

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

TAISE BRESOLIN

**Expressão dos genes Receptor Pregnano X (*PXR*),
Citocromo P4503A (*CYP3A*) e Resistência a
Multidrogas 1 (*MDR1*) em fígado de peixe-zebra
(*Danio rerio*)**

Florianópolis
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

TAISE BRESOLIN

**Expressão dos genes Receptor Pregnano X (*PXR*),
Citocromo P4503A (*CYP3A*) e Resistência a
Multidrogas 1 (*MDR1*) em fígado de peixe-zebra
(*Danio rerio*)**

Orientador: Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Florianópolis, fevereiro de 2005.

Bresolin, Taise

Expressão dos genes Receptor Pregnano X (*PXR*), Citocromo P4503A (*CYP3A*) e Resistência a Multidrogas 1 (*MDR1*) em fígado de peixe-zebra (*Danio rerio*): UFSC, 2005

54 p.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis

1. Receptor Pregnano X. 2. Citocromo P4503A. 3. Resistência a Multidrogas. 4. *Danio rerio*. 5. pregnenolona 16 α -carbonitrilo. 6. clotrimazol. 7. nifedipina.

“A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento.”

Platão - Filósofo grego

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em especial às instituições e pessoas que diretamente viabilizaram a realização desse trabalho:

Ao Dr. Afonso Celso Dias Bainy, pela orientação, incentivo, e pela confiança em mim depositada. Por ser um exemplo de perseverança, e por toda experiência e aprendizado que me proporcionou durante o tempo que trabalhamos juntos.

Ao IFS (*International Foundation for Science*) (#A/28455-2F) pelo apoio financeiro.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de mestrado.

Ao Laboratório de Expressão Gênica e Interação DNA-Proteína, coordenado pelo Dr. Hernán Terenzi, pelo empréstimo de equipamentos. Também as pessoas que nele trabalham ou trabalharam, Patrícia, Guilherme, Javier e Maurício, pela ajuda e preocupação dispensadas.

Ao Dr. Mauro de Freitas Rebelo (UFRJ) e D.Sc. Milton Ozório Moraes (FIOCRUZ) pela realização do sequenciamento dos fragmentos clonados.

Ao Dr. Edmundo Carlos Grisard, Ms. Cristiane e Rodrigo, do laboratório de Protozoologia (MIP-UFSC), pelas reações de sequenciamento durante a primeira fase do trabalho.

À Dra. Helena C. da Silva de Assis, Dr. Hernán Terenzi, Dr. Paulo S. M. de Carvalho e Dra. Maria Risoleta Freire Marques, pela participação na comissão examinadora do presente trabalho.

À professora Dra. Maria Risoleta Freire Marques pelo aprendizado, sugestões e “consultoria” durante o todo o tempo em que fiz parte da família LABICAI, e, claro, também pela amizade.

Ao Dr. Paulo S. M. de Carvalho pelo incentivo e ajuda com os peixes.

À Débora Eger pela ajuda na manutenção, injeção e dissecação dos peixes.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

À Joice e Lígia da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Também gostaria de agradecer as pessoas que indiretamente colaboraram:

Às colegas de mestrado e laboratório Karin e Juliana, amigas feitas e fortalecidas durante esse período, por entenderem minhas ansiedades tão bem.

Aos maravilhosos atuais e antigos colegas de laboratório pelo carinho, companheirismo e ajuda: Débora, Isabel, Dani, Igor, Jacó, Marília, Rafael, Guilherme, Jairo, Ângela, Eliana, Giuliana, Francisco e Daniel. Obrigada pela preocupação e pelos infinitos momentos divertidos que passamos juntos seja no Lab. ou fora dele, nas “happy hours”, nas festas de natal, páscoa, junina...!

Aos monitores Fábio e Hugo pela ajuda durante o Estágio de Docência.

À Carla e Sandra, meus anjos da guarda e minha família em Florianópolis. Pelos dias de sol, dias de chuva, pelos muitos dias felizes e também pelos não tão felizes que passamos juntas.

Às grandes amigas Fabíola e Márcia, pela presença nos meus momentos mais difíceis e também nos mais felizes. Pelas festas que fizemos juntas, pela amizade, pelo carinho e pela convivência.

Às amigas de infância Rafaela e Marta, amigas distantes, mas não menos importantes, por todos os anos de amizade.

Ao Rodrigo que acompanhou tão de perto quase todo esse processo, pelo incentivo e ajuda apesar da divergência de opiniões. Por dividir comigo meus momentos bons e ruins, por todo carinho, companheirismo, atenção e suporte, tornando principalmente os dias finais de elaboração desse trabalho bem mais fáceis.

À minha mãe e meu irmão, Rosa e Danglê, a quem devo tudo que sou e as oportunidades que tive. Por estarem sempre presentes e por serem meu porto mais que seguro!

OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	III
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	VII
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Caracterização do estudo	1
1.2 Receptores Nucleares	4
1.2.1 Receptor Pregnano X – PXR	6
1.3 Superfamília do Citocromo P450	10
1.3.1 Subfamília 3A do Citocromo P450 – CYP3A	12
1.4 Resistência a Múltiplas Drogas – MDR	13
1.5 Fármacos utilizados no estudo	15
1.6 Material Biológico	17
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Coleta dos animais	22
3.2 Tratamento do material biológico	22
3.3 Desenho dos iniciadores	22
3.4 Extração de RNA total	23
3.4.1 Análise do RNA	24
3.5 Síntese do cDNA	25
3.6 Padronização das condições de PCR	25
3.7 RT-PCR semi-quantitativa	25
3.7.1 Amplificação do cDNA dos genes <i>PXR</i> , <i>CYP3A</i> e <i>MDR1</i>	26
3.7.2 Análise dos fragmentos amplificados de cDNA	27
3.7.3 Análise dos resultados	27
3.8 Análise Estatística	28
3.9 Confirmação dos fragmentos obtidos para os genes <i>CYP3A</i> e <i>MDR1</i>	28
3.9.1 Purificação dos produtos obtidos por PCR	28
3.9.2 Clonagem	29
3.9.3 Extração de DNA plasmidial	30
3.9.4 Digestão do DNA plasmidial	30
3.10 Sequenciamento	31
4. RESULTADOS	32
4.1 Padronização das condições de PCR	32
4.2 RT-PCR semi-quantitativa	34
4.3 Confirmação do fragmento obtido para o gene <i>CYP3A</i> e <i>MDR1</i>	36
5. DISCUSSÃO	38

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
7. PERSPECTIVAS	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	Sequência de ligação ao ATP
ATP	Adenosina trifosfato
BXR	Receptor Benzoato X
CAR	Receptor Androstano Constitutivo
cDNA	DNA complementar
CTZ	Clotrimazol
CXR	Recepto X de frango
CYP	Citocromo P450
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Deoxinucleotídeos trifosfatado
DR3	Repetições Diretas separadas por 3 nucleotídeos
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> RI
EDTA	Ácido etilenediaminotetracético
ERH	Elemento Responsivo a Hormônio
EST	Seqüências Expressas Marcadas
GST	Glutathiona S-transferase
GTP	Guanosina trifosfato
IPTG	isopropil-B-D-tiogalactosídeo
Kb	Quilobase (1Kb = 1000 pb)

LB	Luria Bertami
LBD	Domínio de ligação ao ligante
MDR	Resistência a multidrogas
MOPS	Ácido 4-morfolinepropanesulfônico
mRNA	RNA mensageiro
MRP 2	Proteína relacionada a resistência a multidrogas 2
NaI	Iodeto de sódio
NIF	Nifedipina
OATP2	Proteína transportadora de ânions orgânicos 2
PAS	Domínio Per-ARNT-Sim
pb	Pares de bases de DNA
PCN	Pregnenolona 16 α -carbonitrilo
PCR	Reação em cadeia da polimerase
P-gp	Glicoproteína-P
PM	Padrão de peso Molecular
PXR	Receptor Pregnano X
RNA	Ácido ribonucléico
RT	Transcrição Reversa
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase – Transcriptase Reversa
RXR	Receptor Retinóide X
TBE	EDTA tamponado em Tris
UGT	UDP-glicuronosiltransferase

VDR	Receptor Vitamina D
X-Gal	5-bromo-4cloro-3-indoil-B-D-galactosídeo

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática de um receptor nuclear (Adaptado de ARANDA; PASCUAL, 2001). 5
- Figura 2:** Modelo da indução da expressão do gene do receptor nuclear PXR. PXR: Receptor Pregnano X; RXR: Receptor Retinóide X; ERH: Elemento Responsivo a Hormônio. (Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). 7
- Figura 3:** Estrutura do LBD do receptor de xenobióticos de humanos (WATKINS et al., 2001). 8
- Figura 4:** Modelo de ação suposto dos transportadores ABC de humanos. 15
- Figura 5:** Estrutura química dos fármacos: **A)** Clotrimazol; **B)** Pregnenolona 16 α -carbonitrilo; e **C)** Nifedipina. 16
- Figura 6:** Aspecto externo da espécie *Danio rerio*. 18
- Figura 7:** Gel de agarose 1% de produtos de PCR obtidos no teste Curva de expressão do número de ciclos para o gene do número de ciclos para o gene **A)** *CYP3A*; **B)** *PXR* **C)** *MDR1*; e **D)** β -*ACTINA*. As setas indicam o número de ciclos identificados como ideal. 33
- Figura 8:** Efeito dos compostos Nifedipina (NIF), Clotrimazol (CTZ) e Pregnenolona 16 α -carbonitrilo (PCN) na expressão dos genes *PXR*, *CYP3A* e *MDR1* em fígado de *Danio rerio*. Os peixes foram tratados com 20 mg.kg⁻¹ de cada um dos compostos em óleo de milho através de injeção intraperitoneal. **A)** Gel de agarose 1%, 1, grupo controle; 2, NIF; 3, CTZ e 4, PCN. **B)** RT-PCR semi-quantitativo a partir do RNA total (2 μ g) isolados do fígado após 48 horas de tratamento. O gráfico mostra a expressão do mRNA de *PXR*, *CYP3A* and *MDR1* calculado a partir da intensidade densitométrica de cada banda normalizada com o gene β -*ACTINA*. Os valores representam média \pm Desvio Padrão de 5 animais. * $P < 0,05$: diferença significativa em relação ao grupo controle. 35
- Figura 9:** Gel de agarose 1%. Digestão dos clones contendo os insertos referentes aos genes: **A)** *CYP3A* e **B)** *MDR1*. PM: Padrão de peso Molecular. 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de substratos das principais isoformas do Citocromo P450.	11
Tabela 2: Pares de iniciadores utilizados nas reações de amplificação do cDNA dos genes <i>PXR</i> , <i>CYP3A</i> , <i>MDR1</i> e β - <i>ACTINA</i> .	23
Tabela 3: Programas utilizados para a amplificação dos genes <i>PXR</i> , <i>CYP3A</i> e <i>MDR1</i> .	26
Tabela 4: Programa utilizado para a amplificação do controle interno <i>B-ACTINA</i> .	27

RESUMO

O receptor pregnano X (PXR) é um receptor nuclear envolvido na regulação transcricional de enzimas envolvidas no metabolismo de fármacos e também de proteínas transportadoras. Em mamíferos, vários xenobióticos induzem a expressão dos genes do citocromo P4503A (*CYP3A*) e de resistência a multidrogas 1 (*MDR1*) através da via de sinalização do receptor PXR. Pouca atenção tem sido dada aos estudos sobre a identificação da função biológica dos homólogos do PXR em espécies de não-mamíferos. O peixe-zebra tem se tornado amplamente utilizado e aceito como espécie modelo em estudos toxicológicos e farmacológicos no entendimento dos mecanismos de doenças humanas e na identificação de vias de sinalização conservadas. O objetivo desse estudo foi avaliar a expressão *in vivo* dos genes *PXR*, *CYP3A* e *MDR1* no fígado de peixes-zebra tratados com o esteróide sintético pregnenolona 16 α -carbonitrilo (PCN), o antimicótico sintético clotrimazol (CTZ) e o composto fármaco nifedipina (NIF). Peixes (n=15 por grupo) foram expostos à PCN, CTZ e NIF (20 mg.Kg⁻¹) por 48 horas. Os fígados foram retirados e utilizados para a extração do RNA total (n=5 por grupo). A partir do cDNA obtido foi realizada a reação de PCR, utilizando diferentes iniciadores para a amplificação de *PXR*, *CYP3A*, *MDR1* e β -*ACTINA*. Fígados de peixes tratados com PCN mostraram uma indução de 1,9 vezes na indução do *PXR* seguida de 1,8 vezes na indução do *CYP3A* e de 1,6 vezes na indução do *MDR1* nos níveis de mRNA. CTZ e NIF não afetaram estatisticamente a expressão dos genes *PXR*, *CYP3A* e *MDR1*. O padrão similar na expressão do mRNA dos genes *PXR*, *CYP3A* e *MDR1* encontrado em peixes tratados com diferentes indutores de PXR sugere que a associação intrínseca entre esses três genes é conservada no peixe-zebra.

Palavras-chave: Receptor Pregnano X; Citocromo P4503A; Resistência a Multidrogas; *Danio rerio*; pregnenolona 16 α -carbonitrilo; clotrimazol; nifedipina

ABSTRACT

The pregnane X receptor (PXR) is a nuclear receptor involved in the transcriptional regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters. In mammals, many xenobiotics induce the expression of cytochrome P4503A (*CYP3A*) and the multiple drug resistance 1 (*MDR1*) genes via the PXR pathway. Little attention has been given to studies about the identification and biological function of PXR homologues in non-mammalian species. Zebrafish is being widely used and accepted as model for toxicological and pharmacological studies to understand the mechanisms of human diseases and identify conserved signaling pathways. The aim of this study was to evaluate the *in vivo* expression of *PXR*, *CYP3A* and *MDR1* genes in liver of zebrafish treated with the synthetic steroid pregnenolone 16 α -carbonitrile (PCN), the antimycotic clotrimazole (CTZ) and the drug nifedipine (NIF). Group of fish (n=5 each group) were exposed to PCN, CTZ and NIF (20 mg.Kg⁻¹) for 48 hours. The livers were excised and the total RNA was extracted (n=15 each group). From the cDNA, specific primers were used for PCR to amplify sequences corresponding to *PXR*, *CYP3A*, *MDR1* and β -*ACTINA*. Liver of fish treated with PCN showed a 1.9-fold induction in the *PXR* followed by 1.8-fold induction in the *CYP3A* and 1.6-fold induction in the *MDR1* mRNA. CTZ and NIF did not affect statistically the expression of *PXR*, *CYP3A* and *MDR1*. The similar pattern of mRNA expression of *PXR*, *CYP3A* and *MDR1* genes found in fish treated with different PXR inducers suggests that the intrinsic association between these three genes is conserved in zebrafish.

Keywords: Pregnane X Receptor; Multidrug Resistance; Cytochrome P4503A; *Danio rerio*; pregnenolone 16 α -carbonitrile; clotrimazole; nifedipine

1. INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização do estudo

A confiança nos produtos naturais, principalmente de origem vegetal, predominou até que, na década de 1920, foram introduzidos pela primeira vez os produtos químicos sintéticos, e a moderna indústria farmacêutica começou a se desenvolver. Desde então, os fármacos têm sido um importante elemento da vida moderna, sendo que, nos últimos anos, a biotecnologia surgiu como fonte importante de novos agentes terapêuticos na forma de anticorpos, enzimas e várias proteínas reguladoras, incluindo hormônios, fatores de crescimento e citocinas (RANG; DALE; RITTER, 2001).

Os compostos farmacêuticos estão presentes na medicina humana e veterinária, na agricultura e na aqüicultura. São produzidos com o objetivo de causarem um efeito biológico específico, no entanto, eles freqüentemente apresentam o mesmo comportamento físico-químico dos xenobióticos (também denominados poluentes ou contaminantes ambientais), ou seja, são capazes de atravessar as membranas, além de serem relativamente persistentes já que não são inativados após exercerem seu efeito terapêutico (HALLING-SØRENSEN et al., 1998).

