



**INSTITUTO SUPERIOR
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
NORTE**

Andrea Teixeira da Cunha

**Análise Populacional e Funcional dos Polimorfismos
Genéticos CYP2D6*4 e CYP2C19*17 do Citocromo P450 e
C3435T do Gene *MDR1***

Dissertação apresentada no Instituto Superior de Ciências da Saúde – Norte para a
obtenção do grau de Mestre em Terapias Moleculares

Orientação:

Professora Doutora Roxana Esmeriz Falcão Moreira
Instituto Superior de Ciências da Saúde – Norte
Departamento de Ciências / Centro de investigação em Ciências da Saúde

Professora Doutora Odília dos Anjos Pimenta Marques de Queirós
Instituto Superior de Ciências da Saúde – Norte
Departamento de Ciências / Centro de investigação em Ciências da Saúde

Julho 2013

AGRADECIMENTOS

Finalizada uma etapa importante da minha vida, não poderia deixar de expressar o meu mais sincero reconhecimento e agradecimento a todos quantos de variadas formas contribuíram para que este trabalho fosse possível e me apoiaram nesta caminhada. Uma caminhada incrivelmente enriquecedora a nível científico, mas também a nível pessoal.

À Professora Doutora Roxana Falcão Moreira, por ter acreditado em mim aceitando-me como sua orientanda, pelo apoio e partilha do saber e pelo exemplo académico de elevada competência. Não poderia deixar de reconhecer todas as palavras de incentivo e a serenidade que sempre me transmitiu. Que encontre aqui a minha mais profunda gratidão e que tenha a certeza da minha respeitosa consideração.

À Professora Doutora Odília Queirós agradeço o privilégio de ter estado sob a sua orientação. Agradeço, ainda, a sua constante e permanente disponibilidade, a forma como me ajudou e me reconfortou ao longo deste percurso. Não tenho palavras para agradecer as horas que me recebeu acompanhando o meu trabalho, dando sempre valiosas contribuições. Pela excelente pessoa que é e pela amiga que se tornou, um muito obrigado.

Um muito obrigado a todos os membros do departamento de Ciências do ISCS-N, sobretudo à Paula e à D^a Margarida pela constante prestabilidade. Um especial agradecimento à Dra. Maria José por toda a disponibilidade e amabilidade que a caracterizam.

Ao Professor Doutor Ricardo Dinis agradeço a dedicação e o precioso contributo científico na leitura atenta desta dissertação.

À centena de alunos e funcionários do ISCS-N que prescindiram de algum do seu tempo para permitir a recolha de amostras.

Aos meus colegas de mestrado, Francisca, Inês, João, Rita, Jorge e Miguel quero agradecer a amizade. À Inês agradeço ainda o carinho que sempre me demonstrou ao longo destes anos.

À Joana e à Juliana agradeço o apoio, a disponibilidade e a amabilidade que sempre me dispensaram. Obrigado por todas as palavras de conforto, pela amizade incondicional, pelo exemplo de profissionalismo e pelas pessoas extraordinárias que são.

Ao espírito de grupo, amizade e sentido de entreaajuda das minhas amigas e colegas de laboratório, Daniela, Diana e Elsa, sempre incansáveis na ajuda. Por todas as conversas que permitiram ultrapassar os momentos de desânimo e sobretudo por todas as gargalhadas partilhadas. A vossa cumplicidade, solidariedade e encorajamento foram imprescindíveis. Agradeço-vos todos os momentos.

Ao Pinto e à Filipa, por serem os melhores amigos que se pode ter, por estarem sempre disponíveis para me aturarem e, sobretudo, por saberem sempre como me ajudar a relativizar os momentos menos bons! Muito, muito obrigado.

Finalmente, queria agradecer infinitamente à minha família pela paciência e compreensão sempre demonstrados. Agradeço aos meus pais, que apesar de longe, são os meus maiores símbolos de luta, por tudo aquilo que me ensinaram e apesar dos momentos de dificuldade que enfrentamos, nunca impediram que me faltasse todo o apoio necessário. Aos meus irmãos, Amélia e Ricardo, por todo o apoio, carinho e bons momentos que me proporcionam desde sempre. Ao Paulo pelo exemplo de coragem, de esforço e de sabedoria. Aos meus queridos sobrinhos, Paulinho, Fábio e Leonor por, em cada sorriso e carinho, serem a minha fonte de inspiração. Ao Luís, pelo amor e carinho com que sempre suportou as muitas horas de má disposição e nervosismo, principalmente na fase final. Obrigado por me ouvires, por me compreenderes e por estares sempre ao meu lado em todos os momentos. Por tudo o que esse apoio representa para mim, a eles dedico este trabalho!

RESUMO

A variabilidade da resposta aos fármacos deve-se, em grande parte, a fatores genéticos. Polimorfismos em genes que codificam enzimas metabolizadoras de xenobióticos, como as enzimas CYP2D6 e CYP2C19 do citocromo P450 (CYP450), e em genes codificantes de proteínas que promovem o seu efluxo, como o gene *MDR1*, codificante da glicoproteína-P (Pgp), podem afetar a eficácia de um tratamento farmacológico ou a sua toxicidade, determinando assim a variabilidade interindividual na resistência a fármacos. Como tal, e porque os genes que codificam estas proteínas são extremamente polimórficos torna-se necessária uma análise genética e funcional aprofundada.

Com o intuito de prever a incidência de algumas variações genéticas na população Portuguesa, procedeu-se ao estudo dos polimorfismos CYP2D6*4 e CYP2C19*17, do CYP450, e C3435T do gene *MDR1*. Estes polimorfismos foram pesquisados quer por PCR-RFLP quer por *High Resolution Melting* (HRM) em amostras de DNA genómico extraído de dadores voluntários do Instituto Superior de Ciências da Saúde - Norte. Os resultados obtidos permitiram identificar diferentes genótipos, tendo-se verificado uma frequência de 7,4% para o polimorfismo CYP2C19*17, de 7,7% para o polimorfismo CYP2D6*4 e, por último, de 13,0% para o polimorfismo C3435T. De forma a complementar o estudo populacional, o polimorfismo C3435T do gene *MDR1* foi também genotipado em linhas celulares tumorais de adenocarcinoma do intestino, HCT-15, HT29-MTX e Caco-2, com o objetivo de determinar a influência da presença do polimorfismo na funcionalidade da Pgp. Assim, foram realizados ensaios de resistência à doxorrubicina, um fármaco antitumoral substrato da Pgp, que permitissem avaliar uma possível relação entre a presença/ausência dos polimorfismos e diferentes perfis de metabolização. Os resultados obtidos demonstraram que a linha celular HCT-15 de genótipo TT apresentou uma maior resistência ao fármaco do que as restantes linhas de genótipo CT. Foi também observado que a linha HCT-15 apresentava uma maior expressão da Pgp, e que esta era induzida após exposição ao fármaco, o que poderá estar associado à presença do polimorfismo C3435T. Contudo, a existência de um perfil genético e metabólico diferente nas linhas celulares utilizadas impossibilita a determinação do papel específico do polimorfismo C3435T na funcionalidade do gene *MDR1* por esta abordagem. Assim, com o intuito de relacionar a presença do polimorfismo com o efluxo da doxorrubicina, efetuou-se a expressão heteróloga do gene *MDR1* na presença e na ausência do polimorfismo na estirpe *Saccharomyces cerevisiae* AD1-8 desprovida dos principais transportadores de fármacos. Os resultados obtidos demonstraram que a proteína apresentava funcionalidade neste sistema heterólogo, demonstrando assim que a levedura *S. cerevisiae* constitui um bom modelo para estudos funcionais de polimorfismos do gene *MDR1* humano.

ABSTRACT

The variability in the response to drugs is largely due to genetic factors. Polymorphisms in genes encoding for xenobiotic metabolizing enzymes, such as the CYP2D6 and CYP2C19 isoforms of the cytochrome P450 system (CYP450), and in genes encoding for proteins that mediate their efflux, such as the *MDR1* gene encoding P-glycoprotein (Pgp), may affect the efficacy of drug therapy, as well as its toxicity, determining the interindividual variability in drug resistance. In this context, and since the genes that encode for these proteins are highly polymorphic, it is necessary to perform detailed genetic and functional analyses.

Aiming to predict the incidence of certain genetic variations in the Portuguese population, the study of the polymorphisms CYP2D6*4 and CYP2C19*17 of the corresponding isoforms of the CYP450 and C3435T corresponding to the *MDR1* gene, has been performed in this work. This screening was carried out in samples of genomic DNA, extracted from volunteer donors of the Instituto Superior de Ciências da Saúde – Norte, by PCR-RFLP and High Resolution Melting (HRM) assays. Different genotypes have been identified in this study, with the following frequency of the homozygous mutant genotype: 7,4%, 7,7% and 13% for the CYP2C19*17, CYP2D6*4 and C3435T polymorphisms, respectively. To complement the population study, C3435T polymorphism of the *MDR1* gene was also genotyped in colorectal adenocarcinoma cell lines, HCT-15, HT29-MTX and Caco-2, in order to determine the influence of the presence of the polymorphism in Pgp functionality. Thus, cytotoxicity assays were performed using the antitumor drug doxorubicin, which is a Pgp substrate, enabling to assess a possible relationship between the presence/absence of the C3435T polymorphism and the corresponding metabolic profiles. The results showed that the HCT-15 cell line, with a TT genotype, had an increased resistance to the drug when compared to the other cell lines, with CT genotype. It was also observed that the HCT-15 cell line showed a higher expression of Pgp, which was induced after exposure to the drug, which can be associated with the presence of the C3435T polymorphism. However, the existence of different metabolic and genetic profiles of the cell lines used make this approach unsuitable to determine the specific role of the polymorphism C3435T in the functionality of the *MDR1* gene. Thus, in order to correlate the presence of the polymorphism with doxorubicin efflux, we performed the heterologous expression of the *MDR1* gene, with or without the polymorphism, in *Saccharomyces cerevisiae* AD1-8 strain, deprived of the main drug transporters. The results showed that the protein was functional in this heterologous system, thus demonstrating that *S. cerevisiae* is a good model for functional studies of the human *MDR1* gene polymorphisms.

ÍNDICE

ADRADECIMENTOS	III
RESUMO	VII
ABSTRACT	XI
ÍNDICE DE TABELAS	XXI
ÍNDICE DE FIGURAS	XXV
ABREVIATURAS	XXIX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Variabilidade genética individual.....	3
1.2. Transporte e metabolismo de xenobióticos	3
1.2.1. Enzimas do citocromo P450	5
1.2.1.1. Variabilidade interindividual na metabolização de fármacos.....	8
1.2.1.2. Relevância do citocromo P450 no cancro	14
1.2.1. Transportadores ABC e Glicoproteína-P	15
1.2.2.1. Mecanismo de ação da glicoproteína-P	17
1.2.2.2. Substratos da glicoproteína-P	18
1.3. Cancro coloretal: prevalência e implicações de variações polimórficas na glicoproteína-P	22
1.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo para expressão heteróloga .	23
1.4.1. Expressão heteróloga de transportadores ABC.....	27
1.5. Objetivos do trabalho	29
2. MATERIAIS E MÉTODOS	31
2.1. Genotipagem da população norte de Portugal	33
2.1.1. Material Biológico.....	33
2.1.2. Extração de DNA genómico de sangue total periférico	33
2.1.2.1. Método de fenol – clorofórmio.....	33
2.1.2.2. Kit comercial	34
2.1.3. Análise da integridade e da concentração do DNA genómico por espectrofotometria e por análise eletroforética em gel de agarose	35
2.1.4. Amplificação do DNA.....	36

2.1.5.	Análise dos polimorfismos por <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>	37
2.1.6.	Análise dos polimorfismos por <i>High Resolution Melting</i>	38
2.1.6.1.	Desenho de <i>primers</i> para a análise dos polimorfismos por HRM	39
2.2.	Análise da variação da expressão da glicoproteína-P em linhas celulares tumorais com diferente genótipo	39
2.2.1.	Material biológico	39
2.2.2.	Crescimento e condições de cultura das linhas celulares	39
2.2.2.1.	Subcultura das linhas celulares	40
2.2.2.2.	Congelamento e descongelamento das linhas celulares	40
2.2.3.	Extração de DNA genómico de linhas celulares	41
2.2.4.	Análise do polimorfismo C3435T nas linhas celulares	41
2.2.5.	Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio SRB	42
2.2.6.	Determinação do IC ₅₀ para a doxorrubicina	42
2.2.7.	Avaliação da expressão da glicoproteína-P	43
2.2.7.1.	Extração e quantificação de proteínas	43
2.2.7.2.	Separação de proteínas por SDS-PAGE	44
2.2.7.3.	<i>Western-Blot</i>	44
2.3.	Estudo da expressão do gene <i>MDR1</i> na presença e ausência do polimorfismo C3435T em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
2.3.1.	Material biológico	45
2.3.1.1.	Plasmídeos	45
2.3.1.2.	Estirpes de levedura e estirpe de bactéria	46
2.3.2.	Crescimento e condições de cultura	46
2.3.3.	Extração de DNA plasmídico	47
2.3.4.	Digestão do DNA plasmídico com enzimas de restrição	48
2.3.5.	Purificação de fragmentos de DNA	48
2.3.6.	Ligação de fragmentos de DNA	49
2.3.7.	Preparação de células competentes	49
2.3.8.	Transformação em <i>Escherichia coli</i>	50

2.3.9.	Clonagem do gene <i>MDR1</i> nos vetores p416-GPD e pUG35 e expressão em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pelo método de <i>Gap Repair</i>	50
2.3.10.	Inserção do polimorfismo C3435T no gene <i>MDR1</i> por mutagênese dirigida 52	52
2.3.11.	Transformação da levedura pelo método de acetato de lítio	53
2.3.12.	Avaliação da localização celular da glicoproteína-P por microscopia de fluorescência	54
2.3.13.	Avaliação do crescimento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com diferentes genótipos em diferentes meios	54
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3.1.	Genotipagem dos polimorfismos CYP2C19*17, CYP2D6*4 e C3435T da população norte de Portugal	57
3.1.1.	Frequência do polimorfismo CYP2C19*17	57
3.1.2.	Frequência do polimorfismo CYP2D6*4	61
3.1.3.	Frequência do polimorfismo C3435T	64
3.2.	Análise funcional do polimorfismo C3435T do gene <i>MDR1</i> em linhas celulares de cancro colorctal	66
3.2.1.	Genotipagem do polimorfismo C3435T em diferentes linhas celulares de cancro colorctal	67
3.2.2.	Associação entre o polimorfismo C3435T do gene <i>MDR1</i> e a resistência ao fármaco antitumoral doxorubicina	68
3.2.3.	Influência do polimorfismo C3435T na expressão do gene <i>MDR1</i>	69
3.3.	Análise funcional do gene <i>MDR1</i> e do seu polimorfismo C3435T por expressão heteróloga em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	71
3.3.1.	Expressão do gene <i>MDR1</i> em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	72
3.3.2.	Avaliação funcional do polimorfismo C3435T em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	77
3.3.3.	Localização celular da glicoproteína-P em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> transformada com o gene <i>MDR1</i> humano	79
4.	DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÃO	81
5.	PERSPETIVAS FUTURAS	93
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Importância dos polimorfismos CYP no metabolismo de fármacos e carcinogêneos.....	10
Tabela 2: Polimorfismos mais frequentes no gene CYP2D6 em diferentes populações.	12
Tabela 3: Polimorfismos mais frequentes no gene CYP2C19 em diferentes populações..	14
Tabela 4: Diferentes classes de substratos da Pgp.....	18
Tabela 5: Polimorfismos mais frequentes no gene <i>MDR1</i> na população portuguesa e caucasiana	21
Tabela 6: Marcas de seleção, promotores e terminadores de transcrição mais utilizados em tecnologia do DNA recombinante em <i>S. cerevisiae</i>	25
Tabela 7: Descrição da função de cada gene deletado na estirpe de <i>S. cerevisiae</i> AD1-8....	28
Tabela 8: Sequência dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação dos fragmentos de DNA genómico, contendo a zona dos polimorfismos em estudo.	36
Tabela 9: Condições de PCR utilizadas para a amplificação das zonas de DNA genómico, contendo os polimorfismos em estudo.	37
Tabela 10: Condições de HRM utilizadas para a amplificação e análise das zonas de DNA genómico, contendo os polimorfismos em estudo.	38
Tabela 11: Sequência dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação dos fragmentos de DNA genómico contendo a zona dos polimorfismos em estudo, por HRM.	39
Tabela 12: Plasmídeos utilizados no estudo e respetiva descrição.....	45
Tabela 13: Estirpes de levedura <i>S. cerevisiae</i> utilizadas neste estudo e respetivos genótipos.	46
Tabela 14: Sequência dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação do DNA correspondente ao gene <i>MDR1</i>	51
Tabela 15: Sequência dos <i>primers</i> utilizados para a substituição de uma timina por uma citosina no cDNA correspondente ao gene <i>MDR1</i> , inserido no plasmídeo p416-GPD.....	53
Tabela 16: Frequências alélicas e genotípicas detetadas na população em estudo, e frequências descritas na população caucasiana.	61
Tabela 17: Frequências alélicas e genotípicas detetadas na população em estudo e frequências descritas na população portuguesa.	63
Tabela 18: Frequências alélicas e genotípicas detetadas na população em estudo e frequências descritas na população caucasiana.	66
Tabela 19: Valores de IC ₅₀ para a doxorrubicina, obtidos pelo ensaio de SRB, nas linhas celulares HCT-15, Caco-2 e HT29-MTX e respetivos genótipos obtidos por PCR-RFLP e HRM.	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Níveis de expressão hepática e contribuição das diferentes enzimas do citocromo P450 envolvidas na biotransformação de diversos fármacos, onde as famílias CYP3A4, CYP2D6 e CYP2C19 desempenham um importante papel.....	6
Figura 2: Estrutura cristalina do citocromo P450 humano.....	7
Figura 3: Ciclo catalítico das enzimas do citocromo P450.....	7
Figura 4: Representação esquemática da estrutura da glicoproteína-P.....	16
Figura 5: Modelo representativo do mecanismo de ação da glicoproteína-P.	17
Figura 6: Efeito da presença do polimorfismo C3435T na conformação da Pgp.....	20
Figura 7: Representação esquemática do método <i>Gap Repair</i>	51
Figura 8: Processo de inserção de uma mutação num fragmento de DNA por mutagenese dirigida.....	52
Figura 9: Representação esquemática da genotipagem por PCR-RFLP do polimorfismo CYP2C19*17.....	58
Figura 10: Representação esquemática da análise eletroforética dos produtos de PCR-RFLP com a enzima de restrição <i>NsiI</i> para o polimorfismo CYP2C19*17.....	58
Figura 11: Resultados da análise da curva de <i>melting</i> do DNA genómico, para a amplificação de uma região de 100 pb, contendo o polimorfismo CYP2C19*17.....	59
Figura 12: Representação esquemática da análise eletroforética dos produtos de PCR-RFLP com a enzima de restrição <i>BstNI</i> para o polimorfismo CYP2D6*4.....	62
Figura 13: Resultados da análise da curva de <i>melting</i> do DNA genómico, para a amplificação de uma região de 74 pb, contendo o polimorfismo CYP2D6*4.....	62
Figura 14: Representação esquemática da análise eletroforética dos produtos de PCR-RFLP com a enzima de restrição <i>MboI</i> para o polimorfismo C3435T.....	64
Figura 15: Resultados da análise da curva de <i>melting</i> do DNA genómico, para a amplificação de uma região de 74 bp, contendo o polimorfismo C3435T.....	65
Figura 16: Análise eletroforética em gel de acrilamida 8% referente à análise do genótipo das diferentes linhas celulares: Caco-2, HT29-MTX e HCT-15.....	67
Figura 17: Resultados da análise da curva de <i>melting</i> do DNA genómico das linhas celulares, para uma amplificação de uma região de 74 pb, que contém o polimorfismo C3435T.	68
Figura 18: Perfil de expressão da Pgp em três linhas celulares (HCT-15, Caco-2, HT29-MTX) expostas e não expostas à doxorrubicina, por <i>Western-blot</i>	70
Figura 19: Representação esquemática da estirpe AD1-8 da <i>S. cerevisiae</i> , mutada nos transportadores de membrana Pdr5, Pdr10, Pdr11, Pdr15, Snq2 e Yor1, no fator de resistência ao metal Ycf1 e no fator de transcrição Pdr3.....	71

Figura 20: Representação do vetor comercial pCR-XL-TOPO_MDR1 contendo o cDNA do gene <i>MDR1</i> .	72
Figura 21: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de digestão, com as enzimas de restrição <i>Bam</i> HI e <i>Xba</i> I, dos plasmídeos p416-GPD e pCR-XL-TOPO_MDR1, para posterior clonagem do gene <i>MDR1</i> no vetor p416-GPD.	73
Figura 22: Construção e mapa do plasmídeo recombinante p416-GPD-MDR1.	73
Figura 23: Mapa de restrição do plasmídeo p416-GPD-MDR1 e eletroforese em gel de agarose dos fragmentos resultantes da digestão do plasmídeo recombinante p416-GPD-MDR1.	74
Figura 24: Fenótipo de crescimento das estirpes de <i>S. cerevisiae</i> W303-1A, AD1-8-p416-GPD e AD1-8-MDR1 em meio YPD suplementado com diferentes concentrações de doxorubicina (0 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M e 50 μ M), após 72h de incubação a 30°C.	75
Figura 25: Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos resultantes da digestão enzimática com as enzimas <i>Bam</i> HI e <i>Xho</i> I do plasmídeo p416-MDR1-GR, obtido por <i>gap repair</i> e respetivo mapa do plasmídeo p416-MDR1-GR.	76
Figura 26: Fenótipo de crescimento das estirpes de <i>S. cerevisiae</i> W303-1A, AD1-8-MDR1-GR (AD1-8 transformada pelo método <i>gap repair</i> com o gene <i>MDR1</i> sem as regiões 5' e 3' UTR), AD1-8-MDR1 (AD1-8 transformada com o gene <i>MDR1</i> contendo as regiões 5' e 3' UTR) e AD1-8-p416-GPD em meio YPD suplementado com diferentes concentrações de doxorubicina (0 μ M, 5 μ M, 10 μ M) após 48h de incubação a 30°C.	76
Figura 27: Análise eletroforética em gel de agarose do produto resultante da mutagénesis dirigida após PCR-RFLP com a enzima <i>Mbo</i> I.	78
Figura 28: Fenótipo de crescimento das estirpes de <i>S. cerevisiae</i> AD1-8-p416-GPD, AD1-8-MDR1-GR (AD1-8 transformada pelo método <i>gap repair</i> com o gene <i>MDR1</i>), e AD1-8-MDR1-GR-C3435T (AD1-8 transformada com o gene <i>MDR1</i> contendo o polimorfismo C3435T) em meio YPD suplementado com diferentes concentrações de doxorubicina (0 μ M, 5 μ M, 10 μ M) após 48h de incubação a 30°C.	78
Figura 29: Determinação, por microscopia de fluorescência, da localização da Pgp codificada pelo gene <i>MDR1</i> em fusão com a proteína GFP na estirpe AD1-8 crescida em YNB glicose e em YNB glicose suplementado com glicerol 10%.	80

ABREVIATURAS

A	
ABC	<i>ATP-Binding Cassete</i>
ADR	<i>Adverse Drugs Reaction</i>
Amp	Ampicilina
ATP	Adenosina Trifosfato
C	
°C	Graus Celsius
C	Citosina
cdNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CYP450	Citocromo P450
D	
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
D.O.	Densidade ótica
E	
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EM	Metabolizadores Extensivos
F	
FBS	Soro Bovino Fetal
Fwd	<i>Forward</i>
G	
G	Guanina
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
H	
h	Hora
HRM	<i>High Resolution Melting</i>
I	
IM	Metabolizadores Intermediários

K	
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
L	
LB	<i>Luria-Bertani</i>
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
M	
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MDR1	<i>MultiDrug Resistance 1</i>
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Militros
mM	Milimolar
N	
ng	Nanogramas
nm	Nanómetros
O	
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
P	
pb	Pares de Bases
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDR	Resistência Pleiotrópica a Fármacos
Pgp	Glicoproteína-P
PM	Metabolizadores Pobres
p/v	Peso por volume
R	
Rev	<i>Reverse</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNA^m	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações Por Minuto

S	
s	Segundos
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SGDP	<i>Saccharomyces Genome Deletion Project</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SRB	Sulforrodamina B
T	
T	Timina
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propamo-1,3-diol
TBST	<i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i>
TCA	Ácido Tricloroacético
U	
UM	Metabolizadores Ultrarrápidos
V	
v	Volt
v/v	Volume por volume
Y	
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar

1. INTRODUÇÃO

1.1. Variabilidade genética individual

Numa população, os cromossomas são bastante semelhantes entre si; no entanto, em determinadas localizações do cromossoma, pode existir variabilidade na sequência do DNA (Ácido Desoxirribonucleico) (Sripichai and Fucharoen 2007). A sequenciação do genoma humano permitiu identificar essa variabilidade e esclarecer de que forma é que esta variabilidade poderá estar associada a diferentes susceptibilidades (Chakravarti 2001). As diferenças na sequência do DNA entre indivíduos de uma população, são conhecidas como mutações. As mutações génicas são importantes para a evolução biológica, uma vez que levam a uma diversidade genética que pode ser expressa como uma variabilidade de características. Quando as diferenças na sequência do DNA estão presentes numa frequência maior do que 1%, são chamadas de polimorfismos. Os polimorfismos eram inicialmente entendidos como funcionalmente insignificantes, embora atualmente sabe-se que os polimorfismos são capazes de afetar as propriedades intrínsecas e a função proteica num grau variável, apresentando por isso significado funcional (Andreassen, Alsner et al. 2002). Os *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) são os polimorfismos mais abundantes no genoma humano e consistem na alteração de um único nucleótido de uma determinada sequência de DNA (Sripichai and Fucharoen 2007). Devido à sua abundância no genoma têm muito interesse na clínica, uma vez que podem ser utilizados como marcadores de genes que são responsáveis por determinadas doenças e, por isso, são um alvo potencial na farmacogenética (Sobrinho, Brion et al. 2005). Evidências apontam para que o risco para determinadas doenças, tais como o cancro, seja bastante influenciado pelos padrões de SNPs de um indivíduo. Os SNPs podem ser encontrados quer nas regiões codificantes dos genes, como em intrões e nas regiões intergénicas. Contudo, é importante referir que, quando o SNP se encontra na região codificante, esta variação não tem necessariamente que alterar a sequência de aminoácidos da proteína produzida, devido à degeneração do código genético (Lee and Kim 2011). Apesar disso, os SNPs encontrados nas regiões codificantes são de particular interesse científico porque são mais propensos a alterar a função biológica da proteína codificada.

1.2. Transporte e metabolismo de xenobióticos

Todos os organismos estão constantemente em contacto com compostos químicos estranhos ao organismo, que quando acumulados nas células podem tornar-se um problema adicional. Estes compostos são chamados de xenobióticos. Assim, os organismos

vivos necessitaram de criar mecanismos de defesa perante níveis tóxicos de xenobióticos a que estão expostos. Para tal, os organismos usam as membranas celulares como barreiras de permeabilidade hidrofóbica, para controlar o seu acesso ao seu ambiente interno. Os compostos polares não conseguem difundir-se através dessas membranas, sendo a sua captação mediada através de proteínas de transporte que selecionam especificamente substratos do meio extracelular (Yoo and Lee 2011). Contudo, a difusão de compostos hidrofóbicos através destas barreiras não pode ser controlada e desta forma, os organismos não conseguem excluir os xenobióticos lipossolúveis. Assim, surgiram sistemas que metabolizam praticamente qualquer composto não polar, permitindo a biotransformação dos xenobióticos. A biotransformação dos xenobióticos é realizada sobretudo pelo sistema do citocromo P450 (CYP450) dependente de monoxigenases e reações envolvendo uma série de transferases que catalisam reações de conjugação de xenobióticos com uma variedade de moléculas endógenas, como o ácido glicurónico, sulfato, acetato e alguns aminoácidos. Estas reações favorecem em geral a excreção, em que os xenobióticos acabam por ser captados por transportadores de efluxo e levados para o exterior da célula (Goodman, Gilman et al. 2008). A ocorrência concertada destas reações de metabolização permite geralmente destoxificar e remover os xenobióticos das células, uma vez que o produto final destas vias é um produto mais polar e hidrossolúvel, sendo mais facilmente eliminável através de sistemas de excreção como a urina. Sem essa biotransformação, os xenobióticos lipofílicos seriam excretados tão lentamente, que acabariam por se acumular, conduzindo à toxicidade (Casarett and Doull's 2001). De facto, muitos fármacos e outros produtos químicos do ambiente, bem como compostos endógenos, são lipofílicos. Assim, têm de ser metabolizados de forma a tornarem-se mais hidrossolúveis, para serem posteriormente excretados, principalmente através dos rins (Johansson and Ingelman-Sundberg 2011)

O metabolismo de fase I consiste na oxidação, redução ou hidrólise do xenobiótico (Robert, Morvan et al. 2005). Este metabolismo pode ocorrer durante a absorção do xenobiótico, no intestino ou no fígado, antes que o xenobiótico atinja a circulação sistémica. As reações desta fase introduzem um grupo funcional polar no composto, com a finalidade de aumentar a hidrossolubilidade dos compostos. A metabolização geralmente implica menor reatividade, mas existem exemplos de manutenção ou aumento da atividade após essa biotransformação. É o caso dos pró-fármacos, compostos farmacologicamente inativos que são rapidamente convertidos em metabolitos ativos por enzimas, frequentemente pela hidrólise de uma ligação éster ou amida (Leucuta and Vlase

2006). A metabolização de xenobióticos pode também ativar procarcinogêneos em compostos cancerígenos (Robert, Morvan et al. 2005).

Após a metabolização de fase I, os compostos seguem para o metabolismo de fase II. As reações de fase II envolvem uma série de transferases que catalisam reações de conjugação de xenobióticos com uma variedade de moléculas endógenas; a molécula resultante é quase sempre inativa e menos lipofílica que o seu precursor. Estas reações levam à formação de uma ligação covalente entre o grupo funcional no fármaco ou o metabolito de fase I com moléculas endógenas (Rollason, Samer et al. 2008). As transferases que medeiam as reações de fase II são importantes não só para a eliminação de fármacos, mas também para destoxificar os metabolitos, que são principalmente formados no metabolismo anterior (Leucuta and Vlase 2006). Tais conjugados, altamente polares, geralmente são inativos e excretados rapidamente, por exemplo, na urina ou nas fezes.

1.2.1. Enzimas do citocromo P450

O sistema CYP450 foi primeiramente reconhecido por Martin Klingenberg, em 1958, quando estudava as propriedades espectralfotométricas de pigmentos em frações microssomais preparadas a partir de fígados de ratos (Klingenberg 1958). Quando um agente redutor (ditiotionito de sódio) foi adicionado à solução contendo monóxido de carbono, surgiu uma banda de absorvância espectral com cerca de 450 nm. Essa banda de 450 nm foi identificada como sendo uma hemoproteína e serve de assinatura às proteínas P450 (Omura and Sato 1962; Hasler, Estabrook et al. 1999). As proteínas P450 são codificadas por genes pertencentes a uma superfamília (CYP) que contém mais de 40 membros (Kudzi, Dadoo et al. 2010). Os genes do sistema CYP450, para além de se encontrarem presentes em humanos, foram também identificados em animais, plantas, bactérias e leveduras (Ito, Kondo et al. 2008).

A nomenclatura dos P450s surgiu em 1987 por Nebert e colaboradores, que os classificaram em famílias, subfamílias e genes individuais, sendo a abreviatura “CYP” referente a citocromo, utilizada nos humanos. Para classificar a família, utiliza-se um número árabe (ex. CYP3), sendo que as isoenzimas são agrupadas na mesma família, se apresentarem mais de 40% de homologia na sequência de aminoácidos. Quanto à subfamília, representa-se por uma letra (ex. CYP3A), sendo que membros da mesma subfamília devem ter mais de 60% de homologia. Por último, os genes individuais serão representados por outro número árabe (ex. CYP3A5) (Nebert, Adesnik et al. 1987). A superfamília CYP em humanos contém 57 genes funcionais e 58 pseudogenes, tendo as

famílias 1, 2 e 3 um papel preponderante no metabolismo de xenobióticos, contribuindo para a biotransformação de mais de 90% dos fármacos em uso clínico (Zhou, Liu et al. 2009; Li and Bluth 2011). Através da avaliação da expressão específica das enzimas do CYP450, verificou-se que a enzima mais ubíqua é a CYP3A4, sendo deste modo considerada a mais importante (Roberts, Moore et al. 2013). A figura 1 representa os níveis de expressão hepática e a participação de cada enzima na metabolização.

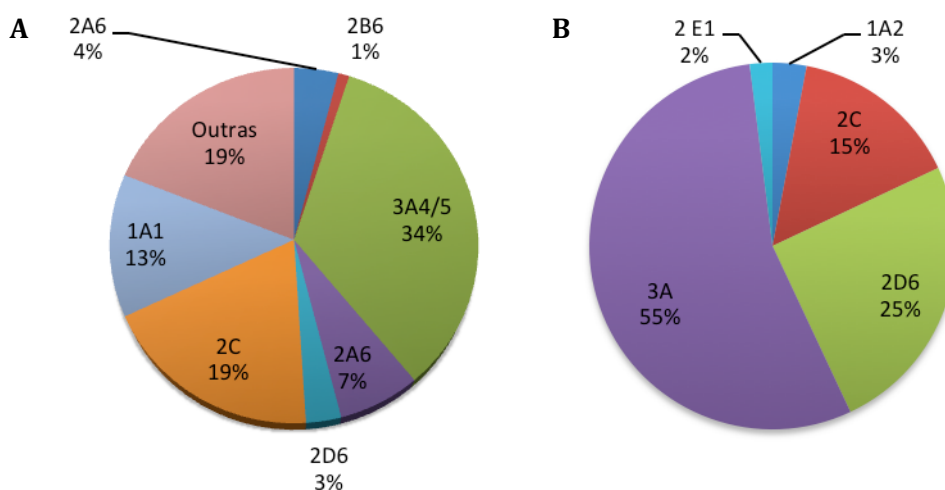


Figura 1: Níveis de expressão hepática (A) e contribuição das diferentes enzimas do citocromo P450 envolvidas na biotransformação de diversos fármacos (B), onde as famílias CYP3A4, CYP2D6 e CYP2C19 desempenham um importante papel adaptado de (Bradford 2005).

Estrutura e função

As isoformas do CYP450 são hemoproteínas intracelulares que ativam o oxigênio molecular para o metabolismo oxidativo de uma grande variedade de produtos químicos orgânicos lipofílicos (Hasler, Estabrook et al. 1999). A maioria dos CYP450 é formada por 400 a 500 aminoácidos, dos quais cerca de 55% são de natureza polar. O grupo heme é constituído essencialmente por protoporfirina IX, sendo o ligando axial do ferro um resíduo de cisteína localizado próximo da região carboxi-terminal da proteína (Gonzalez and Korzekwa 1995) (figura 2). A propriedade mais importante de todas as enzimas do citocromo é a capacidade de ligação do grupo heme a dois átomos de oxigênio e a sua posterior ativação.

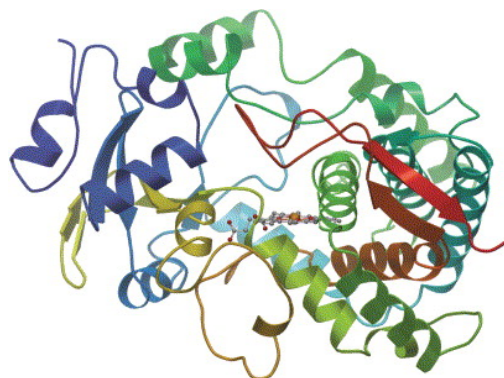


Figura 2: Estrutura cristalina do citocromo P450 humano. O N-terminal encontra-se demonstrado a azul e o C-terminal em vermelho, as partes intermediárias da sequência encontram-se a verde e amarelo. O grupo heme, local de metabolismo oxidativo de muitos xenobióticos, encontra-se no centro retirado de (Congreve, Murray et al. 2005)

A reação catalisada pela maioria dos CYP450 (figura 3) baseia-se na ligação do substrato (RH), a um local perto do grupo heme, seguida de uma mudança conformacional que leva à redução do ferro (Fe^{3+} a Fe^{2+}) e à ligação de uma molécula de oxigénio no seu lugar (Anzenbacher and Anzenbacherova 2001).

