UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Indução da produção de citocromo P-450 em
Saccharomyces cerevisiae

Míriam Cristina Sakuragui Matuo

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo

2007

Míriam Cristina Sakuragui Matuo

Indução da produção de citocromo P-450 em
Saccharomyces cerevisiae

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
orientadora/presidente

Prof. Tit. Adalberto Pessoa Junior
1^o. examinador

Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado
2^o. examinador

São Paulo, 13 de julho de 2007.

*Ao meu marido Lino
pelo amor, apoio e compreensão em todos os momentos*

*Ao meu filho Daniel
por todo amor e carinho dedicados*

*Aos meus pais Sueli e Jorge
pela orientação de vida, amor e dedicação*

*À Profª. Tt. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
pela orientação, confiança e pelo
constante apoio e incentivo*

*À Dra. Irene Satiko Kikuchi
pelo incentivo e amizade e pela
colaboração no desenvolvimento deste trabalho*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela oportunidade de realização do curso de mestrado e desenvolvimento deste trabalho

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

À Prof^ª. Dr^ª. Telma Mary Kaneko pelo constante apoio e incentivo ao longo do desenvolvimento deste projeto.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) pela doação de algumas das linhagens de levedura utilizadas neste trabalho.

Aos colegas do laboratório Juliano de Moraes Ferreira, Siliane Bertolini Kauskalief de Sousa, Elissa Arantes Ostrosky, Beatriz Rezende de Freitas, Anderson Cleiton Stevaux, Márcia Lombardo, pelo companheirismo.

Ao técnico do laboratório José de Souza Sobrinho pela atenção e companheirismo.

Ao Prof. Humberto Gomes Ferraz e Prof^ª. Vladi Olga Consiglieri pela concessão do uso do espectrofotômetro.

Ao Prof. Mário Hiroyuki Hirata e Prof^ª. Rosário Dominguez Crespo Hirata pelo uso da centrífuga e ultra freezer.

Aos colegas dos laboratórios físico químico e microbiológico do CONFAR pela concessão do uso de equipamentos e pelo companheirismo e presteza em todos os momentos.

A Coordenadoria do Programa de Pós Graduação em Fármaco e Medicamentos e aos funcionários Elizabeth C. de Souza Paiva, Elaine Midori, Jorge Lima e Majô pela atenção e dedicação.

Aos bibliotecários do Conjunto das Químicas pela presteza e colaboração sempre que solicitados.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP – monofosfato de adenosina

ATCC – American Type Culture Collection

EPA – Environmental Protection Agency

NADPH – fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo

NCYC – National Collection of Yeast Culture

rpm – rotações por minuto

UFC – unidades formadoras de colônia

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1- Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas neste trabalho e respectivas referências bibliográficas.....	14
Tabela 4.2- Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , cultivadas em glicose, nas concentrações de 2% (p/v) e 20 % (p/v), para determinação de citocromo P-450....	24
Tabela 5.1 – Crescimento celular máximo obtido, ao final da fase de crescimento exponencial, das linhagens ATCC 9080 e ATCC 2366, cultivadas em oito diferentes fontes de carbono, na concentração de 2 % (p/v).....	30
Tabela 5.2- Crescimento celular e concentração de citocromo P-450 máximos obtidos em linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , cultivadas em 2 % (p/v) e 20 % (p/v) de glicose.	49
Tabela 5.3- Crescimento celular e concentração de citocromo P-450 máximos obtidos na linhagem ATCC 44953 (NCYC 240), cultivada em 2 % (p/v) e 20 % (p/v) de glicose, com e sem adição de 2 % de etanol (v/v).	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1- Grupo heme de diferentes citocromos	4
Figura 2.2- Esquema do mecanismo de ação do citocromo P-450. SH representa o substrato e SOH o produto da reação	5
Figura 4.1- Etapas do estudo de indução da produção de citocromo P-450 em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
Figura 4.2- Sistema para injeção de gás monóxido de carbono na amostra.....	22
Figura 5.1 – Curvas de crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9080, cultivada em oito diferentes fontes de carbono.	28
Figura 5.2 – Curvas de crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 2366, cultivada em oito diferentes fontes de carbono.	29
Figura 5.3- Espectro da suspensão de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 2366, obtida através do Método de Omura e Sato (1964).	34
Figura 5.4- Espectro de S9 mix (Rat liver LS-9), do fabricante Moltox [®] , evidenciando um pico de absorção em torno de 450 nm, característico do citocromo P-450.....	35
Figura 5.5- Concentrações de citocromo P-450 obtidas em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9080, cultivada em glicose, sacarose e manose, na concentração de 2 % (p/v).	37
Figura 5.6- Curvas de crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9080, cultivada em glicose, nas concentrações de 2 % (p/v) e 20 % (p/v).....	41
Figura 5.7- Curvas de crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 2366, cultivada em glicose, nas concentrações de 2 % (p/v) e 20 % (p/v).....	41
Figura 5.8- Curvas de crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 201137 (D7), cultivada em glicose, nas concentrações de 2 % (p/v) e 20 % (p/v).....	42
Figura 5.9- Curvas de crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 44953 (NCYC 240), cultivada em glicose, nas concentrações de 2 % (p/v) e 20 % (p/v). ...	42
Figura 5.10- Concentrações de citocromo P-450 em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9080, durante cultivo em 2 % de glicose (p/v) e 20 % de glicose (p/v).....	43

Figura 5.11- Concentrações de citocromo P-450 em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 2366, durante cultivo em 2 % de glicose (p/v) e 20 % de glicose (p/v).....	44
Figura 5.12- Concentrações de citocromo P-450 em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 201137 (D7), durante cultivo em 2 % de glicose (p/v) e 20% de glicose (p/v).	45
Figura 5.13- Concentrações de citocromo P-450 em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 44953 (NCYC 240), durante cultivo em 2 % de glicose (p/v) e 20 % de glicose (p/v).	46
Figura 5.14- Curvas de crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 44953 (NCYC 240), cultivada em 2 % de glicose (p/v) e em 2 % de glicose (p/v), com adição de 2 % de etanol (v/v).	52
Figura 5.15- Curvas de crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 44953 (NCYC 240), cultivada em 20 % de glicose (p/v) e em 20 % de glicose (p/v), com adição de 2 % de etanol (v/v).	53
Figura 5.16- Concentrações de citocromo P-450 em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 44953 (NCYC 240), cultivada em 2 % de glicose (p/v) e em 2 % de glicose (p/v), com adição de 2 % de etanol (v/v).	54
Figura 5.17- Concentrações de citocromo P-450 em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 44953 (NCYC 240), cultivada em 20 % de glicose (p/v) e em 20 % de glicose (p/v), com adição de 2 % de etanol (v/v).	56

Indução da produção de citocromo P-450 em *Saccharomyces cerevisiae*

RESUMO

Saccharomyces cerevisiae tem sido empregada como modelo experimental em testes de mutagenicidade, devido à presença de um sistema citocromo P-450 capaz de metabolizar substâncias promutagênicas a sua forma ativa. O grande número de linhagens e as diferenças na capacidade de produção de citocromo P-450 dificultam a definição das condições ideais de cultivo para obtenção de células com alto conteúdo desta enzima, sendo que poucos são os trabalhos publicados a este respeito. O objetivo deste trabalho é avaliar as melhores condições de cultivo para produção de citocromo P-450 em *S. cerevisiae*. Para tanto, quatro diferentes linhagens foram cultivadas sob diferentes condições, a fim de avaliar a influência de fatores como fonte de carbono, tempo de incubação e adição de etanol ao meio de cultura. Foi verificado que células cultivadas na presença de fontes de carbono altamente fermentáveis e coletadas no final da fase de crescimento exponencial apresentavam o maior conteúdo da enzima. Observou-se também que o nível de citocromo P-450 variou entre as linhagens estudadas, bem como o tempo de incubação para atingir a concentração máxima, sendo que o conteúdo mais alto foi encontrado na linhagem ATCC 44953. A adição de 2 % de etanol (v/v) ao meio de cultura contendo 2 % de glicose (p/v) resultou em aumento do nível de citocromo P-450, indicando o efeito indutor do etanol. Os resultados deste trabalho mostram a importância de estabelecer condições de cultivo para obtenção de células com altas concentrações da enzima, uma vez que fatores como a composição do meio de cultura, o tempo de incubação e a linhagem empregada podem influenciar a produção de citocromo P-450 por *S. cerevisiae*.

Palavras-chave: Citocromo P-450, *Saccharomyces cerevisiae*, Condições de cultivo.

Induction of cytochrome P450 production in *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

Saccharomyces cerevisiae has been employed as experimental model in mutagenicity tests due to the presence of a cytochrome P-450 system capable of metabolizing promutagens to its active form. The large number of *S.cerevisiae* strains and their different capacity of producing cytochrome P-450 make the definition of the ideal cultivation conditions to obtain cells with high enzyme content difficult. Moreover, there are only a few reports related to this subject. The aim of this work is evaluate the ideal cultivation conditions to produce cytochrome P-450 by *S. cerevisiae*. For this purpose, four different *S. cerevisiae* strains were cultured under different cultivation conditions in order to evaluate the influence of factors such as carbon source, incubation time and addition of ethanol to the culture media. It was found that the cytochrome P-450 content was higher in cells growth on strongly fermentable carbon source and harvested at the end of the exponential growth phase. Our results also showed that the cytochrome P-450 concentration varied among the strains studied, as well as the incubation time to reach the maximum level. The highest content was found in the ATCC 44953 strain and the addition of 2 % ethanol (w/w) to the culture media containing 2 % glucose (w/v) increased the cytochrome P-450 amount, indicating the induction of cytochrome P-450 production by ethanol action. These results show the importance of establishment of the cultivation conditions to obtain cells with high cytochrome P-450 concentrations, considering that factors such as the culture media, incubation time and strain employed can influence the cytochrome P-450 production by *S.cerevisiae*.

Keywords: Cytochrome P-450, *Saccharomyces cerevisiae*, Cultivation conditions

ÍNDICE

1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	3
2.1. Sistema citocromo P-450 e suas propriedades espectrais.....	3
2.2. Estrutura química e multiplicidade de formas.....	3
2.3. Mecanismo de ação	4
2.4. Citocromo P-450 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
2.5. Aplicações do citocromo P-450	7
2.6. Vantagens do uso de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo experimental ...	8
2.7. Fatores que influenciam a produção de citocromo P-450 em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
3. Objetivo	13
4. Material e Método.....	14
4.1. Microrganismo.....	14
4.2. Meio de cultura.....	15
4.3. Manutenção das cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
4.4. Indução da produção de citocromo P-450 em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
4.4.1. Curvas de crescimento das linhagens ATCC 9080 e ATCC 2366	18
4.4.2. Influência da fonte de carbono na produção de citocromo P-450 pela linhagem ATCC 9080	19
4.4.2.1. Cultivo da linhagem e preparação das amostras para determinação de citocromo P-450	19
4.4.2.2. Determinação de citocromo P-450 pelo método de Omura e Sato (1964) ..	21

4.4.3. Avaliação da produção de citocromo P-450 em diferentes linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
4.4.4. Efeito da adição de etanol ao meio de cultura na produção de citocromo P-450 pela linhagem ATCC 44953	25
5. Resultado e discussão	27
6. Conclusão	60
7. Referências bibliográficas	61

1. Introdução

O sistema citocromo P-450 consiste em um grupo de enzimas presente em microrganismos eucariontes, plantas e animais, capazes de metabolizar uma grande variedade de substâncias endógenas, como esteróides, eicosanóides, ácidos graxos, lipídios e retinóides, ou xenobióticos, como procarcinogênicos, antioxidantes, solventes orgânicos, anestésicos, corantes, pesticidas, álcoois, aromatizantes e flavorizantes, além de substâncias encontradas em plantas e microrganismos, que embora sejam de origem biológica, são estranhas aos animais (COON et al, 1992).