Quando administrado oralmente o agente farmacêutico primeiro entra em contato com transportadores no intestino, como o produto do gene de resistência a multidroga 1 (*MDR1*) (P-gp), o qual pode eficientemente transportar moléculas hidrofóbicas dos enterócitos de volta ao lúmen. Segundo, se a molécula reside nos enterócitos intestinais por tempo suficiente, pode ser metabolizada por um citocromo P450 (CYP), primariamente CYP3A4 em humanos, o qual é altamente expresso nestas células, além de outros CYPs que são sabidamente expressos ali. Os metabólitos enriquecerão o sangue e então o fígado, onde poderão ser conjugados ou metabolizados antes de serem ativamente transportados via P-gp ou outros transportadores

para a bile e eventualmente excretados. Este mecanismo torna-se exponencialmente mais complexo quando se imagina que cada uma das proteínas envolvidas nesse processo pode ser transcricionalmente regulada por um ou mais receptores nucleares. Assim, vários cenários potenciais podem emergir envolvendo ativação ou repressão gênica (EKINS; MIRNY; SCHUETZ, 2002).

A relação entre a exposição de um organismo a um composto tóxico e seu subsequente efeito biológico, é um importante aspecto da toxicologia, pois o uso efetivo de marcadores moleculares, ou seja, indicadores de exposição ou efeito dos contaminantes a nível molecular, pode ser importante para o desenvolvimento de novas ferramentas na toxicologia.

Enquanto dados utilizando o animal inteiro são úteis, o entendimento do mecanismo celular pelo qual os agentes químicos agem é de extrema importância na visualização do risco de exposição a esses compostos. Ao nível molecular, um dos pontos mais comuns e principais do estudo são as alterações da expressão gênica (TODD et al., 1995).

A quantificação dos níveis de RNA mensageiro como um marcador é possível através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase – Transcriptase Reversa (RT-PCR) quantitativa ou semi-quantitativa, a qual permite medir eventos bioquímicos recentes, fornecendo informações mecanísticas sobre o efeito de determinados agentes químicos. Em particular esses métodos são sensíveis para compostos químicos que afetam a transcrição gênica via interação com uma proteína intracelular específica ou receptor (SEWALL et al., 1995).

Segundo Van den Heuvel e Davis (1999) a análise dos níveis de mRNA de um gene que é controlado a nível transcricional por um receptor de xenobiótico torna mais fácil a interpretação dos mecanismos envolvidos. Assim, se a seqüência de eventos iniciadas por um químico que resulta na resposta tóxica for melhor entendida, seremos capazes de prever as conseqüências mais precisamente e estabelecer efetivas remediações clínicas. Atualmente,

alguns químicos são conhecidos por afetar a transcrição de diferentes genes através da interação com proteínas intracelulares específicas ou receptores.

Alguns compostos químicos podem induzir os mecanismos de defesa celular, atuando como ligantes, ou moléculas efetoras, que se ligam a proteínas reguladoras. De forma geral, quatro tipos de proteínas reguladoras estão comumente envolvidas como alvos primários: enzimas, moléculas transportadoras, canais de íons e receptores (RANG; DALE; RITTER, 2001). Os receptores englobam proteínas ativadoras que induzem a transcrição ao se ligarem em seqüências específicas do DNA na região regulatória do gene alvo. Este processo também pode ter efeito repressor quando proteínas repressoras que previnem a transcrição ligam-se ao sítio consenso nos genes alvo (BOLHUIS et al., 1997). Assim, o mesmo composto pode induzir simultaneamente a expressão de genes de resistência a drogas (MDR), de metabolização de drogas (CYP), da enzima glutationa S-transferase, de proteínas de choque térmico, da metalotioneína, dentre outras, que pertencem ao sistema geral de defesa, funcionando na proteção das células em ambientes adversos (BUCHELI; FENT, 1995).

Estudos *in vitro* auxiliam na identificação inicial dos possíveis químicos que ativam os sistemas de defesa, já que são técnicas rápidas, quantitativas e facilmente reproduzíveis. Fornecem estimativas precisas na avaliação do potencial de um grande número de químicos, resultados que podem ser obtidos em um curto período de tempo. São técnicas importantes em estudos referentes ao mecanismo de ação, assim como, no sinergismo de compostos químicos. No entanto, análises *in vivo* auxiliam no desenvolvimento de fármacos seguros, pois permitem avaliar a resposta multigênica de um organismo quando exposto a determinada substância química, pode-se ter uma idéia da magnitude dos efeitos tóxicos e do risco de exposição a curto, médio e longo prazo, ou seja, fornecem informações referentes à farmacocinética, biotransformação e ligação a proteínas carreadoras, ao contrário dos resultados obtidos através de estudos *in vitro*.

1.2 Receptores Nucleares

Os receptores nucleares, incluindo os receptores para esteróides e hormônios da tireóide, vitamina D, e muitos receptores “órfãos”, são membros de uma grande família de fatores de transcrição, da qual também fazem parte os receptores da família Per-ARNT-Sim (receptores PAS) e os receptores para neurotransmissores. A atividade de muitos dos receptores nucleares é controlada pela ligação de pequenas moléculas lipofílicas como hormônios e diferentes metabólitos (ácidos graxos, ácidos billiares, oxisteróis, xeno e endobióticos) (MAGLICH et al., 2001).

Os receptores nucleares apresentam uma estrutura modular caracterizada pelo domínio de transativação AF-1 na região N-terminal, cuja ativação é independente de ligação; um domínio altamente conservado de ligação ao DNA composto por dois dedos de zinco (*zinc fingers*) que reconhecem seqüências específicas de DNA – *DNA Binding Domain* (DBD); e um domínio de dimerização que contém o domínio de transativação AF-2 na porção C terminal, o qual é ligante dependente *Ligand Binding Domain* – LBD (ARANDA; PASCUAL, 2001) (Figura 1). Embora uma parcela dos receptores nucleares seja ativa sob a forma de monômeros, a maioria deles é ativo na forma de dímeros (homodímeros ou heterodímeros) principalmente com o receptor nuclear denominado receptor retinóide X (RXR) (FRANCIS et al., 2003).

Em geral, os receptores nucleares têm sua função complementada através do recrutamento de fatores celulares definidos como co-reguladores. Estes fatores podem ser divididos em co-ativadores, os quais ativam a transcrição gênica quando recrutados, e co-repressores, que agem atenuando ou inibindo a transcrição (McKENNA; O'MALLEY, 2002). Geralmente, quando não ativos, os receptores nucleares formam complexos físicos com os co-repressores. A ativação do receptor quer seja por ligação e/ou por fosforilação induz a uma mudança conformacional que leva a dissociação do co-repressor e ao posterior recrutamento

de coativadores o que permite a ligação do complexo à seqüência alvo no DNA. A especificidade na formação do complexo receptor/co-regulador é responsável pela sensibilidade da resposta biológica desencadeada pela interação ligante-receptor o que aumenta a variabilidade de respostas gênicas a diferentes ligantes (FRANCIS et al., 2003).

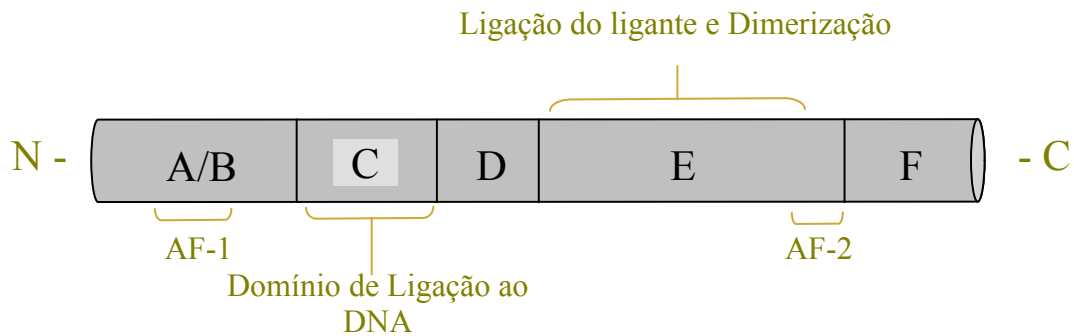


Figura 1: Representação esquemática de um receptor nuclear (Adaptado de ARANDA; PASCUAL, 2001).

Muitos receptores nucleares agem como sensores metabólicos, interferindo no controle do metabolismo, e sensores toxicológicos, atuando na defesa contra compostos tóxicos. Isso permite ao organismo se adaptar rapidamente frente às variações ambientais. Em geral, os ligantes destes receptores são produtos originários da dieta, intermediários de vias metabólicas e fármacos. A concentração de ligantes necessária para promover uma resposta destes receptores é da ordem de micromolar (μM), diferentemente daquela necessária para desencadear respostas nos receptores endócrinos clássicos (nM) (FRANCIS et al., 2003). Distúrbios na sinalização destes receptores, causada por alterações ambientais, podem alterar o controle metabólico e contribuir para o desenvolvimento de doenças comuns, como a obesidade, a resistência à insulina, diabetes tipo 2, hiperlipidemia e arteroesclerose. Os receptores também podem interferir parcialmente na incidência de algumas doenças, que não são explicadas apenas por fatores genéticos. O fato dos receptores estarem desregulados em várias doenças comuns, e por serem ativados em resposta a pequenas moléculas, faz deles excelentes alvos metabólicos para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e preventivas para o tratamento destes distúrbios (FRANCIS et al., 2003).

A caracterização de genes homólogos de animais diferentes dos seres humanos é uma etapa inicial e imprescindível para o desenvolvimento de estudos comparativos das propriedades biológicas destas proteínas nestes animais, assim como em humanos. Além disso, tais informações podem servir para elucidar aspectos sobre a evolução desta família de proteínas, a auxiliarem na identificação de novos modelos potenciais na geração de dados funcionais sobre os receptores nucleares.

1.2.1 Receptor Pregnano X – PXR

PXR, também denominado receptor de esteróide e xenobiótico (SXR), faz parte da sub-família dos receptores nucleares NR1I2 (NRNC, 1999), da qual também fazem parte o Receptor Vitamina D (VDR), o Receptor Androstano Constitutivo (CAR) e o Receptor Benzoato X (BXR). Foi primeiramente denominado por Kliewer e colaboradores (1998), que levaram em consideração a eficiente ativação deste receptor por esteróides C₂₁ naturais ou pregnanos.

Como demonstrado na Figura 2, o receptor PXR em sua configuração ativa forma um heterodímero com RXR (NR2B1) sendo então translocado para o núcleo onde se liga ao DNA em regiões responsivas, como por exemplo, a região formada por duas regiões consensos organizadas como repetições diretas separadas por 3 nucleotídeos (DR3) (KLIEWER, et al., 1998).

Através de estudos de raios-X, Watkins et al. (2001) mostraram que o receptor PXR em humanos possui uma cavidade de ligação grande e esférica que pode acomodar uma ampla variedade de ligantes lipofílicos. A expansão desta cavidade é causada primariamente por uma inserção de 50-60 aminoácidos entre as hélices 1 e 3 na seqüência do receptor. Esta inserção é responsável pela conformação contendo 2 folhas β que efetivamente afastam a hélice 6, uma

das α -hélices que normalmente alinha a cavidade de ligação, levando a sua expansão (Figura 3).

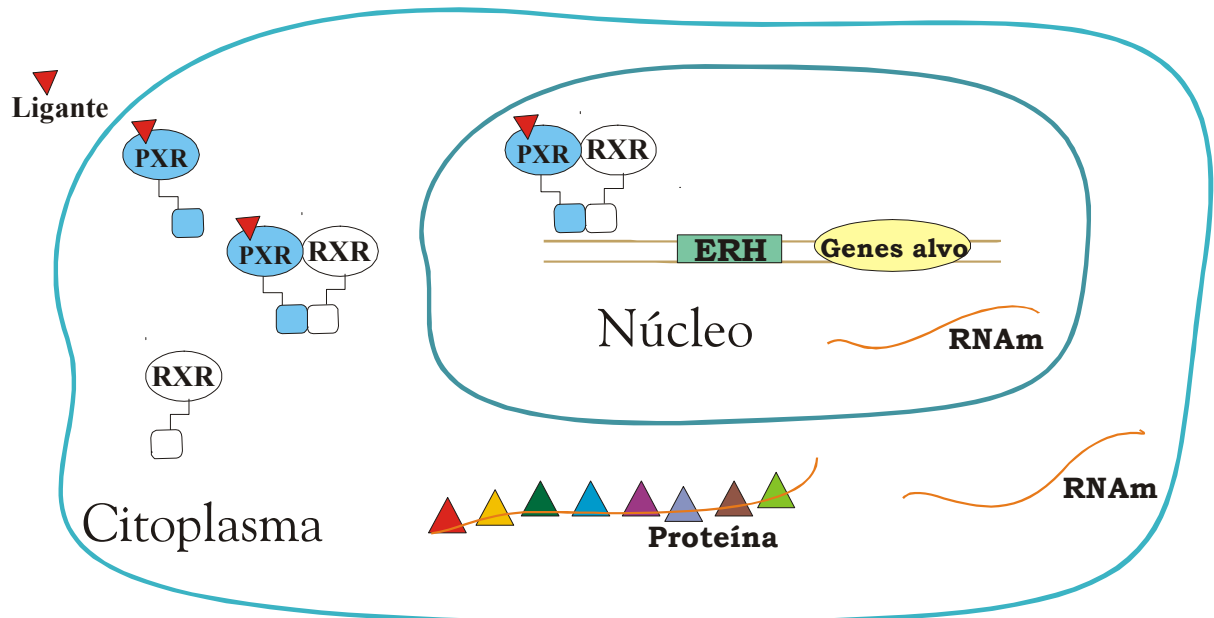


Figura 2: Modelo da indução da expressão do gene do receptor nuclear PXR. PXR: Receptor Pregnano X; RXR: Receptor Retinóide X; ERH: Elemento Responsivo a Hormônio. (Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

As características estruturais, incluindo as acima descritas, tornam o PXR um receptor promíscuo que pode ser ativado por uma ampla variedade de compostos endógenos e exógenos naturais e/ou sintéticos (MOORE; KLIEWER, 2000), que podem apresentar efeitos tóxicos quando acumulados em altos níveis, como é o caso dos hormônios, ácidos biliares, carcinógenos, fármacos, assim como certas moléculas da dieta e poluentes ambientais.

Diversos trabalhos têm demonstrado a indução do receptor PXR por compostos como o antibiótico Rifampicina e o antimicótico Clotrimazol (LEHMANN et al., 1998); o derivado sintético do esteróide Pregnenolona 16 α -carbonitrilo (KLIEWER et al., 1998); o antidepressivo hiperforina (MOORE et al., 2000a), entre outros.

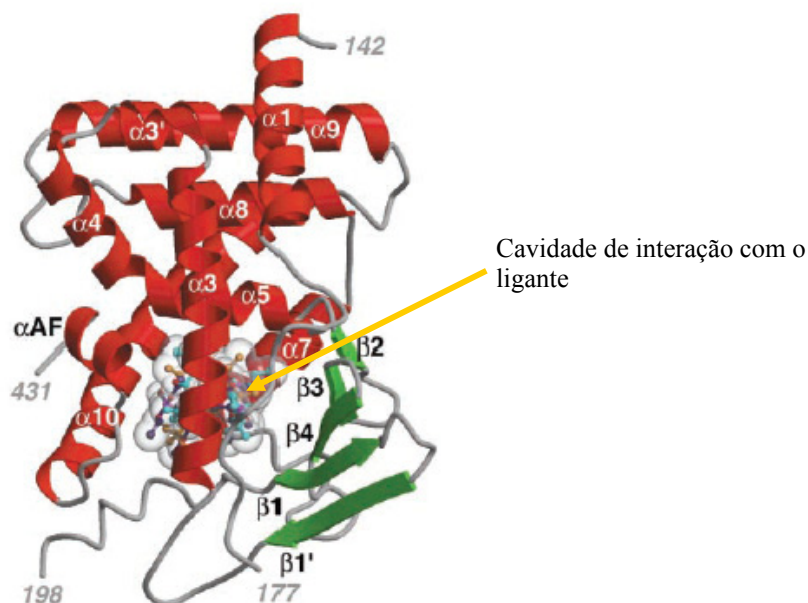


Figura 3: Estrutura do LBD do receptor de xenobióticos de humanos (WATKINS et al., 2001).

O envolvimento do PXR na proteção contra compostos potencialmente tóxicos se deve ao fato dele regular coordenadamente um conjunto de genes envolvidos no metabolismo, transporte e eliminação dessas moléculas do organismo, como isoformas das enzimas do bcitocromo P450 (*CYP2B*, *CYP2C8/9*, *CYP3A* e *CYP7A1*) (KLIEWER et al., 1998; STAUDINGER et al., 2001; SYNOLD; DUSSALT; FORMAN, 2001; XIE et al., 2000), da proteína de resistência a multidrogas 1 (*MDR1*) (GEIK; EICHELBAUM; BURK, 2001; SYNOLD; DUSSALT; FORMAN, 2001), da proteína transportadora de ânions orgânicos 2 (*OATP2*) (STAUDINGER et al., 2001), e da proteína relacionada a resistência a multidrogas 2 (*MRP 2*) (DUSSAULT et al., 2001), além de outros genes (MAGLICH et al., 2002).