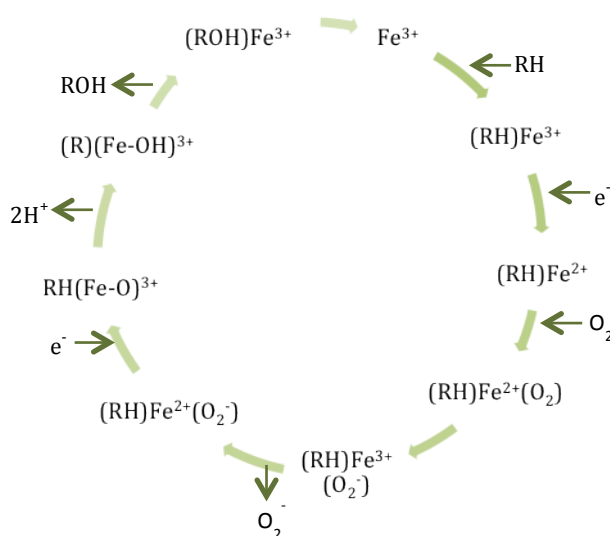


Figura 3: Ciclo catalítico das enzimas do citocromo P450. O CYP450, que contém ferro (Fe^{3+}), combina-se com um substrato (RH). Este complexo recebe um eletrão proveniente do NADPH, reduzindo o ferro a Fe^{2+} , combinando-se, de seguida, com o oxigénio molecular (O_2). Combina-se, ainda, com um protão proveniente do H_2O_2 e um segundo eletrão (do NADPH). Este complexo combina-se com outro protão, produzindo água e um complexo férrico $\text{RH}(\text{FeO})^{3+}$. O $(\text{FeO})^{3+}$ remove um átomo de hidrogénio do RH, formando radicais livres, libertação do substrato oxidado (ROH) e a regeneração da enzima CYP450 adaptado de (Anzenbacher and Anzenbacherova 2001).

A maior concentração de enzimas do CYP450 envolvidas na biotransformação de xenobióticos encontra-se no retículo endoplasmático do fígado (microsomas), sendo este o órgão mais envolvido no metabolismo de xenobióticos. As enzimas microsomais hepáticas do CYP450 desempenham um papel muito importante na determinação da intensidade e duração de reatividade do xenobiótico, assim como, na sua destoxificação

(Casarett and Doull's 2001; Ekhart, Rodenhuis et al. 2009). Além disso, também são importantes na biossíntese e degradação de endobióticos, tais como esteroides, lípidos e vitaminas (Ekhart, Rodenhuis et al. 2009). As enzimas do CYP450 também estão expressas nos enterócitos, no epitélio do intestino delgado, nos rins e nos pulmões. A mucosa intestinal é provavelmente o local extrahepático mais importante na metabolização de xenobióticos enquanto que o rim, é dos órgãos mais importantes na sua excreção (Sistonen, Fuselli et al. 2005).

1.2.1.1. Variabilidade interindividual na metabolização de fármacos

Existem grandes diferenças interindividuais na capacidade de metabolizar e de destoxificar fármacos e outros xenobióticos. Estas diferenças podem ser de origem genética, epigenética, ambiental e fisiopatológica. Em muitos casos, no entanto, foi demonstrado que os fatores genéticos possuem uma maior influência sobre a disposição de fármacos (Ekhart, Rodenhuis et al. 2009; Johansson and Ingelman-Sundberg 2011). A farmacogenética estuda a relação entre o património genético de um indivíduo e a sua resposta individual a fármacos. As características hereditárias que determinam a resposta farmacológica podem ser mutações raras ou polimorfismos genéticos (Kalow 1991). A suscetibilidade individual para a toxicidade após a metabolização é frequentemente dependente de polimorfismos nas enzimas de fase I e II (Ekhart, Rodenhuis et al. 2009; Johansson and Ingelman-Sundberg 2011).

A classificação tradicional de fenótipos atribuída ao CYP450 tem como base o nível de atividade da proteína codificada, dividindo-se em quatro subpopulações fenotípicas de indivíduos, com diferentes frequências populacionais: metabolizadores pobres (PM), em que ambos os alelos não estão funcionais; metabolizadores intermediários (IM), nos quais os dois alelos podem ter uma função diminuída ou, então, um dos alelos encontrar-se não funcional enquanto o outro alelo possui uma função diminuída; metabolizadores extensivos (EM), onde ambos os alelos se encontram com a sua função normal, e metabolizadores ultrarrápidos (UM), nos quais pode existir um aumento da atividade enzimática ou uma duplicação do gene (Correia, Almeida et al. 2010; Lee 2012). Os UM possuem uma quantidade aumentada de enzima proporcional ao número de cópias do gene, uma vez que a região do promotor e elementos reguladores que controlam a transcrição de genes também se encontram duplicados ou ainda devido a uma maior expressão enzimática (Johansson and Ingelman-Sundberg 2011). Nos pacientes UM, as posologias habituais são muitas vezes ineficazes, já que o fármaco é metabolizado tão

rapidamente que não permanece tempo suficiente no organismo para fazer o efeito desejado (Dorado, Caceres et al. 2005). Além disso, pode também causar toxicidade quando o metabolito é mais ativo ou reativo do que o composto original. As mutações que resultam na deficiência da enzima correspondem essencialmente a defeitos de *splicing*, mutações *missense* e deleções de genes (Lodish, Berk et al. 2000). Existem diversas mutações que provocam a instabilidade da enzima e subsequente diminuição da sua atividade, levando à redução da ligação do substrato (Johansson and Ingelman-Sundberg 2011). Assim, um indivíduo PM metaboliza de forma tão lenta um fármaco que este, ao acumular-se no organismo, pode dar origem a derivados tóxicos (Dorado, Caceres et al. 2005). Além disso, um indivíduo tratado concomitantemente tratado com fármaco inibidor de uma enzima CYP, terá um fenótipo semelhante a um indivíduo PM.

O genótipo de um indivíduo, e nomeadamente a presença de SNPs (embora de forma não exclusiva), determina a sua suscetibilidade desse indivíduo a uma determinada doença ou a sua resposta a fármacos, podendo causar reações adversas a fármacos (*adverse drugs reactions* - ADRs) (Sripichai and Fucharoen 2007). Uma grande parte das ADRs ocorrem devido à ativação metabólica do fármaco, causando produtos reativos ou toxicidade no organismo (Johansson and Ingelman-Sundberg 2011). A ocorrência frequente de ADRs e de falhas no tratamento contribui significativamente para os elevados encargos económicos na saúde no mundo inteiro, estando as ADRs nas dez principais causas de morte (Drogemoller, Wright et al. 2010). Tem sido argumentado que, através da implementação de estudos farmacogenómicos, a taxa de ADRs pode ser reduzida em cerca de 10 a 20%, aumentando assim a eficiência do fármaco. Os genes que codificam as enzimas do CYP450 têm sido demonstrados como bons candidatos para este tipo de estudos (Drogemoller, Wright et al. 2010), uma vez que o CYP450 (principalmente as famílias 1 a 3) é responsável por cerca de 80% da fase I do metabolismo de fármacos utilizados na prática clínica. De entre estes, as enzimas polimórficas CYP2C9, CYP2D6 e CYP2C19 metabolizam cerca de 40% (Sim, Risinger et al. 2006). Os fármacos podem ser metabolizados por uma única dessas enzimas (por exemplo, metoprolol pela CYP2D6) ou por um conjunto de enzimas (por exemplo, a varfarina pelo CYP1A2, CYP2D6 e CYP3A4). Além disso, um fármaco pode ainda atuar como inibidor de uma enzima CYP, provocando interações com outros fármacos (Lynch and Price 2007; Ekhardt, Rodenhuis et al. 2009). Assim como, os polimorfismos nos genes dos transportadores de fármacos podem influenciar a capacidade de absorção, distribuição e excreção dos mesmos. Vários estudos demonstraram o potencial da genotipagem dos polimorfismos na previsão da farmacocinética, assim como na prevenção de efeitos adversos. Desta forma, deve ter-se

em atenção que a toxicidade dos fármacos e a eficácia do tratamento são determinadas pela interação de múltiplos genes (Ekhart, Rodenhuis et al. 2009).

No momento da administração de um fármaco, a abordagem ideal seria a realização de avaliações de absorção, distribuição, metabolismo e excreção, de acordo com os parâmetros farmacodinâmicos e farmacocinéticos do fármaco em questão. Contudo, a realização desse procedimento a cada início de tratamento e para a população em geral é inviável (Dorado, Caceres et al. 2005). Em alternativa, usam-se valores baseados em ensaios clínicos que permitem dados que são aceites como representativos para a população em geral.

Segundo a *Food and Drug Administration*, as diferenças interindividuais no metabolismo dos fármacos são provocadas na maioria pelas enzimas polimórficas CYP2C9, CYP2C19 e CYP2D6 (Johansson and Ingelman-Sundberg 2011). As três principais famílias CYP referidas possuem um elevado número de polimorfismos, em comparação com as restantes (Johansson and Ingelman-Sundberg 2011). Os alelos polimórficos mais frequentes relativamente à toxicidade dos fármacos encontram-se detalhados na tabela seguinte (tabela 1):

Tabela 1: Importância dos polimorfismos CYP no metabolismo de fármacos e carcinogéneos.

Enzima	Substratos	Frequência polimórfica	Efeitos funcionais	Polimorfismos mais frequentes	Referência
CYP1A2	Fármacos, carcinogéneos	Elevada	Raro	CYP1A2*1F, *1K	Rodriguez-Antona and Ingelman-Sundberg 2006
CYP1B1	Carcinogéneos, estrogénios	Raro	Cerca de 7 haplótipos com atividade semelhante	CYP1B1*7	
CYP2A6	Nicotina, fármacos, carcinogéneos	Elevada orientais, diminuída em caucasianos	Importante no metabolismo da nicotina	CYP2A6*1B, *4, *9, *12	
CYP2B6	Fármacos	Elevada	Redução da metabolização	CYP2B6*5, *6, *16	
CYP2C8		Elevada	Redução da metabolização	CYP2C8*3	
CYP2C9		Raro em caucasianos	Muito significativo	CYP2C9*2, *3	
CYP2C19		Elevada	Muito significativo	CYP2C19*2, *3, *17	
CYP2D6		Muito elevada	Muito significativo	CYP2D6*2xn, *4, *5, *10, *17	
CYP3A4		Fármacos, carcinogéneos	Baixa	Raro	
CYP3A5	Elevada		Significativo	CYP3A5*3, *6, *7	
CYP3A7	Baixa		Algum	CYP3A7*2	

O CYP2D6 é um membro da superfamília do CYP450 que está localizado no braço longo do cromossoma 22 e codifica a enzima debrisoquina hidroxilase, de 497 aminoácidos, tratando-se de um gene extremamente polimórfico (Levo, Koski et al. 2003; Zackrisson, Holmgren et al. 2004; Ingelman-Sundberg 2005). O CYP2D6 representa apenas 1 a 5% da expressão total de genes de enzimas do sistema CYP450 no fígado, mas é responsável pelo metabolismo de mais 25% dos fármacos comumente prescritos, incluindo antipsicóticos, antidepressivos, antiarrítmicos e bloqueadores β , etc (Teh and Bertilsson 2012). Além disso, num contexto oncológico, possui um papel fundamental na conversão do tamoxifeno em produtos 50 a 100 vezes mais potentes, nomeadamente o hidroxitamoxifeno e o endoxifeno, modulador do recetor de estrogénio amplamente utilizado para o tratamento do cancro da mama. Assim, tratamentos que envolvam a atividade do CYP2D6 são de extrema importância, pois polimorfismos no gene CYP2D6 podem conduzir a uma menor formação de 4-hidroxitamoxifeno e endoxifeno e, portanto, levar a uma falha terapêutica em pacientes com cancro (Rodriguez-Antona and Ingelman-Sundberg 2006; Ekhardt, Rodenhuis et al. 2009).

Por sua vez, os genes CYP2C humanos (CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 e CYP2C19) estão organizados em *clusters* no braço longo do cromossoma 10 (Ruas and Lechner 1997; Lee 2012). Estas enzimas são todas essencialmente expressas no fígado, com a exceção da CYP2C18, que parece estar expressa na pele e estão envolvidas no metabolismo de cerca de 20% dos fármacos utilizados (Rodriguez-Antona and Ingelman-Sundberg 2006; Lee and Kim 2011). De entre esta subfamília, a isoenzima CYP2C9 é a mais abundante, representando cerca de 18% dos CYPs hepáticos (Zand, Tajik et al. 2006). Já a isoenzima CYP2C19 representa cerca de 3% (Zand, Tajik et al. 2006), sendo, no entanto, a enzima mais polimórfica (Lee 2012). As enzimas CYP2C, sobretudo a CYP2C19, catalisam a ativação da ciclofosfamida, agente antitumoral utilizado no tratamento, por exemplo, de leucemias (Rodriguez-Antona and Ingelman-Sundberg 2006). A CYP2C19 (S-mefenitoína hidroxilase) é uma proteína de 490 aminoácidos (Ruas and Lechner 1997; Zackrisson, Holmgren et al. 2004) que metaboliza um largo número de fármacos, como inibidores de bomba de prótons (como o omeprazol), antidepressivos tricíclicos, inibidores da recaptção de serotonina, anticoagulantes (como a varfarina), antidepressivos, benzodiazepinas (como o diazepam), barbitúricos e, ainda, participa no metabolismo do tamoxifeno (Ferguson, De Moraes et al. 1998) (Rodriguez-Antona and Ingelman-Sundberg 2006; Sim, Risinger et al. 2006).

Polimorfismos nos genes CYP2D6 e CYP2C19 e relevância clínica

O primeiro polimorfismo nas enzimas do CYP450 foi publicado em meados dos anos 70, quando foi reportada a existência de elevadas concentrações plasmáticas de debrisoquina (antihipertensor) e esparteína (antiarrítmico) em indivíduos com polimorfismo na isoforma CYP2D6 e tratados com estes fármacos (Johansson and Ingelman-Sundberg 2011). Desde então, mais de 110 variações alélicas foram já descritas para esta isoforma (Ingelman-Sundberg, Daly et al.). O gene CYP2D6 é um dos genes do CYP450 mais estudados e correlações entre o fenótipo e o genótipo têm sido extensivamente analisadas para vários fármacos. Vários estudos relatam que doentes com cancro da mama e que são portadores de alelos CYP2D6 não-funcionais, como o CYP2D6*4, *5, *10 ou *41, têm períodos mais curtos sem recidiva e piores taxas de sobrevivência (Anzenbacher and Anzenbacherova 2001). A importância clínica dos polimorfismos do gene CYP2D6 está relacionada com a probabilidade de reações adversas entre os indivíduos PM, pois uma metabolização deficiente acarreta um aumento da concentração do fármaco no organismo, com aumento de efeitos colaterais (Bijl, Visser et al. 2008). Na tabela 2 encontram-se alguns SNPs mais frequentes no CYP2D6.

Tabela 2: Polimorfismos mais frequentes no gene CYP2D6 em diferentes populações.

Polimorfismo	Genótipo	Incidência (%)	População	Referência
CYP2D6*2	UM	10-20	Caucasiana	(Neafsey, Ginsberg et al. 2009)
CYP2D6*3	PM	1-3	Sueca / Alemã	
CYP2D6*4	PM	20	Caucasiana	(Bijl, Visser et al. 2008)
		24,6	Portuguesa	(Lemos, Carrilho et al. 2007)
		13,3	Portuguesa	(Correia, Santos et al. 2009)
CYP2D6*5	PM	2-7	Caucasiana	(Ferraldeschi and Newman 2010)
CYP2D6*6	PM	0,9-1	Alemã	(Neafsey, Ginsberg et al. 2009)
CYP2D6*41	IM	17	Alemã	

Os polimorfismos podem levar quer a uma diminuição quer a um aumento da atividade da enzima, consoante o polimorfismo em questão. O polimorfismo CYP2D6*4 é o mais comum na população caucasiana (15-21%) (Baranska, Dzionkowska-Bartkowiak et

al. 2012). Este polimorfismo anula a funcionalidade do alelo, verificando-se que mais de 75% dos indivíduos com fenótipo PM são portadores deste polimorfismo (Bijl, Visser et al. 2008). O polimorfismo CYP2D6*4 é caracterizado pela mutação G1846A, que consiste na substituição de um nucleótido de guanina por um de adenina na posição 1846, resultando num erro no *splicing*, que tem como consequência uma redução da atividade enzimática (Fernandez-Santander, del Saz Sanchez et al. 2012). Num estudo realizado na população portuguesa, verificou-se que o polimorfismo CYP2D6*4 era, tal como na população caucasiana, o mais frequente (13.3%) (Correia, Santos et al. 2009). Devido à ineficácia ou mesmo ausência do metabolismo mediado pela enzima CYP2D6, os indivíduos PMs têm maiores concentrações plasmáticas de fármacos, como por exemplo antidepressivos metabolizados pela mesma, do que os indivíduos EMs e, portanto, são mais propensos a sofrer reações adversas, assim como se encontram aumentadas as hipóteses de falha terapêutica (Bijl, Visser et al. 2008).

Por outro lado, polimorfismos no CYP2C19 são de importância clínica devido ao facto desta enzima catalisar o metabolismo de diversos agentes terapêuticos (Ibeanu, Blaisdell et al. 1999). O CYP2C19 tem uma grande variabilidade polimórfica e cerca de 40 variações alélicas foram já descritas (2C19*2-28) (Ingelman-Sundberg, Daly et al.). As diferenças interindividuais na atividade do CYP2C19 levam à divisão da população em diferentes fenótipos. Os metabolizadores pobres podem sofrer efeitos adversos, quando tratados com fármacos inativados pelo CYP2C19. Variações alélicas no CYP2C19 têm maior prevalência entre as populações asiáticas, onde 12 a 23% dos indivíduos são portadores homocigotas de alelos não-funcionais. Por sua vez, 1 a 7% das populações caucasianas são PM (Rudberg, Mohebi et al. 2008). Os alelos CYP2C19*2 e CYP2C19*3, são responsáveis por 87% do fenótipo PM em caucasianos (Hersberger, Marti-Jaun et al. 2001). Por outro lado, alguns polimorfismos do CYP2C19 conduzem a um aumento da atividade enzimática, como é exemplo a variação alélica CYP2C19*17. Este polimorfismo provoca uma maior expressão da enzima devido a uma mutação na região 5' adjacente ao gene, resultando no aumento da transcrição (Rodriguez-Antona and Ingelman-Sundberg 2006) e, como tal, no aumento da quantidade de enzima produzida. O polimorfismo CYP2C19*17 resulta de uma alteração na posição -806, na qual existe a troca de uma citosina por uma timina (C-806T) (Santos, Soares et al. 2011). Indivíduos com portadores do polimorfismo CYP2C19*17 são suscetíveis de ter um aumento do risco de falhas no tratamento com fármacos que sejam substratos do CYP2C19 (Sim, Risinger et al. 2006). A tabela 3 representa alguns dos polimorfismos mais frequentes no CYP2C19.

Tabela 3: Polimorfismos mais frequentes no gene CYP2C19 em diferentes populações.

Polimorfismo	Genótipo	Incidência (%)	População	Referência
CYP2C19*2 *3	PM	15	Caucasiana	Rodriguez 2006
		14	Portuguesa	Oliveira 2007
CYP2C19*4	PM	3	Caucasiana	Ibeanu 1998
CYP2C19*5	PM	1-5	Caucasiana	Ibeanu 1998
CYP2C19*6	PM	1-4	Caucasiana	Ibeanu 1998
CYP2C19*17	IM	3-7	Caucasiana	Sibbing 2010

1.2.1.2. Relevância do citocromo P450 no cancro

Diversos fármacos citotóxicos são inativados pela ação do CYP450, ao passo que vários pro-fármacos são ativados por este, tornando-os citotóxicos e eficazes no tratamento farmacológico (Rodriguez-Antona and Ingelman-Sundberg 2006). Os CYPs, principalmente a isoforma CYP3A4, desempenham assim um papel importante na bioativação e inativação de carcinogêneos e de fármacos antitumorais, e conseqüentemente na etiologia do cancro, sendo também determinantes no seu tratamento (Zhou, Yao et al. 2013). Foram realizados vários estudos com o intuito de encontrar variações genéticas que poderiam predispor a certos tipos de cancro. No entanto, os resultados têm sido inconclusivos quanto às associações entre a presença de um polimorfismo e a incidência do cancro (Rodriguez-Antona and Ingelman-Sundberg 2006; Zhou, Yao et al. 2013).

No que diz respeito ao tratamento farmacológico, foi verificado que uma atividade alterada no sistema do CYP450, em células tumorais, poderia levar a uma eficácia reduzida do tratamento (Rodriguez-Antona and Ingelman-Sundberg 2006). A capacidade das células tumorais metabolizarem fármacos possui um potencial para se atingir uma terapia eficaz, através da ativação de pró-fármacos (Rodriguez-Antona and Ingelman-Sundberg 2006). No entanto, também é um mecanismo de resistência à terapia, pois ocorre uma inativação aumentada de fármacos anti-tumorais causada por uma expressão excessiva das enzimas do sistema CYP450 (Rodriguez-Antona and Ingelman-Sundberg 2006). A enzima CYP1B1, por exemplo, envolvida no metabolismo de fármacos anti-tumorais, possui uma expressão aumentada em células tumorais, nomeadamente em células

provenientes do cancro da próstata, do ovário, da mama, do cólon e do cancro renal, comparativamente às células normais (Rodriguez-Antona and Ingelman-Sundberg 2006; Gajjar, Martin-Hirsch et al. 2012).

1.2.1 Transportadores ABC e Glicoproteína-P

A nível celular, a membrana constitui uma barreira que impede a entrada de alguns compostos. No entanto, como certos compostos entram na célula por difusão através da membrana, nomeadamente os lipofílicos, existem métodos alternativos de proteção. Um dos métodos de defesa mais importante é o bombeamento de xenobióticos para fora da célula. Assim, os transportadores de efluxo de fármacos são geralmente encontrados nas membranas celulares de muitos organismos e são responsáveis pela proteção da célula. A existência desses transportadores dificulta muitas vezes o uso de compostos no tratamento de doenças, pois estes são frequentemente seus substratos. Desta forma, a expressão de bombas de efluxo de xenobióticos na membrana plasmática das células afeta a farmacocinética dos medicamentos no organismo, limitando a sua acumulação nas células-alvo, como por exemplo as células tumorais (Fung and Gottesman 2009).

Os transportadores *ATP-Binding Cassete* (ABC) constituem uma superfamília de proteínas de efluxo, capazes de acoplar a hidrólise de ATP ao transporte vetorial de diversos substratos, endógenos ou exógenos, diminuindo assim a sua concentração intracelular (Kim, Lee et al. 2009). Foi identificado, até ao momento, um total de 49 transportadores ABC pertencentes a 7 subfamílias (ABCA a ABCG), mas apenas alguns deles são capazes de transportar fármacos e, portanto, desempenhar um papel importante na sua biodisponibilidade (Robert, Morvan et al. 2005; Aye, Singh et al. 2009; Kim, Lee et al. 2009). Os transportadores ABC podem ter ação em diferentes órgãos (fígado, intestino e rins) onde participam na absorção e/ou na eliminação do fármaco, exercendo uma função de proteção. Podem, ainda, estar presentes nas membranas das células endoteliais e participar na constituição de barreiras fisiológicas (Robert, Morvan et al. 2005). No entanto, alguns transportadores ABC são também expressos na membrana plasmática de células tumorais, onde contribuem para a resistência a fármacos (Robert, Morvan et al. 2005). Exemplos de genes que codificam para estes transportadores são os genes *MultiDrug Resistance 1* (*MDR1*, *ABCB1*), *ABCC1-3* e *ABCG2* codificantes da glicoproteína-P (*Pgp*), da proteína de resistência a múltiplos fármacos (*MRP*) e da proteína de resistência do cancro da mama (*BCRP*), respetivamente (Aye, Singh et al. 2009; Ekhart, Rodenhuis et al. 2009). O transportador *MDR1* ou *Pgp* foi o primeiro transportador identificado, sendo o transportador de efluxo farmacologicamente mais ativo e o mais importante a nível

clínico; é largamente expresso e transporta uma grande variedade de compostos (Ambudkar, Kimchi-Sarfaty et al. 2003; Aye, Singh et al. 2009; Fung and Gottesman 2009).

Estrutura e função da glicoproteína-P

Em seres humanos, o gene *MDR1* localiza-se no braço curto do cromossoma 7, contendo 28 exões (Fung and Gottesman 2009). O produto proteico deste gene é uma glicoproteína transmembranar de 170 kDa, denominada como Pgp, uma proteína que confere resistência a múltiplos fármacos, tornando-se a sua expressão, basal ou adquirida após algumas sessões de tratamento, um problema importante no cancro (Ekhart, Rodenhuis et al. 2009). A organização básica da Pgp consiste numa sequência de 1280 aminoácidos organizados em dois domínios homólogos (Fung and Gottesman 2009). Em cada domínio, existem seis regiões que atravessam a membrana (*TransMembrane Domains* ou TMD) e um domínio de ligação ao ATP, também conhecido como *Nucleotide Binding Domain* (NBD). Enquanto os domínios transmembranares conferem especificidade para o substrato, o domínio de ligação ao ATP localiza-se no citoplasma e transfere energia para transportar o substrato através da membrana (figura 4). Este domínio de ligação ao ATP atua como uma ATPase, hidrolisando o ATP em ADP e Pi (Bosch, Meijerman et al. 2006; Fung and Gottesman 2009).

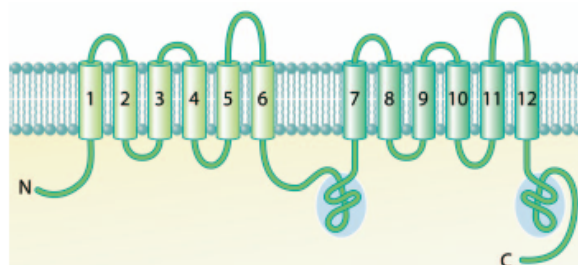


Figura 4: Representação esquemática da estrutura da glicoproteína-P. A glicoproteína-P possui dois domínios homólogos, em que cada um contém seis domínios transmembranares, que conferem especificidade para o substrato e um domínio de ligação ao ATP, permitindo o transporte do substrato ao longo da membrana retirado de (Cannon, Lamping et al. 2009).

A Pgp é expressa em células tumorais, mas também em tecidos normais, com uma função excretora (intestino, fígado, rim) (Ekhart, Rodenhuis et al. 2009). Encontra-se expressa principalmente na superfície apical das células do epitélio do trato gastrointestinal (jejuno, íleo e cólon), reduzindo a absorção intestinal de fármacos e limitando a sua biodisponibilidade oral (Brinkmann and Eichelbaum 2001). Pode também ser expresso na barreira hemato-encefálica, protegendo o cérebro da exposição a compostos tóxicos que possam ter entrado na corrente sanguínea (Pauli-Magnus and Kroetz 2004). A principal função da Pgp é o efluxo de compostos hidrofóbicos, sendo o seu

papel fisiológico mais importante o de proteção contra xenobióticos (Ekhart, Rodenhuis et al. 2009).

A sobre-expressão da Pgp pode impedir a acumulação intracelular de fármacos, inibindo a sua ação. Desta forma, a Pgp encontra-se associada com o fenótipo de multirresistência a fármacos (*multidrug resistance*, MDR) em células tumorais. Este fenótipo, comum em células expostas a compostos tóxicos, como no caso da quimioterapia, pode implicar resistência a fármacos estruturalmente diversos e com diferentes alvos moleculares, por uma série de mecanismos, incluindo o aumento de expressão da Pgp, levando assim a um prognóstico reservado em muitos cânceros humanos (Chowbay, Li et al. 2005).

1.2.2.1 Mecanismo de ação da glicoproteína-P

Inicialmente, pensava-se que a Pgp funcionava como uma flipase, isto é, interagia com o substrato no folheto interno da bicamada lipídica e, de seguida, girava para o folheto externo libertando o composto (Higgings and M.M. 1992). No entanto, o modelo atualmente aceite é o de uma bomba de vácuo hidrofóbica, no qual o substrato interage diretamente com o local de ligação da proteína. As duas subunidades da Pgp formam um único canal de transporte, fazendo com que o substrato seja levado para uma parte mais interna da proteína, chamada de “folheto interno”. A ligação do ATP causa mudanças conformacionais na Pgp, permitindo o bombeamento do composto para o espaço extracelular (figura 5) (Fung and Gottesman 2009; Huber, Maruiama et al. 2010). Após o efluxo, a proteína adquire uma conformação apresentando baixa afinidade para substratos e nucleótidos, sendo necessária a libertação do ADP para que o transportador regresse à conformação nativa (Huber, Maruiama et al. 2010).

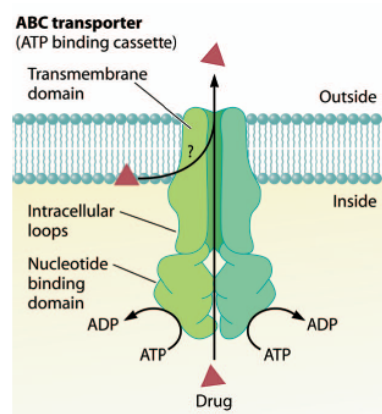


Figura 5: Modelo representativo do mecanismo de ação da glicoproteína-P. A Pgp utiliza a energia do ATP para o efluxo ativo dos seus substratos através da membrana plasmática retirado de (Cannon, Lamping et al. 2009).

1.2.2.2 Substratos da glicoproteína-P

A característica mais importante da Pgp é a sua ampla gama de substratos, maioritariamente de natureza hidrofóbica. Os substratos da Pgp cobrem uma grande variedade de estruturas químicas e possuem diversas indicações terapêuticas: fármacos anti-tumorais, proteases anti-HIV, anti-histamínicos, bloqueadores dos canais de cálcio, antibióticos, entre outros (tabela 4) (Bosch, Meijerman et al. 2006; Fung and Gottesman 2009).

Tabela 4: Diferentes classes de substratos da Pgp (Brinkmann and Eichelbaum 2001; Cascorbi 2006).

Classe do substrato	Exemplos	Referência	Classe do substrato	Exemplos	Referência
Antibióticos	Cefazolina Cefoperazona Eritromicina Ofloxacin	Brinkmann and Eichelbaum 2001; Cascorbi 2006	Esteroides	Aldosterona Dexametasona Hidro cortisona Metilprednisolona	Brinkmann and Eichelbaum 2001; Cascorbi 2006
Anti-histamínicos	Fexofenadina Terfenadina	Cascorbi 2006	Imunossupressores	Ciclosporina A Sirolimus Tacrolimus	Cascorbi 2006
Antitumorais	Actinomicina D Daunorrubicina Docetaxel Doxorrubicina Etoposido Imatinib Mitomicina C Paclitaxel Tamoxifeno Teniposido Topotecano Vinblastina Vincristina	Brinkmann and Eichelbaum 2001; Cascorbi 2006	Inibidores de proteases anti-HIV	Amprenavir Indinavir Nelfinavir Ritonavir Saquinavir	Cascorbi 2006
Bloqueadores β	Bunitrolol Carvedilol Celiprolol Tanilolol	Cascorbi 2006	Inibidores da redutase HMG-CoA	Atorvastatina Lovastatina	Cascorbi 2006
Bloqueadores dos canais de cálcio	Diltiazem Nicardipina Verapamil	Brinkmann and Eichelbaum 2001; Cascorbi 2006	Morfina	Morfina 6-glucuronida Morfina Loperamida	Brinkmann and Eichelbaum 2001
Cardíacos	Amiodarona Digitoxina Digoxina Quinidina	Brinkmann and Eichelbaum 2001; Cascorbi 2006	Péptidos	Gramicidina D Valinomicina N-Acetil-leucil-leucil-norleucina	Brinkmann and Eichelbaum 2001
Corantes fluorescentes	Rodamina 123	Cascorbi 2006	Sistema Nervoso Central	Domperidona Fenitoína Fenoxazina Flufenazina Ondansetron Perfenazina	Brinkmann and Eichelbaum 2001

O fenótipo MDR conferido pela sobre-expressão da Pgp é caracterizado pela resistência a agentes antitumorais, incluindo antraciclina como a doxorubicina, composto utilizado no presente trabalho. A doxorubicina é um agente antitumoral altamente ativo, encontrando-se entre os fármacos anti-tumorais mais eficazes e de maior utilização. Este fármaco é vulgarmente usada em combinação com outros agentes anti-tumorais, como o 5-fluorouracilo, ou a ciclofosfamida no tratamento de diversos cancros (Burger, Foekens et al. 2003; Fung and Gottesman 2009; Sims, Ganguly et al. 2013; Tang, Zhao et al. 2013). Embora a doxorubicina seja um agente altamente eficaz, é substrato de diversos transportadores de efluxo (MDR1, MRP1 e BCRP), pelo que a sua utilização é limitada devido a resistência por parte de alguns cancros, bem como a efeitos colaterais apresentando como, por exemplo, toxicidade cardíaca (Sims, Ganguly et al. 2013).

O mecanismo de ação da doxorubicina tem sido atribuído à intercalação no DNA, ao seu efeito inibidor na topoisomerase II e à produção de espécies reativas de oxigénio por uma via enzimática, através da oxidação mitocondrial, ou então pela oxidação do ferro (via não enzimática) (Gewirtz 1999; Minotti, Menna et al. 2004; Mellor and Callaghan 2008). No entanto, foi recentemente descrito um novo mecanismo de ação da doxorubicina, através de um mecanismo conhecido como proteólise intramembranar (Patel and Kaufmann 2012). Neste processo, uma proteína ligada à membrana, CREB3L1, é clivada libertando uma molécula solúvel, a ceramida, que desempenha diversas funções em processos celulares, incluindo na apoptose, no metabolismo lipídico e na resposta a infeção viral. A proteína CREB3L1 migra para o núcleo, onde ativa o fator de transcrição CDNK1A, que por sua vez aumenta os níveis de expressão da proteína p21. Esta proteína, em conjunto com outras, inibe a proliferação das células tumorais, uma vez que participa na regulação do ciclo celular (Denard, Lee et al. 2012; Patel and Kaufmann 2012).

Polimorfismos no gene *MDR1* e suas implicações clínicas

Os primeiros estudos sobre variações genéticas no gene *MDR1* surgiram em 1994 (Stein, Walther et al. 1994). O gene *MDR1* é altamente polimórfico, sendo atualmente conhecidos mais de 100 SNPs. Destes, a maioria encontra-se na região intrónica ou é silenciosa (Krivulcik, Sedlak et al. 2009). Apesar disso, podem afetar a expressão e função da Pgp e, conseqüentemente, a variabilidade interindividual na farmacocinética de muitos fármacos, contribuindo para diferenças na disponibilidade de vários substratos da Pgp em diferentes indivíduos (Chowbay, Li et al. 2005).

