

PATRÍCIA REGINA MENEZES

**Análise do efeito do ácido 5-aminolevulínico
sobre o perfil transcricional de HepG2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia

São Paulo
2020

PATRÍCIA REGINA MENEZES

**Análise do efeito do ácido 5-aminolevulínico
sobre o perfil transcricional de HepG2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Ivo Lebrun

Versão original

São Paulo
2020

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Menezes, Patrícia Regina
Análise do efeito do ácido 5-aminolevulínico
sobre o perfil transcricional de HepG2 / Patrícia
Regina Menezes; orientador Ivo Lebrun. -- São
Paulo, 2020.
205 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Ácido 5-aminolevulínico. 2. Porfirias agudas.
3. Porfirinas. 4. Transcriptoma. 5. Análise de
microarray. I. Lebrun, Ivo, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Patrícia Regina Menezes

Título da Dissertação: Análise do efeito do ácido 5-aminolevulínico sobre o perfil transcricional de HepG2

Orientador: Ivo Lebrun

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

São Paulo, 19th February 2018

CERTIFIED

We certify that the Research "Effects of 5-aminolevulinic acid in gene and protein expressions in hepatocytes", protocol number CEUAX 3979030117, under the responsibility Janice Onuki, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of Butantan Institute, and was approved in the meeting of day February 15, 2017.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "EFEITOS DO ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO NA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DE HEPATÓCITOS ", protocolado sob o CEUAX nº 3979030117, sob a responsabilidade de Janice Onuki, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan, e foi aprovado na reunião de 15 de fevereiro de 2017.

Jose Ricardo Jensen
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Maria Leonor Sarno de Oliveira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Dedico este trabalho a Deus, por ter me fortalecido e proporcionado esta conquista em minha vida, e à minha família pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela oportunidade e pelo crescimento pessoal e profissional proporcionados com a realização deste mestrado.

Ao Prof. Dr. Ivo Lebrun do Laboratório de Bioquímica e Biofísica - Instituto Butantan pelo aceite ao pedido de orientação.

À Dra. Janice Onuki do Laboratório de Biologia Molecular - Instituto Butantan pela oportunidade, acolhimento, por todo o apoio, paciência, orientação, incentivo e aprendizado. Você foi essencial para que eu chegasse até aqui! Muito obrigada por todo auxílio e compreensão!

Ao Dr. Eduardo Moraes Rego Reis e alunos, em especial ao Diogo Vieira da Silva Pellegrina e Vinicius Ferreira da Paixão, do Laboratório de Genômica e Expressão Gênica em Câncer - LAPIC - USP pela colaboração e auxílio na execução dos experimentos.

Ao Dr. Flávio Lichtenstein e ao Ms. Carlos Eduardo Madureira Trufen do Centro de Excelência para Descobertas de Alvos Moleculares (CENTD) - Instituto Butantan pelas críticas, sugestões, orientações, amizade, colaboração e empenho para a realização deste trabalho. Muito obrigada por todo auxílio!

A todos os funcionários do Instituto Butantan que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho, em especial à Dra. Úrsula de Castro Oliveira do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA) - Instituto Butantan.

A todos os alunos e funcionários que eu convivi durante esses anos, em especial ao Carlos de Ocesano Pereira, Lauren Camargo, Poliana Romão da Silva, Bianca Sayuri Takayasu e dona Sônia pela ajuda, incentivo e amizade.

Ao Carlos Andrey González Blanco da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP pelo auxílio na execução dos experimentos iniciais e amizade durante o período final de seu doutorado. Muito obrigada!

Em especial, à minha mãe, Marcia Regina da Silva, ao meu padrasto, Milton Carlos Graciani, e à minha irmã, Leila Cristina Menezes, por acreditarem em mim, estarem sempre ao meu lado e apoiarem minhas decisões. Muito obrigada pela força e incentivo! Eu não conseguiria alcançar meus objetivos sem vocês!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (Capes) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro, processos n.º 2007/01966-5 e n.º 2010/51068-5.

A orientação, o desenvolvimento e a parte prática deste trabalho foram realizados sob a supervisão da Dra. Janice Onuki do Laboratório de Biologia Molecular - Instituto Butantan, com a colaboração do Dr. Eduardo Moraes do Rego Reis e Ms Diogo Vieira da Silva Pellegrina do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e do Ms Carlos Eduardo Trufen e Dr. Flavio Lichteinstein do CENTD, Instituto Butantan.

RESUMO

MENEZES, P. R. **Análise do efeito do ácido 5-aminolevulínico sobre o perfil transcricional de HepG2.** 2020. 205 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O ácido 5-aminolevulínico (ALA) é o primeiro precursor da via de biossíntese do heme, que pode sofrer oxidação em pH básico gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) como o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio e radical hidroxila ($\cdot OH$). Devido às mutações no gene da porfobilinogênio deaminase, o ALA pode acumular em desordens denominadas porfirias, particularmente as porfirias hepáticas agudas (PHA). Os distúrbios desencadeados por PHA acometem o sistema nervoso central, periférico e visceral e tem sido reportado uma maior incidência de câncer de fígado primário, em especial o carcinoma hepatocelular. Desta forma, o objetivo deste trabalho é investigar os mecanismos moleculares modulados pelo ALA através da análise do efeito sobre a expressão gênica de HepG2. O efeito de ALA sobre a viabilidade de HepG2 foi avaliada por testes como MTT e LDH. Medidas foram realizadas em células tratadas com diferentes concentrações (0 mM - 50 mM). Para o estudo de expressão gênica, HepG2 foram tratadas com 2,5 mM e 25 mM de ALA por um período de 2 h e 24 h. A análise do perfil de expressão gênica foi conduzida em lâminas de microarray. O perfil de expressão gênica obteve maior similaridade entre os tratamentos de 2 h e 24 h com 2,5 mM e entre os tratamentos de 2 h e 24 h com 25 mM. Um total de 1437 genes diferencialmente expressos (DEGs) foi identificado, dos quais 969 foram regulados positivamente e 468, regulados negativamente (2 h 2.5 mM= 891; 2 h 25 mM= 10; 24 h 2.5 mM= 470; 24 h 25 mM= 66). GDF15 e AKR1B10 foram DEGs presentes em todos os tratamentos. A análise de enriquecimento de vias foi realizada pelos bancos de dados KEGG, Reactome e Gene Ontology, seguida pela construção de redes de conectividade para o tratamento de 2 h com 2,5 mM e 24 h com 25 mM pelo MetaCore. No tratamento de 2h com 2,5 mM, processos biológicos associados à fosforilação oxidativa mitocondrial, homeostase de íons metálicos e resposta à proteína mal enoveladas foram enriquecidos. No tratamento de 2 h com 25 mM, processos associados à regulação do ciclo celular. Já para o tratamento de 24 h com 2,5 mM, os processos biológicos modulados por ALA foram relacionados à fosforilação oxidativa mitocondrial e diferenciação celular. No tratamento de 24 h com 25 mM foram enriquecidas múltiplas vias associadas aos processos metabólicos de detoxificação de cetonas e aldeídos, sinalização induzida por estresse oxidativo, regulação de morte celular, senescência, e vias relacionadas à resposta imunológica. A análise de redes de conectividade corrobora com os resultados do enriquecimento e indicou que vias como Wnt/ β -catenina poderia estar envolvida na ação de ALA. A identificação da complexa rede de vias de sinalização moduladas por ALA em diferentes concentrações e períodos de tratamento indica quais processos celulares podem estar envolvidos nos mecanismos de ação diretos e indiretos do ALA e contribui para melhor compreender seu papel nos sintomas de doenças como as porfirias agudas.

Palavras-chave: Ácido 5-aminolevulínico. Porfirias agudas. Porfirinas. Transcriptoma. Análise de microarray.

ABSTRACT

MENEZES, P. R. **Analysis of the effect of 5-aminolevulinic acid on the transcriptional profile of HepG2.** 2020. 205 f. Master's thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

5-Aminolevulinic acid (ALA) is the first precursor of the heme biosynthesis pathway, which may undergo oxidation at basic pH generating reactive oxygen species (ROS) such as superoxide radical anion ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide and hydroxyl radical ($\cdot OH$). Due to mutations in the porphobilinogen deaminase gene, ALA can accumulate in disorders called porphyrias, particularly acute hepatic porphyrias (PHA). PHA-triggered disorders affect the central peripheral and visceral nervous systems and a higher incidence of primary liver cancer has been reported, especially hepatocellular carcinoma. Thus, the aim of this study is to investigate the molecular mechanisms modulated by ALA by analyzing the effect on HepG2 gene expression. The effect of ALA on HepG2 viability was evaluated by MTT and LDH assays. Measurements were performed on cells treated with different concentrations of ALA (0 mM - 50 mM). For the gene expression study, HepG2 were treated with 2.5 mM and 25 mM ALA for a period of 2 h and 24 h. Gene expression profile analysis was performed on microarray slides. The gene expression profile was more similar between the 2 h and 24 h treatments with 2.5 mM and between the 2 h and 24 h treatments with 25 mM. A total of 1437 differentially expressed genes (DEGs) were identified, of which 969 were up-regulated and 468 down-regulated (2 h 2.5 mM = 891; 2 h 25 mM = 10; 24 h 2.5 mM = 470; 24 h 25 mM = 66). GDF15 and AKR1B10 were DEGs present in all treatments. Pathway enrichment analyses were performed by the KEGG, Reactome and Gene Ontology databases, followed by the construction of connectivity networks for the treatments for 2 h with 2.5 mM and 24 h with 25 mM by MetaCore. In the 2h treatment with 2.5 mM, biological processes associated with mitochondrial oxidative phosphorylation, metal ion homeostasis, unfolded protein response were enriched. In 2 h treatment with 25 mM, processes associated with cell cycle regulation. For the 24 h at 2.5 mM treatment, ALA modulated biological processes related to mitochondrial oxidative phosphorylation and cell differentiation. In the 24 h treatment with 25 mM, multiple pathways associated with ketone and aldehyde detoxification metabolic processes, oxidative stress-induced signaling, regulation of cell death, senescence, and pathways related to immune response were enriched. The analysis of connectivity networks corroborates the enrichment results and indicated that pathways such as Wnt / β -catenin could be involved in ALA action. Identification of the complex network of ALA-modulated signaling pathways at different concentrations and treatment periods indicates which cellular processes may be involved in ALA's direct and indirect mechanisms of action and contributes to better understanding their role in the symptoms of diseases such as acute porphyrias.

Keywords: 5-Aminolevulinic acid. Acute porphyrias. Porphyrins. Transcriptome. Microarray analysis.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| Figura 1 - Via de biossíntese do heme..... | 18 |
| Figura 2 - Mecanismos moleculares associados à oxidação e danos ao DNA promovidos por ácido 5-aminolevulínico..... | 28 |
| Figura 3 - Delineamento para o ensaio de microarray..... | 38 |
| Figura 4 - Representação da lâmina de microarray.. | 39 |
| Figura 5 - Efeito do ALA na expressão de p53.. | 45 |
| Figura 6 - Efeito do ALA na expressão de Bcl-2..... | 46 |
| Figura 7 - Efeito do ALA na expressão de catalase..... | 47 |
| Figura 8 - Efeito do ALA na expressão de superóxido dismutase (SOD).. | 48 |
| Figura 9 - Efeito do ALA na expressão de HMG-CoAr..... | 49 |
| Figura 10 - Efeito do ALA na expressão de OGG1..... | 50 |
| Figura 11 - Efeito do ALA na expressão de NF-κB p50 e NF-κB p105..... | 50 |
| Figura 12 - HRP's tratados com ALA (0-100 mM) por 2 h..... | 51 |
| Figura 13 (A e B) - Viabilidade de células HepG2 pelo ensaio de MTT..... | 52 |
| Figura 14 (A e B) - Citotoxicidade de células HepG2 pelo ensaio de LDH..... | 53 |
| Figura 15 - Histograma dos sinais fluorescentes de expressão gênica corrigidos e normalizados..... | 61 |
| Figura 16 - Normalização das intensidades de Cy3 e Cy5 visualizada por MA plot..... | 63 |
| Figura 17 - Normalização das intensidades de Cy3 e Cy5 visualizada por boxplot..... | 64 |
| Figura 18 - Volcano plots dos genes expressos em cada tratamento..... | 67 |
| Figura 19 - Heatmap da análise de agrupamento hierárquico para todos os genes..... | 82 |
| Figura 20 - Heatmap da análise de agrupamento hierárquico para os DEGs..... | 83 |
| Figura 21 - Diagrama de Venn..... | 85 |
| Figura 22 - Vias enriquecidas pelo banco de dados KEGG..... | 101 |
| Figura 23 - Vias enriquecidas pelo banco de dados Reactome..... | 103 |
| Figura 24 - Funções moleculares enriquecidas pelo banco de dados GO..... | 109 |
| Figura 25 - Componentes celulares enriquecidos pelo banco de dados GO..... | 112 |
| Figura 26 - Processos biológicos enriquecidos pelo banco de dados..... | 114 |
| Figura 27 - Rede de conectividade do tratamento de 2 h com 2,5 mM..... | 141 |
| Figura 28 - Rede de conectividade do tratamento de 24 h com 25 mM..... | 142 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1 - Parâmetros avaliados nas sondas controles. | 41 |
| Tabela 2 - Medidas de pureza, quantificação e o RIN de cada amostra de RNA. | 55 |
| Tabela 3 - Avaliação das métricas em sondas controles.. | 58 |
| Tabela 4 - Avaliação das métricas em sondas controles.. | 59 |
| Tabela 5 - DEGs regulados pelo ALA. | 68 |
| Tabela 6 - Sobreposições de DEGs entre os tratamentos e suas funções. | 86 |
| Tabela 7 - Lista dos 10 DEGs exclusivos regulados positiva e negativamente expressos em cada tratamento e suas respectivas funções. | 90 |
| Tabela 8 - Vias de sinalização enriquecidas pelo KEGG.. | 102 |
| Tabela 9 - Vias de sinalização enriquecidas pelo Reactome.. | 104 |
| Tabela 10 - Funções moleculares enriquecidas pelo Gene Ontology. | 110 |
| Tabela 11 - Componentes celulares enriquecidos pelo Gene Ontology.. | 113 |
| Tabela 12 - Processos biológicos enriquecidos pelo banco de dados GO. | 115 |
| Tabela 13 - Processos e vias compartilhados entre os bancos de dados no tratamento de 2 h com 2.5 mM..... | 122 |
| Tabela 14 - Processos e vias compartilhados pelos bancos de dados no tratamento de 24 h com 25mM..... | 125 |
| Tabela 15 - Categorização dos termos enriquecidos em “Processos biológicos” pelo Gene Ontology.. | 129 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|-----|
| Quadro 1 - Sumarização das vias enriquecidas pelo “Processos Biológicos” do Gene Ontology em cada tratamento..... | 156 |
|--|-----|

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1 Porfirias | 18 |
| 1.1.1 Porfiria aguda intermitente | 21 |
| 1.2 Câncer hepático | 23 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 24 |
| 2.1 Epidemiologia: Hepatocarcinoma celular em porfirias hepáticas agudas... | 24 |
| 2.2 Patogênese do hepatocarcinoma celular em porfiria aguda intermitente ... | 27 |
| 2.3 Abordagens experimentais para o estudo das porfirias | 29 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 30 |
| 4 OBJETIVO | 30 |
| 5 MATERIAIS E MÉTODOS | 31 |
| 5.1 Análise da expressão de proteínas em hepatócitos primários de ratos tratados com ALA | 31 |
| 5.1.1 Cultura de hepatócitos: isolamento e cultura | 31 |
| 5.1.2 Tratamento de hepatócitos..... | 31 |
| 5.1.3 Detecção de proteínas | 31 |
| 5.2 Ensaio de lipoperoxidação em hepatócitos primários de ratos tratados com ALA | 32 |
| 5.3 Análise estatística do ensaio de Western blotting e lipoperoxidação | 33 |
| 5.4 Delineamento do ensaio de expressão gênica de HepG2 tratadas com ALA | 33 |
| 5.4.1 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT | 33 |
| 5.4.2 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de LDH | 34 |
| 5.4.3 Determinação de concentrações de ALA e períodos para o tratamento | 34 |
| 5.4.3.1 <i>Cultura celular e tratamento</i> | 35 |
| 5.4.4 Extração e purificação de RNA total | 35 |
| 5.4.4.1 <i>Análise de pureza, quantificação e integridade do RNA</i> | 36 |
| 5.4.5 Marcação e amplificação das amostras | 37 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 5.4.6 | Hibridização das amostras | 38 |
| 5.4.7 | Escaneamento das lâminas | 39 |
| 5.4.8 | Pré-processamento dos dados | 39 |
| 5.4.9 | Análise da qualidade das lâminas hibridizadas | 40 |
| 5.4.9.1 | <i>Localização dos spots</i> | 40 |
| 5.4.9.2 | <i>Distribuição de Outliers</i> | 40 |
| 5.4.9.3 | <i>Distribuição dos sinais fluorescentes de sondas controles</i> | 40 |
| 5.4.9.4 | <i>Acurácia e reprodutibilidade da fluorescência das sondas</i> | 40 |
| 5.4.9.5 | <i>Parâmetros de hibridização</i> | 41 |
| 5.4.10 | Processamento dos dados..... | 42 |
| 5.4.11 | Identificação de genes diferencialmente expressos, análise de perfis de expressão e interpolação de DEGs entre os tratamentos | 42 |
| 5.4.12 | Análise de enriquecimento funcional e de vias | 43 |
| 5.4.13 | Construção de redes de interação gênica | 44 |
| 6 | RESULTADOS | 44 |
| 6.1 | Análise da expressão de proteínas de hepatócitos primários de ratos tratados com ALA | 44 |
| 6.2 | Viabilidade Celular de HepG2 tratadas com ALA..... | 51 |
| 6.3 | Análise de pureza, integridade e quantificação de RNA | 53 |
| 6.4 | Análise da qualidade das lâminas hibridizadas | 55 |
| 6.4.1 | Localização de spots | 56 |
| 6.4.2 | Distribuição de <i>Outliers</i> | 56 |
| 6.4.3 | Distribuição de fluorescência dos sinais fluorescentes | 56 |
| 6.4.4 | Acurácia e reprodutibilidade da fluorescência das sondas | 56 |
| 6.4.5 | Parâmetros da hibridização..... | 57 |
| 6.5 | Processamento dos dados..... | 60 |
| 6.6 | Identificação de genes diferencialmente expressos..... | 64 |
| 6.7 | Análise dos perfis de expressão gênica por clusterização hierárquica | 81 |
| 6.8 | Interpolação de genes diferencialmente expressos..... | 83 |
| 6.9 | Análise de enriquecimento de vias e processos biológicos | 96 |
| 6.9.1 | Processos enriquecidos no tratamento de 2 h com 2.5 mM..... | 96 |

| | |
|--|------------|
| 6.9.1.1 Processos enriquecidos no tratamento de 2 h com 25 mM | 97 |
| 6.9.1.2 Processos enriquecidos no tratamento de 24 h com 2.5 mM | 98 |
| 6.9.1.3 Processos enriquecidos no tratamento de 24 h com 25 mM | 98 |
| 6.9.1.4 Análise de enriquecimento pelo KEGG, Gene Ontology e Reactome..... | 99 |
| 7 REDES DE CONECTIVIDADE | 139 |
| 8 DISCUSSÃO | 143 |
| 8.1 Análise de enriquecimento para o tratamento com 2,5 mM e 25 mM | 145 |
| 8.2 Redes de conectividades gênica para o tratamento de 2 h com 2,5 mM ... | 149 |
| 8.3 Redes de conectividade gênica para o tratamento de 24 h com 25 mM | 150 |
| 8.4 Hepatócitos primários de ratos versus HepG2..... | 152 |
| 9 CONCLUSÃO | 155 |
| 10 PERSPECTIVAS..... | 157 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 158 |
| ANEXO A | 176 |
| ANEXO B | 178 |
| ANEXO C | 180 |
| ANEXO D | 182 |
| ANEXO E | 185 |
| ANEXO F..... | 186 |
| ANEXO G | 187 |
| ANEXO H | 191 |
| APÊNDICE A..... | 195 |
| APÊNDICE B | 204 |

1 INTRODUÇÃO

O heme é um grupo prostético composto por um anel tetrapirrólico associado a um íon ferro (Fe^{2+}). Este grupo se liga a proteínas que desempenham funções biológicas essenciais para o organismo como o transporte de oxigênio, transporte de elétrons e catálise (BONKOWSKY; SINCLAIR; SINCLAIR, 1979).

Todas as células nucleadas sintetizam heme, contudo sua produção majoritária (80 - 90%) ocorre em hepatócitos e em eritrócitos imaturos da medula óssea. O mecanismo regulatório de sua síntese difere entre os sítios: depende de íons Fe^{2+} disponíveis em eritrócitos imaturos e do *pool* de heme livre em hepatócitos (BONKOWSKY; SINCLAIR; SINCLAIR, 1979).

A via de biossíntese do heme engloba oito reações enzimáticas, sendo a primeira e as três últimas mitocondriais e as demais citoplasmáticas, com a concomitante produção de precursores e compostos intermediários denominados porfirinas (BONKOWSKY; SINCLAIR; SINCLAIR, 1979). Como descrito na Figura 1, na primeira etapa, a ALA sintase (ALAS) sintetiza o ácido 5 aminolevulínico (ALA), a partir da condensação de uma molécula de succinil-CoA com o aminoácido glicina. ALAS possui duas isoformas, a ALAS1, expressa em todas as células e a ALAS2, presente somente em eritrócitos e hepatócitos. A ALAS1 controla a síntese hepática do heme e é regulada pelo heme intracelular. Na segunda etapa, ALA é transportado para o citoplasma onde ALA desidratase (ALAD) catalisa a condensação de duas moléculas de ALA para a formação de porfobilinogênio (PBG), um monopirrol, incolor e hidrossolúvel. A terceira etapa é a polimerização de quatro moléculas de PBG, pela porfobilinogênio deaminase (PBGD), para produção de um tetrapirrol linear hidroximetilbilano (HMB). Na quarta etapa, HMB é ciclizado na estrutura de anel tetrapirrólico formando o uroporfirinogênio III, uma reação catalisada pela uroporfirinogênio III sintase (URS). Na quinta etapa, uroporfirinogênio descarboxilase (URD) catalisa a remoção de quatro resíduos carboxilas, convertendo uroporfirinogênio III para coproporfirinogênio III. Na sexta etapa, coproporfirinogênio III é transportado para dentro da mitocôndria onde a coproporfirinogênio oxidase (CPOX) remove outros dois grupos carboxila para formação de protoporfirinogênio IX. A progressiva descarboxilação de precursores e porfirinas torna essas moléculas mais hidrofóbicas determinando sua rota de excreção. A sétima etapa ocorre através

da protoporfirinogênio oxidase (PPOX), catalisando a conversão de protoporfirinogênio IX em protoporfirina IX. Na oitava e última etapa, ocorre a inserção de Fe^{2+} na protoporfirina IX para formação do heme, cuja reação é catalisada pela ferroquelatase (FECH) (BONKOWSKY; SINCLAIR; SINCLAIR, 1979). A deficiência enzimática em qualquer um desses passos afeta a produção de heme e desencadeia um grupo de doenças denominado porfirias (WANG et al., 2019).

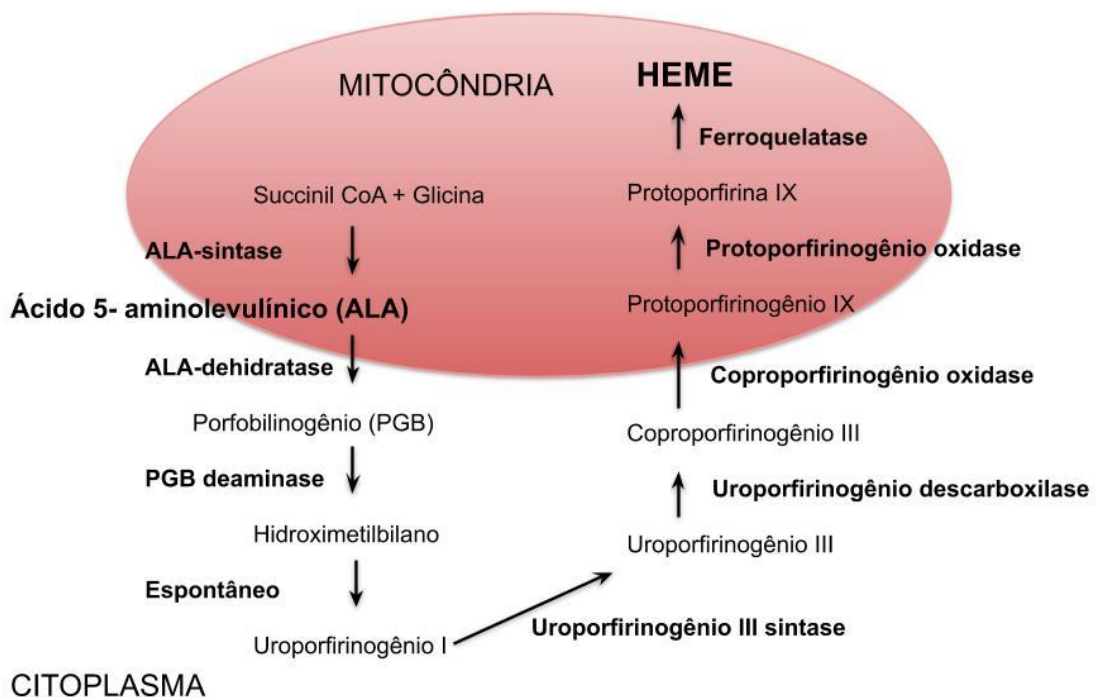


Figura 1 - Via de biossíntese do heme. **Fonte** - (BONKOWSKY; SINCLAIR; SINCLAIR, 1979).

1.1 Porfirias

As porfirias são desordens metabólicas caracterizadas pela inibição ou insuficiência enzimática da via de biossíntese do heme que resultam na superprodução de precursores e porfirinas. Quando acumulados em órgãos e tecidos, estes metabólitos são potencialmente tóxicos, sendo que o passo na via onde ocorre a deficiência enzimática caracteriza o tipo de porfiria (PUY; GOUYA; DEYBACH, 2010).

As porfirias podem ser classificadas como: (1) fotossensível ou neurovisceral, dependendo dos sintomas; (2) hepáticas ou eritróides, de acordo com o sítio de acúmulo dos metabólitos, (HINDMARSH, 1982); (3) porfirias agudas ou não-agudas, decorrente ou não de ataques agudos (PUY; GOUYA; DEYBACH, 2010) ou (4) cutânea eritróide, cutânea hepática e hepáticas agudas (WANG et al., 2019).

As porfirias cutâneas eritróides englobam a porfiria eritropoiética congênita, protoporfiria eritropoiética e protoporfiria ligada ao cromossomo X, sendo caracterizadas pelo comprometimento hematológico e cutâneo. Já as porfirias cutâneas hepáticas compreendem a porfiria cutânea tarda (PCT) e a porfiria hepatoeritropoiética, caracterizadas pelo comprometimento hepático e cutâneo (MARION et al., 2017).

As porfirias hepáticas agudas (PHAs), compostas pela porfiria aguda intermitente (PAI), porfiria variegata (PV), coproporfiria hereditária (CH) e porfiria associada à deficiência de ALA desidratase (PDA), desencadeadas por mutações nos genes codificantes para porfobilinogênio deaminase (PBGD), protoporfirinogênio oxidase, coproporfirinogênio oxidase e ALA desidratase, respectivamente, caracterizadas pelo acúmulo plasmático e excreção urinária de ALA e PGB (WANG et al., 2019). O protoporfirinogênio e/ ou coproporfirinogênio, em concentrações elevadas, podem ser inibidores alostéricos da PBGD (STEIN; BADMINTON; REES, 2017). Entre as PHAs, a PDA é extremamente rara, sendo reportados poucos casos na literatura. Já a PAI ocorre com maior frequência quando comparada à PV e CH e é a PHA que provoca os sintomas clínicos mais severos (HIFT; MEISSNER, 2005). Já na prática clínica, PCT, PAI e protoporfiria eritropoiética são as porfirias mais encontradas (LONGO, 2017).

As PHAs são oriundas de uma ampla variabilidade alélica decorrente de mutações *nonsense* ou *missense*. Stenson *et al* verificaram 403 variantes do gene porfobilinogênio deaminase (PBGD), 177 variantes do gene para protoporfirinogênio deaminase e 65 variantes do gene de coproporfirinogênio deaminase (STENSON et al., 2014).

Devido à sua raridade, é difícil de estimar a prevalência de porfirias. Entre as PHAs, em muitas regiões a PAI é a mais frequente e a PDA, extremamente rara. A PV é mais frequente na África do Sul, onde Hift e Meissner reportaram uma prevalência de 3.000 indivíduos de descendência holandesa por milhão de

habitantes (HIFT; MEISSNER, 2005). Bonkovsky *et al* relataram prevalência de PV de 4 a 13 por milhão de indivíduos nos Estados Unidos (BONKOVSKY, 2014). Na Finlândia e em toda a Europa, a prevalência de PV foi de 1.3:10.000 e 0.3:100.000 habitantes, respectivamente (WANG et al., 2013). Ramanujam *et al* reportaram a prevalência de CH na Dinamarca de aproximadamente 2:1.000.000 habitantes (RAMANUJAM; ANDERSON, 2015). Na Europa, a prevalência de portadores sintomáticos de PAI foi de 5 a 10 por 100.000 habitantes (ELDER et al., 2013). Já no Brasil, Osternack *et al* reportaram a frequência de porfirias em brasileiros através da análise de 439 dados da ABRAPO (Associação Brasileira de Porfiria) de 2007 a 2015, sendo 113 homens e 326 mulheres. O padrão de prevalência foi semelhante ao observado em estudos conduzidos em outros países. Entre as PHAs, PAI foi presente em 59.4% dos pacientes, CH foi presente em 4.3%, PV em 2.5% e porfiria associada à deficiência de ALA desidratase, em 0.4% (OSTERNACK, 2016).

As PHAs desencadeiam uma ampla heterogeneidade de sintomas clínicos acometendo o sistema nervoso central, periférico e visceral, porém portadores de PV e CH também podem desenvolver lesões cutâneas fotossensíveis (STEIN; BADMINTON; REES, 2017). A patogênese de PHAs é ainda incerta, contudo ALA pode exercer efeitos danosos no sistema nervoso diretamente, devido à sua semelhança estrutural com o neurotransmissor ácido-aminobutírico (GABA), ou indiretamente por induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (BRENNAN; CANTRILL, 1981). A participação de ALA na patogênese de PHAs é apoiada por observações em PAI e nas desordens porfíricas adquiridas tirosinemia hereditária e intoxicação por chumbo. Nestas últimas, onde ocorre o aumento da concentração e acúmulo de ALA, mas não de PBG, foram reportados os mesmos sintomas desencadeados por PAI (AKSHATHA et al., 2014; SASSA; KAPPAS, 1983).

Nas PHAs, o sintoma característico é a ocorrência de ataques porfíricos intermitentes caracterizados por dores agudas abdominais, tetraparesia, paralisia oculomotora; manifestações disautonômicas, taquicardia, parada cardíaca, depressão respiratória; distúrbios hidroelétricos como hiponatremia, hipopotassemia, acidose e alcalose respiratória, alcalose metabólica, disfunções neurológicas e alterações psíquicas que desenvolvem-se em poucas horas ou dias e, em casos mais graves, cursam com crises convulsivas (MEYER; SCHUURMANS; LINDBERG,

1998; TILBERY; WILSON; EDNA, 1979). A longo prazo, esse complexo espectro de manifestações clínicas pode acarretar em falha renal e hipertensão (ANDERSSON; LITHNER, 1994), sendo a maior complicação o desenvolvimento de câncer primário de fígado, em especial o hepatocarcinoma celular (HCC) (ANDANT et al., 1998; KAUPPINEN; MUSTAJOKI, 1988; TIDMAN et al., 1989). Aproximadamente 80% dos portadores são assintomáticos, porém são igualmente susceptíveis à ocorrência de crises porfíricas (STEIN; BADMINTON; REES, 2017).

1.1.1 Porfiria aguda intermitente

A PAI é a mais comum entre as PHAs sendo caracterizada por episódios intermitentes de ataques agudos (SASSA; KAPPAS, 2000). PAI é uma desordem autossômica dominante rara resultante de uma variedade de mutações do gene codificante para PBGD do cromossomo 11q24 (TILBERY; WILSON; EDNA, 1979). Assim como em outras porfirias agudas, PAI possui uma baixa penetrância, variável entre 10% e 20%, em portadores do gene para PBGD mutado (DEYBACH; PUY, 2011). Contudo, na Suécia, região onde há maior número de casos relatados da doença, a penetrância chega a 40% (BYLESJÖ; WIKBERG; ANDERSSON, 2009).