Os inúmeros substratos e reações catalisadas garantem ao sistema citocromo P-450 uma notável versatilidade e grande potencial de aplicação. Dentre as diversas aplicações podemos citar seu emprego em testes de mutagenicidade *in vivo* como o Teste de Ames que, desde 1973 é realizado utilizando o sistema citocromo P-450 extraído de fígado de rato, conhecido como S9 mix.

A possibilidade de substituição do S9 mix pelo citocromo P-450 de *Saccharomyces cerevisiae* que, em determinadas condições, é também capaz de produzir a enzima, levou ao desenvolvimento deste trabalho, uma vez que para tornar possível a utilização de citocromo P-450 de levedura, é necessário, primeiramente, estabelecer as condições de cultivo que induzem sua produção.

Muitas pesquisas apontam o potencial do citocromo P-450 e suas aplicações tecnológicas, mas pouco tem sido pesquisado com relação às condições de cultivo para induzir a produção da enzima em *Saccharomyces cerevisiae*. Os poucos trabalhos encontrados relacionados a este tema, além de

antigos, são controversos, sendo que foram realizados cada um com uma linhagem diferente e considerando as variações existentes entre diferentes cepas, torna-se difícil, com base nestes trabalhos, estabelecer as condições ideais de cultivo.

Portanto, neste trabalho é apresentado um estudo sobre a indução da produção de citocromo P-450 em *Saccharomyces cerevisiae*, através do cultivo sob diferentes condições, permitindo avaliar a influência de fatores como fonte de carbono e tempo de incubação na produção de citocromo P-450. O emprego de etanol como agente indutor e a capacidade de produção de citocromo P-450 por diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* também foram avaliados.

A obtenção de células de *Saccharomyces cerevisiae* com alto conteúdo de citocromo P-450 deverá contribuir para melhorar a qualidade e confiabilidade dos resultados de testes de mutagenicidade, considerando que a ação biológica de muitas substâncias químicas é estritamente dependente de altos níveis de citocromo P-450 (BUSCHINI; POLI; ROSSI, 2003), além de otimizar e reduzir custos não apenas em testes de mutagenicidade *in vitro*, mas também no desenvolvimento de novos fármacos e em qualquer outro estudo onde haja envolvimento do citocromo P-450.

2. Revisão de literatura

2.1. Sistema citocromo P-450 e suas propriedades espectrais

A descoberta do sistema citocromo P-450, em fígado de roedores, ocorreu por Klingenberg (1958) e Garfinkel (1958). Anos mais tarde, este sistema enzimático foi caracterizado por Omura e Sato (1962, 1964), que observaram um pico de absorção em torno de 450 nm ao adicionar monóxido de carbono (CO) ao grupo de enzimas, previamente reduzidas com ditionito de sódio. A partir daí, a denominação citocromo P-450 passou a ser adotada, porém sua função ainda era desconhecida e seu envolvimento no metabolismo de compostos carcinogênicos, fármacos e esteróides só foi demonstrado em 1965 (OMURA et al., 1965).

2.2. Estrutura química e multiplicidade de formas

As enzimas denominadas citocromo são hemoproteínas cujo grupo prostético heme é composto por quatro anéis pirrólicos unidos por pontes —CH= , formando a molécula planar porfirina, sendo que no centro desta estrutura encontra-se um átomo de ferro, oscilando entre os estados reduzido (Fe^{2+}) e oxidado (Fe^{3+}) (JONES; POOLE, 1985).

De acordo com a natureza do grupo prostético heme, essas enzimas são divididas em 4 grupos: *a*, *b*, *c* e *d*, sendo que cada grupo apresenta diferentes cadeias laterais em suas porfirinas, como mostra a figura 2.1 (KÄPPELI, 1986).

Figura 2.1- Grupo heme de diferentes citocromos (KÄPPELI,1986)

No grupo de enzimas *b* encontra-se o sistema citocromo P-450, que por sua vez apresenta múltiplas isoformas, sendo que cerca de 2700 já foram identificadas (WISEMAN, 2003). Esta multiplicidade de formas tornou necessária a divisão do sistema citocromo P-450 em famílias, tendo por base informações como reações catalisadas, substratos e propriedades espectrais (COON et al, 1992). Das 74 famílias de citocromo P-450 descritas, 14 estão presentes em todos os mamíferos, sendo que destas, fazem parte 26 subfamílias (SAKAKI; INOUE, 2000).

2.3. Mecanismo de ação

O ciclo de reação do citocromo P-450 está representado na Figura 2.2. e envolve: (1) ligação da enzima ao substrato, no sítio ativo (grupo heme); (2) transferência do primeiro elétron do NADPH, via NADPH-P450 redutase para o citocromo P-450; (3) incorporação de uma molécula de oxigênio e transferência

do segundo elétron para o átomo de ferro, via NADPH-P450 redutase e citocromo b_5 ; (4) clivagem da ligação O-O e liberação de uma molécula de água; (5) retirada do átomo de hidrogênio do substrato e adição do grupo hidroxila; (6) liberação do produto resultante (SAKAKI; INOUE, 2000).

Figura 2.2- Esquema do mecanismo de ação do citocromo P-450. SH representa o substrato e SOH o produto da reação (SAKAKI; INOUE, 2000).

2.4. Citocromo P-450 de *Saccharomyces cerevisiae*

A presença de citocromo P-450 em microrganismos eucariontes foi detectada inicialmente em *Saccharomyces cerevisiae* por Lindenmayer e Smith (1964) e mais tarde por Ishidate et al. (1969).

Yoshida e Kumaoka (1972, 1975) demonstraram que o sistema citocromo P-450 de células de *Saccharomyces cerevisiae* e de mamíferos apresentam propriedades físicas e químicas semelhantes. Em 1973, Duppel, Lebeault e Coon concluíram que existem grandes similaridades entre o sistema citocromo P-450 de levedura e de fígado de mamífero, com relação à organização estrutural e

transporte de elétrons. Alexander, Mitropoulos e Gibbons (1974) constataram que tanto na levedura como em célula de mamífero, o sistema citocromo P-450 está envolvido no metabolismo de esteróides: biossíntese de ergosterol, na levedura, e colesterol em mamíferos.

A semelhança entre a interação de compostos carcinogênicos com citocromo P-450 de *Saccharomyces cerevisiae* e de mamífero foi demonstrada anos mais tarde por Kelly et al. (1985).

Desde então, muitos avanços ocorreram na pesquisa do citocromo P-450, sendo que 57 genes para codificação deste sistema são conhecidos em humanos (INGELMAN-SUNDBERG, 2005). Em *Saccharomyces cerevisiae* alguns genes já foram identificados, sendo que, um deles (*CYP 51*) está também presente em humanos (WISEMAN, 2003; BUSCHINI; POLI; ROSSI, 2003).

Estudos têm sido realizados visando compreender melhor o mecanismo de ação, a regulação e as reações bioquímicas (PORTER, 2003), bem como trabalhos envolvendo a análise de metabólitos do sistema citocromo P-450 de humanos (LUTZ; MARKLING; MASIMIREMBWA, 2002). Porém apesar destes avanços, muito ainda deve ser estudado a respeito das similaridades entre o sistema enzimático de humanos e de levedura, como por exemplo, se os metabólitos produzidos por ambos os sistemas são equivalentes.

2.5. Aplicações do citocromo P-450

- **Teste de mutagenicidade *in vitro* (Teste de Ames)**: desde 1973 o sistema citocromo P-450 tem sido utilizado em um teste de mutagenicidade *in vitro*, conhecido como Teste de Ames, no qual uma substância potencialmente mutagênica é testada em diferentes cepas de *Salmonella typhimurium*, geneticamente modificadas. A este teste, é adicionado um sistema enzimático, contendo citocromo P-450 (S9 mix) extraído de fígado de rato, a fim de metabolizar substâncias pró-mutagênicas à forma ativa (MORTELMANS; ZEIGER, 2000), porém este fator pode ser considerado uma desvantagem devido à ativação metabólica ocorrer de maneira exógena. Desta forma, o uso de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo experimental tem sido proposto como vantajoso considerando que a levedura apresenta um sistema citocromo P-450 endógeno (ROSSI et al., 1997; BUSCHINI; POLI; ROSSI, 2003; LICHTENBERG-FRATÉ et al., 2003).

- **Desenvolvimento de novos fármacos e terapia gênica**: citocromo P-450 de *Saccharomyces cerevisiae* pode ser utilizado para investigar o potencial de mutagenicidade não apenas do fármaco em desenvolvimento, como também de seus metabólitos, além disso pode ser empregado no estudo da ativação metabólica de pró-carcinogênicos e outros fármacos. Terapia gênica baseada no citocromo P-450 tem sido desenvolvida e um exemplo é o tratamento de câncer. Sendo este sistema capaz de converter anti-cancerígenos à sua forma ativa, a terapia gênica busca entregar a droga nas células tumorais, a fim de que sua ativação, pelo sistema citocromo P-450, ocorra no local do tumor, permitindo o

uso de doses reduzidas, e desta forma, aumentando a segurança e eficácia dos anti-cancerígenos. (WAXMAN et al., 1999).

- **Monitoramento ambiental**: na área ambiental, o citocromo P-450 *Saccharomyces cerevisiae* tem sido utilizado, em testes de mutagenicidade *in vitro*, para detecção de poluentes mutagênicos em amostras de solo, água e ar (TERZIYSKA; WALTSCHEWA; VENKOV, 2000).

- **Desenvolvimento de antifúngicos**: Outra aplicação inclui o uso do citocromo P-450 de *Saccharomyces cerevisiae* em desenvolvimento de compostos com atividade fungicida, uma vez que muitos são capazes de inibir sua atividade (KÄPPELI, 1986), como é o caso do butiobato e diclobutrazol (HONECK; SCHUNCK; MÜLLER, 1985).

2.6. Vantagens do uso de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo experimental

Os testes de mutagenicidade *in vivo*, como já sabemos, são bastante caros além de consumir muito tempo, podendo demorar meses ou anos. Desta forma, foram desenvolvidos testes *in vitro*, como uma alternativa mais barata e rápida para identificação de substâncias mutagênicas.

O uso de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo celular em teste de mutagenicidade, apresenta algumas vantagens em relação ao uso de *Salmonella typhimurium*. A presença de um sistema citocromo P-450 endógeno permite que a

ativação metabólica ocorra dentro da célula, dispensando o transporte do metabólito produzido, evitando assim o risco de perda, no caso de instabilidade deste metabólito, o que prejudicaria sua interação com o material genético da célula (KÄPPELI, 1986).

Devemos considerar também, a possibilidade de futuramente, produzir as enzimas do sistema citocromo P-450 em larga escala, assim como é feito atualmente, na produção do sistema de ativação metabólica S9 mix, extraído de fígado de rato. O cultivo de células de *Saccharomyces cerevisiae* com alto conteúdo de citocromo P-450 minimizaria e até dispensaria o uso de animais para produção da enzima, portanto reduzindo custos com manutenção de biotérios.

Ao contrário das bactérias que são procariontes, a levedura é um microrganismo eucarionte, assim como as células de mamíferos e portanto apresentam organização celular semelhantes. A vantagem do uso de células de levedura, em relação às células de mamífero, está na possibilidade de estudo sob diferentes condições e facilidade de cultivo (KÄRENLAMPI; MARIN; HÄNNINEN, 1980).

Além disso, a pesquisa envolvendo o citocromo P-450 hepático é bastante complicada, pois em mamíferos são expressas múltiplas formas da enzima, já nas células de levedura, este sistema é menos complexo, o que torna mais acessível o estudo das reações e dos mecanismos de interação dos componentes do sistema citocromo P-450 (KÄPPELI, 1986).

Por fim, a levedura também apresenta a vantagem de servir como “hospedeiro” de genes para codificação do sistema citocromo P-450 de mamíferos (BERNHARDT, 2006), como mostram os estudos realizados com genes de bovinos que, ao serem expressos em *Saccharomyces cerevisiae*,

produziram o metabólito correspondente ao liberado por células de mamíferos (SAKAKI; INOUE, 2000).