O SNP na posição 3435 do exão 26 (C3435T) é dos mais frequentes no gene *MDR1*, tendo-se verificado estar associado à alteração da expressão e função da Pgp (Krivulcik,

Sedlak et al. 2009). O polimorfismo C3435T é uma mutação silenciosa que não causa substituição de um aminoácido. No entanto, embora se trate de uma mutação silenciosa, este polimorfismo causa um atraso no *folding* da Pgp, influenciando o processamento do mRNA e a sua expressão (figura 6) (Owen, Goldring et al. 2005; Ekhart, Rodenhuis et al. 2009; Yoo and Lee 2011). Indivíduos portadores do genótipo TT na posição 3435 apresentam uma expressão consideravelmente menor da Pgp no duodeno (Yoo and Lee 2011). Vários estudos foram efetuados no sentido de verificar a influência do polimorfismo C3435T no tratamento, por exemplo, com a digoxina, verificando-se que a presença do polimorfismo leva a níveis plasmáticos de digoxina superiores ao normal (Yoo and Lee 2011).

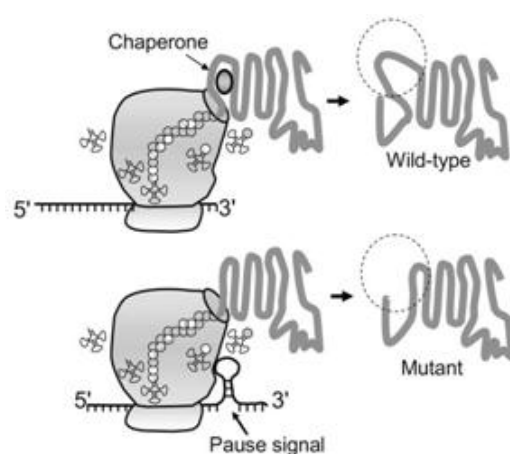


Figura 6: Efeito da presença do polimorfismo C3435T na conformação da Pgp. A paragem do sinal, causada pelo polimorfismo, leva a um atraso de processamento do ribossoma. Este atraso pode interromper o tempo de interação da chaperone e, assim, produzir uma proteína com uma conformação ligeiramente alterada retirado de (Fung and Gottesman 2009).

Vários estudos têm sido efetuados no sentido de compreender o efeito do polimorfismo C3435T, no entanto, os resultados obtidos são controversos, tornando-se assim inconclusivos. Portadores de genótipos que causam uma diminuição da expressão da Pgp podem apresentar uma melhor resposta à quimioterapia. Considerando o papel da Pgp na resistência a múltiplos fármacos e na farmacocinética dos antitumorais, esse polimorfismo pode resultar numa melhor sobrevivência (Ekhart, Rodenhuis et al. 2009). De facto, os autores verificaram que o genótipo TT na posição 3435 se associa a um papel protetor na população caucasiana com leucemia mieloide aguda (LMA). Os autores descobriram igualmente que pacientes com LMA que tinham o genótipo *wild-type* na posição 3435 do gene *MDR1* eram suscetíveis de ter uma sobrevivência diminuída, devido ao aumento do risco de recidiva. No entanto, estes não foram capazes de determinar se este fenómeno se devia a características da população em estudo ou da alteração da farmacocinética dos fármacos mediada pela Pgp (Illmer, Schuler et al. 2002). Estes resultados estão de acordo com outro estudo em que foi verificada a ocorrência de um

pior prognóstico em crianças com leucemia portadoras do genótipo *wild-type* (Jamroziak, Mlynarski et al. 2004). Em contraste, Kim e colaboradores relataram uma maior sobrevivência em pacientes com LMA com o genótipo *wild-type* no exão26. Isto pode dever-se às diferenças étnicas nos pacientes em estudo (caucasianos e coreanos) (Kim, Park et al. 2006). Além disso, o polimorfismo C3435T também foi associado a um aumento do risco de cancro renal, colite ulcerativa e doença de Parkinson (Robert, Morvan et al. 2005), provavelmente devido a uma maior acumulação de produtos tóxicos.

Estas discrepâncias nos resultados podem dever-se ao facto de que o SNP C3435T não é o único polimorfismo que influencia os níveis da Pgp e, portanto, a sua farmacocinética e farmacodinâmica (Chowbay, Li et al. 2005). De facto, vários estudos sugerem que, embora a influência isolada do polimorfismo C3435T seja significativa, o polimorfismo C3435T pode estar associado ao polimorfismo G2677T e, assim, contribuírem coletivamente para mais efeitos colaterais (Kim, Leake et al. 2001). Portanto, o efeito do polimorfismo C3435T na expressão da Pgp é controverso. Num estudo efetuado em 2001 por Kim e colaboradores com americanos de origem europeia e americanos de origem africana, verificou-se que este polimorfismo, na maioria dos indivíduos, estava associado ao polimorfismo G2677T (Kim, Leake et al. 2001). O polimorfismo G2677T encontra-se no exão 21, conduzindo a uma alteração na sequência de aminoácidos a partir da substituição de uma alanina por uma serina (G2677T) no segundo domínio transmembranar da Pgp (Ekhart, Rodenhuis et al. 2009; Yoo and Lee 2011). Na tabela 5 encontram-se alguns polimorfismos mais frequentes no C3435T.

Tabela 5: Polimorfismos mais frequentes no gene *MDR1* na população portuguesa e caucasiana.

Polimorfismo	Incidência (%)	População	Referência
C3435T	20-15	Caucasiana	(Robert, Morvan et al. 2005)
	19.3	Portuguesa	(Correia, Santos et al. 2009)
	41	Portuguesa	Cavaco, Gil et al. 2003
	36.0	Portuguesa	Ameyaw, Regateiro et al. 2001 Cavaco, Gil et al. 2003)
G2677T	26	Portuguesa	Cavaco, Gil et al. 2003
C1236T	17	Portuguesa	(Correia, Santos et al. 2009)
T-129C	1	Portuguesa	Cavaco, Gil et al. 2003

A prevalência do polimorfismo C3435T é elevada, com uma frequência alélica de cerca de 45 a 50% na população caucasiana, correspondente a uma proporção de indivíduos homocigóticos de 20 a 25% (Robert, Morvan et al. 2005). No entanto, a frequência deste polimorfismo varia significativamente entre os diferentes grupos étnicos. Por exemplo, a prevalência em africanos é muito inferior variando, entre 17 a 27% (Cascorbi 2006). No que diz respeito à análise da população portuguesa ocorrido em Coimbra e no Algarve, diversos estudos realizados demonstraram uma frequência de 36% a 41% (Ameyaw, Regateiro et al. 2001; Cavaco, Gil et al. 2003). No entanto, num estudo realizado em Lisboa, em 2009 por Correia e colaboradores, a frequência do polimorfismo C3435T revelou ser de 19% (Correia, Santos et al. 2009).

1.3 Cancro coloretal: prevalência e implicações de variações polimórficas na glicoproteína-P

O mecanismo molecular subjacente à ocorrência de tumores está relacionado com o aparecimento de mutações em genes específicos como os genes supressores tumorais, proto-oncogenes ou genes que promovem a reparação do DNA (Ferreira 2011). Estas mutações podem surgir espontaneamente ou podem ser induzidas por exposição a agentes carcinogéneos. Contudo, estudos revelaram a existência de uma predisposição genética no aparecimento de certos tumores (de la Chapelle 2004). Os fármacos utilizados na quimioterapia possuem a capacidade de inibir a proliferação celular, por interação direta com o DNA ou por interferência em vias de transdução de sinal. Nas últimas décadas, tem-se verificado um progressivo aumento da resistência à ação dos fármacos anti-tumorais (Ferreira 2011). O fenómeno de MDR parece ser a principal razão para a falha terapêutica da quimioterapia no tratamento do cancro (Ambudkar, Kimchi-Sarfaty et al. 2003). Este facto é frequentemente relacionado com a sobre-expressão da Pgp. A Pgp é altamente expressa em células tumorais resistentes a fármacos, particularmente em células tumorais com origem em células que normalmente a expressam, como o cancro renal, hepático e coloretal (Ambudkar, Kimchi-Sarfaty et al. 2003; Fung and Gottesman 2009).

O cancro coloretal é uma das neoplasias mais frequentes. Todos os anos, na União Europeia, há cerca de 220000 novos casos de cancro coloretal diagnosticados (Balcerczak, Panczyk et al. 2010). Em Portugal, desde a década de 80, a taxa de incidência do cancro coloretal, assim como a taxa de mortalidade a ele associado, têm vindo a aumentar. Os dados mais recentes indicam que, em 2005, 14,6% das mortes por cancro são devidas ao

cancro coloretal, um dos cancros mais frequentes em Portugal (em homens e mulheres) (Pinto, Paquete et al. 2010). O aumento do número de casos de cancro coloretal, nos últimos 30 anos, é devido principalmente a fatores ambientais relacionados com alterações no estilo de vida: diminuição do consumo da dieta típica tradicional, adotando uma dieta pobre em cereais e azeite, aumento do consumo de carnes vermelhas e de álcool, assim como um estilo de vida sedentário (Pinto, Paquete et al. 2010). No entanto, a predisposição genética e a presença de SNPs em alguns genes podem estar relacionadas com um aumento ou diminuição do risco de cancro (Balcerczak, Panczyk et al. 2010). Entre eles, o gene *MDR1* parece desempenhar um papel importante na progressão do tumor. Assim, vários estudos têm sido realizados de forma a determinar o contributo do fator genético na função da Pgp para a distribuição de fármacos, o risco para o desenvolvimento de certas doenças e a progressão de tumores (Balcerczak, Panczyk et al. 2010). A expressão ou função diminuída da Pgp pode ser um fator de risco para o cancro coloretal, devido a uma barreira fragilizada, facilitando a entrada de substâncias nocivas exógenas ou endógenas para as células, incluindo agentes cancerígenos (De Iudicibus, De Pellegrin et al. 2008).

A associação entre a presença do SNP C3435T e a suscetibilidade ao cancro coloretal tem sido controversa. Se por um lado foi descrito que o SNP C3435T contribui para a suscetibilidade e progressão do cancro coloretal, uma vez que foi descrito que a presença do alelo C tinha uma função protetora, enquanto os indivíduos com o genótipo mutante tinham um maior risco de desenvolver cancro coloretal (Robert, Morvan et al. 2005). Por outro lado, estudos posteriores indicaram que os polimorfismos C3435T não estão relacionados com uma maior incidência de cancro coloretal nem influenciam o prognóstico da doença (De Iudicibus, De Pellegrin et al. 2008).

1.4 *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo para expressão heteróloga

A tecnologia de DNA recombinante permite a expressão de proteínas puras e funcionais para diversas aplicações, incluindo a avaliação fenotípica de polimorfismos em diferentes genes, tal como foi alvo de estudo no presente trabalho. Os sistemas de expressão heteróloga têm vindo a ser extensivamente utilizados e encontram-se descritos diversos sistemas, utilizando como hospedeiros diferentes organismos unicelulares (como *Escherichia coli* ou *Saccharomyces cerevisiae*), células de inseto ou linhas celulares de diferentes origens, entre outros (Geisse, Gram et al. 1996; Reyes-Ruiz and Barrera-Saldana

2006). Para a expressão heteróloga, os vetores de expressão devem possuir características que incluem a presença de um promotor e terminador de um gene que seja expresso nas condições desejadas; um gene de seleção, que permita distinguir as células transformadas; uma origem de replicação; e ainda um local de clonagem múltipla, de forma a permitir a inserção do gene a clonar (Walker 1999). Inicialmente, a bactéria *Escherichia coli* era o microrganismo hospedeiro mais utilizado, devido à sua capacidade de crescer rapidamente e de atingir uma elevada densidade celular, utilizando substratos económicos. No entanto, apesar de ainda hoje ser um sistema de expressão amplamente utilizado, devido ao elevado rendimento que apresenta, manifesta algumas desvantagens, nomeadamente a incapacidade de processamento do RNA eucariota e de modificações pós-traducionais de proteínas, como por exemplo formação de pontes dissulfureto, glicosilações ou fosforilações, muitas vezes fundamentais para a sua funcionalidade. Contudo, atualmente existe uma grande variedade de hospedeiros eucariotas (leveduras, fungos, plantas e células animais), para os quais já foram desenvolvidos sistemas de expressão e que podem servir como alternativa às células bacterianas (Terpe 2006).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo eucariota unicelular, bem estudado a nível genético e fisiológico, tendo sido o primeiro organismo eucariota a ter o seu genoma totalmente sequenciado (Goffeau, Barrell et al. 1996). Tal como os sistemas bacterianos, e ao contrário das células animais, a levedura *S. cerevisiae* é capaz de crescer em meios de cultura simples e pouco dispendiosos, apresentando igualmente curtos tempos de geração e atingindo elevadas densidades celulares. Tratando-se de um organismo eucariota, partilha vários processos celulares com os organismos eucariotas superiores, apresentando capacidade de efetuar modificações pós-traducionais, semelhantes às que ocorrem na síntese de proteínas funcionais nestes organismos (Pereira, Coutinho et al. 2012). A levedura *S. cerevisiae* tem sido manipulada de forma a expressar genes heterólogos, pois possui um metabolismo extremamente versátil, apresenta diversas ferramentas genéticas e satisfaz as normas de biossegurança para aplicação em seres humanos. Assim, este microrganismo tem sido utilizado para a expressão de diferentes proteínas de interesse biotecnológico ou biomédico, nomeadamente enzimas de interesse industrial, hormonas, anticorpos, fatores de crescimento ou vacinas (Dominguez 2003; Yin, Li et al. 2007).

A levedura *S. cerevisiae* apresenta um plasmídeo natural, o vetor 2 μ , sendo este a principal base de construção da diversidade de vetores de clonagem e expressão neste organismo, uma vez que é capaz de apresentar elevada estabilidade com um elevado número de cópias (Ludwig and Bruschi 1991). As construções derivadas deste plasmídeo endógeno de *S. cerevisiae* incluem sequências de plasmídeos bacterianos contendo a

origem de replicação, de forma a poderem funcionar como vetores *shuttle* (vetor que se replica em diferentes espécies), uma marca de seleção em levedura, normalmente marcadores prototróficos (codificam para uma enzima em falta envolvida numa via de síntese) e, no caso de vetores de expressão, promotores e terminadores funcionais em levedura. A tabela 6 apresenta os marcadores de seleção, assim como os promotores e terminadores, mais usuais nos sistemas de expressão de levedura.

Tabela 6: Marcas de seleção, promotores e terminadores de transcrição mais utilizados em tecnologia do DNA recombinante em *S. cerevisiae* (Walker 1999; Fang, Salmon et al. 2011).

	Tipo	Gene	Características
Marcas de seleção	Recessivo	<i>LEU2</i> <i>TRP1</i> <i>HIS3</i> <i>LYS2</i>	Genes que complementam mutações auxotróficas na síntese de aminoácidos
		<i>URA3</i> <i>ADE2</i>	Genes que complementam mutações auxotróficas para nucleótidos
	Dominante	<i>CUP1</i>	Resistência ao cobre
		G418	Resistência ao antibiótico G418 (geneticina)
		Higromicina Metrotrexato	Resistência a drogas
Promotores	Constitutivo	<i>ADH1</i>	Álcool desidrogenase 1
		<i>GPD</i>	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
		<i>TRP1</i>	N (5'-fosforibosil)-antranilato-isomerase
	Regulável	<i>PHO5</i>	Fosfatase ácida
		<i>GAL1, GAL7,</i> <i>GAL10</i>	Produtos da via Leloir
		<i>MET25</i>	O-acetil homoserina sulfidrilase
		<i>ADH2</i>	Álcool desidrogenase 2
	Terminadores	<i>CYC1</i>	Citocromo c 1
<i>ADH1</i>		Álcool desidrogenase 1	

Nos últimos anos, a levedura tem proporcionado uma contribuição valiosa em relação à descoberta dos mecanismos moleculares subjacentes a diversas doenças,

permitindo a identificação de novos alvos terapêuticos (Pereira, Coutinho et al. 2012). De facto, os atributos anteriormente referidos, como a sua fisiologia e o seu metabolismo, tornam a levedura um bom sistema modelo para o estudo de doenças humanas, levando a que seja uma das escolhas para a investigação biomédica. A expressão heteróloga em levedura de proteínas envolvidas em patologias e subsequentes estudos funcionais têm sido utilizados com sucesso para compreender as funções destas proteínas. Como organismo unicelular que é, a sua principal limitação para o estudo das doenças humanas diz respeito ao facto de vários dos estudos moleculares relativos a essas doenças estarem associados à multicelularidade e às interações célula-célula. Para além disso, uma vez que se trata de um organismo menos complexo, alguns dos genes envolvidos na patogénese poderão não estar presentes no genoma da levedura (Pereira, Coutinho et al. 2012). Uma outra limitação no seu uso é o facto de, apesar de realizar a maior parte das modificações pós-traducionais características de eucariotas superiores, não é capaz de efetuar algumas modificações, críticas para a funcionalidade da proteína. Isto é devido principalmente ao facto da levedura *S. cerevisiae* promover a hipermanosilação das proteínas heterólogas, enquanto as células humanas utilizam diferentes tipos de açúcares na síntese de glicanos (Byrne, O'Callaghan et al. 2005; Olson, Fox et al. 2007). *S. cerevisiae* tem sido, assim, utilizada cada vez com maior frequência com o objetivo de identificar genes relacionados com patologias humanas, assim como na descoberta de compostos químicos que interferem com o funcionamento de uma proteína. Ao estabelecerem-se modelos de expressão de proteínas em levedura, diferentes abordagens são adotadas, dependendo do grau de conservação da proteína em estudo. Se a levedura não tem nenhum ortólogo desse gene, a expressão heteróloga do gene humano neste organismo, denominado neste caso de “levedura humanizada”, pode ser informativa uma vez que a levedura pode conservar as interações da proteína fornecendo pistas sobre a sua função e patobiologia. Assim, este facto pode tornar-se vantajoso pois a proteína pode ser estudada num ambiente eucariota simples, sem a interferência de outras proteínas com funções semelhantes (Mager and Winderickx 2005; Pereira, Coutinho et al. 2012). Por outro lado, se o gene que codifica para a proteína é conservado na levedura, é possível estudar diretamente a sua função através da complementação do respetivo mutante (Mager and Winderickx 2005; Pereira, Coutinho et al. 2012). Os transformantes de levedura, contendo um cDNA humano que complementa funcionalmente uma levedura deletada, são baseados em sistemas celulares, criados para fins de investigação biomédica. Assim, o fenótipo da levedura deletada é compensado pela expressão da proteína humana. Por exemplo, a p53, proteína fundamental na regulação do ciclo celular e da apoptose, provoca um crescimento diminuído, podendo mesmo levar a um efeito letal quando expressa em níveis elevados.

Assim, os mutantes podem permitir a identificação de novas variações na p53, o que poderá tornar-se útil no desenvolvimento de novas terapias contra o cancro (Mager and Winderickx 2005). Outros exemplos que demonstram a utilização de ensaios de levedura humanizadas para o estudo de doenças humanas são as doenças de foro neurológico, como a doença de Parkinson ou a doença de Huntington em que identificaram genes candidatos a diminuir a toxicidade da proteína huntingtina mutada (Mager and Winderickx 2005; Pereira, Coutinho et al. 2012).

1.4.1. Expressão heteróloga de transportadores ABC

Após a sequenciação do genoma da levedura em 1996 (Goffeau, Barrell et al. 1996), os estudos prosseguiram com a análise funcional dos diferentes genes identificados. A análise fenotípica de mutantes em genes específicos constitui uma ferramenta poderosa no campo da genómica funcional. Para este fim, foram construídas coleções de leveduras com deleções nos diferentes genes, constituindo o chamado “Deletoma”(SGDP 2007). Apesar da grande utilidade deste projeto, este apresenta algumas limitações, pois a coleção criada consiste em mutantes simples de cada um dos genes identificados, quando, existem em levedura vários genes redundantes pertencentes à mesma família. Nestes casos serão necessários efetuar mutações múltiplas, de forma a poder avaliar a sua função, o que pode ser conseguido por exemplo, através do sistema *Lox-P*, amplamente utilizado em levedura, que faz recombinação específica e requer apenas um pequeno local para catalisar a recombinação entre os locais *loxP* e inativar o gene (Sauer 1987).

Os transportadores ABC são encontrados nas células de todos os organismos, frequentemente na membrana plasmática (Cannon, Lamping et al. 2009). Em leveduras, existem duas famílias principais de proteínas de efluxo constituídas por diversos membros: a Superfamília dos Facilitadores Maioritários (*Major Facilitator Superfamily – MFS*) e a família dos transportadores ABC, composta por seis subfamílias e apresentando uma gama de substratos mais ampla (Paumi, Chuk et al. 2008; Cannon, Lamping et al. 2009). Atualmente, estão disponíveis mais de 52 estirpes de leveduras em que as principais bombas de efluxo, envolvidas na resistência pleiotrópica a fármacos (PDR), se encontram deletadas (Decottignies 1998; Rogers, Decottignies et al. 2001). Um desses exemplos é a estirpe AD1-8 de *S. cerevisiae*, utilizada neste trabalho para a expressão da *Pgp*, e que se encontra deletada em diferentes bombas de efluxo, assim como no fator de transcrição *Pdr3* (tabela 7), de forma a constituir um sistema adequado para a expressão de proteínas ABC. Os genes *YOR1*, *PDR5* e *SNQ2* codificam para os três principais

transportadores pleiotrópicos em *S. cerevisiae*. Estes genes são co-regulados pelos fatores de transcrição Pdr1 e Pdr3. A estirpe de *S. cerevisiae* Ad1-3 mutada nestes três genes foi primeiramente construída para sensibilizar a estirpe a diferentes fármacos e, assim, utilizá-la para o *screening* de compostos. Posteriormente, foi construída a estirpe AD1-8 mutada nos principais transportadores ABC (tabela 7).

Tabela 7: Descrição da função de cada gene deletado na estirpe de *S. cerevisiae* AD1-8 (Kolaczowski, Kolaczowska et al. 1998; Rogers, Decottignies et al. 2001; Paumi, Chuk et al. 2008).

Gene	Função
<i>yor1</i>	Transportador de múltiplos compostos. Exporta oligomicina, fármacos aniônicos e outros compostos.
<i>snq2</i>	Transportador de múltiplos compostos. Envolvido na resistência pleiotrópica a xenobióticos e a espécies de oxigênio singlete.
<i>pdr5</i>	Transportador de múltiplos compostos. Confere resistência à cicloheximida e outros fármacos, incluindo fármacos anti-tumorais e esteroides, como a Pgp humana
<i>pdr10</i>	Transportador de múltiplos compostos. Envolvido na resistência pleiotrópica a xenobióticos.
<i>pdr15</i>	Transportador de múltiplos compostos. Envolvido na resposta ao stress e na destoxificação celular.
<i>ycf1</i>	Fator de resistência ao metal. Expresso na membrana vacuolar.
<i>pdr3</i>	Fator de transcrição homólogo ao PDR1
<i>pdr11</i>	Transportador de múltiplos compostos. Envolvido na resistência pleiotrópica a xenobióticos. Transportador de esteróis

Existem muito poucos estudos, utilizando a levedura *S. cerevisiae*, para a expressão heteróloga da Pgp. O primeiro estudo efetuado nesse sentido foi realizado em 1992, utilizando-se para a expressão heteróloga desta proteína um mutante de *S. cerevisiae* no gene *STE6*, codificante de uma proteína de membrana membro da superfamília ABC e homóloga à Pgp. A Ste6p apresenta uma topologia semelhante à Pgp, sendo responsável pela secreção da ferormona **a** nas células *MATa* (Kuchler and Thorner 1992). As células transformadas com o gene *MDR1* apresentavam um aumento de resistência à valinomicina, um ionóforo substrato da Pgp, demonstrando a sua funcionalidade neste sistema de expressão. Adicionalmente, verificou-se que a Pgp estava localizada na membrana plasmática das células transformadas, confirmando o seu correto tráfego, apesar de se encontrar em baixos níveis, localizando-se a maior parte da proteína no retículo endoplasmático. Os níveis de expressão da Pgp na membrana plasmática de levedura foram aumentados quer pela utilização de um vetor de expressão multicópia contendo o promotor forte *PMA1*, quer pela utilização de glicerol como chaperone químico (Mao and Scarborough 1997; Figler, Omote et al. 2000). Foi também verificado que, contrariamente à Pgp em células humanas, o produto de expressão do gene *MDR1* em levedura não se encontrava glicosilado, mas a sua expressão, além de conferir resistência à valinomicina, complementava, ainda que de forma limitada, a mutação *ste6* em *S.*

cerevisiae, indicando a sua funcionalidade, mesmo na ausência desta modificação pós-traducional (Kuchler and Thorner 1992). Estudos posteriores, utilizando mutantes dos genes *PDR5*, *SNQ2* e *YOR1*, codificantes das principais bombas de efluxo em levedura, demonstraram que a expressão da Pgp conferia resistência aos fármacos doxorubicina e daunorrubicina também nestes mutantes, os quais foram utilizados para expressar variantes da Pgp com diferentes polimorfismos (Jeong et al., 2007). Foram testados diversos polimorfismos, tendo sido observado uma maior resistência aos compostos testados nas variantes M89T, L662R, R669C e S1141T, ao passo que a expressão da variante W1108R conferiu uma maior sensibilidade. Curiosamente, esta diferente sensibilidade não se deveu nem a alterações dos níveis de expressão da Pgp, nem a diferentes localizações sub-celulares, sendo provavelmente devida a alterações na atividade biológica da proteína. Além do gene humano *MDR1*, a levedura *S. cerevisiae* foi também utilizada como sistema heterólogo para expressão de diversos genes codificantes de transportadores ABC, nomeadamente do fungo patogénico *Candida albicans* (Shukla, Saini et al. 2003; Lamping, Monk et al. 2007; Pasrija, Banerjee et al. 2007). Uma vez que a expressão endógena de bombas de efluxo endógenas pode influenciar a análise funcional, esses estudos foram efetuados em estirpes de *S. cerevisiae* desprovidas desses sistemas, nomeadamente na estirpe AD1-8 atrás mencionada e utilizada no presente trabalho.

1.5. Objetivos do trabalho

O transportador Pgp e várias enzimas do CYP450 como a CYP2D6 e a CYP2C19 são proteínas preponderantes no transporte e metabolismo de xenobióticos, inclusive fármacos. Porque os genes destas proteínas são altamente polimórficos são necessários estudos que correlacionam um determinado polimorfismo com diferentes padrões de resposta face à exposição de um xenobiótico. Tais estudos podem ser usados com benefício marcante para campos como a farmacogenómica e medicina personalizada. A utilização de sistemas *in vitro* possibilita a associação de um polimorfismo específico com a expressão e atividade proteica. Contudo, a presença de outros polimorfismos pode afetar esta correlação. Assim, recorrendo à utilização de modelos eucariotas simples como a levedura e por expressão heteróloga do gene *MDR1* é possível proceder-se a uma análise funcional do polimorfismo de interesse.

Neste sentido, o presente trabalho de investigação teve como principais objetivos:

- Genotipagem da população portuguesa para os polimorfismos CYP2C19*17, CYP2D6*4 (CYP450) e C3435T (Pgp) em amostras de DNA genómico;
- Correlação da presença/ausência do polimorfismo C3435T no gene *MDR1* com a sua expressão e com a resistência à ação do fármaco anti-tumoral doxorrubicina em diferentes linhas celulares de cancro colorectal;
- Análise funcional do polimorfismo C3435T no gene *MDR1* por expressão heteróloga na estirpe *Saccharomyces cerevisiae* AD1-8.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Genotipagem da população norte de Portugal

2.1.1. Material Biológico

Para a genotipagem da população Norte de Portugal utilizou-se sangue total como matriz biológica, sangue total periférico. As amostras de sangue foram recolhidas, aleatoriamente, de uma população de dadores voluntários, constituída por discentes do Instituto Superior de Ciências da Saúde – Norte (ISCS-N). Todos os participantes foram informados do estudo, tendo somente participado aqueles que concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I). A recolha de sangue ocorreu de forma a obter uma amostra representativa da população do Norte de Portugal, para análise de polimorfismos nos genes codificantes da glicoproteína P e de enzimas do citocromo P450 (CYP450), utilizando DNA genómico extraído dessas amostras. Os polimorfismos estudados neste trabalho foram o C3435T (Pgp) e o CYP2D6*4 e CYP2C19*17 (CYP450), devido à sua elevada frequência na população caucasiana.

Foi recolhido um total de 187 amostras de sangue total periférico, das quais 135 eram de indivíduos do sexo feminino e 52 de indivíduos do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 18 e os 64 anos. A idade média dos voluntários foi de $23,1 \pm 7,9$, e a mediana de 20 anos. Após a extração de DNA genómico, foram excluídas 24 amostras, por não se encontrarem em condições adequadas quanto à integridade e/ou pureza.

2.1.2. Extração de DNA genómico de sangue total periférico

Para a extração do DNA genómico de sangue total, foram utilizados dois métodos distintos de extração. Inicialmente, o DNA genómico foi extraído pelo método de fenol-clorofórmio. Contudo, dado o elevado número de amostras contaminadas com compostos orgânicos e, pelo facto de se tratar de um método bastante moroso, optou-se, posteriormente, pela extração através do kit de DNA QIAamp® DNA Blood Mini (Qiagen).

2.1.2.1. Método de fenol – clorofórmio

A extração por fenol-clorofórmio trata-se de uma extração orgânica que envolve a adição de vários compostos químicos. Apesar da extração orgânica apresentar grande eficiência no isolamento de DNA genómico, possui como principal desvantagem a morosidade e a facilidade de contaminação (Butler 2005). O protocolo efetuado encontra-se, descrito em seguida, de forma resumida.

Recolheram-se 4 mL de sangue total em tubos de colheita esterilizados (Starstedt), contendo EDTA (anticoagulante). O sangue recolhido foi transferido para tubos *Falcon* de 50 mL, onde se fez o volume (até aos 50 mL) com solução hipotónica, AKE (NH_4Cl 155mM; KHCO_3 10mM; EDTA 0,1mM; pH 7,4), de modo a provocar a lise dos eritrócitos, sendo os tubos incubados a 4°C durante 30 minutos. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 4°C por 10 minutos a 2000 rpm, numa centrífuga refrigerada *Eppendorf Centrifuge 5804R*. O sobrenadante foi descartado e os passos de lavagem com AKE, seguidos de centrifugação, foram repetidos o número de vezes necessárias, até ao desaparecimento total da hemoglobina.

O sedimento celular obtido no final deste processo foi ressuspensão em 1 mL de PBS (NaCl 0,82% (m/v); Na_2HPO_4 0,16% (m/v); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,03% (m/v); pH 7,4), transferido para um tubo *ependorf* e centrifugado novamente, a 8000 rpm, durante 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento obtido foi ressuspensão em 500 μL de tampão SE (NaCl 75mM; EDTA 25 mM; pH 8,0), provocando a lise das células nucleadas. De seguida, adicionaram-se 25 μL de SDS 10% (p/v), para promover a dissociação do DNA das proteínas e agitou-se vigorosamente. A esta mistura adicionaram-se 20 μL de proteinase K (20 mg/mL, Sigma), misturando-se suavemente e deixando-se a incubar durante a noite, a 55°C, para completa degradação proteica.

Após a incubação, adicionaram-se 500 μL da mistura fenol:clorofórmio:ácido isoamílico (25:24:1, Sigma) e centrifugou-se a 14000 rpm durante 5 minutos, de modo a separar a fase aquosa, que contém o DNA, da fase orgânica, onde se encontram as proteínas degradadas. A fase aquosa foi recolhida para um novo tubo *ependorf* e procedeu-se a uma nova extração com fenol:clorofórmio:ácido isoamílico (adicionando-se, novamente, 500 μL da mistura fenol:clorofórmio:ácido isoamílico). Separou-se, novamente, a fase aquosa para um novo tubo e adicionou-se igual volume de isopropanol puro, promovendo assim a precipitação do DNA. Envolveu-se o fragmento de DNA e procedeu-se à lavagem do mesmo com etanol a 70% (v/v). Após completa evaporação do etanol, o DNA foi ressuspensão em água desionizada estéril. As amostras de DNA genómico extraído foram armazenadas a -20°C.

2.1.2.2. Kit comercial

O DNA genómico foi também extraído das amostras de sangue através do kit comercial *QIAamp® DNA Blood Mini* (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante. Para iniciar a extração, pipetaram-se 20 μL de proteinase K para um tubo *ependorf*, seguindo-se a adição de 200 μL de amostra de sangue e de *buffer* AL, tendo-se vortexado a

mistura por 15 segundos. Incubou-se a solução a 56°C durante 10 minutos e realizou-se uma breve centrifugação para remover possíveis gotas retidas na tampa. Em seguida, adicionaram-se 200 µL de etanol absoluto e misturou-se no vórtex durante 15 segundos e centrifugou-se à velocidade máxima, durante 1 minuto. Cuidadosamente, transferiu-se a mistura para uma coluna *QIAamp Mini*, e centrifugou-se a 8000 rpm, durante 1 minuto. Colocou-se a coluna num novo tubo e adicionaram-se 500 µL de *buffer AW1*, procedendo-se à centrifugação a 8000 rpm, durante 1 minuto. Transferiu-se a coluna para um novo tubo e adicionaram-se 500 µL de *buffer AW2*, centrifugando-se a 14000 rpm durante 3 minutos. Por fim, para eluição do DNA, colocou-se a coluna num tubo *ependorf*, adicionaram-se 200 µL de água destilada, incubou-se à temperatura ambiente durante 1 minuto e centrifugou-se a 8000 rpm, durante 1 minuto. Descartou-se a coluna e armazenou-se o tubo *ependorf* contendo o filtrado com o DNA a -20°C.

2.1.3. Análise da integridade e da concentração do DNA genómico por espectrofotometria e por análise eletroforética em gel de agarose

A avaliação da integridade do DNA, assim como a determinação de possíveis contaminações por RNA, foi verificada por análise em gel de agarose (Nzytech). Foram colocados 5µL da amostra de DNA e 5 µL do padrão de peso molecular λ /*HindIII* (Fermentas) num gel de agarose 0,7% (p/v) em tampão TAE 1x (Tris 40 mM, acetato de sódio 5 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) com 0,5 µg/mL de brometo de etídio. A separação eletroforética foi realizada a 80 V, durante 40 minutos. Após a corrida, procedeu-se à aquisição da imagem utilizando o sistema *BIO DOC-IT™ Imaging System* (UVP).

A concentração do DNA, bem como a pureza, foram determinadas por análise espectrofotométrica recorrendo a um espectrofotómetro (THERMO SCIENTIFIC – NANODROP 2000), e utilizando água como branco. A concentração de DNA total foi estimada, tendo em conta que uma unidade de $A_{260\text{nm}}$ corresponde à concentração de 50 ng/µL de DNA de cadeia dupla. A contaminação com proteínas e com RNA foi avaliada através da análise da razão $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$, onde valores inferiores a 1,75 indicam contaminação por proteínas, enquanto valores superiores a 2,00 sugerem contaminação com RNA. Também foi avaliada a contaminação por compostos orgânicos através da razão $A_{230\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$, onde valores inferiores a 1,75 indicam contaminação por compostos orgânicos.

2.1.4. Amplificação do DNA

A amplificação dos fragmentos de DNA correspondentes a regiões contendo os polimorfismos a avaliar neste estudo foi realizada recorrendo à técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Para este estudo, foram utilizadas misturas de reação de PCR para um volume final de 50 μ L, contendo 50 ng de DNA molde 1 μ L dNTPs (10mM, Nzytech), 4 μ L $MgCl_2$ (25mM, Fermentas), 5 μ L tampão de enzima 10x (Fermentas), 1 μ L *Taq* DNA polimerase (produzida no laboratório), 1,15 μ L de cada *primer* (10 μ M) e água ultrapura para perfazer o volume. No estudo do polimorfismo CYP2C19*17, foi efetuado um PCR *nested*, tendo-se utilizado 1 μ L de produto da primeira reação como DNA molde para a segunda reação. O controlo negativo foi realizado usando a mesma mistura reacional, mas sem DNA, sendo o volume de DNA substituído por igual volume de água. Para cada polimorfismo em análise, utilizaram-se *primers* específicos obtidos de StabVida (Oeiras, Portugal), cuja sequência é apresentada na tabela 8. Após receção dos *primers*, estes foram reconstituídos em água numa concentração final de 100 μ M.