O PXR também atua no controle da transcrição de genes que codificam a enzima glutationa S-transferase (*GST*) (FALKNER, 2001); UDP-glicuronosiltransferase (*UGT*) (HUANG et al., 2003; SUGATANI, et al., 2001) e sulfotransferases (SONODA, et al., 2002).

Constitutivamente, o receptor PXR também é responsável pelo controle da detoxificação dos ácidos biliares, pois exerce uma função hepatoprotetora contra o acúmulo destes compostos agindo diretamente na inibição da expressão da enzima *CYP7A1*,

responsável pela catálise da transformação de colesterol em ácidos biliares, e por induzir o transportador OATP2, o qual facilita a absorção dos ácidos biliares secundários tóxicos, como ácido litocólico, pelo fígado. A presença do ácido litocólico no fígado ativa o PXR que induz a expressão das enzimas CYP3A e CYP2B, favorecendo o catabolismo do próprio ácido litocólico e de outros compostos tóxicos (XIE et al., 2001).

O receptor PXR até o momento é melhor conhecido em mamíferos, tendo sido clonado e caracterizado em humanos (LEHMANN et al., 1998), camundongo (KLIOWER et al., 1998), coelho (JONES et al., 2000; SAVAS et al., 2000) e rato (JONES et al., 2000). Em peixes o receptor PXR foi parcialmente caracterizado na espécie de *Fugu - Fugu rubripes* (MAGLICH et al., 2003) e completamente sequenciado na espécie de *Zebrafish - Danio rerio* (BAINY; STEGEMAN, 2004). Outros receptores relacionados ao PXR de mamíferos foram identificados em galos e denominados CXR – *Chicken X Receptor* (HANDSCHIN; PODVINEC; MEYER, 2000), e em *Xenopus laevis*, denominados BXR - *Benzoate X Receptor*: BXR α (BLUMBERG et al., 1998) e BXR β (NISHIKAWA et al., 2000).

Em mamíferos foi demonstrado que este receptor é altamente expresso no fígado e moderadamente expresso no intestino, tecidos que são importantes sítios para o metabolismo de químicos endógenos e exógenos (SAVAS et al., 2000). Em *F. rubripes* foi observado que o receptor PXR é expresso no cérebro, brânquias, estômago, coração, fígado e ovário (MAGLICH et al., 2003). Em *D. rerio* o PXR é expresso no intestino, coração, fígado, ovário, baço, rim, brânquia e em pequena quantidade nos testículos (BAINY; STEGEMAN, 2004).

Diversos trabalhos têm demonstrado a existência de efeitos espécie-específicos na expressão do gene do receptor PXR. Jones et al. (2000) observaram que altas concentrações de retinóides sintéticos ativam o heterodímero PXR/RXR, através de ligação direta em humanos e coelhos, mas não em ratos e camundongos. Segundo os autores, essa divergência pode representar tanto uma resposta adaptativa a mudanças na presença de xenobióticos ambientais ou diferenças dos ligantes naturais entre as espécies. Do mesmo modo, Lehmann

et al. (1998) mostraram diferenças marcantes na ativação por certos fármacos entre o PXR de humanos e de camundongo. Assim, os efeitos espécie-específicos podem limitar o uso de tecidos e células animais para propósitos de teste.

O PXR tem divergido significativamente durante o curso da evolução, e seqüências diferentes no domínio LBD, e não no DBD, parecem servir como as bases moleculares para as diferenças nas espécies na indução do CYP3A observadas *in vivo* (LECLUYSE, 2001).

1.3 Superfamília do Citocromo P450

Os citocromos P450 (CYP) são uma superfamília de enzimas heme-tiolato que desempenham um papel central no metabolismo oxidativo, peroxidativo e redutivo de uma ampla variedade de compostos endógenos, incluindo ácidos graxos, esteróides, leucotrienos, prostaglandinas, ácidos biliares e vitaminas lipossolúveis (Tabela 1). Além disso, muitas dessas enzimas, expressas em níveis elevados no retículo endoplasmático dos hepatócitos, são responsáveis pela detoxificação de compostos exógenos, como diversos fármacos, carcinógenos e contaminantes ambientais (NELSON et al., 1996).

A superfamília dos citocromos P450 tem existido por 1,5 bilhão de anos. É composta por várias subfamílias, que são classificadas de acordo com a composição e seqüência dos aminoácidos que as compõem, sendo amplamente distribuída entre os programas procariotos e eucariotos (GONZALEZ, 1992). Até 2003, haviam sido identificadas 57 CYPs no genoma humanos (GUENGERICH, 2003).

Dentre as diversas famílias de genes do citocromo P450 (enzimas oxidativas da fase I da biotransformação), quatro delas (famílias 1 - 4) codificam enzimas que metabolizam compostos exógenos (fármacos, químicos ambientais e outros xenobióticos) e substratos endógenos lipofílicos em derivados mais polares que podem ser mais facilmente excretados

do organismo. Em alguns casos os metabólitos produzidos nesse processo podem ser potencialmente carcinogênicos, mutagênicos ou tóxicos (NEBERT; GONZALEZ, 1987).

Tabela 1: Exemplos de substratos das principais isoformas do Citocromo P450.

Genes CYP	Substratos CYP (também podem servir como ligantes para os Receptores Nucleares)
<i>CYP1A</i>	Estrógenos, Retinóides
<i>CYP1B</i>	Estrógenos
<i>CYP2A</i>	Andrógenos
<i>CYP2B</i>	Xenobióticos, Metoxiclor, Andrógenos, Estrógenos e Retinóides
<i>CYP2C</i>	Xenobióticos, Anti-inflamatórios não esteróides, Metoxiclor, Andrógenos, Retinóides e derivados de ácidos graxos
<i>CYP2D</i>	Xenobióticos, Andrógenos, Estrogênios e Vitamina D3
<i>CYP3A</i>	Xenobióticos, Metoxiclor, Andrógenos, Corticóides, Estrógenos e Pregnanos
<i>CYP4A</i>	Derivados de ácidos graxos
<i>CYP26</i>	Ácido Retinóico
<i>CYP27B1</i>	Vitamina D
<i>CYP24</i>	Vitamina D
<i>CYPs esterogênicos</i>	Andrógenos, Corticóides, Estrógenos e Pregnanos
<i>CYP7A</i>	Precusores para esteróides
<i>CYPs formadores de ácidos biliares</i>	Oxisteróis
<i>CYP51</i>	Esteróides

(HONKAKOSKI; NEGISHI, 2000)

Entre as enzimas, as isoformas CYP3A e CYP2B são as enzimas de maior relevância medicinal, pois participam do metabolismo de cerca de 60 e 20% dos fármacos utilizados clinicamente, respectivamente. Elas também contribuem para o metabolismo de uma variedade de esteróides endógenos, metabólitos de plantas, ácidos biliares, e outros metabólitos lipídicos (GONZALEZ, 1992). Como as enzimas CYP podem reconhecer um largo espectro de substratos farmacêuticos, um composto que induza um gene CYP é potencialmente capaz de afetar o metabolismo de qualquer outro fármaco co-administrado.

Além de estarem envolvidas no metabolismo de compostos exógenos, as enzimas do citocromo P450 também desempenham um importante papel na biosíntese do colesterol, no metabolismo da vitamina D, dos ácidos biliares e dos esteróides.

Esses genes do complexo P450 são regulados por uma variedade de vias e em muitos níveis: exibem expressão tecido-específica, são regulados por hormônios e citocinas, e respondem a químicos exógenos estruturalmente diversos, os quais freqüentemente aumentam os níveis de proteínas P450 por estimularem o início da transcrição desses genes. Como revisado por Waxman (1999), a maioria dos genes que fazem parte das diferentes famílias do CYPs podem ser transcricionalmente ativados por compostos exógenos que induzem a expressão gênica do P450 através de mecanismos receptor-dependentes (XIE; EVANS, 2002).

Esse mecanismo de resposta tem impacto principalmente no metabolismo de fármacos P450-dependentes, interações fármaco-fármaco, na toxicidade e carcinogenicidade de compostos exógenos, e na atividade e disposição dos hormônios endógenos (CONNERY, 1982).

1.3.1 Subfamília 3A do Citocromo P450 - CYP3A

Os genes do CYP3A foram originalmente caracterizados por sua indução não clássica por glicocorticóides (SCHUETZ et al., 1984). Desde então, uma ampla variedade de fármacos, contaminantes ambientais e esteróides já foram identificados como indutores dessa isoforma. A indução do CYP3A *in vivo* pode ser explicada por sua especificidade de ligação correspondente para o receptor PXR (GOODWIN; REDINBO; KLIEWER, 2002; WAXMAN, 1999).

Os genes do CYP3A são caracterizados por sua expressão no fígado e intestino, onde promovem a catálise dos hormônios esteróides e a 6 β -hidroxilação e oxidação do ácido biliar,

inibição seletiva pelo mecanismo inativador baseado na troleandomicina, e indução por uma ampla variedade de esteróides e antibióticos (WAXMAN, 1999). Por isso, constitui-se no principal grupo de enzimas envolvidas no metabolismo de drogas.

A isoforma CYP3A4 catalisa o metabolismo de mais de 60% de todos os fármacos em uso, sendo os glicocorticóides, antibióticos, antimicóticos e derivados sintéticos dos esteróides, os indutores mais eficazes, e comumente administrados em humanos (LEHMANN et al., 1998).

Os efeitos de diversos compostos na expressão do gene *CYP3A4* tem sido alvo de estudos tanto no campo da farmacologia quanto da toxicologia, com o objetivo de estabelecer as bases para as interações entre diferentes fármacos administrados simultaneamente, assim como minimizar a potencial interação entre fármacos quando novos deles são desenvolvidos.

A regulação das enzimas do Citocromo P450 pelo receptor PXR implica em potenciais interações fármaco-fármaco, já que as enzimas CYP3A e CYP2B podem reconhecer uma variedade de substratos, o que pode resultar na inativação de outros fármacos que eventualmente sejam co-administradas. Coumoul, Diry e Barouki (2002) mostraram que os pesticidas α -endossulfano, clordano e dieldrin ativam o PXR e a transcrição do CYP3A4 em culturas de hepatócitos humanos de uma forma dose dependente, o que pode levar a uma alteração do metabolismo de um amplo número de compostos endógenos, bem como de xenobióticos. Esse aumento da expressão do CYP3A4 desencadeada pela presença de pesticidas pode desencadear interações cruzadas com outros fármacos como, por exemplo, contraceptivos orais.

1.4 Resistência a Múltiplas Drogas – MDR

O fenômeno de resistência a multidrogas foi primeiramente descrito em uma linhagem de células tumorais humanas, as quais bombeavam ativamente daunomicina para fora da

célula, enquanto em uma linhagem parental sensível, este bombeamento para fora da célula não acontecia (DANO, 1973). Juliano e Ling (1976) demonstraram que nessas células o acúmulo reduzido de drogas era resultado da expressão de uma glicoproteína de membrana de 170kDa, chamada glicoproteína-P, P₁₇₀ ou P-gp.

A glicoproteína P faz parte de uma superfamília de transportadores denominada como proteínas *ATP-binding cassette* (ABC) ou *Traffic-ATPases*. Ela consiste de uma proteína transmembrana sendo expressa como uma única cadeia polipeptídica contendo duas porções homólogas de igual tamanho, formada por 1280 aminoácidos. Caracterizada por um domínio citoplasmático de ligação ao ATP, sendo esta região de maior homologia evolutiva, conhecida como domínio ABC (BELLAMY, 1996) e dois domínios de ligação às drogas (BARD, 2000).

A glicoproteína-P é uma proteína integral de membrana resultante da expressão de um único gene em humanos - *MDR1* ou *ABCB1*, cuja ação de bombeamento dos substratos para fora da célula é dependente de uma fonte constante de energia (ATP, um sistema de regeneração de ATP, ou GTP) e ocorre contra um aparente gradiente de concentração (GOTTESMAN; PASTAN, 1993). Esse efluxo de drogas para fora da célula às custas de energia, provoca a redução no acúmulo de drogas na célula e aumenta sua resistência a estes compostos (SMITAL; KURELEC, 1998) (Figura 4).

Em camundongos foram identificados dois transportadores tipo-ABCB1, identificados como produtos dos genes *MDR1a* (*MDR3*) e *MDR1b* (*MDR1*), os quais parecem desempenhar o papel de uma única P-gp, a P-gp MDR1 (ABCB1) em humanos.

A expressão da proteína codificada pelo gene *MDR1* em tecidos não tumorais e a sua ampla distribuição nos tecidos dos mamíferos sugere que esse mecanismo desempenhe um importante papel na proteção contra produtos derivados da dieta do organismo, além da proteção contra xenobióticos ambientais (GOTTESMAN; PASTAN, 1993). A P-gp também desempenha um importante papel no controle osmótico, no transporte de esteróis, fosfolípidios, xenobióticos e metabólitos endógenos. Na mucosa intestinal previne contra a

entrada de toxinas, na barreira hemato-encefálica, placenta, testículos e medula óssea, atua na proteção de partes vitais, enquanto no intestino, fígado e rins a P-gp ajuda na eliminação de toxinas do organismo.

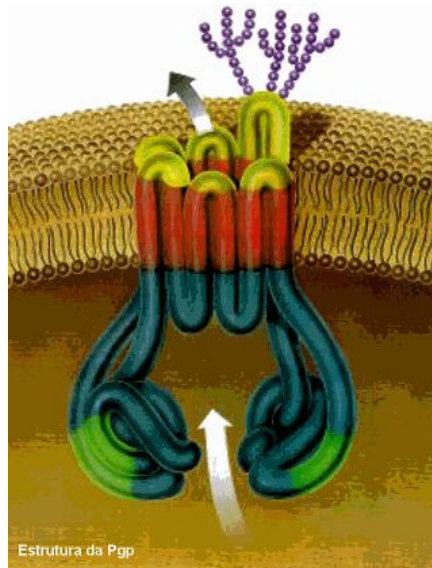


Figura 4: Modelo de ação suposto dos transportadores ABC de humanos.

Os genes *MDR* estão distribuídos filogeneticamente desde microrganismos, leveduras, plantas até mamíferos, ocorrendo possivelmente em todos os organismos (BARD, 2000).

Alguns agentes químicos podem alterar a disposição de determinados fármacos quer seja por diminuírem sua eliminação através da P-gp, ou por interferirem no seu metabolismo via complexo P-450.

1.5 Fármacos utilizados no estudo

O Clotrimazol é um agente antifúngico azol utilizado em clínica para aplicação tópica, já que é bastante tóxico para ser usado sistemicamente (Figura 5A). A ação inicia rapidamente e extensivamente após a adição do medicamento. Sua ação ocorre através da inibição da

síntese lipídica do fungo (especialmente do ergosterol) na membrana plasmática, alterando sua permeabilidade e por isso interferindo no transporte de aminoácidos para o interior do microrganismo. Interfere nas enzimas oxidativas do fungo (primariamente a 14 α -demetilase microsomal P-450 dependente) resultando no acúmulo de 14 α -metil esteróis, os quais podem interromper o empacotamento das cadeias acil dos fosfolipídios, inibindo o crescimento e interferindo com os sistemas de ligação das enzimas na membrana (RANG; DALE; RITTER, 2001).

O Pregnenolona 16 α -carbonitrilo ou PCN é um anti-glicocorticóide sintético, derivado do hormônio Pregnenolona 16 α -carbonitrilo, é conhecido por ser um “composto catatóxico”, ou seja, que induz a proliferação do retículo endoplasmático hepático e a expressão dos genes do citocromo P450 (BURGER et al., 1992) (Figura 5B). PCN foi identificado como sendo o esteróide catatóxico mais potente na ativação do CYP3A (SEYLE, 1971).

Já o fármaco Nifedipina, atua na inibição do influxo de cálcio na célula muscular lisa, por atuar bloqueando competitivamente a entrada do Ca^+ através dos canais lentos voltagem dependente, por isso são classificados por possuírem ação anti-angina e por sua ação vasodilatadora (RANG; DALE; RITTER, 2001) (Figura 5C).