A utilização de técnica imunológica para a quantificação de proteínas associada à medida de atividade enzimática proporcionou um melhor entendimento acerca da patofisiologia de porfirias (ANDERSON et al., 1981). Particularmente para PAI, mutações no gene codificante para PBGD, caracterizam os portadores em CRIM-positivo e CRIM-negativo (CRIM: Cross-reactive immunologic material). A divisão em CRIM-positivo e CRIM-negativo se dá de acordo com a razão entre a quantidade da enzima e atividade enzimática: no CRIM-negativo, a quantificação e a atividade enzimática são correspondentes, isto é, mutações que resultam na síntese de 50% de PGBD e possuem 50% da atividade enzimática. Já no CRIM-positivo a quantificação da enzima é superior à atividade enzimática, indicando a presença de enzima anormal funcionalmente, ou seja, refere a mutações que resultam na atividade diminuída de PGBD, contudo não há alteração na quantidade/estabilidade enzimática (DESNICK et al., 1985). Deste modo, há três subtipos de PAI: 1) (CRIM-negativo) mutações por substituição ou deleção de uma única base que resultam na substituição de um aminoácido ou em proteína truncada, causando uma diminuição

de aproximadamente 50% da síntese e da atividade de PBGD em todos os tecidos; 2) (Sem deficiência de PBGD eritrocitária) uma deleção sítio do íntron 1, cuja deficiência em PBGD ocorre somente em células não eritróides; 3) (CRIM-positivo), apenas a diminuição da atividade de PBGD é encontrada em todos os tecidos (SASSA; KAPPAS, 2000).

A PAI é considerada uma doença de difícil diagnóstico devido à sua raridade e ao conjunto de sinais e sintomas inespecíficos que apresenta. Os portadores que não apresentam ataques agudos são considerados portadores latentes. O diagnóstico de PAI ocorre através dos sintomas típicos associados ao aumento da excreção urinária de ALA e PBG, particularmente quando a doença é clinicamente expressa, através da dosagem da atividade de PBGD em eritrócitos e/ou através de análise genética (HINDMARSH, 1982; LITHNER; WETTERBERG, 1984).

A maioria dos portadores de PAI sofrem poucos ataques agudos ao longo da vida, mas há casos mais graves em que o desenvolvimento dos sintomas ocorre com maior assiduidade (STEIN; BADMINTON; REES, 2017). Estima-se que 10% dos portadores de PAI apresentem crises porfíricas periódicas. A taxa de mortalidade foi calculada entre 15 a 20% em portadores com crises recorrentes. Os ataques agudos são mais frequentes em mulheres, durante a segunda e terceira décadas de vida (HINDMARSH, 1986).

Os sintomas frequentemente observados são disfunções neurológicas, ataques agudos de dores abdominais, constipação, taquicardia, vômitos, hipertensão, sendo hiponatremia e pancreatite menos frequente, além do desenvolvimento de HCC (MEYER; SCHUURMANS; LINDBERG, 1998). Ataques agudos periódicos e o conseqüente acúmulo de ALA, aproximadamente de 4 a 100 vezes o valor normal ($0,1 \mu\text{M}$), podem estar correlacionados ao aumento do número de casos de HCC em portadores sintomáticos de PAI (LITHNER; WETTERBERG, 1984). Os portadores assintomáticos também estão sujeitos a níveis plasmáticos elevados de ALA, como reportado por Floderus *et al*, os quais verificaram um valor médio de $0,38 \mu\text{mol/L}$ e $1,7 \mu\text{mol/L}$ em indivíduos saudáveis e portadores assintomáticos de PAI, respectivamente. (FLODERUS *et al.*, 2006).

Vários fatores podem precipitar as crises de PAI por aumentar a demanda de heme e, conseqüentemente, estimular a expressão da enzima ácido 5-aminolevulínico sintase (ALAS). Infecções, certas drogas, hormônios sexuais, álcool

e alterações nutricionais são alguns dos agentes que estimulam as crises (BISSELL; WANG, 2015; LITHNER; WETTERBERG, 1984).

Medidas profiláticas são adotadas para evitar a frequência dos ataques e terapias são empregadas para conter a produção de precursores porfirínicos, além do tratamento dos sintomas. Algumas das terapias propostas são infusão intravenosa de heme ou hematina, agentes quelantes, antioxidantes e sobrecarga de carboidratos (HINDMARSH, 1982; PUY; GOUYA; DEYBACH, 2010). A glicose age como inibidor indireto de ALAS por atuar sobre o coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PCG-1 α), uma proteína que estimula a transcrição de ALAS (HANDSCHIN et al., 2005). Os pacientes com ataques recorrentes podem precisar de transplante de fígado (SOONAWALLA et al., 2004). Outros potenciais métodos terapêuticos hipotetizados foram terapia gênica dirigida ao fígado tendo como objetivo a superexpressão de PBGD (UNZU et al., 2010), silenciamento de ALAS1 mediado por pequenos RNAs de interferência (siRNAs) (YASUDA et al., 2014) e administração intravenosa de RNAs mensageiros para PBGD humana encapsulados por nanopartículas lipídicas (JIANG et al., 2018).

1.2 Câncer hepático

O câncer hepático é a segunda causa mais comum de mortalidade relacionada ao câncer no mundo. O hepatocarcinoma celular (HCC) compreende 90% dos casos de câncer primário de fígado com aproximadamente 800.000 novos casos por ano (LLOVET et al., 2018). Entre os portadores de PHAs, a incidência anual de desenvolvimento de câncer primário de fígado é de 0,35% *versus* 0,003% em residentes sem PHAs da Noruega (BARAVELLI et al., 2017). No norte da Suécia, um estudo de rastreamento acompanhou portadores de PAI durante um período de 15 anos, constatando que a incidência anual de HCC por 100.000 foi de 815. Já para a população geral, a incidência anual correspondente foi de 12,7 por 100.000 (INNALA; ANDERSSON, 2011).

Alguns fatores de risco para o desenvolvimento de HCC já são bem definidos como hepatites virais (B e/ou C), cirrose, doença do fígado gorduroso não alcoólica, doenças metabólicas (diabetes e obesidade), toxinas ambientais (aflatoxinas B1, B2, G1 e G2), fatores relacionados ao estilo de vida (fumo, consumo de álcool e dieta) e

fatores genéticos (hemocromatose, deficiência de alfa-1 antitripsina, glicogenose tipo I, tirosinemia hereditária do tipo I e porfirias hepáticas) (LOK et al., 2009; RAWLA et al., 2018). Entre os fatores genéticos, mutações no promotor *TERT* são as mais frequentes, presentes em ~60% dos casos (SCHULZE; NAULT; VILLANUEVA, 2016). Outras mutações são verificadas em genes do ciclo celular (*TP53*), sinalização Wnt e remodelamento de cromatina (*ARID1A* e *ARID2*) (AHMET ZEHIR et al., 2017).

O crescimento tumoral necessita de um microambiente específico, especialmente relevante para tumores hepáticos dos quais 90% se desenvolvem em condições inflamatórias crônicas (LLOVET et al., 2018). Os fatores que colaboram para o desenvolvimento do câncer hepático incluem alterações na matriz extracelular, sinalização entre células parenquimatosas e não parenquimais e disfunção do sistema imune (HERNANDEZ-GEA et al., 2013). Todavia, sob as várias condições que promovem a iniciação e a promoção de HCC, o estresse oxidativo é um fator crucial que contribui para a transformação de células normais e migração, invasão e metástase de células malignas (SASAKI, 2006; TOYOKUNI et al., 1995).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Epidemiologia: Hepatocarcinoma celular em porfirias hepáticas agudas

Vários estudos retrospectivos e prospectivos de caso-controle e mortalidade reportaram uma associação entre PHAs, especialmente PAI, e o desenvolvimento de câncer primário de fígado. Lithner e Wetterberg conduziram o primeiro estudo, ao analisar biópsias ou autópsias de 206 portadores de PAI, e registraram 11 casos de HCC (LITHNER; WETTERBERG, 1984). Bengtsson e Hardell investigaram duas famílias de portadores de PAI. Na primeira família, 1 de 4 irmãos, morreu após um ataque agudo porfírico e os demais desenvolveram HCC. Já na segunda família, 3 de 5 irmãos eram portadores de PAI, sendo que 2 dos 3 portadores desenvolveram HCC (BENGTSSON; HARDELL, 1986).

Kauppinen e Mustajoki verificaram lesões no fígado de portadores de PHAs como cirrose e aumento na incidência de casos de HCC em PV, PCT e CH, sendo mais frequente em portadores de PAI. Os registros de dados examinados pertenciam

a indivíduos vivos (121 com PAI e 42 com PV) e mortos (63 com PAI e 19 com VP). O óbito de portadores de PAI foi devido a sintomas desencadeados pela própria doença (29 mortes), doença cardiovascular (23 mortes), HCC (7 mortes) e em decorrência de outros tipos de tumores (4 mortes). Dos 7 portadores de PAI que desenvolveram HCC, 3 apresentaram inflamação hepática e 4, somente necrose (contudo, dos 7, somente um não apresentou outras doenças ou exposição a drogas que justificassem o HCC. Apenas 1 portador de PV apresentou HCC e inflamação hepática (KAUPPINEN; MUSTAJOKI, 1988).

Tidman *et al* publicaram um relato de caso de uma mulher de 70 anos diagnosticada com HCC, altos níveis no soro de α -fetoproteína e medida de porfirias no plasma com padrão característico de PV (TIDMAN *et al.*, 1989). Gluber *et al* reportaram câncer em duas irmãs portadoras de PAI: 1) a primeira, com 65 anos, desenvolveu carcinoma colangiocelular intra-hepático e fibrose centrolobular leve sem a presença de cirrose no tecido hepático circundante. Contudo, esta paciente consumia diariamente entre 500 mL a 1 L de vinho; 2) a segunda, com 62 anos, não sofria ataques agudos recorrentes, porém consumia quantidades excessivas de álcool nos 5 anos que antecederam o diagnóstico de carcinoma hepatocelular adenomatóide com extensa degeneração gordurosa (GUBLER; BARGETZI; MEYER, 1990).

Germanaud *et al* descreveram um caso de uma portadora de PV, 54 anos, que desenvolveu HCC após dezoito anos do diagnóstico de porfiria (GERMANAUD *et al.*, 1994). A presença de pré-cirrose e cirrose em paciente porfíricos foi verificada por Bjersing *et al* em biópsias ou autópsias de HCC de 17 portadores de PAI (BJERSING; ANDERSSON; LITHNER, 1996). Andant *et al* reportaram um caso de uma portadora de CH, 58 anos, que desenvolveu HCC sem a presença concomitante de qualquer fator etiológico que predispucesse à ocorrência tumoral (ANDANT *et al.*, 1997). Outras neoplasias foram descritas em PAI e PCT como câncer de faringe, cólon, pulmão, mama, renal e hematolinfoproliferativo (MARTHA S. LINET *et al.*, 1999).

Em 2000, Andant *et al* conduziram um estudo composto por 430 portadores de PAI, 136 portadores de VP e 84 portadores de CH com o intuito de investigar os fatores genéticos relacionados ao HCC em portadores de PHAs. Dentre os 7 indivíduos (sintomáticos e assintomáticos) que desenvolveram HCC: 5 eram

portadores de PAI, 1 de VP e 1 de CH. Além de HCC, colangiocarcinoma, sozinho ou combinado com HCC, também foi verificado. A alteração nos genes foi heterogênea e afetou somente um alelo dos genes: PAI, (Del exon 12) (R173W) (L42X) (913 Ins C) (E250K); PV (1082 Ins C) e CH (Q306X) (ANDANT et al., 2000).

Innala e Andersson reportaram uma incidência anual de 0,8% de HCC em portadores de PAI, no norte da Suécia, dentre os quais 27% nunca havia apresentado sintomas (INNALA; ANDERSSON, 2011). Posteriormente, Lang *et al* verificaram a ocorrência de outros tipos de cânceres como o de fígado, cólon, mama, útero, tireoide e linfoma bem como metástase para o fígado em um grupo composto por 49 portadores de PHAs, dentre os quais 38 eram portadores de PAI, 10 de VP e 1 de PDA (LANG et al., 2015).

Schneider *et al* investigaram causas genéticas relacionadas à incidência elevada de HCC em portadores de PHAs. Foram conduzidas análises em 3 regiões tumorais e 10 não tumorais do fígado e do tecido cardíaco de uma portadora de PV (paciente 1) e análise de regiões tumorais hepáticas e não tumorais de uma portadora de PAI (paciente 2). Além disso, 10 regiões tumorais hepáticas de portadores de HCC sem porfirias foram também analisadas. Os resultados revelaram mutações germinativas e somáticas nas duas pacientes: a) na paciente 1, uma mutação germinativa de inserção de nucleotídeo único c.1082dupC no exon 10 no gene da protoporfirinogênio oxidase foi encontrada em ambos os tecidos hepático e cardíaco e uma mutação somática *nonsense* foi encontrada no exon 11, no qual insere um códon de parada no lugar de uma lisina, mutação esta chamada de p.K416X; b) na paciente 2, uma mutação germinativa de transversão G-A foi verificada no exon 7 de protoporfirinogênio deaminase e uma mutação somática causada por uma mutação *nonsense* no exon 12 mudando leucina para um códon de parada. Mutações em genes relacionados ao HCC como *TP53*, *CTNNB1*, *KRAS* e *BRAF* nas duas pacientes foram descartadas e, de acordo com os autores, não houveram evidências suficientes da participação de ALA (níveis elevados) para o desenvolvimento de HCC (SCHNEIDER-YIN et al., 2015). Baravelli *et al* relataram risco elevado de desenvolvimento de câncer primário de fígado em portadores de PHAs *versus* a população sem PHAs da Noruega (BARAVELLI et al., 2017).

2.2 Patogênese do hepatocarcinoma celular em porfiria aguda intermitente

A razão da maior incidência de HCC em portadores de PAI ainda não é bem esclarecida, contudo várias hipóteses foram levantadas ao longo dos anos. A primeira hipótese sugerida foi que, devido à disfunção do metabolismo do heme, alterações na detoxificação hepática, como redução de citocromo P450, poderiam causar o acúmulo de substâncias cancerígenas (LITHNER; WETTERBERG, 1984). Outras hipóteses para tal associação sugeriram que porfirinas por si só seriam potencialmente carcinogênicas (BENGTSSON; HARDELL, 1986), ou que o desenvolvimento do HCC seria devido à superprodução e acúmulo de ALA e PBG (LITHNER; WETTERBERG, 1984), ou que a diminuição da quantidade de heme poderia afetar a síntese de enzimas antioxidantes hepáticas contribuindo para o desenvolvimento de HCC (BENGTSSON; HARDELL, 1986; WILE et al., 1984). Além disso, Bengtsson *et al* hipotetizaram que o gene codificante para PBGD poderia atuar como supressor tumoral (BENGTSSON; HARDELL, 1986), contudo a relação entre o gene mutado da PBGD e o desenvolvimento de HCC em portadores de PAI é controversa. Andant *et al* foram contra essa hipótese ao verificar alterações heterogêneas em somente um alelo em pacientes com PAI (ANDANT et al., 2000). Já Schneider-Yin *et al* hipotetizaram que o gene da PBGD poderia atuar com supressor tumoral e que mutações somáticas e germinativas em seus dois alelos e, conseqüentemente, deficiência quase total de PBG, seriam responsáveis pelo desenvolvimento de HCC em uma portadora de PAI (SCHNEIDER-YIN et al., 2015).

Mais recentemente, Storjord *et al* sugeriram, após verificação de elevados níveis sistêmicos de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em portadores de PAI, que ALA, PBG e/ou várias outras porfirinas poderiam atuar como padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e que um nível basal de inflamação estaria associado à sintomatologia de PAI (STORJORD et al., 2017). As hipóteses para a associação entre PHAs e o desenvolvimento de HCC foram recentemente sumarizadas e publicadas por Peoc'h *et al* (PEOC'H et al., 2018).

Estudos demonstrando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), durante a oxidação de ALA *in vitro* (MONTEIRO et al., 1986) originaram outra hipótese que sugeriu que um ambiente oxidativo, gerado pelo acúmulo de ALA, estaria associado ao HCC (FRAGA et al., 1994; ONUKI et al., 2002c). Lesões ao

DNA como quebra de fita simples de DNA e oxidação de bases induzidas por ALA reforçaram essa hipótese (DI MASCIO et al., 2000; DOUKI et al., 1998; MONTEIRO et al., 1986; ONUKI et al., 1994, 2002a, 2004).

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram o potencial oxidante e deletério de ALA em altas concentrações (CARNEIRO; REITER, 1998; DOUKI et al., 1998; FRAGA et al., 1994; MONTEIRO et al., 1986). O ácido 5-aminolevulínico (ALA) é uma α -aminocetona (Figura 2) que em pH fisiológico forma espécies reativas de oxigênio (ROS) como ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\cdot OH$), e, como produto final da reação, o ácido 4,5-dioxovalérico (DOVA) (MONTEIRO et al., 1986). Além do DOVA, o ALA pode dar origem ao ácido 6-dihidropirazina-2,5-dipropanóico (DHPY), um produto de sua dimerização (BUTLER; GEORGE, 1992). Onuki *et al* hipotetizaram os mecanismos moleculares de danos no DNA promovidos por ALA: ALA pode enolizar em pH fisiológico e oxidar na presença de oxigênio e íons Fe^{2+} , formando o radical enoil ALA \cdot e $O_2^{\cdot-}$. O radical $O_2^{\cdot-}$ pode ser dismutado ou reduzido a H_2O_2 . Através da reação de Fenton, H_2O_2 reage com Fe^{2+} dando origem ao $\cdot OH$ um radical livre altamente deletério. A oxidação do radical ALA \cdot produz a imina de ALA que, ao ser hidrolisada, gera o produto da reação de ALA: o DOVA. O outro produto de ALA, o DHPY é originado da dimerização espontânea desse metabólito, em pH ácido, e também pode promover danos oxidativos pela produção de $O_2^{\cdot-}$ e outras ROS via reação com íons metálicos (ONUKI et al., 2002c).

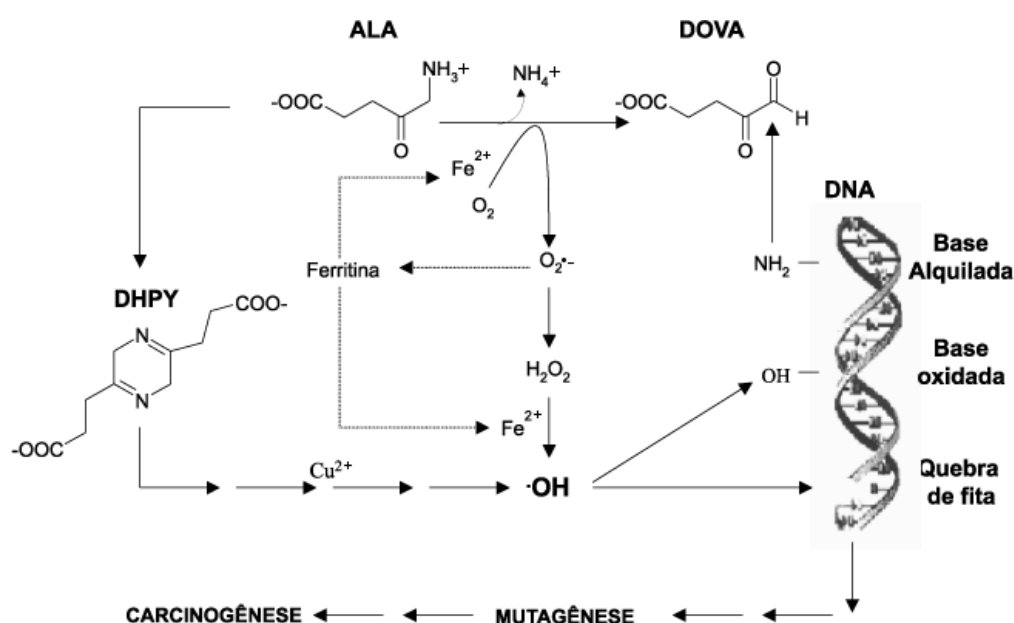


Figura 2 - Mecanismos moleculares associados à oxidação e danos ao DNA promovidos por ácido 5-aminolevulínico. **Fonte** - (ONUKI et al., 2002c).

2.3 Abordagens experimentais para o estudo das porfirias

Os modelos murinos de porfirias humanas têm sido utilizados para investigar sua patogênese e para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Para todas as porfirias, exceto para a extremamente rara porfiria associada à deficiência de ALA desidratase (ALAD) e para a porfiria ligada ao cromossomo X, foram gerados modelos murinos (YASUDA; DESNICK, 2019). Em especial, destacaremos os modelos experimentais utilizados para estudo das PHAs. Para o entendimento da patogênese de PV, camundongos heterozigotos (R59W^{+/-}) foram gerados e apresentaram protoporfirinogênio oxidase com ~50% da atividade normal e medida de porfirias com padrão característico de PV humana (MEDLOCK et al., 2002). Já para a CPH, camundongos heterozigotos (Cpox^{+/^{M373X}}) apresentaram ~50% de expressão de RNA mensageiro para coproporfirinogênio oxidase e uma leve anemia microcítica (YASUDA; DESNICK, 2019).

Para o estudo de PAI, camundongos T1/T2 foram empregados para o entendimento de sua patofisiologia. Os camundongos T1/T2 *knockout* heterozigotos para o gene da PBGD mantém ~30% de atividade normal de PBGD. Camundongos homozigotos para o alelo T1 apresentaram ~55% da atividade normal de PBGD, contudo a homozigose do alelo T2 é letal para seus embriões. Já camundongos heterozigotos para o alelo T2 apresentaram ~57% da atividade normal de PBGD. Camundongos T1/T2 apresentaram níveis basais de RNA mensageiro de ALAS1 e concentrações plasmáticas e urinárias de ALA e PBG levemente elevadas. Contudo, quando submetidos à administração de agentes porfirinogênicos, aumentaram bruscamente a expressão de ALAS1, de 2 (controle) a 17,4 nmol ALA/mg proteína/h em ratos T1/T2 (-/-) 60 h após 3 doses diárias de administração de fenobarbital, e as concentrações urinárias de ALA, de 0,1 (controle) até 1,5 μmol ALA/μmol creatinina, após administração consecutiva de fenobarbital durante 4 dias. O nível de aumento de ALAS1 e ALA urinário foi de 2 a 6 vezes quando comparados ao normal. Camundongos T1/T2 não manifestam distúrbios neurológicos característicos de ataques porfíricos agudos, porém desenvolvem degeneração axonal crônica compatível com alterações observadas em pacientes com ataques severos (LINDBERG et al., 1996, 1999). Outro modelo murino empregado para o estudo de

disfunções desencadeadas por ALA e PAI é através de injeção intraperitoneal de ALA em ratos (DEMASI et al., 1996; NORIEGA; TOMARO; DEL BATLLE, 2003).

Particularmente, outros modelos experimentais para o estudo de danos celulares hepáticos promovidos por ALA são os *in vitro*. A vantagem da utilização de modelos *in vitro*, apesar da falta de complexidade fisiológica de sistemas *in vivo*, é a disposição de abordagens simplistas para o estudo dos precursores do heme (MAITRA et al., 2015). Vários tipos celulares como células primárias de hepatócitos já foram empregados em estudos com ALA (MENEZES et al., 2018; WEISS et al., 2003). Contudo, devido à dificuldade de obtenção e tempo de cultivo limitado, as células primárias são utilizadas com menor frequência. Deste modo, outra abordagem foi o emprego de linhagens de hepatocarcinoma celular HepG2 e Hep3B para o estudo da citotoxicidade de ALA (LAAFI et al., 2014; ONUKI et al., 2004). Ambas as linhagens apresentam a maioria das enzimas metabolizadoras de drogas (CASTELL et al., 2006), contudo HepG2 não possui o vírus da hepatite B (HBV) e não é tumorigênica, ao contrário de Hep3B que apresenta o vírus HBV e é tumorigênica (QIU et al., 2014).

3 JUSTIFICATIVA

Muitos estudos indicam que o ALA pode ser um importante fator relacionado aos sintomas de porfirias agudas e sua citotoxicidade tem sido associada à maior incidência de carcinoma hepatocelular em pacientes sintomáticos. A maioria dos trabalhos demonstram os efeitos do ALA sobre macromoléculas, mas para desvendar os mecanismos moleculares de um composto é imprescindível compreender a complexa rede de interações e sinalizações celulares que desencadeiam os processos biológicos associados.

4 OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo identificar as vias de sinalização e possíveis mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos do ALA em células HepG2, através da análise bioinformática dos perfis transcricionais obtidos por ensaios de microarrays.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Análise da expressão de proteínas em hepatócitos primários de ratos tratados com ALA

Tratamos hepatócitos primários de ratos (HPRs) com concentrações entre 5-100 mM de ALA, por um período de 2 h, visando o monitoramento da produção de proteínas p53, Bcl-2, OGG1, NF-kBp50, NF-kBp105, CAT (catalase) e SOD (superóxido dismutase), reguladoras de apoptose, de reparo de lesões no DNA, associadas ao estresse oxidativo ou metabolismo lipídico.

5.1.1 Cultura de hepatócitos: isolamento e cultura

Os HPRs foram isolados seguindo o método de perfusão de colagenase, conforme descrito em (GUGUEN-GUILLOUZO; GUILLOUZO, 1986). O procedimento experimental foi aprovado pelo comitê de ética do Instituto Butantan (CEUAIB 755/10) para a realização do projeto intitulado “Effect of 5-aminolevulinic acid on the expression of carcinogenesis-related proteins in cultured primary hepatocytes”.

5.1.2 Tratamento de hepatócitos

Imediatamente após o isolamento, HPRs (2.0×10^6 células) foram plaqueados em uma garrafa de 25 cm² com 5 mL de meio DMEM-Low glucose, 10% de soro fetal bovino e antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 0,10 mg/mL estreptomicina). Os HPRs foram incubados por 16 h a 37 °C, com 5% CO₂ antes do tratamento. As células foram expostas ao ALA (5-100 mM) em meio sem soro para prevenir o melhoramento ou supressão de estímulos químicos. Os HPRs foram tratados por 2 h, lavados com PBS e lisados com tampão RIPA gelado contendo coquetel inibidor de proteases e fosfatases (Thermo Scientific, MA, USA). As células foram imediatamente analisadas ou congeladas a -20 °C para análises posteriores.

5.1.3 Detecção de proteínas

A concentração de proteínas dos lisados de HPRs foi dosada pelo kit de ensaio de proteína Coomassie (Pierce Chemical Co., IL, EUA) como descrito em (NOBLE, 2014). Em seguida, realizamos o ensaio de Western blotting para sua detecção. As proteínas extraídas (40 µg) foram misturadas com tampão e desnaturadas a 95 °C por 2 min, separadas em gel de SDS-PAGE a 12,5% durante 2 h a 100 V e transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) usando um sistema semi-seco a 20 V por 30-45 min em tampão de transferência (Tris 12 mM, glicina 96 mM, metanol a 20%, pH 8,3). Albumina sérica bovina (1%), contendo 0,1% Tween-20, foi usada para bloquear as membranas de um dia para o outro a 4°C e, posteriormente, foram incubadas com anticorpos primários anti-NF-κB (1:1000) e p53, (5 µg/µL) da Abcam, Bcl-2 (1:1000), catalase (1:1000) e OGG1 (1:1000) de Thermo Scientific e superóxido dismutase (1:2000) e HMG-CoA redutase (1 µg/mL) da Millipore durante a noite a 4 °C. Após três lavagens com TBS-T durante 5 min, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário IgG de cabra anti-coelho (H + L) 1:5000 ou IgG1 de coelho anti-camundongo 1: 4000), conjugados com HRP, durante 1 h à temperatura ambiente. Usando quimioluminescência, as bandas foram reveladas com o uso do substrato SuperSignal® West Dura Extended Duration (Thermo Scientific, MA, EUA) e visualizadas no sistema ChemiDoc MP (Bio-Rad Lab, CA, EUA), em que GAPDH ou β-actina foi usada como controle. A aquisição de imagens, detecção de bandas e análises foram realizadas através do Software Image Lab 5.0 (BioRad Lab, CA, EUA).

5.2 Ensaio de lipoperoxidação em hepatócitos primários de ratos tratados com ALA

A peroxidação lipídica foi avaliada pela modificação do ensaio fluorimétrico com ácido tiobarbitúrico (TBA) em microescala (MIHARA; UCHIYAMA, 1978). Resumidamente, 50 µL da amostra foram misturados com 1 mL de ácido fosfórico e 50 µL de BHT. Adicionou-se 1 mL de uma solução de TBA a 0,67% à mistura reacional, a qual foi agitada e incubada em água fervente durante 30 min. Depois de ser resfriado à temperatura ambiente, o cromógeno rosa foi extraído pela adição de 1 mL de butanol e agitação por 30 s. As amostras foram centrifugadas a 680 x g por

5 min. A fluorescência da fase de butanol foi medida a 515 nm (comprimento de onda de excitação) e 553 nm (comprimento de onda de emissão). A peroxidação lipídica foi expressa como uma porcentagem dos equivalentes micromolares de tetraetoxipropano (TEP) por milimolar de proteína.

5.3 Análise estatística do ensaio de Western blotting e lipoperoxidação

Para calcular as diferenças entre a expressão de proteínas e peroxidação lipídica de amostras controle e tratadas com ALA, utilizamos as análises de variância One-way ANOVA seguida pelo teste de Dunnett, realizados pelo programa estatístico *GraphPad*, versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA), sendo considerados significativos valores de p-valor < 0,05.

5.4 Delineamento do ensaio de expressão gênica de HepG2 tratadas com ALA

Para decidirmos as concentrações e tempos utilizados para o ensaio de expressão gênica, submetemos células HepG2 aos ensaios de viabilidade MTT e LDH.

5.4.1 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT

O brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) foi dissolvido em PBS, pH 7,4, em uma concentração de 5 mg/mL. A solução de MTT foi filtrada em filtro de 0,22 µm para esterilização e remoção de cristais e armazenada, protegida da luz, a -4 °C. Células da linhagem HepG2 adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) foram plaqueadas em uma concentração de $1,5 \times 10^4$ células/poço no volume final de 100 µL/poço em meio DMEM-Low com antibióticos (100 unidades de penicilina e 0,10 mg estreptomicina/mL), 10% de soro fetal bovino, em placas de 96 poços, e incubadas de um dia para o outro a 37 °C/CO₂ 5%. As células foram tratadas por 2, 4, 6 e 24 h com as concentrações 0 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 25 mM e 50 mM de ALA em meio DMEM-Low com antibióticos (100 unidades de penicilina e 0,10 mg estreptomicina/mL) sem soro fetal bovino. Foram adicionados 20 µL de solução MTT por poço e as placas incubadas

por 4 horas a 37 °C/CO₂ 5%. Após este período, o meio de cultura foi removido e adicionado 100 µL de DMSO para dissolução de cristais de formazan. A leitura da absorbância foi realizada em 570 nm e subtraída do background lido em 630 nm.

5.4.2 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de LDH

Após o período de tratamento com ALA, alíquotas de 50 µL de todos os poços-controle e teste foram transferidas para novas placas de 96 poços e 50 µL de reagente CytoTox 96® (Promega, Madison, WI) foram adicionados a cada amostra. Os controles recomendados no kit foram realizados para cada tratamento. O *background* do meio de cultura foi determinado. A liberação total de lactato desidrogenase (LDH: Lactate Dehydrogenase) foi avaliada pela adição de 10 µL de solução de lise em 100 µL de uma amostra controle. Esse controle é utilizado para estimar a liberação máxima de LDH de acordo o número de células plaqueadas no ensaio. Em seguida, as placas foram protegidas da luz e armazenadas à temperatura ambiente por 30 min. Após este período, 50 µL de solução Stop foi adicionada a cada amostra. A leitura da absorbância foi realizada em 490 nm. Para o cálculo dos resultados, o valor da absorbância do “branco” (meio de cultura) foi subtraído de todos os valores dos poços experimentais. Os valores obtidos foram aplicados na seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem de Citotoxicidade} = \frac{100 \times \text{Liberação Experimental de LDH (OD}_{490} \text{ nm)}}{\text{Liberação Máxima de LDH (OD}_{490} \text{ nm)}}$$

5.4.3 Determinação de concentrações de ALA e períodos para o tratamento

A partir dos ensaios de viabilidade celular, as concentrações e os tempos de exposição ao ALA foram selecionados para serem utilizados na análise de expressão gênica. Deste modo, células HepG2 foram submetidas ao tratamento com concentrações de 2,5 mM e 25 mM e expostas por período de 2 h e 24 h com o intuito de verificar os mecanismos moleculares induzidos diante de concentrações baixa e alta, porém ambas suprafisiológicas, durante curto e longo período de exposição ao ALA.