Tabela 8: Sequência dos *primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos de DNA genómico contendo a zona dos polimorfismos em estudo. Abreviaturas: SNP- *Single Nucleotide Polymorphism*; Fwd - *primer forward*; Rev - *primer reverse*; pb - pares de bases.

* O primeiro número corresponde ao tamanho do fragmento de DNA correspondente ao 1º PCR (*primers* utilizados Fwd1 e Rev1) e o 2º ao do PCR *nested* (*primers* utilizados Fwd2 e Rev2).

Gene	SNP	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
<i>MDR1</i>	C3435T	Fwd: 5' TGC TGG TCC TGA AGT TGA TCT 3' Rev: 5' ACA TTA GGC AGT GAC TCG ATG 3' (Balram, Sharma et al. 2003)	248
<i>CYP2D6</i>	CYP2D6*4 (G1934A)	Fwd: 5'GCT TCG CCA ACC ACT CCG 3' Rev: 5'AAA TCC TGC TCT TCC GAG GC 3' (Lemos, Carrilho et al. 2007)	334
<i>CYP2C19</i>	CYP2C19*17 (C-806T)	Fwd1: 5'GCC CTT AGC ACC AAA TTC TC 3' Rev1: 5'ATT TAA CCC CCT AAA AAA ACA CG 3' Fwd2: 5'AAA TTT GTG TCT TCT GTT CTC AAT G 3' Rev2: 5'AGA CCC TGG GAG AAC AGG AC 3' (Anichavezhi 2011)	470; 143*

Programou-se o termociclador, Bio-Rad C1000™ Thermal Cycler, especificamente para cada reação de PCR, de acordo com o indicado na tabela 9. Os produtos amplificados por PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 3% em tampão SGTB 1x (Grisp), onde se aplicaram igualmente 5 μ L do padrão de peso molecular (NZYtech Ladder IV).

Tabela 9: Condições de PCR utilizadas para a amplificação das zonas de DNA genômico contendo os polimorfismos em estudo.

Condições de Amplificação	C3435T	CYP2C19*17		CYP2D6*4
		PCR I	PCR II	
Desnaturação inicial	94°C, 15 min	94°C, 5 min	95°C, 5 min	94°C, 5 min
Desnaturação	94°C, 1 min	94°C, 30 s	95°C, 1 min	94°C, 1 min
Emparelhamento dos primers	60°C, 45 s	52°C, 30 s	64°C, 30 s	65°C, 1 min
Extensão	72°C, 30 s	72°C, 30 s	72°C, 30 s	72°C, 1 min
Extensão final	72°C, 5 min	72°C, 7 min	72 ° C, 7 min	72°C, 5 min
Número de ciclos	37	34	24	30

2.1.5. Análise dos polimorfismos por *Restriction Fragment Length Polymorphism*

Os polimorfismos em estudo neste trabalho foram analisados recorrendo à técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Esta técnica permitiu a identificar a presença/ ausência do polimorfismo na amostra biológica em estudo, após a amplificação por PCR.

Para a análise dos polimorfismos C3435T, CYP2D6*4 e do CYP2C19*17, foi utilizado um volume de produto de PCR correspondente a 1µg de cada amostra, para digestão com as enzimas de restrição *MboI*, *MvaI* e *NsiI* (Fermentas), respetivamente. Para cada restrição, utilizou-se o tampão 10x respetivo (Fermentas), segundo as instruções fornecidas pelo fabricante, num volume final de reação de 10 µL. Incubou-se a mistura de restrição a 37°C durante 3 horas e após esta incubação, procedeu-se à inativação das enzimas *MboI* e *NsiI* por incubação a 65°C.

Os produtos de restrição obtidos pelo método de RFLP foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 7% (preparado com Acrilamida / Bis-acrilamida 30%; Bio-Rad), decorrida a uma voltagem de 120 V durante 45 minutos, aplicando um volume de 10 µL de produto de digestão em cada poço e 5 µL do padrão de peso molecular (NZYtech Ladder IV), após a qual se revelou o gel numa solução contendo 20 mL de TBE 1x (Bio-Rad) e 1 µL de brometo de etídio (10 µg/mL) durante aproximadamente 5 minutos.

2.1.6. Análise dos polimorfismos por *High Resolution Melting*

A técnica de *High Resolution Melting* (HRM) é uma técnica que permite, à semelhança do RFLP, detetar a presença/ ausência de polimorfismos, conseguindo desta forma identificar o genótipo. Esta técnica foi utilizada como alternativa ao método de PCR – RFLP por ultrapassar, principalmente, o tempo de análise e, por se tratar de uma ferramenta bastante sensível e precisa. O HRM gera perfis de curvas de *melting* de DNA que são específicas e sensíveis o suficiente para ter a capacidade de detetar pequenas diferenças na sequência de DNA, permitindo assim a genotipagem. Esta técnica exige que o DNA se encontre em boas condições de pureza e que os produtos de PCR sejam de baixo peso molecular, preferencialmente compreendidos entre 50 e 100 pb.

Para a realização do HRM, prepararam-se as misturas da reação com um volume total de 20 µL, onde se colocou 10 ng de DNA, 0,5 µL de cada um dos respetivos *primers* (10 µM), 10 µL da mix (*Precision Melt Supermix 2x*, Bio-Rad) e água até perfazer o volume de 20 µL. O controlo negativo foi realizado usando a mesma mistura reacional, sem DNA. As reações ocorreram num termociclador (Bio-Rad C1000™ *Thermal Cycler*), e encontram-se descritas na tabela 10. No final da reação, os dados foram obtidos e, posteriormente, analisados utilizando o *software* “*Precision Melt Analysis™* Software”, versão 1.1 (Bio-Rad).

Tabela 10: Condições de HRM utilizadas para a amplificação e análise das zonas de DNA genómico contendo os polimorfismos em estudo.

Condições de amplificação	CYP2C19*17	CYP2D6*4	C3435T	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95°C, 2 min			1
Desnaturação	95°C, 10 s			44
Annealing (+ plate read)	57°C, 30 s	52°C, 30 s	50,7°C, 30 s	
Formação de heteroduplexes	95°C, 30 s			1
	60°C, 1 min			1
HRM (+ plate read)	<i>Melting Curve</i> de 65°C a 95°C: incrementos de 0,2°C por cada 10 s			1

2.1.6.1. Desenho de *primers* para a análise dos polimorfismos por HRM

Os *primers* (tabela 11) foram desenhados de forma a amplificar a região contendo os polimorfismos de interesse, tendo sido fornecidos pela StabVida (Oeiras, Portugal). Depois de desenhados, os *primers* foram analisados quanto à sua especificidade no programa *Blast* da PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Após receção dos *primers*, estes foram reconstituídos em água a uma concentração final de 100 µM.

Tabela 11: Sequência dos *primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos de DNA genómico contendo a zona dos polimorfismos em estudo, por HRM. Abreviaturas: SNP- *Single Nucleotide Polymorphism*; Fwd - *primer forward*; Rev - *primer reverse*; pb - pares de bases.

Gene	SNP	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
<i>MDR1</i>	C3435T	Fwd: 5' GGGTGGTGTACAGGAAGAG 3' Rev: 5' AGGCAGTGACTCGAGAAGG 3'	74
<i>CYP2D6</i>	CYP2D6*4 (G1934A)	Fwd: 5' ACCCCTTACCCGCATCTC 3' Rev: 5' TTGCTCACGGCTTTGTCC 3' (Pindurová, Zourková et al. 2012)	74
<i>CYP2C19</i>	CYP2C19*17 (C-806T)	Fwd: 5' AAATTTGTGTCTCGTTCTCAA 3' Rev: 5' TAGCTGGCAGAAGTGGGATT 3'	100

2.2. Análise da expressão da glicoproteína-P em linhas celulares tumorais com diferente genótipo

2.2.1. Material biológico

Neste estudo, utilizaram-se três linhas celulares tumorais humanas de adenocarcinoma coloretal: Caco-2 e HCT-15, obtidas da *American Type Culture Collection*, EUA – ATCC, e HT29-MTX, gentilmente cedida pelo Professor Doutor Bruno Sarmento, Instituto Superior de Ciências da Saúde – Norte.

2.2.2. Crescimento e condições de cultura das linhas celulares

Todas as linhas celulares foram cultivadas em meio "*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*" (DMEM GIBCO™, Invitrogen). Os meios foram previamente suplementados com 10% (v/v) de Soro Bovino Fetal inativado (FBS, Gibco™, Invitrogen) e 1% (v/v) de antibiótico-antimicótico (penicilina-estreptomicina, Sigma-Aldrich). O meio foi ainda

suplementado com 1% de aminoácidos não essenciais (Gibco) para as linhas Caco-2 e HT29-MTX.

As três linhas celulares foram mantidas em frascos T25 (Nunclon™ Δ Surface), à temperatura de 37°C e a uma pressão parcial de CO₂ de 5%, em atmosfera humidificada (Water Jacketed CO₂ Incubators, Shel Lab). Todas as experiências, que envolveram cultura de células, foram realizadas numa câmara de fluxo laminar de segurança biológica de classe 2, tipo A (Scanlaf, Mars).

2.2.2.1. Subcultura das linhas celulares

De forma a evitar a confluência total das células e, conseqüentemente, a falta de espaço e de nutrientes, foram realizadas subculturas periódicas. Assim, procedeu-se à passagem das células (destacamento das células do frasco de cultura, por adição de tripsina e inoculação em novo meio), quando estas atingiam cerca de 80% de confluência. O meio de cultura foi removido e as células, que crescem em monocamada, foram sujeitas a lavagem com PBS, para retirar qualquer vestígio do meio de cultura. Após a lavagem, as células foram incubadas, a 37°C, com 1 mL de tripsina TrypLE™ Express (Gibco™, Invitrogen) para as linhas celulares HT29-MTX e Caco-2, e 500 μ L para a linha celular HCT-15, por cerca de 5 minutos, até se observar o destacamento das células. A fim de parar a ação da tripsina, adicionou-se 1 mL de meio de cultura contendo FBS, e as células destacadas foram ressuspensas, de modo a evitar aglomerados celulares. De seguida, recolheram-se 20 μ L da suspensão celular e adicionaram-se 20 μ L de azul de tripano 0,4% (Sigma) para determinação da quantidade de células e da viabilidade celular, numa câmara de Neubauer. Por último, transferiu-se o volume equivalente à densidade ótima para a linha celular em causa e para a capacidade do novo frasco T25, contendo 5 mL de meio de cultura. Todas as soluções utilizadas foram previamente aquecidas a 37°C num banho termostático.

2.2.2.2. Congelamento e descongelamento das linhas celulares

De modo a prevenir a perda de características fenotípicas, em consequência de um elevado número de passagens, as células foram periodicamente congeladas e armazenadas em contentores contendo azoto líquido. Para tal, as células foram tripsinizadas como referido na secção 2.2.2.1 e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi gentilmente ressuspensado em 1 mL de meio de cultura suplementado com 10% de DMSO (Sigma). A suspensão celular foi transferida para

criotubos (Cryovial®) e estes foram armazenados a -80°C durante 24h a 48h num contentor (Nalgene™ Cryo Freezing Container), contendo isopropanol, para que assim ocorresse o congelamento gradual das células. Decorrido esse tempo, os criotubos foram transferidos para um contentor contendo azoto líquido.

Para o descongelamento das linhas celulares, os criotubos contendo as células congeladas foram rapidamente colocados num banho termostaticado a 37°C. Após o descongelamento, a suspensão celular foi transferida para um frasco de cultura T25 contendo cerca de 8 mL de meio de cultura previamente aquecido a 37°C. O volume de meio usado foi superior ao habitual, de forma a diminuir a toxicidade provocada pelo DMSO. Após a adesão celular, o meio foi substituído por meio de cultura novo.

2.2.3. Extração de DNA genómico de linhas celulares

A extração de DNA genómico das linhas celulares foi realizada utilizando o kit QIAamp® DNA Blood Mini, fornecido pela QIAGEN, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, as quais se descrevem em seguida.

Após tripsinização, a suspensão celular foi recolhida para um tubo *Falcon* de 15 mL (num volume correspondente a uma quantidade de células não superior a 5×10^6 células). De seguida, centrifugou-se a suspensão celular a 12000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 200 µL de PBS. O restante protocolo foi efetuado como referido na secção 2.1.2.2.

A avaliação da integridade do DNA genómico extraído das três linhas celulares tumorais foi efetuada por eletroforese em gel de agarose. A concentração e a pureza do DNA foram avaliadas por espectrofotometria. Ambos os métodos foram realizados como descrito na secção 2.1.3.

2.2.4. Análise do polimorfismo C3435T nas linhas celulares

Após extração do DNA das três linhas celulares, um segmento do gene *MDR1* contendo a região onde ocorre o polimorfismo C3435T foi amplificado como consta na secção 2.1.4 e a presença / ausência do polimorfismo C3435T foi avaliada através da técnica de RFLP, como descrito na secção 2.1.5.

2.2.5. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio SRB

O ensaio com sulforrodamina B (SRB, Sigma), tem como objetivo avaliar o efeito citotóxico de um composto. A SRB é um corante de cor púrpura, solúvel em água que, em condições ácidas, como é o caso das condições proporcionadas pela fixação com ácido tricloroacético (TCA, Merck) se liga a aminoácidos básicos das proteínas, dissociando-se dos mesmos em condições alcalinas (por adição de tampão Tris 10 mM). Ao dissociar-se das proteínas, a SRB origina uma solução corada, cuja absorvância será proporcional ao conteúdo proteico. Deste modo, quanto maior o número de células, maior a quantidade de proteínas expostas e maior a quantidade de SRB que se liga a essas proteínas, funcionando o valor de densidade óptica correspondente como um indicador da viabilidade celular. Para o ensaio SRB, procedeu-se de acordo com o seguinte protocolo:

As células foram inoculadas em placas de 96 poços à densidade celular adequada para cada linha celular por um período de 24h a 37°C, em meio de cultura apropriado, de forma a ocorrer a adesão celular. Após este período, o meio de cultura foi removido e as células sujeitas ao tratamento desejado. Após este tratamento, as células foram fixadas com 25 µL, por poço, de TCA 50% por 1h a 4°C, lavadas 5 vezes consecutivas com água desionizada, de forma a remover o TCA e deixadas a secar à temperatura ambiente durante a noite. Procedeu-se então à adição a cada poço de 50 µL de SRB 0,4% em ácido acético 1% (v/v), seguido de incubação de 30-60 minutos, a 37°C. Após este período de incubação, a placa foi lavada 5 vezes com ácido acético 1% (v/v), de modo a remover a SRB que não se ligou às proteínas. Depois das placas estarem secas, a SRB complexada com proteínas foi solubilizada com 100 µL de Tris 10 mM por poço e, leu-se a absorvância a 540 nm num leitor de placas (Biotek Synergy 2).

2.2.6. Determinação do IC₅₀ para a doxorrubicina

Para determinar o valor de IC₅₀ da doxorrubicina, para as três linhas celulares utilizadas, as células foram inoculadas em placas de 96 poços (100 µL / poço), a uma densidade apropriada para cada linha celular: 10 000 células / poço (HT29-MTX e Caco-2) e 7500 células / poço (HCT-15). As células foram incubadas, a 37°C, durante 24h e, de seguida, foram tratadas com a doxorrubicina a diferentes concentrações (0 (células não tratadas); 0,1; 0,5; 1; 4; 20; 100; 250 µM) por um período de 48h. Foram também incluídos no ensaio, brancos, em que os poços continham meio e composto às diferentes concentrações utilizadas. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio de SRB, como descrito na secção 2.2.5.

A percentagem de células viáveis foi determinada, após subtração dos respetivos brancos, utilizando o valor da absorvância das células não sujeitas a tratamento como 100% de viabilidade. O valor de IC₅₀ foi determinado por tratamento dos resultados obtidos, de três experiências independentes, realizadas em triplicado, no *software GraphPad Prism 5.00*, utilizando uma regressão não linear do tipo dose-resposta sigmoideal (inclinação variável), após transformação logarítmica.

2.2.7. Avaliação da expressão da glicoproteína-P

Os níveis de expressão da Pgp foram avaliados ao nível proteico, por *Western-Blot*.

2.2.7.1. Extração e quantificação de proteínas

As três linhas celulares foram plaqueadas, em triplicado, em placas de 6 poços. Após atingirem cerca de 80% de confluência, incubaram-se as células com doxorubicina, numa concentração correspondente ao IC₅₀, previamente determinado de acordo com o descrito na secção 2.2.6. Como controlo utilizaram-se células não tratadas com doxorubicina. Após 48h, retirou-se o meio de cultura e lavaram-se as células com 1 mL de PBS frio. De seguida, adicionaram-se 200 µL de tampão de lise (NaCl 150 mM; Tris-HCl 50 mM pH 7,5; EDTA 0,1 mM; Triton X-100 1% (v/v); NP40 1% (v/v); 1/7 de *cocktail* de inibidores de proteases (Roche)) e raspam-se as células de forma a destacá-las. Neste procedimento, as células foram sempre mantidas em gelo. Depois de raspadas, as células foram transferidas para um tubo *eppendorf* e, em seguida, deixaram-se os lisados celulares a incubar em gelo durante quinze minutos, sendo vortexados ocasionalmente. Centrifugaram-se as amostras a 4°C, durante 5 minutos, a 13000 rpm, em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi recolhido para ensaios de Western-Blot, guardando-se as amostras a -80°C.

Os ensaios de quantificação foram realizados utilizando o kit “BCA™ Protein Assay Kit” (Pierce Biotechnology, Inc.), seguindo-se as instruções fornecidas pelo fabricante. Efetuou-se uma curva de calibração (D.O. versus concentração de proteína total) com albumina do soro bovino. Adicionaram-se 200 µL de reagente de trabalho a 25 µL de padrão assim como às diferentes amostras diluídas, tendo sido efetuada a leitura dos valores de absorvância a 562 nm após 30 minutos de incubação a 37°C.

2.2.7.2. Separação de proteínas por SDS-PAGE

As amostras proteicas foram separadas e analisadas por em SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Utilizou-se o volume de amostra correspondente a 20 µg de proteína, as quais foram desnaturadas por calor e aplicadas num gel de poliacrilamida (constituído pelo gel resolvente a 7,5% e pelo gel de empacotamento a 6%) em tampão de eletroforese (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%; pH 8,3). A eletroforese decorreu a uma voltagem de 200 V durante aproximadamente 60 minutos. Com o intuito de confirmar o peso molecular da proteína em análise, utilizou-se o padrão de peso molecular *Precision Plus Protein™* (Bio-rad). O gel obtido após eletroforese foi utilizado para Western-blot de acordo com o protocolo seguidamente descrito.

2.2.7.3. Western-Blot

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Protan, Whatman®), utilizando-se tampão de transferência (Glicina 192mM; Tris Base 25mM; Metanol 20% (v/v); pH 8,3). A transferência decorreu durante 75 minutos, a 110 mA, 25 V usando o sistema de transferência TE70 ECL Semi-dry, Transfer Unit, Amersham Biosciences. No final da transferência, a membrana de nitrocelulose foi lavada com *Tris-Buffered Saline Tween-20* (TBST, Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, Tween-20® 0,1% (v/v)), para remover vestígios de acrilamida. Com o intuito de verificar o sucesso da transferência, mergulhou-se a membrana numa solução de *Ponceau S* (*Ponceau S* 0,5% (p/v); TCA 5% (p/v)). De modo a evitar ligações inespecíficas, efetuou-se o bloqueio das membranas em solução de bloqueio (leite em pó magro 5% (p/v) em TBST), durante uma hora, à temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C, ambas com agitação suave. De seguida, lavaram-se as membranas numa solução de leite em pó magro 1% (p/v) em TBST e efetuou-se a incubação com o anticorpo primário (*rabbit anti-Pgp*; 1:200; Santa Cruz Biotechnology) durante 60 minutos à temperatura ambiente ou, alternativamente, a 4°C durante a noite, com agitação suave. O anticorpo α -Tubulina (*mouse anti- α -Tubulina*; 1:400; Sigma) foi utilizada como controlo de *loading*. Lavaram-se, novamente, as membranas numa solução de leite em pó magro 1% (p/v) em TBST e incubaram-se com o anticorpo secundário acoplado à *horseradish peroxidase* (*anti-rabbit IgG*, 1:1500, Sigma; *anti-mouse IgG*, 1:1500, Vector), específico contra as imunoglobulinas do anticorpo primário, durante uma hora, à temperatura ambiente, ou a 4°C durante a noite, ambas com agitação suave. Após a incubação, efetuaram-se três lavagens com TBST, durante 10

minutos à temperatura ambiente e com agitação suave. Por último, foi feita a revelação em solução de revelação *Enhanced Chemiluminescence* (ECL – Tris 100 mM pH 8,5; Ácido Coumárico 90 mM; Luminol 100mM; H₂O₂ 0,5% (v/v)). Na câmara escura, as membranas foram colocadas em cassetes de revelação (Hypercassette™ Amersham Biosciences) e, sobre elas, o filme autorradiográfico (Kodak BioMax Light Film), durante diferentes períodos de tempo, aos quais se seguiu a revelação num revelador automático. Alternativamente, os filmes foram revelados de forma manual, por exposição a solução de revelação, seguida por água, solução de fixação e novamente por água. Os filmes foram deixados a secar ao ar à temperatura ambiente e o teor de proteína foi estimada medindo a densidade de cada banda e de modo a normalizar o conteúdo da α -tubulina com o *software* “Image J”.

2.3. Estudo da expressão do gene *MDR1* na presença e ausência do polimorfismo C3435T em *Saccharomyces cerevisiae*

2.3.1. Material biológico

2.3.1.1. Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados neste trabalho experimental encontram-se descritos na tabela 12.

Tabela 12: Plasmídeos utilizados no estudo e respetiva descrição.

Plasmídeos	Descrição	Origem
pCR-XL-TOPO	Plasmídeo bacteriano contendo o gene <i>MDR1</i> humano codificante da Pgp	<i>Invitrogen Life Technologies</i>
p416-GPD	Plasmídeo de expressão centromérico, que contém o promotor constitutivo GPD (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase)	(Mumberg, Muller et al. 1995)
pUG35	Plasmídeo de expressão centromérico, que contém o promotor da metionina (MET25) e a região codificante da yEGFP3	Guldener e Hegeman, Não publicado
p416-GPD-MDR1	Derivado do plasmídeo p416-GPD por inserção do gene <i>MDR1</i> , no local de restrição <i>Bam</i> HI e <i>Xba</i> II do MCS	Construído neste trabalho
p416-MDR1-GR	Derivado do plasmídeo p416-GPD por inserção do gene <i>MDR1</i> no local de restrição <i>Eco</i> RI e <i>Sal</i> I do MCS, pelo método <i>Gap Repair</i>	Construído neste trabalho
p416-MDR1-GR-C3435T	Derivado do plasmídeo p416-MDR1-GR por inserção do polimorfismo C3435T no gene <i>MDR1</i> por mutagénese dirigida	Construído neste trabalho
pUG35-MDR1	Derivado do plasmídeo pUG35 por inserção do gene <i>MDR1</i> , no local de inserção <i>Eco</i> RI e <i>Sal</i> I do MCS, pelo método <i>Gap Repair</i>	Construído neste trabalho

2.3.1.2. Estirpes de levedura e estirpe de bactéria

Neste estudo, foram utilizadas diferentes estirpes da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, encontrando-se descritas tabela 13.

Tabela 13: Estirpes de levedura *S. cerevisiae* utilizadas neste estudo e respectivos genótipos.

Estirpe	Genótipo	Origem
W303-1A	MAT α , ade2, can1, ura3, leu2, his3, trp1	(Thomas and Rothstein 1989)
AD1-8	MAT α , pdr1-3, ura3, his1, yor1 Δ ::hisG, snq2 Δ ::hisG, pdr5- Δ 2::hisG, pdr10 Δ ::hisG, pdr11 Δ ::hisG, ycf1 Δ ::hisG, pdr3- Δ 2::hisG, pdr15 Δ ::hisG	Cedido pela Professora Doutora Margarida Casal
AD1-8-p416-MDR1	AD1-8 transformada com o plasmídeo p416-MDR1	Presente trabalho
AD1-8-p416-MDR1-GR	AD1-8 transformada com o plasmídeo p416-MDR1-GR	Presente trabalho
AD1-8-p416-MDR1-GR-C3435T	AD1-8 transformada com o plasmídeo p416-MDR1-C3435T	Presente trabalho
AD1-8-pUG35	AD1-8 transformada com o plasmídeo pUG35	Presente trabalho
AD1-8-pUG35-MDR1	AD1-8 transformada com o plasmídeo pUG35-MDR1	Presente trabalho

A estirpe de bactéria *Escherichia coli* XL1-Blue (*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thirelA1lac-F'*[*proAB+lacIqlacZ Δ M15Tn10(tetr)*]), foi utilizada como organismo hospedeiro nas estratégias de amplificação e manutenção de vetores de DNA.

As estirpes de levedura e de bactéria foram preservadas a -80°C, em criotubos de 2 ml, contendo uma solução de glicerol a 30% (v/v).

2.3.2. Crescimento e condições de cultura

As estirpes de levedura foram cultivadas em meio líquido "Yeast Extract Peptone Dextrose" (YEPD; extrato de levedura 1% (p/v), peptona 1% (p/v), glicose 2% (p/v)). No crescimento de leveduras com marcas auxotróficas, foi utilizado o meio "Yeast Nitrogen Base" (YNB) 0,67% (p/v), suplementado com os nutrientes necessários para o seu crescimento prototrófico (histina 40mg/L, triptofano 40 mg/L, leucina 40 mg/L, adenina 40 mg/L). Estes componentes foram esterilizados por filtração e, posteriormente, adicionados em condições de assépsia ao meio esterilizado por calor húmido. Os meios sólidos foram preparados por adição de agar 2% (p/v). Os crescimentos foram realizados

em balões *Erlenmeyer*, com capacidade quántupla do volume de meio de cultura utilizado. O crescimento das leveduras foi realizado a 30°C num agitador orbital (Infort HT Ecotron), a 150 rpm.

A estirpe de bactéria foi cultivada em meio "*Luria-Bertani*" (LB; bacto-triptona 1% (p/v), NaCl 1% (p/v) e extracto de levedura 0,5% (p/v)) suplementado quando necessário, com ampicilina (100 mg/L, Sigma) ou kanamicina A (25 mg/L, NZYtech) após esterilização. O meio sólido foi preparado por adição de agar 2% (p/v), com o objetivo de seleccionar transformantes. As culturas de *E. coli* foram incubadas a 37°C num banho termostático com agitação (OLS200 Grant), a 120 rpm.

2.3.3. Extração de DNA plasmídico

A extração de DNA plasmídico a partir de culturas bacterianas foi realizada pelo sistema GenElute™ Plasmid Miniprep Kit, fornecido pela Sigma, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante e, as quais se descrevem em seguida.

Colocaram-se, previamente, as bactérias transformadas com os plasmídeos a crescer *overnight* a 37°C, 150 rpm. Para o isolamento de DNA plasmídico utilizaram-se cerca de 5 mL da cultura de bactérias que foram centrifugados à velocidade máxima, por 1 minuto. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspensão em 200 µL da solução de ressuspensão. De seguida, adicionaram-se 200 µL da solução de lise e inverteu-se cuidadosamente o tubo 5 vezes. Adicionaram-se 350 µL da solução de neutralização, misturou-se por inversão e centrifugou-se à velocidade máxima durante 10 minutos. Paralelamente, preparou-se a coluna, com a adição de 500 µL da solução de preparação e centrifugou-se à velocidade máxima durante 1 minuto. Colocou-se o lisado na coluna e centrifugou-se novamente à velocidade máxima, durante 1 minuto. Descartou-se o eluído e adicionou-se à coluna 750 µL da solução de lavagem, centrifugando-se 1 minuto à velocidade máxima. O passo de centrifugação foi repetido, de modo a garantir que a coluna ficasse seca. Por fim, adicionou-se 50 µL de água e centrifugou-se à velocidade máxima durante 1 minuto. Descartou-se a coluna e armazenou-se o tubo *ependorf* contendo o filtrado com o DNA a -20°C.

A avaliação da integridade do DNA plasmídico foi efetuada por eletroforese em gel de agarose. A concentração e a pureza do DNA foram avaliadas por espectrofotometria. Ambos os métodos foram realizados como descrito na secção 2.1.3.

Procedeu-se também ao isolamento de DNA plasmídico de células de levedura transformadas pelo método *Gap Repair*, com a finalidade de confirmação da clonagem pretendida. Para tal, foi utilizado o procedimento anteriormente descrito, com algumas

alterações, enumeradas em seguida. As células de levedura transformadas foram crescidas em meio de seleção (YNBGlucose sem uracilo) a 30°C. Após esse tempo, as células foram centrifugadas a 5000 rpm durante 5 minutos e, após remoção do sobrenadante, ressuspensas em 200 µL da solução de ressuspensão do kit. Adicionaram-se 300 µL de esferas de vidro (~0,6 mm de diâmetro, Sigma) e vortexaram-se as células 5 vezes um minuto, com intervalos de igual período no gelo. Os restantes passos foram idênticos aos descritos para o isolamento de DNA plasmídico de células bacterianas. Após isolamento, utilizaram-se 5 µL do DNA isolado para transformar células bacterianas competentes. O DNA plasmídico foi finalmente isolado de células bacteriana e analisado por restrição enzimática.

2.3.4. Digestão do DNA plasmídico com enzimas de restrição

De forma a digerir o DNA plasmídico do vetor p416-GPD e pCR-XL-Topo, foi preparada uma mistura reacional contendo 7 µL de DNA plasmídico, 1 µL *Bam*HI, 1 µL *Xba*I e 1 µL tampão Tango 10x (Fermentas). Quando necessário, fez-se um *up-scale* da reação, de forma a obter uma maior quantidade do fragmento a purificar. As misturas de restrição foram incubadas *overnight*, a 37°C. De forma a evitar a recircularização do plasmídeo p416-GPD, efetuou-se a desfosforilação do plasmídeo com *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP, Fermentas) de acordo com as instruções do fabricante.

Os fragmentos de DNA digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em TAE 1x, decorrida a uma voltagem de 90 V durante 60 minutos, aplicando a totalidade do produto de digestão e 5 µL do padrão de peso molecular λ /*Hind*III (Fermentas) em cada poço.

2.3.5. Purificação de fragmentos de DNA

Após digestão e análise em gel de agarose dos fragmentos de DNA digeridos, estes foram purificados através do sistema NZYGelpure (NZYtech), de acordo com as instruções do fabricante e, o qual se descreve em seguida. O fragmento digerido foi isolado, tendo sido determinada a sua massa. Foram adicionados 300 µL da solução de ligação por cada 100 mg de fragmento obtido. Incubou-se a solução a 55°C durante 10 minutos e, ocasionalmente, a solução foi misturada de modo a garantir a total dissolução da agarose. De seguida, adicionou-se um volume de isopropanol igual à massa do fragmento e inverteu-se vigorosamente o tubo *ependorf*. Colocou-se a solução na coluna e centrifugou-se à velocidade máxima, durante 1 minuto. Descartou-se o eluído e

adicionaram-se à coluna 500 μL da solução de lavagem, centrifugando-se 1 minuto à velocidade máxima. O passo de centrifugação foi repetido, de modo a garantir que a coluna ficasse seca. Por fim, adicionou-se 30 μL de água e centrifugou-se à velocidade máxima durante 1 minuto. Descartou-se a coluna e armazenou-se o tubo *ependorf* contendo o filtrado com o DNA digerido a -20°C .

2.3.6. Ligação de fragmentos de DNA

A ligação do fragmento de DNA correspondente ao gene *MDR1* ao plasmídeo p416 foi realizada pelo kit DNA ligase (Sigma). Inicialmente, testaram-se diferentes proporções de *insert/vector*, de forma, a escolher qual a melhor razão molar da concentração do vector e do fragmento a inserir (compreendidas entre 5:1 e 1:3). A mistura reacional continha 1 μL de enzima T4 DNA ligase, 1 μL de tampão de ligação 10x, *insert* e vector em diferentes proporções e água até perfazer um volume de 10 μL . Como controlo negativo da ligação, efetuou-se uma mistura reacional sem *insert*. As misturas reacionais foram incubadas a 16°C , *overnight* e o produto de ligação foi posteriormente amplificado por transformação de *E. coli*.

2.3.7. Preparação de células competentes

As células competentes foram preparadas segundo o protocolo descrito por Inoue e colaboradores, o qual se encontra descrito de seguida (Inoue, Nojima et al. 1990). Uma cultura de *E. coli* XL-1 foi crescida em meio LB a 37°C , a 120 rpm durante a noite. No dia seguinte, uma alíquota de 1 mL dessa cultura foi diluída em 200 mL de meio SOB (triptona 2%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM) e foi crescida a 18°C , a 200 rpm até atingir uma $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ entre 0,4 e 0,6 (aproximadamente 36h). De seguida, as células foram recolhidas por centrifugação a 4°C a 3000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas gentilmente em 67 mL de tampão de transformação (PIPES 10 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15 mM; KCl 250 mM; MnCl_2 55 mM) previamente arrefecido. Incubaram-se as células em gelo durante 10 minutos e foi realizado uma nova centrifugação. O sobrenadante foi rejeitado e as células foram novamente ressuspensas em 16 mL de tampão de transformação gelado. Foram adicionados 1200 μL de DMSO e incubou-se em gelo por 10 minutos. A suspensão celular foi dividida em tubos *ependorf* e colocadas em azoto líquido, sendo depois armazenadas a -80°C .

2.3.8. Transformação em *Escherichia coli*

As células competentes de *E. coli*, armazenadas a -80°C , foram descongeladas em gelo. Adicionaram-se a 50 μL de células competentes o volume conveniente de plasmídeo (ou o produto da mistura reacional de ligação), agitou-se cuidadosamente e incubou-se, em gelo, durante 20 minutos. De seguida, as células foram submetidas a um choque térmico num banho a 42°C durante 90 segundos, após o qual foram transferidas para o gelo, durante 2 minutos. De modo a permitir a recuperação das células e a expressão da resistência ao antibiótico, adicionaram-se 800 μL de meio SOB e incubou-se a 37°C , com agitação suave, durante 1h. A mistura foi centrifugada a 3000 rpm, durante 10 minutos, descartou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em 150 μL de meio SOB. Após a transformação, as células foram inoculadas em meio LB/Amp sólido e, uma vez obtido os transformantes, as colónias foram cultivadas em meio LB/Amp. Por fim, o DNA plasmídico foi isolado como descrito na secção 2.3.3.

2.3.9. Clonagem do gene *MDR1* nos vetores p416-GPD e pUG35 e expressão em *Saccharomyces cerevisiae* pelo método de *Gap Repair*

O gene *MDR1* foi também clonado no plasmídeo p416-GPD e no plasmídeo pUG35 através do método *Gap Repair* (Orr-Weaver, Szostak et al. 1983). Este método permite a clonagem direta de um fragmento de DNA no vetor de interesse, através da co-transformação de células de levedura com o vetor linearizado (*gapped*) e com o fragmento a clonar, o qual deverá conter regiões flanqueantes de pelo menos 30 pb, homólogas ao vetor no local de inserção. A levedura tem uma elevada capacidade recombinogénica, sendo assim capaz de reparar (*repair*) o vetor linearizado através da inserção do fragmento, por recombinação homóloga, originando dessa forma o plasmídeo recombinante (figura 7).