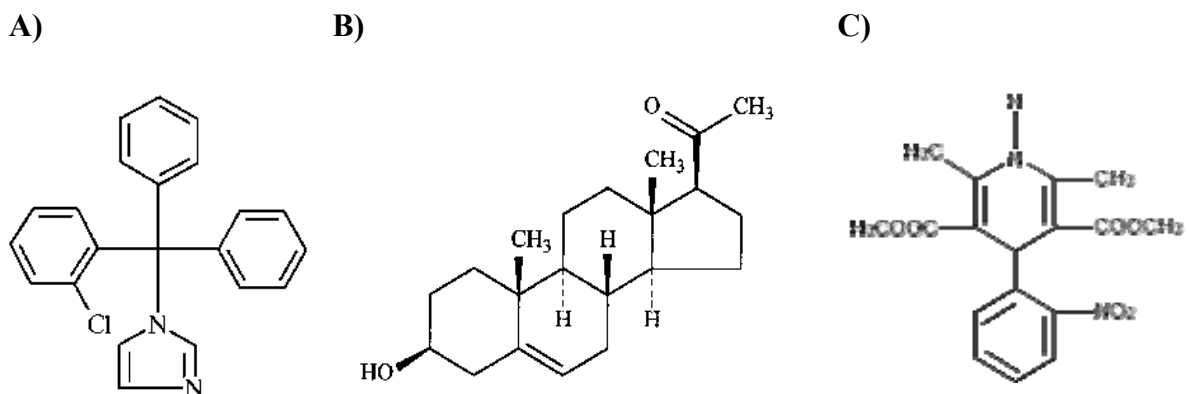


Figura 5: Estrutura química dos fármacos: **A)** Clotrimazol; **B)** Pregnenolona 16 α -carbonitrilo; e **C)** Nifedipina.

1.6 Material Biológico

O material biológico utilizado nesse trabalho foi a espécie:

Espécie: *Danio rerio*

Nome popular: Paulistinha, Peixe-zebra

O peixe-zebra (*Danio rerio*) pertence à Família Cyprinidae (Ordem Cypriniformes) que, juntamente com outras ordens de peixes primitivos de água doce, que incluem as piranhas, o peixe-gato e outros, formam um grande grupo monofilético com aproximadamente 6.500 espécies conhecido como Ostariophysii (CHEN; ORTI; MEYER, 2004).

No início da década de 70, o doutor George Streisinger da Universidade de Oregon (USA), iniciou suas pesquisas utilizando a espécie de peixe-zebra *D. rerio* (Figura 6) como modelo experimental. Em pouco tempo ele já determinaria a potencialidade da utilização dessa espécie como um promissor modelo experimental principalmente para estudos de desenvolvimento e genética de vertebrados. Desde então, embriões de *D. rerio* se tornaram muito populares em todo o mundo como sinônimo para o entendimento não apenas dos peixes, mas de todos os vertebrados, incluindo o ser humano (<http://www.neuro.uoregon.edu>).

Atualmente, cientistas da Universidade de Oregon ainda têm um papel importante na implementação do peixe-zebra como modelo experimental, destacando-se a construção e manutenção de um endereço eletrônico com informações sobre o tema (www.zfin.org - *The Zebrafish Information Network*) e a publicação de um guia técnico para a manutenção de espécimes (WESTERFIELD, 1993 - *The Zebrafish Manual*).

Além disso, o projeto genoma da espécie *D. rerio*, a qual está sendo realizada pelo Centro Sanger (http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio), encontra-se em andamento com

término previsto para 2005, sendo que, até o momento mais de 400.000 seqüências expressas (ESTs) já foram seqüenciadas.



Figura 6: Aspecto externo da espécie *Danio rerio*.
Fonte: www.zfin.org

Essa espécie tropical de água doce, que naturalmente habita rios do norte da Índia, Paquistão e Nepal, na região sul da Ásia, possui algumas características que a torna um sistema modelo altamente utilizável (<http://www.neuro.uoregon.edu>; SUMANAS & LIN, 2004):

- Os adultos são relativamente pequenos (entre 3 e 4 cm de comprimento), baratos, e acondicionados em grandes quantidades em um mesmo aquário, o que os torna facilmente mantidos em condições controladas de laboratório;
- Os ovos são fertilizados externamente, produzidos regularmente em grande quantidade, além de não serem adesivos;
- Os embriões são transparentes, pequenos, contém um pequeno número de células e se desenvolvem rápido, sendo que, 5 dias após a fertilização a larva já se apresenta formada a maioria dos órgãos internos incluindo fígado, pâncreas e uma rede vascular complexa;
- Relativo curto período de geração, de aproximadamente 3 meses;
- São vertebrados, o que os aproxima ainda mais do ser humano quando comparado com os modelos mais utilizados de invertebrados como os insetos (*Drosophila* - mosca-da-fruta) e os nematóides (*Caenorhabditis elegans*).

Os machos são finos e em forma de torpedo, usualmente dourados no abdômen, nadadeiras ventrais, pélvicas e peitorais, porém, em algumas variedades isso pode não ser verdade. As fêmeas são maiores quando cheias de ovos e podem ou não apresentar regiões douradas. As listras características que ocorrem ao longo do corpo e das nadadeiras deram o nome a essa espécie.

Assim, experimentos com peixe-zebra são significativamente fáceis, rápidos e baratos se comparados com aqueles realizados em camundongos e ratos, os quais são os principais modelos experimentais adotados quando se objetiva a comparação com mamíferos.

Considerando que as vias de regulação comuns entre as espécies estão sendo identificadas e a genômica possibilita a comparação de genes, como estão arrançados nos cromossomos e como são regulados, o peixe-zebra aparece como um modelo vertebrado válido e complementar (LINNEY; UPCHURCH; DONERLY, 2004). Segundo Pichler, Dodd e Love (2004) a análise das regiões expressas do genoma do peixe-zebra pode fornecer informações úteis no campo da genômica comparativa. Da mesma forma, estudos com peixe-zebra podem levar a identificação de vias conservadas de regulação gênica, a partir da comparação com o perfil de expressão em outros sistemas modelo, além da identificação de sistemas espécie-específicos.

As características biológicas que os tornam semelhantes ao ser humano, que incluem tanto seu genoma, como os processos de desenvolvimento, anatomia, fisiologia e comportamento, têm direcionado seu uso como modelo experimental em estudos de desenvolvimento; genética; estudos neurológicos e de desenvolvimento neural (LINNEY; UPCHURCH; DONERLY, 2004); modelo de doenças humanas (SUMANAS; LIN, 2004); além de estudos para descoberta e validação de novos fármacos (LINNEY; UPCHURCH; DONERLY, 2004). Da mesma forma, estudos utilizando linhagens transgênicas para estudos em neurotoxicologia, a tecnologia de construção de genes *knockdown*, além da tecnologia de microchips têm sido direcionadas para a toxicogenética a partir da utilização dessa espécie.

Por outro lado, estudos *in vivo* com o peixe-zebra constituem-se em uma ferramenta farmacológica poderosa, pois permite avaliar os efeitos de influências ambientais em manifestações clínicas. No ano passado um crescente número de publicações sobre doenças e efeitos farmacologicamente relevantes começaram a ilustrar como, quando e onde essa espécie pode ser utilizada (GOLDSMITH, 2004).

O conhecimento sobre a expressão de genes envolvidos na regulação transcricional de outros genes importantes na defesa do organismo contra poluentes ambientais nessa espécie pode contribuir para a elucidação de mecanismos filogenéticos conservados que podem ser afetados pela exposição a contaminantes. Além disso, distúrbios relacionados às vias de sinalização da qual o receptor PXR participa podem causar uma desregulação endócrina que comprometeria processos fisiológicos essenciais, tais como a reprodução, olfato, visão, entre outros.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão dos genes que codificam o Receptor Pregnano X (*PXR*), a isoforma 3A do citocromo P450 (*CYP3A*) e da proteína de resistência a multidrogas 1 – (*MDR1*) de fígado de peixe-zebra (*Danio rerio*) tratados com substâncias indutoras de *CYP3A* em mamíferos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão dos genes que codificam o receptor Pregnano X (*PXR*), a isoforma 3A do citocromo P450 (*CYP3A*) e da proteína de resistência a multidrogas 1 – (*MDR1*) de fígado de peixe-zebra (*Danio rerio*) tratados com o fármaco Nifedipina, o antifúngico Clotrimazol e o esteroíde sintético Pregnenolona 16 α -carbonitrilo.
- Analisar comparativamente a expressão destes genes em peixes com as respostas em mamíferos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta dos animais

Espécimes de *Danio rerio* foram adquiridos comercialmente de uma loja de aquários da cidade de Florianópolis. Os animais foram levados ao laboratório onde foram mantidos em aquários de 10 L com aeração constante e temperatura controlada (23-24°C) durante 48 horas e alimentados com nauplius de *Artemia salina* uma vez por dia e com ração comercial duas vezes por dia, para aclimação às condições de laboratório.

3.2 Tratamento do material biológico

Após o período de aclimação, os fármacos Nifedipina e Clotrimazol, o derivado natural de Pregnenolona, 5-Pregnane-3 β -ol-20-one-16 α -carbonitrile (PCN), e óleo de milho (veículo) foram injetados intraperitonealmente em peixes adultos em dose única de 20 mg.Kg⁻¹ (n=15 por grupo). Após a injeção, os peixes foram mantidos nos aquários por 48 horas, sem alimentação e sob aeração constante.

Após esse período os animais foram mortos e então dissecados para a retirada do fígado, que foi imediatamente imerso em nitrogênio líquido. As análises foram realizadas com *pools* de fígados de 2 ou 3 indivíduos.

3.3 Desenho dos iniciadores

Para o desenho dos iniciadores utilizados na reação de RT-PCR semi-quantitativa para amplificação do cDNA dos genes *CYP3A* e *MDR1* em peixe-zebra, dois fragmentos iniciais foram identificados em ESTs depositada no GenBank sob o número de acesso AW202769 e BQ284593, respectivamente. Os iniciadores para o gene *CYP3A* foram construídos utilizando-

se o programa MacVector, enquanto os iniciadores para o gene *MDRI* foram construídos utilizando-se o programa Primer 3 (Instituto Whitehead de Pesquisa Biomédica; ROZEN; SKALETSKY, 2000). Os iniciadores utilizados na amplificação do cDNA dos genes *PXR* e β -*ACTINA* foram os mesmos utilizados por Bairy e Stegeman (2004), e por eles desenhados. Os pares de iniciadores utilizados no presente trabalho estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Pares de iniciadores utilizados nas reações de amplificação do cDNA dos genes *PXR*, *CYP3A*, *MDRI* e β -*ACTINA*.

Gene	Iniciadores	Tamanho do fragmento gerado (pb)
<i>PXR</i>	sense: 5' ATG CGG CGA CAA ATC TAC TGG C 3' antisense: 5' TGT GAA GTG TGG CAG AGA GGT G 3'	577
<i>CYP3A</i>	sense: 5' TTG AGG AGC GGT GGT GAG CAT TAG 3' antisense: 5' TGG AGA GAG TGA ACT TCG GAT TCG 3'	477
<i>MDRI</i>	sense: 5' CAG AGT GGG CAG ACG TAC AA 3' antisense: 5' ATT TCT GCC GGA TCC TCT TT 3'	217
β - <i>ACTINA</i> (Controle Interno)	sense: 5' CGA CCC AGA CAT CAG GGA GTG 3' antisense: 5' GTC CAG GGC CAC ATA GCA 3'	550

As seqüências utilizadas para o desenho dos iniciadores podem ser visualizadas nos apêndices A, B, C e D.

3.4 Extração de RNA total

A extração de RNA foi realizada de acordo com o protocolo para o reagente TRIzol, (Invitrogen). Após excisado, o tecido foi transferido para microtubo livre de DNase e RNase e a esse, foi adicionado 1000 μ L de TRIzol para cada 100 mg de tecido sendo, então, homogeneizado com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (Cole-Parmer). A seguir o material incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. A estes tubos foram adicionados 200 μ L de clorofórmio por mL de TRIzol utilizado inicialmente, e em seguida, os mesmos foram agitados vigorosamente por 15 segundos e incubados no gelo por 3 minutos. Os tubos foram centrifugados a 12.000 x g por 20 minutos (4°C) e a fase aquosa foi transferida para outros tubos novos. À fase aquosa foram adicionados 500 μ L de álcool isopropílico por mL

de TRIzol utilizado inicialmente e, após a incubação por 10 minutos a temperatura ambiente, o material foi submetido a uma nova centrifugação a 12.000 x g (4°C) por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os precipitados obtidos foram lavados com 1 mL de etanol 75%, agitados e centrifugados a 7.500 x g (4°C) por 5 minutos. Os sobrenadantes foram novamente descartados, e os precipitados secos a temperatura ambiente e, em seguida, ressuspendidos em água livre de RNAses, sendo armazenados a -80°C.

A pureza e a concentração de RNA obtido foi determinada através da leitura das amostras em comprimento de onda 260 e 280 nm, utilizando o espectrofotômetro Ultrospec 3000 (Pharmacia). A integridade das amostras e a comparação com o resultado obtido através da leitura em espectrofotômetro foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1%, conforme descrito abaixo.

3.4.1 Análise do RNA

Para análise das amostras de RNA foram preparados géis de agarose 1% sob condições desnaturantes, utilizando Agarose ultra pura (GibcoBRL), tampão MOPS 10x (MOPS 200 mM, Acetato de Sódio 50 mM, EDTA 10 mM; pH 7,0) e formaldeído 37%. À cada amostra de RNA foi adicionado tampão de desnaturação contendo brometo de etídio (AUSUBEL et al., 1993) e aquecidas a 55-60°C por 10 minutos, para aplicação no gel. As eletroforeses foram realizadas a 85V, em maxi cuba submarina horizontal (Hoefler HE99X), em tampão de corrida MOPS 1x. Os géis foram visualizados em transiluminador UV.

Todas as soluções foram tratadas com DEPC (Dietilpirocarbanato). Foi adicionado DEPC à água deionizada autoclavada utilizada para as soluções e diluição do tampão até a concentração final de DEPC de 0,01% (AUSUBEL et al., 1992). Em seguida, a água tratada foi colocada em banho-maria a 37°C durante 18 horas e depois autoclavada.

A cuba de eletroforese e os acessórios foram tratados com peróxido de hidrogênio 10% por 10 minutos e em seguida lavados com água destilada tratada com DEPC.

3.5 Síntese do cDNA

Para a síntese do cDNA foi realizada a transcrição reversa utilizando o sistema *Omniscript RT Kit* (Qiagen) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. As amostras de RNA total extraídas de fígado de *D. rerio*, após serem quantificadas, foram utilizadas na concentração de 2 µg para a reação de transcrição reversa. Além do RNA molde, a reação de transcrição reversa continha: tampão RT 1x; dNTPs (0,5 mM de cada dNTP); iniciador Oligo dT 1 µM; inibidor de RNase 10 unidades/µL; e transcriptase reversa *Omniscript* (4 unidades). Foi utilizado o programa RT: 37°C por 1 hora. O cDNA resultante foi armazenado a -80°C.

3.6 Padronização das condições de PCR

Para otimizar as condições para a amplificação do cDNA pela reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), cada par de iniciadores foi utilizado em ensaio preliminar, visando estabelecer o número de ciclos em que a quantidade de cDNA formado pudesse ser avaliada durante a fase exponencial. Assim, para os genes *CYP3A* e β -*ACTINA* foram testados os ciclos de amplificação de 16, 19, 22, 25 e 28, para o gene *MDR1* os ciclos de 28, 30, 33 e 35, e para o gene *PXR* os ciclos de 25, 35, 40 e 45.

3.7 RT-PCR semi-quantitativa

3.7.1 Amplificação do cDNA dos genes *PXR*, *CYP3A* e *MDR1*

Como a Reação em Cadeia da Polimerase é baseada no aumento logarítmico da quantidade de produto de cDNA formado pelo tempo, não é possível comparar simultaneamente a expressão de múltiplos genes. Assim, as reações para os três diferentes genes de interesse, além do gene utilizado para normalização dos dados (controle interno) foram realizadas separadamente.

As concentração de cDNA das amostras sintetizadas (Item 3.5) foram quantificadas através da relação A_{260}/A_{280} , a fim de ajustar a concentração a ser utilizada para a reação de PCR de 1 μg .

Todas as reações de amplificação foram realizadas utilizando o kit *Advantage2 Polymerase Mix* (BD Biosciences) e continham: tampão PCR 1x; dNTPs (0,2 mM de cada dNTP); mistura de enzimas Polimerase 1x (*AdvanTaq DNA polymerase*, *Proofreading DNA polymerase* e *TaqStart antibody*); iniciadores sense e antisense (0,2 μM); além do cDNA (0,02 μg). As reações foram realizadas no termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf).