2.7. Fatores que influenciam a produção de citocromo P-450 em *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae são microrganismos anaeróbicos facultativos e, de acordo com as condições de cultivo, o seu metabolismo e a síntese de citocromo P-450 podem ser influenciados (KÄRENLAMPI; MARIN; HÄNNINEN, 1981).

Rogers e Stewart (1973) em seus estudos concluíram que *S.cerevisiae* não produz citocromo P-450 em condições estritamente anaeróbicas, mas que sua produção máxima, ocorre em meio de cultura com baixo nível de oxigênio.

O substrato utilizado para promover o crescimento de *S. cerevisiae*, ou seja, a fonte de carbono e energia, também exerce um importante papel na modificação do metabolismo da levedura e conseqüentemente na produção de citocromo P-450. Kärenlampi, Marin e Hänninen (1981) constataram que a síntese de citocromo P-450 ocorreu na presença de açúcares altamente fermentáveis ou que permitiam fermentação e respiração. Porém, na presença de substratos não fermentáveis nenhum citocromo P-450 foi detectado.

A concentração do açúcar no meio de cultura pode ser também um dos fatores que influenciam o nível de citocromo P-450 em levedura. Von Borstel et al. (1985), em seus estudos com *S. cerevisiae* D5, concluíram que em 2 % e 20 % de glicose não ocorrem diferenças de produção de citocromo P-450. Morita e Mifuchi

(1983), também encontraram o mesmo conteúdo de citocromo P-450 em *S. cerevisiae* D7 incubada na presença de 2 e 10 % de glicose. Porém, Wiseman, Lim e McCloud (1975) concluíram que altas concentrações de glicose produzem elevados níveis de citocromo P-450 na linhagem NCYC 240. Da mesma forma, Del Carratore et al. (1983), ao utilizarem *S. cerevisiae* D7, demonstraram que o nível mais elevado da enzima é atingido em 20 % de glicose. Kelly e Parry (1983) também concluíram que altas concentrações de glicose podem aumentar o nível de citocromo P-450 nas linhagens D6 e JD1, além de aumentar sua estabilidade nas células.

O tempo de incubação é outro fator que parece influenciar a produção de citocromo P-450, que varia ao longo do crescimento celular. Segundo Wiseman et al. (1975) e Callen e Philpot (1977), a concentração de citocromo P-450 atinge o máximo durante a fase de crescimento exponencial, porém ao atingir a fase estacionária, esta concentração diminui rapidamente.

O etanol também parece estar relacionado com a indução da produção de citocromo P-450. Del Carratore et al. (1984) demonstraram que baixa concentração de etanol (entre 1 % e 2,5 %) adicionada ao meio de cultura, contendo 2 % de glicose, produz um aumento na produção de citocromo P-450, sendo que concentrações acima de 3 % provocam redução do nível desta enzima. Da mesma forma, Morita e Mifuchi (1984), em seus estudos, concluíram que a adição de etanol nas concentrações de 1,5 % ou 3 % ao meio de cultura, pode provocar um aumento no conteúdo de citocromo P-450, em células de *S. cerevisiae* cultivadas em 2 % de glicose e que o etanol parece também inibir a degradação de citocromo P-450. Porém este efeito não foi observado com outros tipos de álcool, em que a velocidade de perda do citocromo P-450 é tanto mais

acelerada quanto maior o comprimento da cadeia do álcool (BLATIAK et al., 1985,1987).

3. Objetivo

Os principais objetivos deste trabalho consistem em:

- Avaliar o efeito de diferentes fontes de carbono, no crescimento celular e na produção de citocromo P-450, em *Saccharomyces cerevisiae*
- Determinar o tempo de incubação ideal para obtenção de células com alto nível de citocromo P-450
- Induzir a produção de citocromo P-450 em *Saccharomyces cerevisiae* por adição de etanol ao meio de cultura
- Comparar o nível de citocromo P-450 entre diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

4. Material e Método

4.1. Microrganismo

Neste trabalho, quatro linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foram empregadas, como mostra a Tabela 4.1.

Tabela 4.1- Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas neste trabalho e respectivas referências bibliográficas

Linhagem	Referência
ATCC 9080	HATA et al., 1981 ARNEZEDER; HAMPEL, 1981
ATCC 2366	DELITHEOS; KARAVOKYROS; TILIGADA, 1995 TILIGADA; DELITHEOS, 1993
ATCC 201137	MORITA; MIFUCHI, 1984 DEL CARRATORE et al., 1984
ATCC 44953	WISEMAN; LIM; McCLOUD, 1975 KÄRENLAMPI; MARIN; HÄNNINEN, 1981 KING; AZARI; WISEMAN, 1988

4.2. Meio de cultura

Meio base

Para incubação das diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizado um meio de cultura base composto de (KÄRENLAMPI; MARIN; HÄNNINEN, 1981; KING et al., 1985; BLATIAK et al., 1987; WISEMAN; LIM; McCLOUD, 1975; KELLY; PARRY, 1983):

- 1 % de extrato de levedura (p/v)
- 2 % de peptona (p/v)
- 0,5 % de NaCl (p/v)

Suplementos:

- Fontes de carbono:

Foram utilizadas neste trabalho oito fontes de carbono que podem ser classificadas, de acordo com a forma de metabolização pela levedura, em (KÄRENLAMPI; MARIN; HÄNNINEN, 1981):

- Altamente fermentáveis: glicose, sacarose e frutose
- Respiração / Fermentação simultaneamente: manose, galactose, maltose
- Não fermentáveis: lactose, glicerina

- Agente indutor: etanol 2 % (v/v) (MORITA; MIFUCHI, 1984; DEL CARRATORE et al, 1984).

O meio base contendo as diferentes fontes de carbono foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos. No caso das fontes de carbono frutose e sacarose foi realizada a esterilização por filtração, utilizando membrana de éster de celulose Millipore®, 47 mm de diâmetro e 0,22 µ de poro e à seguir adicionados ao meio base previamente autoclavado. Etanol foi adicionado ao meio de cultura previamente autoclavado e resfriado.

4.3. Manutenção das cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

As cepas foram estocadas em tubos contendo ágar inclinado (Ágar Sabouraud dextrose), à temperatura de geladeira, sendo a manutenção realizada através de repiques mensais, de, no máximo, 5 passagens, com incubação a 30°C por 24 - 48 horas.

4.4. Indução da produção de citocromo P-450 em *Saccharomyces cerevisiae*

O estudo da indução de citocromo P-450 em *Saccharomyces cerevisiae* foi realizado em diversas etapas, como mostra a figura 4.1.

Figura 4.1- Etapas do estudo de indução da produção de citocromo P-450 em *Saccharomyces cerevisiae*

Inicialmente foram obtidas curvas de crescimento das linhagens ATCC 9080 e ATCC 2366 que permitiram, além de comparar o crescimento celular da levedura cultivada em meio de cultura contendo diferentes fontes de carbono, determinar a fase de crescimento exponencial, onde ocorre a maior concentração de citocromo P-450 (WISEMAN; LIM; McCLOUD, 1975).

Com base na massa celular obtida no cultivo em diferentes fontes de carbono, quatro destas fontes foram selecionadas para determinação de citocromo P-450. A fonte de carbono que induziu maiores concentrações da enzima e promoveu maior crescimento celular foi utilizado na fase seguinte, na qual a produção de citocromo P-450 foi avaliada em quatro diferentes linhagens, sendo que a cepa que produziu maiores níveis da enzima foi selecionada para a etapa final do trabalho.

Na última etapa, a levedura foi cultivada em meio de cultura com adição de 2 % (v/v) de etanol, a fim de avaliar o efeito indutor do etanol na produção de citocromo P-450.

4.4.1. Curvas de crescimento das linhagens ATCC 9080 e ATCC 2366

A partir de uma cultura de 24 h em ágar inclinado, células das linhagens ATCC 9080 e ATCC 2366 foram transferidas, com auxílio de uma alça de 1 μ L, para erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio base e as fontes de carbono glicose, sacarose, manose, maltose, frutose, lactose, galactose e glicerina, separadamente, na concentração de 2 % (p/v).

A incubação foi realizada a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ em banho maria com agitação orbital a 120 rpm (BLATIAK et al., 1987; KING et al., 1985).

Em tempos correspondentes ao momento anterior ao início da incubação, após 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, e 28 h de incubação, amostras foram coletadas e submetidas à diluição seriada em solução salina 0,9 % (p/v). A seguir foi realizada contagem de células viáveis, em triplicata, pela técnica de semeadura em profundidade ou “*Pour Plate*” (USP 28, 2005), empregando como meio de cultura ágar Sabouraud dextrose 2 % e incubação a 30 °C por 24 – 48 h. Com base nas contagens de células viáveis em função do tempo foram obtidas curvas de crescimento.

4.4.2. Influência da fonte de carbono na produção de citocromo P-450 pela linhagem ATCC 9080

4.4.2.1. Cultivo da linhagem e preparação das amostras para determinação de citocromo P-450

A partir de uma cultura de 24 h em ágar inclinado, células da linhagem ATCC 9080 foram transferidas, com auxílio de uma alça de 1 µL, para erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio base e as fontes de carbono glicose, sacarose, manose e glicerina, separadamente, na concentração de 2 % (p/v). A concentração celular inicial correspondeu a 10^5 cél/mL, determinada pela contagem de células viáveis, empregando a técnica “*Pour Plate*”).

A incubação foi realizada a 30 °C $\pm$ 1 °C em banho maria, com agitação orbital a 120 rpm, por períodos correspondentes a 6 h, 8 h, 12 h e 16 h, primeiramente para as células cultivadas em glicose. Estes tempos de incubação,

correspondentes à fase de crescimento exponencial, foram determinados com base nas curvas de crescimento realizadas conforme item 4.4.1.

Após o período de incubação, as células foram coletadas por centrifugação, a seguir lavadas, de duas a três vezes, com solução tampão de fosfato 0,1 M, pH 7,4, e ressuspensas na mesma solução. A concentração celular foi ajustada para cerca de 10^9 células/mL (BUSCHINI, POLI; ROSSI, 2003).

Uma alíquota de 1,0 mL foi retirada para confirmação da concentração celular final, realizada através de diluição seriada e contagem de células viáveis, pela técnica "*Pour Plate*". A concentração de citocromo P-450 foi determinada nesta suspensão de células, pelo Método de Omura e Sato (1964).

Após determinado o tempo de incubação necessário para atingir a concentração máxima de citocromo P-450 em células cultivadas em glicose, o qual correspondeu a 12 h de incubação, foi realizado o cultivo em manose, sacarose e glicerina, incubadas sob as mesmas condições que em glicose, ou seja, em banho maria a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, com agitação orbital a 120 rpm, porém por um período de 12 h, correspondente ao tempo necessário para atingir a concentração máxima de citocromo P-450. As células foram então coletadas e preparadas conforme descrito anteriormente.

Com base nos resultados obtidos na determinação da concentração de citocromo P-450 em diferentes fontes de carbono, foi selecionada a glicose, como açúcar que induziu maior produção da enzima, sendo portanto empregada nas etapas seguintes deste trabalho.

4.4.2.2. Determinação de citocromo P-450 pelo método de Omura e Sato (1964)

A concentração de citocromo P-450 foi determinada em suspensão de células, seguindo o método proposto por Omura e Sato (1964).

Para tanto, 5 mg de ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) foram adicionados em 1,0 mL de amostra e a seguir, homogeneizada em vórtex. O ditionito de sódio reduz o Fe^{+3} do centro do grupo heme do citocromo P-450 à forma Fe^{+2} (STANSFIELD; KELLY, 1996)

Após 2 minutos (tempo necessário para redução do Fe^{+3} a Fe^{+2}), a amostra assim tratada, foi transferida para uma cubeta e realizada a varredura no espectrofotômetro Beckman Coulter® modelo DU 640, no comprimento de onda entre 390 nm e 500 nm.