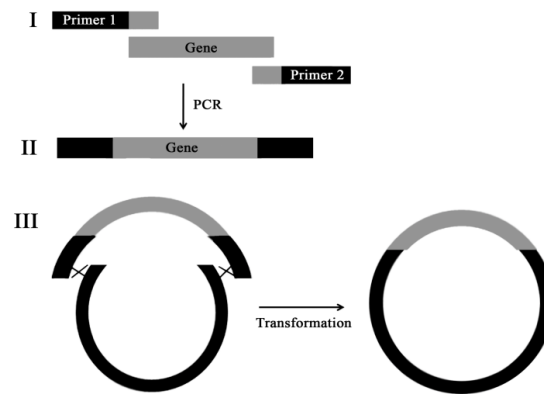


Figura 7: Representação esquemática do método *Gap Repair*. O fragmento que se pretende clonar é amplificado utilizando *primers* contendo na sua composição cerca de 30 pb homólogos ao vetor de clonagem e 20 pb homólogos ao gene (I). O produto de PCR, que corresponde ao gene a clonar, contendo zonas homólogas ao local de clonagem no vetor (II), é utilizado para transformação de levedura em conjunto com o vetor digerido e desfosforilado. Após a transformação, ocorre na levedura a recombinação homóloga entre o vetor e o fragmento nas zonas de homologia (III), originando o vetor recombinante retirado de (Bessa, Pereira et al. 2012).

Neste sentido, no presente trabalho o vetor p416-GPD e o vetor pUG35 foram linearizados com as enzimas de restrição *EcoRI* e *Sall* do *Multiple Cloning Site* (MCS). Foram preparadas misturas reacionais contendo: 15 μ L do vetor de interesse, 10 μ L de água, 1 μ L *EcoRI*, 1 μ L de *Sall*, 3 μ L tampão Orange 10x (Fermentas) e 1 μ L SAP. As misturas reacionais foram incubadas *overnight*, a 37°C e, após inativação das enzimas de restrição a 65°C por 20 minutos, foram utilizadas para transformar a estirpe de *S. cerevisiae* AD1-8, em conjunto com o gene *MDR1*, contendo regiões homólogas ao vetor em questão.

O gene *MDR1* foi amplificado através de *primers* específicos (tabela 14), constituídos por 30 pb homólogos aos vetores p416-GPD e pUG35, respetivamente, e 20 pb homólogos ao gene. As reações ocorreram segundo um programa que compreende uma desnaturação inicial a 95°C durante 4 minutos, 32 ciclos a 94°C por 15 segundos, 55°C por 1 minuto e 68°C por 5 minutos.

Tabela 14: Sequência dos *primers* utilizados para a amplificação do DNA correspondente ao gene *MDR1*. As bases que se encontram a verde, correspondem às bases homólogas ao vetor p416-GPD enquanto que as bases que se encontram a laranja, correspondem ao vetor pUG35. Abreviaturas: Fwd - *primer forward*; Rev - *primer reverse*; pb - pares de base.

Gene	Plasmídeo	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
<i>MDR1</i>	p416-GPD	Fwd: 5' TCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGGCTGCAG ATGGATCTGAAGGGGACCG 3' Rev: 5' GCGTGACATAACTAATTACATGACTCGAGG TTCCTGGCGCTTTGTTCCAG 3'	3842
	pUG35	Fwd: 5' TCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGGCTGCAG ATGGATCTGAAGGGGACCG 3' Rev: 5' ACCAGTGAATAATCTTCACTTTAGACAT CTGGCGCTTTGTTCCAGCCT 3'	

Após a obtenção do gene *MDR1* contendo as bases homólogas aos vetores, procedeu-se às transformações na estirpe AD1-8 com os vetores digeridos e desfosforilados, juntamente com o produto de amplificação. Como controlo, para determinar a frequência de vetor vazio recircularizado, efetuou-se uma transformação com o vetor digerido e desfosforilado. Foi ainda realizada uma transformação com o vetor p416-GPD e com o vetor pUG35, com o intuito de avaliar a eficiência da transformação.

2.3.10. Inserção do polimorfismo C3435T no gene *MDR1* por mutagénese dirigida

Com o objetivo de estudar a influência do polimorfismo C3435T na célula, procedeu-se à inserção desse polimorfismo no gene *MDR1*, por mutagénese dirigida (figura 8). Para este estudo, foram utilizadas misturas de reação de PCR para um volume final de 25 μ L, contendo 50 ng de DNA molde (plasmídeo contendo o gene *MDR1* selvagem). Para além do DNA molde, cada mistura continha 0,75 μ L dNTPs (10 mM, Grisp), 5 μ L tampão de enzima 5x (Grisp), 1 μ L *KAPA HiFi HotStart DNA polymerase* (Grisp) e 0,75 μ L de cada *primer* (10 μ M).

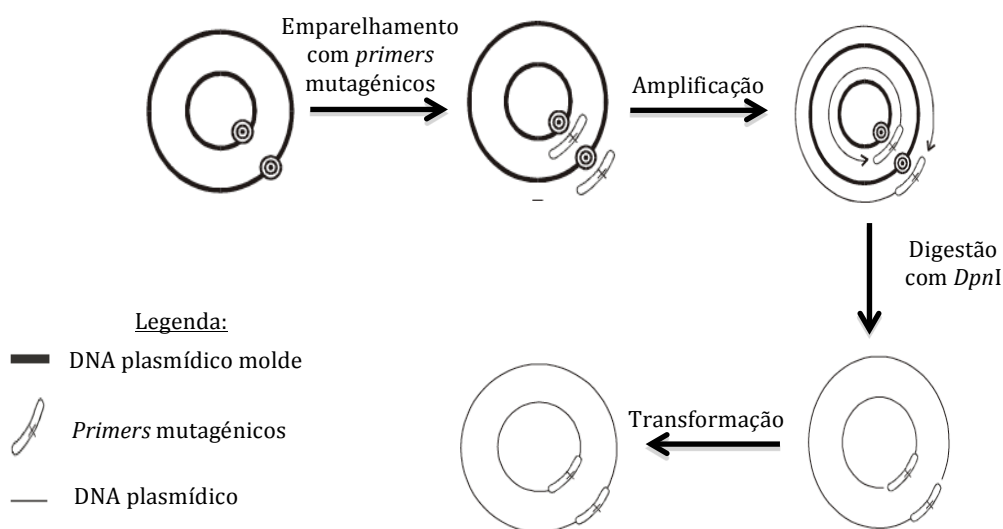


Figura 8: Processo de inserção de uma mutação num fragmento de DNA por mutagénese dirigida. O plasmídeo contendo o gene que se pretende mutar é amplificado com *primers* contendo a mutação pretendida. Após o PCR, digere-se o produto amplificado com a enzima *DpnI*, para que o DNA metilado, correspondente ao DNA molde seja degradado. Após digestão, o produto de PCR é utilizado para transformar células competentes de bactéria. O DNA plasmídico é isolado das células transformadas, de forma a confirmar-se a inserção da mutação adaptado de (Stratagene 2007).

Os *primers* utilizados nesta estratégia laboratorial (tabela 15), foram desenhados no programa Primer X (http://www.bioinformatics.org/primerx/cgi-bin/DNA_1.cgi), de forma a introduzir a substituição de uma timina por uma citosina, na posição 3435 do

gene *MDR1*. Após receção dos *primers*, estes foram reconstituídos em água a uma concentração final de 100 μ M.

Tabela 15: Sequência dos *primers* utilizados para a substituição de uma timina por uma citosina no cDNA correspondente ao gene *MDR1*, inserido no plasmídeo p416-GPD. Abreviaturas: Fwd - *primer forward*; Rev - *primer reverse*; pb - pares de base.

Plasmídeo	Sequência	Tamanho do fragmento (pb)
p416-MDR1	Fwd: 5' GTCACAGGAAGAGATTGTGAGGGCAGCAAAG 3' Rev: 5' CTTTGCTGCCCTCACAATCTCTTCTGTGAC 3'	10545

As reacções ocorreram num termociclador (Bio-Rad C1000TM *Thermal Cycler*), segundo um programa que compreende uma desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, 15 ciclos a 98°C por 20 segundos, 68°C por 15 segundos, 72°C durante 5 minutos e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. De forma a eliminar o DNA que não continha a mutação (DNA metilado, extraído de bactéria), deixou-se arrefecer a mistura a 37°C, adicionaram-se 20U de *DpnI* (Fermentas) (digere DNA metilado) e incubou-se durante 1 hora. O produto amplificado por PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE 1x, e utilizado para transformar células de *E. coli* competentes. Após obtenção dos transformantes, o plasmídeo foi isolado de diferentes clones, segundo o protocolo descrito em 2.3.3. A inserção do polimorfismo foi confirmada por RFLP, tal como descrito na secção 2.1.5.

2.3.11. Transformação da levedura pelo método de acetato de lítio

A transformação da levedura *S. cerevisiae* foi efetuada pelo método de Acetato de Lítio (Gietz and Woods 2002), o qual se encontra descrito de seguida. Inocolou-se uma colónia isolada de *S. cerevisiae* em 5 mL de meio YPD a 30°C, a 120 rpm durante a noite. No dia seguinte, o pré-inóculo foi inoculado em 50 mL de YPD, de forma a possuir uma D.O. inicial próxima de 0,25 (5×10^6 células/mL), deixando-se a cultura a crescer até uma D.O.₆₀₀ cerca de quatro vezes superior (2×10^7 células/mL). De seguida, a suspensão celular foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos e o sedimento foi ressuspenso em 25 mL de água estéril, centrifugando-se novamente. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuspenso em 1mL de água estéril. Foram transferidos volumes de 100 μ L da suspensão para tubos *ependorfs* e foram centrifugados à velocidade máxima durante 30 segundos, descartando-se o sobrenadante. Foi preparada para cada transformação uma mistura de transformação para um volume final de 360 μ L, contendo 240 μ L de PEG (50% p/v), 36 μ L de acetato de lítio 1 M, 50 μ L de SS-DNA (2 mg / μ L), previamente fervido durante 5 min, e

arrefecido em gelo, cerca de 0,2 µg de plasmídeo e água até perfazer o volume de 360 µL. Após a adição da mistura de transformação, o *pellet* foi submetido a uma agitação vigorosa no vórtex até estar completamente homogêneo e, posteriormente, a mistura foi incubada a 42°C durante 40 minutos. Finalmente, a mistura foi centrifugada a 5000 rpm durante 15 segundos, removendo-se o sobrenadante e ressuspensando-se o sedimento em 400 µL de água estéril. Foi plaqueado então 200 µL da suspensão celular em placas de Petri contendo o meio adequado de seleção.

2.3.12. Avaliação da localização celular da glicoproteína-P por microscopia de fluorescência

A localização celular da Pgp, foi avaliada por microscopia de fluorescência. Para tal, as células foram crescidas em meio YNB glicose ou YNB glicose suplementado com glicerol a 10% até uma D.O.₆₀₀ compreendida entre 0,45 e 0,7. Foi recolhido um volume de 1 mL de cada cultura e centrifugou-se a 5000 rpm durante 1 min. O *pellet* obtido foi ressuspensado em 100 µL do sobrenadante, tendo-se rejeitado o restante volume, o que permitiu concentrar as células por um fator de 10. Para a visualização das estirpes *S. cerevisiae* AD1-8-pUG35-MDR1 e *S. cerevisiae* pUG-35, foi utilizado o microscópio de fluorescência Leica DM5000B com uma ampliação 100x, usando o filtro de emissão para a fluorescência GFP (505-545 nm). As imagens foram adquiridas através da câmara digital Leica DFC 350FX R2, usando o *software* LAS AF Versão 1.4.1.

2.3.13. Avaliação do crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* com diferentes genótipos em diferentes meios

A avaliação do crescimento, em meio sólido, das diferentes estirpes da *S. cerevisiae*, foi realizada utilizando uma suspensão de células a uma D.O.₆₀₀ de 0,1. Esta suspensão foi diluída, sucessivamente, nas razões 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴, as quais foram de seguida homogeneizadas por agitação no vórtex. Adicionou-se uma gota com 3 µL de cada diluição às placas contendo doxorrubicina (substrato da Pgp) em diferentes concentrações (5 µM, 10 µM e 20 µM) de modo a avaliar o fenótipo das estirpes a testar.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Genotipagem dos polimorfismos CYP2C19*17, CYP2D6*4 e C3435T da população norte de Portugal

3.1.1. Frequência do polimorfismo CYP2C19*17

Um dos polimorfismos genotipados no presente estudo, foi o polimorfismo CYP2C19*17 (correspondente à troca de uma citosina por uma timina, na posição -806 da região não codificante, do gene CYP2C19). Com este intuito, utilizaram-se amostras de DNA genómico extraído de sangue total de dadores voluntários (discentes do Instituto Superior de Ciências da Saúde-Norte). Este estudo assume particular relevância dado que a frequência deste polimorfismo não foi avaliada na população portuguesa, apesar de existirem estudos na população caucasiana, onde foi observada uma incidência de 18%. Esta isoenzima do CYP450 é responsável pela metabolização de 19% dos fármacos, nomeadamente inibidores de bomba de protões, antidepressivos tricíclicos, inibidores da captação de serotonina e anticoagulantes (Lee and Kim 2011). Trata-se de uma enzima altamente polimórfica, e diversos estudos realizados revelaram que existe uma diferença assinalável entre diferentes populações relativamente à frequência dos polimorfismos nesta enzima. O polimorfismo CYP2C19*17, situado na região 5' a montante do gene, provoca um aumento dos seus níveis de transcrição (Sibbing, Koch et al. 2010). Desta forma, a quantidade de enzima aumenta e, conseqüentemente, a velocidade de metabolização dos xenobióticos também aumenta (Sim, Risinger et al. 2006; Daly and Dixon 2010; Sibbing, Koch et al. 2010). Assim, o polimorfismo CYP2C19*17 está associado a perfis de metabolizadores ultrarrápidos (Anichavezhi 2011).

Para a genotipagem da população em estudo foram inicialmente utilizadas 55 amostras de DNA genómico, as quais foram analisadas pela metodologia de PCR-RFLP. No entanto, foi necessário realizar uma abordagem que permitisse criar um local de restrição enzimático, uma vez que a mutação correspondente ao polimorfismo em estudo não altera nenhum local de restrição. Neste sentido, realizou-se um PCR *nested*, utilizando *primers* específicos para cada uma das amplificações. O primeiro PCR permitiu amplificar um fragmento de 470 pb, contendo o local polimórfico CYP2C19*17 (C-806T). Por sua vez, o segundo PCR originou um fragmento de 143 pb e teve como intuito introduzir um local de restrição para a enzima *NsiI*, uma vez que os *primers* utilizados originavam a sequência reconhecida pela enzima de restrição no caso de ocorrer a conversão de um nucleótido C no alelo selvagem para um nucleótido T no local do polimorfismo, tornando assim possível a análise por RFLP (figura 9) (Anichavezhi 2011).

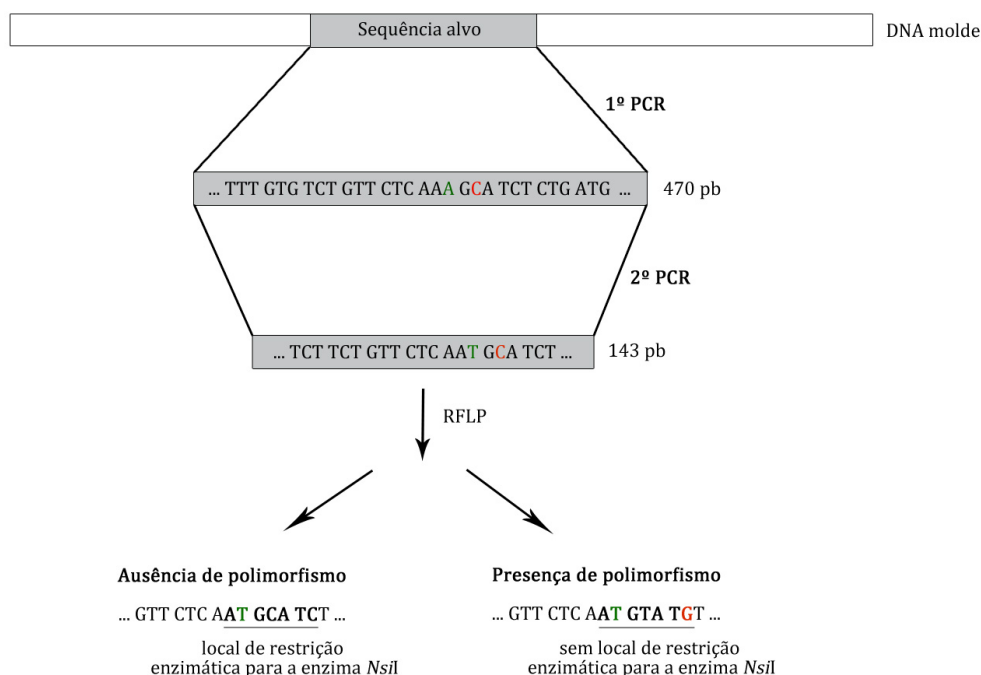


Figura 9: Representação esquemática da genotipagem por PCR-RFLP do polimorfismo CYP2C19*17. Os primers do segundo PCR altera uma adenina por uma timina (representado a verde) de forma a introduzir um local de restrição, na ausência do polimorfismo, para a enzima *NsiI*.

Após a amplificação da sequência polimórfica, procedeu-se a análise por RFLP, com a enzima de restrição *NsiI*, de modo a avaliar a presença do polimorfismo. A presença do polimorfismo não cria um local de restrição, pelo que a digestão com a enzima resulta no aparecimento de uma banda do mesmo tamanho do PCR, ou seja, de 143 pb. Por sua vez, a ausência do polimorfismo, cria o local de restrição para a enzima *NsiI* e resulta, após a digestão, no aparecimento de dois fragmentos, correspondentes a 116 pb e 27 pb (Anichavezhi 2011). No caso de heterozigotia, observam-se três bandas de pesos moleculares 143 pb, 116 pb e 27 pb. Os resultados esperados para a análise do polimorfismo CYP2C19*17 encontram-se esquematizados na figura seguinte (figura 10).

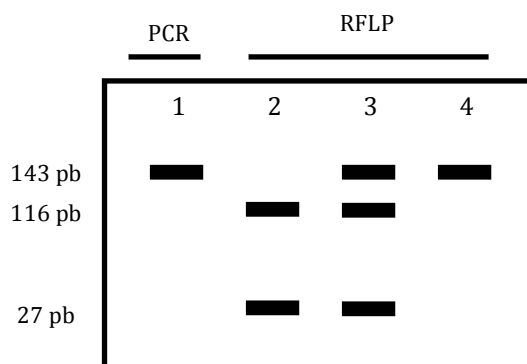


Figura 10: Representação esquemática da análise eletroforética dos produtos de PCR-RFLP com a enzima de restrição *NsiI*, correspondentes aos distintos genótipos para o polimorfismo CYP2C19*17. A posição 1 corresponde ao produto do segundo PCR; nas posições 2, 3 e 4 esquematizam-se os resultados do PCR-RFLP de indivíduos com genótipos *1/*1, *1/*17 e *17/*17, respetivamente.

De forma a ultrapassar, principalmente, o tempo de análise, recorreu-se a uma outra metodologia de genotipagem, consistindo na análise por *High Resolution Melting* (HRM). Esta metodologia possibilita a genotipagem de polimorfismos, baseada na análise do perfil de *melting* de um produto de PCR. Neste contexto, permite obter resultados finais semelhantes aos obtidos por PCR-RFLP, pois ambos os métodos são válidos para estes estudos, no entanto, de forma mais rápida, dado que não é realizado o passo de digestão enzimática (RFLP). Aliás, a análise por HRM, não necessita que o polimorfismo em estudo altere locais de restrição enzimática, ao contrário do que acontece com o PCR-RFLP. Este método é altamente sensível e preciso, permitindo uma análise *high-throughput* do polimorfismo em estudo. A distinção entre cada genótipo torna-se possível, pois cada um leva à formação de uma curva de *melting* diferente. Quer amostras homocigóticas, quer heterocigóticas, previamente identificadas por PCR-RFLP, foram incluídos em cada ensaio de forma a aumentar a confiança da análise. Os resultados obtidos por uma análise exemplo por HRM deste polimorfismo encontram-se na figura 11.

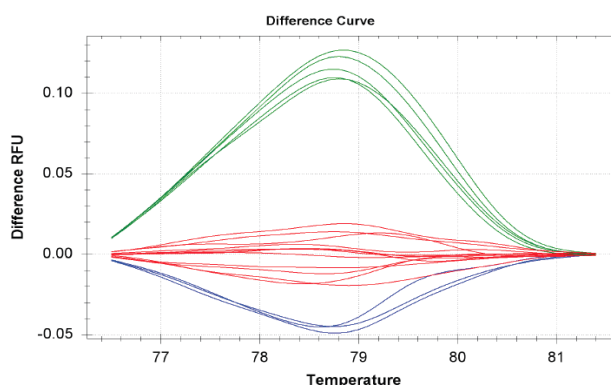


Figura 11: Resultados da análise da curva de *melting* do DNA genómico, para a amplificação de uma região de 100 pb, contendo o polimorfismo CYP2C19*17. A verde encontram-se os resultados para os homocigotas normais, a vermelho os heterocigotas e a azul os homocigotas mutantes (genótipos atribuídos com um grau de confiança compreendido entre 95,0 e 100,0).

As curvas de *melting* são construídas com base nos sinais de fluorescência emitidos, que são possíveis através da incorporação de um fluorocromo que se incorpora na cadeia dupla de DNA. Neste tipo de análise, as amostras são expostas à temperatura de 95°C, de modo a provocar a desnaturação do DNA. Quando se inicia a desnaturação essa fluorescência começa a decrescer e permite que se consiga registar as diferenças entre as amostras. Por fim, efetua-se a análise num *software* adequado (*Precision Melt Analysis™ Software*) que agrupa automaticamente curvas semelhantes em grupos, em que estes representam os diferentes genótipos. O alelo selvagem contém um nucleótido C na posição -806, o que resulta num produto amplificado com maior temperatura de *melting* (79,40°C, representado a verde), uma vez que os nucleótidos C-G estão ligados por três pontes de hidrogénio, enquanto os nucleótidos A-T estão ligados por duas. O alelo mutado contém

um nucleótido T, o que diminui a temperatura de *melting* (79,20°C, representado a azul). Já os heterozigotas contêm ambos os alelos, formando heteroduplexes e, portanto, uma diferente curva (representado a vermelho).

Algumas das amostras genotipadas por RFLP, foram também genotipadas por HRM e os resultados comparados. De um total das 55 amostras analisadas pelos dois métodos, 17 amostras apresentaram diferentes genótipos, consoante o método em questão. Estas eram maioritariamente amostras que apresentavam fenótipo heterozigota pelo método PCR-RFLP, mas normal por HRM. Tal poderá ser justificado por uma digestão parcial do produto de PCR no método PCR-RFLP, levando a resultados de carácter duvidoso. Uma vez que na análise por HRM não se procede à digestão enzimática, esse problema pode ser obviado, originando menor incerteza e resultados mais fidedignos. Assim, a totalidade das amostras em estudo foi posteriormente genotipada por HRM.

De um total de 163 amostras, 161 foram genotipadas por HRM para o gene CYP2C19. Nas duas restantes, verificou-se que o DNA isolado (através do método fenol/clorofórmio) não se encontrava nas melhores condições de pureza (determinada pela razão A_{260}/A_{280}). A frequência do genótipo CYP2C19*17/*17 verificou-se ser de 7,4%, o que apesar de ligeiramente superior, aproxima-se aos valores obtidos no estudo realizado por Santos e colaboradores em 2011, tendo como amostra 615 indivíduos da população caucasiana (Santos, Soares et al. 2011). No entanto, a coerência dos resultados obtidos com os previamente descritos para a população caucasiana nesse estudo, não se verificou para os genótipos CYP2C19*1/*1 (normal) e CYP2C19*1/17 (heterozigota). De acordo com os resultados, verificou-se uma frequência de 39,2% e 53,4%, para os genótipos CYP2C19*1/*1 e CYP2C19*1/17 respetivamente, enquanto que no estudo da população caucasiana foram obtidas frequências de 69,1% e 25,7% para os mesmos genótipos (Santos, Soares et al. 2011). Contudo, tal como descrito na população caucasiana, o alelo CYP2C19*1 foi o alelo mais frequente na população portuguesa deste estudo (de Leon, Susce et al. 2009). Os resultados obtidos para a genotipagem do polimorfismo CYP2C19*17, estão apresentados na tabela 16.

Tabela 16: Frequências alélicas e genótípicas detetadas na população em estudo, e frequências descritas na população caucasiana.

	CYP2C19	Número de alelos / genótipo	Frequência obtida (%)	Frequência na população caucasiana (%)
Alelo	*1	212	65,8	86 (de Leon, Susce et al. 2009)
	*17	110	34,2	20 (Drogemoller, Wright et al. 2010)
Genótipo	*1/*1	63	39,2	69,1 (Santos, Soares et al. 2011)
	*1/*17	86	53,4	25,7 (Santos, Soares et al. 2011)
	*17/*17	12	7,4	5,2 (Santos, Soares et al. 2011)

Quanto às frequências genótípicas, estas não estão totalmente de acordo com a literatura, referente à genotipagem da população caucasiana. A população portuguesa inclui-se na população caucasiana sendo, por isso, comparada com esta população. Segundo a literatura, na população caucasiana, o genótipo homocigota normal apresenta uma frequência, de cerca de 69%, enquanto a frequência do genótipo homocigota mutante é de 5,2%. Quanto à frequência genotípica de heterocigotia, esta apresenta uma frequência de 26% (Santos, Soares et al. 2011). Uma das principais causas, que poderá justificar as diferenças observadas, está relacionada com o grande fluxo migratório cada vez maior ao longo dos anos, levando a cruzamentos entre indivíduos de populações diferentes.

3.1.2. Frequência do polimorfismo CYP2D6*4

Um outro polimorfismo do sistema CYP450 analisado foi o polimorfismo CYP2D6*4. Tal como anteriormente referido (secção de introdução 1.2.1.1), estima-se que mais de 25% dos fármacos sejam metabolizados pela enzima CYP2D6, incluindo antidepressivos tricíclicos, neuropléticos, fármacos antitumorais e inibidores seletivos da recaptção da serotonina (Leppert 2011). Torna-se, por isso, importante estudar o polimorfismo do alelo não funcional CYP2D6*4, uma vez que este origina um defeito no *splicing* e uma inativação da enzima e, conseqüentemente, uma metabolização deficiente dos fármacos (Silva and Andrade 2008). O polimorfismo é resultado de uma substituição de um nucleótido G por um nucleótido A, na posição 1846. Esta substituição nucleotídica leva à eliminação de um local de restrição para a enzima *BstNI*, tornando possível a análise direta do produto de PCR por RFLP.

Recorrendo à metodologia de PCR-RFLP foram genotipadas 138 amostras de DNA genómico. Amplificou-se por PCR um fragmento de 334 pb, que continha a zona do polimorfismo, submetendo-se, de seguida, o produto obtido à restrição enzimática com a

enzima *Bst*NI. Após a digestão, os fragmentos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de acrilamida 8%. A presença de polimorfismo leva à abolição do local de restrição da enzima *Bst*NI, pelo que a enzima não digere o fragmento amplificado por PCR e o fragmento obtido após RFLP será igual ao produto de PCR, apresentando 334 pb. Por outro lado, para um indivíduo homocigota normal, após a digestão com a enzima, devido à presença do local de restrição, obtêm-se duas bandas, resultantes do corte do produto amplificado por PCR, uma banda correspondente a 230 pb e outra correspondente a 104 pb (Lemos, Carrilho et al. 2007). Os resultados esperados encontram-se esquematizados na figura 12.

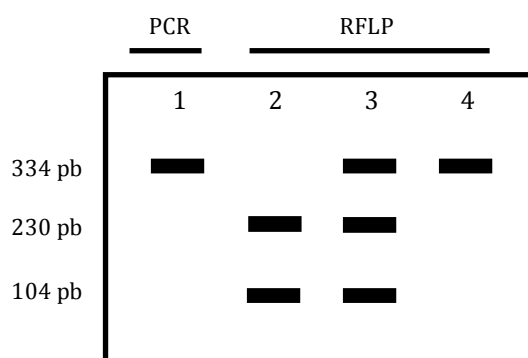


Figura 12: Representação esquemática da análise eletroforética dos produtos de PCR-RFLP com a enzima de restrição *Bst*NI, correspondentes aos distintos genótipos para o polimorfismo CYP2D6*4. A posição 1 corresponde ao produto do PCR; nas posições 2, 3 e 4 esquematizam-se os resultados do PCR-RFLP de indivíduos com genótipos *1/*1, *1/*4 e *4/*4, respetivamente.

Tal como para o polimorfismo CYP2C19*17, o polimorfismo CYP2D6*4 foi igualmente analisado pela metodologia de HRM. Desta forma, foram determinados os genótipos de 159 amostras, encontrando-se a curva de cada genótipo obtido na figura 13, que corresponde a um exemplo de uma das análises efetuadas. As curvas de *melting* das amostras amplificadas foram comparadas com os genótipos previamente identificados por PCR-RFLP.

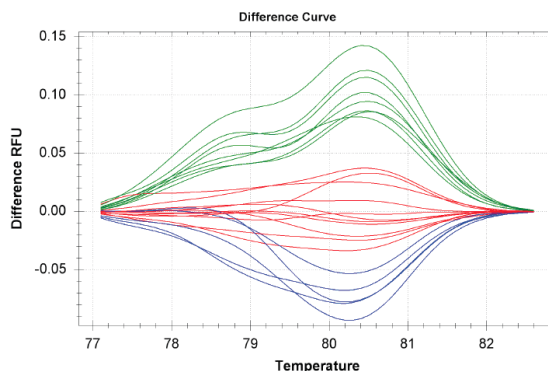


Figura 13: Resultados da análise da curva de *melting* do DNA genómico, para a amplificação de uma região de 74 pb, contendo o polimorfismo CYP2D6*4. A verde encontram-se os resultados para os homocigotas normais, a vermelho os heterocigotas e a azul os homocigotas mutantes (genótipos atribuídos com um grau de confiança compreendido entre 86,7 e 100,0).

O alelo *4 produz uma curva de *melting* diferente devido à substituição nucleotídica. O polimorfismo responsável pelo alelo *4, em que há substituição de G por A, levou a uma diminuição da temperatura nos perfis homozigóticos mutantes quando comparados com os outros genótipos. Neste sentido, o produto amplificado de um genótipo *4/*4 apresenta uma temperatura de *melting* de 78,40°C (representado, na figura 11, a azul). O alelo selvagem *1 contém um nucleótido G, apresentando uma temperatura de *melting* superior 78,60°C (representado, na figura 11, a verde).

As frequências obtidas nos genótipos CYP2D6*4/*4 e CYP2D6*1/*1 apresentaram um valor superior às obtidas em outros estudos realizados na população portuguesa, ao contrário da frequência obtida do genótipo CYP2D6*1/*4, que apresentou um valor inferior (tabela 2) (Lemos, Carrilho et al. 2007). É de referir que esses estudos utilizaram população portuguesa do centro do país, ao passo que, no presente estudo, a população do norte é a predominante, o que poderá justificar esta diferença. Neste contexto, é importante considerar a constituição da amostra, uma vez que vários estudos mostram que as frequências genotípicas deste polimorfismo variam com a etnia, tendo o genótipo CYP2D6*4/*4 pouca incidência em indivíduos afro-americanos (7-9%) e ainda menos em indivíduos do subcontinente indiano (5%). Por sua vez em latino-americanos, a frequência ronda os 19% (Neafsey, Ginsberg et al. 2009). No que diz respeito às frequências alélicas do CYP2D6*4 na população portuguesa e em caucasianos, estas variam entre 12-21% (Correia, Santos et al. 2009). Nesta perspetiva, as frequências alélicas obtidas neste trabalho (17%), encontram-se na gama de valores esperados para a população caucasiana. Os resultados obtidos para a genotipagem do polimorfismo CYP2D6*4, estão apresentados na tabela 17.

Tabela 17: Frequências alélicas e genotípicas detetadas na população em estudo e frequências descritas na população portuguesa.

	CYP2D6	Número de alelos / genótipo	Frequência obtida (%)	Frequência descrita na população portuguesa (%) (Lemos, Carrilho et al. 2007; Correia, Santos et al. 2009)
Alelo	*1	264	83,0	78,3
	*4	54	17,0	21,7
Genótipo	*1/*1	117	73,5	62,1
	*1/*4	30	18,8	32,4
	*4/*4	12	7,7	5,5

3.1.3. Frequência do polimorfismo C3435T

Por fim, a genotipagem de polimorfismos na população em estudo, compreendeu a análise do polimorfismo C3435T do gene *MDR1* nas amostras de DNA genómico extraídas. Este polimorfismo resulta da substituição de um nucleótido de citosina por um nucleótido de timina na posição 3435, eliminando um local de restrição para a enzima *MboI*, tornando possível a análise direta por PCR-RFLP. Para esta análise, procedeu-se à amplificação de um fragmento de 248 pb, contendo o local polimórfico. Após a obtenção do fragmento de interesse, procedeu-se à digestão do mesmo, com a enzima de restrição *MboI* procedendo-se, de seguida, à análise dos fragmentos obtidos através de um gel de acrilamida a 8%. Um total de 76 amostras foram genotipadas recorrendo a esta metodologia. Na ausência do polimorfismo, ou seja, num indivíduo homocigota normal, a digestão do produto de PCR resulta em três bandas: 172 pb; 60 pb e 16 pb. Em contrapartida, na presença do polimorfismo, a mutação decorrente, elimina um local de restrição para a enzima. Deste modo, a digestão resume-se apenas a dois fragmentos: uma banda correspondente a 232 pb e a outra a 16 pb (Ameyaw, Regateiro et al. 2001). A figura 14, demonstra um esquema representativo dos fragmentos, e respetivos pesos moleculares, após digestão, para cada genótipo.

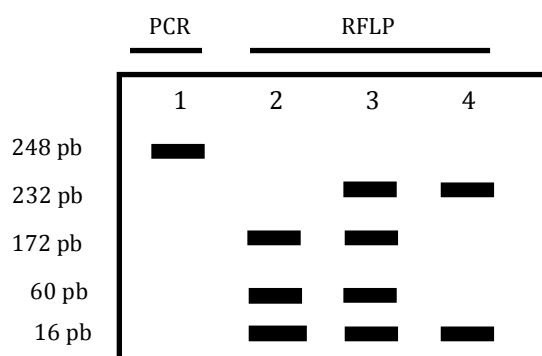


Figura 14: Representação esquemática da análise eletroforética dos produtos de PCR-RFLP com a enzima de restrição *MboI*, correspondentes aos distintos genótipos para o polimorfismo C3435T. A posição 1 corresponde ao produto do PCR; nas posições 2, 3 e 4 esquematizam-se os resultados do PCR-RFLP de indivíduos com genótipos CC, CT e TT, respetivamente.

A frequência do polimorfismo na população em estudo, a genotipagem foi efetuada por HRM. Por esta técnica os 76 casos analisados por RFLP foram também analisados, para comparação dos resultados de ambos os métodos. Os resultados obtidos para uma análise exemplo de genotipagem do polimorfismo C3435T por HRM, são apresentados na figura 15.

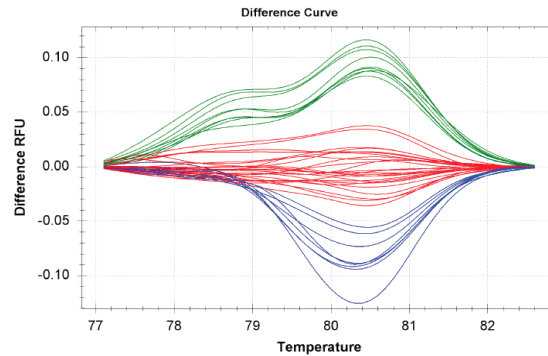


Figura 15: Resultados da análise da curva de *melting* do DNA genômico, para a amplificação de uma região de 74 bp, contendo o polimorfismo C3435T. A verde encontram-se os resultados para os homocigotas normais, a vermelho os heterocigotas e a azul os homocigotas mutantes (genótipos atribuídos com um grau de confiança compreendido entre 86,6 e 99,8).