Os programas utilizados para as reações de amplificação estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Programas utilizados para a amplificação dos genes *PXR*, *CYP3A* e *MDR1*.

<i>PXR</i>	<i>CYP3A</i>	<i>MDR1</i>
1) 5 ciclos: 94°C por 5 seg 72°C por 35 seg	1) 5 ciclos: 94°C por 5 seg 72°C por 35 seg	1) 5 ciclos: 94°C por 5 seg 72°C por 35 seg
2) 5 ciclos: 94°C por 5 seg 70°C por 10 seg 72°C por 35 seg	2) 5 ciclos: 94°C por 5 seg 70°C por 10 seg 72°C por 35 seg	2) 5 ciclos: 94°C por 5 seg 70°C por 10 seg 72°C por 35 seg
3) 40 ciclos: 94°C por 5 seg 63°C por 10 seg 72°C por 35 seg	3) 33 ciclos: 94°C por 5 seg 54°C por 10 seg 72°C por 35 seg	3) 35 ciclos: 94°C por 5 seg 60°C por 10 seg 72°C por 35 seg

O programa para amplificação do controle interno esta descrito na Tabela 4.

Tabela 4: Programa utilizado para a amplificação do controle interno *B-ACTINA*.

<i>B-ACTINA</i>	
1) 5 ciclos:	94°C por 5 seg 72°C por 35 seg
2) 5 ciclos:	94°C por 5 seg 70°C por 10 seg 72°C por 35 seg
3) 33 ciclos:	94°C por 5 seg 63°C por 10 seg 72°C por 35 seg

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5% e corados com brometo de etídio, como abaixo descrito.

3.7.2 Análise dos fragmentos amplificados de cDNA

As eletroforeses de cDNA foram realizadas em géis de agarose 1%, utilizando agarose ultra pura (GibcoBRL) e brometo de etídio (solução 10 mg.ml⁻¹, concentração final no gel 5 µg). A cada amostra de DNA, foi adicionado tampão de amostra 6X azul/laranja (Promega), para aplicação no gel. Como marcador de peso molecular, foi utilizado um dos seguintes marcadores: 500 pb (Q-Biogene) ou 1 Kb (Promega). As eletroforeses foram realizadas em mini cuba submarina horizontal (Hofer HE33), a 150V, em tampão de corrida TBE 0,5x (TBE 1x: 89 mM Tris base, pH 8,0; 89 mM Ácido Bórico; 2 mM EDTA). Os géis foram visualizados em transiluminador UV.

3.7.3 Análise dos resultados

Após a visualização dos géis no transiluminador, estes foram fotodocumentados e digitalizados a partir do programa DigiDoc. A densitometria das bandas foi realizada utilizando-se o programa *Scion Image*[®] for Windows.

3.8 Análise Estatística

O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a normalidade dos dados, enquanto o teste *t* de Student foi utilizado para comparação dos grupos controle e tratados, respectivamente com Nifedipina, Clotrimazol e PCN, para $P < 0,05$.

3.9 Confirmação dos fragmentos obtidos para os genes *CYP3A* e *MDR1*

3.9.1 Purificação dos produtos obtidos por PCR

Os produtos de PCR que apresentaram fragmentos detectáveis no gel de agarose foram purificados para eliminação de dNTPs e iniciadores presentes na solução. A purificação dos produtos de PCR foi realizada utilizando-se o kit comercial *GeneClean II* (Bio 101). A banda correspondente ao tamanho esperado de cada fragmento de interesse amplificado (Item 3.7.2) foi cortada do gel de agarose, sendo a fatia de gel colocada em microtubo, adicionado tampão TBE e solução NaI 6 M e incubado em banho-maria a 55°C para solubilização da agarose. Após esse período, foi acrescentada à solução, a matriz aquosa de sílica responsável pela ligação ao DNA e mantida a temperatura ambiente por 5 minutos. A solução foi então centrifugada em rotação máxima por 5 segundos e, após a retirada do sobrenadante, o precipitado foi lavado em solução concentrada de NaCl, Tris, EDTA e etanol por 3 vezes. Após a última centrifugação o precipitado foi ressuscitado com água com grau para biologia molecular (Eppendorf).

O procedimento acima descrito foi realizado utilizando o produto amplificado de um espécime (não induzido) para cada um dos dois genes de interesse.

3.9.2 Clonagem

Para a clonagem dos fragmentos resultantes da amplificação dos genes de interesse foi utilizado o sistema de ligação ao vetor pGEM-T Easy Vector System I (Promega).

Ligação ao vetor pGEM-T easy

Após purificação, o DNA de interesse foi ligado ao vetor de clonagem pGEM-T Easy, o qual possui no sítio de clonagem uma sequência para clivagem com a enzima *EcoRI*. Para a reação de ligação, 3 μL do produto da PCR foi acrescentado à solução contendo tampão de ligação, vetor (50 ng) e a enzima de ligação T4 (4 unidades) e mantida por 14 horas a 4°C.

Transformação

Para a reação de transformação foram utilizadas bactérias competentes *Escherichia coli* JM109 (Promega). Foram adicionados 2 μL da reação de ligação a 50 μL de bactérias competentes sendo mantido no gelo por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram colocadas em banho-maria a 42°C por cerca de 45-50 segundos e imediatamente transferidas para o gelo por mais 2 minutos. Para cada tubo foram adicionados 950 μL de meio LB broth (Luria Bertani: triptofano, extrato de levedura e cloreto de sódio; Sigma) e estes foram incubados a 37°C por 90 minutos, sob agitação constante de 150 rpm. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados por 2 minutos a 2.000 x g.

Foram removidos 750 μL do sobrenadante para ser desprezado, sendo o restante utilizado para ressuspender as células. A suspensão de células foi então aplicada sobre uma placa de meio LB agar (Luria Bertani: triptofano, extrato de levedura, cloreto de sódio e agar; Sigma) contendo 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ampicilina, 1,5 mM IPTG (isopropil-B-D-tiogalactosídeo); 80 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ X-Gal (5-bromo-4cloro-3-indoil-B-D-galactosídeo) e as placas colocadas em estufa a 37°C por 18 horas (AUSUBEL et al., 1992).

3.9.3 Extração de DNA plasmidial

Após o crescimento das colônias em placas LB/Ampicilina/IPTG/X-Gal, foram selecionadas apenas as colônias positivas, ou seja, as colônias de cor branca. Com a ajuda de uma ponteira cada colônia foi retirada e inoculada em um tubo contendo 3 mL de meio LB broth e 3 μ L de ampicilina (estoque 100 mg/ml), sendo mantida sob agitação de 150 rpm a 37°C por 18 horas.

A extração do DNA plasmidial foi realizada segundo instruções do fabricante do kit Perfectprep Plasmid midi utilizado (Eppendorf). Assim, 1,5 mL do meio contendo as bactérias foram centrifugados a 14.000 x g por 20 segundos, sendo o procedimento repetido com mais 1,5 mL, no mesmo tubo, a fim de aumentar o número de células. O precipitado foi então ressuspendido com 100 μ L da solução 1 e depois lisado utilizando-se a mais 100 μ L da solução 2, e logo após, neutralizado com adicionais 100 μ L da terceira solução. O lisado neutralizado foi centrifugado a 14.000 x g por 20 segundos e o sobrenadante, livre de proteínas e DNA cromossômico, foi transferido para tubo limpo contendo a coluna Spin. À esse tubo foram acrescentados 450 μ L da matriz de ligação ao DNA e após repetidas e vigorosas inversões, a fim de promover a ligação do DNA à matriz, este foi centrifugado 14.000 x g por 30 segundos. À coluna contendo o DNA ligado foi acrescentado 400 μ L da solução de purificação e novamente centrifugado. O DNA foi eluído da matriz utilizando-se água (40 μ L) com grau para biologia molecular (Eppendorf).

3.9.4 Digestão do DNA plasmidial

Os fragmentos clonados no vetor pGEM-T Easy foram confirmados por digestão do plasmídeo utilizando a enzima de restrição *EcoRI* (Q-Biogene). A solução contendo 2 μ L de

tampão com soro-albumina bovina, 1 μL da enzima *EcoRI*, 15 μL de água com grau para biologia molecular e 2 μL do DNA plasmidial, foi mantida a 37°C por 90 minutos. Após esse período, a reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% (Item 3.7.2) para confirmação do resultado.

3.10 Sequenciamento

O sequenciamento dos fragmentos clonados foi realizado em colaboração com os Drs. Mauro Rebelo (UFRJ) e Milton Moraes (FIOCRUZ) utilizando o equipamento ABI3730 de 48 capilares (Applied Biosystems). A confirmação das seqüências foi realizada utilizando-se o programa para Edição de Seqüências Bioedit (HALL, 1999).

4. RESULTADOS

4.1 Padronização das condições de PCR

Durante a PCR semi-quantitativa o acúmulo do produto de PCR formado precisa ser medido durante a fase exponencial da reação através da interrupção da PCR após um determinado número de ciclos, o qual é estabelecido experimentalmente. Para se avaliar a expressão de um gene, o mesmo deve ser comparado com um gene expresso constitutivamente pela célula utilizado como controle, o qual também tem a reação interrompida durante a fase exponencial. Então, a razão dada através relação do gene de interesse pelo gene controle refletirá a expressão do gene de interesse.

Portanto, cada par de iniciadores dos respectivos genes avaliados neste trabalho foi utilizado em ensaio preliminar, visando estabelecer o número de ciclos em que não houvesse saturação da expressão dos genes de interesse *CYP3A*, *PXR* e *MDR1* durante as reações de PCR (Figura 7). O mesmo ensaio foi realizado visando estabelecer o número de ciclos em que não houvesse saturação da expressão do gene utilizado como controle β -*ACTINA* (Figura 7D).

Conforme os padrões encontrados para cada gene os ciclos escolhidos para amplificação foram 22, 40, 33 e 22, respectivamente para amplificação do cDNA dos genes *CYP3A*; *PXR*; *MDR1* e β -*ACTINA* por RT-PCR semiquantitativa.

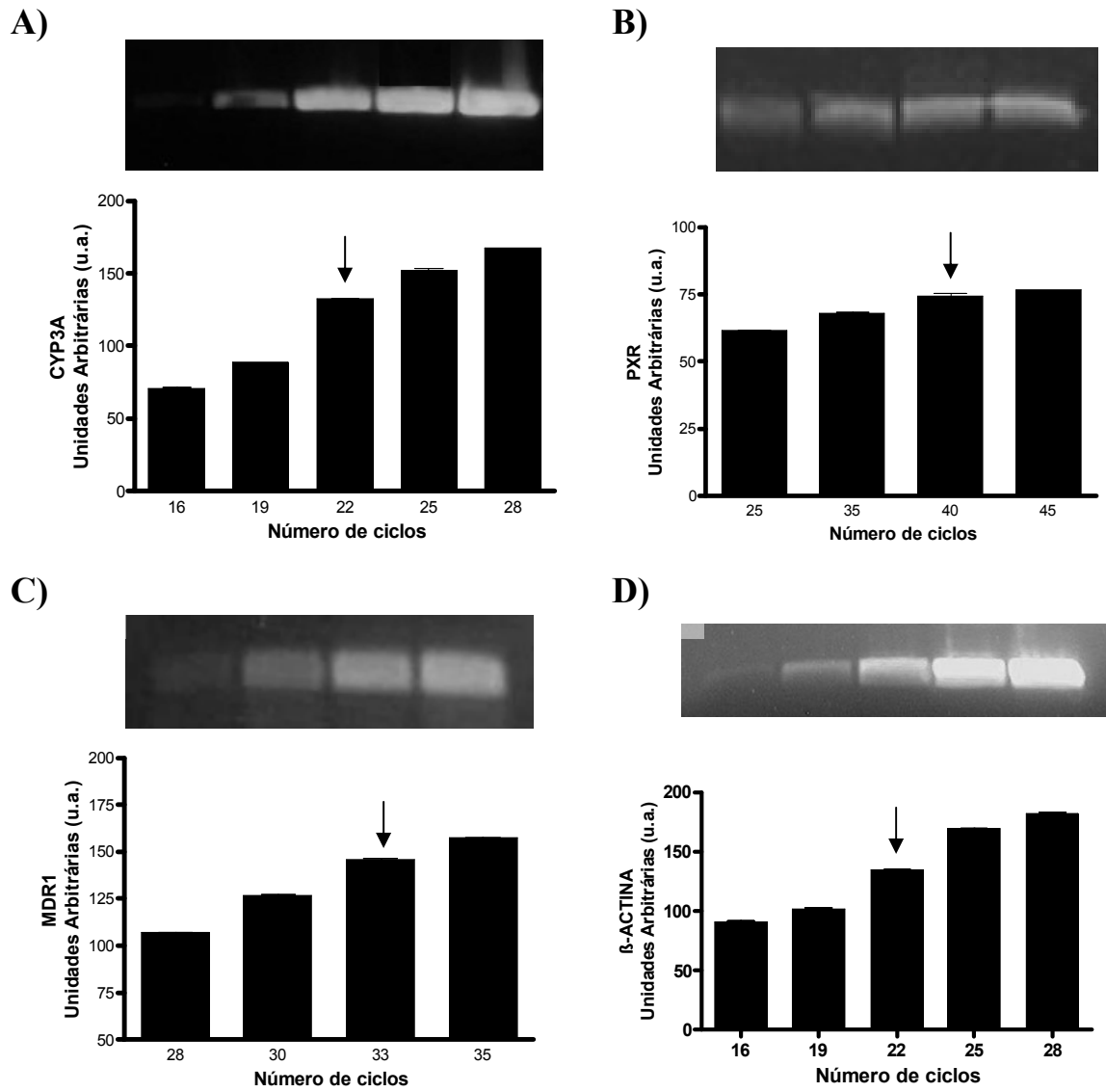


Figura 7: Gel de agarose 1% de produtos de PCR obtidos no teste Curva de expressão do número de ciclos para o gene do número de ciclos para o gene A) *CYP3A*; B) *PXR* C) *MDR1*; e D) β -*ACTINA*. As setas indicam o número de ciclos identificados como ideal.

4.2 RT-PCR semi-quantitativa

O produto da amplificação do gene que codifica a proteína constitutiva β -ACTINA foi utilizado para normalizar os níveis de cDNA presentes nas amostras. Cabe ressaltar que, apesar de todas as amostras apresentarem a banda correspondente à β -ACTINA (550 pb), as mesmas apresentaram intensidades distintas (dados não mostrados).

As bandas correspondentes aos genes *CYP3A*, *PXR*, *MDR1* e β -ACTINA foram quantificadas utilizando-se o programa *Scion Image*[®] for Windows. A quantidade relativa de mRNA foi determinada através da razão PXR/β -ACTINA; $MDR1/\beta$ -ACTINA e $CYP3A/\beta$ -ACTINA, a partir dos valores de densitometria das bandas amplificadas.

Assim, a Figura 8 apresenta a quantidade relativa de mRNA dos genes *CYP3A*, *PXR* e *MDR1* no fígado de peixes-zebra tratados com nifedipina, clotrimazol e PCN, assim como no grupo controle.

O fígado dos peixes tratados com PCN 20 mg.kg⁻¹ mostraram uma indução de 1,9 vezes na expressão do mRNA do receptor *PXR*, seguido da indução de 1,8 vezes na expressão do mRNA do *CYP3A* e 1,6 vezes no mRNA do *MDR1* (Figura 8). Por outro lado, nifedipina, na concentração testada não afetou a expressão dos genes *PXR*, *CYP3A* e *MDR1*. Semelhante ao composto nifedipina, o antifúngico clotrimazol não afetou estatisticamente a expressão do mRNA dos genes *CYP3A*, *PXR* and *MDR1*. Porém, os peixes tratados com esse composto mostraram um aumento de 1,6 vezes na expressão do mRNA do *PXR* ($P=0.089$) e 1,7 vezes na expressão do mRNA do *CYP3A* ($P=0.059$), o que sugere um possível efeito biologicamente relevante.