5.4.3.1 Cultura celular e tratamento

As células HepG2 foram cultivadas em DMEM-Low com antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 0,10 mg/mL estreptomicina), 10% de soro fetal bovino, em garrafas de 75 cm², e incubadas pernoite a 37 °C/CO₂ 5%. As células foram repicadas para obtenção de 24 garrafas igualmente confluentes. O ensaio foi realizado em quadruplicata. Ao atingir confluência de 80-90%, o meio de cultura foi retirado e foi adicionado meio DMEM-Low com antibióticos (100 UI de penicilina e 0,10 mg/mL estreptomicina) sem soro fetal. As células foram incubadas por 2 h a 37 °C/CO₂ 5%. Após esse período, o meio foi retirado e as células foram tratadas com as concentrações de 0 mM, 2,5 mM e 25 mM de ALA em meio DMEM-Low com antibióticos (100 unidades de penicilina e 0,10 mg estreptomicina/mL) sem soro fetal bovino, por um período de 2 h e 24 h.

5.4.4 Extração e purificação de RNA total

A extração de RNA foi realizada utilizando o kit "RNAspin Mini RNA Isolation kit" (GE Healthcare). Após o período de tratamento, as células foram tripsinizadas adicionando 2 mL de solução de tripsina a 0,05% às garrafas. Um total de 3 x 10⁶ células de cada replicata foi utilizado para extração. O protocolo de extração, realizada à temperatura ambiente. Para cada precipitado foram adicionados 350 µL de buffer RA1 e 3,5 µL de β-mercaptoetanol. As amostras foram agitadas por pipetagem para lise direta. Os lisados foram aplicados em mini filtros RNAspin e centrifugados por 1 min. a 11000 x g. Os filtrados foram transferidos para uma nova coleção de tubos. Em seguida, 350 µL de etanol (70%) foram adicionados aos lisados e misturados por agitação vigorosa 2 x 5 s. Os lisados foram misturados 2-3 vezes por pipetagem, aplicados na coluna RNAspin e centrifugados por 30 s a 8000 x g. As colunas foram transferidas para uma nova coleção de tubos. Posteriormente, 350 µL de buffer MDB foram aplicados sobre a membrana dos filtros e os tubos, centrifugados a 11000 x g por 1 min. A digestão de DNA residual foi realizada aplicando-se 95 µL de solução de reação de DNase diretamente sobre a membrana das colunas. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 15 min. Após o período de incubação, a primeira lavagem foi realizada por adição de 200 µL de

buffer RA2 e os tubos centrifugados por 1 min a 11000 x g. As colunas foram colocadas em uma nova coleção de tubos. A segunda lavagem foi seguida por adição de 600 µL de buffer RA3 e centrifugação por 1 min a 11000 x g. O eluato foi descartado. Na terceira lavagem, 250 µL de buffer RA3 foram aplicados sobre a membrana e os tubos foram centrifugados por 2 min a 11.000 x g. As colunas foram transferidas para tubos livres de nucleases e o RNA total de cada amostra foi eluído em 40 µL de H₂O livre de RNases.

5.4.4.1 Análise de pureza, quantificação e integridade do RNA

A quantificação preliminar de RNA total foi obtida por absorbância a 260 nm no espectrofotômetro Nanodrop 2000[®] (Thermo Fisher Scientific, San Jose, EUA), sendo a pureza avaliada pelas razões 260/280 nm e 260/230 nm. O Qubit[®] RNA HS Assay Kit (Invitrogen) foi utilizado para quantificação acurada de RNA das amostras. O protocolo para ensaio foi composto por dois padrões para calibração do fluorímetro Qubit[®]2.0 (Invitrogen). Para as amostras padrões, a solução de trabalho Qubit[®] foi preparada por diluição 1:200 do reagente Qubit[®] RNA HS em tampão Qubit[®] RNA HS. A seguir, 10 µL de padrão Qubit[®] foram adicionados a 190 µL de solução de trabalho Qubit[®], a solução foi agitada vigorosamente. Para os ensaios individuais, 1 µL de cada amostra e 199 µL de solução de trabalho Qubit[®] foram utilizados. As amostras foram agitadas vigorosamente por 2-3 s e incubadas à temperatura ambiente por 2 min. Em seguida, o fluorímetro Qubit[®]2.0 (Invitrogen) foi calibrado e as amostras quantificadas.

Para avaliação da integridade do RNA, as amostras foram diluídas 1:1000 e submetidas ao sistema eletroforético do microchip Eukaryote Total RNA Nano (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), no qual foram separadas e detectadas por fluorescência induzida por laser. O perfil eletroforético foi gerado com o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). A integridade foi detectada pela imagem do gel, com a utilização de um marcador de peso molecular para estimar o tamanho dos fragmentos de RNA, e pelos dados do eletroferograma que exibem a razão das bandas ribossomais (18S e 28S). Além disso, o software forneceu o Número de Integridade do RNA (RIN: RNA Integrity Number) para a classificação do RNA total, baseado no sistema de

numeração de 1 a 10, em que 1 representa o perfil mais degradado e 10, o mais íntegro (SCHROEDER et al., 2006).

5.4.5 Marcação e amplificação das amostras

A metodologia de hibridização competitiva foi realizada com o protocolo "Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Quick Amp Labeling Kit", seguindo as recomendações do fabricante (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). A síntese da primeira fita foi executada por transcrição reversa com o emprego de um oligo dT de DNA contendo o sítio promotor da enzima AffinityScript RT. Posteriormente, a segunda fita foi produzida e utilizada como molde para a transcrição do cRNA alvo. A transcrição do cRNA foi mediada pela RT-RNA polimerase e realizada com o "Low Input Quick Amp Labeling Kit, Two-Color" que possibilitou a marcação das amostras com dois fluorocromos: cianina 3 (cy3) e cianina 5 (cy5). Spikes A/Cy3 e B/Cy5, transcritos sintéticos utilizados para controle-positivo, foram adicionados e hibridizados juntamente com as amostras experimentais para o controle da hibridização.

Sucintamente, utilizamos 100 ng de RNA total como molde para transcrição da primeira fita de cDNA. Adicionamos 1.8 µL de solução T7 Primer Mix e, em seguida, incubamos a 65°C em banho-maria por 10 min. Acrescentamos 4.5 µL de solução cDNA Master Mix e misturamos por pipetagem. Incubamos as amostras a 40°C por 2 h. Em seguida, adicionamos 6 µL de solução "Transcription Master Mix" com Cy3 no tubo contendo o Spike A e 6 µL de solução "Transcription Master Mix" com Cy5 no tubo contendo Spike B. Em seguida, incubamos as amostras a 40°C por 2 h.

As amostras amplificadas de cRNA foram purificadas com o uso do RNeasy Mini Kit e quantificadas através do espectrofotômetro *NanoDrop*. Análise da incorporação dos fluoróforos nos cRNAs recém-sintetizados e qualidade das amostras foi realizada através da concentração de Cy3 ou Cy5 (pmol/µL), relação de absorvância de RNA (260/280 nm) e concentração de cRNA (ng/µL).

5.4.6 Hibridização das amostras

Para a hibridização das amostras nas lâminas, utilizamos o delineamento com hibridizações competitivas, onde as amostras controles são pareadas com as amostras experimentais. Esse pareamento é realizado com a inversão da marcação (Cy3 e Cy5) entre as réplicas biológicas (Figura 3) e geralmente é mais eficiente do que delineamentos com amostras de referência (YANG; SPEED, 2002).

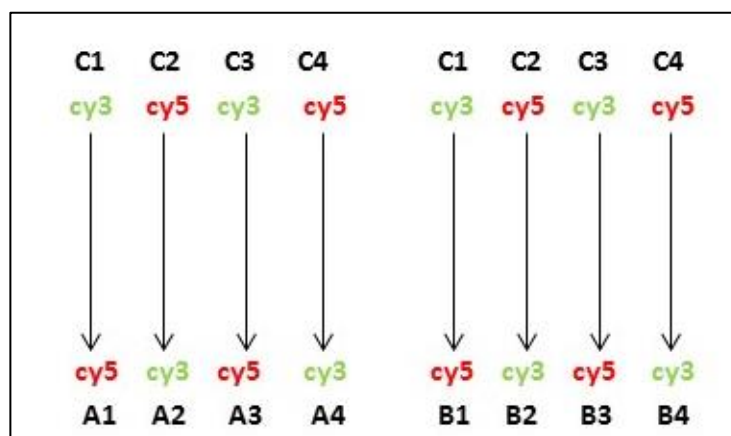


Figura 3 - Delineamento para o ensaio de microarray. Cada letra representa um grupo experimental, os números representam as replicatas biológicas, e as setas representam os pares de amostras hibridizados em um mesmo array. Cy3: fluorocromo cianina 3, Cy5: fluorocromo cianina 5. (A) amostras tratadas como 2.5 mM; (B) amostras tratadas com 25 mM; (C) amostras controles correspondentes a cada tratamento. O mesmo desenho foi utilizado para ambos os tratamentos de 2 h e 24 h.

As amostras foram hibridizadas em lâminas SurePrint G3 Human GE v3 8x60K Microarray 072363 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) compostas por 58201 sondas que interrogaram 33748 genes, conforme a Figura 4. A seguir, as lâminas foram montadas no suporte do rotor de hibridização do forno SciGene (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). O rotor foi ajustado para rotação a 10 rpm. A hibridização foi realizada a 65°C por 17 h. Após esse período, as lâminas foram lavadas com “Gene Expression Wash Buffer 1” seguida pela lavagem com “Gene Expression Wash Buffer 2”, por inversão das lâminas de 5 a 6 vezes nas soluções. A seguir as lâminas foram lavadas por imersão em acetonitrila 100% durante 5 min, para evitar a geração de artefatos durante o escaneamento.

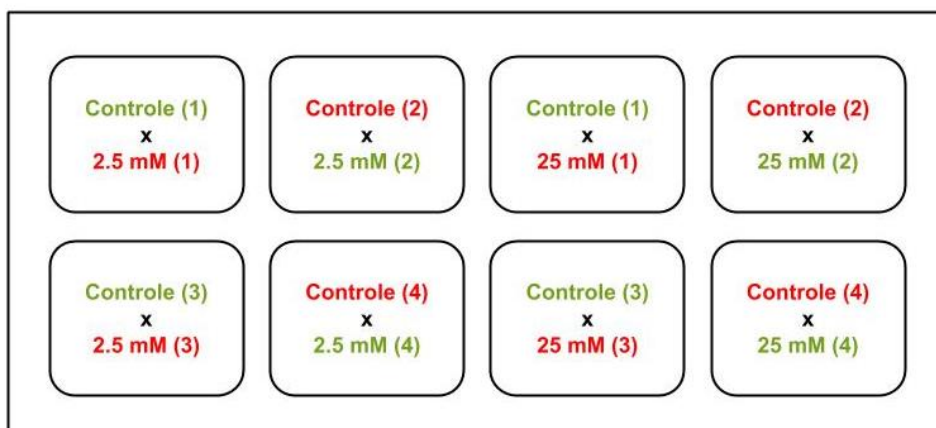


Figura 4 - Representação da lâmina de microarray. Disposição das quatro réplicas das hibridizações competitivas das amostras em cada array utilizadas para ambos os tratamentos de 2 h e 24 h. Vermelho: representa as amostras marcadas com o fluorocromo cianina 5. Verde: representa as amostras marcadas com o fluorocromo cianina 3.

5.4.7 Escaneamento das lâminas

O escaneamento foi realizado pelo Scanner Microarray Agilent SureScan seguindo o protocolo AgilentG3_GX_2color (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Os arrays foram digitalizados a 3 μm de resolução e iluminação a laser nos comprimentos de onda 550 nm e 650 nm para excitação dos fluorocromos Cy5 e Cy3, respectivamente. Os dados foram extraídos e analisados com o auxílio dos programas Feature Extraction Software e GeneSpring 12.6 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

5.4.8 Pré-processamento dos dados

Antes de prosseguir para a análise e obtenção dos resultados, realizamos um pré-processamento dos dados, avaliando diversos parâmetros indicativos da qualidade das hibridizações e do escaneamento. Esse controle foi realizado pelo software Feature Extraction Software 10.7 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

5.4.9 Análise da qualidade das lâminas hibridizadas

O programa *Feature Extraction Software* gerou um relatório com a avaliação de métricas para a análise de qualidade da hibridização para cada *array*.

5.4.9.1 *Localização dos spots*

Primeiramente o *Feature Extraction Software* localizou a região central dos spots de cada *array* para verificar se as medidas de fluorescência foram realizadas nas posições corretas.

5.4.9.2 *Distribuição de Outliers*

A estimativa de *outlier* levou em consideração a intensidade de fluorescência da sequência da sonda a ser analisada, a intensidade da sequência da sonda mais próxima em intensidade, a intensidade da sequência da sonda mais intensa e a intensidade da sonda menos intensa. O valor obtido foi comparado com a estatística de modelo de ruídos das Agilent para determinar se a intensidade de fluorescência das sondas seria um *outlier*.

5.4.9.3 *Distribuição dos sinais fluorescentes de sondas controles*

A distribuição dos sinais fluorescentes é uma indicação da dinâmica de distribuição de ambos sinais do microarray de probes não-controles e controle positivos (*Spikes-In*). Esta foi uma métrica utilizada para a comparação de intensidades entre *arrays* permitindo a verificação de problemas durante os passos de realização do ensaio que pudessem afetar a intensidade da fluorescência.

5.4.9.4 *Acurácia e reprodutibilidade da fluorescência das sondas*

O monitoramento da linearidade, sensibilidade e acurácia do ensaio foram realizados através da comparação de dados de fluorescência de transcritos sintéticos em concentrações e razões conhecidas (*Spikes-In*).

5.4.9.5 Parâmetros de hibridização

No final da análise de qualidade da hibridização, uma tabela foi gerada com os parâmetros analisados do grupo de sondas controles, além da localização central dos spots para cada array (Tabela 1). Os resultados obtidos foram classificados como bom ou avaliar, de acordo com intervalos de referência descritos pela Agilent.

Tabela 1 - Parâmetros avaliados nas sondas controles.

| | |
|---|---|
| IsGoodGrid | Indica se a região central dos spots foi localizada adequadamente; |
| AnyColorPrcntFeatNonUniform | Mede a porcentagem de <i>outliers</i> não uniforme em todos os canais; |
| gNegCtrlAveBGSubSig e gNegCtrlSDevBGSubSig | Referem às métricas (média e desvio-padrão) de sinais obtidos pelas sondas do controle negativo marcadas com o fluoróforo Cy3; |
| rNegCtrlAveBGSubSig e rNegCtrlSDevBGSubSig | Referem às métricas (média e desvio-padrão) de sinais obtidos pelas sondas do controle negativo marcadas com o fluoróforo Cy5; |
| gNonCntrlMedVCBkSubSignal | Indica o coeficiente de variação obtido dos sinais de sondas não controles, marcadas com o fluoróforo Cy3, subtraídos de sinais do <i>background</i> ; |
| rNonCntrlMedVCBkSubSignal | Indica o coeficiente de variação obtido dos sinais de sondas não controles, marcadas com o fluoróforo Cy5, subtraídos de sinais do <i>background</i> ; |
| gE1aMedVCBkSubSignal | Indica o coeficiente de variação obtido dos sinais de sondas de controles positivos (<i>Spike-in</i>), marcadas com o fluoróforo Cy3, subtraídos de sinais do <i>background</i> ; |
| rE1aMedVCBkSubSignal | Indica o coeficiente de variação obtido dos sinais de sondas de controles positivos (<i>Spike-in</i>), marcadas com o fluoróforo Cy5, subtraídos de sinais do |

| | |
|----------------------------|--|
| absE1aObsVsExpCorr | <i>background</i> ; Indica a relação entre o logaritmo da razão entre os sinais esperados e os sinais observados das sondas dos <i>Spike-in</i> ; |
| absE1aObsVsExpSlope | Avalia a inclinação da curva da regressão linear entre o logaritmo da razão dos sinais esperados e os sinais observados dos <i>Spike-in</i> . |

5.4.10 Processamento dos dados

A etapa de processamento dos dados foi realizada com o auxílio do Ms. Diogo Vieira da Silva Pellegrina, doutorando orientado pelo Dr. Eduardo Moraes Rego Reis (Laboratório de Genômica e Expressão Gênica em Câncer do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo). Neste passo, foi realizada a transformação logarítmica dos sinais, correção do background pelo algoritmo *normexp* (SILVER; RITCHIE; SMYTH, 2009), normalização das amostras utilizando o método de *Lowess*, filtragem de sondas consideradas *outliers* e cálculo de intensidades dos sinais usando a média de sondas idênticas. As medidas de fluorescência das lâminas foram normalizadas pelo método quantil para que pudessem ser comparadas entre si. Os dados do processamento foram gerados usando a função `plotMA()` no pacote `limma` do software Bioconductor.

Para a reanotação das sondas que continham pouca ou nenhuma informação de acordo com regiões exônicas do “Genome Reference Consortium Human Build 38” (GRCh38), o alinhador de sequências BLAT, na linguagem de programação Python, foi utilizado para a remoção de sondas não alinhadas e/ou inespecíficas. As sondas remanescentes foram sobrepostas aos registros do banco de dados GENCODE e, em seguida, receberam identificadores para genes correspondentes.

5.4.11 Identificação de genes diferencialmente expressos, análise de perfis de expressão e interpolação de DEGs entre os tratamentos

Para a identificação de genes diferencialmente expressos (*Differentially Expressed Genes*: DEGs), foi aplicado o teste estatístico T moderado adotando-se p-

valor $<0,05$ como corte para significância estatística. O método de taxa de falsas descobertas (*False Discovery Rate*: FDR), com FDR $< 0,05$ como critério de corte, foi utilizado para o controle de resultados falso-positivos. A estimação de DEGs foi baseada nos valores de *Log Fold-Change* (LFC) entre -1 e 1 e significância estatística de FDR $< 0,05$.

A análise de bioinformática dos dados de expressão gênica foi realizada pelo Ms. Carlos Eduardo Madureira Trufen e Dr. Flavio Lichtenstein (CENTD, Butantan). Para visualizarmos separadamente os DEGs separados positiva e negativamente em cada tratamento, geramos Volcano plots com a função `geom_dotplot()` do pacote de software `ggplot2` versão 3.2.1 (WICKHAM, 2009). Para estimarmos diferenças no perfil de expressão gênica entre os tratamentos experimentais, inserimos os dados de LFC na função `heatmap.2()` do pacote `gplots` versão 3.0.1.1 e agrupamos via clusterização hierárquica para posterior visualização em *heatmap* (WILKINSON; FRIENDLY, 2009). Em seguida, com o intuito de verificar a existência de relações entre o conjunto de DEGs obtidos em cada tratamento, construímos um diagrama de Venn utilizando a função `draw.quad.venn()` do pacote *VennDiagram* versão 1.6.20 no R (CHEN; BOUTROS, 2011).

5.4.12 Análise de enriquecimento funcional e de vias

A partir da lista de DEGs, investigamos os genes modulados pelo ALA pelo *Gene Ontology* (GO) e pela análise de enriquecimento de vias através do *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) e Reactome. Para tal, foi utilizado o teste hipergeométrico (FURY et al., 2006). O GO, ferramenta que promove anotações funcionais para genes e produtos gênicos, analisou os DEGs em três categorias: funções moleculares (FM), processos biológicos (PB) e componentes celulares (CC). O KEGG e o Reactome forneceram informações úteis para o entendimento de funções de genes em sistemas biológicos (ASHBURNER et al., 2000; CROFT et al., 2011; GOTO, 2000). Tais análises foram conduzidas através de funções do pacote `clusterProfiler` versão 3.12.0 (YU et al., 2012). Os dados referentes aos bancos de dados usados para as análises foram obtidos junto ao `enrichr` (CHEN et al., 2013).

5.4.13 Construção de redes de interação gênica

Utilizamos o MetaCore (Life Sciences Research, Thomson Reuters, UK) para construção e análise de redes de conectividade de DEGs e primeiros vizinhos.

6 RESULTADOS

6.1 Análise da expressão de proteínas de hepatócitos primários de ratos tratados com ALA

O tratamento de HRP's com concentrações crescentes de ALA por 2 h induziu a produção de p53 (Figura 5) e repressão concomitante de Bcl-2 (Figura 6). As proteínas p53 e o Bcl-2 atuam na regulação de apoptose (HEMANN; LOWE, 2006). Não observamos alteração estatisticamente significativa na dosagem das proteínas antioxidantes catalase e superóxido dismutase (Figuras 7 e 8). Porém, verificamos que o ALA desencadeou estresse oxidativo através do aumento significativo da peroxidação de lipídios (Figura 12). Para as proteínas OGG1 e NF- κ B, também não verificamos alteração estatisticamente significativa (Figuras 10 e 11). OGG1 é responsável pelo reparo danos oxidativos no DNA (KLUNGLAND; BJELLAND, 2007). O NF- κ B, além de estar envolvido em respostas a ROS, atua também em respostas associadas ao sistema imunológico (LAWRENCE, 2009). Ainda, verificamos que o acúmulo de ALA pode modular o metabolismo lipídico, como verificado pela repressão significativa da produção de HMG-CoAr (Figura 9), uma proteína implicada no metabolismo do colesterol (FRIESEN; RODWELL, 2004).

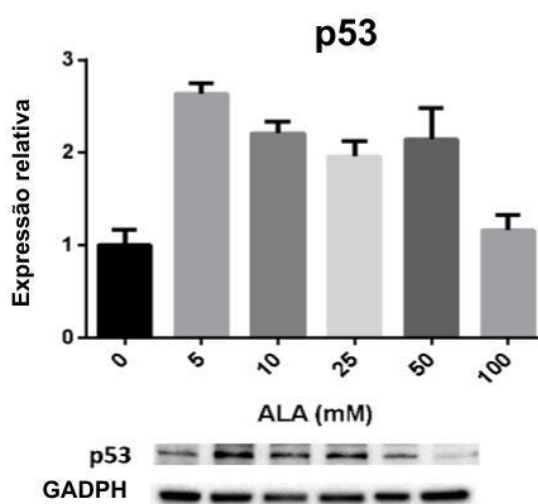


Figura 5 - Efeito do ALA na expressão de p53. HRP's tratados com concentrações indicadas (5-100 mM) por 2 h. Os extratos de proteínas foram submetidos a Western blotting usando anticorpos primários anti-p53 e anti-GAPDH anticorpo secundário de cabra Ig (H+L) conjugado com HRP. Os sinais de quimioluminescência emitidos foram quantificados. O experimento foi realizado em quatro preparações celulares independentes. Os resultados são expressos como a razão de p53 /GAPDH (média ± SEM) relativa ao controle, que foi definido como 1.* p <0,05, ** p <0,01 versus o controle.

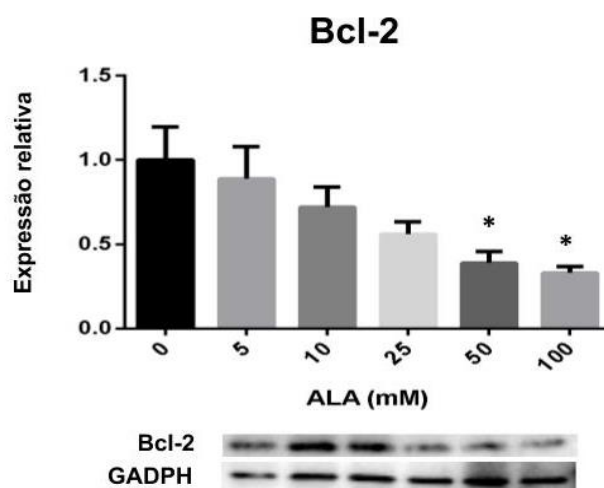


Figura 6 - Efeito do ALA na expressão de Bcl-2. HRP's tratados com as concentrações crescentes (5-100 mM) por 2 h. Os extratos de proteínas foram submetidos a Western blotting usando anticorpos primários anti-Bcl-2 e anti-GAPDH e um anticorpo secundário de cabra anti-rato conjugado com HRP. Os sinais de quimioluminescência emitidos foram quantificados. O experimento foi realizado em quatro preparações celulares independentes. Os resultados são expressos como a razão de Bcl-2/GAPDH (média \pm SEM) relativa ao controle, que foi definido como 1. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus o controle.

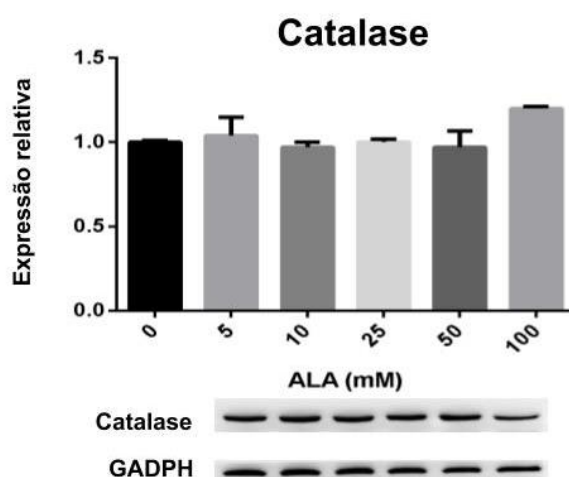


Figura 7 - Efeito do ALA na expressão de catalase. HRP's tratados com concentrações crescentes (5-100 mM) durante 2 h. Os extratos de proteínas foram submetidos a Western blotting usando anticorpos primários anti-CAT e anti-GAPDH um anticorpo secundário de cabra anti-coelho Ig (H+L) conjugado com HRP. Os resultados são expressos como relação de CAT/GAPDH (média \pm SEM) em relação ao controle, que foi definido como 1; os dados são derivados de quatro experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus o controle.

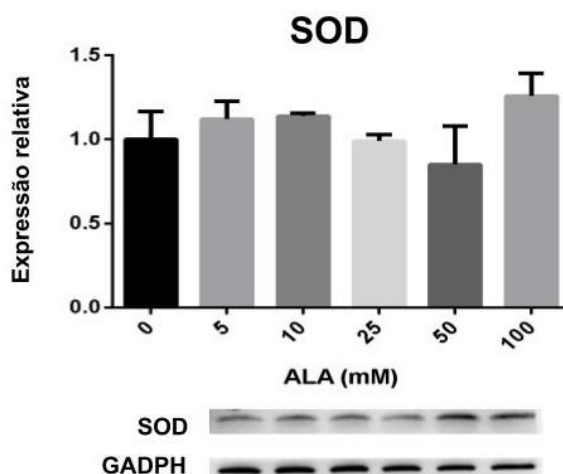


Figura 8 - Efeito do ALA na expressão de superóxido dismutase (SOD). HRP's tratados com concentrações crescentes (5-100 mM) durante 2 h. Os extratos de proteínas foram submetidos a Western blotting usando anticorpos primário anti-SOD e anti-GADPH um anticorpo secundário de cabra anti-coelho Ig (H+L) conjugado com HRP. Os resultados são expressos como relação de SOD/GADPH (média ± SEM) em relação ao controle, que foi definido como 1; os dados são derivados de quatro experimentos independentes. * p < 0,05, ** p < 0,01 versus o controle.

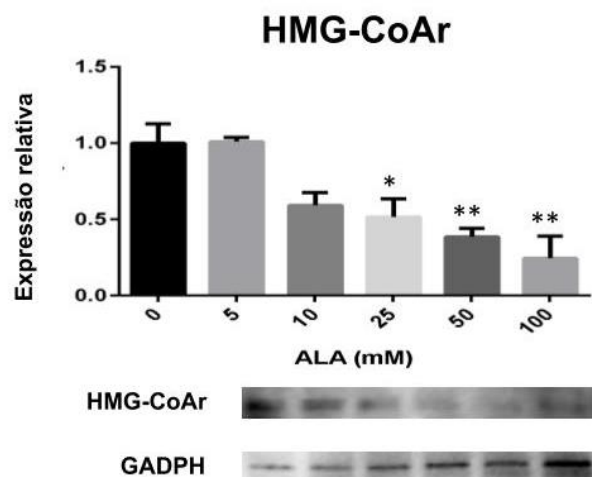


Figura 9 - Efeito do ALA na expressão de HMG-CoAr. HRP's tratados com concentrações crescentes (5-100 mM) por 2 h. Os extratos de proteínas foram submetidos a Western blotting usando anticorpos primários anti-HMG-CoAr e anti-GAPDH e anticorpo secundário de cabra anti-coelho (H + L) conjugado com HRP. Os resultados são expressos como a razão de HMG-CoAr/GAPDH (média \pm EPM) em relação ao controle, que foi fixado em 1; os dados são derivados de 4 experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus o controle.

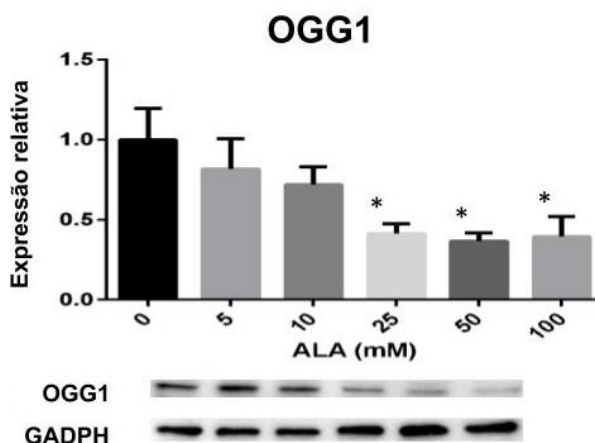


Figura 10 - Efeito do ALA na expressão de OGG1. HRP's tratados com concentrações crescentes (5-100 mM) por 2 h. Os extratos de proteínas foram submetidos a Western blotting usando anticorpos primários anti-OGG1 e anti-GAPDH e anticorpo secundário de cabra anti-coelho (H + L) conjugado com HRP. Os resultados são expressos como a razão de OGG1/GAPDH (média \pm EPM) em relação ao controle, que foi fixado em 1; os dados são derivados de 4 experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus o controle.

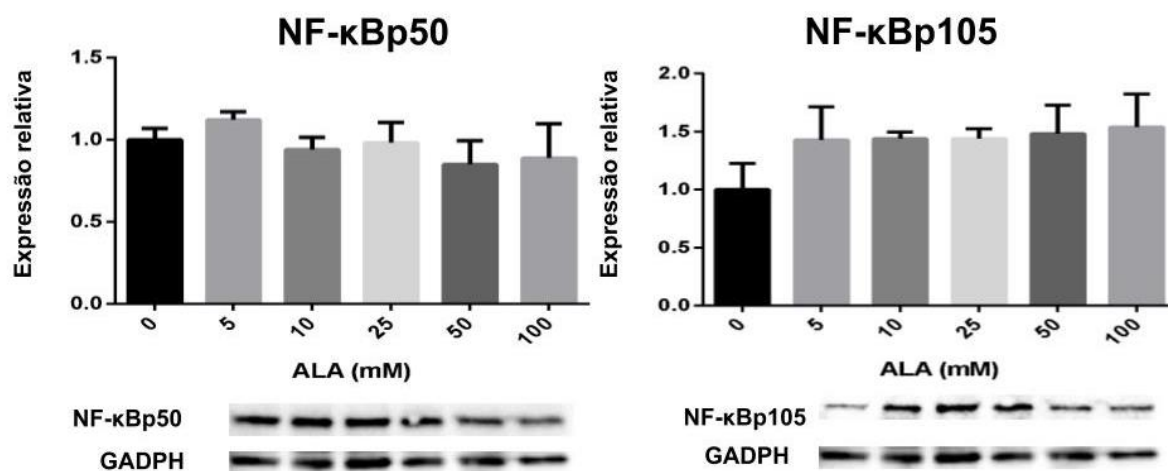


Figura 11 - Efeito do ALA na expressão de NF- κ B p50 e NF- κ B p105. HRP's tratados com concentrações crescentes (5-100 mM) por 2 h. Os extratos de proteínas foram submetidos a Western blotting usando anticorpos primários anti-NF- κ B e anti-GAPDH e um anticorpo secundário de cabra anti-coelho conjugado com HRP. Os resultados são expressos como a razão de NF- κ B / GAPDH (média \pm SEM) relativa ao controle, que foi estabelecido em 1; esses dados são derivados de quatro experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus o controle.

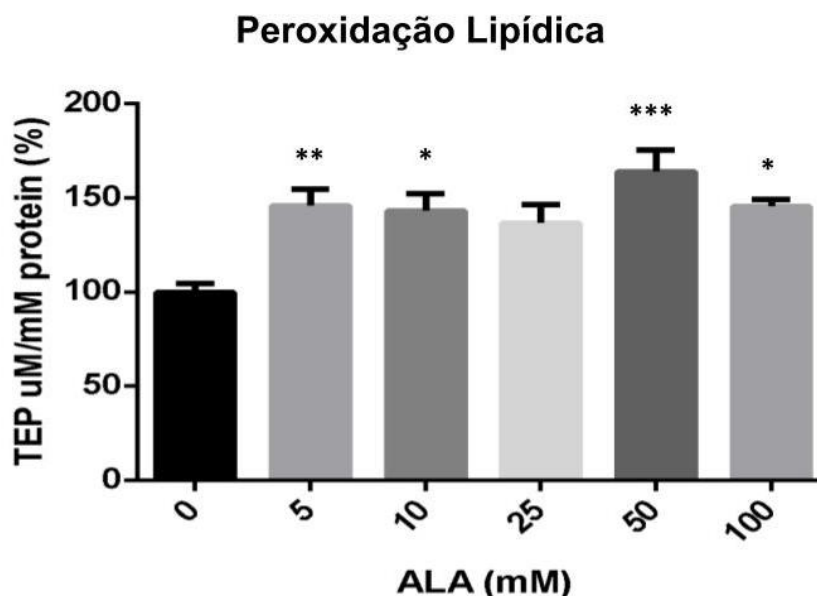


Figura 12 - HRP's tratados com ALA (0-100 mM) por 2 h. A peroxidação lipídica é expressa como uma porcentagem de equivalentes micromolares de tetraepoxipropano (TEP) por milimolar de proteína. O experimento foi realizado em quatro preparações celulares independentes. Os resultados são expressos como a média \pm SEM relativa ao controle, definida em 100%. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus o controle.