A seguir, o gás CO (monóxido de carbono - pureza mínima 99,0 %, fornecedor White Martins®) foi injetado na amostra por cerca de 20 segundos, a uma vazão inferior a 0,3 L / min, como mostra a Figura 4.1. Após cerca de 2 – 3 minutos, investigou-se a formação do complexo CO – citocromo P-450, efetuando novamente a varredura entre 390 nm e 500 nm (o monóxido de carbono é capaz de formar um complexo com a enzima citocromo P-450, absorvendo luz próximo a 450 nm).

Figura 4.2- Sistema para injeção de gás monóxido de carbono na amostra.

A concentração de citocromo P-450 foi calculada pela equação abaixo:

$$[\text{P450}] \text{ (mM)} = (\Delta A_{450} - \Delta A_{490}) / 91 \text{cm}^{-1} \text{mM}^{-1}$$

onde,

[P450] = Concentração de citocromo P-450

ΔA_{450} = Diferença de absorção em 450 nm

ΔA_{490} = Diferença de absorção em 490 nm

$91 \text{cm}^{-1} \text{mM}^{-1}$ = Coeficiente de extinção

4.4.3. Avaliação da produção de citocromo P-450 em diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

Curvas de crescimento foram obtidas, como descrito no item 4.4.1, para as linhagens ATCC 9080, ATCC 2366, ATCC 210037 e ATCC 44953, cultivadas em meio base contendo 2 % (p/v) e 20 % (p/v) de glicose. Com base nestas curvas, foi determinada a fase de crescimento exponencial para cada linhagem.

A determinação da concentração de citocromo P-450 nas diferentes linhagens foi realizada transferindo, com auxílio de uma alça de 1 µL, células de culturas de 24 h em agar inclinado para erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio base e glicose, nas concentrações de 2 % (p/v) e 20 % (p/v). A concentração celular inicial correspondeu a 10^5 cél/mL, determinada pela contagem de células viáveis (Técnica “*Pour Plate*”). A incubação foi realizada em banho maria a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, com agitação orbital a 120 rpm.

Os tempos de incubação para determinação de citocromo P-450 foram diferentes para cada cepa estudada, como mostra a Tabela 4.2, devido a variações nas curvas de crescimento, uma vez que as linhagens atingiram a fase de crescimento exponencial em diferentes tempos de incubação.

Tabela 4.2- Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, cultivadas em glicose, nas concentrações de 2% (p/v) e 20 % (p/v), para determinação de citocromo P-450.

Linhagem (ATCC)	Concentração de glicose (%)	Tempo de incubação (h)
9080	2	6, 8, 12, 16
	20	6, 8, 12, 16, 20, 22, 24
2366	2	6, 8, 10, 12, 16
	20	6, 8, 10, 12, 16, 20
201137	2	8, 12, 16, 24
	20	16, 20, 24, 32
44953	2	12, 20, 28, 32, 40
	20	12, 24, 28, 32, 40

Após o período de incubação, as células foram coletadas por centrifugação. A coleta por filtração, utilizando membrana de éster de celulose Millipore®, 0,45 µm de poro e 47 mm de diâmetro, foi também realizada quando a concentração celular era reduzida, necessitando, portanto de um volume maior da suspensão.

As células coletadas foram lavadas, de duas a três vezes, com solução tampão de fosfato 0,1 M, pH 7,4, e ressuspensas na mesma solução tampão. A concentração celular foi ajustada para cerca de 10⁹ células/mL (BUSCHINI, POLI; ROSSI, 2003).

Uma alíquota de 1,0 mL foi retirada para confirmar a concentração celular final. Esta confirmação foi feita através de diluição seriada e contagem de células viáveis, pela técnica "*Pour Plate*".

A concentração de citocromo P-450 foi determinada na suspensão de células, seguindo o método proposto por Omura e Sato (1964), conforme descrito no item 4.4.2.2.

Com base nos resultados obtidos na determinação da concentração de citocromo P-450 em diferentes linhagens, a ATCC 44953 foi selecionada como a linhagem que produziu maiores concentrações de citocromo P-450 sendo, portanto empregada na etapa final do trabalho.

4.4.4. Efeito da adição de etanol ao meio de cultura na produção de citocromo P-450 pela linhagem ATCC 44953

Curvas de crescimento foram obtidas, como descrito no item 4.4.1, para a linhagem ATCC 44953, cultivada em meio base contendo 2 % (p/v) e 20 % (p/v) de glicose, com adição de um volume de etanol para concentração final de 2 % (v/v) (MORITA; MIFUCHI, 1984; DEL CARRATORE et al., 1984). Os erlenmeyers foram selados, com tampão de algodão e filme plástico (Parafilm[®]), a fim de reduzir a evaporação do etanol durante o período de incubação. Com base nestas curvas, foi determinada a fase de crescimento exponencial para a cepa ATCC 44953, na presença de 2 % de etanol (v/v).

A determinação da concentração de citocromo P-450 foi realizada transferindo, com auxílio de uma alça de 1 µL, células de uma cultura de 24 h em ágar inclinado para erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio base e glicose, nas concentrações de 2 % (p/v) e 20 % (p/v), e etanol, na concentração final de 2 % (v/v). A concentração celular inicial correspondeu a 10^5 cél/mL, determinada pela contagem de células viáveis (Técnica “*Pour Plate*”). A incubação foi realizada em banho maria a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, com agitação orbital a 120 rpm. Os tempos de incubação e coleta das células para determinação de citocromo P-450, definidos com base nas curvas de crescimento foram: 20 h, 28 h e 32 h, no caso de células incubadas na presença de 2 % de glicose e 2 % de etanol. Para as células incubadas em 20 % de glicose e 2 % de etanol, os tempos foram 28 h e 32 h.

Após incubação, as células foram coletadas por filtração, utilizando membrana de éster de celulose Millipore[®], 0,45 µm de poro e 47 mm de diâmetro. Em seguida, foram lavadas, de duas a três vezes, com solução tampão de fosfato 0,1 M, pH 7,4, e ressuspendidas na mesma solução tampão até a concentração final de cerca de 10^9 células/mL.

Uma alíquota de 1,0 mL foi retirada para confirmação da concentração celular final, que foi feita através de diluição seriada e contagem de células viáveis, pela técnica “*Pour Plate*”.

A concentração de citocromo P-450 foi determinada na suspensão de células, seguindo o método proposto por Omura e Sato (1964), conforme descrito no item 4.4.2.2.

5. Resultado e discussão

Conforme apresentado na Introdução, este trabalho foi idealizado e desenvolvido com intuito de substituir, no Teste de Ames, o sistema de ativação metabólica S9 mix, um produto caro e importado, por citocromo P-450 obtido em laboratório, através de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo para tanto necessário conhecer as condições ideais de cultivo para obtenção de células com alto conteúdo da enzima.

É importante salientar que este não é um trabalho de avaliação e confirmação da eficácia de um método já estabelecido. Ao contrário, o foco deste trabalho é o desenvolvimento de um método ainda não definido e que portanto busca informações sobre as condições de cultivo, nas quais as cepas poderão produzir maiores níveis da enzima e a partir destas premissas, propor um método que poderá ser posteriormente validado.

Neste trabalho, como controle, foi realizada a comparação dos dados obtidos através da linhagem ATCC 201137 (D7) com resultados publicados por outros autores, uma vez que a EPA (Environmental Protection Agency), em 1984, considerou que as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* mais testadas e estudadas em testes de mutagenicidade, dentre elas a D7, poderiam ser consideradas microrganismos de referência e portanto ter seus resultados comparados com os de outros laboratórios (ZIMMERMANN et al., 1984). Desta forma, os resultados obtidos através da cepa ATCC 201137 (D7) foram comparados com o trabalho de Morita e Mifuchi (1984), que utilizaram esta mesma linhagem, cultivada em diversas concentrações de glicose, dentre elas a concentração de 2 %, a mesma utilizada neste trabalho. Morita e Mifuchi (1984)

também determinaram a concentração de citocromo P-450, em uma suspensão de cerca de 10^9 células/ mL, pelo Método de Omura e Sato (1964), sendo que os níveis de citocromo P-450 obtidos neste trabalho (Figura 5.12), bem como o tempo de incubação para obtenção da concentração máxima da enzima, foram muito semelhantes aos resultados apresentados por Morita e Mifuchi (1984).

As Figuras 5.1 e 5.2 mostram as diferenças no crescimento celular, em ambas às linhagens, cultivadas em diferentes fontes de carbono. Como pode ser observado na Tabela 5.1, este crescimento foi mais acentuado em glicose, manose e galactose e nos dissacarídeos maltose e sacarose, sendo menos acentuado em lactose, glicerina e frutose.

■ Glicose 2% (p/v) ; ● Frutose 2% (p/v) ; ▼ Sacarose 2% (p/v) ; * Maltose 2% (p/v) ; X Manose 2% (p/v) ; ▲ Lactose 2% (p/v) ; ◆ Galactose 2% (p/v) ; + Glicerina 2% (p/v).

Figura 5.1 – Curvas de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080, cultivada em oito diferentes fontes de carbono. Os dados representam o valor médio de 3 testes independentes.

■ Glicose 2% (p/v) ; ● Frutose 2% (p/v) ; ▼ Sacarose 2% (p/v) ; * Maltose 2% (p/v) ; X Manose 2% (p/v) ; ▲ Lactose 2% (p/v) ; ◆ Galactose 2% (p/v) ; + Glicerina 2% (p/v).

Figura 5.2 – Curvas de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2366, cultivada em oito diferentes fontes de carbono. Os dados representam o valor médio de 3 testes independentes.

Tabela 5.1 – Crescimento celular máximo obtido, ao final da fase de crescimento exponencial, das linhagens ATCC 9080 e ATCC 2366, cultivadas em oito diferentes fontes de carbono, na concentração de 2 % (p/v).

Fonte de carbono	Crescimento celular máximo <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9080 (UFC/ mL)	Crescimento celular máximo <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 2366 (UFC/ mL)
Glicose	$(2,0 \pm 1,40) \times 10^8$	$(1,13 \pm 0,06) \times 10^8$
Frutose	$(1,13 \pm 0,11) \times 10^7$	$(9,90 \pm 0,96) \times 10^6$
Sacarose	$(1,63 \pm 0,30) \times 10^8$	$(1,27 \pm 0,11) \times 10^8$
Maltose	$(2,43 \pm 0,15) \times 10^8$	$(2,50 \pm 1,22) \times 10^8$
Manose	$(2,27 \pm 0,25) \times 10^8$	$(2,10 \pm 0,30) \times 10^8$
Lactose	$(2,47 \pm 0,49) \times 10^7$	$(2,87 \pm 0,84) \times 10^7$
Galactose	$(2,17 \pm 0,45) \times 10^8$	$(2,47 \pm 0,25) \times 10^8$
Glicerina	$(1,70 \pm 0,26) \times 10^7$	$(6,07 \pm 0,75) \times 10^7$

As leveduras, em geral, utilizam preferencialmente a glicose como fonte de carbono e energia e a seguir, outras hexoses, dissacarídeos e açúcares não fermentáveis, nesta ordem (WILLS, 1996), o que justifica o acentuado crescimento na presença de glicose e manose. Porém, a frutose, apesar de ser também uma hexose, promoveu baixo crescimento celular das cepas ATCC 9080 e ATCC 2366. Este açúcar é um monossacarídeo transportado por difusão facilitada, assim como a glicose e manose (FLORES et al., 2000). A via metabólica da fermentação da frutose é muito semelhante à da glicose, porém algumas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* podem apresentar preferência por glicose. O transporte através da membrana parece ser a causa da discrepância

entre fermentação da glicose e frutose, pois apesar dos transportadores utilizados por ambos os açúcares serem os mesmos, a afinidade por glicose é maior. Esta discrepância pode variar de uma linhagem para outra (BERTHELIS et al., 2004), sendo que no caso das cepas estudadas, houve uma baixa utilização de frutose, o que justifica o baixo crescimento celular.