Neste trabalho, foi possível determinar os genótipos para o polimorfismo C3435T de 162 amostras de DNA extraídas da população em estudo, por HRM. A presença do alelo T levou a uma diminuição da temperatura nos perfis homocigóticos mutantes quando comparados com os outros genótipos. Assim, o produto amplificado de um genótipo TT apresenta uma temperatura de *melting* de 80,20°C (representado a azul). O alelo C apresenta uma temperatura de *melting* superior 78,40°C (representado a verde).

Os resultados apresentam algumas diferenças relativamente a outros estudos efetuados na população caucasiana e portuguesa. De acordo com os resultados apresentados por Correia e colaboradores, em 2009, da análise de uma amostra de 100 indivíduos da população portuguesa, a frequência do genótipo heterocigota é mais frequente (57,9%) do que a frequência do homocigota mutante (19,3%). Já a frequência de homocigotas normais, segundo este estudo, corresponde a apenas 22,8% (Correia, Santos et al. 2009). No presente estudo os indivíduos heterocigotas estão, tal como nos estudos anteriores, em maioria, correspondendo a 47,7% dos indivíduos analisados. Relativamente aos homocigotas normais, estes apresentam uma frequência de 39,5%, valor consideravelmente superior ao encontrado nos estudos anteriores, ao contrário do que acontece com o genótipo de homocigotia, correspondendo a 13% da população em estudo e de valor inferior aos estudos realizados anteriormente. Quanto às frequências alélicas, encontra-se descrito por Jeannesson e colaboradores que a frequência alélica mutante é de 54%, no entanto, neste estudo verificou-se uma frequência inferior (32,7%). Os resultados obtidos para a genotipagem do polimorfismo C3435T, estão apresentados na tabela 18.

Tabela 18: Frequências alélicas e genótípicas detetadas na população em estudo e frequências descritas na população caucasiana.

	C3435T	Número de alelos / genótipo	Frequência obtida (%)	Frequência na população portuguesa (%)
Alelo	C	205	63,3	46 (Jeannesson, Albertini et al. 2007)
	T	119	32,7	54 (Jeannesson, Albertini et al. 2007)
Genótipo	CC	64	39,5	22,8 (Correia, Santos et al. 2009)
	CT	77	47,7	57,9 (Correia, Santos et al. 2009)
	TT	21	13,0	19,3 (Bernal, Sinues et al. 2003; Correia, Santos et al. 2009)

Em conclusão, os genótipos para os três polimorfismos foram determinados com sucesso. No entanto, os resultados obtidos pelas duas metodologias (HRM e PCR-RFLP) não foram totalmente concordantes, dado que cerca de 10,5% dos genótipos atribuídos por PCR-RFLP não corresponderam à análise por HRM. Embora a técnica de PCR-RFLP também seja válida, esta técnica é mais morosa, e pode trazer resultados de incerteza provocados por uma possível digestão enzimática não completa, originando falsos heterozigotas. Comparando os custos, grau de confiança, tempo de execução e simplicidade do método, a análise por HRM torna-se vantajosa.

3.2. Análise funcional do polimorfismo C3435T do gene *MDR1* em linhas celulares de cancro coloretal

A presença de variações genótípicas de proteínas envolvidas no metabolismo e no transporte de xenobióticos condiciona a resposta a tratamentos farmacológicos. Entre estes, inclui-se a quimioterapia utilizada no tratamento do cancro, cuja eficácia é frequentemente condicionada pela resistência que as células tumorais desenvolvem aos fármacos antitumorais. A presença de polimorfismos em genes codificantes de proteínas do sistema CYP450 ou da Pgp, condicionam frequentemente os seus níveis de expressão e/ou atividade e, conseqüentemente, a eficácia de fármacos. O estudo populacional desses polimorfismos é importante para prever a eficácia, assim como as possíveis reações adversas, que podem resultar do tratamento farmacológico. No entanto, nem sempre esses estudos são conclusivos e estudos meramente genotípicos não permitem avaliar a influência dos polimorfismos na atividade das proteínas em estudo. A utilização de sistemas *in vitro* poderá complementar os estudos populacionais, permitindo determinar

de melhor forma a relação de um polimorfismo específico com a expressão e atividade proteica. Dessa forma, no presente trabalho, utilizaram-se diferentes linhas celulares de cancro coloretal, de forma a proceder à sua genotipagem, e avaliar a influência do genótipo dessas linhas na resistência à doxorrubicina, um fármaco antitumoral frequentemente utilizado em tratamentos de quimioterapia, assim como nos níveis de expressão do gene em questão. O polimorfismo escolhido para esse estudo foi o C3435T do gene *MDR1*, codificante da Pgp, uma bomba de efluxo que possui como substratos diversos fármacos antitumorais, incluindo a doxorrubicina. Foi escolhido como modelo de estudo linhas de cancro coloretal, uma vez que as células intestinais funcionam como uma barreira, de forma a evitar o aumento plasmático de fármacos que poderiam ser tóxicos para o organismo e assim apresentam normalmente expressão basal de Pgp. Desta forma, células tumorais deste tipo de tecido também deverão apresentar presumivelmente, expressão desta proteína.

3.2.1. Genotipagem do polimorfismo C3435T em diferentes linhas celulares de cancro coloretal

Para a genotipagem do polimorfismo C3435T do gene *MDR1*, foram utilizadas as linhas celulares de cancro coloretal HCT-15, Caco-2 e HT29-MTX. Foi isolado DNA genómico destas linhas celulares e, após análise qualitativa e quantitativa do DNA isolado, procedeu-se à análise do polimorfismo por PCR-RFLP, segundo o método descrito anteriormente. A figura 16 representa os resultados obtidos, após digestão enzimática do produto de PCR com a enzima *MboI*.

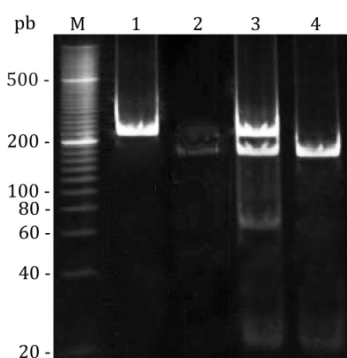


Figura 16: Análise eletroforética em gel de acrilamida 8% referente à análise do genótipo das diferentes linhas celulares. No poço M encontra-se o marcador de peso molecular (Nzytech ladder IV), no poço 1 o produto de PCR da região contendo o local onde ocorre o polimorfismo C3435T (idêntico para os três tipos de polimorfismo), no poço 2 o produto do RFLP referente à linha celular Caco-2, no poço 3 o produto de RFLP da linha celular HT29-MTX, correspondentes ambos ao genótipo CT e no poço 4 o produto do RFLP referente à linha celular HCT-15, correspondente ao genótipo TT.

Como se pode observar pela figura, a linha celular HCT-15 apresentou um genótipo de homozigotia mutante (genótipo TT), ao passo que as linhas celulares Caco-2 e HT29-MTX apresentaram heterozigotia para o polimorfismo em questão (genótipo CT). Não foi encontrado nenhum genótipo de homozigotia normal nas linhas em estudo. Assim, e uma vez que estas eram as únicas linhas de cancro colorectal disponíveis, analisou-se igualmente a presença deste polimorfismo em linhas celulares de cancro de mama, disponíveis no laboratório. No entanto, também neste caso, não foi encontrado nenhum genótipo de homozigotia normal, além de que nenhuma das linhas celulares apresentou expressão do gene *MDR1* (resultados não apresentados), pelo que os estudos prosseguiram apenas com as linhas celulares de cancro colorectal.

Uma vez que se verificou, nos resultados da genotipagem populacional que, por vezes o genótipo encontrado por RFLP não correspondia ao genótipo determinado por HRM, provavelmente devido a uma digestão incompleta da amostra, também neste caso se efetuou o estudo da genotipagem do polimorfismo C3435T por HRM (figura 17). Como se pode verificar, neste caso, os genótipos encontrados pelos dois métodos eram coincidentes, confirmando assim o genótipo em questão para todas as linhas celulares.

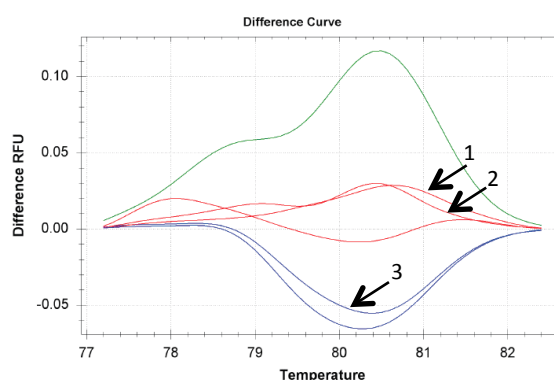


Figura 17: Resultados da análise da curva de *melting* do DNA genómico das linhas celulares, para uma amplificação de uma região de 74 pb, que contém o polimorfismo C3435T. Foi incluído na análise uma amostra de cada genótipo de forma a associá-los a cada uma das linhas celulares. A verde encontram-se os resultados para os homozigotas normais, a vermelho os heterozigotas e a azul os homozigotas mutantes. As setas 1 e 2 referem-se à curva de *melting* referente à linha celular HT29-MTX e Caco-2, respetivamente, à qual foi atribuído o genótipo de heterozigotia (CT). A seta 3 refere-se à curva de *melting* referente à linha celular HCT-15 à qual foi atribuído o genótipo de homozigotia mutante (TT) genótipos atribuídos com um grau de confiança compreendido entre 97,6 e 99,8).

3.2.2. Associação entre o polimorfismo C3435T do gene *MDR1* e a resistência ao fármaco antitumoral doxorrubicina

Após genotipagem das linhas celulares, foram efetuados ensaios de citotoxicidade com a doxorrubicina, um composto com atividade antitumoral, substrato da Pgp. Com este intuito, as células das diferentes linhas foram incubadas com diferentes concentrações de

doxorrubicina e a viabilidade celular e o respectivo valor de IC₅₀ para cada linha celular foram determinados pelo ensaio de SRB (tabela 19).

Tabela 19: Valores de IC₅₀ para a doxorrubicina, obtidos pelo ensaio de SRB, nas linhas celulares HCT-15, Caco-2 e HT29-MTX e genótipos obtidos por PCR-RFLP e HRM das três linhas celulares.

Linha celular	HCT-15	HT29-MTX	Caco-2
Genótipo	TT	CT	CT
IC ₅₀ (μM)	4,8	2,29	2,83

Os resultados obtidos mostraram que as linhas celulares Caco-2 e HT29-MTX, ambas com genótipo CT para o polimorfismo C3435T, apresentam valores de IC₅₀ semelhantes e inferiores ao encontrado para a linha celular HCT-15, homocigótica mutante para o polimorfismo em questão. Encontra-se descrito que o alelo T está relacionado com uma maior expressão da Pgp, o que está de acordo com os resultados de citotoxicidade obtidos neste trabalho, em que foi encontrado maior resistência ao fármaco (provavelmente devido a uma maior expressão da Pgp) na linha de genótipo TT.

3.2.3. Influência do polimorfismo C3435T na expressão do gene *MDR1*

Uma vez que os resultados obtidos sugerem a existência de uma correlação entre o genótipo do polimorfismo C3435T e a citotoxicidade da doxorrubicina nas linhas celulares em estudo, foi-se verificar se essa correlação se encontrava associada a uma diferente expressão da Pgp, ou se poderia ser devido a outros fatores, dado tratarem-se de diferentes linhas celulares, com diferentes patrimónios genéticos e diferentes perfis metabólicos. Assim, procedeu-se à extração de proteínas das diferentes linhas e avaliou-se a expressão da Pgp por *western-blot*. Uma vez que a exposição celular a fármacos induz frequentemente a expressão da Pgp, foi-se também analisar a variação da expressão desta proteína após 48 horas de exposição à doxorrubicina nas linhas celulares em estudo, tempo que se observou em ensaios prévios como sendo ótimo para atuação do fármaco. A figura 18 apresenta os resultados de expressão da Pgp em células das linhas HCT-15, Caco-2 e HT29-MTX, tratadas e não tratadas com doxorrubicina.

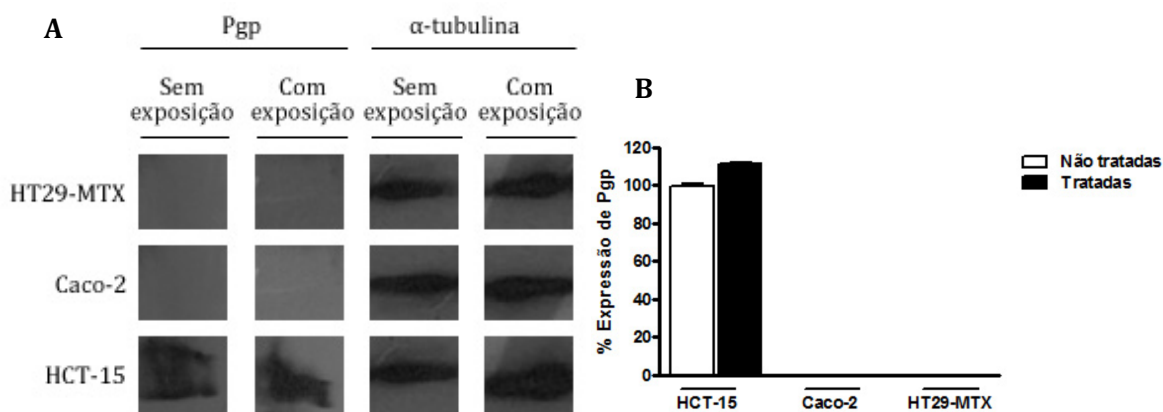


Figura 18: Perfil de expressão da Pgp em três linhas celulares (HCT-15, Caco-2, HT29-MTX) expostas e não expostas à doxorrubicina, avaliada por *Western-blot*. (A) Resultados representativos dos níveis de expressão. (B) Níveis de expressão da Pgp normalizados para α -tubulina.

Foi possível observar que, de acordo com os resultados de citotoxicidade, a linha celular HCT-15 é também a que apresenta maiores níveis de expressão da Pgp, sendo aliás a única em que foi observada essa expressão. Uma vez que as outras duas linhas, Caco-2 e HT29-MTX são de cancro coloretal, seria esperado que apresentassem igualmente expressão da Pgp. Pode no entanto acontecer que a Pgp seja de facto expressa, mas em níveis demasiado baixos para poderem ser detetados por este método. A otimização do ensaio de *western-blot*, utilizando por exemplo, uma menor diluição do anticorpo ou a utilização de métodos mais sensíveis como o PCR em tempo real, poderá ajudar a elucidar esta questão. É de referir que está descrito para células tumorais, que os níveis de expressão da Pgp estão de facto associadas ao genótipo para o polimorfismo C3435T. Assim, células com genótipo CC, CT ou TT apresentam respetivamente, elevada, média ou baixa expressão da Pgp, reforçando os resultados obtidos no presente trabalho (Nagler, Bar et al. 2007).

Foi também verificado que a exposição das células ao fármaco induziu a expressão da Pgp na linha HCT-15. No entanto, nas restantes linhas, mesmo após essa exposição, não se observou qualquer expressão da Pgp, pelo que não foi possível analisar a influência do polimorfismo C3435T na variação da expressão do gene *MDR1*. A utilização de ensaios mais sensíveis como o PCR em tempo real poderá igualmente ajudar a esclarecer se, de facto, a presença do polimorfismo conduz não só a alterações na expressão basal, mas também na variação da expressão génica por exposição a fármacos substratos da Pgp.

3.3. Análise funcional do gene *MDR1* e do seu polimorfismo C3435T por expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae*

Como referido, encontra-se descrito na literatura que existe uma correlação entre a presença do polimorfismo C3435T e a expressão/atividade do gene *MDR1* em diferentes tecidos tumorais (Baldissera, de Mattos et al. 2012; Sterjev, Trencavska et al. 2012), a qual foi também observada neste trabalho nas linhas celulares tumorais em estudo, apesar do baixo número de amostras utilizadas. No entanto, os diferentes tecidos/linhas celulares tumorais analisados apresentam diferente património genético, podendo nomeadamente apresentar variações noutros polimorfismos do gene *MDR1*. Tal facto inviabiliza a possibilidade de determinar o papel específico do polimorfismo C3435T na funcionalidade do gene *MDR1* por esta abordagem. A análise funcional específica pode ser conseguida através da expressão heteróloga do gene *MDR1* em *Saccharomyces cerevisiae*, com e sem o polimorfismo em estudo, uma vez que neste caso a célula hospedeira é a mesma, possuindo sempre o mesmo património genético, evitando dessa forma a influência de fatores externos à presença ou ausência do polimorfismo. Assim, no presente trabalho, procedeu-se à clonagem do gene *MDR1* no vetor de expressão de *S. cerevisiae* p416-GPD e criou-se o polimorfismo em estudo por mutagénese dirigida. Os vetores de expressão recombinantes foram utilizados para transformar a estirpe de *S. cerevisiae* AD1-8, deficiente nos principais transportadores ABC (*pleiotropic drug resistance*, PDR) (figura 19), de forma a evitar a interferência destas proteínas nos fenótipos a testar. As estirpes transformadas com as duas variantes do gene *MDR1* (*MDR1* e *MDR1C3435T*), foram então caracterizadas fenotipicamente.

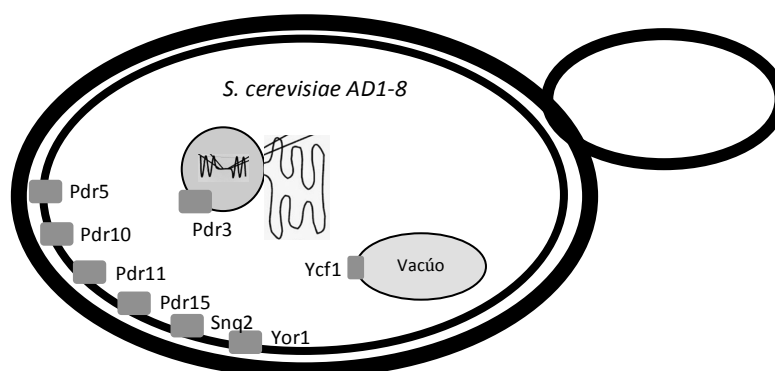


Figura 19: Representação esquemática da estirpe AD1-8 da *S. cerevisiae*, mutada nos transportadores de membrana Pdr5, Pdr10, Pdr11, Pdr15, Snq2 e Yor1, que medeiam o efluxo de diversos xenobióticos, assim como no fator de resistência ao metal Ycf1, expresso na membrana vacuolar, e no fator de transcrição Pdr3 que regula a expressão de transportadores ABC através da ligação aos elementos cis PDRE destes genes adaptado de (Lamping, Monk et al. 2007).

3.3.1. Expressão do gene *MDR1* em *Saccharomyces cerevisiae*

O cDNA do gene *MDR1* humano foi isolado a partir do vetor comercial pCR-XL-TOPO_MDR1 (Invitrogen Life Technologies) (figura 20), e posteriormente clonado no vetor p416-GPD, um vetor centromérico de expressão em *S. cerevisiae* (Mumberg, Muller et al. 1995).

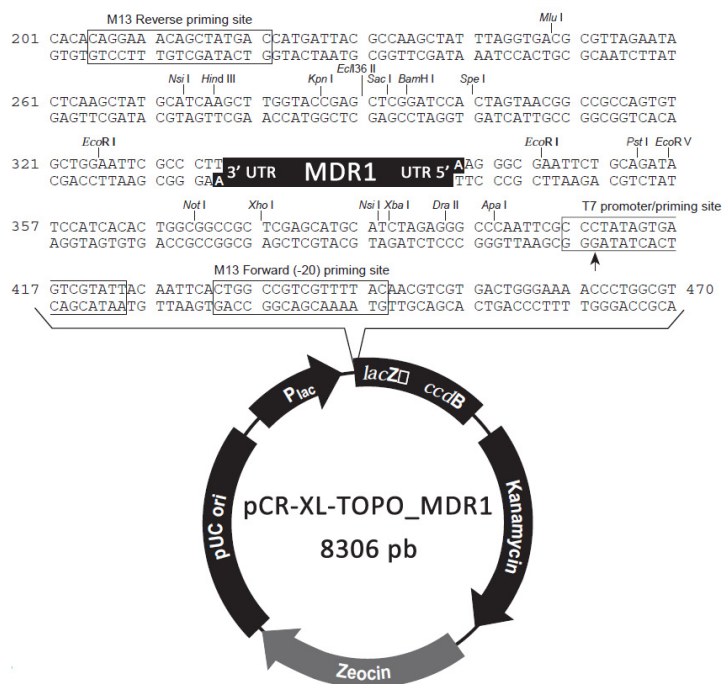


Figura 20: Representação do vetor comercial pCR-XL-TOPO_MDR1 contendo o cDNA do gene *MDR1*. O cDNA, contendo a região codificante do gene *MDR1* e as regiões 5' e 3' UTR, foi inserido no *multiple cloning site* do vetor na orientação 3' - 5'.

Como se pode verificar na figura 20, o cDNA do gene *MDR1*, encontra-se inserido no *multiple cloning site* (MCS) do vetor pCR-XL-TOPO, podendo deste modo, ser removido por digestão enzimática. A escolha das enzimas de restrição para essa digestão obedeceu a vários critérios: (i) permitirem a excisão do cDNA do gene *MDR1* a partir do vetor pCR-XL-TOPO_MDR1; (ii) não cortarem no fragmento a clonar e (iii) encontrarem-se presentes no MCS do p416-GPD entre o promotor e terminador do vetor, de forma a permitir a inserção do fragmento na orientação correta. As únicas enzimas de restrição que obedeciam a todos estes critérios foram as enzimas *BamHI* e *XbaI*, as quais foram então utilizadas para isolar o cDNA pretendido e também para digerir o vetor de expressão p416-GPD, de forma a clonar o cDNA do gene *MDR1* neste vetor.

Os vetores p416-GPD e pCR-XL-TOPO_MDR1 foram então digeridos com estas enzimas, originando, no caso do vetor pCR-XL-TOPO_MDR1 dois fragmentos, um de 3519 pb (correspondente ao pCR-XL-TOPO) e outro de 4787 pb (correspondente ao cDNA do gene *MDR1*) (figura 21), e no caso do vetor p416-GPD um fragmento de 5791 pb

(correspondente ao vetor linearizado) e um fragmento de 13 pb não visualizável em gel de agarose (resultados não apresentados).

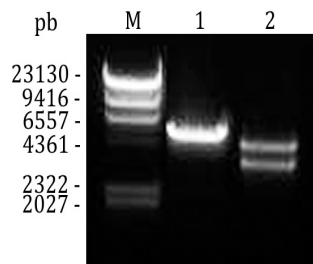


Figura 21: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de digestão, com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xba*I, do plasmídeo p416-GPD (poço 1) e pCR-XL-TOPO_MDR1 (poço 2), para posterior clonagem do gene *MDR1* no vetor p416-GPD. O marcador de peso molecular utilizado (M) foi o λ /*Hind*III (fermentas).

O fragmento de 4787 pb obtido após a digestão do vetor pCR-XL-TOPO_MDR1 compreende a *Open Reading Frame* (ORF) do gene *MDR1* flanqueada pelas regiões 3' e 5' não traduzidas (3' e 5'-UTRs). Este fragmento foi purificado e ligado ao vetor p416-GPD digerido com as mesmas enzimas. A figura 22 esquematiza a construção do vetor de expressão recombinante.

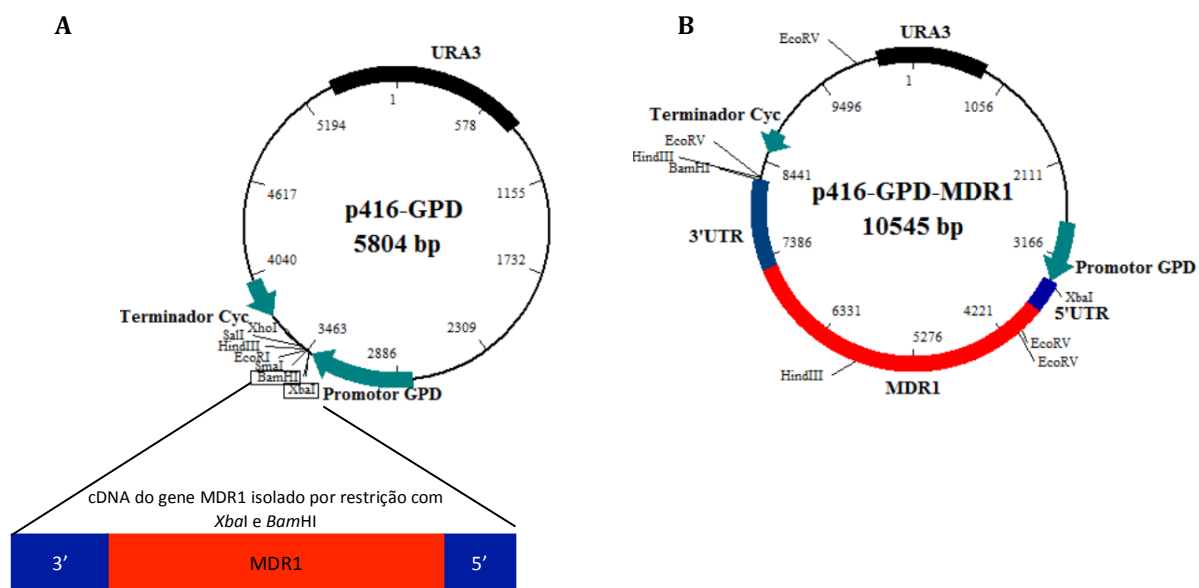
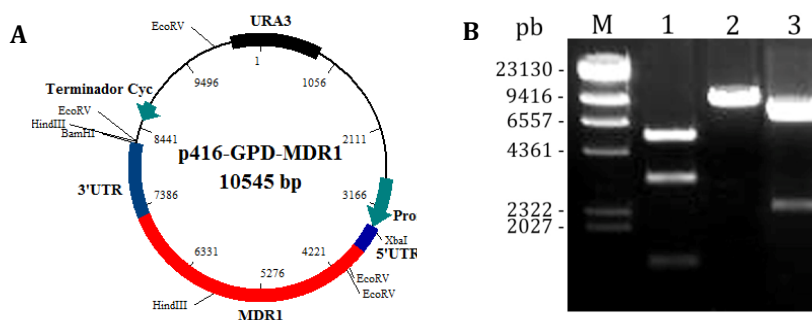


Figura 22: (A) Construção do plasmídeo p416-GPD-MDR1 por inserção do fragmento de cDNA correspondente ao gene humano *MDR1* nos locais de restrição *Bam*HI e *Xba*I do plasmídeo p416-GPD. (B) Mapa do plasmídeo recombinante p416-GPD-MDR1.

Após ligação do cDNA do gene *MDR1* ao vetor p416-GPD, procedeu-se à transformação de células de *Escherichia coli* recombinantes com o produto de ligação, sendo as colónias transformantes selecionadas em meio LB com ampicilina. O vetor recombinante foi isolado das células transformantes e a correta clonagem do fragmento

foi confirmada por restrição enzimática com diferentes enzimas de restrição (*EcoRV*, *Bam*HI e *Hind*III) (figura 23).



Tamanhos previstos:

Digestão com *EcoRV*: 4,1; 4,8; 1,4 e 0,06 kb

Digestão com *Bam*HI: 10,5 kb

Digestão com *Hind*III: 7,2 e 3,3 pb

Figura 23: (A) Mapa de restrição do plasmídeo p416-GPD-MDR1 e previsão do tamanho dos fragmentos obtidos após digestão com as enzimas de restrição *EcoRV*, *Bam*HI e *Hind*III (B) Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos resultantes da digestão do plasmídeo recombinante p416-GPD-MDR1 com as enzimas *EcoRV* (poço 1), *Bam*HI (poço 2) e *Hind*III (poço 3). O marcador de peso molecular utilizado (M) foi o λ /*Hind*III (fermentas).

Como é possível confirmar na figura 22, a clonagem do cDNA do gene *MDR1* no vetor p416-GPD foi efetuada com sucesso, uma vez que os tamanhos dos fragmentos obtidos, após digestão com as diferentes enzimas, corresponderam aos tamanhos previstos para o vetor recombinante (p416-GPD-MDR1), o qual foi assim utilizado para transformar a estirpe de *S. cerevisiae* AD1-8. Uma vez obtida a estirpe recombinante, esta foi avaliada fenotipicamente por crescimento em meio YPD suplementado com doxorrubicina em diferentes concentrações. Como controlos, utilizaram-se as estirpes AD1-8 transformada com o vetor vazio p416-GPD e a estirpe *S. cerevisiae* W303-1A *wild-type*, com expressão dos diferentes PDRs. É de referir que a estirpe de *S. cerevisiae wild-type* que originou o mutante AD1-8 é a estirpe US50-18C (Decottignies, Grant et al. 1998) e não a W303-1A, utilizada neste trabalho. No entanto, uma vez que ambas as estirpes apresentam expressão dos genes mutados na estirpe AD1-8, foi esta última a utilizada como controlo positivo de crescimento, dado não se encontrar disponível no grupo de trabalho a estirpe de origem (US50-18C). O resultado da análise fenotípica do crescimento das estirpes em meio YPD com diferentes concentrações de doxorrubicina, é apresentado na figura seguinte (figura 24).

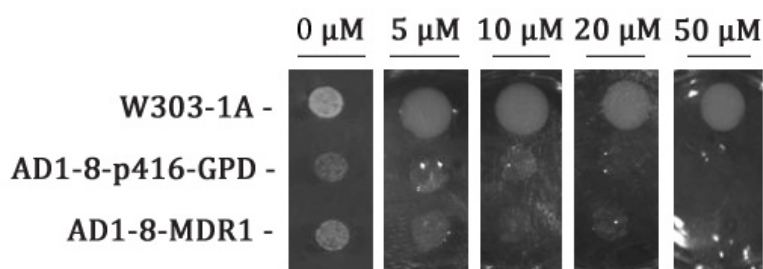


Figura 24: Fenótipo de crescimento das estirpes de *S. cerevisiae* W303-1A, AD1-8-p416-GPD e AD1-8-MDR1 em meio YPD suplementado com diferentes concentrações de doxorubicina (0 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M e 50 μ M), após 72h de incubação a 30°C. Foi preparada uma suspensão celular de cada uma das estirpes a uma D.O.₆₀₀ 0,1, tendo sido aplicados nos diferentes meios 3 μ L de cada suspensão celular.

Como se pode observar na figura, as diferentes deleções introduzidas na estirpe AD1-8 originaram um menor crescimento desta estirpe, comparativamente à estirpe W303-1A *wild-type*, mesmo na ausência de doxorubicina. Apesar dessa diferença poder ser justificada pelo facto de se ter utilizado uma estirpe diferente, é provável que esta se deva às deleções dos PDRs nesta estirpe, que comprometem o crescimento celular, uma vez que as proteínas mutadas podem estar envolvidas na eliminação de produtos tóxicos produzidos pela célula no seu metabolismo. Foi também verificado que, contrariamente ao esperado, as estirpes de *S. cerevisiae* AD1-8 transformadas com o vetor vazio ou com o vetor p416-GPD-MDR1, apresentaram uma sensibilidade semelhante à doxorubicina, pelo que a introdução do gene *MDR1* humano não foi capaz de reverter o fenótipo. É de realçar que o fragmento clonado no plasmídeo recombinante p416-GPD-MDR1 apresenta não só a ORF do gene *MDR1*, mas também as regiões 5' e 3' UTR as quais apresentam tamanhos de 333 e 610 pb, respetivamente. Apesar da região 5' UTR não apresentar ATGs alternativos ao codão de iniciação, apresenta um tamanho considerável, pelo que poderá interferir com a correta expressão do gene. Assim, de forma a contornar esse problema, amplificou-se apenas a ORF do gene *MDR1*, utilizando o vetor pCR-XL-TOPO_MDR1 como molde. O fragmento amplificado foi igualmente clonado no vetor p416-GPD, pela técnica de *Gap Repair*.

A estirpe de *S. cerevisiae* AD1-8 foi co-transformada com o plasmídeo p416-GPD linearizado e com um fragmento de DNA correspondente à totalidade da região codificante do gene *MDR1*, flanqueado em ambas as extremidades com 30 pb de DNA homólogo às extremidades do vetor linearizado, conforme descrito na secção 2.3.9 dos Materiais e Métodos. De forma a confirmar a correta clonagem, o plasmídeo foi isolado de células transformantes e amplificado em *E. coli*. O plasmídeo recombinante obtido (p416-MDR1-GR) foi digerido com diferentes enzimas de restrição (*Bam*HI e *Xho*I), a flanquear o fragmento obtido, para confirmar a sua correta inserção. A digestão originou, de acordo

com o esperado, dois fragmentos, um de ~5,8 kb (correspondente ao vetor p416-GPD) e outra de ~3,8 kb (correspondente à ORF do gene *MDR1*) (figura 25).

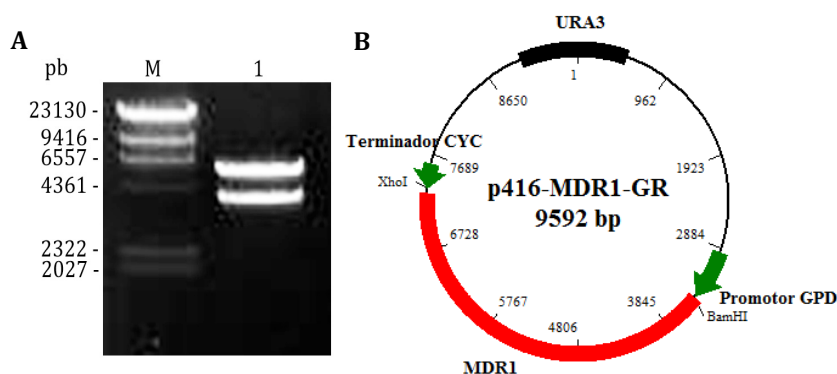


Figura 25: (A) Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos resultantes da digestão enzimática com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I do plasmídeo p416-MDR1-GR, obtido por *gap repair* (poço 1). O marcador de peso molecular utilizado (M) foi o λ /*Hind*III (fermentas). (B) Mapa do plasmídeo p416-MDR1-GR.

Uma vez confirmada a correta inserção do fragmento no vetor p416-GPD, procedeu-se à análise fenotípica da estirpe obtida, para avaliar a funcionalidade do gene *MDR1* humano em levedura, após remoção das regiões UTR flanqueantes. Para isso, procedeu-se, tal como anteriormente descrito, à avaliação do crescimento desta estirpe em meio YPD (controlo positivo) e em meio YPD suplementado com diferentes concentrações de doxorrubicina. Como controlo positivo de crescimento utilizou-se a estirpe W303-1A (com expressão basal das proteínas Pdr) e como controlo negativo a estirpe AD1-8-p416-GPD (deletada nas principais proteínas envolvidas na resistência a fármacos (tabela 6) e transformada com o vetor vazio). Além da estirpe AD1-8-p416-MDR1-GR obtida por *Gap Repair* (contendo apenas a ORF do gene *MDR1*), reavaliou-se novamente o crescimento da estirpe AD1-8-p416-MDR1 (contendo a ORF do gene *MDR1* e regiões 5' e 3' UTR) (figura 25). O crescimento nos diferentes meios foi acompanhado diariamente, sendo as gotas apresentadas na figura 26 referentes a 48 horas de crescimento a 30°C.