6.2 Viabilidade Celular de HepG2 tratadas com ALA

No ensaio de MTT (Figura 13), a viabilidade de HepG2 foi medida através do metabolismo do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais, e a consequente produção de cristais insolúveis de formazan. Desse modo, a inferência da viabilidade ocorreu pela produção de formazan que refletiu o estado funcional da cadeia respiratória celular. Os resultados sugeriram que a concentração de ALA afetou o metabolismo de HepG2. O tratamento com 2,5 mM a 10 mM de ALA não produziu efeitos significativos sobre a viabilidade durante as 24 h, exceto no tempo 4 h, onde foi observado um ligeiro aumento. Por outro lado, a concentração de 25 mM de ALA reduziu a viabilidade de HepG2, com cerca de 50% da viabilidade celular observada em 6 h. Já na concentração de 50 mM, após o tempo de 6 h, o metabolismo celular foi severamente comprometido, sendo reduzido quase que totalmente no período de 24 h de tratamento.

No ensaio de LDH (Figura 14), a citotoxicidade de ALA foi inferida pela liberação através de membranas celulares danificadas, da enzima lactato

desidrogenase, que catalisa a conversão de piruvato a lactato na presença de NADH. Os resultados indicaram que, mesmo em concentrações mais baixas, ALA pode causar danos celulares, diferente do observado no ensaio de MTT. Concentrações acima de 5 mM foram significativamente citotóxicas nos tempos de 2 h a 6 h e, no tempo de 24 h, acima de 10 mM.

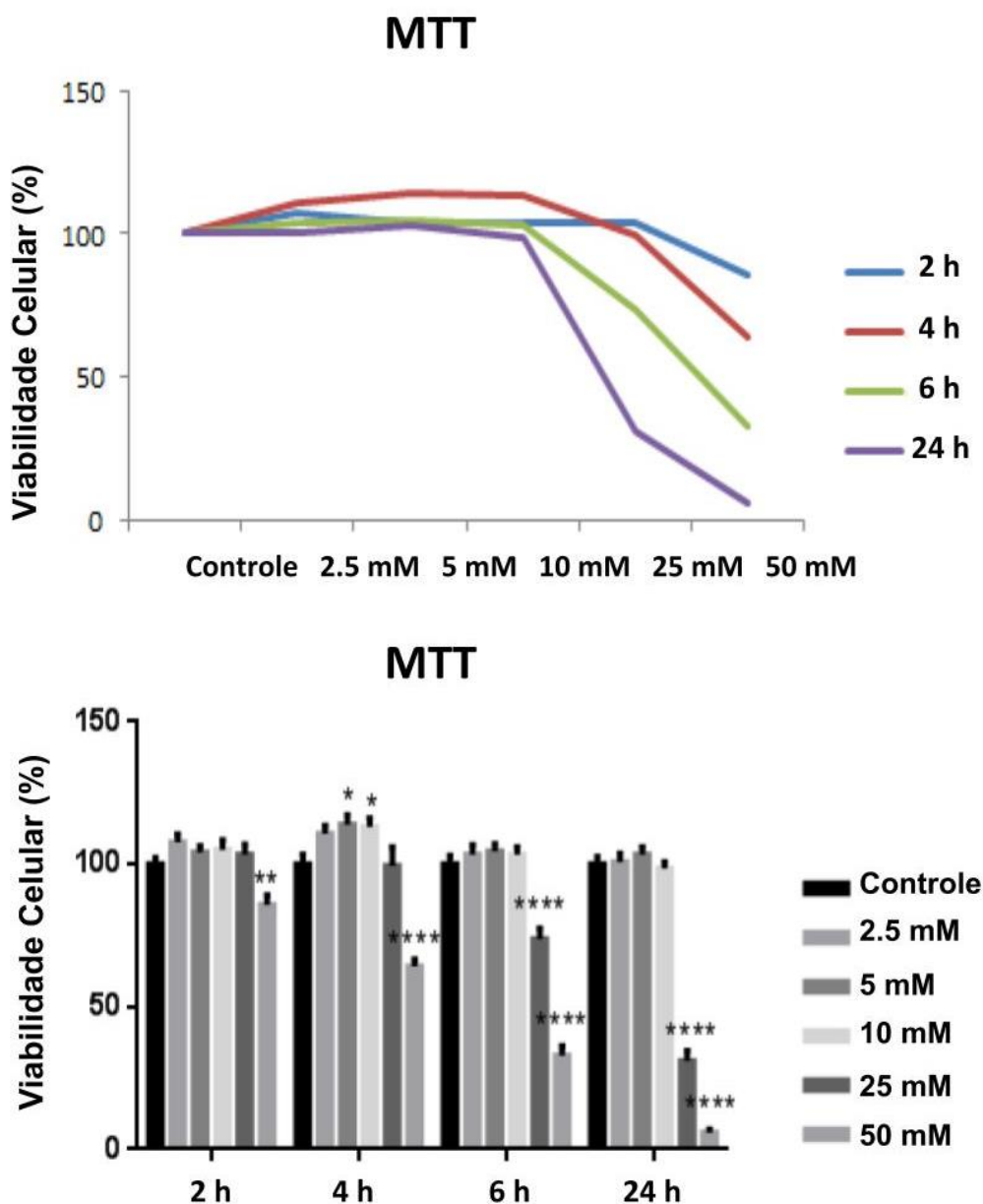


Figura 13 (A e B) - Viabilidade de células HepG2 pelo ensaio de MTT. Valores estão apresentados como porcentagem média \pm erro padrão relativos ao controle (100%) de 3 experimentos independentes. Diferença entre os grupos foi avaliada usando teste Two way-ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ versus o controle.

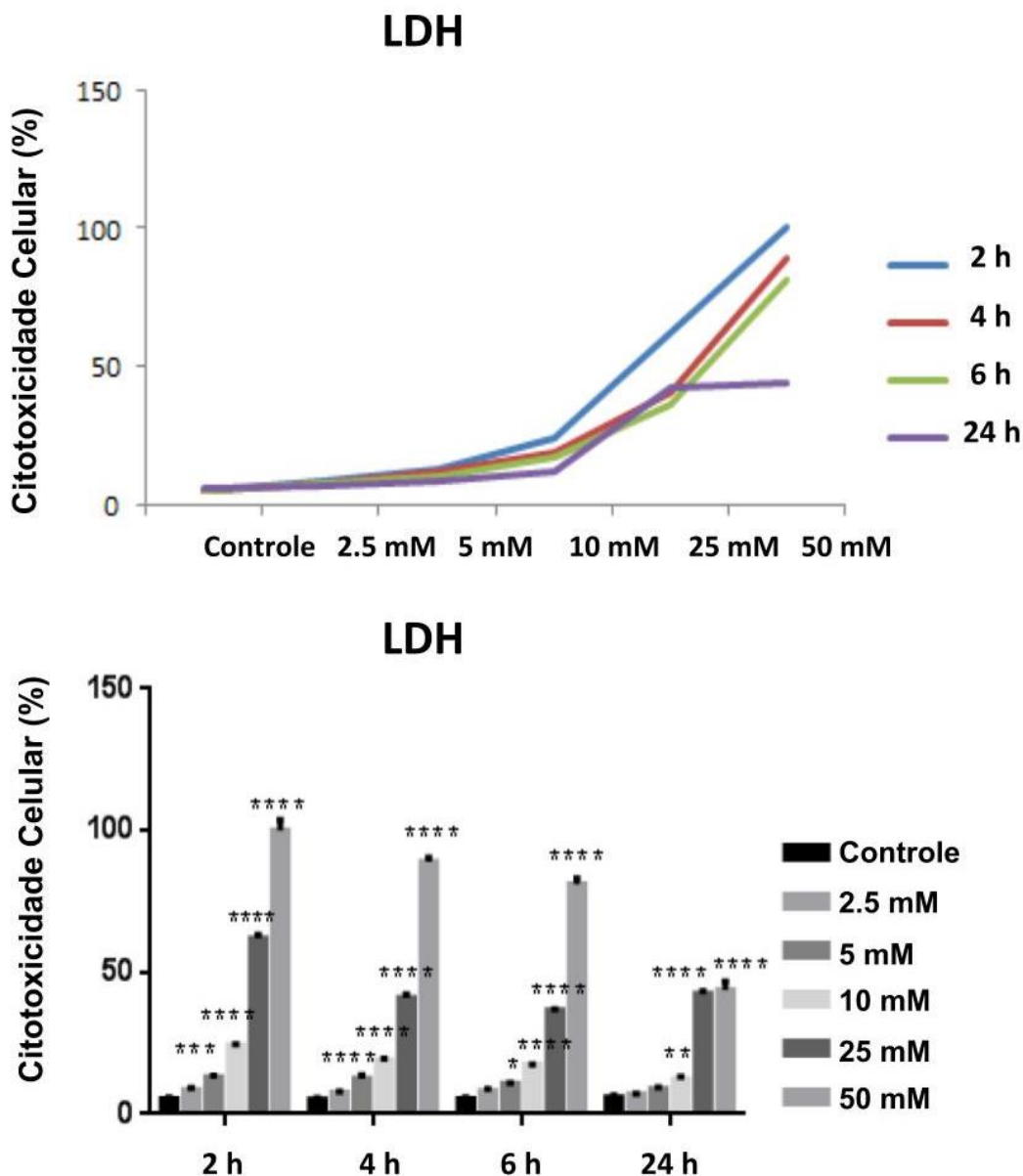


Figura 14 (A e B) - Citotoxicidade de células HepG2 pelo ensaio de LDH. Valores estão apresentados como porcentagem média \pm erro padrão relativos ao controle (100%) de 3 experimentos independentes. Diferença entre os grupos foi avaliada usando teste Two way-ANOVA e seguido pelo teste de Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ versus o controle.

6.3 Análise de pureza, integridade e quantificação de RNA

Após a extração de RNA de HepG2, a pureza das amostras foi realizada por análise espectrofotométrica através das razões 260/280 nm e 260/230 nm, sendo

recomendados valores de ~ 2 e entre 1.8-2.2, respectivamente. Ácidos nucleicos como nucleotídeos, RNA, DNA fita simples ou dupla absorvem no comprimento de onda 260 nm e todos contribuem para a concentração final. A presença de contaminantes como proteínas e fenol é verificada pela absorção em 280 nm. O grau de pureza é analisado pela relação entre 260/280 nm. Para amostras de RNA, a razão ~ 2 é indicada e aceita como pura. A relação entre 260/230 nm é pode ser utilizada como uma medida de pureza secundária para contaminantes que absorvem em 230 nm como EDTA e carboidratos, sendo o valor esperado entre 1.8-2.2 (DESJARDINS; CONKLIN, 2010).

O eletroferograma nos permitiu a visualização da qualidade das amostras a partir do sinal basal de emissão de fluorescência entre os dois picos de detecção das bandas de RNA ribossomal. A degradação de RNA foi acompanhada pela diminuição das bandas 18S e 28S e aumento de sinal entre os dois picos ribossomais.

Para padronizar o processo de interpretação da integridade, o software gera o Número de integridade do RNA (*RNA Integrity Number*: RIN), um algoritmo que permite a classificação do RNA total eucariótico, baseado no sistema de numeração de 1 a 10. No perfil de degradação, 1 representa o perfil mais degradado e 10, o mais íntegro (SCHROEDER et al., 2006). A Tabela 2 sumariza os resultados de pureza, concentração e do valor de RIN correspondente a cada tratamento. As amostras pertencentes ao tratamento de 2 h apresentaram RIN acima de 9.7, exceto uma replicata do tratamento com 25 mM em que o valor não foi fornecido pelo *software*. Além disso, uma replicata do tratamento com 2.5 mM não computou nenhum parâmetro, provavelmente devido à ausência da amostra no poço. Das amostras pertencentes ao tratamento de 24 h, nove replicatas apresentaram RIN acima de 8.8. Porém, duas replicatas do tratamento com 2.5 mM apresentaram os valores de RIN 4.7 e 5.8. Os tratamentos correspondentes às amostras que não apresentaram RIN ou apresentaram RIN abaixo de 7 foram repetidos e novamente avaliados para obtenção de amostras adequadas à obtenção do perfil de expressão gênica por microarrays.

As amostras incluídas no estudo apresentaram nível de pureza, concentração e RIN adequados para o prosseguimento do ensaio de expressão gênica, mostrados nos valores entre parênteses na Tabela 2.

Tabela 2 - Medidas de pureza, quantificação e o RIN de cada amostra de RNA. Os valores entre parênteses representam os dados obtidos anteriormente à realização das novas aferições.

| Amostras | 2h | | | | 24 h | | | |
|-------------------|---------|---------|----------------|-------|---------|---------|----------------|-------|
| | 260/280 | 260/230 | RNA [µg/µL] | RIN | 260/280 | 260/230 | RNA [µg/µL] | RIN |
| Controle 1 | 2.11 | 2.21 | 1220 | 9.8 | 2.11 | 2.22 | 662 | 9.7 |
| Controle 2 | 2.08 | 2.24 | 908 | 9.8 | 2.11 | 2.25 | 634 | 9.6 |
| Controle 3 | 2.06 | 2.13 | 340 | 9.7 | 2.05 | 2.14 | 464 | 9.3 |
| Controle 4 | 2.13 | 2.18 | 622 | 9.9 | 2.10 | 2.19 | 550 | 9.2 |
| 2.5 mM 1 | 2.11 | 2.21 | 436 | 9.8 | 2.10 | 2.36 | 522 | 8.8 |
| 2.5 mM 2 | 2.12 | 2.25 | 652 | 9.8 | 2.11 | 2.27 | 252 | 6.9 |
| 2.5 mM 3 | (2.10) | (2.18) | (399) | (*) | 2.07 | (2.16) | (246) | (4.7) |
| | 2.05 | 2.07 | 376 | (7.0) | | 2.10 | 230 | 7.3 |
| 2.5 mM 4 | 2.08 | 2.09 | 465 | 9.8 | 2.11 | 2.02 | 208 | 9.7 |
| 25 mM 1 | 2.12 | 2.20 | 570 | 10 | 2.11 | 2.22 | 288 | 9.0 |
| 25 mM 2 | (2.12) | (2.06) | (430) | (*) | 2.11 | 2.21 | 384 | 9.6 |
| | 2.10 | 2.00 | 432 | (7.5) | | | | |
| 25 mM 3 | 2.13 | 2.11 | 322 | 9.9 | 2.12 | (2.20) | (548) | (5.8) |
| | | | | | | 2.16 | 462 | 7.4 |
| 25 mM 4 | 2.11 | 2.25 | 316 | 9.9 | 2.10 | 2.20 | 440 | 9.5 |

6.4 Análise da qualidade das lâminas hibridizadas

Após as hibridizações e o escaneamento das lâminas de microarray, realizamos a extração dos dados e analisamos sua qualidade a partir das métricas avaliadas pelo software Feature Extraction Software.

6.4.1 Localização de spots

Para a localização dos *spots*, o array foi dividido em quatro quadrantes e a região centróide dos spots foi localizada pelo sinal (+). Se os *spots* onde foram realizadas as leituras de intensidade de fluorescência são localizados corretamente, o relatório exibirá a expressão “Grid Normal”. Todos os *arrays* utilizados neste estudo apresentaram a expressão “Grid Normal” (dados no anexo).

6.4.2 Distribuição de *Outliers*

As distribuições espaciais de *outliers* foram apresentadas em dois plots, um para cada fluoróforo. Para determinar se as intensidades são *outliers* não uniformes o programa utilizou desvios estatísticos do modelo de ruídos da Agilent. O cálculo é feito para cada intensidade e *background* por fluoróforo. O modelo da Agilent estima a variância esperada no seu próprio sistema de expressão gênica por Microarray que inclui variabilidade na fabricação das lâminas, o ruído do scanner entre outros processos. A porcentagem de *outliers* não uniformes recomendável pela Agilent é < 1. A porcentagem < 1 foi obtida para todos os arrays analisados (dados no anexo).

6.4.3 Distribuição de fluorescência dos sinais fluorescentes

A dinâmica da distribuição de intensidade de ambos fluoróforos foi analisada para as sondas não-controle e controle positivo (*Spikes-In*). Esta métrica permitiu a comparação da distribuição dos sinais fluorescentes entre *arrays* e, conseqüentemente, a verificação de adversidades na hibridização que pudessem afetar a intensidade de fluorescência. Verificamos uma distribuição proporcional de sinais para as sondas *Spike-In* e para as sondas não controle, indicando um padrão homogêneo na distribuição de intensidade e boa qualidade de hibridização, bem como a ausência de intensidades saturadas (dados no anexo).

6.4.4 Acurácia e reprodutibilidade da fluorescência das sondas

A confiabilidade dos sinais fluorescentes resultante da hibridização, o monitoramento da linearidade, sensibilidade e acurácia do ensaio foram avaliados

através dos dados de fluorescência das sondas *Spike-In* sintéticas em concentrações e razões conhecidas. O kit RNA *Spike-In* da Agilent contém duas misturas de *Spike-In*, cada qual contendo dez transcritos poliadenilados derivados do transcriptoma de Adenovírus AE1 e otimizados para anelar com sondas complementares na lâmina de *microarray*. As amostras tratadas com ALA e seus respectivos controles foram marcadas e amplificadas juntamente com as misturas de *Spike-In*. Após a hibridização, o logaritmo da razão das intensidades dos sinais verde e vermelho foi usado para monitorar a marcação, a amplificação e os procedimentos realizados no ensaio. Uma regressão linear foi construída a partir dos logaritmos das razões esperadas *versus* obtidas e o resultado do coeficiente de determinação foi fornecido para cada *array*. Quanto mais próximo de 1, maior o coeficiente de determinação entre os dados e maior a confiabilidade nos resultados obtidos na hibridização. Nos resultados observados, todas as amostras apresentaram coeficiente de determinação > 0.965 (dados no anexo).

6.4.5 Parâmetros da hibridização

As métricas avaliadas nas sondas controles são exibidas nas Tabelas 3 e 4. As letras de A a H correspondem aos arrays do tratamento de 2 h e as letras de I a P, aos arrays do tratamento de 24 h. A classificação “Bom” indica o resultado de referência do software e a “Avaliar”, um alerta para reavaliação das amostras e os dados correspondentes.

Tabela 3 - Avaliação das métricas em sondas controles. Medidas extraídas dos arrays correspondente ao tratamento de 2 h. A classificação “Bom” indica o resultado de referência do software e a “Avaliar”, é um alerta para reavaliação das amostras e dos dados. As letras de A a H correspondem aos arrays da lâmina.

| Nome da métrica | Bom | Avaliar | A | B | C | D | E | F | G | H |
|------------------------------------|----------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| IsGoodGrid | >1 | <1 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| AnyColorPrcntFeatNonUniform | <1 | >1 | 0.00 | 0.05 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| gNegCtrlAveBGSubSig | -20 a 10 | <-20 a >10 | -4.11 | -3.51 | -4.18 | -4.08 | -4.74 | -4.63 | -5.18 | -4.07 |
| gNegCtrlADevBGSubSig | <15 | >15 | 3.53 | 3.58 | 4.01 | 4.28 | 3.92 | 3.57 | 4.81 | 4.18 |
| rNegCtrlAveBGSubSig | -20 a 4 | <-20 a >10 | -2.81 | -3.69 | -4.21 | -3.72 | -3.56 | -3.57 | -3.64 | -4.55 |
| rNegCtrlADevBGSubSig | <6 | >6 | 2.97 | 2.98 | 3.21 | 3.11 | 3.26 | 3.21 | 3.16 | 3.57 |
| gNonCntrlMedVCBkSubSignal | 0 a 18 | <0 a >18 | 12.67 | 12.36 | 13.16 | 14.57 | 12.66 | 12.37 | 12.15 | 14.64 |
| rNonCntrlMedVCBkSubSignal | 0 a 18 | <0 a >18 | 11.95 | 11.60 | 12.00 | 13.17 | 12.27 | 11.10 | 11.91 | 13.83 |
| gE1aMedVCBkSubSignal | 0 a 18 | <0 a >18 | 11.58 | 10.71 | 11.39 | 13.08 | 11.44 | 11.09 | 11.33 | 13.77 |
| rE1aMedVCBkSubSignal | 0 a 18 | <0 a >18 | 10.67 | 10.85 | 10.83 | 12.06 | 11.14 | 10.31 | 12.02 | 12.98 |
| absE1aObsVsExpCorr | >0.86 | <0.86 | 0.99 | 1.00 | 0.99 | 0.98 | 0.99 | 0.99 | 0.99 | 0.99 |
| absE1aObsVsExpSlope | >0.85 | <0.85 | 0.87 | 0.91 | 0.91 | 0.84 | 0.87 | 0.87 | 0.87 | 0.85 |

Tabela 4 - Avaliação das métricas em sondas controles. Medidas extraídas dos arrays correspondente ao tratamento de 24 h. A classificação “Bom” indica o resultado de referência do so software e a “Avaliar”, é um alerta para reavaliação das amostras e dos dados. As letras de I a P correspondem aos arrays da lâmina.

| Nome da métrica | Bom | Avaliar | I | J | K | L | M | N | O | P |
|-----------------------------------|----------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| IsGoodGrid | >1 | <1 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| AnyColorPrntFeatNonUniform | <1 | >1 | 0.00 | 0.00 | 0.02 | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| gNegCtrlAveBGSubSig | -20 a 10 | <-20 a >10 | -4.49 | -4.68 | -5.83 | -4.13 | -4.66 | -4.37 | -4.85 | -4.12 |
| gNegCtrlADevBGSubSig | <15 | >15 | 3.53 | 4.72 | 4.93 | 4.01 | 4.03 | 3.67 | 3.67 | 4.16 |
| rNegCtrlAveBGSubSig | -20 a 4 | <-20 a >10 | -1.68 | -2.02 | -2.31 | -3.48 | -2.35 | -2.98 | -2.15 | -1.99 |
| rNegCtrlADevBGSubSig | <6 | >6 | 2.86 | 2.96 | 3.11 | 3.36 | 2.80 | 3.05 | 2.88 | 3.16 |
| gNonCntrlMedVCBkSubSignal | 0 a 18 | <0 a >18 | 12.34 | 13.54 | 13.11 | 12.97 | 12.85 | 13.21 | 13.15 | 14.58 |
| rNonCntrlMedVCBkSubSignal | 0 a 18 | <0 a >18 | 12.06 | 12.72 | 12.02 | 13.29 | 13.63 | 12.30 | 12.80 | 13.87 |
| gE1aMedVCBkSubSignal | 0 a 18 | <0 a >18 | 10.59 | 11.88 | 12.93 | 12.46 | 12.44 | 11.39 | 12.16 | 13.67 |
| rE1aMedVCBkSubSignal | 0 a 18 | <0 a >18 | 9.93 | 11.95 | 11.85 | 12.59 | 12.08 | 10.47 | 12.51 | 13.59 |
| absE1aObsVsExpCorr | >0.86 | <0.86 | 0.99 | 0.99 | 0.99 | 0.99 | 0.99 | 0.98 | 0.99 | 0.97 |
| absE1aObsVsExpSlope | >0.85 | <0.85 | 0.83 | 0.88 | 0.84 | 0.85 | 0.80 | 0.74 | 0.79 | 0.70 |

Em resumo, as métricas de hibridização avaliadas pelo *software* foram satisfatórias e, deste modo, as amostras tratadas com ALA estavam adequadas para a análise de expressão gênica.

6.5 Processamento dos dados

As lâminas SurePrint G3 Human GE v3 8x60K Microarray 072363 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) foram compostas por 58201 sondas que interrogaram 33748 genes. O processo de reanotação das lâminas foi realizado para descartar sondas desatualizadas e sondas que não possuíam informação de acordo com o Genome Reference Consortium Human Build 38 (GRCh38). Após essa etapa, sondas *Spike-In* foram excluídas e 20636 sondas remanescentes, nas quais interrogaram 15169 genes, foram empregadas para a análise estatística.

A correção do *background* e normalização dos dados foram empregadas para corrigir sinais fluorescentes oriundos de ligações inespecíficas e para ajustar o viés sistemático proveniente das várias etapas de realização do ensaio de microarray, particularmente para corrigir e estabilizar as intensidades dos sinais fluorescentes de Cy3 (verde) e Cy5 (vermelho), respectivamente. Para a correção do *background* e normalização dos sinais fluorescentes intra e inter-lâminas, empregamos o algoritmo *normexp* e o método de *Lowess* e quantil, respectivamente. A qualidade e a confiabilidade dos dados após o processamento são demonstradas nas Figuras 15 e 16. O histograma ilustrado na Figura 15, revela a distribuição de fluorescência entre os fluoróforos Cy5 e Cy3 dos *arrays* das duas lâminas. O eixo y representa a densidade e o eixo x, a intensidade dos sinais de fluorescência. A Figura 15A exibe a diferença de intensidade inerente aos fluoróforos. As Figuras 15B e 15C, ilustram os sinais após a correção do *background* e normalização, respectivamente. Já a Figura 15D, exibe as intensidades dos *arrays* ajustadas após o processamento completo dos dados.

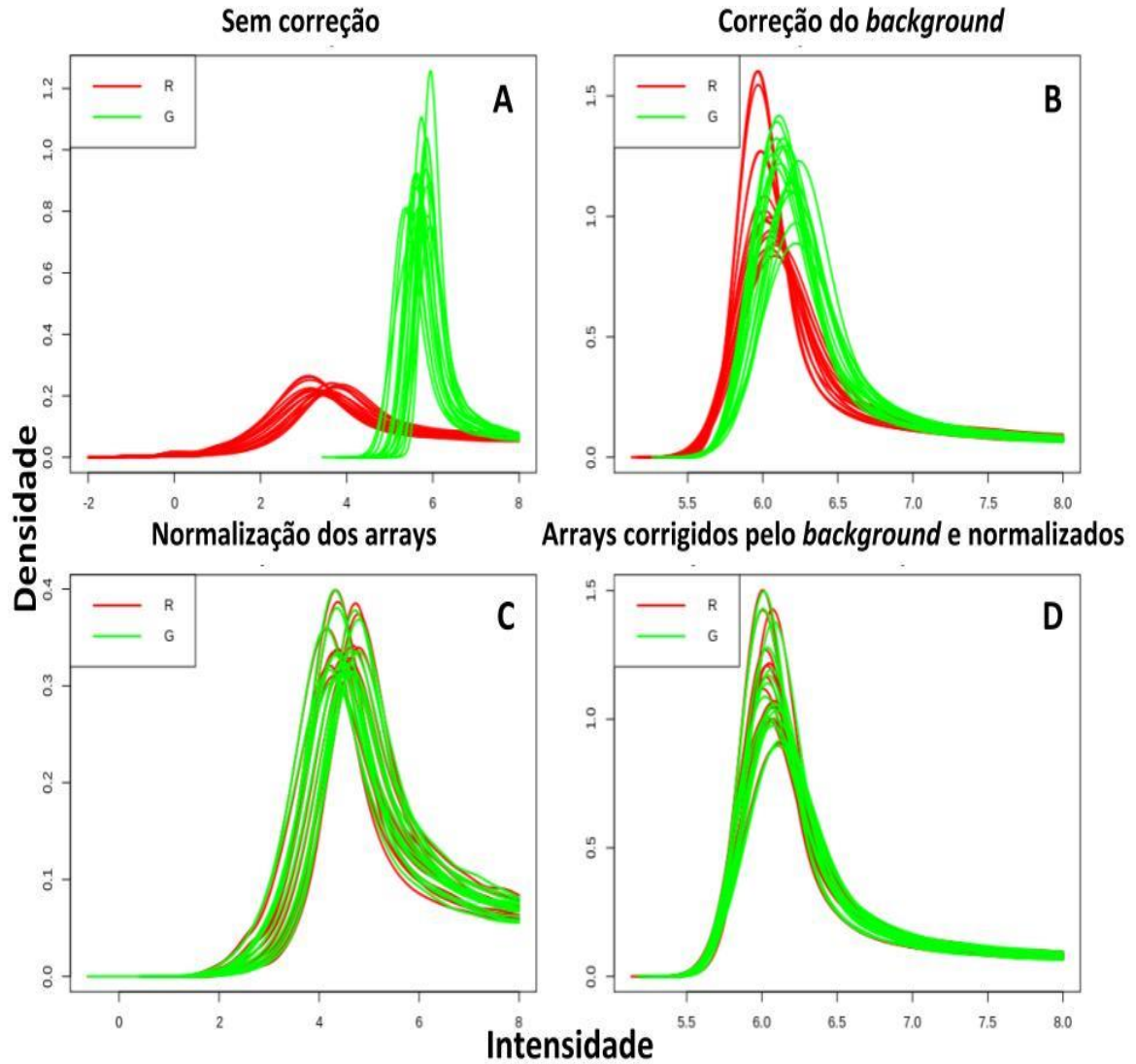


Figura 15 - Histograma dos sinais fluorescentes de expressão gênica corrigidos e normalizados. O eixo y representa a densidade e o eixo x, a intensidade dos sinais de fluorescência. A) representa os sinais fluorescentes sem correção; B) demonstra os sinais fluorescentes após correção do background; C) representa os sinais fluorescentes após a normalização dos dados; D) demonstra o ajuste dos sinais fluorescentes após as

Além de histogramas, utilizamos MA plots (Figura 16) para demonstrar o relacionamento entre as razões dos sinais (M) e as intensidades dos sinais (A), transformada na escala \log_2 . O MA plot é um gráfico de distribuição onde o eixo M representa o logaritmo da razão entre Cy5 e Cy3 e o eixo A, o logaritmo da média de intensidade dos fluoróforos. O propósito da normalização pelo método *Lowess* é estimar o viés inerente aos fluoróforos usando a curva regressão ponderada local. Em cada ponto do MA plot, o valor M é ajustado através da subtração do viés estimado no mesmo valor A (YANG et al., 2012).

Através da regressão, as intensidades foram ajustadas corrigindo a diferença de incorporação e a sensibilidade na detecção da fluorescência emitida por Cy5 e Cy3. Antes da correção, como ilustrado na Figura 16A, os dados se agruparam ao longo de uma curva, refletindo o viés de intensidade entre Cy3 e Cy5. A Figura 16B retrata os dados após a correção do *background*. Nesta etapa, verificamos que apesar de haver um pequeno ajuste, as intensidades das sondas ainda permanecem enviesadas. A Figura 16C exibe os dados somente normalizados. Nesta etapa, verificamos que os sinais fluorescentes tendem à região central, contudo apresentam sinais/ruídos oriundos de ligações inespecíficas e/ou erros técnicos. A Figura 16D retrata os dados das sondas após a correção do *background* e normalização. O objetivo da normalização por *Lowess* é ajustar os dados de tal forma que a maioria deles centralize ao longo de 0 (YANG et al., 2012). Essa centralização significa que \log_2 da razão de intensidades e a média do logaritmo das intensidades das lâminas foram ajustadas (YANG et al., 2012). Em seguida, a média da intensidade das sondas idênticas foi calculada (Figura 16E).