As curvas de crescimento das cepas ATCC 9080 (Figura 5.1) e ATCC 2366 (Figura 5.2), em meio de cultura contendo 2 % de galactose, mostram um crescimento celular mais lento, ou seja, fase de crescimento exponencial mais longa. Em 2 % de galactose, as cepas demoraram cerca de 12 horas a mais para atingir uma concentração celular máxima semelhante à concentração máxima obtida em 2 % de glicose e manose. A galactose, assim como as hexoses frutose e manose, é também transportada por difusão facilitada. Em *Saccharomyces cerevisiae*, as enzimas envolvidas especificamente no catabolismo da galactose são sintetizadas em resposta à presença deste açúcar (ENTIAN; BARNETT, 1992; BARNETT, 1976), ou seja, a síntese destas enzimas ocorre por indução. Desta forma, a levedura em meio de cultura contendo galactose, necessita de um tempo de indução para que o crescimento celular ocorra.

O reduzido crescimento celular observado, em ambas as linhagens, na presença de glicerina (Tabela 5.1) é justificado pelo fato de esta ser uma fonte de carbono e energia não fermentável. Além disso, a membrana plasmática da levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta baixa permeabilidade à glicerina (WALKER, 1998).

O crescimento celular na presença dos dissacarídeos sacarose, maltose e lactose também foi avaliado, sendo que foi mais acentuado na presença de sacarose e maltose (Tabela 5.1). O metabolismo dos dissacarídeos é precedido da hidrólise em seus monômeros e dependendo da espécie de levedura e natureza do açúcar, esta hidrólise pode ocorrer fora da membrana celular, no espaço periplasmático ou no interior da célula após o transporte do dissacarídeo (FLORES et al., 2000). No caso da utilização da sacarose por *Saccharomyces cerevisiae*, a primeira etapa envolve a hidrólise por enzimas localizadas na parede celular, seguida de transporte das hexoses liberadas, ou seja, glicose e frutose (WALKER, 1998). De forma semelhante à sacarose, a maltose sofre hidrólise intracelular, gerando duas moléculas de glicose que serão catabolizadas pela levedura, sendo que a enzima responsável por esta hidrólise é a maltase, cuja síntese é induzida pela presença do açúcar maltose (ENTIAN; BARNETT, 1992; JANSEN et al. 2004). Desta forma, assim como ocorre na presença de galactose, a maltose também necessita de um tempo de indução de síntese da enzima que irá hidrolisar a maltose, para que ocorra o transporte e metabolização da glicose liberada. Assim sendo, da mesma forma como ocorreu em galactose, as cepas demoram cerca de 12 horas a mais para atingir uma concentração celular máxima semelhante à massa obtida em 2 % de glicose e manose, como pode ser observado nas Figuras 5.1 e 5.2.

Já as linhagens cultivadas na presença do dissacarídeo lactose apresentaram baixo crescimento celular (Tabela 5.1), o que é justificado pelo fato de a levedura *Saccharomyces cerevisiae* não ser capaz de transportar e fermentar este açúcar (WALKER, 1998).

Com a obtenção das curvas de crescimento foi possível, além de comparar a massa celular obtida em diferentes fontes de carbono, localizar a fase de crescimento exponencial da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, na qual a maior concentração da enzima deve ocorrer (WISEMAN; LIM; McCLOUD, 1975). Portanto, com base nestas curvas, foram definidos os tempos de incubação e coleta das células para determinação do conteúdo de citocromo P-450.

As primeiras determinações do citocromo P-450 foram realizadas na sua forma solubilizada (CALLEN; PHILPOT, 1977; KÄRENLAMPI, MARIN. HÄNNINEN, 1981), ou seja, era realizado o rompimento da parede das células, para retirada e solubilização do citocromo P-450 em solução tampão, para a partir desta amostra determinar a concentração da enzima pelo Método de Omura e Sato (1964). Porém, ao realizar a leitura em espectrofotômetro, nenhum pico de absorção em torno de 450 nm, característico do citocromo P-450, era observado. De fato, a determinação de citocromo P-450 na forma solubilizada apresentava algumas desvantagens, como o risco de perda da enzima por denaturação, mesmo sob pH e temperaturas controlados, além do custo com material e tempo gasto para análise.

Outra alternativa era a determinação do citocromo P-450 em suspensão de células (BUSCHINI, POLI; ROSSI, 2003; STANSFIELD; KELLY, 1996), ou seja, sem a necessidade de rompimento da parede celular, para posterior retirada e solubilização da enzima. Esta forma de determinação de citocromo P-450, em células íntegras, mostrou ser mais adequado às condições do laboratório, além do menor risco de perda da enzima.

A Figura 5.3 mostra um dos espectros que foram obtidos em suspensão de células de *Saccharomyces cerevisiae*, através do método de Omura e Sato (1964). Comparando este espectro com o do sistema de ativação metabólica S9 mix (Rat liver LS-9), do fabricante Moltox® (Figura 5.4), pode-se observar a semelhança entre eles, sendo que ambos apresentaram um pico de absorção em torno de 450 nm, característico do citocromo P-450, confirmando que foi possível detectar a enzima em células de levedura. Deve-se salientar ainda que, a concentração da enzima obtida no S-9 mix correspondeu a 0,24 nmol / mg de proteína, porém a confirmação desta concentração não foi possível, uma vez que não é procedimento do fornecedor informar o conteúdo de citocromo P-450.

Figura 5.3- Espectro da suspensão de células de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2366, obtida através do Método de Omura e Sato (1964).

Figura 5.4- Espectro de S9 mix (Rat liver LS-9), do fabricante Moltex®, evidenciando um pico de absorção em torno de 450 nm, característico do citocromo P-450.

A determinação de citocromo P-450 em suspensão de células foi primeiramente realizada empregando *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080, cultivada em 2 % glicose (Figura 5.10).

No caso desta linhagem, a fase de crescimento exponencial correspondeu ao intervalo de tempo entre 4 e 12 h de incubação (Figura 5.6), portanto a determinação do conteúdo celular de citocromo P-450 foi efetuada em células cultivadas por um período de 6 h (correspondente à fase inicial do crescimento exponencial), sendo que nenhuma enzima foi detectada.

Ao cultivar a mesma cepa por um período de 8 h (meio da fase de crescimento exponencial), a enzima citocromo P-450 foi detectada, porém em níveis muito baixos ($0,1 \text{ nmol} / 10^9 \text{ células}$). A concentração máxima de citocromo P-450 só foi observada no intervalo de tempo correspondente ao final da fase de crescimento exponencial e início da fase estacionária (12 h de incubação), quando foi obtida a concentração de $1,31 \text{ nmol} / 10^9 \text{ células}$. Porém, quando as células foram incubadas por um período de 16 h, ou seja, já na fase estacionária, a concentração de citocromo P-450 reduziu para $0,81 \text{ nmol} / 10^9 \text{ células}$.

A etapa seguinte foi a determinação de citocromo P-450 em células de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080 cultivadas em diferentes fontes de carbono.

Como já visto anteriormente, as linhagens estudadas apresentaram maior crescimento celular na presença de glicose, manose, galactose, sacarose e maltose. Como todas estas fontes de carbono promoveram o mesmo nível de crescimento celular, a determinação de citocromo P-450 foi feita selecionando algumas destas fontes de carbono. Desta forma, a determinação de citocromo P-450 foi realizada em células cultivadas na presença de glicose e sacarose (altamente fermentáveis), manose (no qual fermentação e respiração ocorrem simultaneamente), além da glicerina (não fermentável), na concentração de 2 % (p/v).

O tempo de incubação foi fixado em 12 h, uma vez que, de acordo com as curvas de crescimento (Figura 5.1), o tempo necessário para atingir o final da fase de crescimento exponencial, quando foi obtida a maior concentração de citocromo P-450, é a mesma na presença de glicose, sacarose, manose e glicerina.

Como mostra a Figura 5.5, a produção de citocromo P-450 nas células cultivadas em 2 % de glicose, manose e sacarose ocorreu em níveis diferentes, embora o crescimento celular tenha sido muito semelhante (Figura 5.1). Dentre estas fontes de carbono foi encontrada uma diferença significativa nos níveis de citocromo P-450 entre glicose e manose. No caso da glicerina, além de promover um baixo crescimento celular, esta fonte de carbono não foi capaz de induzir a síntese de citocromo P-450, uma vez que a enzima não foi detectada.

Figura 5.5- Concentrações de citocromo P-450 obtidas em *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080, cultivada em glicose, sacarose e manose, na concentração de 2 % (p/v), por um período de 12 h de incubação. Os dados representam o valor médio de 3 testes independentes.

Os diferentes níveis de citocromo P-450 em diferentes fontes de carbono, obtidos neste trabalho, contribuem para esclarecer a regulação da produção de citocromo P-450 em *Saccharomyces cerevisiae*.

Uma hipótese levantada para explicar a regulação da produção de citocromo P-450 em *Saccharomyces cerevisiae* foi o controle através do nível intracelular de AMP cíclico e a repressão por glicose (WISEMAN; LIM; McCLOUD, 1975; WISEMAN; LIM; WOODS, 1978; KING; WISEMAN; WILKIE, 1983). Ou seja, em meio de cultura contendo altas concentrações de glicose, o nível intracelular de AMP cíclico diminui, reprime as enzimas envolvidas na cadeia respiratória, e conseqüentemente a respiração (BARNETT; ENTIAN, 2005). Estas condições de repressão da respiração favoreceriam a produção de citocromo P-450 na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Esta hipótese foi reforçada pelos dados obtidos por Callen e Philpot (1977) ao observarem que cultivando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em meio de cultura contendo galactose, no qual a respiração ocorre juntamente com a fermentação, e portanto o efeito de repressão por glicose não é observado, a produção de citocromo P-450 era muito baixa, não sendo detectado em suspensão de células de *Saccharomyces cerevisiae*.

Porém, ao contrário dos resultados obtidos por Callen e Philpot (1977) que não detectaram citocromo P-450 em suspensão de células cultivadas em galactose, no presente estudo, a enzima foi detectada em células cultivadas em 2 % de manose, embora em níveis mais baixos do que o encontrado em 2 % de glicose. A respiração, que ocorre durante o crescimento da levedura na presença de açúcares como manose e galactose, traz como conseqüência o surgimento de células com alto conteúdo de citocromo oxidase mitocondrial. Este citocromo

oxidase apresenta um pico de absorção em torno de 441 a 445 nm, interferindo no espectro do citocromo P-450 (KÄPPELI, 1986) (KÄRENLAMPI; MARIN; HÄNNINEN, 1981). Esta interferência do citocromo oxidase pode ter sido a causa da baixa concentração de citocromo P-450 encontrada em células cultivadas em 2 % de manose (Figura 5.5) e também da não detecção em galactose, por Callen e Philpot (1977).

Os resultados obtidos através do estudo da indução de citocromo P-450 em diferentes fontes de carbono (Figura 5.5) estão de acordo com Kärenlampi, Marin e Hänninen (1981), ou seja, em açúcares altamente fermentáveis como glicose e sacarose, ocorre a produção de citocromo P-450. Em açúcares onde fermentação e respiração ocorrem simultaneamente, como é o caso da manose, a enzima também é produzida. Porém, em fontes de carbono não fermentáveis, como a glicerina, não há produção de citocromo P-450. Estes resultados indicam que a repressão por glicose não deve ser suficiente para induzir a produção de citocromo P-450 em *Saccharomyces cerevisiae*, fato que também foi observado por Rossi et al.(1997).

A indução parece estar relacionada à capacidade de fermentação das diferentes fontes de carbono pela levedura, e como foi proposto por Kärenlampi, Marin e Hänninen (1981), é possível que a produção de citocromo P-450 seja influenciada por um produto resultante da fermentação do açúcar presente no meio de cultura, como por exemplo, o etanol.