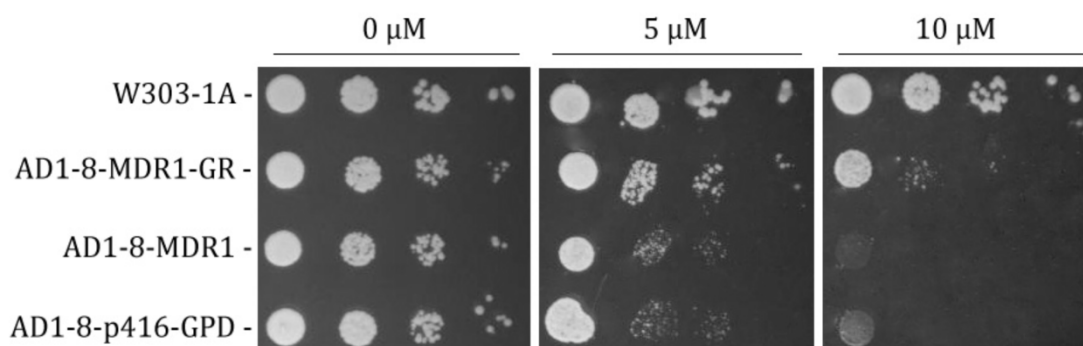


Figura 26: Fenótipo de crescimento das estirpes de *S. cerevisiae* W303-1A, AD1-8-MDR1-GR (AD1-8 transformada pelo método *gap repair* com o gene *MDR1* sem as regiões 5' e 3' UTR), AD1-8-MDR1 (AD1-8 transformada com o gene *MDR1* contendo as regiões 5' e 3' UTR) e AD1-8-p416-GPD em meio YPD suplementado com diferentes concentrações de doxorrubicina (0 μ M, 5 μ M, 10 μ M) após 48h de incubação a 30°C. Foi preparada uma suspensão celular de cada uma das estirpes a uma D.O.₆₀₀ 0,1. Realizaram-se diluições

sucessivas de 10x (da esquerda para a direita), tendo sido aplicados nos diferentes meios 3 µL de cada suspensão celular.

Por análise da figura, pode-se constatar que de facto, a estirpe AD1-8-p416-MDR1-GR apresentou um aumento significativo de resistência à ação da doxorrubicina comparativamente quer à estirpe AD1-8 transformada com o vetor vazio, quer à estirpe transformada com o vetor p416-GPD-MDR1 (com as regiões flanqueantes do gene). Estes resultados vêm confirmar por um lado que o número de bases existente entre o promotor e o codão de iniciação pode comprometer a expressão da proteína e, por outro lado, que o gene *MDR1* humano é funcional neste sistema de expressão, uma vez que foi capaz de reverter parcialmente o fenótipo do mutante. No que diz respeito à comparação com a estirpe W303-1A, verifica-se, tal como anteriormente, que esta apresenta um crescimento ligeiramente maior em meio com doxorrubicina, sendo este efeito mais evidente para as gotas de maior diluição. Isso pode ser justificado pelo facto de a estirpe AD1-8, utilizada para construir a estirpe AD1-8-MDR1-GR, se encontrar mutada em diversos genes, podendo a expressão heteróloga do gene *MDR1* não ter sido suficiente para reversão total do fenótipo.

3.3.2. Avaliação funcional do polimorfismo C3435T em *Saccharomyces cerevisia*

Após confirmação da funcionalidade do gene *MDR1* humano em *S. cerevisiae*, procedeu-se à inserção do polimorfismo C3435T neste gene, de modo a efetuar a sua caracterização funcional. O polimorfismo foi inserido por mutagénesse dirigida, conforme descrito na secção 2.3.10 dos Materiais e Métodos, utilizando para esse fim o plasmídeo p416-MDR1-GR, contendo a região codificante do gene *MDR1* sob o controlo do promotor constitutivo GPD. Após o PCR com os *primers* contendo a mutação pretendida, procedeu-se à digestão do produto de PCR com a enzima *DpnI*, para eliminar o DNA plasmídeo molde (contendo o gene *MDR1* sem a mutação). O produto de PCR digerido com *DpnI* foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, tendo-se observado a presença de uma banda correspondente ao tamanho pretendido (resultados não apresentados). Procedeu-se dessa forma à transformação de células de *E. coli* competentes, com o produto de PCR digerido com *DpnI* (contendo presumivelmente a mutação). Foram obtidas cerca de quarenta colónias, tendo sido isolado o DNA plasmídico de seis colónias. A presença do polimorfismo nos plasmídeos isolados (designados por p416-MDR1-GR-C3435T) foi analisada por PCR-RFLP, conforme descrito anteriormente (secção 2.1.5 dos Materiais e Métodos). Como controlo, utilizou-se o plasmídeo p416-MDR1-GR sem inserção do

polimorfismo em questão. Como se pode ver pela figura 27, foi obtido apenas um fragmento após digestão com a enzima *Mbo*I (ao contrário do que aconteceu por digestão do fragmento amplificado a partir do plasmídeo p416-MDR1-GR), indicando que o local de restrição para esta enzima foi removido e, conseqüentemente, a inserção do polimorfismo foi bem sucedida.

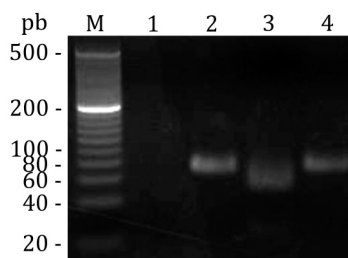


Figura 27: Análise eletroforética em gel de agarose do produto resultante da mutagênese dirigida após PCR-RFLP com a enzima *Mbo*I. No poço 1 encontra-se o controlo negativo da amplificação por PCR, no poço 2 encontra-se o produto de amplificação (74 pb) contendo a zona a analisar, no poço 3 o produto amplificado a partir do plasmídeo p416-MDR1-GR digerido com a enzima *Mbo*I (55 pb e 19 pb) e no poço 4 o produto amplificado a partir do plasmídeo p416-MDR1-GR-C3435T digerido com a enzima *Mbo*I (74 pb).

Após a confirmação da inserção do polimorfismo C3435T no gene *MDR1* procedeu-se à avaliação fenotípica da estirpe, de modo a avaliar a funcionalidade do polimorfismo. Assim, procedeu-se à avaliação do crescimento da estirpe nos diferentes meios YPD e YPD suplementado com doxorrubicina. Nesta análise, incluiu-se novamente a estirpe AD1-8-p416-GPD e a estirpe AD1-8-p416-MDR1-GR (transformada com o gene *MDR1*) para comparação do fenótipo. O crescimento nos diferentes meios foi efetuado durante 48 horas a 30°C, encontrando-se os resultados apresentados na figura 28.

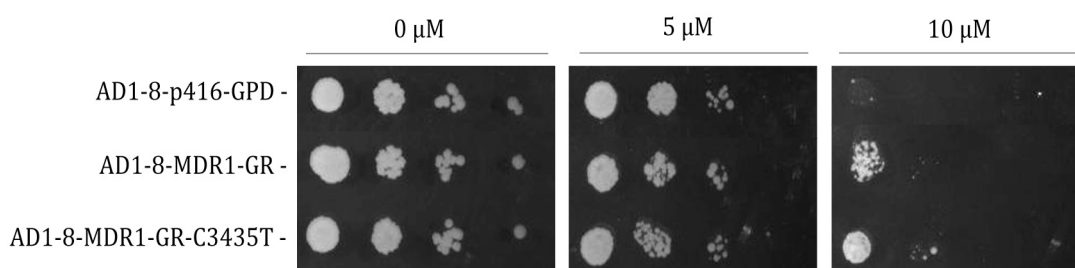


Figura 28: Fenótipo de crescimento das estirpes de *S. cerevisiae* AD1-8-p416-GPD, AD1-8-MDR1-GR (AD1-8 transformada pelo método *gap repair* com o gene *MDR1*), e AD1-8-MDR1-GR-C3435T (AD1-8 transformada com o gene *MDR1* contendo o polimorfismo C3435T) em meio YPD suplementado com diferentes concentrações de doxorrubicina (0 µM, 5 µM, 10 µM) após 48h de incubação a 30°C. Foi preparada uma suspensão celular de cada uma das estirpes a uma D.O.₆₀₀ 0,1. Realizaram-se diluições sucessivas de 10x (da esquerda para a direita), tendo sido aplicados nos diferentes meios 3 µl de cada suspensão celular.

Como observado na figura, a estirpe AD1-8-p416-MDR1-GR-C3435T demonstrou um maior crescimento em meio suplementado com doxorrubicina (principalmente na concentração de 10 µM), comparativamente à estirpe AD1-8-p416-MDR1-GR. Estes resultados demonstram que a presença do polimorfismo C3435T afeta a funcionalidade do

gene *MDR1*, levando a um ganho de função da Pgp, conferindo assim uma maior resistência à doxorubicina. E conseqüentemente a um maior crescimento em meio contendo o fármaco. De acordo com os resultados anteriores, verificou-se novamente que a estirpe AD1-8-p416-MDR1-GR apresentou um crescimento maior do que a estirpe AD1-8-p416-GPD em meio com doxorubicina, sendo este resultado mais claro no meio suplementado com maior concentração do fármaco.

3.3.3. Localização celular da glicoproteína-P em *Saccharomyces cerevisiae* transformada com o gene *MDR1* humano

Com o objetivo de determinar a localização da Pgp na estirpe *S. cerevisiae* AD1-8 transformada, o gene *MDR1* foi clonado no vetor pUG35, contendo o gene repórter GFP (*Green Fluorescent Protein*), de forma a criar a proteína quimérica Pgp-GFP. O gene *MDR1*, sem o respectivo codão STOP, foi amplificado a partir do vetor pCR-XL-TOPO_MDR1, de forma a poder efetuar a fusão da extremidade 3' do gene *MDR1* com a extremidade 5' do gene *GFP*, no mesmo quadro de leitura. O gene *MDR1* amplificado foi clonado no vetor de expressão pUG35 na estirpe *S. cerevisiae* AD1-8 pela técnica de *Gap Repair*. Uma vez que se encontra descrito que o glicerol pode funcionar como *chaperone* químico (Kuchler and Thorner 1992), as estirpes transformantes foram crescidas quer em meio YNB glicose quer em meio YNB glicose suplementado com glicerol 10% até D.O._{600nm}, compreendida entre 0,45 e 0,7 e analisadas por microscopia de fluorescência. Todas as células foram crescidas na ausência de uracilo, marca prototrófica dos transformantes, e de metionina, de forma a permitir a expressão da proteína. Como controlo, foi utilizada a estirpe *S. cerevisiae* AD1-8 transformada com o plasmídeo vazio. De acordo com as imagens obtidas por microscopia de fluorescência (figura 29), podemos verificar que as células recolhidas na fase exponencial de crescimento em YNB glicose e glicerol 10% revelaram a presença da Pgp na membrana plasmática das células transformadas. Desta forma, foi possível confirmar o seu correto tráfego apesar de parte da proteína se encontrar no vacúolo, verificando-se que os níveis de expressão da Pgp na membrana plasmática de levedura foram aumentados quando as células foram crescidas na presença de glicerol.

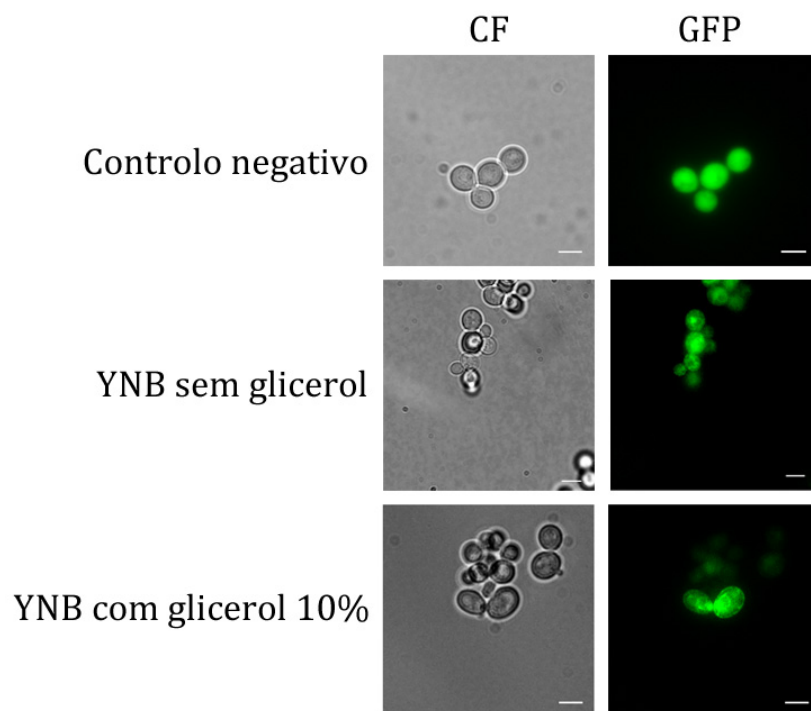


Figura 29: Determinação, por microscopia de fluorescência, da localização da Pgp codificada pelo gene *MDR1* em fusão com a proteína GFP na estirpe AD1-8 crescida em YNB glicose e em YNB glicose suplementado com glicerol 10%. Como controlo, foi utilizada a estirpe AD1-8 transformada com o vetor vazio. Escala das imagens: 5 μ m.

4. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÃO

A variabilidade interindividual na resposta a fármacos contribui significativamente para a sua eficácia assim como para o aparecimento de reações adversas do seu metabolismo. Tal variabilidade na resposta aos fármacos é influenciada por idade, estado patológico, fatores ambientais ou interação entre fármacos e também em grande parte provocada por variações genéticas nos genes codificantes de proteínas envolvidas no seu metabolismo e transporte (Ingelman-Sundberg, Sim et al. 2007). A variabilidade genética pode influenciar quer a farmacocinética quer a farmacodinâmica de um determinado fármaco, conduzindo dessa forma a alterações na sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção assim como a ação do fármaco no seu alvo (Weinshilboum and Wang 2006). O metabolismo de um fármaco depende essencialmente das respetivas enzimas metabolizadoras, assim como da sua entrada e saída da célula mediada por proteínas transportadoras, pelo que os polimorfismos genéticos que ocorrem nos genes codificantes dessas proteínas, contribuem de forma determinante para a variabilidade interindividual e resposta a esse fármaco. Entre as principais proteínas metabolizadoras de fármacos encontram-se as do sistema citocromo P450 (CYP450), nomeadamente as isoformas CYP2D6 e CYP2C19, cujos genes apresentam diversos polimorfismos na população caucasiana (Sim, Risinger et al. 2006). Por sua vez, de entre as proteínas transportadoras, assume particular destaque o transportador ABC glicoproteína-P (Pgp), uma proteína de transporte ativo, codificada pelo gene *MDR1*, que medeia o efluxo de diversos tipos de fármacos, sem relação estrutural e funcional, estando diretamente envolvida no fenótipo de multirresistência a fármacos que muitas células tumorais apresentam. Assim, foi objetivo deste trabalho estudar alguns dos principais polimorfismos dos genes codificantes destas proteínas, nomeadamente os polimorfismos CYP2D6*4, CYP2C19*17 do sistema CYP450 e C3435T do gene *MDR1*.

De entre os genes codificantes de enzimas do sistema CYP450, o gene *CYP2D6* é o mais polimórfico, apresentando grande significado clínico, dada a sua importância no metabolismo de antidepressivos, antipsicóticos ou agentes antitumorais, por exemplo (Ingelman-Sundberg 2005). Apesar do elevado número de polimorfismos no CYP2D6, assume particular importância o polimorfismo CYP2D6*4, uma vez que é o mais frequente na população caucasiana, havendo também já estudos nesse sentido na população portuguesa (Lemos, Carrilho et al. 2007). Neste contexto, pretendeu-se neste trabalho proceder a um estudo populacional desse polimorfismo, numa amostra representativa da população norte de Portugal, uma vez que os estudos anteriores não incluíam esta franja da população (Lemos, Carrilho et al. 2007). Os dados estatísticos referidos na literatura demonstram num estudo feito na população portuguesa do centro do país, que o genótipo de homozigotia mutante tem uma frequência baixa (5,5%) comparativamente aos outros

genótipos (Lemos, Carrilho et al. 2007). Também no presente trabalho este genótipo foi o menos frequente, sendo a sua incidência da mesma ordem de grandeza do estudo anterior (7,7%). O número obtido em ambos os estudos da população portuguesa é no entanto ligeiramente inferior à frequência encontrada para este polimorfismo na população caucasiana (12 a 21%) (Ferraldeschi and Newman 2010), demonstrando a importância de se efetuar a genotipagem num determinado país, pois podem ocorrer variações relativamente à população caucasiana em geral. De facto, outros estudos referem que a frequência deste polimorfismo é inferior na população da Europa do sul, comparativamente à do norte, o que vem de encontro aos resultados obtidos (Correia, Santos et al. 2009). Relativamente aos outros genótipos (heterozigotia e homozigotia normal), foram já encontradas diferenças dentro da própria população portuguesa (18,8% e 73,5% para heterozigotia e homozigotia normal no presente estudo correspondente à população norte e 32,4% e 62,1% para os mesmos genótipos na população de Coimbra), mostrando que pode também existir variabilidade regional. É de referir que, apesar de ter sido utilizado um número de amostras considerável no presente trabalho (159), este foi inferior à do estudo anterior (256) (Lemos, Carrilho et al. 2007). Este polimorfismo contribui para um fenótipo metabolizador pobre (PM), não sendo no entanto o único polimorfismo do CYP2D6 que interfere neste fenótipo. Encontra-se descrito que a frequência PM compreende 5 a 10% da população caucasiana (Scheer, Kapelyukh et al. 2012). No entanto, tendo sido essa frequência determinada com base em todos os polimorfismos contribuidores para esse fenótipo, é provável que na população portuguesa (população do norte, especificamente), esse valor seja mais baixo, pois o estudo teve apenas em conta este polimorfismo que, como referido, tem uma frequência mais baixa que na população caucasiana em geral.

Em resumo, quanto às frequências genotípicas do polimorfismo CYP2D6*4, verificou-se que:

- O genótipo de homozigotia mutante foi o menos frequente (7,7%), estando de acordo com estudos portugueses anteriores (5,5%);
- A frequência de homozigotia mutante na população portuguesa é inferior à frequência do polimorfismo na população caucasiana (12-21%);
- O genótipo de homozigotia normal foi o mais frequente (73,5%), no entanto, numa frequência superior ao descrito na população portuguesa (62,1%);
- A frequência do genótipo de heterozigotia (18,8%) foi inferior ao descrito na população portuguesa (32,4%).

Um outro polimorfismo do sistema CYP450 estudado neste trabalho foi o polimorfismo CYP2C19*17. Este polimorfismo promove um fenótipo metabolizador ultrarrápido (UM) da isoforma CYP2C19 (Daly 2010). Apesar deste polimorfismo não ser o mais frequente na isoforma CYP2C19 (sendo este o CYP2C19*2 (de Moraes, Wilkinson et al. 1994)), foi incluído neste trabalho, por não haver qualquer estudo de genotipagem deste polimorfismo na população portuguesa. O estudo do polimorfismo CYP2C19*17, permitiu observar uma elevada frequência de heterozigotas (53,4%), enquanto que o genótipo homozigota normal, obteve uma frequência inferior (39,2%). Por sua vez, o genótipo homozigota mutante apresentou uma frequência de 7,4%, da mesma ordem de grandeza da população caucasiana (5,2%) (Santos, 2011). No entanto, a frequência de genótipos heterozigóticos e homozigóticos normais, tal como no caso anterior, não se encontram totalmente de acordo com o descrito na literatura, referente à genotipagem da população caucasiana (tabela 16). Pode considerar-se como a causa mais plausível, o facto de se considerar descendentes caucasianos, e não indivíduos pertencentes à raça pura no estudo escolhido para comparação com os resultados obtidos (Santos, 2011). A baixa incidência deste polimorfismo (conducente a um fenótipo UM) leva a que, exceto nos casos de pró-fármacos, o metabolismo dos fármacos não provoque reações adversas de grande extensão, mas por outro lado, leva também a uma menor eficiência, e conseqüentemente a uma falha terapêutica.

Relativamente ao polimorfismo CYP2C19*17, quanto às frequências genotípicas conclui-se que:

- O genótipo de homozigotia mutante foi o menos frequente (7,4%), sendo a sua frequência semelhante à frequência na população caucasiana anteriormente descrita (5,2%);
- O genótipo de heterozigotia foi o mais frequente (53,4%), comparativamente aos outros genótipos. A frequência de heterozigotia na população portuguesa foi mais elevada do que na população caucasiana (25,7%);
- A frequência obtida de indivíduos homozigotas normais (39,2%) foi bastante inferior à frequência na população caucasiana (69,1%)

Apesar das enzimas metabolizadoras, em especial as do sistema CYP450, terem um papel determinante na ação e toxicidade de fármacos, este efeito é também influenciado, como referido, por bombas de efluxo, nomeadamente pela Pgp. Os níveis de expressão desta proteína são particularmente importantes na eficiência da terapia do cancro, pois vários dos fármacos anti-tumorais utilizados correntemente são seus substratos, tal como acontece com a doxorrubicina, fármaco utilizado no presente trabalho. O gene *MDR1*,

codificante da Pgp, é altamente polimórfico, sendo o polimorfismo C3435T, o mais frequente na população caucasiana (Correia, Santos et al. 2009). O polimorfismo C3435T, apesar de situado na região codificante não provoca qualquer modificação aminoacídica. No entanto, a substituição ocorrida provoca um atraso no *folding* da proteína, conduzindo a uma alteração da sua expressão (Fung and Gottesman 2009). O sentido dessa alteração permanece controverso, havendo estudos que indicam que o polimorfismo aumenta a expressão da Pgp (Kim, Leake et al. 2001), enquanto outros estudos vão no sentido contrário (Illmer, Schuler et al. 2002). Tal poderá ser devido ao tipo de tecido utilizado, pois poderão existir outros fatores que condicionem essa expressão. A modificação da expressão (e conseqüentemente da atividade) da Pgp poderá ter significado clínico, nomeadamente ao nível da resistência a fármacos anti-tumorais. Apesar do estudo populacional deste polimorfismo já ter sido efetuado na população portuguesa (Correia, Santos et al. 2009), foi apenas na região de Lisboa, não havendo nenhum estudo na população norte de Portugal. Assim, foi também objetivo do presente trabalho, proceder ao estudo populacional deste polimorfismo, utilizando uma amostra do norte do país para tal estudo. Os estudos de genotipagem neste trabalho demonstraram uma elevada frequência de indivíduos homozigotas mutantes (13,0%), sendo a frequência de heterozigotas e homozigotas normais de 47,7% e 39,5%, respetivamente. A frequência genotípica homozigótica mutante (TT) é ligeiramente inferior à genotipagem da população caucasiana e portuguesa da região de Lisboa (19,8 e 19,3%, respetivamente). No entanto, as principais diferenças vão como nos casos anteriores para as frequências de heterozigotia e homozigotia normal (tabela 18). Essas diferenças poderão ser importantes na definição de um regime de quimioterapia, dada a influência da expressão desta proteína, para o sucesso desse tratamento.

Finalmente, relativamente às frequências genotípicas para o polimorfismo C3435T, obteve-se:

- Uma elevada frequência de indivíduos homozigotas mutantes (13,0%), apesar de inferior ao descrito para a população portuguesa (19,3%);
- Uma frequência de 47,7% para o genótipo de heterozigotia, sendo este o mais frequente, tal como descrito para a população portuguesa. No entanto, este valor encontra-se abaixo do descrito (57,9%);
- A frequência de indivíduos homozigotas normais foi superior (39,5%) ao descrito para a população portuguesa (22,8%).

A análise global dos três polimorfismos estudados indica que, apesar da frequência do genótipo mutante ser semelhante aos estudos já publicados em população caucasiana

ou portuguesa de regiões diferentes da do presente estudo, o mesmo não se passa para as frequências do genótipo heterozigota e homozigota normal. Uma das principais causas que poderá justificar as diferenças observadas está relacionada com o grande fluxo migratório, cada vez maior ao longo dos anos, levando a cruzamentos entre indivíduos de populações diferentes.

Todos estes estudos populacionais, foram realizados por metodologias diferentes, nomeadamente por *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) e por *High Resolution Melting* (HRM). No entanto, foram verificadas algumas diferenças nos resultados entre os dois métodos de análise. Tais diferenças poderão, no entanto, ser justificadas por uma digestão parcial do produto do RFLP, que poderá ter originado resultados duvidosos. De facto, verificou-se para os três polimorfismos que os casos duvidosos diziam respeito ao aparecimento de heterozigotia por PCR-RFLP e que correspondiam no HRM a homozigotas normais. Em todos os polimorfismos estudados, a presença do polimorfismo leva ao desaparecimento do local de restrição. Se a digestão com a enzima de restrição for parcial, originará o mesmo padrão de bandas que os indivíduos heterozigotas, o que explica assim os resultados obtidos. No HRM não é necessário efetuar qualquer digestão enzimática, pelo que esse problema não se coloca. Além disso, os resultados obtidos apresentavam sempre um elevado grau de confiança compreendido entre 87 e 100%, indicando assim a fiabilidade deste método. Assim, a totalidade das amostras foi analisada por HRM, uma vez que este se mostrou um método mais preciso e adequado para a análise genotípica. É de referir, no entanto, que apesar dos resultados obtidos parecerem indicar que os resultados por HRM foram os corretos, apenas a sequenciação permitiria a confirmação inequívoca destes resultados.

Os estudos genotípicos realizados no presente trabalho podem ser úteis no ajuste de doses farmacológicas, de modo, a aumentar a eficácia terapêutica dos fármacos que sejam substratos destas proteínas. Caso essa eficácia não seja atingida, devido ao facto do aumento de dose causar toxicidade, outra alternativa para estes pacientes, será escolher um fármaco que não seja seu substrato. Estes dados deverão no entanto, ser correlacionados com a variabilidade interindividual na eficácia de tratamentos clínicos pela mesma população, de forma a estabelecer-se a correlação genótipo/resposta a fármaco, e assim definir-se para cada caso clínico a necessidade de genotipagem individual.

Apesar da importância dos estudos populacionais na determinação de uma terapia adequada, estes estudos genotípicos não permitem aferir a influência de um polimorfismo na atividade da proteína em questão. Assim, o desenvolvimento de sistemas *in vitro*, em

que seja possível medir essa atividade poderá ser importante para determinar o papel específico de cada polimorfismo. No presente trabalho, procedemos a esse estudo funcional para o polimorfismo C3435T do gene *MDR1* humano, utilizando o fármaco antitumoral doxorrubicina, substrato da Pgp e dois sistemas diferentes: linhas celulares tumorais e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

O modelo de estudo para as linhas celulares tumorais foi o cancro coloretal, um dos tipos de cancro mais frequente em Portugal (Pinto, Paquete et al. 2010) e que apresenta elevadas taxas de recidiva, devido à sobre-expressão da Pgp (Linn and Giaccone 1995). Foram encontrados diferentes genótipos nas linhas celulares em estudo: genótipo homozigota mutante na linha celular HCT-15 e heterozigota nas linhas celulares HT29-MTX e Caco-2. Devido à limitação de amostras, não foi possível analisar outras linhas tumorais de cancro coloretal, pelo que não se analisou nenhuma linha com genótipo homozigota normal. No entanto, verificou-se que a linha celular HCT-15, de genótipo TT, apresentava maior resistência à ação da doxorrubicina, que as restantes linhas. No sentido de ver se essa resposta estaria associada a um aumento da expressão provocada pelo polimorfismo, analisaram-se os níveis de expressão da proteína nas três linhas em estudo, por ensaios de Western-blot. Foi verificado, que de facto a linha celular HCT-15 era a linha que apresentava maior expressão, não tendo sido aliás detetados níveis de expressão significativos nas restantes linhas. Isto vem de acordo com o descrito na literatura, em que se associa a presença do polimorfismo a um aumento dos níveis de expressão da Pgp.

Em resumo, quanto ao modelo das linhas celulares tumorais, verificou-se que:

- A linha celular HCT-15 apresentou um genótipo de homozigotia mutante e as linhas celulares HT29-MTX e Caco-2 um genótipo de heterozigotia;
- A linha celular HCT-15 apresentou uma maior resistência à doxorrubicina e, por sua vez, uma maior expressão da Pgp.

É de referir no entanto, que apesar deste estudo funcional em linhas celulares tumorais, ter suportado a hipótese da associação entre a presença do polimorfismo C3435T do gene *MDR1* e a expressão da Pgp, não é possível estabelecer uma relação direta, devido às diferentes linhas apresentarem diferentes perfis genéticos e metabólicos, podendo inclusivamente apresentar outros polimorfismos no gene *MDR1* que contribuíram para o fenótipo da células. Assim, e no sentido de eliminar qualquer influência externa ao estudo da influência de um polimorfismo específico, foi construído com sucesso neste trabalho um sistema de expressão heteróloga do gene *MDR1* na estirpe de levedura AD1-8, deficiente nos principais transportadores de efluxo (tabela 7 e figura

19). A utilização desta estirpe é fundamental para o objetivo proposto, uma vez que se verificou que a levedura *wild-type* apresentava uma elevada resistência ao fármaco utilizado nos ensaios (doxorrubicina), pelo que a sua utilização inviabilizaria a determinação da funcionalidade da Pgp neste sistema. É de referir que numa primeira experiência, em que se clonou no vetor de expressão p416-GPD de *S. cerevisiae* um fragmento contendo não só a região codificante do gene *MDR1* mas também parte das regiões flanqueantes 5' e 3', num total adicional de 333 e 610 pb, respetivamente, não se observou qualquer diferença no fenótipo comparativamente à estirpe controlo (AD1-8 transformada com o vetor vazio). No entanto, quando se procedeu à clonagem no mesmo vetor do fragmento correspondente apenas à *Open Reading Frame* (ORF) do gene (sem as regiões flanqueantes), verificou-se um aumento de resistência comparativamente à mesma estirpe, indicando que o gene era funcional neste sistema de expressão e que apenas a longa distância entre o promotor e o codão de iniciação impedia a correta expressão da proteína. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam assim que a levedura *S. cerevisiae* é um bom modelo para o estudo individual dos diferentes polimorfismos do gene *MDR1* humano, podendo ser utilizado para determinar a influência de cada um na atividade da Pgp.

Vários estudos têm sido efetuados no sentido de estabelecer uma relação entre a presença de polimorfismos no gene *MDR1* e a expressão da Pgp. No entanto, estes estudos têm sido controversos. Assim, neste estudo de forma a compreender o efeito da presença do polimorfismo C3435T no gene *MDR1* e uma vez confirmada a funcionalidade do gene em *S. cerevisiae*, procedeu-se à inserção por mutagénesse dirigida do polimorfismo. Os estudos efetuados neste trabalho demonstraram que a presença do polimorfismo induz variações ao nível da resistência ao agente antitumoral exposto, a doxorrubicina, sobretudo em concentrações mais elevadas. Estas variações permitiram comprovar que a presença do polimorfismo C3435T está associado a um aumento da funcionalidade da Pgp, traduzindo-se numa maior resistência quando exposto ao fármaco. Devido à sua elevada frequência, a avaliação funcional deste polimorfismo possui uma elevada importância clínica, já que uma vez demonstrado o seu aumento de funcionalidade, a presença deste polimorfismo minimizará o efeito terapêutico dos fármacos administrados que sejam substratos da Pgp. Desta forma, a farmacocinética destes fármacos poderá ser afetada pela presença do polimorfismo no gene, o que poderá levar a necessidade de ajuste das doses farmacológicas baseado no genótipo.

Relativamente ao modelo de estudo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* conclui-se que:

- O gene *MDR1* foi funcional neste modelo, uma vez que verificou-se um aumento de resistência comparativamente à mesma estirpe;
- A presença do polimorfismo C3435T está associado a um aumento de função da Pgp, o que levou a um aumento da resistência à doxorrubicina

Apesar do polimorfismo C3435T ser o mais frequente no gene *MDR1*, encontram-se descritos mais de 100 polimorfismos para este gene, podendo igualmente conduzir a alterações da atividade da Pgp (Krivulcik, Sedlak et al. 2009). No entanto, a correlação entre a presença do SNP e a atividade da Pgp encontra-se ainda por esclarecer, para a maior parte destes polimorfismos. A levedura *S. cerevisiae* foi também utilizada como modelo de estudo por Jeong e colaboradores (Jeong, Herskowitz et al. 2007) para avaliar a relevância a nível funcional de outros polimorfismos no gene *MDR1* humano. Nesse estudo, foram avaliados apenas polimorfismos que conduziam a alterações aminoacídicas na Pgp (SNPs não sinónimos), nomeadamente os polimorfismos R669C, A893S, W1108R, L662R, S1141T, M89T e P1051A (ou C2005T, G2677T, T3322C, T1984G, T3421A, T265C e C3151G respetivamente), sozinhos ou em conjunto. Os polimorfismos foram selecionados a partir de bases de dados (<http://pharmacogenetics.ucsf.edu> e <http://pharmgkb.org>), dando prioridade aos SNPs não sinónimos de maior relevância na função da Pgp. As variantes da Pgp foram expressas em estirpes de *S. cerevisiae* deletada nos genes *PDR5* e/ou *SNQ2* e/ou *YOR1*, demonstrando que a deleção de apenas estes genes é suficiente para analisar a funcionalidade do gene *MDR1*. A deleção combinatória destes três genes levou a um aumento da sensibilidade da estirpe à doxorrubicina, tal como verificado no presente trabalho com a estirpe AD1-8, mas também à daunorrubicina, um agente anti-tumoral da mesma classe da doxorrubicina e igualmente substrato da Pgp. Os autores verificaram que as variantes da Pgp A893S-M89T, L662R e R669C conduziram a uma maior resistência à daunorrubicina e à doxorrubicina, tal como verificado neste trabalho com a presença do polimorfismo C3435T, presumivelmente devido a um aumento da atividade da Pgp nestes casos. Por sua vez, os polimorfismos A893S, S1141T, A893S-R669C, A893S-P1051A, W1108R e W1108R-R669C conduziram pelo contrário a um menor grau de resistência, comparativamente à Pgp de referência. Isso mostra a importância do estudo funcional dos vários haplótipos possíveis, uma vez que a alteração da função da proteína provocada por um polimorfismo pode ser alterada, caso outros polimorfismos estejam presentes (como é o caso do polimorfismo A893S que sozinho ou em conjunto com os polimorfismos R669C ou P1051A leva a uma diminuição da função da Pgp, mas quando em conjunto com o polimorfismo M89T leva pelo contrário a um ganho de função). No presente estudo, foi apenas analisado o polimorfismo C3435T do gene

MDR1, por ser o mais frequente na população caucasiana, mas já se encontram em curso estudos para avaliar a função deste polimorfismo em conjunto com o polimorfismo G2677T (correspondente ao polimorfismo A893S), o segundo polimorfismo mais frequente no gene, de forma a analisar quer o efeito separado, quer combinatório dos dois polimorfismos mais frequentes no gene *MDR1*.

Uma vez que foi verificado que apesar da expressão do gene *MDR1* conduzir a uma maior resistência a fármacos substratos da Pgp (o caso da doxorrubicina neste estudo), essa expressão não consegue reverter totalmente o fenótipo provocado pela deleção múltipla dos genes *PDR* na estirpe AD1-8. Isso pode ser explicado pelo facto de se tratarem de proteínas diferentes, o que poderá levar a que a aquisição do fenótipo PDR seja menor ou pode também ser devido a um menor grau de expressão da proteína na membrana plasmática da levedura, uma vez que o seu tráfego pode estar alterado, dado tratar-se de uma proteína diferente com diferentes modificações pós-traducionais. De facto, encontra-se descrito que, apesar do gene *MDR1* apresentar funcionalidade em *S. cerevisiae*, o produto proteico dessa expressão (a proteína Pgp) não se encontra glicosilada, ao contrário do que acontece em células humanas (Kuchler and Thorner 1992). De forma a verificar se o tráfego da proteína se dava corretamente, apesar da ausência dessas modificações pós-traducionais, procedeu-se à construção da proteína quimérica Pgp-GFP, de forma a poder acompanhar o seu tráfego em *S. cerevisiae*. Verificou-se a presença da proteína na membrana plasmática da levedura, tal como era esperado, dado o seu fenótipo. No entanto, verificou-se igualmente que muita da proteína se encontrava no citoplasma, presumivelmente no retículo endoplasmático, indicando que o tráfego não se encontrava totalmente operacional. Encontra-se descrito que os níveis de Pgp na membrana de levedura podem ser aumentados pela adição de glicerol ao meio de cultura, uma vez que este pode funcionar como um *chaperone* químico (Figler, Omote et al. 2000). Assim, neste trabalho, avaliou-se também esse efeito na presença da proteína quimérica na membrana da levedura recombinante. Apesar do ensaio não ter sido quantitativo, verificou-se, tal como descrito, um aumento da proteína na membrana nestas condições, pelo que poderá ser aplicado em ensaios futuros para estudos funcionais da Pgp e suas variantes em *S. cerevisiae*.