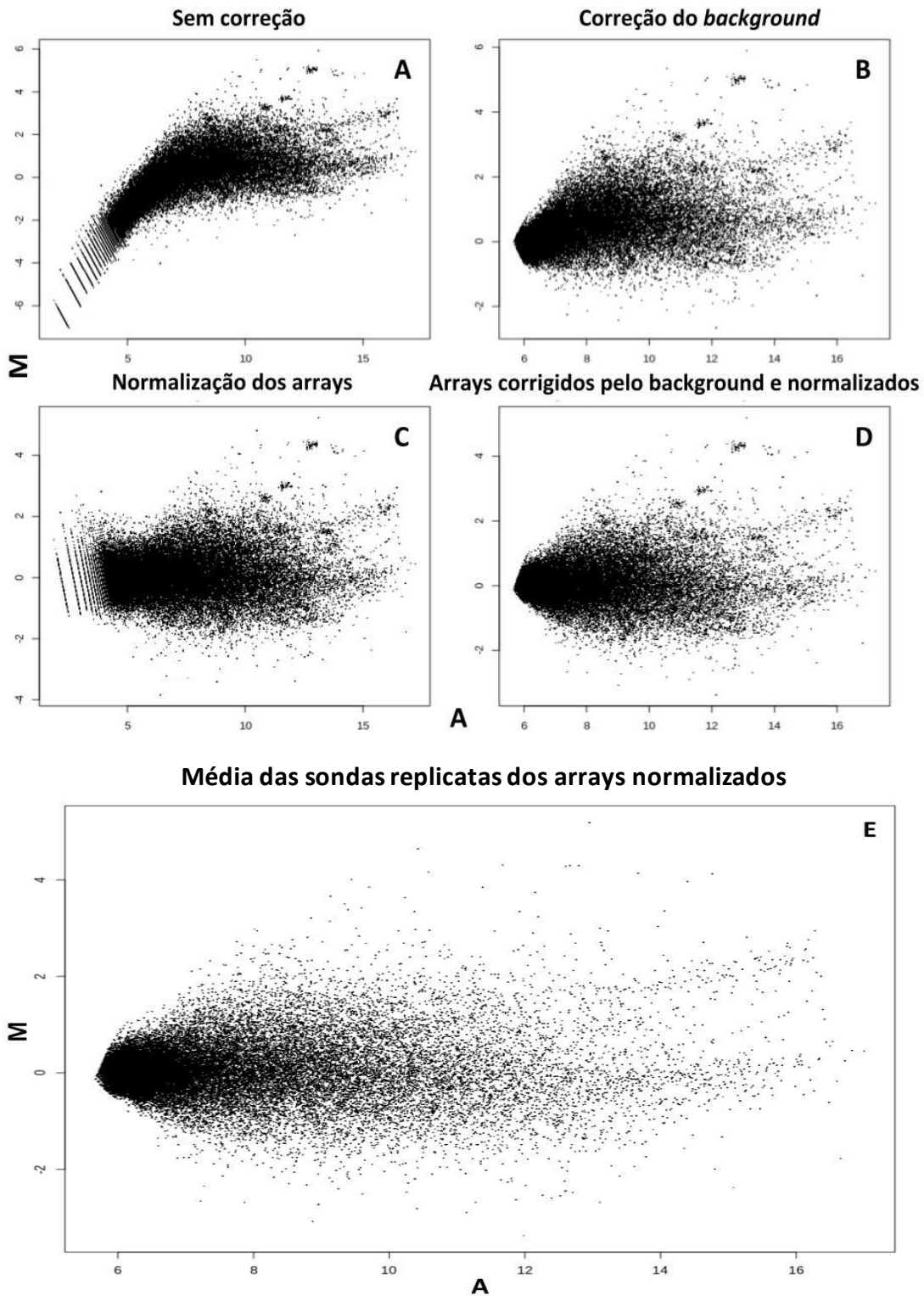


Figura 16 - Normalização das intensidades de Cy3 e Cy5 visualizada por MA plot. A letra M representa a intensidade dos sinais e a letra A, a média das intensidades dos sinais, ambos transformados em escala \log_2 . A) antes da correção, os dados refletem o viés de intensidade entre Cy3 e Cy5; B) retrata os dados após a correção do background; C) representa os dados somente normalizados; D) retrata os dados das sondas após a correção do background e normalização; E) MA plot exibindo a intensidade da média das sondas idênticas.

Utilizamos o pacote *limma* para a construção de *boxplots* antes e após a normalização dos dados como demonstrado na Figura 17. Esses plots foram úteis para ilustrar a distribuição de intensidades globais de todas as sondas das replicatas biológicas. A distribuição das intensidades no *boxplot* foi desenhada entre os percentis 25 e 75. As linhas que se estenderam a partir das caixas são referentes a propagação dos dados. Verificamos que após a realização da normalização, houve um alinhamento das intensidades dos arrays de todas as replicatas biológicas, mostrando o ajuste adequado os sinais fluorescentes.

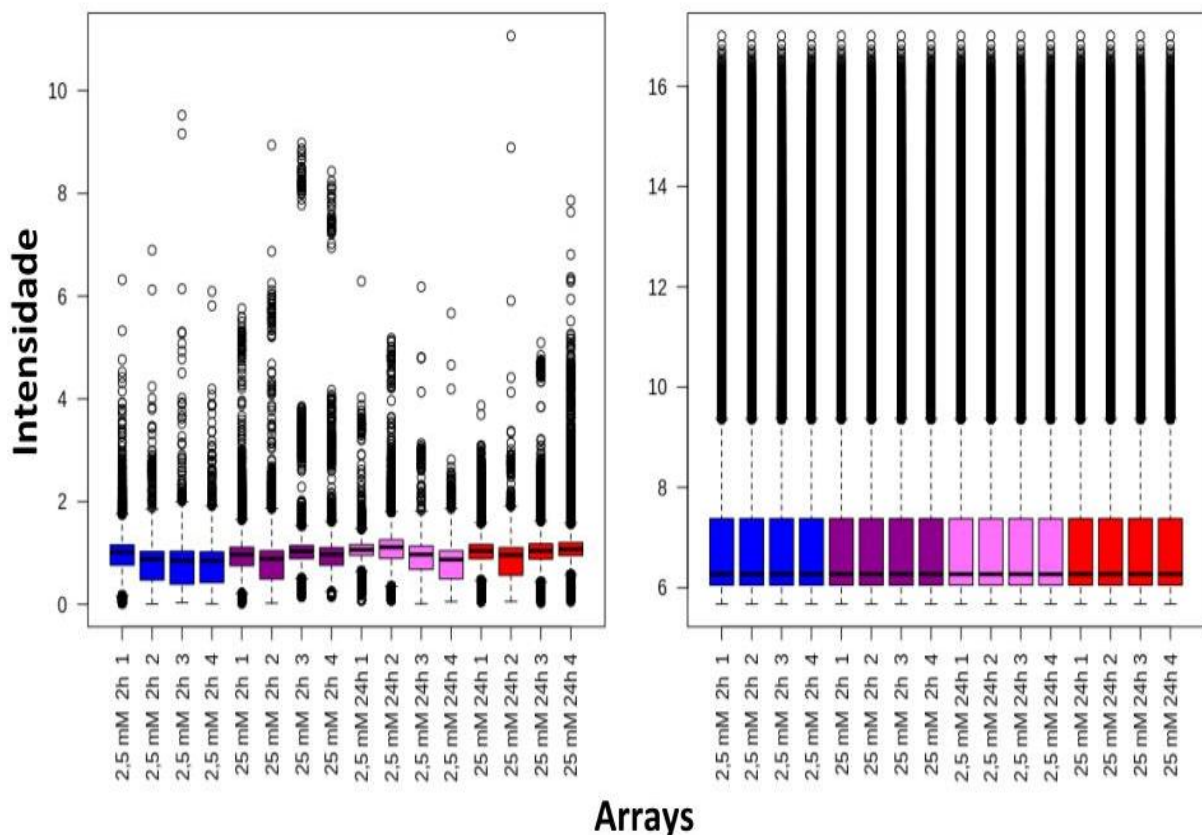
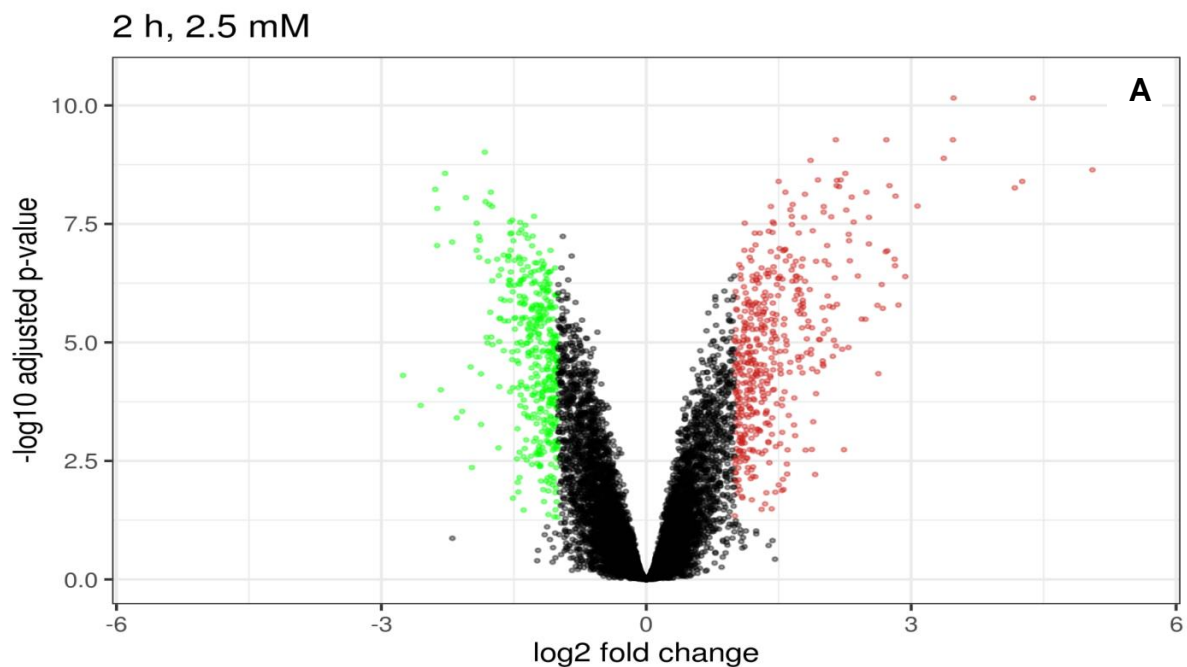


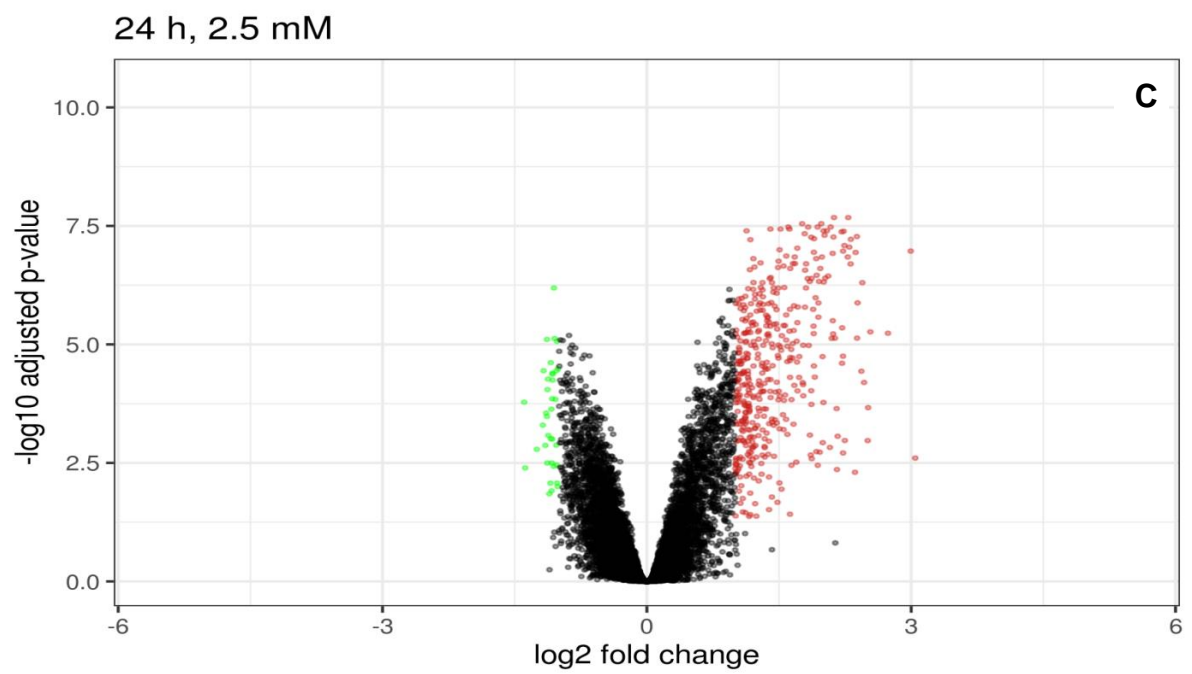
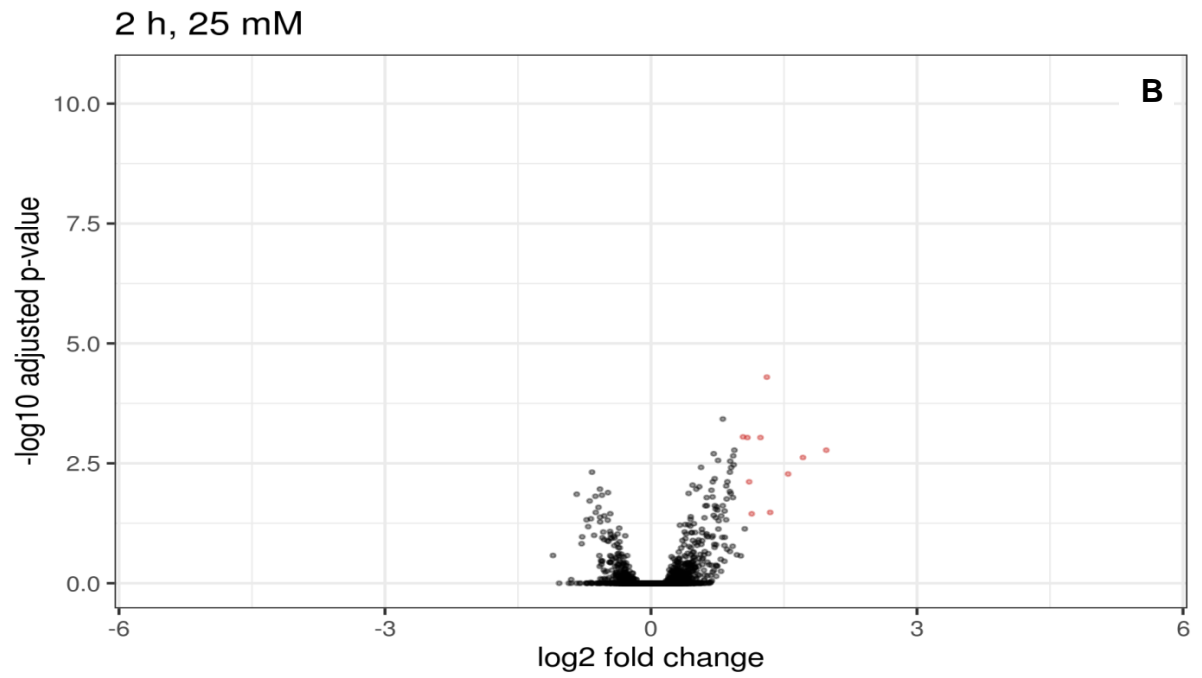
Figura 17 - Normalização das intensidades de Cy3 e Cy5 visualizada por *boxplot*. O eixo y representa a intensidade dos sinais fluorescentes e o eixo x, os arrays de cada tratamento, antes e após a normalização dos dados, respectivamente.

6.6 Identificação de genes diferencialmente expressos

Para definir o número de genes diferencialmente expressos (DEGs), consideramos a *Log Fold-Change* entre $-1 < e > 1$ e significância estatística de $FDR < 0,05$. Desta forma, identificamos um total de 1437 DEGs, dos quais 969 foram genes regulados positivamente e 468, regulados negativamente: a) no tratamento de

2 h, 2,5 mM, encontramos 891 DEGs, dos quais 471 genes regulados positivamente e 420 genes regulados negativamente; b) no tratamento de 2 h 25 mM, encontramos 10 DEGs, dos quais 10 genes regulados positivamente e 0 genes regulados negativamente; c) no tratamento de 24 h 2,5 mM; encontramos 470 DEGs, dos quais genes 434 regulados positivamente e 36 genes regulados negativamente; d) no tratamento de 24 h 25 mM, encontramos 66 DEGs, dos quais 54 genes regulados positivamente e 12 genes regulados negativamente. Os dados são ilustrados conforme Figura 18. Já na Tabela 5, são exibidos os 25 principais DEGs regulados positiva (Up) e negativamente (Down) no tratamento de 2 h com 2.5 mM e 24 h com 2.5 mM ordenados pelo *Log Fold-Change* (LogFC). Para os demais tratamentos, são exibidos todos os DEGs.





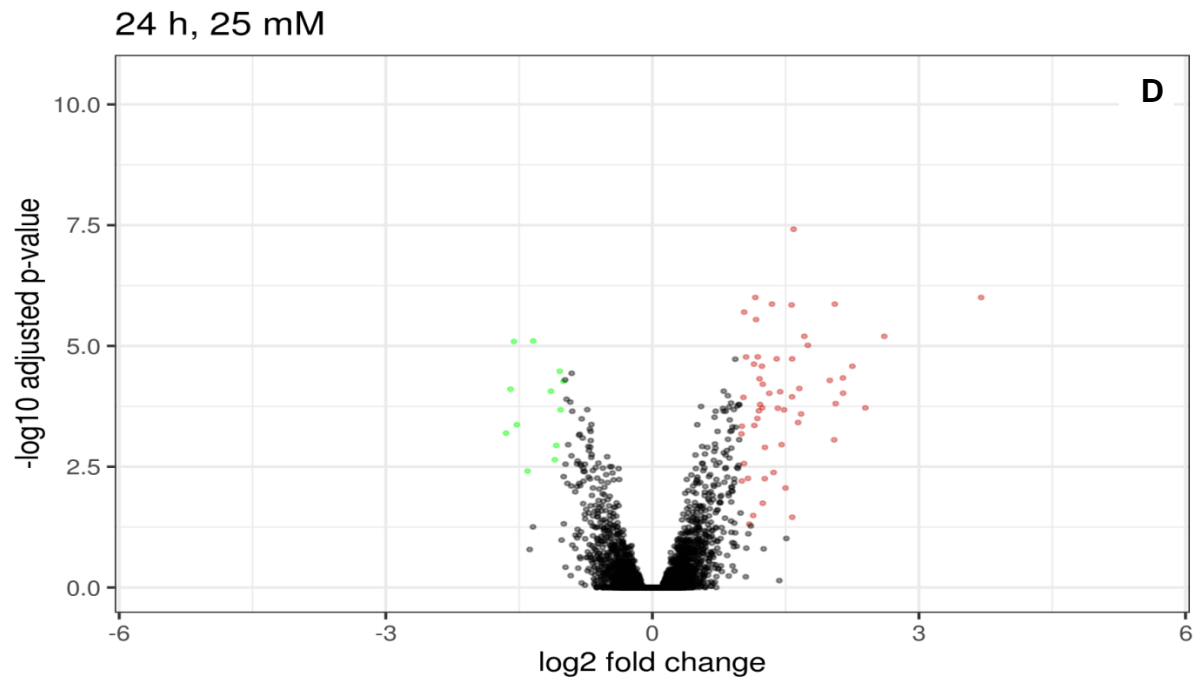


Figura 18 - Volcano plots dos genes expressos em cada tratamento. Os dados para todos os genes foram plotados como $-\log_{10}$ do p-valor ajustado (FDR) no eixo y versus Log2 fold change (LFC) no eixo x. A) amostra de 2 h com 2.5 mM; B) amostra de 2 h com 25 mM; C) amostra de 24 h como 2.5 mM; D) amostra de 24 h com 25 mM). Os pontos verdes retratam os DEGs regulados negativamente, os pontos vermelhos, os DEGs regulados positivamente, e os pontos pretos representam os genes expressos sem significância estatística.

Tabela 5 - DEGs regulados pelo ALA. A lista exhibe os 25 principais DEGs regulados positiva (Up) e negativamente (Down) no tratamento de 2 h com 2.5 mM e 24 h com 2.5 mM ordenados pelo logFC. Para os demais tratamentos, são exibidos todos os DEGs.

| Gene | Descrição | P. Valor | FDR | LogFC |
|--------------------|---|----------|----------|-------|
| 2 h, 2.5 mM | | | | |
| Up | | | | |
| IGFBP1 | Insulin like growth factor binding protein 1 | 9,05E-13 | 2,29E-09 | 5,05 |
| KLHDC7B | Kelch domain containing 7B | 1,66E-15 | 6,98E-11 | 4,38 |
| GDF15 | Growth differentiation factor 15 | 2,42E-12 | 4,02E-09 | 4,26 |
| HMOX1 | Heme oxygenase 1 | 4,14E-12 | 5,49E-09 | 4,17 |
| NMRAL2P | Nmra like redox sensor 2, pseudogene | 2,39E-15 | 6,98E-11 | 3,48 |
| ABCC2 | ATP binding cassette subfamily C member 2 | 9,12E-14 | 5,32E-10 | 3,47 |
| KLHDC7B,1 | Kelch domain-containing protein 7B | 4,03E-13 | 1,31E-09 | 3,37 |
| GPAT3 | Glycerol-3-phosphate acyltransferase 3 | 1,73E-11 | 1,33E-08 | 3,07 |
| MANF | Mesencephalic astrocyte derived neurotrophic factor | 2,66E-09 | 4,07E-07 | 2,93 |
| VEGFA | Vascular endothelial growth factor A | 1,88E-08 | 1,63E-06 | 2,86 |
| SLC17A9 | Solute carrier family 17 member 9 | 8,72E-12 | 8,2E-09 | 2,82 |
| ARHGAP45 | Rho gtpase activating protein 45 | 1,22E-09 | 2,41E-07 | 2,82 |
| CCL20 | C-C motif chemokine ligand 20 | 7,33E-10 | 1,75E-07 | 2,81 |
| PPP2R2D | Protein phosphatase 2 regulatory subunit Bdelta | 3,27E-12 | 4,93E-09 | 2,75 |
| NPIP5 | Nuclear pore complex interacting protein family member B5 | 4,26E-10 | 1,17E-07 | 2,73 |
| PABPC1L | Poly(A) binding protein cytoplasmic 1 like | 6,51E-14 | 5,32E-10 | 2,72 |

| | | | | |
|------------------|---|----------|----------|------|
| DNAJB9 | Dnaj heat shock protein family (Hsp40) member B9 | 4,57E-10 | 1,22E-07 | 2,71 |
| SMG1P1 | SMG1 pseudogene 1 | 2,37E-08 | 1,91E-06 | 2,68 |
| SAT1,1 | Spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1 | 4,84E-09 | 6,02E-07 | 2,67 |
| AREG,1 | Amphiregulin | 1,46E-06 | 4,58E-05 | 2,63 |
| AKR1B10 | Aldo-keto reductase family 1 member B10 | 1,94E-08 | 1,65E-06 | 2,62 |
| HERPUD1 | Homocysteine inducible ER protein with ubiquitin like domain 1 | 3,8E-11 | 2,3E-08 | 2,52 |
| SLC22A15 | Solute carrier family 22 member 15 | 2,61E-10 | 8,37E-08 | 2,52 |
| LDLR | Low density lipoprotein receptor | 6,11E-12 | 6,79E-09 | 2,49 |
| HSP90B1 | Heat shock protein 90 beta family member 1 | 4,82E-08 | 3,25E-06 | 2,48 |
| SAT1,2 | Spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1 | 4,71E-08 | 3,22E-06 | 2,44 |
| DNAJC3 | Dnaj heat shock protein family (Hsp40) member C3 | 2,53E-09 | 3,97E-07 | 2,4 |
| SLC7A2 | Solute carrier family 7 member 2 | 5,31E-11 | 2,89E-08 | 2,35 |
| TMEM88 | Transmembrane protein 88 | 9,3E-12 | 8,61E-09 | 2,33 |
| REC8 | REC8 meiotic recombination protein | 2,11E-10 | 7,17E-08 | 2,3 |
| LSMEM1 | Leucine rich single-pass membrane protein 1 | 8,29E-10 | 1,9E-07 | 2,3 |
| SAT1 | Spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1 | 1,29E-10 | 5,24E-08 | 2,29 |
| HK2 | Hexokinase 2 | 2,84E-07 | 1,28E-05 | 2,29 |
| LINC01564 | Long intergenic non-protein coding RNA 1564 | 2,36E-11 | 1,62E-08 | 2,27 |
| NCR3LG1 | Natural killer cell cytotoxicity receptor 3 ligand 1 | 1,17E-12 | 2,72E-09 | 2,25 |
| MALAT1 | Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding) | 0,000138 | 0,00184 | 2,24 |
| AREG | Amphiregulin | 3,19E-07 | 0,000014 | 2,22 |
| METRNL | Meteorin like, glial cell differentiation regulator | 2,05E-12 | 3,74E-09 | 2,2 |

| | | | | |
|-------------------|---|----------|----------|-------|
| AL137127,1 | Novel transcript | 3,77E-12 | 5,18E-09 | 2,18 |
| AL354702,1 | Heat shock 70kda protein 5 (glucose-regulated protein, 78kda) (HSPA5) pseudogene | 2,16E-12 | 3,82E-09 | 2,16 |
| SLC16A3 | Solute carrier family 16 member 3 | 3,16E-12 | 4,93E-09 | 2,16 |
| GOLGA8S,1 | Golgin A8 family member G | 1,8E-08 | 1,57E-06 | 2,16 |
| AC124798,1 | Antisense to KCNJ11 and overlapping to a novel gene | 8,34E-14 | 5,32E-10 | 2,15 |
| F2RL1 | F2R like trypsin receptor 1 | 2,62E-07 | 1,19E-05 | 2,15 |
| SLC20A1 | Solute carrier family 20 member 1 | 2,9E-09 | 4,34E-07 | 2,14 |
| ATF3 | Activating transcription factor 3 | 1,83E-07 | 0,000009 | 2,13 |
| MIR17HG | Mir-17-92a-1 cluster host gene | 2,22E-08 | 1,82E-06 | 2,11 |
| IKBKKG | Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit gamma | 4,91E-07 | 1,96E-05 | 2,11 |
| GOLGA8S | Golgin A8 family member G | 3,66E-11 | 2,25E-08 | 2,09 |
| MXD1 | MAX dimerization protein 1 | 2,05E-08 | 1,72E-06 | 2,07 |
| SDF2L1 | Stromal cell derived factor 2 like 1 | 1,14E-09 | 2,31E-07 | 2,06 |
| TNFRSF12A | TNF receptor superfamily member 12A | 9,14E-08 | 5,29E-06 | 2,06 |
| Down | | | | |
| MT1F | Metallothionein 1F | 1,61E-06 | 4,97E-05 | -2,75 |
| PEG10 | Paternally expressed 10 | 9,97E-06 | 0,000213 | -2,55 |
| KLB | Klotho beta | 4,55E-12 | 5,89E-09 | -2,39 |
| ABCC6P1,1 | ATP binding cassette subfamily C member 6 pseudogene 1 | 2,1E-11 | 1,49E-08 | -2,37 |
| FSCN1 | Fascin actin-bundling protein 1 | 2,94E-10 | 9,08E-08 | -2,37 |

| | | | | |
|-------------------|--|----------|----------|-------|
| MT1M | Metallothionein 1M | 3,89E-06 | 0,0001 | -2,33 |
| ABCC6P1 | ATP binding cassette subfamily C member 6 pseudogene 1 | 1,13E-12 | 2,72E-09 | -2,28 |
| SPTLC3 | Serine palmitoyltransferase long chain base subunit 3 | 2,3E-10 | 7,64E-08 | -2,2 |
| MT1B | Metallothionein 1B | 2,09E-05 | 0,00039 | -2,15 |
| MT1L | Metallothionein 1L, pseudogene | 1,42E-05 | 0,000286 | -2,09 |
| AC009414,2 | Ribosomal protein L21 (RPL21) pseudogene | 9,76E-12 | 8,89E-09 | -2,04 |
| MT1H | Metallothionein 1H | 9,55E-07 | 0,000033 | -1,99 |
| MT2A | Metallothionein 2A | 0,00039 | 0,00436 | -1,98 |
| CDKN2C | Cyclin dependent kinase inhibitor 2C | 5,83E-11 | 3,06E-08 | -1,92 |
| PEBP1 | Phosphatidylethanolamine binding protein 1 | 4,02E-10 | 1,14E-07 | -1,92 |
| VSNL1 | Visinin like 1 | 1,5E-10 | 5,8E-08 | -1,89 |
| TMA7,1 | Serine palmitoyltransferase long chain base subunit 3 | 6,49E-10 | 1,61E-07 | -1,89 |
| NDUFB3 | NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B3 | 2,05E-10 | 7,03E-08 | -1,88 |
| SPTLC3,2 | Serine palmitoyltransferase long chain base subunit 3 | 1,47E-06 | 4,61E-05 | -1,87 |
| MT1CP | Metallothionein 1C, pseudogene | 3,09E-05 | 0,000538 | -1,87 |
| GTF2H5 | General transcription factor IIH subunit 5 | 2,33E-13 | 9,69E-10 | -1,83 |
| CCDC170 | Coiled-coil domain containing 170 | 1,24E-11 | 1,08E-08 | -1,82 |
| UHRF1 | Ubiquitin like with PHD and ring finger domains 1 | 1,52E-07 | 7,82E-06 | -1,81 |
| KRTAP3-1 | Keratin associated protein 3-1 | 2,17E-07 | 1,03E-05 | -1,8 |
| HMGB3P27 | High mobility group box 3 pseudogene 27 | 8,86E-10 | 1,94E-07 | -1,79 |
| TMA7 | Translation machinery associated 7 homolog | 1,5E-11 | 1,23E-08 | -1,78 |
| GLUD2 | Glutamate dehydrogenase 2 | 3,06E-08 | 2,31E-06 | -1,77 |

| | | | | |
|-------------------|--|----------|----------|-------|
| THRA | Thyroid hormone receptor, alpha | 6,05E-12 | 6,79E-09 | -1,76 |
| RGN | Regucalcin | 1,82E-11 | 1,36E-08 | -1,75 |
| KLHDC9 | Kelch domain containing 9 | 1,49E-07 | 7,72E-06 | -1,75 |
| HMG2 | High mobility group nucleosomal binding domain 2 | 3,69E-09 | 5,01E-07 | -1,74 |
| GLUD2,1 | Glutamate dehydrogenase 2 | 2,41E-07 | 1,11E-05 | -1,74 |
| AC009967,1 | Novel transcript | 7,47E-10 | 1,76E-07 | -1,69 |
| C1orf53 | Chromosome 1 open reading frame 53 | 2,46E-09 | 3,88E-07 | -1,67 |
| SUB1 | SUB1 homolog, transcriptional regulator | 0,000124 | 0,00168 | -1,67 |
| CAT | Catalase | 4,6E-08 | 3,16E-06 | -1,66 |
| FKBP1B | FK506 binding protein 1B | 1,99E-07 | 9,62E-06 | -1,66 |
| GLUD2,2 | Glutamate dehydrogenase 2 | 3,23E-06 | 8,62E-05 | -1,66 |
| UNG | Uracil DNA glycosylase | 1,25E-08 | 1,21E-06 | -1,65 |
| LINC02413 | Long intergenic non-protein coding RNA 2413 | 4,39E-08 | 3,06E-06 | -1,65 |
| SNX21 | Sorting nexin family member 21 | 1,57E-09 | 2,87E-07 | -1,64 |
| BEX3 | Brain expressed X-linked 3 | 5,52E-10 | 1,44E-07 | -1,62 |
| TSPYL4 | TSPY like 4 | 1,39E-08 | 1,3E-06 | -1,61 |
| AL591034,1 | Replication protein A3 (RPA3) pseudogene | 5,4E-08 | 3,55E-06 | -1,61 |
| HMG2 | High mobility group AT-hook 2 | 3,47E-07 | 0,000015 | -1,61 |
| PET100 | PET100 homolog | 5,86E-10 | 1,51E-07 | -1,56 |
| C15orf39 | Chromosome 15 open reading frame 39 | 5,86E-10 | 1,51E-07 | -1,56 |
| UBR7 | Ubiquitin protein ligase E3 component n-recogin 7 (putative) | 8,09E-10 | 1,87E-07 | -1,56 |
| AC021074,3 | Uncharacterized LOC100507389 | 4,76E-09 | 5,99E-07 | -1,56 |

| | | | | |
|---------------------|--|----------|----------|-------|
| TMEM14A | Transmembrane protein 14A | 5,36E-08 | 3,54E-06 | -1,56 |
| CYB5B | Cytochrome b5 type B | 3,52E-09 | 4,87E-07 | -1,55 |
| IDNK | IDNK, gluconokinase | 5,19E-11 | 2,87E-08 | -1,54 |
| 2 h, 25 mM | | | | |
| Up | | | | |
| ATF3 | Activating transcription factor 3 | 4,68E-07 | 1,68E-03 | 1,98 |
| GDF15 | Growth differentiation factor 15 | 9,02E-07 | 2,39E-03 | 1,71 |
| HMOX1 | Heme oxygenase 1 | 3,89E-06 | 5,28E-03 | 1,55 |
| AKR1B10 | Aldo-keto reductase family 1 member B10 | 7,04E-05 | 3,34E-02 | 1,34 |
| LINC01909 | Long intergenic non-protein coding RNA 1909 | 8,64E-10 | 5,04E-05 | 1,31 |
| MAP3K8 | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8 | 1,57E-07 | 9,18E-04 | 1,23 |
| JUN | Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit | 7,71E-05 | 3,57E-02 | 1,14 |
| MBNL2 | Muscleblind like splicing regulator 2 | 7,15E-06 | 7,68E-03 | 1,11 |
| GADD45A | Growth arrest and DNA damage inducible alpha | 1,44E-07 | 9,18E-04 | 1,09 |
| NMRAL2P | Nmra like redox sensor 2, pseudogene | 1,22E-07 | 8,89E-04 | 1,04 |
| 24 h, 2.5 mM | | | | |
| Up | | | | |
| RMRP | RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease | 0,000127 | 0,0025 | 3,05 |
| HLA-A | Major histocompatibility complex, class I, A | 2,38E-10 | 1,07E-07 | 2,99 |
| CD79A | CD79a molecule | 5,44E-08 | 5,8E-06 | 2,74 |