Na etapa seguinte foi realizado o estudo da indução de citocromo P-450 em diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*: ATCC 9080, ATCC 2366, ATCC 201137 (D7) e ATCC 44953 (NCYC 240). Uma vez que foi possível obter, na presença de glicose, elevada massa celular e altos níveis de citocromo P-450

na linhagem ATCC 9080, e tendo em vista o baixo custo em relação às demais fontes de carbono, a glicose foi então, considerada o açúcar de escolha para o estudo da indução de citocromo P-450 em diferentes linhagens.

As linhagens foram cultivadas em baixa e alta concentração de glicose, 2 % e 20 % respectivamente, a fim de avaliar a influência da concentração da fonte de carbono na produção de citocromo P-450. As curvas de crescimento das cepas ATCC 9080, ATCC 2366, ATCC 201137 e ATCC 44953 são apresentadas nas Figuras 5.6 a 5.9 e mostram que o crescimento celular foi mais acentuado na presença de altas concentrações de açúcar (20 % de glicose).

Podemos observar também que, entre as cepas estudadas houve variação nos tempos de incubação necessários para atingir o final da fase de crescimento exponencial e início da fase estacionária, e portanto, o tempo para produção máxima de citocromo P-450. Esta variação no tempo de incubação também ocorreu entre diferentes concentrações de glicose, sendo que em 20 % o tempo necessário para atingir a concentração máxima de citocromo P-450 foi maior. Desta forma, devido a estas variações, foi necessário determinar a concentração da enzima ao longo da fase de crescimento exponencial, localizando o tempo de incubação no qual cada cepa produz a concentração máxima da enzima.

As diferentes concentrações de citocromo P-450 obtidas durante o cultivo das linhagens ATCC 9080, ATCC 2366, ATCC 201137 e ATCC 44953 são apresentadas nas figuras 5.10 a 5.13.

Figura 5.6- Curvas de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080, cultivada em glicose, nas concentrações de 2 % (p/v) e 20 % (p/v). Os dados representam o valor médio de 3 testes independentes.

Figura 5.7- Curvas de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2366, cultivada em glicose, nas concentrações de 2 % (p/v) e 20 % (p/v). Os dados representam o valor médio de 3 testes independentes.

Figura 5.8- Curvas de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 201137 (D7), cultivada em glicose, nas concentrações de 2 % (p/v) e 20 % (p/v). Os dados representam o valor médio de 3 testes independentes.

Figura 5.9- Curvas de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 44953 (NCYC 240), cultivada em glicose, nas concentrações de 2 % (p/v) e 20 % (p/v). Os dados representam o valor médio de 3 testes independentes.

Figura 5.10- Concentrações de citocromo P-450 em *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080, durante cultivo em 2 % de glicose (p/v) e 20 % de glicose (p/v). Os dados representam o valor médio de 3 testes independentes.

Figura 5.11- Concentrações de citocromo P-450 em *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2366, durante cultivo em 2 % de glicose (p/v) e 20 % de glicose (p/v). Os dados representam o valor médio de 3 testes independentes.

Figura 5.12- Concentrações de citocromo P-450 em *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 201137 (D7), durante cultivo em 2 % de glicose (p/v) e 20% de glicose (p/v). Os dados representam o valor médio de 3 testes independentes.

Figura 5.13- Concentrações de citocromo P-450 em *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 44953 (NCYC 240), durante cultivo em 2 % de glicose (p/v) e 20 % de glicose (p/v). Os dados representam o valor médio de 3 testes independentes.

A Figura 5.10. mostra que a linhagem ATCC 9080 não apresentou diferença significativa no conteúdo de citocromo P-450 entre o cultivo em 2 % e em 20 % de glicose, apesar do aumento de massa celular em 20 % de glicose (Figura 5.6). Pode-se observar também que a alteração na fase de crescimento exponencial provocada pelo aumento da concentração de glicose, provocou uma mudança no tempo necessário para atingir a concentração máxima de citocromo P-450, ou seja, a concentração máxima da enzima, que em 2 % de glicose era encontrada em 12 h de incubação, em 20 % de glicose só foi obtida em 24 h de incubação (Figura 5.10).

Por meio das Figuras 5.7 e 5.11 pode-se observar que ao incubar a linhagem ATCC 2366, em 2 % de glicose por um período de incubação de 6 h (início da fase de crescimento exponencial) e 8 h (meio da fase de crescimento exponencial), o citocromo P-450 não foi detectado. Em 12 h e 16 h de incubação, ou seja, já na fase estacionária, a enzima também não foi detectada. Apenas após 10 h de incubação, ou seja no final da fase de crescimento exponencial, a cepa apresentou uma concentração de citocromo P-450 de $0,95 \text{ nmol} / 10^9$ células. Quando esta cepa foi incubada em meio de cultura contendo 20 % de glicose, ocorreu um aumento da massa celular, porém apesar deste aumento, não houve elevação da produção de citocromo P-450. Da mesma forma como ocorreu com a linhagem ATCC 9080 a fase de crescimento exponencial também foi mais longa na presença de 20 % de glicose (Figura 5.7) e portanto o tempo necessário para atingir a concentração máxima de citocromo P-450 mudou de 10 h para 12 h de incubação (Figura 5.11).

As curvas de crescimento das outras linhagens avaliadas, ou seja, ATCC 201137 (Figura 5.8) e ATCC 44953 (Figura 5.9) mostram que, como foi verificado nas cepas ATCC 9080 (Figura 5.6) e ATCC 2366 (Figuras 5.7), houve um aumento da massa celular em 20 % de glicose.

Com relação ao nível de citocromo P-450 produzido, no caso da ATCC 201137 (D7) não foi encontrada diferença significativa entre as células cultivadas em 2 % e 20 % de glicose, como pode ser visto na Figura 5.12, sendo que este resultado corrobora com os dados obtidos por Morita e Mifuchi (1984). Novamente foi observada uma diferença no tempo de incubação necessário para atingir a concentração máxima de citocromo P-450, ou seja 16 h, para células cultivadas em 2 % de glicose e 24 h, para células cultivadas em 20 % de glicose.

A cepa ATCC 44953 (NCYC 240) apresentou um comportamento diferente em relação às demais linhagens estudadas. A Figura 5.13 mostra que esta linhagem foi capaz de produzir níveis elevados de citocromo P-450, sendo que o tempo de incubação necessário para atingir o nível máximo da enzima, assim como ocorreu com as demais cepas, mudou de 20 h (células cultivadas em 2 % de glicose), para 28 h (células cultivadas em 20 % de glicose), devido ao longo período de crescimento exponencial em 20 % de glicose (Figura 5.9). Além disso, esta cepa foi a única a apresentar elevação do nível de citocromo P-450 na presença de 20 % de glicose, fato que também foi observado por Wiseman, Lim e McCloud (1975).

Podemos observar também, através da Figura 5.13, que em 20 % de glicose, a concentração máxima de citocromo P-450 se manteve estável. Em 28 h de incubação, quando as células atingiram o nível máximo da enzima, a concentração de citocromo P-450 era de 2,47 nmoles / 10^9 células. Após 4 h, ou seja no tempo correspondente a 32 h de incubação, a concentração permaneceu praticamente a mesma, ou seja, 2,39 nmoles / 10^9 células.

A Tabela 5.2 compara os diferentes níveis de citocromo P-450 produzidos pelas cepas ATCC 9080, ATCC 2366, ATCC 201137 e ATCC 44953 e mostra que todas as cepas estudadas foram capazes de produzir citocromo P-450, sendo que o nível de enzima produzido é uma característica de cada linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados também mostram que em todas as linhagens a concentração da enzima variou ao longo da fase de crescimento exponencial, sendo que o máximo de produção do citocromo P-450 ocorreu no período correspondente ao final da fase de crescimento exponencial e início da fase estacionária.

Tabela 5.2- Crescimento celular e concentração de citocromo P-450 máximos obtidos em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, cultivadas em 2 % (p/v) e 20 % (p/v) de glicose.

Linhagem (ATCC)	Concentração de glicose (%)	Concentração máxima de citocromo P-450 (nmol/10 ⁹ cél.)	Crescimento celular máximo (UFC / mL)	Tempo de (*) incubação (h)
9080	2	1,26	2,0 X 10 ⁸	12
	20	1,31	8,6 X 10 ⁸	24
2366	2	0,95	1,1 X 10 ⁸	10
	20	1,1	4,9 X 10 ⁸	12
201137	2	1,07	1,1 X 10 ⁸	16
	20	1,24	3,4 X 10 ⁸	24
44953	2	1,94	1,7 X 10 ⁶	20
	20	2,47	1,9 X 10 ⁷	28

(*) O tempo de incubação se refere ao tempo no qual a concentração máxima de citocromo P-450 foi encontrada.

Podemos observar na Tabela 5.2 que as concentrações máximas de citocromo P-450 encontradas nas cepas ATCC 9080, ATCC 2366 e ATCC 201137 foram muito semelhantes. Apenas a cepa ATCC 44953 se destacou, apresentando níveis mais altos da enzima. De fato, esta cepa, também, conhecida como NCYC 240, é citada como sendo “boa produtora de citocromo P-450” (STANSFIELD; KELLY, 1996).

Com relação às linhagens ATCC 9080 e ATCC 2366, não foram encontrados trabalhos publicados sobre indução de citocromo P-450 nestas linhagens, ou a respeito do nível de citocromo P-450 produzido por estas cepas, para comparação dos resultados. O seu emprego, neste trabalho, se justifica pelo uso destas cepas em estudos de biossíntese de ergosterol, onde existe envolvimento do citocromo P-450 (HATA et al., 1981; ARNEZEDER; HAMPEL, 1981) e, em estudos envolvendo agentes químicos carcinogênicos (DELITHEOS et al., 1995; TILIGADA; DELITHEOS, 1993), respectivamente.

Já a linhagem D7 foi desenvolvida por Zimmermann, Kern e Rasenberger, em 1975, para ser utilizada como um organismo modelo no estudo das diferentes alterações genéticas induzidas por agentes mutagênicos. Na presença destes agentes, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* D7 dá origem a colônias com diferentes colorações (rosa/ vermelho, vermelho, rosa, rosa/ branco), de acordo com o tipo de mutação. Devido à vantagem de tornar possível, em um mesmo organismo, a detecção visual de mutações que ocorrem por diferentes mecanismos, pesquisadores tem utilizado esta linhagem em testes de mutagenicidade (BUSCHINI; POLI; ROSSI, 2003; ROSSI et al., 1997). Porém, os resultados deste trabalho mostram que apesar de ser um organismo útil para detecção de substâncias mutagênicas, a linhagem D7 não é capaz de produzir

níveis elevados da enzima, sendo que a produção elevada de citocromo P-450 é um requisito importante para uma cepa ser empregada em testes de mutagenicidade, uma vez que muitas substâncias pró-mutagênicas são convertidas a sua forma ativa, através deste sistema. A comparação, realizada neste trabalho, dos níveis de citocromo P-450 produzido pelas quatro linhagens estudadas (Tabela 5.2) mostra que a D7 não se destaca em relação às demais cepas.

As diferenças de produção de citocromo P-450 em diferentes linhagens e o aumento ou não do nível da enzima na presença de altas concentrações de açúcar deve ser uma consequência de variações que possam existir entre as linhagens estudadas, como por exemplo, diferenças na capacidade de transporte do açúcar através da membrana ou mesmo na capacidade de fermentação deste açúcar. Essas diferenças existentes entre as cepas, podem ter sido um dos motivos de discrepâncias entre os resultados obtidos por diversos autores, ao tentarem concluir qual a melhor concentração de açúcar no meio de cultura a fim de obter células de *Saccharomyces cerevisiae* com elevado nível de citocromo P-450.