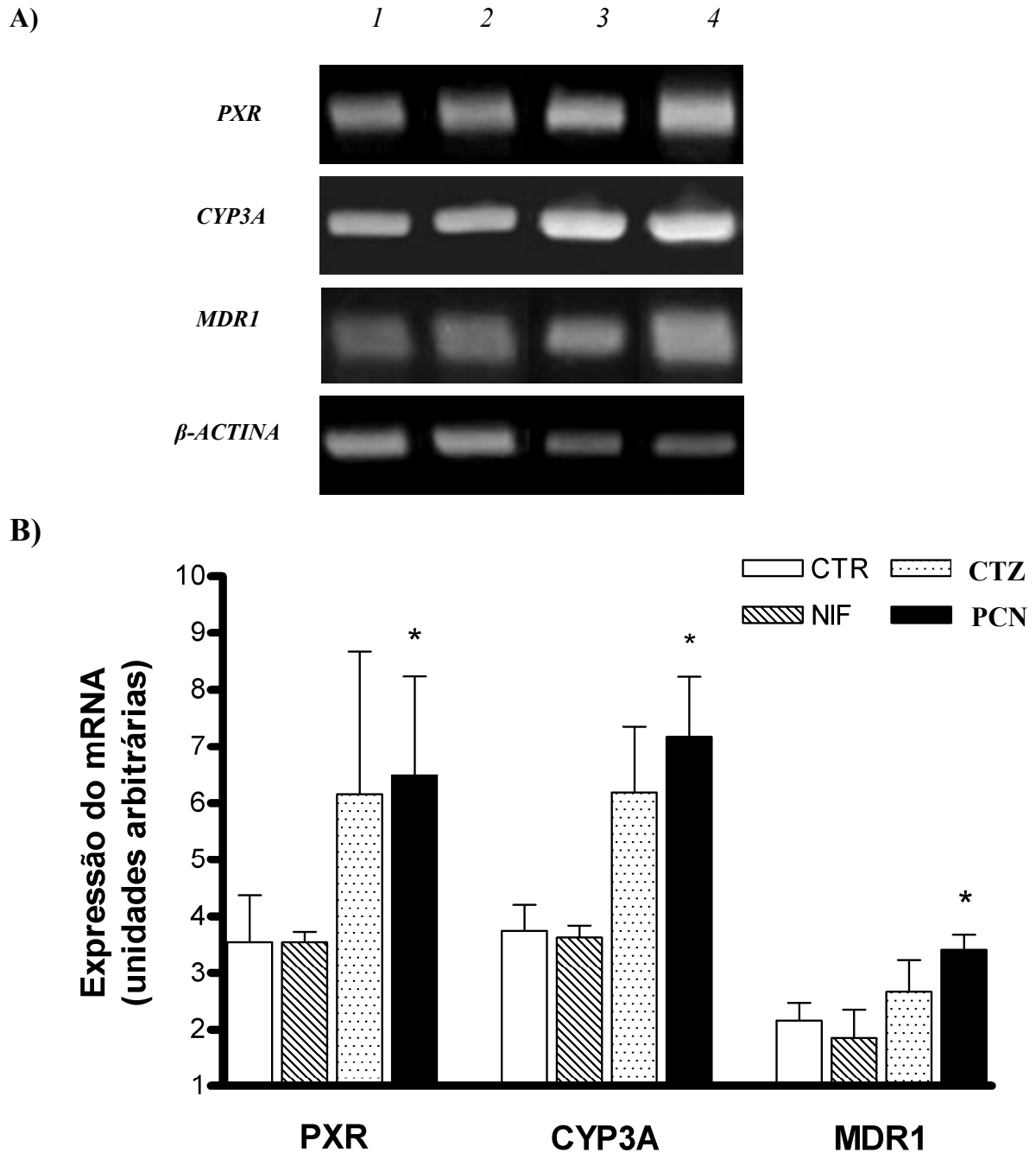


Figura 8: Efeito dos compostos Nifedipina (NIF), Clotrimazol (CTZ) e Pregnenolona 16 α -carbonitrilo (PCN) na expressão dos genes *PXR*, *CYP3A* e *MDR1* em fígado de *Danio rerio*. Os peixes foram tratados com 20 mg.kg⁻¹ de cada um dos compostos em óleo de milho através de injeção intraperitoneal. **A)** Gel de agarose 1%, 1, grupo controle; 2, NIF; 3, CTZ e 4, PCN. **B)** RT-PCR semi-quantitativo a partir do RNA total (2 μ g) isolados do fígado após 48 horas de tratamento. O gráfico mostra a expressão do mRNA de *PXR*, *CYP3A* and *MDR1* calculado a partir da intensidade densitométrica de cada banda normalizada com o gene *β -ACTINA*. Os valores representam média \pm Desvio Padrão de 5 animais. * $P < 0,05$: diferença significativa em relação ao grupo controle.

4.3 Confirmação do fragmento obtido para o gene *CYP3A* e *MDR1*

A confirmação da inserção do fragmento de ~ 477 pb referente ao gene *CYP3A* e do fragmento de ~ 217 pb referente gene *MDR1* ao vetor pGEM-T easy foi confirmado através de digestão utilizando-se a enzima de restrição *EcoRI*.

Como mostrado na Figura 9A, a reação de digestão para o gene *CYP3A* gerou três fragmentos de diferentes tamanhos, sendo que o primeiro fragmento de 3 Kb refere-se ao esperado para o vetor utilizado, e dois menores, sendo um de 302 e outro de 175 pb aproximadamente, que juntos atingem o tamanho esperado para o gene *CYP3A*. Analisando a seqüência do inserto esperado foi observada a existência de um sítio de restrição para *EcoRI*, o que explica a existência destes dois fragmentos.

Na Figura 9B é possível observar a ocorrência de dois fragmentos após a reação de digestão para o gene *MDR1*. O primeiro fragmento de 3 Kb refere-se ao vetor enquanto o segundo fragmento de aproximadamente 217 pb refere-se ao gene *MDR1*.

A partir do resultado do sequenciamento foi possível confirmar a similaridade entre o fragmento de 477 pb e o suposto gene *CYP3A* em peixe-zebra. Já o fragmento de aproximadamente 217 pb ainda aguarda sequenciamento para confirmação da similaridade com o suposto gene *MDR1* nessa espécie.

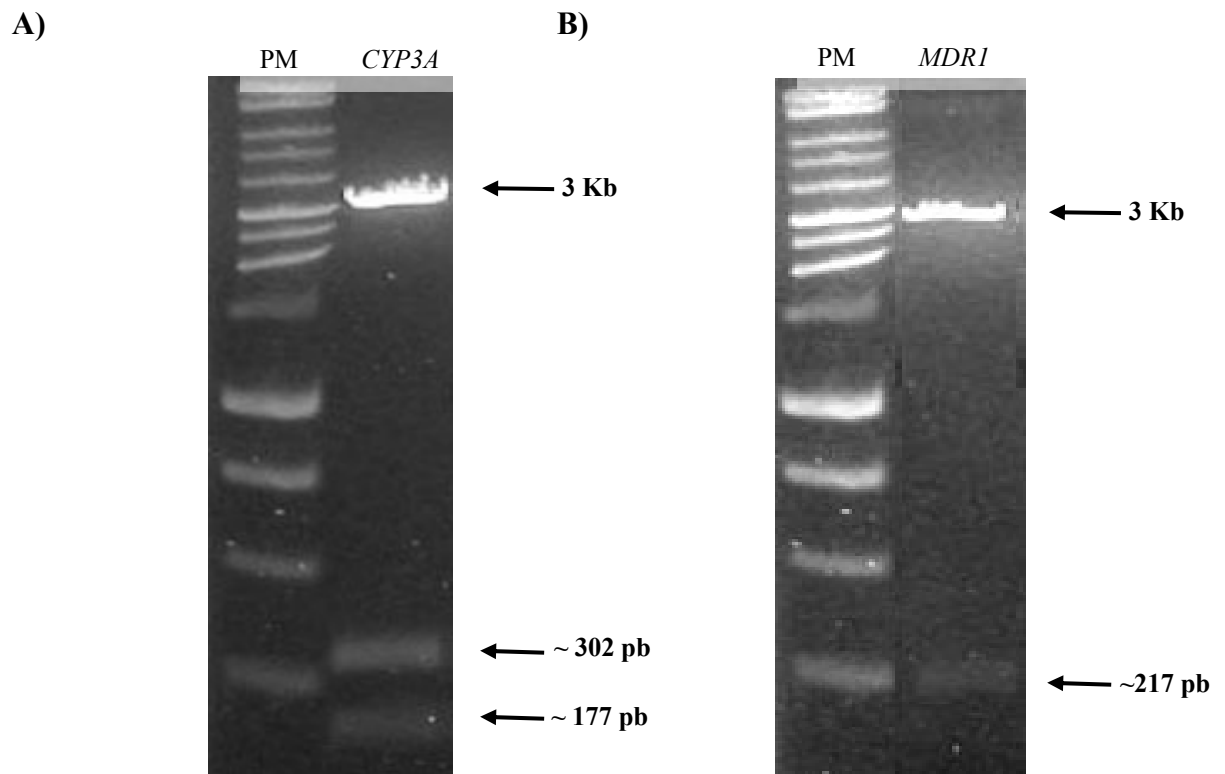


Figura 9: Gel de agarose 1%. Digestão dos clones contendo os insertos referentes aos genes: **A)** *CYP3A* e **B)** *MDRI*. PM: Padrão de peso Molecular.

5. DISCUSSÃO

A quantificação dos níveis de RNA mensageiro como um biomarcador se torna possível através do ensaio de RT-PCR. A RT-PCR é uma ferramenta que permite a análise da expressão do RNA mensageiro de um gene induzível na presença de determinado xenobiótico, a partir da quantidade do produto formado em função da quantidade do molde presente no início da reação. Em termos da quantidade de amostra necessária, a confiabilidade na detecção de pequenas diferenças na expressão, além da versatilidade para análises de muitos genes em grande número de cópias, tudo isso torna a técnica de RT-PCR um dos procedimentos mais convencionais.

No presente estudo o gene da β -*ACTINA* foi utilizado como gene controle, pois as actinas são algumas das proteínas mais abundantes e conservadas nas células eucarióticas, sendo um gene estrutural envolvido na estrutura e mobilidade celular e intensivamente utilizado como controle interno em estudos de expressão gênica.

Durante a reação de PCR há uma relação linear entre o número de ciclos e a quantidade de DNA produzida. No entanto, quando atingido um determinado número de ciclos a quantidade de DNA formada entra na fase estacionária, o que acontece como resultado da estabilidade da enzima, pela depleção de nucleotídeos ou iniciadores presentes na reação ou mesmo pela inibição pelo produto formado (isto é, o produto compete com o iniciador durante a fase de anelamento).

Com o objetivo de padronizar as condições para a realização da RT-PCR semi-quantitativa, foram testadas variações no número de ciclos da reação, a fim de determinar o ponto ideal em que a reação continuasse em fase exponencial. Assim, foram testados o número de ciclos de 25, 35, 40 e 45 ciclos para os genes *PXR*, *CYP3A* e *MDR1* e também para o gene β -*ACTINA*, utilizado na normalização dos dados. Para o gene *PXR* foi escolhido o número de ciclos 40 como ideal (Fig. 7B). Já para os demais genes novas curvas foram realizadas, agora com um intervalo menor entre o número de ciclos escolhidos e também com

menos ciclos, devido a saturação inicial observada no primeiro teste (dados não mostrados). Então, para os genes *CYP3A* e β -*ACTINA* foram refeitas curvas de 16, 19, 22, 25 e 28 ciclos (Fig. 7A e 7D, respectivamente), e para o gene *MDR1* curva de 28, 30, 33 e 35 ciclos (Fig. 7C), e escolhidos o número de ciclos de 22 tanto para o gene *CYP3A* quanto para β -*ACTINA*, e de 33 para o gene *MDR1*.

Após a realização da ligação do fragmento de 477 pb e 217 pb ao vetor pGEM-T easy, a transformação das células competentes e posterior purificação dos mesmos, foi realizada a digestão dos clones positivos formados utilizando-se a enzima de restrição *EcoRI* (Item 3.9.4). Como mostrado na Figura 9A, a reação de digestão dos clones contendo o fragmento de 477 pb gerou três fragmentos de diferentes tamanhos. O primeiro fragmento de 3 Kb esta em concordância com o tamanho esperado para o vetor utilizado. Ao contrário do esperado, a digestão com a enzima *EcoRI* não gerou um segundo fragmento de 477 pb, e sim dois fragmentos sendo um de 302 e outro de 175 pb aproximadamente. Após análise do clone utilizado para a construção dos iniciadores para *CYP3A* através do programa específico para análise de seqüências NEBcutter (<http://tools.neb.com>), foi verificada a presença de um sítio de ligação para a enzima *EcoRI* justamente na região onde a digestão resultaria na formação dos fragmentos obtidos. Na Figura 9B é possível observar a ocorrência de dois fragmentos após a reação de digestão para o gene *MDR1*. O primeiro fragmento de 3 Kb refere-se ao vetor enquanto o segundo fragmento de aproximadamente 217 pb refere-se possivelmente ao gene *MDR1*.

Os clones foram então enviados para sequenciamento e o resultado confirmou a similaridade entre o fragmento de 477 pb amplificado e o gene *CYP3A* de outras espécies, enquanto o clone contendo o fragmento de 217 pb aguarda sequenciamento.

Levando-se em consideração que em muitos estudos o foco não é a avaliação de pequenas mudanças ou o número exato de moléculas, e sim o aumento ou decréscimo por no mínimo uma ou duas vezes nos níveis de RNA mensageiro expressos, apesar da alta precisão

das recentes tecnologias desenvolvidas, os métodos semi-quantitativos ainda são amplamente utilizados e ainda apropriados para muitos objetivos (MARONE et al., 2001).

Neste trabalho foi avaliada a expressão dos genes *PXR*, *CYP3A* e *MDR1* de fígado de peixe-zebra tratados com as substâncias conhecidamente indutoras de CYP3A em mamíferos, Pregnenolona 16 α -carbonitrilo, Clotrimazol e Nifedipina.

A clonagem do receptor PXR em camundongos (KLIEWER et al. 1998) e a identificação do mesmo receptor em humanos (LEHMANN et al. 1998) fornece fortes evidências de que o PXR possa regular o gene do *CYP3A*. Sabendo-se que o gene *MDR1* é co-induzido juntamente com a isoforma CYP3A4 (SCHUETZ; BECK; SCHUETZ, 1996), acredita-se que o mesmo gene também seja regulado pelo receptor PXR (GEIK; EICHELBAUM; BURK, 2001).

Normalmente, o potencial de compostos químicos em induzirem CYP3A, MDR1 ou PXR é investigado *in vitro*, a partir de metodologias que utilizam células transfectadas com esses genes, ou mesmo por regiões ou domínios específicos dos mesmos, tendo como alvo as mudanças nos níveis de expressão de proteínas ou do mRNA, ou então, em ensaios utilizando-se genes repórteres. Embora os ensaios *in vitro* representem uma ferramenta quantitativa simples na triagem de compostos que possam ser ativadores de genes, a disponibilidade de sistemas *in vivo* pode representar um passo importante no desenvolvimento de fármacos mais seguros, assim como se tornam importantes na avaliação de possíveis interações entre diferentes compostos quando esses são co-administrados. Levando-se em consideração o baixo número de trabalhos *in vivo* incluindo a expressão dos genes estudados nesse projeto, principalmente em espécies que não sejam mamíferos, entre eles os peixes, o estudo desse mecanismo torna-se de grande relevância. No presente estudo foi escolhida a espécie de peixe-zebra, a qual recentemente tem sido apontada como uma proeminente espécie de vertebrado em estudos farmacológicos (GOLDSMITH, 2004).

Através da RT-PCR semi-quantitativa foi possível detectar diferenças nos níveis de expressão dos genes *PXR*, *CYP3A* e *MDR1* expostos a NIF, CTZ e PCN. A expressão dos genes *PXR*, *CYP3A* e *MDR1* foi estatisticamente maior nos animais tratados com PCN, enquanto o mesmo não ocorreu para os demais compostos testados (Figura 8).

O efeito do anti-glicocorticóide sintético pregnenolona 16 α -carbonitrilo (PCN) na indução dos genes *PXR*, *CYP3A* e *MDR1* encontra-se em concordância com estudos anteriores. Em 1998 dois trabalhos mostraram uma regulação do gene do *CYP3A* como resultado da ativação do receptor PXR na presença de PCN (KLIEWER et al., 1998; LEHMANN et al., 1998). Lehmann e colaboradores (1998) descreveram o PCN como um potente indutor do gene *PXR* em células co-transfectadas com o *PXR* de camundongos, mas um fraco indutor em células co-transfectadas com o mesmo receptor de humanos. Da mesma forma, Moore et al. (2000b) e Giersbergen et al. (2002), demonstraram que o PCN ativa o PXR em camundongo, mas não em humanos. Outro estudo mostrou que a indução do *CYP3A* pelo PCN ocorre como resultado da indução do *PXR*, pois a perda do gene *PXR* em camundongos transgênicos não afetou a expressão basal do *CYP3A*, porém, o gene *CYP3A* não era mais induzido em resposta ao PCN (XIE et al., 2000). No mesmo trabalho os autores mostraram que tanto PCN, como CTZ e NIF agem como potentes indutores do gene *CYP3A23* em cultura de hepatócitos de ratos, na ausência de uma inserção adicional do gene *PXR*, ou seja, apenas sob ação do PXR endógeno. Através de testes com co-transfecção do PXR de humanos, o mesmo trabalho mostrou a indução de *CYP3A23* por NIF e CTZ, mas não por PCN.