| | | | | |
|--------------------|---|----------|----------|------|
| SMG1P1 | SMG1 pseudogene 1 | 4,98E-08 | 5,43E-06 | 2,54 |
| AC117386,2 | Novel transcript, antisense to PFN2 | 5,59E-06 | 0,000215 | 2,51 |
| MALAT1,2 | Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 | 4,29E-05 | 0,00107 | 2,51 |
| MT-CO1 | Cytochrome c oxidase subunit I | 1,15E-06 | 6,36E-05 | 2,47 |
| NPIP5,1 | Nuclear pore complex interacting protein family member B5 | 2,07E-09 | 4,98E-07 | 2,45 |
| COL27A1,1 | Collagen, type XXVII, alpha 1 | 5,67E-07 | 3,69E-05 | 2,44 |
| SLC22A18 | Solute carrier family 22 member 18 | 7,69E-09 | 1,33E-06 | 2,39 |
| ANKRD36 | Ankyrin repeat domain 36 | 7,36E-08 | 7,37E-06 | 2,39 |
| SLC35E4 | Solute carrier family 35 member E4 | 7,75E-11 | 5,31E-08 | 2,38 |
| BORCS7-ASMT | BORCS7-ASMT readthrough (NMD candidate) | 2,76E-10 | 1,15E-07 | 2,37 |
| MT-CO2 | Cytochrome c oxidase subunit II | 0,000305 | 0,00498 | 2,36 |
| HSCB | Hscb mitochondrial iron-sulfur cluster cochaperone | 1,01E-10 | 6,07E-08 | 2,31 |
| PCNX4 | Pecanex homolog 4 | 6,23E-10 | 2,01E-07 | 2,31 |
| KLF17 | Kruppel like factor 17 | 1,84E-10 | 8,88E-08 | 2,3 |
| ZNF526 | Zinc finger protein 526 | 3,83E-12 | 2,11E-08 | 2,28 |
| NPIP5 | Nuclear pore complex interacting protein family member B5 | 3,83E-10 | 1,43E-07 | 2,28 |
| MTND4P35 | Mt-nd4 pseudogene 35 | 4,26E-05 | 0,00106 | 2,25 |
| INKA1 | Inka box actin regulator 1 | 1,6E-10 | 8,2E-08 | 2,24 |
| FAM224A | Family with sequence similarity 224 member a | 4,99E-11 | 4,1E-08 | 2,23 |
| TNFAIP8L1 | TNF alpha induced protein 8 like 1 | 2,43E-10 | 1,07E-07 | 2,23 |
| LINC01952 | Long intergenic non-protein coding rna 1952 | 2,25E-07 | 1,77E-05 | 2,23 |
| SNHG12 | Small nucleolar RNA host gene 12 | 9,17E-05 | 0,00195 | 2,23 |

| | | | | |
|-------------------|--|----------|----------|------|
| DPYSL4 | Dihydropyrimidinase like 4 | 3,88E-08 | 4,47E-06 | 2,22 |
| AMZ1 | Archaelysin family metallopeptidase 1 | 5,45E-11 | 4,21E-08 | 2,21 |
| MTRNR2L8 | MT-RNR2-like 8 | 3,39E-07 | 0,000025 | 2,21 |
| MT-ATP6 | ATP synthase F0 subunit 6 | 0,000033 | 0,000867 | 2,17 |
| MT-CO3 | Cytochrome c oxidase III | 0,000259 | 0,00437 | 2,16 |
| ANKRD36,3 | Ankyrin repeat domain 36 | 5,93E-06 | 0,000226 | 2,15 |
| NEAT1 | Nuclear paraspeckle assembly transcript 1 (non-protein coding) | 7,37E-08 | 7,37E-06 | 2,13 |
| ZNF763 | Zinc finger protein 763 | 4,14E-12 | 2,11E-08 | 2,12 |
| MROH7 | Maestro heat like repeat family member 7 | 8,08E-11 | 5,42E-08 | 2,12 |
| LINC01630 | Long intergenic non-protein coding RNA 1630 | 2,9E-10 | 1,2E-07 | 2,11 |
| GOLGA8S | Golgin A8 family member G | 2,47E-08 | 3,16E-06 | 2,11 |
| GDF15 | Growth differentiation factor 15 | 5,79E-08 | 6,01E-06 | 2,11 |
| HCP5 | HLA complex P5 (non-protein coding) | 7,5E-08 | 7,46E-06 | 2,1 |
| GJD4 | Gap junction protein delta 4 | 2,6E-11 | 3,34E-08 | 2,09 |
| MT-ND5 | NADH dehydrogenase, subunit 5 (complex I) | 6,53E-05 | 0,00149 | 2,08 |
| CHRD | Chordin | 1,31E-09 | 3,62E-07 | 2,06 |
| RNF180 | Ring finger protein 180 | 4,57E-11 | 4,02E-08 | 2,04 |
| SFI1 | SFI1 centrin binding protein | 6,98E-11 | 4,98E-08 | 2,02 |
| MAPK8IP3 | Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3 | 1,48E-09 | 3,99E-07 | 2,02 |
| CLASRP | CLK4 associating serine/arginine rich protein | 1,97E-09 | 4,84E-07 | 2,01 |
| AP001486,2 | Novel transcript, overlapping to DCUN1D5 | 4,4E-11 | 4,02E-08 | 2 |
| SRSF11 | Serine and arginine rich splicing factor 11 | 4,04E-06 | 0,000168 | 2 |

| | | | | |
|-----------------|---|----------|----------|-------|
| MT-ND1 | NADH dehydrogenase, subunit 1 (complex I) | 4,86E-05 | 0,00118 | 2 |
| ABCC2 | ATP binding cassette subfamily C member 2 | 3,8E-10 | 1,43E-07 | 1,99 |
| LPIN3 | Lipin 3 | 2,31E-07 | 1,81E-05 | 1,99 |
| VHL | Von Hippel-Lindau tumor suppressor | 1,24E-11 | 2,84E-08 | 1,98 |
| Down | | | | |
| GLUD2 | Glutamate dehydrogenase 2 | 3,97E-06 | 0,000165 | -1,39 |
| ZNF316 | Zinc finger protein 316 | 0,000233 | 0,00403 | -1,38 |
| MAL2,1 | Mal, T cell differentiation protein 2 (gene/pseudogene) | 7,29E-05 | 0,00163 | -1,25 |
| ID2 | Inhibitor of DNA binding 2 | 1,64E-05 | 0,000505 | -1,18 |
| GLRX5 | Glutaredoxin 5 | 5,42E-07 | 3,59E-05 | -1,17 |
| SH3BGRL | SH3 domain binding glutamate rich protein like | 5,75E-05 | 0,00135 | -1,15 |
| GLUD2,1 | Glutamate dehydrogenase 2 | 7,82E-06 | 0,000282 | -1,14 |
| H3F3A | H3 histone family member 3A | 7,96E-08 | 7,84E-06 | -1,13 |
| CHP1 | Calcineurin like EF-hand protein 1 | 1,79E-06 | 8,97E-05 | -1,13 |
| EID2 | EP300 interacting inhibitor of differentiation 2 | 9,57E-06 | 0,000332 | -1,13 |
| RPL15P20 | Ribosomal protein L15 pseudogene 20 | 0,000171 | 0,00318 | -1,13 |
| RAB4A | RAB4A, member RAS oncogene family | 9,25E-07 | 5,37E-05 | -1,12 |
| PCTP | Phosphatidylcholine transfer protein | 3,13E-05 | 0,000834 | -1,12 |
| RAP1A | RAP1A, member of RAS oncogene family | 0,00115 | 0,0142 | -1,11 |
| ARMT1 | Acidic residue methyltransferase 1 | 0,000602 | 0,00845 | -1,1 |
| VSNL1 | Visinin like 1 | 3,26E-07 | 2,43E-05 | -1,09 |

| | | | | |
|----------------------|--|----------|----------|-------|
| HMGA2 | High mobility group AT-hook 2 | 3,79E-05 | 0,000974 | -1,09 |
| LHPP | Phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase | 6,15E-06 | 0,000232 | -1,08 |
| AOC3 | Amine oxidase, copper containing 3 | 0,00017 | 0,00316 | -1,08 |
| LMNB1 | Lamin B1 | 0,000953 | 0,0123 | -1,08 |
| HIST1H3A | Histone cluster 1 H3 family member a | 6,43E-07 | 4,05E-05 | -1,07 |
| ARPC3P5 | Actin related protein 2/3 complex subunit 3 pseudogene 5 | 6,82E-07 | 4,22E-05 | -1,07 |
| C1orf53 | Chromosome 1 open reading frame 53 | 9,92E-07 | 5,65E-05 | -1,07 |
| UNG | Uracil DNA glycosylase | 3,23E-06 | 0,00014 | -1,07 |
| PRMT6 | Protein arginine methyltransferase 6 | 3,91E-05 | 0,000994 | -1,07 |
| FAM117B | Family with sequence similarity 117 member B | 0,000211 | 0,00374 | -1,06 |
| KHDRBS3 | KH RNA binding domain containing, signal transduction associated 3 | 2,9E-09 | 6,45E-07 | -1,05 |
| EIF4EBP2 | Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2 | 7,58E-08 | 7,51E-06 | -1,05 |
| HIST1H3E | Histone cluster 1 H3 family member e | 3,34E-06 | 0,000144 | -1,04 |
| AKR1D1 | Aldo-keto reductase family 1 member D1 | 5,49E-07 | 3,62E-05 | -1,03 |
| RRAGA | Ras related GTP binding A | 5,69E-05 | 0,00134 | -1,03 |
| SDHAF3 | Succinate dehydrogenase complex assembly factor 3 | 0,000194 | 0,00351 | -1,03 |
| PSMF1 | Proteasome inhibitor subunit 1 | 9,01E-08 | 8,62E-06 | -1,02 |
| NACA2 | Nascent polypeptide associated complex alpha subunit 2 | 0,0006 | 0,00843 | -1,02 |
| CDKN2C | Cyclin dependent kinase inhibitor 2C | 4,8E-07 | 3,25E-05 | -1,01 |
| DNAJC25-GNG10 | DNAJC25-GNG10 readthrough | 0,000742 | 0,01 | -1,01 |

24 h, 25 mM

| Up | | | | | |
|---------------------|---|----------|----------|------|--|
| AKR1B10 | Aldo-keto reductase family 1 member B10 | 1,41E-10 | 9,92E-07 | 3,7 | |
| GDF15 | Growth differentiation factor 15 | 3,14E-09 | 6,32E-06 | 2,61 | |
| AKR1B1P2 | Aldo-keto reductase family 1 member B1 pseudogene 2 | 4,50E-07 | 1,92E-04 | 2,4 | |
| AKR1C1 | Aldo-keto reductase family 1 member C1 | 2,71E-08 | 2,64E-05 | 2,25 | |
| ATF3 | Activating transcription factor 3 | 1,60E-07 | 9,52E-05 | 2,15 | |
| HMOX1 | Heme oxygenase 1 | 5,93E-08 | 4,59E-05 | 2,14 | |
| IGFBP1 | Insulin like growth factor binding protein 1 | 3,26E-07 | 1,56E-04 | 2,06 | |
| FST | Follistatin | 2,92E-10 | 1,36E-06 | 2,05 | |
| AKR1C4 | Aldo-keto reductase family 1 member C4 | 3,36E-06 | 8,79E-04 | 2,05 | |
| AL049839,2 | Novel protein | 7,00E-08 | 5,17E-05 | 2 | |
| GLP2R | Glucagon like peptide 2 receptor | 5,95E-09 | 9,69E-06 | 1,75 | |
| HOXD1 | Homeobox D1 | 3,14E-09 | 6,32E-06 | 1,71 | |
| AKR1C3 | Aldo-keto reductase family 1 member C3 | 7,07E-07 | 2,56E-04 | 1,67 | |
| GPAT3 | Glycerol-3-phosphate acyltransferase 3 | 1,15E-07 | 7,59E-05 | 1,65 | |
| JUN | Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit | 1,13E-06 | 3,84E-04 | 1,64 | |
| PLAU | Plasminogen activator, urokinase | 1,88E-12 | 3,84E-08 | 1,59 | |
| NMRAL2P | Nmra like redox sensor 2, pseudogene | 3,89E-10 | 1,42E-06 | 1,57 | |
| LINC02313 | Long intergenic non-protein coding RNA 2313 | 1,65E-08 | 1,85E-05 | 1,57 | |
| AL049839,2,1 | Coiled-coil domain containing 59 (CCDS59) pseudogene | 2,05E-07 | 1,13E-04 | 1,57 | |
| AREG | Amphiregulin | 3,89E-04 | 3,51E-02 | 1,57 | |
| SPP1 | Secreted phosphoprotein 1 | 6,57E-05 | 8,73E-03 | 1,5 | |

| | | | | |
|--------------------|---|----------|----------|------|
| GADD45B | Growth arrest and DNA damage inducible beta | 5,31E-07 | 2,10E-04 | 1,48 |
| TUBB6 | Tubulin beta 6 class V | 4,47E-06 | 1,11E-03 | 1,45 |
| FOS | Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit | 1,45E-07 | 8,88E-05 | 1,44 |
| CLDN4 | Claudin 4 | 4,60E-07 | 1,94E-04 | 1,41 |
| PIM1 | Pim-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase | 1,63E-08 | 1,85E-05 | 1,4 |
| SAT1 | Spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1 | 2,50E-05 | 4,17E-03 | 1,36 |
| FAM167B | Family with sequence similarity 167 member B | 2,58E-10 | 1,36E-06 | 1,35 |
| TRIB1 | Tribbles pseudokinase 1 | 1,62E-07 | 9,56E-05 | 1,32 |
| RHOQ | Ras homolog family member Q | 5,37E-06 | 1,26E-03 | 1,27 |
| IQCJ-SCHIP1 | Schwannomin interacting protein 1 | 3,60E-05 | 5,59E-03 | 1,26 |
| SFN | Stratifin | 8,93E-08 | 6,20E-05 | 1,24 |
| ARG2 | Arginase 2 | 4,42E-07 | 1,91E-04 | 1,24 |
| IER3 | Immediate early response 3 | 1,64E-04 | 1,80E-02 | 1,24 |
| GABARAPL1 | GABA type A receptor associated protein like 1 | 2,66E-08 | 2,63E-05 | 1,23 |
| MKLN1 | Muskelin 1 | 6,32E-08 | 4,79E-05 | 1,21 |
| ABCC2 | ATP binding cassette subfamily C member 2 | 3,50E-07 | 1,63E-04 | 1,21 |
| CEBPB | CCAAT/enhancer binding protein beta | 5,66E-07 | 2,20E-04 | 1,2 |
| MRPS6 | Mitochondrial ribosomal protein S6 | 1,18E-08 | 1,68E-05 | 1,19 |
| IER5 | Immediate early response 5 | 9,03E-07 | 3,17E-04 | 1,18 |
| TEX19 | Testis expressed 19 | 1,07E-09 | 2,85E-06 | 1,17 |

Down

| | | | | |
|---------------------|--|----------|----------|-------|
| FGB | Fibrinogen beta chain | 2,28E-06 | 6,38E-04 | -1,65 |
| GLUD2 | Glutamate dehydrogenase 2 | 1,20E-07 | 7,84E-05 | -1,6 |
| AC021074,3,1 | Novel transcript | 4,72E-09 | 8,10E-06 | -1,56 |
| GLUD2,1 | Glutamate dehydrogenase 2 | 1,30E-06 | 4,28E-04 | -1,53 |
| GLUD2,2 | Glutamate dehydrogenase 2 | 2,32E-05 | 3,89E-03 | -1,4 |
| AC021074,3 | Uncharacterized LOC100507389 | 4,06E-09 | 7,90E-06 | -1,34 |
| AKR1D1 | Aldo-keto reductase family 1 member D1 | 1,39E-07 | 8,65E-05 | -1,14 |
| DKK1 | Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1 | 1,12E-05 | 2,26E-03 | -1,1 |
| DHRS2 | Dehydrogenase/reductase 2 | 4,70E-06 | 1,15E-03 | -1,08 |
| CCDC170 | Coiled-coil domain containing 170 | 3,70E-08 | 3,34E-05 | -1,04 |
| MAP2K6 | Mitogen-activated protein kinase kinase 6 | 5,22E-07 | 2,10E-04 | -1,03 |
| LEAP2 | Liver enriched antimicrobial peptide 2 | 7,46E-08 | 5,37E-05 | -1 |

6.7 Análise dos perfis de expressão gênica por clusterização hierárquica

Para analisar as diferenças entre os perfis de expressão gênica, realizamos uma clusterização hierárquica entre os tratamentos; *heatmaps* foram construídos tanto para a análise de todos os genes (Figura 19) quanto para a análise somente de DEGs (Figura 20). A análise de clusterização de todos os genes foi executada para verificarmos se o perfil de expressão permanece o mesmo, reforçaria os mecanismos moleculares já observados e contribuiria para a análise de outros genes que, mesmo não sendo DEGs no presente estudo poderiam ser tão importantes quanto os DEGs encontrados.

O algoritmo de clusterização hierárquica agrupou os dados de acordo com a similaridade de *Log Fold-Change* (LFC) dos genes (*cluster* lateral) e entre os tratamentos (*cluster* superior) (Figuras 19 e 20). Os valores de LFC foram representados pela intensidade das cores verde e vermelha para os genes regulados negativa e positivamente pelo ALA, respectivamente. A configuração do *cluster* lateral resultou no agrupamento do *cluster* superior no qual verificamos o nível de similaridade do perfil de expressão gênica entre os tratamentos.

Na análise de todos os genes, o primeiro agrupamento (esquerda), foi composto pelos tratamentos de 2 h e 24 h, com 2.5 mM, e o segundo agrupamento (direita), pelos tratamentos de 24 h e 2 h com 25 mM. Particularmente, o nível de similaridade de LFC entre os genes foi maior para o agrupamento com 25 mM do que para o agrupamento com 2.5 mM, como verificado pela distância euclidiana das barras do dendograma. Já para a análise dos DEGs, o primeiro agrupamento (esquerda), foi composto pelos tratamentos de 24 h e 2 h, com 25 mM, e o segundo agrupamento (direita), pelos tratamentos de 2 h e 24 h com 2.5 mM. O maior nível de similaridade de LFC entre os grupamentos foi novamente observado para o agrupamento de 25 mM.

Em ambos os *heatmaps*, o perfil de expressão gênica do tratamento de 2 h com 2.5 mM teve maior similaridade com o tratamento de 24 h com 2.5 mM, assim como o tratamento por 2 h com 25 mM foi mais semelhante ao tratamento de 24 h com 25 mM. Deste modo, a realização de uma análise de co-expressão poderia ser utilizada para caracterizar o padrão de correlação entre os genes que estariam associados às desordens ocasionadas por ALA.

A partir da análise de clusterização, notamos que houve uma diferença mais acentuada no perfil de expressão gênica entre os tratamentos com 2.5 mM e 25 mM e, que pelo menos parcialmente, os genes regulados positiva e negativamente na concentração de 2.5 mM foram regulados negativa e positivamente na concentração de 25 mM, respectivamente e vice-versa, indicando que mecanismos celulares e sinalizações distintas podem ser modulados de acordo com a concentração de ALA.

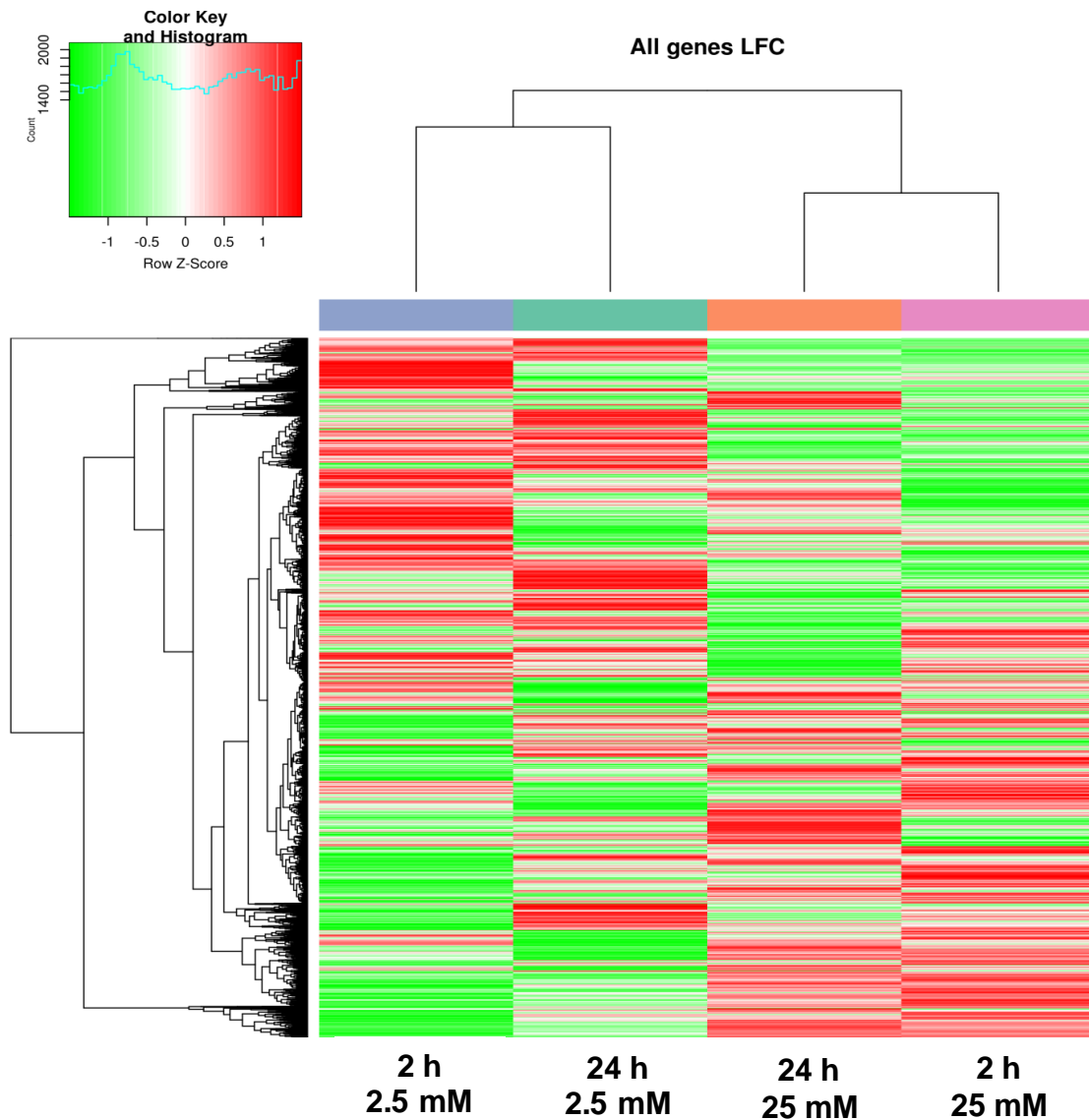


Figura 19 - Heatmap da análise de agrupamento hierárquico para todos os genes. Os valores de expressão foram representados por cores que variam de acordo com o *Log Fold-Change* (LFC) dos genes em cada tratamento: a cor verde representa os genes regulados negativamente e a cor vermelha, os regulados positivamente por ALA. A barra de cor representa a relação entre os LFC e as cores empregadas para a análise.

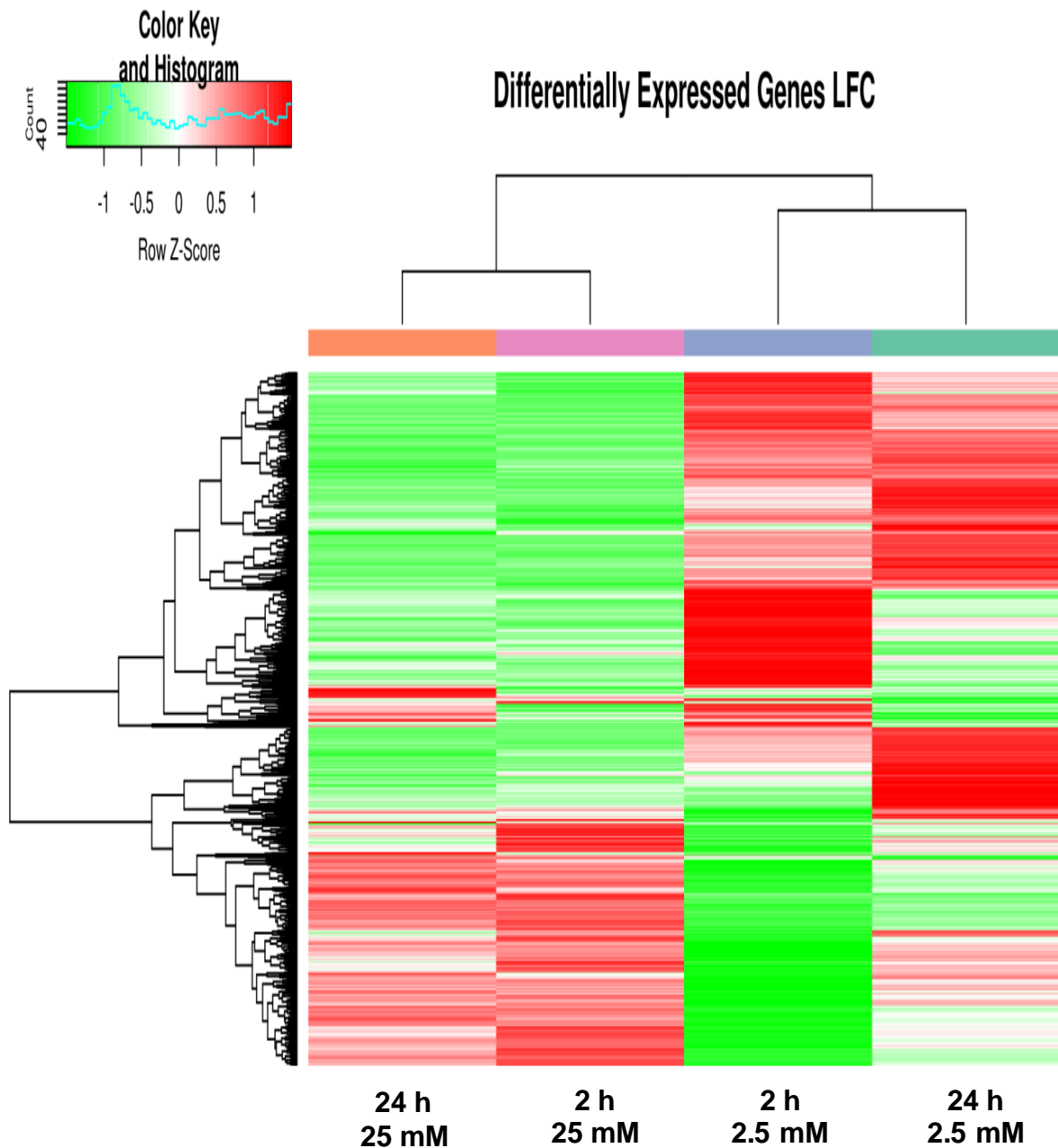


Figura 20 - Heatmap da análise de agrupamento hierárquico para os DEGs. Os valores de expressão foram representados por cores que variam de acordo com o *Log Fold-Change* (LFC) dos DEGs em cada tratamento: a cor verde representa os DEGs regulados negativamente e a cor vermelha, os DEGs regulados positivamente por ALA. A barra de cor representa a relação entre os valores de LFC e as cores empregadas para a análise.

6.8 Interpolação de genes diferencialmente expressos

Para verificar a existência de relações entre o conjunto de DEGs de cada tratamento, construímos o diagrama de Venn (Figura 21). O diagrama apontou as

seguintes sobreposições entre os tratamentos: na concentração de 2.5 mM, 232 DEGs estavam presentes nos tempos de 2 h e 24 h. Ambos os tempos compartilharam 6 DEGs na concentração de 25 mM. Considerando o período de tratamento, estavam presentes 5 DEGs no tempo de 2 h e 10 DEGs no período de 24 h. Já na sobreposição entre todas as configurações experimentais, observamos 2 DEGs presentes em todas as amostras.

Verificamos que GDF15 e AKR1B10, ambos regulados positivamente, foram os DEGs presentes em todos os tratamentos. Já os DEGs ABCC2, AKR1D1, GLUD2.1, GDF15, AREG, AKR1B10, CLDN4, FST, IGFBP1 e GLUD2 foram presentes em ambos os tratamentos de 24 h. Para os tratamentos de 2 h, encontramos os DEGs GDF15, HMOX1, AKR1B10, ATF3 e NMRAL2P. Vários DEGs foram compartilhados entre os tratamentos com 2.5 mM entre eles ZNF763, DBIL5P2, AC139099,2, KCNT1, SUZ12P1, MROH7, RBM6, VEGF, LSP1, CLCN6, REC8, ANKRD13D, EHBP1, KI2,2 e TRAPPC10. Já nos tratamentos com 25 mM, os DEGs GDF15, HMOX1, AKR1B10, ATF3, NMRAL2P e JUN foram presentes em ambos os tempos.

Além das sobreposições descritas, observamos que vários DEGs foram presentes em um único tratamento: 632 DEGs no tratamento de 2 h com 2.5 mM, 237 DEGs no tratamento de 24 h com 2.5 mM, 28 DEGs no tratamento de 24 h com 25 mM e 4 DEGs no tratamento de 2 h com 25 mM. O DEG FST foi presente somente nos tratamentos de 24 h e JUN, somente nos tratamentos com 25 mM. Já 223 DEGs foram presentes somente no tratamento com 2.5 mM, entre eles KCNT1, SUZ12P1, MROH7, RBM6 e DBIL5P2. Para os tratamentos de 2 h de ambas as concentrações, não houve DEGs exclusivos. Os DEGs expressos somente em um tratamento poderiam ser atuantes em processos exclusivos induzidos somente na condição correspondente.

No tratamento com 2 h com 2.5 mM, os DEGs KLHDC7B, sua isoforma KLHDC7B.1, MANF, CCL20, DNAJB9 e AREG.1 foram regulados positivamente e, MT1F, PEG10, KLB, ABCC6P1.1 e FSCN, regulados negativamente. No tratamento de 2 h com 25 mM, os DEGs LINC01909, MAP3K8, MBNL2 e GADD45A foram regulados positivamente. Não houve DEGs negativamente regulados para este tratamento. No tratamento de 24 h com 2.5 mM, os DEGs RMRP, MALAT1, COL27A1,1, MT-CO-2 e MT-ATP6 foram regulados positivamente e MAL2,1,

RPL15P20, RAP1A, AOC3 e ARPC3P5, negativamente regulados. Para o tratamento de 24 h com 25 mM, PLAU, BTBD16, FAM167B, CARD6 e TEX19 foram positivamente regulados e FGB e DHRS2, negativamente regulados. Selecionamos os 10 DEGs com os maiores e menores LogFC sobrepostos entre os tratamentos e os 10 DEGs com os maiores e menores LogFC exclusivos de cada tratamento para representarmos em tabelas (Tabela 6 e 7).