Na etapa final deste trabalho, foi avaliado o efeito indutor do etanol na produção de citocromo P-450 por *Saccharomyces cerevisiae*. Como já foi observado no estudo da indução por diferentes fontes de carbono, esta produção pode ser influenciada por um metabólito resultante da fermentação, como o etanol.

Para esta etapa, apenas a cepa ATCC 44953 (NCYC 240) foi utilizada, uma vez que, dentre as linhagens avaliadas, foi a única que se destacou quanto à produção de citocromo P-450.

A fonte de carbono utilizada foi a glicose, em duas concentrações diferentes (2 % e 20 %), sendo que a concentração de etanol estabelecida para este estudo foi de 2 %, como sugerido por Morita e Mifuchi (1984) e Del Carratore et al.(1984).

Primeiramente, foram construídas curvas de crescimento da cepa ATCC 44953 (NCYC 240) em meio de cultura contendo glicose, nas concentrações de 2 % e 20 %, com e sem adição de 2 % de etanol, representadas pelas Figuras 5.14 e 5.15, respectivamente. Através destas figuras podemos verificar que na presença de 2 % de etanol o crescimento celular foi menos acentuado, evidenciando o efeito tóxico do etanol.

Figura 5.14- Curvas de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 44953 (NCYC 240), cultivada em 2 % de glicose (p/v) e em 2 % de glicose (p/v), com adição de 2 % de etanol (v/v). Os dados representam o valor médio de 3 testes independentes.

Figura 5.15- Curvas de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 44953 (NCYC 240), cultivada em 20 % de glicose (p/v) e em 20 % de glicose (p/v), com adição de 2 % de etanol (v/v). Os dados representam o valor médio de 3 testes independentes.

Apesar de ser o principal metabólito do processo de fermentação, o etanol atua como um agente tóxico para a própria levedura que o elimina, através da membrana celular, a medida em que a concentração intracelular de etanol aumenta, não ocorrendo portanto, seu acúmulo no interior da célula. O efeito tóxico sobre a levedura provoca uma inibição do crescimento, da divisão e da viabilidade celular (WALKER, 1998).

Como mostra a Figura 5.16, apesar do crescimento celular reduzido na presença de etanol, o nível de citocromo P-450 foi mais elevado em 2 % de etanol, do que em meio de cultura contendo apenas 2 % de glicose, indicando que houve um efeito indutor do etanol na síntese de citocromo P-450.

Figura 5.16- Concentrações de citocromo P-450 em *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 44953 (NCYC 240), cultivada em 2 % de glicose (p/v) e em 2 % de glicose (p/v), com adição de 2 % de etanol (v/v). Os dados representam o valor médio de 3 testes independentes.

Este efeito indutor do etanol na produção de citocromo P-450 pode ser explicado pelo *stress* provocado nas células de levedura que sofrem diversas alterações fisiológicas, a fim de garantir proteção contra a toxicidade do etanol. Algumas dessas alterações incluem a aceleração da biossíntese de ergosterol e aumento do metabolismo de etanol (WALKER, 1998).

O ergosterol é o principal esteróide presente na membrana plasmática da levedura, responsável pela manutenção de sua permeabilidade (WALKER, 1998). Alguns trabalhos indicam o envolvimento do sistema citocromo P-450 em uma etapa final da biossíntese do ergosterol (HATA et al., 1981; AOYAMA; YOSHIDA; SATO, 1984) e portanto um aumento da biossíntese de ergosterol, provocada

pela presença de etanol no meio de cultura, ocasionaria também indução da produção de citocromo P-450.

O metabolismo do etanol na levedura também é modificado e intensificado com adição de etanol, sendo que Il'Chenko, Chernyavskaya e Finogenova (2005) sugeriram que o sistema citocromo P-450 de levedura está envolvido no mecanismo de oxidação do etanol, ao observarem que a adição de 0,8 % - 4,8 % de etanol no meio de cultura leva a um aumento de sua oxidação e da síntese de citocromo P-450.

Por meio da Figura 5.16, pode-se constatar também que as concentrações máximas de citocromo P-450, obtidas na presença e ausência de 2 % de etanol, ocorrem em tempos diferentes de incubação. Ou seja, em meio de cultura contendo apenas 2 % de glicose, a concentração máxima ocorreu em 20 h de incubação, sendo que, no caso de células cultivadas em 2 % de glicose e 2 % de etanol a concentração máxima foi obtida apenas em 28 h de incubação. Esta diferença pode ser explicada pelo crescimento celular mais lento e reduzido, devido à toxicidade do etanol, o que leva as células a necessitarem de um tempo maior de incubação para atingir o final da fase de crescimento exponencial, etapa na qual a concentração máxima de citocromo P-450 é atingida.

Ainda com relação à Figura 5.16, pode-se observar que a concentração máxima de citocromo P-450 obtida em 2 % de glicose, com adição de 2 % de etanol, em 28 h de incubação (2,98 nmoles /10⁹células) se manteve constante após 4 h ou seja, após 32 h de incubação a concentração de citocromo P-450 permaneceu em cerca de 2,98 nmoles /10⁹células. Este fato corrobora com os dados obtidos por Blatiak et al (1987) em que a presença de etanol no meio de

cultura foi capaz de aumentar a estabilidade da enzima citocromo P-450 em células de *Saccharomyces cerevisiae*.

Na Figura 5.17 são apresentados os diferentes níveis de citocromo P-450 obtidos ao longo do cultivo de células, em meio de cultura contendo 20 % de glicose, na presença e ausência de etanol.

Figura 5.17- Concentrações de citocromo P-450 em *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 44953 (NCYC 240), cultivada em 20 % de glicose (p/v) e em 20 % de glicose (p/v), com adição de 2 % de etanol (v/v). Os dados representam o valor médio de 3 testes independentes.

A concentração máxima obtida em células cultivadas em 20 % de glicose foi de 2,47 nmoles / 10^9 células, sendo que, com adição de 2 % de etanol, a concentração máxima foi de 2,74 nmoles / 10^9 células. Ou seja, em células cultivadas em 20 % de glicose, a adição de 2 % de etanol não provocou alteração na produção de citocromo P-450. Não foram encontrados estudos relacionados à indução de citocromo P-450 em células de *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas em 20 % de glicose, na presença de etanol, para comparar e justificar os resultados obtidos.

Uma hipótese que pode ser levantada para justificar estes resultados é a de que, como a levedura não acumula etanol em seu interior, eliminando-o para o ambiente a medida em que é produzido, e como concentrações de etanol acima de 3 % no meio de cultura, provocam redução do nível de citocromo P-450 (DEL CARRATORE et al., 1984), é possível que, ao cultivar células em 20 % de glicose, a alta taxa de fermentação, devido à concentração elevada de glicose, tenha ocasionado um aumento exagerado no nível de etanol no meio de cultura. Considerando que a concentração inicial de etanol neste meio era de 2 %, um acréscimo nesta concentração pode ter tornado o ambiente menos favorável às células e portanto à produção de citocromo P-450. As próprias curvas de crescimento obtidas em 2 % e 20 % de glicose, na presença e ausência de etanol (Figuras 5.14 e 5.15) indicam que, em 20 % de glicose, a inibição do crescimento celular, pela ação do etanol, foi maior em 2 % de glicose. Experimentos futuros deverão determinar o possível incremento de etanol, para permitir conclusões seguras neste aspecto.

As próprias curvas de crescimento obtidas em 2 % e 20 % de glicose, na presença e ausência de etanol (Figuras 5.14 e 5.15) indicam que, em 20 % de

glicose, a inibição do crescimento celular, pela ação do etanol, foi maior em 2 % de glicose. Experimentos futuros deverão determinar o possível incremento de etanol, para permitir conclusões seguras neste aspecto.

A Tabela 5.3 compara os diferentes níveis de citocromo P-450 obtidos em 2 % e 20 % de glicose, com e sem adição de etanol e mostram que é possível obter células de *Saccharomyces cerevisiae* com alto conteúdo de citocromo P-450, através do cultivo em 2 % de glicose + 2 % de etanol, ou em 20 % de glicose, com ou sem adição de etanol. Porém, o cultivo em 2 % de glicose + 2 % de etanol parece ser mais vantajoso se considerada a menor concentração do açúcar utilizado.

Tabela 5.3- Crescimento celular e concentração de citocromo P-450 máximos obtidos na linhagem ATCC 44953 (NCYC 240), cultivada em 2 % (p/v) e 20 % (p/v) de glicose, com e sem adição de 2 % de etanol (v/v).

Concentração de glicose (%)	Concentração celular máxima (UFC / mL)	Concentração máxima de citocromo P-450 (nmol / 10 ⁹ células)	Tempo de incubação (h) (**)
2	4,9 X 10 ⁶	1,94	20
2(*)	1,9 X 10 ⁶	2,98	28
20	1,9 X 10 ⁷	2,47	28
20(*)	3,6 X 10 ⁶	2,74	28

(*) Adição de 2 % de etanol (v/v) ao meio de cultura

(**) O tempo de incubação se refere ao tempo no qual a concentração máxima de citocromo P-450 foi encontrada.

Com base no estudo realizado, pode-se considerar a linhagem ATCC 44953 (NCYC 240) como sendo a mais indicada para obtenção de células com alto conteúdo de citocromo P-450. Como condições de cultivo são recomendadas incubação à temperatura de 30 ° C, sob agitação a 120 rpm, por um período de 28 h, em meio de cultura contendo 1 % de extrato de levedura, 2 % de peptona, 0,5 % de NaCl, 2 % de glicose e 2 % de etanol. Essas condições permitiram obter uma concentração de cerca de 2,98 nmoles / 10⁹ células.

Níveis elevados de citocromo P-450 devem ser necessários para a utilização da levedura como modelo experimental e concentrações obtidas através deste estudo, deverão ser testadas e ajustadas para o emprego específico a que se destinam, seja para testes de mutagenicidade, estudos envolvendo ativação metabólica de substâncias carcinogênicas e outros xenobióticos, desenvolvimento de novos fármacos, dentre outras aplicações.

Por fim, deve-se salientar que o uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como um modelo experimental não deve substituir os testes *in vivo*, tendo em vista as diferenças existentes e a complexidade da célula de mamífero em relação à célula de levedura. O que se espera é utilizar o sistema citocromo P-450 de levedura em testes preliminares, tornando os estudos envolvendo o sistema enzimático citocromo P-450 mais rápidos e menos onerosos.

6. Conclusão

- A concentração máxima de citocromo P-450 em *Saccharomyces cerevisiae* foi encontrada no período entre crescimento exponencial e fase estacionária.

- A produção de citocromo P-450 em *Saccharomyces cerevisiae* ocorreu quando uma das vias de metabolização da fonte de carbono era a fermentação, como em glicose, sacarose e manose

- ATCC 44953 foi a linhagem que produziu níveis mais elevados de citocromo P-450.

- A adição de 2 % de etanol ao meio de cultura provocou elevação dos níveis de citocromo P-450 em células cultivadas em 2 % de glicose, mas não em 20 % de glicose.

- Para obtenção de células de *Saccharomyces cerevisiae* com alto conteúdo de citocromo P-450 é recomendável o cultivo da linhagem ATCC 44953 em meio de cultura contendo 1 % de extrato de levedura, 2 % de peptona, 0,5 % de NaCl, 2 % de glicose e 2 % de etanol, a uma temperatura de 30° C, sob agitação a 120 rpm, por um período de 28 h.

7. Referências bibliográficas

ALEXANDER, K.T.W.; MITROPOULOS, K.A.; GIBBONS, G.F. A possible role for cytochrome P-450 during the biosynthesis of zymosterol from lanosterol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, V.60, n.1, p.460-467, 1974.

AOYAMA, Y.; YOSHIDA, Y.; SATO, R. Yeast cytochrome P-450 catalyzing lanosterol 14 α -. Lanosterol metabolism by purified P-450_{14DM} and by intact microsomes. *J. Biol. Chem.*, v.259, n.3, p.1661-1666, 1984.