Apesar da indução do *PXR* e *CYP3A* pelos compostos NIF e CTZ terem sido descritas em cultura de células, no presente estudo, estes compostos não causaram indução em nenhum dos três genes analisados em fígados de peixe-zebra.

O comportamento do domínio LBD do *PXR* da espécie de *D. rerio* também foi analisado através de ensaios de transfecção por Moore e colaboradores (2002). Neste trabalho

os autores mostraram a indução de 3,3 vezes do *PXR* quando as células foram expostas a NIF e 7,8 vezes quando expostas a CTZ, ambos na concentração de 10 μ M. Os mesmos compostos também provocaram a ativação do PXR de células transfectadas com o LBD do PXR de camundongo, porco, cachorro, coelho, macaco e humano. Da mesma forma, estudos prévios utilizando células transfectadas com PXR de peixe-zebra mostraram a indução desse receptor por CTZ (BAINY et al., em preparação). Trabalhos utilizando linhagens celulares de humanos mostraram a indução dos níveis de mRNA do PXR por PCN e CTZ, mas não por NIF (TENG et al., 2003) na concentração de 25 μ M. Também foi observado que o gene endógeno *MDR1* é altamente induzido por NIF e CTZ, mas fracamente induzido por PCN (GEIK; EICHELBAUM; BURK, 2001).

Cabe salientar que exposições a concentrações mais altas dos fármacos Clotrimazol e Nifedipina poderiam eventualmente revelar uma possível faixa de concentração destes compostos efetiva em induzir a expressão dos genes *PXR*, *CYP3A* e *MDR1* nesta espécie de peixe. Da mesma forma, o período de exposição dos animais aos fármacos Clotrimazol e Nifedipina poderia não ser suficiente para induzir a expressão dos genes *PXR*, *CYP3A* e *MDR1*. Assim, tempos de exposição tanto maiores quanto menores poderiam eventualmente resultar em alterações estatisticamente significativas na expressão dos genes de interesse do presente estudo.

Respostas diferentes encontradas para genes homólogos em diferentes espécies e a ativação específica de PXR ortólogos tem sido demonstradas como sendo responsáveis pelas diferenças espécie-específicas na indução do gene *CYP3A* (ÖSTBERG et al., 2002). A região do domínio de ligação ao ligante do receptor PXR apresenta uma baixa conservação na sequência de aminoácidos entre as diferentes espécies (WATKINS et al., 2001). Então, a especificidade da resposta entre as espécies na indução do *CYP3A* por xenobióticos parece ser uma consequência das diferenças na expressão do PXR que está associada a sequência de

aminoácidos no domínio LBD e também da interação do DBD com os elementos de resposta da região promotora do PXR (LEHMANN et al., 1998; XIE et al., 2000).

Östberg e colaboradores (2002) através de experimentos de transfecção utilizando o domínio LBD como alvo, identificaram e mutaram dois resíduos polares pertencentes à cavidade de ligação ao ligante do PXR, os quais sabidamente diferem entre camundongos e humanos. O primeiro resíduo escolhido, Q285 em humano e o correspondente I282 em camundongo, foi mutado entre as duas espécies com o aminoácido correspondente. Os mutantes de camundongo que ao invés de conter o aminoácido I282, continham o seu correspondente Q285 de humano mostrou uma diminuição da ativação do PXR ao PCN, sugerindo que este composto se ligaria com muita proximidade a este resíduo e que uma interação hidrofóbica seria favorável. Quanto ao segundo resíduo, H407 em humano e Q404 em camundongo, o mutante de humano que ao invés de conter o aminoácido H407, continha o seu correspondente Q404 de camundongo, aumentou sua ativação pelo composto PCN. Através desses mutantes foi possível demonstrar que estes resíduos são importantes para a ativação espécie-específica do PXR pelo ligante PCN.

Em peixes-zebra, o resíduo Q285 em humano / I282 em camundongo é substituído pelo aminoácido L282, enquanto o segundo resíduo H407 em humano / Q404 em camundongo é substituído pelo aminoácido Y404. Apesar das substituições dos aminoácidos em ambos resíduos, as características são mantidas quando a seqüência do peixe-zebra é comparada com a seqüência de camundongo, pois tanto I quanto L são aminoácidos não polares e Q e Y são aminoácidos polares não carregados, o que estaria de acordo com as respostas encontradas para peixe-zebra quando comparadas com camundongos, já que o LBD do receptor PXR apresenta maior grau de homologia quando comparado com rato e camundongo, do que com humano (BAINY et al., em preparação).

Os resultados apresentados nesse trabalho também sugerem fortemente que os aminoácidos importantes para a ligação do PCN ao LBD do PXR em peixe-zebra não são os mesmos para a ligação dos outros compostos testados, ou seja, NIF e CTZ.

No que diz respeito à expressão do mRNA dos genes *PXR*, *CYP3A* e *MDR1* nas condições apresentadas nesse trabalho, os resultados sugerem uma intrínseca associação entre esses três genes na espécie de peixe-zebra. Assim como, também sugerem que o PXR possivelmente regula a expressão dos genes *CYP3A* e *MDR1* em peixes, assim como já previamente demonstrado em mamíferos, indicando a existência de uma conservação evolutiva deste mecanismo.

Os vários receptores que coexistem com sua especificidade ou promiscuidade podem atuar simultaneamente aumentando ou reduzindo a ação dos mesmos genes, fenômeno conhecido como sinalização cruzada. Assim, não se pode descartar a possibilidade de que outros receptores, não analisados neste trabalho possam ter influenciado a ausência de resposta dos genes analisados neste estudo. A competição por diferentes receptores nucleares, os quais apresentam efeitos opostos na expressão dos mesmos genes, poderia estar associada a variabilidade individual na indução desse conjunto de genes. Por exemplo, a presença das regiões flanqueadoras 5' na região promotora, DR3 e IR6, são ao mesmo tempo reconhecidas pelo receptor PXR (GOODWIN; HODGSON; LIDDLE, 1999) e VDR após sua dimerização com o receptor RXR (DROCOURT et al., 2002).

Uma situação de estresse pode levar à competição entre os diferentes receptores que potencialmente formam heterodímeros com o receptor RXR, o que desencadearia um aumento na ativação e conseqüentemente interferiria na disponibilidade desse receptor, afetando indiretamente todos os receptores que dimerizam com o RXR e inibindo a ativação gênica deles, mesmo que a ligação do receptor com o ligante tenha ocorrido (JACOBS; DICKINS; LEWIS, 2003).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O entendimento do mecanismo celular pelo qual os compostos químicos agem é de extrema importância para avaliação do risco de exposição a esses compostos. A quantificação dos níveis de RNA mensageiro como um marcador molecular fornece informações mecanísticas sobre o efeito de determinados grupos de químicos.

No presente trabalho foi avaliada a expressão dos genes *PXR*, *CYP3A* e *MDR1* de fígado de peixe-zebra tratados com as substâncias conhecidamente indutoras de CYP3A em mamíferos, Pregnenolona 16 α -carbonitrilo, Clotrimazol e Nifedipina. Através da RT-PCR semi-quantitativa foi observado um aumento na expressão dos genes *PXR*, *CYP3A* e *MDR1* em fígado de peixes-zebra tratados com PCN, que está de acordo com estudos anteriores realizados em mamíferos.

Apesar da indução do *PXR* e *CYP3A* pelos compostos NIF e CTZ terem sido descritas em cultura de células, no presente estudo, estes compostos não causaram indução em nenhum dos três genes analisados em fígados de peixe-zebra.

O fato da região do domínio de ligação ao ligante do receptor PXR apresentar uma baixa conservação na seqüência de aminoácidos, quando comparada entre diferentes espécies pode explicar as diferenças entre as respostas encontradas para os três genes em peixe-zebra utilizados neste trabalho. A partir dos resultados apresentados nesse trabalho pode-se sugerir que os aminoácidos importantes para a ligação do PCN ao LBD do PXR em peixe-zebra não são os mesmos para a ligação dos outros compostos testados, ou seja, NIF e CTZ.

O padrão de resposta similar na expressão do mRNA dos genes *PXR*, *CYP3A* e *MDR1* encontrada em peixes tratados com diferentes indutores de PXR sugere que a associação intrínseca entre esses três genes é conservada no peixe-zebra e que o PXR possivelmente regula a expressão dos genes *CYP3A* e *MDR1* em peixes, assim como já previamente

demonstrado em mamíferos, indicando a existência de uma conservação evolutiva deste mecanismo.

7. PERSPECTIVAS

Dentro das perspectivas para a continuação deste trabalho está, inicialmente, o sequenciamento do fragmento de 217 pb amplificado e clonado, a fim de confirmação da similaridade com o gene *MDR1* de outras espécies.

Além disso, poderia-se tentar clonar o gene completo de *CYP3A*. O que permitiria sua utilização em estudos de traduções *in vitro* e também em testes utilizando diferentes elementos responsivos através de ensaios com gel de mudança de mobilidade.

Posteriormente, a partir da busca de sequências depositadas no genbank, localizar as regiões promotoras dos genes *CYP3A* e *MDR1* para identificar as sequências dos elementos responsivos potencialmente ligantes ao PXR. A partir daí, poderia-se fazer construções contendo a região promotora destes genes e um gene reporter para testar ligantes endógenos e xenobióticos em cultura de células transfectadas com esta construção.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. **Physiology Review**, v. 81, p. 1269-1304, 2001.

AUSUBEL, F., et al. **Short Protocols in Molecular Biology**. Editora Wiley. 2ª Edição, Nova York, 1992.

BAINY, A.C.D.; STEGEMAN, J.J. Cloning and identification of a full length pregnane X receptor and expression in vivo in zebrafish (*Danio rerio*). **Marine Environmental Research**, v. 58, nos. 2-5, p. 133-134, 2004.

BARD, S.M. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 48, p. 357-389, 2000.

BELLAMY, W.T. P-glycoproteins and multidrug resistance. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 36, p. 161-183, 1996.

BLUMBERG, B., et al. BXR, an embryonic orphan nuclear receptor actiated by a novel class of endogenous benzoate metabolites. **Genes Development**, v. 12, p. 1269-1277, 1998.

BOLHUIS, H., et al. Mechanisms of multidrug transporters. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, p. 55-84, 1997.

BUCHELI, T.D.; FENTE, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 25, n. 3, p. 201-268, 1995.

BURGER, H.J., et al. Paradoxical transcriptional activation of rat liver cytochrome P-450 3A1 by dexamethasone and the antigluco-corticoid pregnenolone 16a-carbonitrile: Analysis by transient transfection into primary monolayer cultures of adult rat hepatocytes. **Proceedings in National Academic of Science U.S.A.**, v. 89, p. 2145–2149, 1992.

CHEN, W.J.; ORTÍ, G.; MEYER, A. Novel evolutionary relationship among four fish model systems. **TRENDS in genetics**, v. 20, n. 9, p. 424, 431, 2004.

CONNAY, A.H. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis y polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes memorial Lecture. **Cancer Research**, v. 42, p. 4875-4917, 1982.

COUMOUL, X.; DIRY, M.; BAROUKI, R. PXR-dependent induction of human CYP3A4 gene expression by organochlorine pesticides. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, p. 1513-1519, 2002.

DANO, K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 323, p. 466-483, 1973.

DROCOURT, L., et al. Expression of *CYP3A4*, *CYP2B6*, and *CYP2C9* Is Regulated by the Vitamin D Receptor Pathway in Primary Human Hepatocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 28, p. 25125-25132, 2002.

DUSSAULT, I., et al. Peptide mimetic HIV protease inhibitors are ligands for the orphan receptor SXR. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 33309-33312, 2001.

EKINS, S.; MIRNY, L. & SCHUETZ E. G. A ligand-based approach to understanding selectivity of nuclear hormone receptors PXR, CAR, FXR, LXR α , e LXR β . **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 12, p. 1788-1800, 2002.

FALKNER, K.C., et al. Regulation of the Rat Glutathione S-Transferase A2 Gene by Glucocorticoids: Involvement of Both the Glucocorticoid and Pregnane X Receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 60, p. 611-619, 2001.

FRANCIS, G. A., et al. Nuclear receptors and the control of metabolism. **Annual Review Physiology**, v. 65, p. 261-311, 2003.

GEIK, A.; EICHELBAUM, M.; BURK, O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal *mdr1* by rifampin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 18, p. 14581-14587, 2001.

GIERSBERGEN, P.L.M. van, et al. Bosentan, a dual endothelin receptor antagonist, activates the pregnane X nuclear receptor. **European Journal of Pharmacology**, v. 450, p. 115-121, 2002.

GOLDSMITH, P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, p. 504-512, 2004.

GONZALEZ, F.J. Human cytochromes P450: problems and prospects. **Trends Pharmacological Science**, v. 13, p. 346-352, 1992.

GOODWIN, B.; HODGSON, E.; LIDDLE, C. The Orphan Human Pregnane X Receptor Mediates the Transcriptional Activation of *CYP3A4* by Rifampicin through a Distal Enhancer Module. **Molecular Pharmacology**, v. 56, p. 1329-1339, 1999.

GOODWIN, B.; REDINBO, M.R.; KLIEWER, S.A. Regulation of CYP3A gene transcription by the pregnane x receptor. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 42, p. 1-23, 2002.

GOTTESMAN, M.M.; PASTAN, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. **Annual Review of Biochemistry**, v. 62, p. 385-427, 1993.

GUENGERICH, F.P. Cytochromes P450, drugs, and diseases. **Molecular Interventions**, v. 3, p. 194-204, 2003.

HALL, T.A., BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, Ser. 41, 95-98, 1999.

HALLING-SØRENSEN, B., et al. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- a review. **Chemosphere**, v. 36, p. 357-393, 1998.

HANDSCHIN, C.; PODVINEC, M.; MEYER, U. A. CXR, a chicken xenobiotic-sensing orphan nuclear receptor, is related to both mammalian pregnane X receptor (PXR) and constitutive androstane receptor (CAR). **Proceedings in National Academic of Science U.S.A.**, v. 97, p. 10769-10774, 2000.

HONKAKOSKI, P.; NEGISHI, M. Regulation of cytochrome P450 (*CYP*) genes by nuclear receptors. **Biochemical Journal**, v. 347, p. 321-337, 2000.

HUANG, W. et al. Induction of bilirubin clearance by the constitutive androstane receptor (CAR). **Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.**, v. 100, p. 4156-4161, 2003.

JACOBS, M.N.; DICKINS, M.; LEWIS, D.F.V. Homology modelling of the nuclear receptors: human oestrogen receptor β (hER β), the human pregnane-X-receptor (PXR), the Ah receptor (AhR) and the constitutive androstane receptor (CAR) ligand binding domains from the human oestrogen receptor α (hER α) crystal structure, and the human peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) ligand binding domain from the human PPAR γ crystal structure. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 84, p. 117-162, 2003.

JONES, S.A., et al. The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution. **Molecular Endocrinology**, v. 14, n. 1, p. 27-39, 2000.

JULIANO, R.L.; LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 455, p. 152-162, 1976.

KLIEWER, S.A., et al. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. **Cell**, v. 92, p. 73-82, 1998.

LECLUYSE, E.L. Pregnane x receptor: molecular basis for species differences in CYP3A induction by xenobióticos. **Chemico-Biological Interactions**, v. 134, p. 283-289, 2001.

LEHMANN, J.M., et al. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate *CYP3A4* gene expression and cause drug interactions. **Journal of Clinical Investigation**, v. 102, p. 1016-1023, 1998.

LINNEY, E.; UPCHURCH, L.; DONERLY, S. Zebrafish as a neurotoxicological model. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 26, p. 709-718, 2004.

MAGLICH, J.M., et al. Comparison of complete nuclear receptor sets from the human, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* genomes. **Genome Biology**, v. 2, p. 29.1-29.7, 2001.

MAGLICH, J.M., et al. Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. **Molecular Pharmacology**, v. 62, n. 3, p. 638-646, 2002.