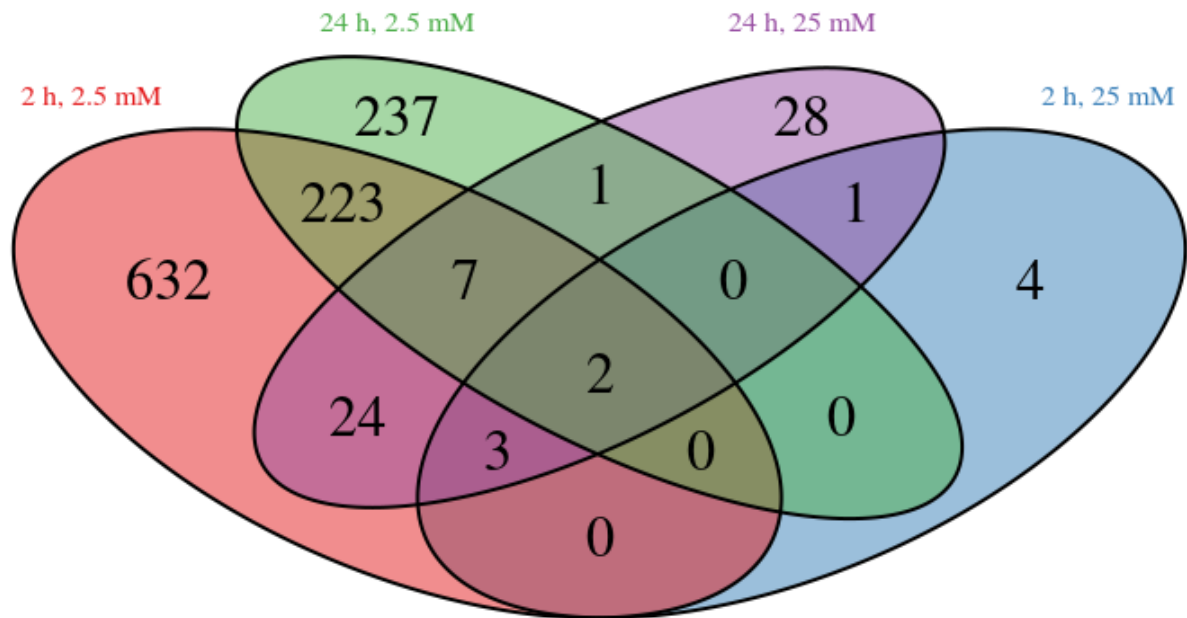


Figura 21 - Diagrama de Venn. Intersecções dos conjuntos de DEGS em cada tratamento com ALA (2.5 mM e 25 mM em 2h e 24h).

Tabela 6 - Sobreposições de DEGs entre os tratamentos e suas funções.

| Tratamentos | Gene | Descrição | Função |
|--------------------|----------------|---|--|
| | Up | | |
| | GDF15 | Growth differentiation factor 15 | Ligante da família de receptores TGF- β |
| | AKR1B10 | Aldo-keto reductase family 1 member B10 | Redução de aldeídos aromáticos e alifáticos |
| 2 h | | | |
| | Up | | |
| | GDF15 | Growth differentiation factor 15 | Ligante da família de receptores TGF- β |
| | HMOX1 | Heme oxygenase 1 | Catabolismo do heme |
| | AKR1B10 | Aldo-keto reductase family 1 member B10 | Redução de aldeídos aromáticos e alifáticos |
| | ATF3 | Activating transcription factor 3 | Resposta ao estresse celular |
| | NMRAL2P | Nmra like redox sensor 2, pseudogene | Pseudogene |
| 24 h | | | |
| | Up | | |
| | ABCC2 | ATP binding cassette subfamily C member 2 | Transporte de várias moléculas através de membranas intra e extracelulares |
| | AKR1D1 | Aldo-keto reductase family 1 member D1 | Catálise da redução 5-beta dos intermediários dos ácidos biliares e dos hormônios esteróides |
| | GLUD2,1 | Glutamate dehydrogenase 2 | Reciclagem de glutamato durante a neurotransmissão |
| | GDF15 | Growth differentiation factor 15 | Ligante da família de receptores TGF- β |

| | | | |
|---------------|-------------------|---|---|
| | AREG | Amphiregulin | Promoção do crescimento de células epiteliais |
| | AKR1B10 | Aldo-keto reductase family 1 member B10 | Redução de aldeídos aromáticos e alifáticos |
| | CLDN4 | Claudin 4 | Regulação do movimento de solutos e íons |
| | Down | | |
| | FST | Follistatin | Inibição do lançamento de hormônio folículo estimulante |
| | IGFBP1 | Insulin like growth factor binding protein 1 | Ligante e prolongador da meia-vida dos fatores de crescimento IGFs. |
| | GLUD2 | Glutamate dehydrogenase 2 | Reciclagem de glutamato durante a neurotransmissão |
| 2.5 mM | Up | | |
| | ZNF763 | Zinc finger protein 763 | Pode estar envolvido na regulação da transcrição |
| | ZNF763,1 | Zinc finger protein 763 | Pode estar envolvido na regulação da transcrição |
| | AC139099,2 | Novel transcript | Afiliação à classe lncRNA |
| | KCNT1 | Potassium sodium-activated channel subfamily T member 1 | Regulação da liberação de neurotransmissores, frequência cardíaca, secreção de insulina, excitabilidade neuronal, transporte epitelial de eletrólitos, contração do músculo liso e volume celular |
| | SUZ12P1 | Suz12 pseudogene 1 | Pseudogene |

| | | |
|-----------------|--|--|
| MROH7 | Maestro heat like repeat family member 7 | Afilado à classe lncRNA |
| RBM6 | RNA binding motif protein 6 | Desempenha um papel na indução da parada do ciclo celular e apoptose através do splicing de pré-mRNA de múltiplos genes-alvo, incluindo a proteína supressora de tumor p53 |
| VEGFA | Vascular endothelial growth factor A | Indução de proliferação e migração de células de células endoteliais vasculares |
| DBIL5P2 | Diazepam binding inhibitor-like 5 pseudogene 2 | Pseudogene |
| LSP1 | Lymphocyte-specific protein 1 | Regulação da motilidade de neutrófilose, adesão às proteínas da matriz de fibrinogênio e migração transendotelial |
| Down | | |
| ANKRD13D | Ankyrin repeat domain 13D | Internalização de proteínas constituídas por cadeias de ubiquitina ligadas à Lys-63 |
| EHBP1 | EH domain binding protein 1 | Tráfego endocítico |
| KIZ,2 | Kizuna centrosomal protein | Atua no fortalecimento e estabilização da região pericentriolar antes da formação do fuso |
| TRAPPC10 | Trafficking protein particle complex 10 | Transporte vesicular do retículo endoplasmático para o Golgi |
| SRSF11,1 | Serine and arginine rich splicing factor 11 | Pode desempenhar um papel no processamento pré-mRNA |

| | | | |
|--------------|----------------|---|---|
| | CEBPZOS | CEBPZ opposite strand | Interage com e é fosforilada pela quinase polo-1 e atua na manutenção da organização dos microtúbulos e na morfologia celular |
| | ID2 | Inhibitor of DNA binding 2 | Regulação negativa da diferenciação celular |
| | SREK1 | Splicing regulatory glutamic acid and lysine rich protein 1 | Modulação do sítio de splicing. |
| | CEP170B | Centrosomal protein 170B | |
| | MAMDC4 | MAM domain containing 4 | Envolvido na triagem e transporte seletivo de receptores e ligantes através dos epitélios polarizados |
| 25 mM | Up | | |
| | NMRAL2P | Nmra like redox sensor 2, pseudogene | Pseudogene |
| | ATF3 | Activating transcription factor 3 | Envolvida em um complexo processo de resposta ao estresse celular |
| | GDF15 | Growth differentiation factor 15 | Ligante da família de receptores TGF- β |
| | HMOX1 | Heme oxygenase 1 | Catabolismo do heme |
| | AKR1B10 | Aldo-keto reductase family 1 member B10 | Redução de aldeídos aromáticos e alifáticos |
| | JUN | Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit | Regulação da expressão gênica |

Tabela 7 - Lista dos 10 DEGs exclusivos regulados positiva e negativamente expressos em cada tratamento e suas respectivas funções.

| Tratamento | Gene | Descrição | Função |
|--------------------|------------------------------------|--|---|
| 2 h, 2.5 mM | Up | | |
| | KLHDC7B | Kelch domain containing 7B | Regulador da osteoclastogênese |
| | KLHDC7B,1 | Kelch domain containing 7B | Regulador da osteoclastogênese |
| | MANF | Mesencephalic astrocyte derived neurotrophic factor | Promoção da sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos |
| | CCL20 | C-C motif chemokine ligand 20 | Inibição da atividade quimiotática para linfócitos e repressão a proliferação de progenitores mielóides |
| | DNAJB9 | Dnaj heat shock protein family (Hsp40) member B9 | Induzido pelo estresse do retículo endoplasmático e desempenha um papel na proteção das células estressadas da apoptose |
| | AREG,1 | Amphiregulin | Interage com o receptor EGF / TGF-alfa para promover o crescimento de células epiteliais normais e inibe o crescimento de certas linhas celulares agressivas de carcinoma |
| | HERPUD1 | Homocysteine inducible ER protein with ubiquitin like domain 1 | Proteína induzida pela resposta e sistema de degradação de proteínas associado à resposta da proteína mal enovelada |
| SLC22A15 | Solute carrier family 22 member 15 | Transporte de vários compostos importantes em | |

| | | |
|------------------|--|--|
| | | termos médicos e fisiológicos, incluindo produtos farmacêuticos, toxinas, hormônios, neurotransmissores e metabólitos celulares |
| LDLR | Low density lipoprotein receptor | Liga o LDL, a principal lipoproteína do plasma, transportadora de colesterol, e o transporta para as células por endocitose |
| HSP90B1 | Heat shock protein 90 beta family member 1 | Desempenha função na estabilização e dobragem de outras proteínas |
| Down | | |
| MT1F | Metallothionein 1F | Proteção contra toxicidade de íons de metais pesados |
| PEG10 | Paternally expressed 10 | |
| KLB | Klotho beta | Contribui para a repressão transcricional da colesterol 7-alfa-hidroxilase (CYP7A1), a enzima limitadora da taxa na síntese de ácidos biliares |
| ABCC6P1,1 | ATP binding cassette subfamily C member 6 pseudogene 1 | Pseudogene |
| FSCN1 | Fascin actin-bundling protein 1 | Desempenha função crítica na migração celular, motilidade, adesão e interações celulares |
| MT1M | Metallothionein 1M | Proteção contra toxicidade de íons de metais pesados |

| | | | |
|---------------------|------------------|--|--|
| | ABCC6P1 | ATP binding cassette subfamily C member 6 pseudogene 1 | Pseudogene |
| | SPTLC3 | Serine palmitoyltransferase long chain base subunit 3 | Metabolism de lauroil e miristoil-CoA e geração de bases C14 e C16-esfingóides |
| | MT1B | Metallothionein 1B | Proteção contra toxicidade de íons de metais pesados |
| | MT1L | Metallothionein 1L, pseudogene | Pseudogene |
| 2 h, 25 mM | Up | | |
| | LINC01909 | Long intergenic non-protein coding RNA 1909 | RNA não codificante |
| | MAP3K8 | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8 | Ativação de I κ B quinases e, assim, induzir a produção nuclear de NF- κ B / promoção da produção de TNF- α e IL-2 durante a ativação de linfócitos T |
| | MBNL2 | Muscleblind like splicing regulator 2 | Modulação de splicing alternativo de pré-mRNAs |
| | GADD45A | Growth arrest and DNA damage inducible alpha | Respostas a estresses ambientais mediando a ativação da via p38 / JNK via MTK1 / MEKK4 quinase |
| 24 h, 2.5 mM | Up | | |
| | RMRP | RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease | Clivagem de RNA mitocondrial em um local primário da replicação do DNA mitocondrial |
| | MALAT1,2 | Metastasis associated lung adenocarcinoma | Regulador da transcrição para vários genes, incluindo |

| | | |
|------------------|--|--|
| | transcript 1 (non-protein coding) | alguns genes envolvidos na metástase do câncer e na migração celular, e está envolvido na regulação do ciclo celular |
| COL27A1,1 | Collagen type XXVII alpha 1 chain | Desempenha um papel durante a calcificação da cartilagem e a transição da cartilagem para o osso |
| MT-CO2 | Cytochrome c oxidase subunit II | Componente da cadeia respiratória que catalisa a redução de oxigênio na água |
| MT-ATP6 | ATP synthase F0 subunit 6 | Produção de ATP a partir do ADP |
| MT-CO3 | Cytochrome c oxidase III | Componente da cadeia respiratória que catalisa a redução de oxigênio na água |
| ANKRD36,3 | Ankyrin repeat domain 36 | Atividade inibidora de canal iônico |
| LPIN3 | Lipin 3 | Catálise da desfosforilação do ácido fosfatídico para produzir diacilglicerol, que é o precursor dos triglicerídeos e dos fosfolípidios |
| ANKRD36,4 | Ankyrin repeat domain 36 | Atividade inibidora de canal iônico |
| AHSA2P | Activator Of HSP90 atpase Homolog 2 | Pseudogene |
| Down | | |
| MAL2,1 | Mal, T-cell differentiation protein 2 (gene/pseudogene) | Necessário para a transcitose, uma via de transporte intracelular usada para fornecer proteínas ligadas à membrana e cargas exógenas da superfície basolateral à superfície apical |

| | | |
|--------------------|--|--|
| RPL15P20 | Ribosomal protein L15 pseudogene 20 | Pseudogene |
| RAP1A | RAP1A, member of RAS oncogene family | Regula as vias de sinalização que afetam a proliferação e adesão celular e pode desempenhar um papel na malignidade tumoral |
| AOC3 | Amine oxidase, copper containing 3 | Catálise da conversão oxidativa de aminas em aldeídos na presença de cofator de cobre e quinona |
| ARPC3P5 | Actin related protein 2/3 complex subunit 3 pseudogene 5 | Pseudogene |
| FAM117B | Family with sequence similarity 117 member B | Função desconhecida |
| KHDRBS3 | KH RNA binding domain containing, signal transduction associated 3 | Desempenha um papel na regulação da emenda alternativa e influencia a seleção do local de emenda do mRNA e a inclusão do exon |
| RRAGA | Ras related GTP binding A | Desempenha um papel crucial na resposta celular à disponibilidade de aminoácidos através da regulação da cascata de sinalização mTORC1 |
| PSMF1 | Proteasome inhibitor subunit 1 | Clivagem peptídeos em um processo dependente de ATP/ubiquitina |
| NACA2 | Nascent polypeptide associated complex alpha subunit 2 | Evita direcionamento inadequado de polipeptídeos não secretores para o retículo endoplasmático |
| 24 h, 25 mM | Up | |
| | PLAU | Conversão de plasminogênio a plasmina |

| | | |
|------------------|--|---|
| BTBD16 | BTB domain containing 16 | Mediação de interação proteína-proteína |
| FAM167B | Family with sequence similarity 167 member B | Função desconhecida |
| CARD6 | Caspase recruitment domain family member 6 | Modulação de vias de transdução de sinais que convergem para a ativação de NF-kB |
| TEX19 | Testis expressed 19 | Necessário durante a espermatogênese e durante o desenvolvimento da placenta |
| HOXD1 | Homeobox D1 | Diferenciação e desenvolvimento de membros |
| GLP2R | Glucagon like peptide 2 receptor | Receptor acoplado à proteína G que se liga ao peptídeo 2 do tipo glucagon |
| MRPS6 | Mitochondrial ribosomal protein S6 | Biossíntese de proteínas mitocondriais |
| LINC01173 | Long intergenic non-protein coding RNA 1173 | RNA não codificante |
| LINC02313 | Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 2313 | RNA não codificante |
| Down | | |
| FGB | Fibrinogen beta chain | Regulação da adesão e disseminação celular |
| DHRS2 | Dehydrogenase/reductase 2 | Metabolismo de vários compostos diferentes, como hormônios esteróides, prostaglandinas, retinóides, lipídios e xenobióticos |

6.9 Análise de enriquecimento de vias e processos biológicos

Para a análise de enriquecimento de vias e processos biológicos, utilizamos genes presentes no KEGG, Reactome e Gene Ontology (GO) como o conjunto universo. Esta escolha foi motivada por duas razões: 1) a análise limitada de expressão gênica inerente à técnica de microarray e 2) a presença de um número maior de genes nos bancos de dados quando comparados aos presentes na lâmina. A técnica de *microarray* impõe uma limitação no ensaio de expressão gênica devido à análise exclusiva de sondas presentes na lâmina. Assim, optamos pela utilização do conjunto universo dos bancos de dados com o intuito de ampliar a análise de enriquecimento.

Utilizamos os três bancos de dados uma vez que a forma de alimentação e composição difere entre eles, resultando em enriquecimentos distintos. O KEGG fornece o enriquecimento de vias metabólicas, no Gene Ontology o enriquecimento de DEGs ocorre de acordo com processos biológicos, funções moleculares e componentes moleculares e no Reactome, de acordo com as funções de genes em sistemas biológicos. As vias e os processos idênticos, evidenciados por bancos diferentes, poderiam reforçar os mecanismos implicados na ação de ALA. Além disso, levamos em consideração a descrição detalhada das vias de sinalização e dos processos biológicos de cada banco de dados.

A análise dos 1437 DEGs (2 h 2.5 mM= 891; 2 h 25 mM= 10; 24 h 2.5 mM= 470; 24 h 25 mM= 66) resultou em 10 vias de sinalização enriquecidas pelo KEGG, 12 funções moleculares, 5 componentes celulares e 53 processos enriquecidos pelo Gene Ontology e 36 vias de sinalização pelo Reactome. As análises foram representadas por gráficos de ponto (Figuras 22 a 26) e suas respectivas tabelas (Tabelas 8 a 12).

6.9.1 Processos enriquecidos no tratamento de 2 h com 2.5 mM

No tratamento com 2.5 mM de ALA, as principais vias enriquecidas foram associadas à função mitocondrial. Vários genes codificantes para proteínas presentes na membrana mitocondrial interna e atuantes no transporte de elétrons nos complexos respiratórios I e III foram negativamente regulados (NDUFB3;

NDUFB10; NDUFS5; NDUFB4; NDUFS6; NDUFAF3; NDUFA1). Vias como “metabolismo de frutose e manose” foram verificadas pelo KEGG e “transporte de elétrons na cadeia respiratória”, “ciclo do ácido cítrico e cadeia de transporte de elétrons” pelo Reactome. Consistentemente, “cadeia de transporte de elétrons respiratória”, “transporte de elétrons acoplado à síntese de ATP mitocondrial”, “transporte de elétrons mitocondrial, NADH para ubiquinona”, “montagem do complexo I da cadeia de transporte de elétrons”, “biogênese do complexo I da cadeia de transporte de elétrons” e “montagem do complexo NADH desidrogenase” foram enriquecidos pelo GO em processos moleculares, “complexo I da cadeia respiratória mitocondrial” em componentes celulares e atividades de oxirredução como “atividade (quinona) de NADH desidrogenase” e “atividade (ubiquinona) de NADH desidrogenase”, em funções moleculares.

Outros grandes termos enriquecidos com 2.5 mM foram associados ao retículo endoplasmático (RE) como a resposta à proteína mal enovelada (UPR: Unfolded Protein Response). A UPR é uma maquinaria ativada pelo acúmulo de proteínas danificadas seguida de estresse no RE. No KEGG, foram reportadas vias como “processamento de proteínas no retículo endoplasmático”. No Reactome, houve enriquecimento da via “resposta à proteína mal enovelada” e vias mais específicas como “XBP1S ativa genes chaperona” e “IRE1 α ativa chaperonas”. Já em processos biológicos pelo GO, “resposta de estresse ao retículo endoplasmático” e “resposta da proteína desdobrada mediada por IRE1” foram observadas.

Vias de sinalização associadas a íons metálicos como “metaloioneínas ligantes de metais” e “resposta a íons metálicos” foram enriquecidas pelo Reactome pela diminuição da expressão dos genes codificantes para metaloioneínas MT1F, MT1M, MTH1, MT1B e MT2A. Consistente com esses achados, processos biológicos do GO como “resposta ao íon zinco”, “resposta ao íon cobre”, “resposta celulares ao íon zinco” e “homeostase celular do íon zinco” foram reportadas. No banco de dados KEGG, respostas a íons metálicos não foram enriquecidas.

5.4.9.6 Processos enriquecidos no tratamento de 2 h com 25 mM

No tratamento com 25 mM, poucos processos foram observados. A “via de sinalização MAPK” foi enriquecida pelo KEGG, através dos genes MAP3K8,

GADD45A e JUN e as vias “atividade de heterodimerização de proteína”, em funções moleculares, e “regulação do ciclo celular” em processos biológicos do GO.

5.4.9.7 Processos enriquecidos no tratamento de 24 h com 2.5 mM

Os processos biológicos associados à função mitocondrial descritos no tratamento de 2 h foram novamente enriquecidos pelo GO em 2.5 mM por 24 h através dos termos “cadeia respiratória de transporte de elétrons” e “transporte de elétrons acoplado à síntese de ATP mitocondrial” Além disso, processos relacionados à “regulação de diferenciação de megacariócito” e “regulação de diferenciação celular mielóide” também foram observados. Nos demais bancos de dados, não houve enriquecimento neste tratamento.

5.4.9.8 Processos enriquecidos no tratamento de 24 h com 25 mM

A mobilização do sistema imune, mediada pela sinalização de citocinas e receptores tipo Toll (TLR: Toll-like Receptors), foi verificada no tratamento com 25 mM. No banco de dados Reactome, os genes FOS, JUN e MAP2K6 enriqueceram as vias “cascatas de sinalização ao receptor tipo Toll” desencadeada pelos receptores TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, TLR9 e TLR10, “ativação de MAPK em cascata TLR”, cascata “MyD88 iniciada na membrana plasmática”, “cascata dependente de MyD88 no endossomo”, “cascata TLR3 e TLR4 independente de MyD88” e “indução mediada por TRAF6 de NF- κ B e MAPK sobre TLR7/8 ou TLR9”. Essa análise corroborou com o resultado observado pelo KEGG através do enriquecimento da “via de sinalização do receptor tipo Toll” consistentemente através de FOS, JUN, MAP2K6 e SPP1. Outra via enriquecida pelo KEGG foi a “via de sinalização TNF” por genes FOS, JUN, MAP2K6 e CEBPB. No GO, sinalização do sistema imune foi observada pelo processo biológico correspondente à “via de sinalização mediada por IL-1” e “resposta celular ao estímulo de TNF- β ”.

Processos relacionados à atividade metabólica hepática foram enriquecidos pelos constituintes da família aldo-ceto redutases (AKR: aldo-keto reductases) responsáveis pela transformação e detoxificação de aldeídos e cetonas e

metabolismo de prostaglandinas e hormônios esteróides. No Reactome, vias como “metabolismo e transporte de retinóide”, “fototransdução visual”, “metabolismo de vitaminas solúveis” e “metabolismo de vitaminas e cofatores” foram enriquecidas pelos genes AKR1B10, AKR1C1, AKR1C4 e AKR1C3. Outras vias verificadas foram “síntese de ácidos e sais biliares”, particularmente via 24-, 25- e 7 α -hidroxicolesterol, e “metabolismo dos ácidos e sais biliares” enriquecidas por AKR1C1, AKR1C4, AKR1D1 e AKR1C3. De acordo com a análise do KEGG, estes mesmos genes enriqueceram a via “biossíntese de hormônios esteróides”. Corroborando com esses resultados, “processos de biossíntese de esteróides”, “resposta a estímulo hormonal” e “processos metabólicos de ácido biliar, de andrógeno, de retinóide, de prostaglandinas, de prostanóide, de progesterona e de hormônio esteróide C-21” foram enriquecidos pelo GO.

Vias de sinalização associadas à “senescência”, “senescência associada ao fenótipo secretor” e “senescência induzida por estresse oxidativo” foram enriquecidas pelos genes FOS, JUN, CEBPB e/ou MAP2K6, no Reactome. Além disso, vias de morte celular foram verificadas em processos biológicos pelo GO como “regulação de morte neuronal” e “regulação de morte celular”.

Particularmente, o KEGG enriqueceu vias não verificadas nos demais bancos como as associadas à “aterosclerose”, “câncer colorretal”, “infecção por herpesvírus associada ao sarcoma de Kaposi”, “diferenciação de osteoclastos” e à “mitofagia”. Já o GO enriqueceu os processos “regulação de organização do citoesqueleto” e “desenvolvimento cutâneo” com 25 mM por 24 h.

5.4.9.9 Análise de enriquecimento pelo KEGG, Gene Ontology e Reactome

Após a análise de enriquecimento pelo KEGG, Reactome e Gene Ontology, verificamos que nossos dados tiveram sensibilidade moderada pelo enriquecimento de poucas vias e moderado poder estatístico utilizando FDR < 0,05 como critério de corte. Notamos várias similaridades entre os processos e vias de sinalização enriquecidas, ao compararmos os resultados dos três bancos de dados. Para sumarizar esta observação, categorizamos as vias e os processos biológicos semelhantes de acordo com os processos celulares envolvidos: “fosforilação oxidativa”, “resposta a íons metálicos”, “estresse no retículo endoplasmático”,

“metabolismo celular”, “sistema imunológico” e “ciclo celular/senescência/morte celular” conforme Tabelas 13 e 14.

O banco de dados do Gene Ontology “Processos Biológicos” foi o único que forneceu enriquecimento para todos os tratamentos. Deste modo, categorizamos os termos em classes e subclasses de acordo com a localização ou sinalização celular e os respectivos processos modulados, respectivamente, para demonstrar os processos biológicos estimulados pelo ALA, conforme Tabela 15.

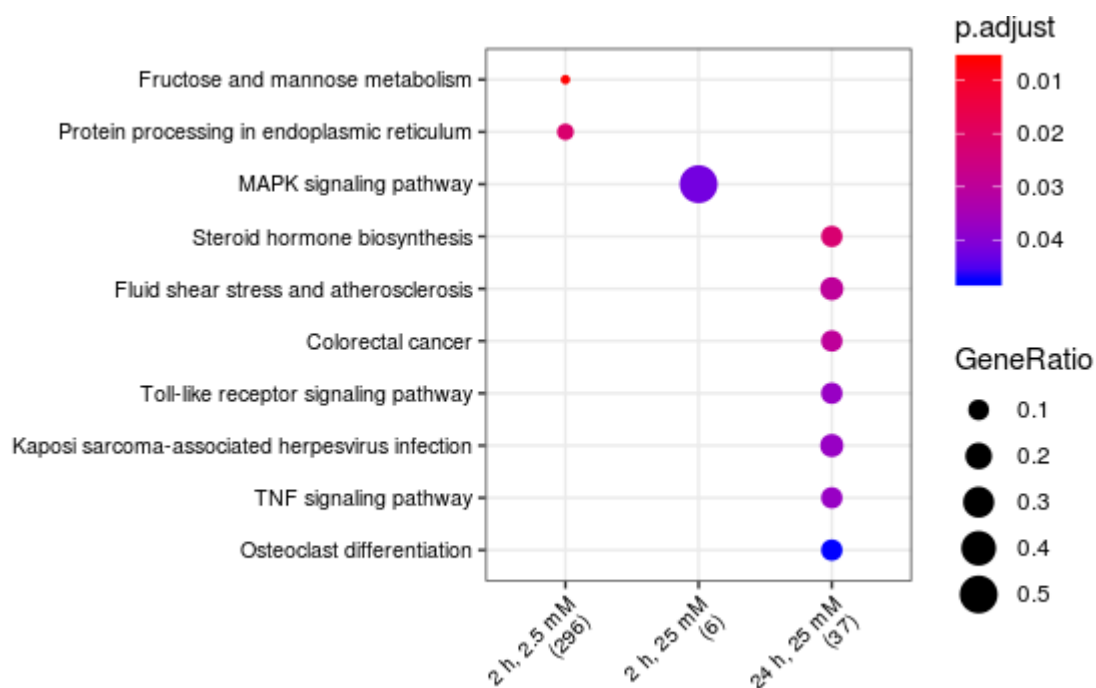


Figura 22 - Vias enriquecidas pelo banco de dados KEGG. GeneRatio reporta a razão do número de DEGs encontrados para cada termo enriquecido, dentro da lista de genes diferencialmente expressos de cada tratamento, que estão incluídos no banco de dados. Quanto maior a razão, maior o diâmetro dos círculos. A barra de cores indica o nível de significância do termo enriquecido pelo corte do FDR. O número abaixo do tratamento reporta o número de genes diferencialmente expressos utilizado para o cálculo de GeneRatio em cada condição experimental.

Tabela 8 - Vias de sinalização enriquecidas pelo KEGG. A coluna GeneRatio reporta a razão do número de DEGs encontrados para cada termo enriquecido, dentro da lista de genes diferencialmente expressos em cada tratamento, que estão incluídos no banco de dados; BgRatio representa a razão entre o número de genes presentes na via e o número total de genes presentes no banco de dados; FDR reporta o nível de significância do termo enriquecido e a coluna Genes descreve os DEGs responsáveis pelo enriquecimento de cada termo. As cores verde e vermelha representam os DEGs negativa e positivamente regulados pelo ALA, respectivamente.

| Tratamento | Descrição | GeneRatio | BgRatio | FDR | Genes | |
|-------------|---|-----------|----------|----------|---|------------------|
| 2 h, 2,5 mM | Fructose and mannose metabolism | 8/296 | 33/7802 | 6.34E+14 | HKDC1, AKR1B10, HK2, PFKFB4, PFKFB3 | KHK, TKFC, SORD, |
| 2 h, 2,5 mM | Protein processing in endoplasmic reticulum | 17/296 | 165/7802 | 2.19E+14 | HERPUD1, DNAJC3, HSP90B1, DNAJC10, DNAJB11, CALR, ATF6, RPN2, OS9, SSR4, EDEM1, RRBP1, STT3B, SEC61A1, CANX | RAD23B, EIF2AK4 |
| 2 h, 25 mM | MAPK signaling pathway | 03/06 | 295/7802 | 4.21E+14 | MAP3K8, GADD45A, JUN | |
| 24 h, 25 mM | Steroid hormone biosynthesis | 04/37 | 60/7802 | 2.24E+14 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | AKR1D1 |
| 24 h, 25 mM | Fluid shear stress and atherosclerosis | 05/37 | 139/7802 | 2.98E+13 | HMOX1, FOS, JUN, SQSTM1 | MAP2K6 |
| 24 h, 25 mM | Colorectal cancer | 04/37 | 86/7802 | 2.98E+13 | FOS, JUN, GADD45B, AREG | |
| 24 h, 25 mM | Toll-like receptor signaling pathway | 04/37 | 104/7802 | 3.74E+14 | FOS, JUN, SPP1 | MAP2K6 |
| 24 h, 25 mM | Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection | 05/37 | 186/7802 | 3.74E+14 | FOS, GABARAPL1, JUN, ZFP36 | MAP2K6 |
| 24 h, 25 mM | TNF signaling pathway | 04/37 | 110/7802 | 3.74E+14 | FOS, JUN, CEBPB | MAP2K6 |
| 24 h, 25 mM | Osteoclast differentiation | 04/37 | 127/7802 | 4.74E+13 | FOS, JUN, SQSTM1 | MAP2K6 |

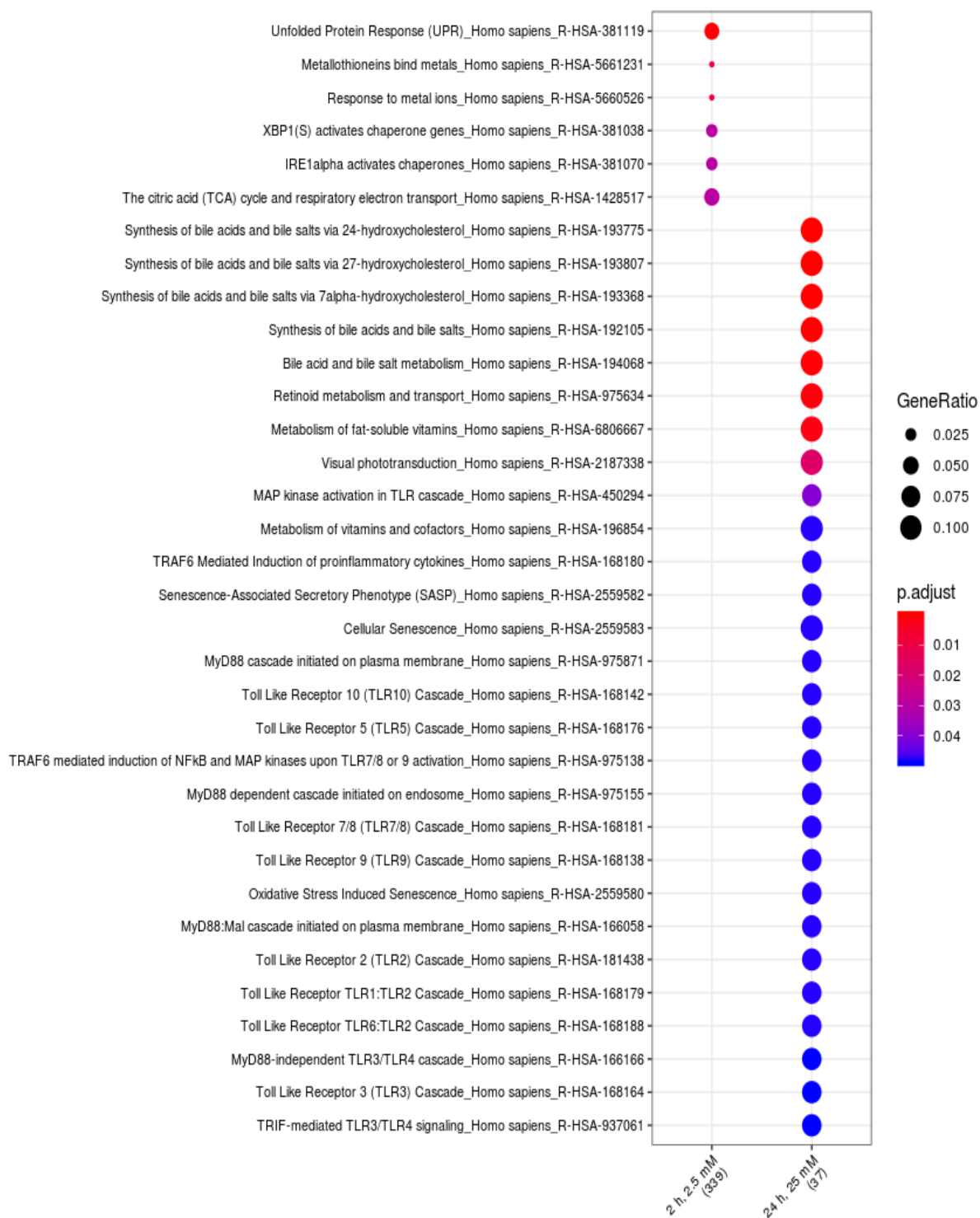


Figura 23 - Vias enriquecidas pelo banco de dados Reactome. GeneRatio reporta a razão do número de DEGs encontrados para cada termo enriquecido dentro, da lista de genes diferencialmente expressos de cada tratamento, que estão incluídos no banco de dados. Quanto maior a razão, maior o diâmetro dos círculos. A barra de cores indica o nível de significância do termo enriquecido pelo corte do FDR. O número abaixo do tratamento reporta o número de genes diferencialmente expressos utilizado para o cálculo de GeneRatio em cada condição experimental.