ARNEZEDER, C.; HAMPEL, W.A. Influence of growth rate on the accumulation of ergosterol in yeast – cells. *Biotechnol. Lett.*, v.12, n.4, p.277-282, 1981.

BARNETT, J.A. The utilization of sugar by yeasts. IV Criteria for the utilization of sugars by yeasts. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, v.32, p.126-234, 1976.

BARNETT, J.A.; ENTIAN, K.D. A history of research on yeasts 9: Regulation of sugar metabolism. *Yeast*, v.22, p.835-894, 2005.

BERTHEL, N.J.; OTERO, R.R.C.; BAUER, F.F.; THEVELEIN, J.M.; PRETORIUS, I.S. Discrepancy in glucose and fructose utilization during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Res.*, v.4, p.683-689, 2004.

BERNHARDT, R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. Biotechnol.*, v.124, p.128-145, 2006.

BLATIAK, A.; KING, D.J.; WISEMAN, A. Effect of alcohols and of glucose on the level of cytochrome P-450 in *Saccharomyces cerevisiae* after resuspension in buffer. *Biochem. Soc. Trans.*, v.13, p.924, 1985.

BLATIAK, A.; KING, D.J.; WISEMAN, A.; WINKLER, M.A. Cytochrome P-450 accumulation and loss as controlled by growth phase of *Saccharomyces cerevisiae*: relationship to oxygen, glucose and ethanol concentrations. *J. Gen. Microbiol.*, v.133, p.1053-1059, 1987.

BUSCHINI, A.; POLI, P.; ROSSI, C. *Saccharomyces cerevisiae* as an eukaryotic cell model to assess cytotoxicity and genotoxicity of three anticancer anthraquinones. *Mutagenesis*, v.18, n.1, p.25-36, 2003.

CALLEN, D.F.; PHILPOT, R.M. Cytochrome P-450 and the activation of promutagens in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.*, v.45, p.309-324, 1977.

COON, M.J.; DING, X.; PERNECKY, S.J.; VAZ, A.D.N. Cytochrome P450: Progress and predictions. *FASEB J.*, v.6, p.669-673, 1992.

DEL CARRATORE, R.; BRONZETTI, G.; BAUER, C.; CORSI, C.; NIERI, R.; PAOLINI, M.; GIAGONI, P. Cytochrome P-450 factors determining synthesis in strain D7 *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.*, v.121, p.117-123, 1983.

DEL CARRATORE, R.; MORGANTI, C.; GALLI, A.; BRONZETTI, G. Cytochrome P-450 inducibility by ethanol and 7-ethoxycoumarin o-deethylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.123, n.1, p.186-193, 1984.

DELITHEOS, A.; KARAVOKYROS I.; TILIGADA E. Response of *Saccharomyces cerevisiae* strains to antineoplastic agents. *J. Appl. Bacteriol.*, v.79, n.4, p.379-383, 1985.

DUPPEL, W.; LEBEAULT, J.M.; COON, M.J. Properties of a yeast cytochrome P-450 containing enzyme system which catalyzes the hydroxylation of fatty acids, alkanes and drugs. *Eur. J. Biochem.*, v. 36, p.583-592, 1973.

ENTIAN, K.D.; BARNETT, J.A. Regulation of sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Biochem. Sci.*, v.17, p.506-510, 1992.

FLORES, C.; RODRÍGUEZ, C.; PETIT, T.; GANCEDO, C. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.24, p.507-529, 2000.

GARFINKEL, D. Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.77, p.493-509, 1958.

HATA, S.; NISHINO, T.; KOMORI, M.; KATSUKI, H. Involvement of cytochrome P-450 in Δ^{22} -desaturation in ergosterol biosynthesis of yeast. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v.103, n.1, p.272-277, 1981.

HONECK, H.; SCHUNCK, W.H.; MÜLLER, H.G. The function of cytochrome P-450 in fungi and prospects of application. *Pharmazie*, v. 40, p.221-227, 1985.

IL'CHENKO, A.P.; CHERNYAVSKAYA, O.G.; FINOGENOVA, T.V. Ethanol metabolism in the yeasts. *Yarrowia* and *Torulopsis*: a Review. *Appl. Biochem. Microbiol.*, v.41, n.5, p.426-432, 2005.

INGELMAN-SUNDBERG, M. The human genome Project and novel aspects of cytochrome P-450 research. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.207, p.S52-S56, 2005.

ISHIDATE, K.; KAWAGUCHI, K.; TAGAWA, K.; HAGIHARA, B. Hemoproteins in anaerobically growth yeast cells. *J. Biochem.*, v.65, p.375-383, 1969.

JANSEN, M.L.; DARAN-LAPUJADE, P.; WINDE, J.H.; PIPER, M.D.W.; PRONK, J.T. Prolonged maltose-limited cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* selects for cells with improved maltose affinity and hypersensitivity. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.70, n.4, p.1956-1963, 2004.

JONES, C.W.; POOLE, R.K. The analysis of cytochrome P-450. *Methods in microbiology*, v.18, p.285-328, 1985.

KÄPPELI, O. Cytochrome P-450 of yeasts. *Microbiol. Rev.*, v.50, n.3, p.244-258, 1986.

KÄRENLAMPI, S.O.; MARIN, E.; HÄNNINEN, O.O.P. Occurrence of cytochrome P-450 in yeasts. *J. Gen. Microbiol.*, v.120, p.529-533, 1980.

KÄRENLAMPI, S.O.; MARIN, E.; HÄNNINEN, O.O.P. Effect of carbon source on the accumulation of cytochrome P-450 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, v.194, p.407-413, 1981.

KELLY, D.; PARRY, J.M. Metabolic activation of cytochrome P-450/P-448 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.*, v.108, p.147-159, 1983.

KELLY, S.L.; KELLY, D.E.; WISEMAN, A. Interaction between yeast cytochrome P-450 and chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, v.6, n.9, p.1321-1325, 1985.

KING, D.J.; WISEMAN, A.; WILKIE, D. Studies on the genetic regulation of cytochrome P-450 production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, v.192, p.466-470, 1983.

KING, D.J.; BLATIAK, A.; WISEMAN, A.; WINKLER, M.A. Effect of culture shake speed and local oxygenation on the observed maximal accumulation of cytochrome P-450 in *Saccharomyces cerevisiae* at the fastest growth rate. *Biochem. Soc. Trans.*, v.13, p.527, 1985.

KING, D.J.; AZARI, M.R.; WISEMAN, A. Immobilization of a cytochrome P-450 enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.*, v.137, p.675-686, 1988.

KLINGENBERG, M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.75, p.376-386, 1958.

LINDENMAYER, A.; SMITH, L. Cytochromes and other pigment of brewer's yeast growth aerobically and anaerobically. *Biochim. Biophys. Acta*, v.93, p.445-461, 1964.

LICHTENBERG-FRATÉ, H.; SCHMITT, M.; GELLERT, G.; LUDWIG, J. A yeast-based method for the detection of cyto and genotoxicity. *Toxicol. in vitro*, v.17, p.709-716, 2003.

LUTZ, E.S.M.; MARKLING, M.E.; MASIMIREMBWA, C.M. Monolithic silica rod liquid chromatography with ultraviolet or fluorescence detection for metabolite analysis of cytochrome P-450 marker reactions. *J. Chromatogr. B*, v.780, p.205-215, 2002.

MORITA, T.; MIFUCHI, I. Ethanol enhancement of cytochrome P-450 content in yeast, *Saccharomyces cerevisiae* D7. *Chem. Pharm. Bull.*, v.32, n.4, p.1624-1627, 1984.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella* microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.*, v.455, p.29-60, 2000.

OMURA, T.; SATO, R. A new cytochrome in liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, v.237, n.4, p.1375-1376, 1962.

OMURA, T.; SATO, R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, v.239, n.7, p.2370-2378, 1964.

OMURA, T.; SATO, R.; COOPER, D.Y.; ROSENTHAL, O.; ESTABROOK, R.W. Function of cytochrome P-450 of microsomes. *Federation Proc.*, v.24, p.1181-1189, 1965.

PORTER, T.D. Jud Coon: 35 years of P450 research, a synopsis of P450 history. *Drug Metab. Dispos.*, v.32, n.1, p.1-6, 2003.

ROGERS, P.J.; STEWART, P.R. Respiration development in *Saccharomyces cerevisiae* growth at controlled oxygen tension. *J. Bacteriol.*, v.115, n.1, p.88-97, 1973.

ROSSI, C.; POLI, P.; CANDI, A.; BUSCHINI, A. Modulation of mitomycin C mutagenicity on *Saccharomyces cerevisiae* by glutathione, cytochrome P-450, and mitochondria interactions. *Mutat. Res.*, v.390, p.113-120, 1997.

SAKAKI, T.; INOUE, K. Practical application of mammalian cytochrome P-450. *J. Biosci. Bioeng.*, v.90, n.6, p.583-590, 2000.

STANSFIELD, I.; KELLY, S.L. Purification and quantification of *Saccharomyces cerevisiae*. Cytochrome P-450. *Methods Mol. Biol.*, v.53, p.355-367, 1996.

TERZIYSKA, A.; WALTSCHEWA, L.; VENKOV, P. A new sensitive test based on yeast cells for studying environmental pollution. *Environ. Pollut.*, v.109, p.43-52, 2000.

TILIGADA, E.; DELITHEOS, A. Involvement of potassium ions in the action of various antineoplastic drugs on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.16, n.5, p.251-253, 1983.

UNITED States Pharmacopeia. 28.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2005. p.2246-2251.

VON BORSTEL, R.C.; O'CONNELL, D.F.; METHA, R.D.; HENNIG, U.G.G. Modulation in cytochrome P-420 and P-450 content in *Saccharomyces cerevisiae* according to physiological conditions and genetic background. *Mutat. Res.*, v.150, p.217-224, 1985.

WALKER, G.M. *Yeast physiology and biotechnology*. 1ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 1998. 350p.

WAXMAN, D.; CHEN, L.; HECHT, J.E.D.; JOUNAIDI, Y. Cytochrome P-450 based cancer gene therapy: Recent advances and future prospects. *Drug Metab. Rev.*, v.31, n.2, p.503-522, 1999.

WILLS, C. Some puzzles about carbon catabolite repression in yeast. *Res. Microbiol.*, v.147, n.6, 566-572, 1996.

WISEMAN, A; LIM, T.K.; MCCLOUD, C. Relationship of cytochrome P-450 to growth phase of brewer's yeast in 1 % - or 20 % - glucose medium. *Biochem. Soc. Trans.*, v.3, p.276-278, 1975.

WISEMAN, A; LIM, T.K.; WOODS, L.F.J. Regulation of the biosynthesis of cytochrome P-450 in brewer's yeast – Role of cyclic AMP. *Biochim. Biophys. Acta*, v.544, p.615-623, 1978.

WISEMAN, A. Novel cytochromes P450 applications arising from the directed-evolution of recombinant micro-organisms. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.37, p.264-267, 2003.

YOSHIDA, Y.; KUMAOKA, H. Interconversion of high and low spin states of cytochrome P-450 solubilized from yeast microsomes. *J. Biochem.*, v.71, p.915-918, 1972.

YOSHIDA, Y.; KUMAOKA, H. Studies on the microsomal electron-transport system of anaerobically growth yeast. *J. Biochem.*, v.78, p.785-794, 1975.

ZIMMERMANN, F.K.; KERN, R.; RASENBERGER, H. A yeast strain for simultaneous detection of induced mitotic crossing over, mitotic gene conversion and reverse mutation. *Mutat. Res.*, v.28, p.381-388, 1975.

ZIMMERMANN, F.K.; VON BORSTEL, R.C.; VON HALLE, E.S.; PARRY, J.M.; SIEBERT, D.; ZETTERBERG, G.; BARALE, R.; LOPRIENO, N. Testing of chemicals for genetic activity with *Saccharomyces cerevisiae*: a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, v.133, p.199-244, 1984.