MAGLICH, J.M., et al. The first completed genome sequence from a teleost fish (*Fugu rubripes*) adds significant diversity to the nuclear receptor superfamily. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 14, p. 4051-4058, 2003.

MARONE, M., et al. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. **Biological Procedures Online**, v. 3, n. 1, p. 19-25, 2001.

McKENNA, N.J.; O'MALLEY, B. Minireview: nuclear receptor coactivators – an update. **Endocrinology**, v. 143, p. 2461-2465, 2002.

MOORE, J.T.; KLIEWER, S.A. Use of the nuclear receptor PXR to predict drug interactions. **Toxicology**, v.153, p. 1-10, 2000.

MOORE, L. B., et al. St John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.**, v. 97, p. 7500-7502, 2000a.

MOORE, L.B. et al. Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 20, p. 15122-15127, 2000b.

MOORE, L.B., et al. Pregnane X Receptor (PXR), Constitutive Androstane Receptor (CAR), and Benzoate X Receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors. **Molecular Endocrinology**, v. 16, n. 5, p. 977-986, 2002.

NEBERT, D.W.; GONZALEZ F.J. P450 genes: structure, evolution, and regulation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 56, p. 945-993, 1987.

NELSON, D.R. et al. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession number and nomenclatures. **Pharmacogenetics**. v. 6, p. 1-42, 1996.

NEW ENGLAND BIOLABS, INCORPORATION. **NEBcutter**. Disponível em: <<http://tools.neb.com>> Acesso em: 17 janeiro 2005.

NISHIKAWA, J., et al. Molecular cloning and functional characterization of a novel nuclear receptor similar to an embryonic orphan nuclear receptor activated by a novel class of endogenous benzoate metabolites. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 277, p. 209-215, 2000.

NUCLEAR RECEPTORS NOMENCLATURE COMMITTEE. **Cell**, v. 97, 161-163, 1999.

ÖSTBERG, T., et al. Identification of residues in the PXR ligand binding domain critical for species specific and constitutive activation. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 4896-4904, 2002.

PICHLER, F.B; DODD, A.; LOVE, D.R. Global gene expression analysis in the zebrafish: the challenge and the promise. **DDT: Technologies**, v. 1, n. 2, p. 79-84, 2004.

RANG, H.P.; DALE, M.M. & RITTER, J.M. **Farmacologia**. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 703 pp., 2001.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386, 2000.

SAVAS, Ü., et al. Rabbit pregnane X receptor is activated by rifampicin. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 28, p. 529-537, 2000.

SCHUETZ, E.G., et al. Induction of cytochrome P-450 by glucocorticoids in rat liver. I. Evidence that glucocorticoids and pregnenolone 16 alpha-carbonitrile regulate de novo synthesis of a common form of cytochrome P-450 in cultures of adult rat hepatocytes and in the liver in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 1999-2006, 1984.

SCHUETZ, E.G.; BECK, W.T.; SCHUETZ, J.D. Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. **Molecular Pharmacology**, v. 49, p. 311-318, 1996.

SEWALL, L. The skill of ecological perception. **In: Molecular approaches to identify exposure and risk to specific environmental pollutants**. Biomarkers, v. 4, p. 93-103, 1999.

SEYLE, H. Hormones and resistance. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, p. 1-28, 1971.

SMITAL, T.; KURELEC, B. The chemosensitizers of multidrug resistance mechanism in aquatic invertebrates: a new class of pollutants. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 399, p. 43-53, 1998.

SONODA, J. et al. Regulation of a xenobiotic sulfonation cascade by nuclear pregnane X receptor (PXR). **Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.**, v. 99, p. 13801-13806, 2002.

STAUDINGER, J.F., et al. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.**, v. 86, n.6, p. 33-69, 2001.

SUGATANI, J. et al. The phenobarbital response enhancer module in the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 gene and regulation by the nuclear receptor CAR. **Hepatology**, v. 33, 1232-1238, 2001.

SUMANAS, S.; LIN, S. Zebrafish as a model system for drug target screening and validation. **DDT: Targets**, v. 3, n. 3, p. 89-96, 2004.

SYNOLD, T.W.; DUSSAULT, B.M.; FORMAN, B.M. The orphan nuclear SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. **Nature Medicine**, v. 7, n. 5, p. 584-590, 2001.

TENG, S.; JEKERLE, V.; PIQUETTE-MILLER, M. Induction of abcc3 (mrp3) by pregnane x receptor activators. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, p. 1296-1299, 2003.

THE ZEBRAFISH INFORMATION NETWORK. Zfin. Disponível em: < <http://zfin.org> >. Acesso em: 05 de novembro de 2004.

THE WELLCOME TRUST SANGER INSTITUTE. The *Danio rerio* Sequencing Project Disponível em: <http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio>. Acesso em: 05 de novembro de 2004.

TODD, M.D. et al. The CAT-Tox assay: a sensitive and specific measure of stress-induced transcription in transformed human liver cells. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 28, p. 118-128, 1995.

UNIVERSITY OF OREGON. Institute of Neuroscience. Zebrafish Frequently Questions. Disponível em: <<http://www.neuro.uoregon.edu/>> Acesso em : 29 de outubro de 2004.

VAN DEN HEUVEL, J.P.; DAVIS, J.W. Molecular approaches to identify exposure and risk to specific environmental pollutants. **Biomarkers**, v. 4, p. 93-103, 1999.

WATKINS, R.E., et al. The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity. **Science**, v. 292, p. 2329-2333, 2001.

WAXMAN, D.J. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 369, p. 11-23, 1999.

WESTERFIELD, M. **The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Brachydanio rerio*)**. Editora Universidade de Oregon, Eugene, 2ª Edição, 300 pp., 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors**, 2002.

XIE, W., et al. Humanized xenobiotic response in mice expressing nuclear receptor SXR. **Nature**, v. 406, p. 435-439, 2000.

XIE, W., et al. An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. **Proceedings in National Academic of Science USA**, v. 98, p. 3375-3380, 2001.

XIE, W.; EVANS, R.M. Pharmaceutical use of mouse models humanized for the xenobiotic receptor. **DDT:Targets**, v. 7, n. 9, p. 509-515, 2002.

APÊNDICE A

EST utilizada para construção dos iniciadores utilizados na amplificação do cDNA do gene *PXR*

Número de Acesso: AF502918, seqüência parcial de RNA mensageiro.

Organismo: *Danio rerio*

Autores: Bainy,A.C.D. and Stegeman,J.J.

(Dados não publicados)

```
1  tatgcggcgt  acaaatctac  tggctatcac  tttaatgcca  tgacctgcga  gggctgcaaa
61  ggcttttgca  gacgtgcgat  gaagcgacca  gccagctct  gctgcccatt  tcagagcgcc
121  tgtgtcatca  ccaagagcaa  cagaagacag  tgccaatcct  gccggctaca  gaagtgcctc
181  tcaataggca  tgaagagaga  gctgatcatg  tcggatgagg  cggtgagaga  gcggaggttg
241  cagatcagga  ggaagaggat  gcaggaagag  cctgtaactc  tactcctca  acaggaagct
301  gtcatacaag  agctgcttaa  cgcacacaag  aaaaccttcg  acatgacttg  tgcccatttc
361  agtcagttcc  ggcctttaga  tcggggtcag  aagtctgtgt  ccgagtccag  tccagtcaca
421  aacggcagct  ggatc gatca  cagacccatc  gctgaagacc  cagtgcagtg  ggtcttcaac
481  tccacttcgc  tctcgtcctc  ttctccagc  taccagagcc  ttgacaaaga  gaagaagcac
541  tttaaaagtg  gcagcttcac  ctctctgcc  cacttcacag  acctcaccac  gtacatgatc
601  aagaatgtca  tcaacttcgg  gaagacgctg  acaatgttca  gggctctggt  tatggaggac
661  cagatctcgc  tgctgaaagg  tgccaccttt  gagatcattc  tgattcactt  caacatgttc
721  tttaatgaag  tgacgggaat  ttgggagtgc  ggccccctgc  agtactgcat  ggatgatgcc
781  tttcgagctg  gttttcagca  ccatctgctg  gacccaatga  tgaatttcca  ttacacactg
841  cgtaagctgc  gtttgcatga  ggaggagtat  gtgctgatgc  aggccctctc  tctcttttca
901  ccagatcgcc  ctgggtgtgac  agaccacaaa  gtgatcgacc  gcaaccagga  aacactagcg
961  cttaccctaa  agacttacat  tgagggc
```

APÊNDICE B

EST utilizada para construção dos iniciadores utilizados na amplificação do cDNA do gene *CYP3A*

Número de Acesso: AW202769, seqüência de RNA mensageiro.

Clone: fj22a02.y1

Organismo: *Danio rerio*

Autores: Clark,M., Johnson,S.L., Lehrach,H., Lee,R., Li,F., Marra,M., Eddy,S., Hillier,L., Kucaba,T., Martin,J., Beck,C., Wylie,T., Underwood,K., Steptoe,M., Theising,B., Allen,M., Bowers,Y., Person,B., Swaller,T., Gibbons,M., Pape,D., Harvey,N., Schurk,R., Ritter,E., Kohn,S., Shin,T., Jackson,Y., Cardenas,M., McCann,R., Waterston,R. and Wilson,R.

(Dados não publicados)

```
1 tcgaactccg tgttgaggag cggtggtgag cattagtgta catgagcatt tgttgtacac
61 tgaagaatac attgatttac aatgtgtgat ctctcgtctc tgtctgtgac ctggaccctg
121 gtggttctgg tcataaccct ccttttaatt tacggtgttt ggccacatgg atttttcaaa
181 aaactgggaa ttccaggacc aagacctttg ccatttgttg gcacggcttt atcatactct
241 aaaggcatct gtaattttga catagaatgt tctaagaagt atggaaaagt atgggggatc
301 tatgatggaa ggcttccatt gctacttggt actgatctgg aaatgatcaa aacgattttg
361 gtgaaagact gttattctac cttcactaac agacggaata tgaatccaga tttggttggc
421 ccttttgctg atggaataac attggttaaa gatgagaggt ggaggcgaat ccgaagttca
481 ctctctccat atttcactag tggacgactg aaggagatat ttcccattgc tatgacacat
541 gctgatcggt ttattgaaaa tatggaaaag aaagaccca atctgccact taaaatagaa
601 gatgttgtgg ctccatacag tttagatggt gtacgcagct cctccttcag cgttgactac
661 gactacatag acaaccctga tgatacgttg gtgaccagtc ataaaagttt atacaacatc
721 aatccaacca ggcttatctt ctgcttgtaa cttgtagtcc ctctg
```

APÊNDICE C

EST utilizada para construção dos iniciadores utilizados na amplificação do cDNA do gene *MDR1*

Número de Acesso: BQ284593, seqüência de RNA mensageiro.

Clone: fz85a08.y1

Organismo: *Danio rerio*

Autores: Clark,M., Johnson,S.L., Lehrach,H., Lee,R., Li,F., Marra,M., Eddy,S., Hillier,L., Kucaba,T., Martin,J., Beck,C., Wylie,T., Underwood,K., Steptoe,M., Theising,B., Allen,M., Bowers,Y., Person,B., Swaller,T., Gibbons,M., Pape,D., Harvey,N., Schurk,R., Ritter,E., Kohn,S., Shin,T., Jackson,Y., Cardenas,M., McCann,R., Waterston,R. and Wilson,R.

(Dados não publicados)

```
1 gcttatctgc atattgtgtc tgtttgcac agctgtgacc atcacatggg caacaagaat
61 actgtgtttt ccaatgaaa acggaccacc tgaagaatca acagaccccc caccctactc
121 gcatgaggcg atccctgagg gctttgtaaa cctcgcttac agccaagatg agaaacctca
181 tgaagacaaa ccagaggagc caccagtgta ctcaaagcac aaaggcaaaa agggaaaaaa
241 ctcaaaggac aacaaagagc caatgaaatc agttgggttt tttcaactgt ttcgctatgc
301 cacctgcca gaggtgttcc tcatgctgat cggcctcctc tgtgctgctg cccatggcgt
361 cgctttgcct ctcatgtgtg tagtgtttgg acaaatgact gacagctttg tgcagagtgg
421 gcagacgtac aatctgacag gcttcaatgg gaacttcacc tctaacttca ccttcaccct
481 caacaacact ttaacgtgtt tggctggttc accgaaata ggcatggaac ctaaaatgac
541 aaaacaagca tatttcttta tcggtatcgg gggcgagtt ctggtcctgg gaacgttcca
601 ggtcatgctt tttctgctta ctgctgcgaa gcaaacaag aggatccggc agaaatattt
661 tcatgccatc cttcaccagc agatgtcgtg gtttgacacg catcccatcg gagagctaaa
721 cattaga
```


APÊNDICE D

EST utilizada para construção dos iniciadores utilizados na amplificação do cDNA do gene β -ACTINA

Número de Acesso: NM_131031, seqüência de RNA mensageiro.

Organismo: *Danio rerio*

Referência: Kochilas,L.K., Potluri,V., Gitler,A., Balasubramanian,K. and Chin,A.J. Cloning and characterization of zebrafish tbx1. **Gene Expr. Patterns.** v. 3, n. 5, p. 645 – 651, 2003.

```
1  ggcacgagag  atcttcaactc  cccttggtca  caataaccta  ctaatacaca  gccatggatg
61  aggaaatcgc  tgccctggtc  gttgacaacg  gctccggtat  gtgcaaagcc  ggttttgctg
121 gagatgatgc  ccctcgtgct  gttttcccct  ccattggttg  acgaccaga  catcagggag
181 tgatggttg  catgggacag  aaagactcct  atgtgggaga  tgaggctcag  agcaagagag
241 gtatcctgac  cctcaaatac  cccattgagc  acggatttgt  gaccaactgg  gatgacatgg
301 agaagatctg  gcatcacacc  ttctacaatg  agctccgtgt  tgcccctgag  gagcacctg
361 tcgtgctcac  tgaggctccc  ctgaatcca  aagccaacag  agagaagatg  acacagatca
421 tgttcgagac  cttcaacacc  cctgccatgt  atgtggccat  ccaggctgtg  ctctctctgt
481 acgcttctgg  tcgtactact  ggtattgtga  tggactctgg  tgatggtgtg  acccacaccg
541 tgcccatcta  tgagggttac  gctcttccc  atgccatcct  gcgtctggat  ctagctggtc
601 gtgacctgac  agactacctg  atgaagatcc  tgaccgagcg  tggctacagc  ttcaccacca
661 cagccgaaa  agaaaattgtc  cgtgacatca  aggagaagct  gtgctatgtg  gccttgact
721 tcgagcagga  gatgggaacc  gctgcctct  ctctctccct  ggagaagagc  tatgagctgc
781 ctgacggtca  ggtcatcacc  atcggcaatg  agcgtttccg  ttgccccgag  gctctcttcc
841 agccttcct  cctgggtatg  gaatcttgcg  gtatccacga  gaccacctc  aactccatca
901 tgaagtgcga  cgtggacatc  cgtaaggacc  tgatgcca  cacagtgtg  tctggaggta
961 ccacatgta  ccctggcatt  gctgaccgta  tgcagaagga  aatcacctct  cttgtctcct
1021 ccacatgaa  gatcaagatc  attgctccc  ctgagcgcaa  atactccgtc  tggatcgggtg
1081 gctccatct  ggctccctg  tccaccttcc  agcagatgtg  gatcagcaag  caggagtacg
1141 atgagtctg  cccatccatc  gttcacagga  agtgcttcta  aacagaactg  ttgccacctt
1201 aaatggccta  gcaatgagat  tcaaacgaac  gaccaaccta  aactctcgaa  cagaacaaga
1261 tgacatcagc  atggcttctg  ctctgtatgg  cgcattgact  caggatgagg  aaactggcaa
1321 agggaggtag  ttgtctaaca  ggggagagct  ttccccgaga  ggacaacaat  gtacatttct
1381 tttagtcatt  ccagaagcgt  ttaccacttt  gccctcctca  caatgggctg  ccatgacctt
1441 tttgttatag  tgttttatgt  aaattatgta  ctgatacat  tgttttctt  tttgtacttc
1501 agccttaaac  ttggcccagt  ttgttattgt  tgcaatgagg  ggaaagcttt  accttttaa
1561 aagtgaagat  cttgcaggac  ttccctaggg  tatgtgaata  agggatgtcc  cttgaaaatg
1621 taagccaggg  tgtctctgta  cactgacaag  tcaacccaaa  taaaacgtgc  acatgtaaaa
1681 ccaaaaaaaaa  aaaaaaaaaa
```