Quanto à localização celular da Pgp na *Saccharomyces cerevisiae* verificou-se que:

- Apesar de a Pgp se encontrar na membrana plasmática, muita da proteína encontrava-se no citoplasma. A adição de glicerol ao meio levou a um aumento dos níveis de proteína na membrana plasmática.

Em conclusão, os resultados obtidos ao longo deste trabalho quanto à genotipagem da população do norte de Portugal, permitiram determinar a frequência genotípica e alélica de três polimorfismos, nomeadamente os polimorfismos CYP2C19*17 e CYP2D6*4 do sistema CYP450 e o polimorfismo C3435T do gene *MDR1*. Foi verificado, para os três polimorfismos que a frequência de homozigotas mutantes era aproximada à descrita para a população caucasiana. No entanto, a frequência de heterozigotas apresentou diferenças consideráveis para os três casos, comparando a população em estudo (representativa da população norte de Portugal) e a população caucasiana. Tal poderá estar relacionado com o aumento do fluxo migratório de indivíduos de diferentes tipos de população ao longo dos anos. Além disso, verificou-se que o HRM é um método mais preciso e adequado para a análise genotípica, sendo necessário no entanto validar esses resultados por sequenciação.

No que diz respeito à análise funcional do polimorfismo C3435T do gene *MDR1*, verificou-se que os resultados obtidos nas diferentes linhas celulares de cancro colorretal permitiram uma correlação aproximada entre a presença do polimorfismo e a resistência à ação do fármaco anti-tumoral doxorrubicina, tendo-se verificado que a presença do polimorfismo estava associada a uma maior expressão do gene. No entanto, esta relação pode ser influenciada pelo património genético e metabólico das diferentes linhas celulares em estudo. Assim, utilizou-se a levedura *S. cerevisiae* como modelo de estudo para tal avaliação funcional, permitindo uma comparação menos dúbia e com maior grau de confiança, uma vez que neste caso a única variável é o polimorfismo em estudo. Os resultados obtidos em *S. cerevisiae* corroboraram no entanto os resultados obtidos com as linhas celulares, tendo-se verificado que a presença do polimorfismo C3435T confere um aumento de funcionalidade do gene, aumentando assim a resistência a fármacos. Deste modo, este sistema de expressão demonstrou ser um bom modelo, como primeira linha de investigação, para o estudo individual de polimorfismos.

5. PERSPETIVAS FUTURAS

Os estudos realizados no presente trabalho permitiram avaliar a presença de polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo e transporte de fármacos na população norte de Portugal e adicionalmente, trazer algumas evidências sobre a importância dos polimorfismos na atividade destes genes, utilizando diferentes modelos celulares. Os resultados obtidos neste estudo permitem colocar novas linhas de investigação a desenvolver no futuro, tais como os seguidamente descritos.

Foram encontrados diferentes genótipos para os polimorfismos CYP2C19*17 e CYP2D6*4 do sistema CYP450 e C3435T do gene *MDR1*, os quais poderão estar associados a uma variabilidade na resposta a fármacos, assim como na suscetibilidade a determinadas patologias, como por exemplo o cancro. Assim, seria interessante no futuro realizar estudos clínicos que permitissem fazer essa associação. Seria também de interesse, nomeadamente a nível de rastreios, relacionar a influência dos polimorfismos em estudo e a suscetibilidade a um determinado tipo de cancro. Para tal, será importante obter amostras histológicas de pacientes oncológicos, e efetuar a sua genotipagem e comparar com uma população controlo saudável. No que diz respeito à resposta a fármacos, através de colaborações com centros hospitalares, e escolhendo o cancro como doença modelo de estudo, a utilização de amostras clínicas seria importantes no sentido de ajudar a relacionar a presença de um polimorfismo com a falha terapêutica. Além disso, poderão ser quantificados os níveis de fármacos antitumorais e seus metabolitos no plasma de doentes, de forma a avaliar a atividade enzimática e relacioná-la com a análise genotípica das amostras clínicas. Isso poderá ter influência terapêutica, no sentido de ajustar a dose do fármaco ou de encontrar tratamentos alternativos, não influenciados pelos polimorfismos em questão. Adicionalmente, poder-se-á ainda tentar correlacionar a presença do polimorfismo com as características clinico-patológicas, nomeadamente com o grau de agressividade do tumor. Assim, a utilização de amostras clínicas e o acesso à resposta terapêutica e aos dados clínico-patológicos do paciente poderão ajudar a estabelecer uma associação entre o genótipo dos polimorfismos em estudo com a suscetibilidade para a patologia em questão, assim como com a repercussão farmacogenómica.

Os genes CYP2D6, CYP2C19 e *MDR1* são altamente polimórficos, sendo já vários os alelos descritos para estes genes. Assim, são vários os haplótipos possíveis que poderão ter relevância na resposta farmacológica. Isso leva a um aumento da complexidade na previsão dessa resposta. A utilização de sistemas *in vitro*, como o modelo da levedura utilizado neste trabalho, pode ser uma ferramenta importante para o esclarecimento da

relevância de cada um dos polimorfismo mais frequentes para a atividade da proteína. Nesse sentido, estão já a ser efetuados estudos com o polimorfismo G2677T do gene *MDR1*, o segundo polimorfismo mais frequente neste gene. Para isso, encontra-se a ser construída uma levedura recombinante com expressão do gene *MDR1-G2677T*, assim como com expressão do gene *MDR1-G2677T-C3435T*, com o objetivo de comparar o fenótipo destas estirpes, no que diz respeito à resistência a fármacos com a estirpe transformada com o gene *MDR1*, assim como com a estirpe transformada com o gene *MDR1-C3435T*, construídas no presente trabalho.

Ainda respeitante aos estudos *in vitro*, seria de todo o interesse elucidar se a presença do polimorfismo afeta os níveis de expressão e/ou atividade da glicoproteína-P. Assim, estudos posteriores poderão passar por uma análise dos níveis de expressão do gene *MDR1*, no sistema heterólogo de levedura, na ausência e na presença do polimorfismo (quer do polimorfismo C3435T, quer do polimorfismo G2677T, quer de ambos os polimorfismos), assim como a determinação da atividade da Pgp nestas condições. Será também importante verificar se o aumento descrito na expressão/atividade da Pgp por exposição a fármacos antitumorais seus substratos, poderá ser igualmente influenciado pela presença dos polimorfismos.

Dado o reduzido número de linhas celulares utilizadas, no futuro, o presente trabalho desenvolvido poderá ser complementado com a genotipagem para o polimorfismo C3435T (e para o polimorfismo G2677T, caso se verifique uma associação do polimorfismo com a alteração da atividade da Pgp) de um maior número de linhas celulares tumorais. Para contornar a eventualidade de linhas celulares responderem de forma diferente a um fármaco, apenas devido à sua diferente origem, seria interessante também fazer estudos de viabilidade celular com linhas celulares da mesma proveniência, mas com genótipos diferentes para o mesmo polimorfismo, através da utilização de um vetor de expressão contendo o gene com ou sem polimorfismo, numa linha que não apresentasse expressão basal desse gene, o que permitiria uma comparação mais direta dos resultados.

Sendo as enzimas CYP2D6 e CYP2C19 do sistema citocromo P450 altamente polimórficas e dada a sua frequência na população, uma análise funcional utilizando como sistema de expressão a *Saccharomyces cerevisiae*, seria importante na medida em que ajudaria a esclarecer a atividade da enzima mutante na presença de um fármaco que seja substrato.

Por último, seria interessante e relevante a nível terapêutico, utilizar o sistema construído neste trabalho, para verificar com novos fármacos se estes são substratos da Pgp. Para isso, proceder-se-ia a ensaios fenotípicos de crescimento das estirpes de *S. cerevisiae* AD1-8-p416-GPD e AD1-8-p416-MDR1-GR na presença de diferentes concentrações dos fármacos a testar. Como controlo positivo de crescimento deveria ser utilizada a estirpe selvagem. Sendo a expressão da Pgp em células tumorais uma das principais causas do insucesso do tratamento anti-tumoral, a descoberta de fármacos eficazes que não sejam substratos desta proteína, será importante para o sucesso do tratamento. Adicionalmente, este tipo de abordagem deveria ser estendido à caracterização funcional de outras proteínas ABC, também envolvidas em fenótipos de resistência, como as proteínas MRP ou BCRP.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ambudkar, S. V., C. Kimchi-Sarfaty, et al. (2003). "P-glycoprotein: from genomics to mechanism." Oncogene **22**(47): 7468-7485.
- Ameyaw, M. M., F. Regateiro, et al. (2001). "MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity." Pharmacogenetics **11**(3): 217-221.
- Andreassen, C. N., J. Alsner, et al. (2002). "Does variability in normal tissue reactions after radiotherapy have a genetic basis--where and how to look for it?" Radiother Oncol **64**(2): 131-140.
- Anichavezhi, D. P., M.; Rao, C.; Shewade, D.G. (2011). "Distribution of CYP2C19*17 allele and genotypes in an Indian population." Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics.
- Anzenbacher, P. and E. Anzenbacherova (2001). "Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics." Cell Mol Life Sci **58**(5-6): 737-747.
- Aye, I. L., A. T. Singh, et al. (2009). "Transport of lipids by ABC proteins: interactions and implications for cellular toxicity, viability and function." Chem Biol Interact **180**(3): 327-339.
- Balcerczak, E., M. Panczyk, et al. (2010). "ABCB1/MDR1 gene polymorphisms as a prognostic factor in colorectal cancer." Int J Colorectal Dis **25**(10): 1167-1176.
- Baldissera, V. D., A. A. de Mattos, et al. (2012). "Evaluation of the C3435T polymorphism in the MDR1 gene in patients with hepatocellular carcinoma." Ann Hepatol **11**(6): 899-906.
- Balram, C., A. Sharma, et al. (2003). "Frequency of C3435T single nucleotide MDR1 genetic polymorphism in an Asian population: phenotypic-genotypic correlates." Br J Clin Pharmacol **56**(1): 78-83.
- Baranska, M., B. Dziankowska-Bartkowiak, et al. (2012). "Significance of genetic polymorphism of CYP2D6 in the pathogenesis of systemic sclerosis." Pharmacol Rep **64**(2): 336-342.
- Bernal, M. L., B. Sinues, et al. (2003). "Frequency distribution of C3435T mutation in exon 26 of the MDR1 gene in a Spanish population." Ther Drug Monit **25**(1): 107-111.
- Bessa, D., F. Pereira, et al. (2012). "Improved gap repair cloning in yeast: treatment of the gapped vector with Taq DNA polymerase avoids vector self-ligation." Yeast **29**(10): 419-423.
- Bijl, M. J., L. E. Visser, et al. (2008). "Influence of the CYP2D6*4 polymorphism on dose, switching and discontinuation of antidepressants." Br J Clin Pharmacol **65**(4): 558-564.
- Bosch, T. M., I. Meijerman, et al. (2006). "Genetic polymorphisms of drug-metabolising enzymes and drug transporters in the chemotherapeutic treatment of cancer." Clin Pharmacokinet **45**(3): 253-285.
- Bradford, D. (2005). "The Ethnopharmacology of Atypical Antipsychotics." Primary Psychiatry **10**: 6-12.
- Brinkmann, U. and M. Eichelbaum (2001). "Polymorphisms in the ABC drug transporter gene MDR1." Pharmacogenomics J **1**(1): 59-64.

Burger, H., J. A. Foekens, et al. (2003). "RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response." *Clin Cancer Res* **9**(2): 827-836.

Butler, J. M. (2005). Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers.

Byrne, L. J., K. J. O'Callaghan, et al. (2005). "Heterologous gene expression in yeast." *Methods Mol Biol* **308**: 51-64.

Cannon, R. D., E. Lamping, et al. (2009). "Efflux-mediated antifungal drug resistance." *Clin Microbiol Rev* **22**(2): 291-321, Table of Contents.

Casarett and Doull's (2001). Toxicology: the basis science of poisons

Cascorbi, I. (2006). "Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs." *Pharmacol Ther* **112**(2): 457-473.

Cavaco, I., J. P. Gil, et al. (2003). "CYP3A4 and MDR1 alleles in a Portuguese population." *Clin Chem Lab Med* **41**(10): 1345-1350.

Chakravarti, A. (2001). "To a future of genetic medicine." *Nature* **409**(6822): 822-823.

Chowbay, B., H. Li, et al. (2005). "Meta-analysis of the influence of MDR1 C3435T polymorphism on digoxin pharmacokinetics and MDR1 gene expression." *Br J Clin Pharmacol* **60**(2): 159-171.

Congreve, M., C. W. Murray, et al. (2005). "Structural biology and drug discovery." *Drug Discov Today* **10**(13): 895-907.

Correia, C., P. Santos, et al. (2009). "Characterization of pharmacogenetically relevant CYP2D6 and ABCB1 gene polymorphisms in a Portuguese population sample." *Cell Biochem Funct* **27**(4): 251-255.

Correia, C. T., J. P. Almeida, et al. (2010). "Pharmacogenetics of risperidone therapy in autism: association analysis of eight candidate genes with drug efficacy and adverse drug reactions." *Pharmacogenomics J* **10**(5): 418-430.

Daly, M. J. and L. J. Dixon (2010). "Takotsubo cardiomyopathy in two preoperative patients with pain." *Anesth Analg* **110**(3): 708-711.

De Iudicibus, S., A. De Pellegrin, et al. (2008). "ABCB1 gene polymorphisms and expression of P-glycoprotein and long-term prognosis in colorectal cancer." *Anticancer Res* **28**(6B): 3921-3928.

de la Chapelle, A. (2004). "Genetic predisposition to colorectal cancer." *Nat Rev Cancer* **4**(10): 769-780.

de Leon, J., M. T. Susce, et al. (2009). "DNA microarray technology in the clinical environment: the AmpliChip CYP450 test for CYP2D6 and CYP2C19 genotyping." *CNS Spectr* **14**(1): 19-34.

- de Morais, S. M., G. R. Wilkinson, et al. (1994). "The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans." *J Biol Chem* **269**(22): 15419-15422.
- Decottignies, A. (1998). Study of yeast ABC transporters Université catholique de Louvain.
- Decottignies, A., A. M. Grant, et al. (1998). "ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p." *J Biol Chem* **273**(20): 12612-12622.
- Denard, B., C. Lee, et al. (2012). "Doxorubicin blocks proliferation of cancer cells through proteolytic activation of CREB3L1." *Elife* **1**: e00090.
- Dominguez, A. (2003). Heterologous protein expression and secretion in non conventional yeasts, Research Singpost.
- Dorado, P., M. C. Caceres, et al. (2005). "Development of a PCR-based strategy for CYP2D6 genotyping including gene multiplication of worldwide potential use." *Biotechniques* **39**(4): 571-574.
- Drogemoller, B. I., G. E. Wright, et al. (2010). "Characterization of the genetic profile of CYP2C19 in two South African populations." *Pharmacogenomics* **11**(8): 1095-1103.
- Ekhart, C., S. Rodenhuis, et al. (2009). "An overview of the relations between polymorphisms in drug metabolising enzymes and drug transporters and survival after cancer drug treatment." *Cancer Treat Rev* **35**(1): 18-31.
- Fang, F., K. Salmon, et al. (2011). "A vector set for systematic metabolic engineering in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **28**(2): 123-136.
- Ferguson, R. J., S. M. De Morais, et al. (1998). "A new genetic defect in human CYP2C19: mutation of the initiation codon is responsible for poor metabolism of S-mephenytoin." *J Pharmacol Exp Ther* **284**(1): 356-361.
- Fernandez-Santander, A., M. del Saz Sanchez, et al. (2012). "CYP2D6*4 allele and breast cancer risk: is there any association?" *Clin Transl Oncol* **14**(2): 157-159.
- Ferraldeschi, R. and W. G. Newman (2010). "The Impact of CYP2D6 Genotyping on Tamoxifen Treatment." *Pharmaceuticals* **3**: 1122-1138.
- Ferreira, R. J. (2011). Vencendo a multi-resistência: Modelos computacionais da glicoproteína-P. Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa. **Mestrado**.
- Figler, R. A., H. Omote, et al. (2000). "Use of chemical chaperones in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to enhance heterologous membrane protein expression: high-yield expression and purification of human P-glycoprotein." *Arch Biochem Biophys* **376**(1): 34-46.
- Fung, K. L. and M. M. Gottesman (2009). "A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function." *Biochim Biophys Acta* **1794**(5): 860-871.
- Gajjar, K., P. L. Martin-Hirsch, et al. (2012). "CYP1B1 and hormone-induced cancer." *Cancer Lett* **324**(1): 13-30.

- Geisse, S., H. Gram, et al. (1996). "Eukaryotic expression systems: a comparison." Protein Expr Purif **8**(3): 271-282.
- Gewirtz, D. A. (1999). "A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin." Biochem Pharmacol **57**(7): 727-741.
- Gietz, R. D. and R. A. Woods (2002). "Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method." Methods Enzymol **350**: 87-96.
- Goffeau, A., B. G. Barrell, et al. (1996). "Life with 6000 genes." Science **274**(5287): 546, 563-547.
- Gonzalez, F. J. and K. R. Korzekwa (1995). "Cytochromes P450 expression systems." Annu Rev Pharmacol Toxicol **35**: 369-390.
- Goodman, L. S., A. Gilman, et al. (2008). Goodman & Gilman's manual of pharmacology and therapeutics. New York, McGraw-Hill Medical.
- Hasler, J. A., R. Estabrook, et al. (1999). "Human cytochromes P450." Molecular Aspects of Medicine **20**: 1-137.
- Hersberger, M., J. Marti-Jaun, et al. (2001). "Two single-tube tetra-primer assays to detect the CYP2C19*2 and *3 alleles of S-mephenytoin hydroxylase." Clin Chem **47**(4): 772-774.
- Higgings, C. F. and G. M.M. (1992). "Is the multidrug transporter a flippase?" Trends Biochem Sci **1**: 18-21.
- Huber, P. C., C. H. Maruiama, et al. (2010). "Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores." Quim. Nova **33**: 2148-2154.
- Ibeanu, G. C., J. Blaisdell, et al. (1999). "A novel transversion in the intron 5 donor splice junction of CYP2C19 and a sequence polymorphism in exon 3 contribute to the poor metabolizer phenotype for the anticonvulsant drug S-mephenytoin." J Pharmacol Exp Ther **290**(2): 635-640.
- Illmer, T., U. S. Schuler, et al. (2002). "MDR1 gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients." Cancer Res **62**(17): 4955-4962.
- Ingelman-Sundberg, M. (2005). "Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity." Pharmacogenomics J **5**(1): 6-13.
- Ingelman-Sundberg, M., A. K. Daly, et al. "The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database ". Retrieved 18.03.2013, from <http://www.cypalleles.ki.se/index.htm>.
- Ingelman-Sundberg, M., S. C. Sim, et al. (2007). "Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects." Pharmacol Ther **116**(3): 496-526.
- Inoue, H., H. Nojima, et al. (1990). "High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids." Gene **96**(1): 23-28.

- Ito, Y., H. Kondo, et al. (2008). "Analysis of CYP2D6 substrate interactions by computational methods." *J Mol Graph Model* **26**(6): 947-956.
- Jamroziak, K., W. Mlynarski, et al. (2004). "Functional C3435T polymorphism of MDR1 gene: an impact on genetic susceptibility and clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia." *Eur J Haematol* **72**(5): 314-321.
- Jeannesson, E., L. Albertini, et al. (2007). "Determination of ABCB1 polymorphisms and haplotypes frequencies in a French population." *Fundam Clin Pharmacol* **21**(4): 411-418.
- Jeong, H., I. Herskowitz, et al. (2007). "Function-altering SNPs in the human multidrug transporter gene ABCB1 identified using a *Saccharomyces*-based assay." *PLoS Genet* **3**(3): e39.
- Johansson, I. and M. Ingelman-Sundberg (2011). "Genetic polymorphism and toxicology--with emphasis on cytochrome p450." *Toxicol Sci* **120**(1): 1-13.
- Kalow, W. (1991). "Interethnic variation of drug metabolism." *Trends Pharmacol Sci* **12**(3): 102-107.
- Kim, D. H., J. Y. Park, et al. (2006). "Multidrug resistance-1 gene polymorphisms associated with treatment outcomes in de novo acute myeloid leukemia." *Int J Cancer* **118**(9): 2195-2201.
- Kim, D. W., S. K. Lee, et al. (2009). "Lack of association between ABCB1, ABCG2, and ABCC2 genetic polymorphisms and multidrug resistance in partial epilepsy." *Epilepsy Res* **84**(1): 86-90.
- Kim, R. B., B. F. Leake, et al. (2001). "Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans." *Clin Pharmacol Ther* **70**(2): 189-199.
- Klingenberg, M. (1958). "Pigments of rat liver microsomes." *Arch Biochem Biophys* **75**(2): 376-386.
- Kolaczowski, M., A. Kolaczowska, et al. (1998). "In vivo characterization of the drug resistance profile of the major ABC transporters and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network." *Microb Drug Resist* **4**(3): 143-158.
- Krivulcik, T., J. Sedlak, et al. (2009). "Frequency of the three most common polymorphisms in the MDR1 gene in Slovak population." *Neoplasma* **56**(2): 101-107.
- Kuchler, K. and J. Thorner (1992). "Functional expression of human *mdr1* in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(6): 2302-2306.
- Kudzi, W., A. N. Doodoo, et al. (2010). "Genetic polymorphisms in MDR1, CYP3A4 and CYP3A5 genes in a Ghanaian population: a plausible explanation for altered metabolism of ivermectin in humans?" *BMC Med Genet* **11**: 111.
- Lamping, E., B. C. Monk, et al. (2007). "Characterization of three classes of membrane proteins involved in fungal azole resistance by functional hyperexpression in *Saccharomyces cerevisiae*." *Eukaryot Cell* **6**(7): 1150-1165.
- Lee, I. S. and D. Kim (2011). "Polymorphic metabolism by functional alterations of human cytochrome P450 enzymes." *Arch Pharm Res* **34**(11): 1799-1816.

- Lee, S. J. (2012). "Clinical Application of CYP2C19 Pharmacogenetics Toward More Personalized Medicine." Front Genet **3**: 318.
- Lemos, M. C., F. Carrilho, et al. (2007). "Genetic polymorphism of CYP2D6 influences susceptibility to papillary thyroid cancer." Clinical Endocrinology **67**: 180-183.
- Lemos, M. C., F. Carrilho, et al. (2007). "Genetic polymorphism of CYP2D6 influences susceptibility to papillary thyroid cancer." Clin Endocrinol (Oxf) **67**(2): 180-183.
- Leppert, W. (2011). "CYP2D6 in the metabolism of opioids for mild to moderate pain." Pharmacology **87**(5-6): 274-285.
- Levo, A., A. Koski, et al. (2003). "Post-mortem SNP analysis of CYP2D6 gene reveals correlation between genotype and opioid drug (tramadol) metabolite ratios in blood." Forensic Sci Int **135**(1): 9-15.
- Li, J. and M. H. Bluth (2011). "Pharmacogenomics of drug metabolizing enzymes and transporters: implications for cancer therapy." Pharmgenomics Pers Med **4**: 11-33.
- Linn, S. C. and G. Giaccone (1995). "MDR1/P-glycoprotein expression in colorectal cancer." Eur J Cancer **31A**(7-8): 1291-1294.
- Lodish, H., A. Berk, et al. (2000). Mutations: Type and Causes. Molecular Cell Biology. W. H. Freeman.
- Ludwig, D. L. and C. V. Bruschi (1991). "The 2-micron plasmid as a nonselectable, stable, high copy number yeast vector." Plasmid **25**: 81-95.
- Lynch, T. and A. Price (2007). "The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects." Am Fam Physician **76**(3): 391-396.
- Mager, W. H. and J. Winderickx (2005). "Yeast as a model for medical and medicinal research." Pharmacological Sciences **26**: 265-273.
- Mao, Q. and G. A. Scarborough (1997). "Purification of functional human P-glycoprotein expressed in *Saccharomyces cerevisiae*." Biochim Biophys Acta **1327**(1): 107-118.
- Mellor, H. R. and R. Callaghan (2008). "Resistance to chemotherapy in cancer: a complex and integrated cellular response." Pharmacology **81**(4): 275-300.
- Minotti, G., P. Menna, et al. (2004). "Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity." Pharmacol Rev **56**(2): 185-229.
- Mumberg, D., R. Muller, et al. (1995). "Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds." Gene **156**(1): 119-122.
- Nagler, A., I. Bar, et al. (2007). "Pgp (MDR1)-dependent resistance of malignant cells towards natural killer (NK) cells is reversed by IL-2 and by the Pgp inhibitor KT-5720: implications on graft versus tumor (GVT) effects in adoptive immunotherapy." The Journal of Immunology **178**: B144-B158.

- Neafsey, P., G. Ginsberg, et al. (2009). "Genetic polymorphism in cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): Population distribution of CYP2D6 activity." J Toxicol Environ Health B Crit Rev **12**(5-6): 334-361.
- Nebert, D. W., M. Adesnik, et al. (1987). "The P450 gene superfamily: recommended nomenclature." DNA **6**(1): 1-11.
- Olson, G. M., D. S. Fox, et al. (2007). "Role of protein O-mannosyltransferase Pmt4 in the morphogenesis and virulence of *Cryptococcus neoformans*." Eukaryot Cell **6**(2): 222-234.
- Omura, T. and R. Sato (1962). "A new cytochrome in liver microsomes." J Biol Chem **237**: 1375-1376.
- Orr-Weaver, T. L., J. W. Szostak, et al. (1983). "Genetic applications of yeast transformation with linear and gapped plasmids." Methods Enzymol **101**: 228-245.
- Owen, A., C. Goldring, et al. (2005). "Relationship between the C3435T and G2677T(A) polymorphisms in the ABCB1 gene and P-glycoprotein expression in human liver." Br J Clin Pharmacol **59**(3): 365-370.
- Pasrija, R., D. Banerjee, et al. (2007). "Structure and function analysis of CaMdr1p, a major facilitator superfamily antifungal efflux transporter protein of *Candida albicans*: identification of amino acid residues critical for drug/H⁺ transport." Eukaryot Cell **6**(3): 443-453.
- Patel, A. G. and S. H. Kaufmann (2012). "How does doxorubicin work?" Elife **1**: e00387.
- Pauli-Magnus, C. and D. L. Kroetz (2004). "Functional implications of genetic polymorphisms in the multidrug resistance gene MDR1 (ABCB1)." Pharm Res **21**(6): 904-913.
- Paumi, C. M., M. Chuk, et al. (2008). "Negative regulation of the yeast ABC transporter Ycf1p by phosphorylation within its N-terminal extension." J Biol Chem **283**(40): 27079-27088.
- Pereira, C., I. Coutinho, et al. (2012). "New insights into cancer-related proteins provided by the yeast model." FEBS J **279**: 697-712.
- Pindurová, E., A. Zourková, et al. (2012). "Alternative Reliable Method for Cytochrome P450 2D6 Poor Metabolizers Genotyping." Mol Biotechnol.
- Pinto, C. G., A. T. Paquete, et al. (2010). "Colorectal cancer in Portugal." Eur J Health Econ **10 Suppl 1**: S65-73.
- Reyes-Ruiz, J. M. and H. A. Barrera-Saldana (2006). "Proteins in a DNA world: expression systems for their study." Rev Invest Clin **58**(1): 47-55.
- Robert, J., V. L. Morvan, et al. (2005). "Predicting drug response and toxicity based on gene polymorphisms." Crit Rev Oncol Hematol **54**(3): 171-196.
- Roberts, J. K., C. D. Moore, et al. (2013). "Metabolism of Beclomethasone Dipropionate by Cytochrome P450 3A Enzymes." J Pharmacol Exp Ther.

- Rodriguez-Antona, C. and M. Ingelman-Sundberg (2006). "Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer." *Oncogene* **25**(11): 1679-1691.
- Rogers, B., A. Decottignies, et al. (2001). "The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*." *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**(2): 207-214.
- Ruas, J. L. and M. C. Lechner (1997). "Allele frequency of CYP2C19 in a Portuguese population." *Pharmacogenetics* **7**(4): 333-335.
- Rudberg, I., B. Mohebi, et al. (2008). "Impact of the ultrarapid CYP2C19*17 allele on serum concentration of escitalopram in psychiatric patients." *Clin Pharmacol Ther* **83**(2): 322-327.
- Santos, P. C., R. A. Soares, et al. (2011). "CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms are differently distributed according to ethnicity in the Brazilian general population." *BMC Med Genet* **12**: 13.
- Sauer, B. (1987). "Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **7**(6): 2087-2096.
- Scheer, N., Y. Kapelyukh, et al. (2012). "Modeling human cytochrome P450 2D6 metabolism and drug-drug interaction by a novel panel of knockout and humanized mouse lines." *Mol Pharmacol* **81**(1): 63-72.
- SGDP (2007). Retrieved 21.04.2013, from http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/deletions3.html.
- Shukla, S., P. Saini, et al. (2003). "Functional characterization of *Candida albicans* ABC transporter Cdr1p." *Eukaryot Cell* **2**(6): 1361-1375.
- Sibbing, D., W. Koch, et al. (2010). "Cytochrome 2C19*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement." *Circulation* **121**(4): 512-518.
- Silva, D. K. and F. M. Andrade (2008). "Pharmacogenetics of selective serotonin reuptake inhibitors: a review." *Rev. de Psiquiatria Rio Gd Sul* **1**.
- Sim, S. C., C. Risinger, et al. (2006). "A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants." *Clin Pharmacol Ther* **79**(1): 103-113.
- Sims, J. T., S. S. Ganguly, et al. (2013). "Imatinib reverses doxorubicin resistance by affecting activation of STAT3-dependent NF-kappaB and HSP27/p38/AKT pathways and by inhibiting ABCB1." *PLoS One* **8**(1): e55509.
- Sistonen, J., S. Fuselli, et al. (2005). "CYP2D6 genotyping by a multiplex primer extension reaction." *Clin Chem* **51**(7): 1291-1295.
- Sobrino, B., M. Brion, et al. (2005). "SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies." *Forensic Sci Int* **154**(2-3): 181-194.
- Sripichai, O. and S. Fucharoen (2007). "Genetic polymorphisms and implications for human diseases." *J Med Assoc Thai* **90**(2): 394-398.

- Stein, U., W. Walther, et al. (1994). "Point mutations in the *mdr1* promoter of human osteosarcomas are associated with in vitro responsiveness to multidrug resistance relevant drugs." *Eur J Cancer* **30A**(10): 1541-1545.
- Sterjev, Z., G. K. Trencavska, et al. (2012). "The association of C3435T single-nucleotide polymorphism, Pgp-glycoprotein gene expression levels and carbamazepine maintenance dose in patients with epilepsy." *Neuropsychiatr Dis Treat* **8**: 191-196.
- Stratagene (2007). QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit.
- Tang, D. X., H. P. Zhao, et al. (2013). "QiShenYiQi Pills, a Compound Chinese Medicine, Ameliorates Doxorubicin-Induced Myocardial Structure Damage and Cardiac Dysfunction in Rats." *Evid Based Complement Alternat Med* **2013**: 480597.
- Teh, L. K. and L. Bertilsson (2012). "Pharmacogenomics of CYP2D6: molecular genetics, interethnic differences and clinical importance." *Drug Metab Pharmacokinet* **27**(1): 55-67.
- Terpe, K. (2006). "Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems." *Appl Microbiol Biotechnol* **72**(2): 211-222.
- Thomas, B. J. and R. Rothstein (1989). "Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA." *Cell* **56**(4): 619-630.
- Walker, G. M. (1999). *Yeast Physiology and Biotechnology*.
- Weinshilboum, R. M. and L. Wang (2006). "Pharmacogenetics and pharmacogenomics: development, science, and translation." *Annu Rev Genomics Hum Genet* **7**: 223-245.
- Yin, J., G. Li, et al. (2007). "Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes." *J Biotechnol* **127**: 335-347.
- Yoo, H. D. and Y. B. Lee (2011). "Interplay of pharmacogenetic variations in ABCB1 transporters and cytochrome P450 enzymes." *Arch Pharm Res* **34**(11): 1817-1828.
- Zackrisson, A. L., P. Holmgren, et al. (2004). "Fatal intoxication cases: cytochrome P450 2D6 and 2C19 genotype distributions." *Eur J Clin Pharmacol* **60**(8): 547-552.
- Zand, N., N. Tajik, et al. (2006). "Allele Frequency of CYP2C19 Gene Polymorphisms in a Healthy Iranian Population." *IRANIAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS* **4**: 124-128.
- Zhou, L. P., F. Yao, et al. (2013). "CYP3A4*1B polymorphism and cancer risk: a HuGE review and meta-analysis." *Tumour Biol* **34**(2): 649-660.
- Zhou, S. F., J. P. Liu, et al. (2009). "Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact." *Drug Metab Rev* **41**(2): 89-295.

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado participante, estamos a realizar um projecto de investigação denominado “Estudo populacional português de variações genéticas no transportador MDR1”. O transportador *multidrug resistance protein 1* (MDR1) e várias enzimas do Citocromo-P450, nomeadamente a CYP2D6, assumem um papel preponderante no transporte e metabolismo de xenobióticos, respectivamente. Torna-se pertinente um estudo que faça a genotipagem populacional portuguesa e que posteriormente correlacione esses polimorfismos e a biotransformação dos xenobióticos, como alicerces de objectivos de âmbito clínico e forense. O projecto prosseguirá no sentido de uma genotipagem válida da população portuguesa, sendo para tal necessário o estudo de um número significativo de amostras representativas. O nosso interesse em estudar o tema é contribuir para uma identificação das várias variantes relacionadas com a sensibilidade a xenobióticos contribuindo para tratamentos personalizados/interpretação de efeitos adversos.

Sendo assim, solicitamos a sua colaboração na pesquisa, ao nos disponibilizar 4 ml de sangue, informando-lhe que a pesquisa não lhe trará custos ou riscos e que manteremos o sigilo e anonimato das informações. Poderá se retirar da pesquisa a qualquer momento que desejar. Desde já, contamos com a sua colaboração e agradecemos a sua atenção.

Eu, _____ bilhete de identidade nº _____, declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projecto de investigação acima descrito.

Eu, _____ declaro que forneci todas as informações referentes ao projecto ao participante e/ou responsável.

Gandra, ___ de _____ de _____

Assinatura do voluntário

Assinatura do responsável por obter o consentimento

INFORMAÇÕES GERAIS

1. Dados sobre a pesquisa científica e investigador

Título do Projecto: *Estudo populacional português de variações genéticas no transportador MDR1*

Instituição: *Instituto Superior de Ciências da Saúde – Norte*

2. Dados de identificação do sujeito da pesquisa e/ou responsável legal

Nome do voluntário: _____

Idade: ___ anos

Morada: _____

nº _____ Código Postal: _____

Naturalidade: _____ Telemóvel: _____

Email: _____

3. Dados Clínicos do sujeito da pesquisa e/ou responsável legal

3 a) Toma algum tipo de medicação: SIM ___ NÃO ___

Se sim, Qual a medicação que toma? _____

3 b) Já alguma vez tomou antidepressivos: SIM ___ NÃO ___

Se sim, durante quanto tempo? _____

Qual o nome da medicação? _____

Teve algum efeito secundário (se sim identifique qual)? _____

Precisou de fazer ajuste da dose ou mudou de medicação? _____