Tabela 9 - Vias de sinalização enriquecidas pelo Reactome. A coluna GeneRatio reporta a razão do número de DEGs encontrados para cada termo enriquecido, dentro da lista de genes diferencialmente expressos em cada tratamento, que estão incluídos no banco de dados; BgRatio representa a razão entre o número de genes presentes na via e o número total de genes presentes no banco de dados; FDR reporta o nível de significância do termo enriquecido e a coluna Genes descreve os DEGs responsáveis pelo enriquecimento de cada termo. As cores verde e vermelha representam os DEGs negativa e positivamente regulados pelo ALA, respectivamente.

| Tratamento | Descrição | GeneRatio | BgRatio | p. valor | FDR | Genes |
|-------------|---|-----------|---------|----------|----------|--|
| 2 h, 2.5 mM | Unfolded Protein Response (UPR)_Homo sapiens_R-HSA-381119 | 15/339 | 86/8973 | 6,36E+07 | 5,44E+14 | IGFBP1, HERPUD1, DNAJB9, DNAJC3, HSP90B1, ATF3, SRPRB, ARFGAP1, DNAJB11, CALR, ATF6, PDIA5, EDEM1, SEC61A1, ACADVL |
| 2 h, 2.5 mM | Metallothioneins bind metals_Homo sapiens_R-HSA-5661231 | 5/339 | 11/73 | 2,86E+09 | 8,15E+13 | MT1F, MT1M, MT1H, MT1B, MT2A |
| 2 h, 2.5 mM | Response to metal ions_Homo sapiens_R-HSA-5660526 | 5/339 | 11/73 | 2,86E+09 | 8,15E+13 | MT1F, MT1M, MT1H, MT1B, MT2A |
| 2 h, 2.5 mM | XBP1(S) activates chaperone genes_Homo sapiens_R-HSA-381038 | 9/339 | 53/8973 | 1,44E+11 | 2,97E+14 | DNAJB9, DNAJC3, SRPRB, ARFGAP1, DNAJB11, PDIA5, EDEM1, SEC61A1, ACADVL |
| 2 h, 2.5 mM | IRE1alpha activates chaperones_Homo sapiens_R-HSA-381070 | 9/339 | 55/8973 | 1,93E+14 | 2,97E+14 | DNAJB9, DNAJC3, SRPRB, ARFGAP1, DNAJB11, PDIA5, |

| | | | | | | | |
|--------------------|--|--------|----------|----------|----------|--|---|
| 2 h, 2.5 mM | The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport_Homo sapiens_R-HSA-1428517 | 16/339 | 153/8973 | 2,09E+12 | 2,97E+14 | EDEM1, SEC61A1, ACADVL SLC16A3, LDHAL6A, PDK1 | NDUFB3/UQCR10/ UQCRQ/NDUFB10/ NDUFS5/NDUFS6/ NDUFB4/SDHC/NDUFA1/TACO1/NDUFAF3/PDHA1/PDK2 |
| 24 h, 25 mM | Synthesis of bile acids and bile salts via 24-hydroxycholesterol_Homo sapiens_R-HSA-193775 | 4/37 | 14/8973 | 2,38E+05 | 3,46E+08 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | AKR1D1 |
| 24 h, 25 mM | Synthesis of bile acids and bile salts via 27-hydroxycholesterol_Homo sapiens_R-HSA-193807 | 4/37 | 15/8973 | 3,23E+07 | 3,46E+08 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | AKR1D1 |
| 24 h, 25 mM | Synthesis of bile acids and bile salts via 7alpha-hydroxycholesterol_Homo sapiens_R-HSA-193368 | 4/37 | 24/8973 | 2,45E+08 | 1,75E+14 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | AKR1D1 |
| 24 h, 25 mM | Synthesis of bile acids and bile salts_Homo sapiens_R-HSA-192105 | 4/37 | 27/8973 | 4,01E+08 | 2,15E+14 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | AKR1D1 |
| 24 h, 25 mM | Bile acid and bile salt metabolism_Homo sapiens_R-HSA-194068 | 4/37 | 35/8973 | 1,17E+09 | 5,00E+14 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | AKR1D1 |
| 24 h, 25 mM | Retinoid metabolism and transport_Homo sapiens_R-HSA-975634 | 4/37 | 42/8973 | 2,45E+09 | 8,73E+14 | AKR1B10, AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | |
| 24 h, 25 mM | Metabolism of fat-soluble vitamins_Homo | 4/37 | 51/8973 | 5,32E+09 | 1,63E+14 | AKR1B10, AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | |

| | | | | | | | |
|-------------|---|------|----------|----------|----------|---------------------------------|--------|
| 24 h, 25 mM | sapiens_R-HSA-6806667 Visual phototransduction_Homo sapiens_R-HSA-2187338 | 4/37 | 97/8973 | 6,45E+13 | 1,72E+14 | AKR1B10, AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | MAP2K6 |
| 24 h, 25 mM | MAP kinase activation in TLR cascade_Homo sapiens_R-HSA-450294 | 3/37 | 60/8973 | 1,88E+14 | 4,02E+14 | FOS, JUN | |
| 24 h, 25 mM | Metabolism of vitamins and cofactors_Homo sapiens_R-HSA-196854 | 4/37 | 148/8973 | 3,07E+14 | 4,81E+14 | AKR1B10, AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | |
| 24 h, 25 mM | TRAF6 Mediated Induction of proinflammatory cytokines_Homo sapiens_R-HSA-168180 | 3/37 | 72/8973 | 3,17E+13 | 4,81E+14 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| 24 h, 25 mM | Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP)_Homo sapiens_R-HSA-2559582 | 3/37 | 77/8973 | 3,83E+14 | 4,81E+14 | FOS, JUN, CEBPB | |
| 24 h, 25 mM | Cellular Senescence_Homo sapiens_R-HSA-2559583 | 4/37 | 161/8973 | 4,16E+14 | 4,81E+14 | FOS, JUN, CEBPB | MAP2K6 |
| 24 h, 25 mM | MyD88 cascade initiated on plasma membrane_Homo sapiens_R-HSA-975871 | 3/37 | 82/8973 | 4,57E+14 | 4,81E+14 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| 24 h, 25 mM | Toll Like Receptor 10 (TLR10) Cascade_Homo sapiens_R-HSA-168142 | 3/37 | 82/8973 | 4,57E+14 | 4,81E+14 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| 24 h, 25 mM | Toll Like Receptor 5 (TLR5) Cascade_Homo sapiens_R-HSA-168176 | 3/37 | 82/8973 | 4,57E+14 | 4,81E+14 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| 24 h, 25 mM | TRAF6 mediated induction of NFkB and MAP kinases | 3/37 | 83/8973 | 4,73E+13 | 4,81E+14 | FOS, JUN | MAP2K6 |

| | | | | | | | |
|-------------|---|------|---------|----------|----------|----------|--------|
| 24 h, 25 mM | upon TLR7/8 or 9 activation_Homo sapiens_R-HSA-975138 MyD88 dependent cascade initiated on endosome_Homo | 3/37 | 85/8973 | 5,05E+14 | 4,81E+14 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| 24 h, 25 mM | sapiens_R-HSA-975155 Toll Like Receptor 7/8 (TLR7/8) Cascade_Homo | 3/37 | 85/8973 | 5,05E+14 | 4,81E+14 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| 24 h, 25 mM | sapiens_R-HSA-168181 Toll Like Receptor 9 (TLR9) Cascade_Homo | 3/37 | 88/8973 | 5,57E+13 | 4,81E+14 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| 24 h, 25 mM | sapiens_R-HSA-168138 Oxidative Stress Induced Senescence_Homo | 3/37 | 91/8973 | 6,11E+12 | 4,81E+14 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| 24 h, 25 mM | sapiens_R-HSA-2559580 MyD88:Mal cascade initiated on plasma membrane_Homo | 3/37 | 92/8973 | 6,30E+13 | 4,81E+14 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| 24 h, 25 mM | sapiens_R-HSA-166058 Toll Like Receptor 2 (TLR2) Cascade_Homo | 3/37 | 92/8973 | 6,30E+13 | 4,81E+14 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| 24 h, 25 mM | sapiens_R-HSA-181438 Toll Like Receptor TLR1:TLR2 Cascade_Homo | 3/37 | 92/8973 | 6,30E+13 | 4,81E+14 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| 24 h, 25 mM | sapiens_R-HSA-168179 Toll Like Receptor TLR6:TLR2 Cascade_Homo | 3/37 | 92/8973 | 6,30E+13 | 4,81E+14 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| 24 h, 25 mM | sapiens_R-HSA-168188 MyD88-independent TLR3/TLR4 | 3/37 | 97/8973 | 7,29E+14 | 4,88E+14 | FOS, JUN | MAP2K6 |

| | | | | | | | |
|-------------|--|------|---------|----------|----------|----------|--------|
| 24 h, 25 mM | cascade_Homo sapiens_R-HSA-166166 Toll Like Receptor 3 (TLR3) Cascade_Homo | 3/37 | 97/8973 | 7,29E+14 | 4,88E+14 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| 24 h, 25 mM | sapiens_R-HSA-168164 TRIF-mediated TLR3/TLR4 signaling_Homo sapiens_R-HSA-937061 | 3/37 | 97/8973 | 7,29E+14 | 4,88E+14 | FOS, JUN | MAP2K6 |



Figura 24 - Funções moleculares enriquecidas pelo banco de dados GO. GeneRatio reporta a razão do número de DEGs encontrados para cada termo enriquecido, dentro da lista de genes diferencialmente expressos de cada tratamento, que estão incluídos no banco de dados. Quanto maior a razão, maior o diâmetro dos círculos. A barra de cores indica o nível de significância do termo enriquecido pelo corte do FDR. O número abaixo do tratamento reporta o número de genes diferencialmente expressos utilizado para o cálculo de GeneRatio em cada condição experimental.

Tabela 10 - Funções moleculares enriquecidas pelo Gene Ontology. A coluna GeneRatio reporta a razão do número de DEGs encontrados para cada termo enriquecido, dentro da lista de genes diferencialmente expressos em cada tratamento, que estão incluídos no banco de dados; BgRatio representa a razão entre e o número de genes presentes na via e o número total de genes presentes no banco de dados; FDR reporta o nível de significância do termo enriquecido e a coluna Genes descreve os DEGs responsáveis pelo enriquecimento de cada termo. As cores verde e vermelha representam os DEGs negativa e positivamente regulados pelo ALA, respectivamente.

| Tratamento | Descrição | GeneRatio | BgRatio | p. valor | FDR | Genes |
|-------------|--|-----------|-----------|----------|----------|---|
| 2 h, 2.5 mM | NADH dehydrogenase (quinone) activity (GO:0050136) | 9/414 | 44/11459 | 2,21E+09 | 5,67E+14 | MT-ND3, MT-ND5, MT-ND1 NDUFB3, NDUFB10, NDUFS5, NDUFS6, NDUFB4, NDUFA1 |
| 2 h, 2.5 mM | NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity (GO:0008137) | 9/414 | 44/11459 | 2,21E+09 | 5,67E+14 | MT-ND3, MT-ND5, MT-ND1 NDUFB3, NDUFB10, NDUFS5, NDUFS6, NDUFB4, NDUFA1 |
| 2 h, 25 mM | Protein heterodimerization activity (GO:0046982) | 3/8 | 266/11459 | 6,35E+14 | 2,41E+14 | ATF3, GADD45A, JUN |
| 24 h, 25 mM | Alditol:NADP+ 1-oxidoreductase activity (GO:0004032) | 5/38 | 13/11459 | 3,85E+03 | 5,12E+06 | AKR1B10, AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 AKR1D1 |
| 24 h, 25 mM | Alcohol dehydrogenase (NADP+) activity (GO:0008106) | 5/38 | 21/11459 | 5,97E+05 | 2,65E+07 | AKR1B10, AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 AKR1D1 |
| 24 h, 25 mM | Aldo-keto reductase (NADP) activity (GO:0004033) | 5/38 | 21/11459 | 5,97E+05 | 2,65E+07 | AKR1B10, AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 AKR1D1 |
| 24 h, 25 mM | Oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor (GO:0016616) | 6/38 | 89/11459 | 4,19E+07 | 1,39E+09 | AKR1B10, AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 AKR1D1, DHRS2 |
| 24 h, 25 mM | Oxidoreductase activity, acting on paired donors, | 4/38 | 42/11459 | 1,05E+09 | 2,80E+14 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 AKR1D1 |

| | | | | | | |
|--------------------|---|------|----------|----------|----------|-------------------------|
| | with incorporation or reduction of molecular oxygen, NAD(P)H as one donor, and incorporation of one atom of oxygen (GO:0016709) | | | | | |
| 24 h, 25 mM | Oxidoreductase activity, acting on NAD(P)H, quinone or similar compound as acceptor (GO:0016655) | 3/38 | 16/11459 | 1,83E+09 | 4,05E+14 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 |
| 24 h, 25 mM | Steroid dehydrogenase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor (GO:0033764) | 3/38 | 22/11459 | 4,96E+09 | 9,43E+14 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 |
| 24 h, 25 mM | Monocarboxylic acid binding (GO:0033293) | 3/38 | 23/11459 | 5,69E+09 | 9,46E+14 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 |
| 24 h, 25 mM | Oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor (GO:0016620) | 3/38 | 26/11459 | 8,30E+09 | 1,23E+13 | AKR1B10, AKR1C4, AKR1C3 |

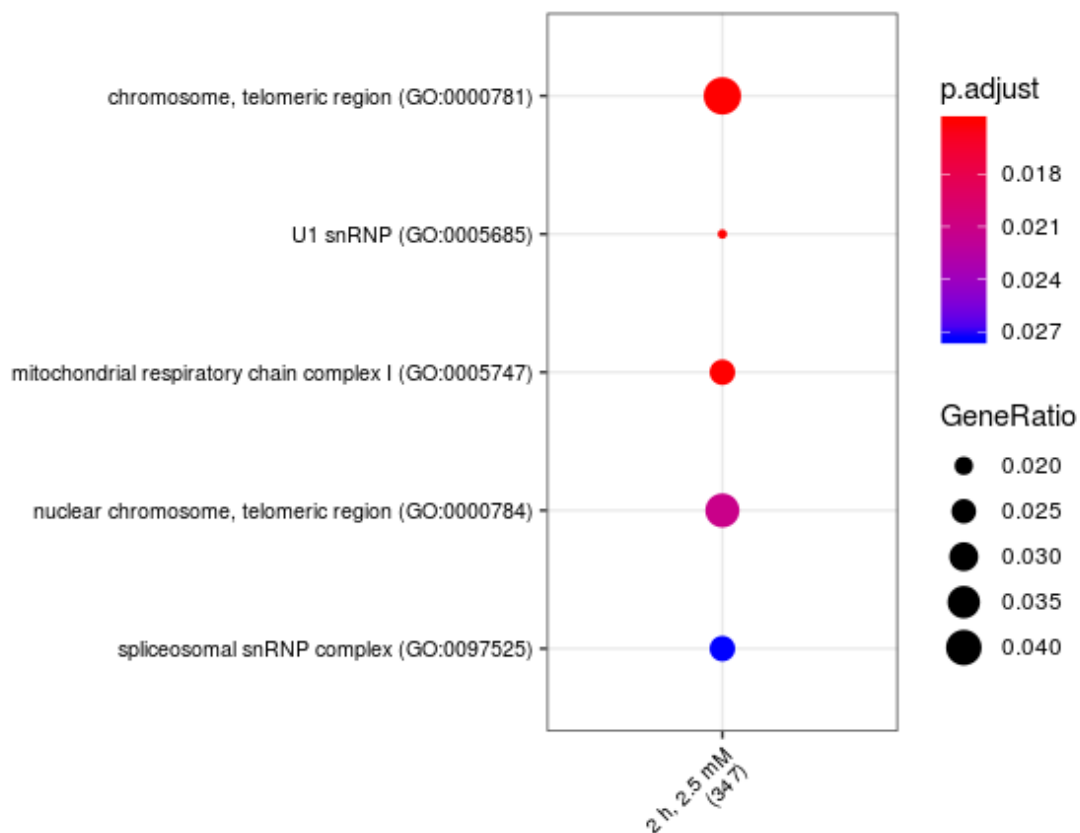


Figura 25 - Componentes celulares enriquecidos pelo banco de dados GO. GeneRatio reporta a razão do número de DEGs encontrados para cada termo enriquecido, dentro da lista de genes diferencialmente expressos de cada tratamento, que estão incluídos no banco de dados. Quanto maior a razão, maior o diâmetro dos círculos. A barra de cores indica o nível de significância do termo enriquecido pelo corte do FDR. O número abaixo do tratamento reporta o número de genes diferencialmente expressos utilizado para o cálculo de GeneRatio em cada condição experimental.

Tabela 11 - Componentes celulares enriquecidos pelo Gene Ontology. A coluna GeneRatio reporta a razão do número de DEGs encontrados para cada termo enriquecido, dentro da lista de genes diferencialmente expressos em cada tratamento, que estão incluídos no banco de dados; BgRatio representa a razão entre o número de genes presentes na via e o número total de genes presentes no banco de dados; FDR reporta o nível de significância do termo enriquecido e a coluna Genes descreve os DEGs responsáveis pelo enriquecimento de cada termo. As cores verde e vermelha representam os DEGs negativa e positivamente regulados pelo ALA, respectivamente.

| Tratamento | Descrição | GeneRatio | BgRatio | p. valor | FDR | Genes | |
|-------------|--|-----------|----------|----------|----------|-----------------------------------|---|
| 2 h, 2.5 mM | Chromosome, telomeric region (GO:0000781) | 15/347 | 125/8655 | 1,35E+14 | 1,50E+14 | NABP1, HMBOX1, RTEL1, SMCHD1, WRN | H3F3A, MCM2, HIST3H3, RPA1, RAD51, XRCC6, SP100, MCM5, MSH2, PPP1CB |
| 2 h, 2.5 mM | U1 snrnp (GO:0005685) | 6/347 | 22/8655 | 1,72E+14 | 1,50E+14 | RBPM5, LUC7L3 | SNRPC, SNRPD1, SNRPE, SNRPD3 |
| 2 h, 2.5 mM | Mitochondrial respiratory chain complex I (GO:0005747) | 9/347 | 52/8655 | 1,93E+14 | 1,50E+14 | MT-ND3, MT-ND5, MT-ND1 | NDUFB3, NDUFB10, NDUFS5, NDUFS6, NDUFB4, NDUFA1 |
| 2 h, 2.5 mM | Nuclear chromosome, telomeric region (GO:0000784) | 13/347 | 108/8655 | 3,62E+14 | 2,12E+14 | NABP1, HMBOX1, SMCHD1 | H3F3A, MCM2, HIST3H3, RPA1, RAD51, XRCC6, SP100, MCM5, MSH2, PPP1CB |
| 2 h, 2.5 mM | Spliceosomal snrnp complex (GO:0097525) | 9/347 | 60/8655 | 5,84E+14 | 2,73E+13 | WDR62, RBPM5, LUC7L3 | SNRPC, HTATSF1, SNRPD1, SNRPE, LSM6, SNRPD3 |

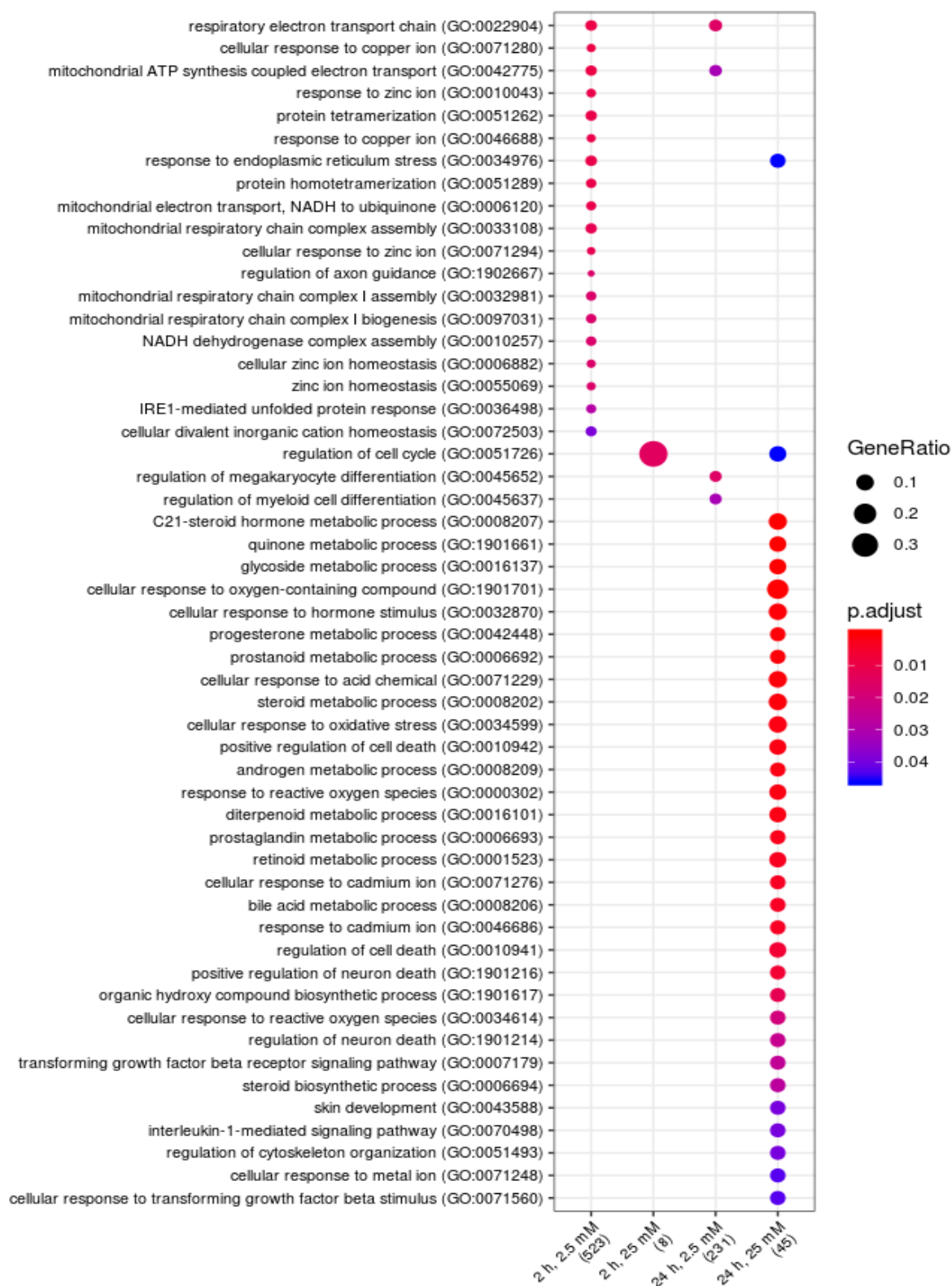


Figura 26 - Processos biológicos enriquecidos pelo banco de dados. GeneRatio reporta a razão do número de DEGs encontrados para cada termo enriquecido, dentro da lista de genes diferencialmente expressos de cada tratamento, que estão incluídos no banco de dados. Quanto maior a razão, maior o diâmetro dos círculos. A barra de cores indica o nível de significância do termo enriquecido pelo corte do FDR. O número abaixo do tratamento reporta o número de genes diferencialmente expressos utilizado para o cálculo de GeneRatio em cada condição experimental.

Tabela 12 - Processos biológicos enriquecidos pelo banco de dados GO. A coluna GeneRatio reporta a razão do número de DEGs encontrados para cada termo enriquecido, dentro da lista de genes diferencialmente expressos em cada tratamento, que estão incluídos no banco de dados; BgRatio representa a razão entre o número de genes presentes na via e o número total de genes presentes no banco de dados; FDR reporta o nível de significância do termo enriquecido e a coluna Genes descreve os DEGs responsáveis pelo enriquecimento de cada termo. As cores verde e vermelha representam os DEGs negativa e positivamente regulados pelo ALA, respectivamente.

| Tratamento | Descrição | GeneRatio | BgRatio | p.valor | FDR | Genes | |
|-------------|---|-----------|----------|----------|----------|--------------------------------|---|
| 2 h, 2,5 mM | Respiratory electron transport chain (GO:0022904) | 14/523 | 95/14433 | 7,79E+08 | 9,70E+14 | MT-CO1, MT-ND3, MT-ND5, MT-ND1 | NDUFB3, UQCR10, UQCRQ, NDUFB10, NDUFS5, NDUFS6, NDUFB4, SDHC, NDUFA1, ALDH5A1 |
| 2 h, 2,5 mM | Cellular response to copper ion (GO:0071280) | 7/523 | 22/14433 | 8,37E+08 | 9,70E+14 | PRNP | MT1F, MT1M, MT1H, MT1L, MT1B, MT2A |
| 2 h, 2,5 mM | Mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport (GO:0042775) | 13/523 | 86/14433 | 1,24E+09 | 9,70E+14 | MT-CO1, MT-ND3, MT-ND5, MT-ND1 | NDUFB3, UQCR10, UQCRQ, NDUFB10, NDUFS5, NDUFS6, NDUFB4, SDHC, NDUFA1 |
| 2 h, 2,5 mM | Response to zinc ion (GO:0010043) | 8/523 | 33/14433 | 1,76E+09 | 1,03E+14 | SLC30A7 | MT1F, MT1M, MT1H, MT1L, MT1B, CRIP1, MT2A |
| 2 h, 2,5 mM | Protein tetramerization (GO:0051262) | 13/523 | 91/14433 | 2,31E+09 | 1,05E+13 | CTH, CD79A, HM13 | CAT, DECR1, ACOT13, HIST1H3A, HIST3H3, XRCC6, ALDH5A1, GNMT, ACACB, GPX3 |
| 2 h, 2,5 mM | Response to copper ion (GO:0046688) | 7/523 | 26/14433 | 2,84E+09 | 1,05E+13 | PRNP | MT1F, MT1M, MT1H, MT1L, MT1B, MT2A |

| | | | | | | | |
|-------------|---|--------|-----------|----------|----------|---|--|
| 2 h, 2,5 mM | Response to endoplasmic reticulum stress (GO:0034976) | 14/523 | 107/14433 | 3,11E+09 | 1,05E+13 | HERPUD1, DNAJB9, HSP90B1, TRIB3, CEBPB, FICD, ATF3, DNAJC10, ATF6, OS9, ATP2A2, PDIA5, BBC3 | ANKS4B |
| 2 h, 2,5 mM | Protein homotetramerization (GO:0051289) | 10/523 | 58/14433 | 3,90E+08 | 1,05E+14 | CTH, CD79A, HM13 | CAT, DECR1, ACOT13, ALDH5A1, GNMT, ACACB, GPX3 |
| 2 h, 2,5 mM | Mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone (GO:0006120) | 9/523 | 47/14433 | 4,01E+09 | 1,05E+14 | MT-ND3, MT-ND5, MT-ND1 | NDUFB3, NDUFB10, NDUFS5, NDUFS6, NDUFB4, NDUFA1 |
| 2 h, 2,5 mM | Mitochondrial respiratory chain complex assembly (GO:0033108) | 13/523 | 98/14433 | 5,13E+09 | 1,18E+14 | MT-ND3, MT-ND5, MT-ND1 | NDUFB3, PET100, UQCR10, NDUFB10, NDUFS5, NDUFS6, NDUFB4, NDUFA1, NDUFAF3, SDHAF3 |
| 2 h, 2,5 mM | Cellular response to zinc ion (GO:0071294) | 6/523 | 20/14433 | 5,52E+09 | 1,18E+14 | | MT1F, MT1M, MT1H, MT1L, MT1B, MT2A |
| 2 h, 2,5 mM | Regulation of axon guidance (GO:1902667) | 5/523 | 14/14433 | 9,35E+09 | 1,67E+13 | VEGFA, PLXNA3, ZSWIM6, ZSWIM8, PLXNA1 | |
| 2 h, 2,5 mM | Mitochondrial respiratory chain complex I assembly (GO:0032981) | 10/523 | 65/14433 | 1,07E+14 | 1,67E+13 | MT-ND3, MT-ND5, MT-ND1 | NDUFB3, NDUFB10, NDUFS5, NDUFS6, NDUFB4, NDUFA1, NDUFAF3 |
| 2 h, 2,5 mM | Mitochondrial respiratory chain complex I biogenesis (GO:0097031) | 10/523 | 65/14433 | 1,07E+14 | 1,67E+13 | MT-ND3, MT-ND5, MT-ND1 | NDUFB3, NDUFB10, NDUFS5, NDUFS6, NDUFB4, NDUFA1, NDUFAF3 |

| | | | | | | | |
|--------------|---|--------|-----------|----------|----------|--|--|
| 2 h, 2,5 mM | NADH dehydrogenase complex assembly (GO:0010257) | 10/523 | 65/14433 | 1,07E+14 | 1,67E+13 | MT-ND3, MT-ND5, MT-ND1 | NDUFB3, NDUFB10, NDUFS5, NDUFS6, NDUFB4, NDUFA1, NDUFAF3 |
| 2 h, 2,5 mM | Cellular zinc ion homeostasis (GO:0006882) | 7/523 | 32/14433 | 1,21E+14 | 1,67E+13 | SLC39A14 | MT1F, MT1M, MT1H, MT1L, MT1B, MT2A |
| 2 h, 2,5 mM | Zinc ion homeostasis (GO:0055069) | 7/523 | 32/14433 | 1,21E+14 | 1,67E+13 | SLC39A14 | MT1F, MT1M, MT1H, MT1L, MT1B, MT2A |
| 2 h, 2,5 mM | IRE1-mediated unfolded protein response (GO:0036498) | 9/523 | 58/14433 | 2,20E+14 | 2,87E+14 | DNAJB9, DNAJC3, SRPRB, ARFGAP1, DNAJB11, PDIA5, EDEM1, SEC61A1, ACADVL | |
| 2 h, 2,5 mM | Cellular divalent inorganic cation homeostasis (GO:0072503) | 12/523 | 102/14433 | 3,14E+13 | 3,89E+14 | CALR, ATP2A2, SLC39A14 | RGN, MT1F, EPHX2, MT1M, MT1H, MT1L, MT1B, TMEM203, MT2A |
| 2 h, 25 mM | Regulation of cell cycle (GO:0051726) | 3/8 | 216/14433 | 1,75E+14 | 1,43E+14 | MAP3K8, GADD45A, JUN | |
| 24 h, 2,5 mM | Regulation of megakaryocyte differentiation (GO:0045652) | 7/231 | 50/14433 | 1,37E+09 | 1,55E+13 | L3MBTL1, AGO3, THBS1, TNRC6C | H3F3A, HIST1H3A, PRMT6 |
| 24 h, 2,5 mM | Respiratory electron transport chain (GO:0022904) | 9/231 | 95/14433 | 2,10E+09 | 1,55E+13 | MT-CO1, MT-ND5, MT-ND1, MT-CO2, D2HGDH, MT-ND2, MT-CO3, MT-ND3, MT-ND6 | |
| 24 h, 2,5 mM | Mitochondrial ATP synthesis coupled | 8/231 | 86/14433 | 6,92E+09 | 3,17E+14 | MT-CO1, MT-ND5, MT-ND1, MT-CO2, | |

| | | | | | | | |
|--------------|--|-------|-----------|----------|----------|--|------------------------------|
| 24 h, 2,5 mM | electron transport (GO:0042775) Regulation of myeloid cell differentiation (GO:0045637) | 7/231 | 66/14433 | 8,57E+09 | 3,17E+14 | MT-ND2, MT-CO3, MT-ND3, MT-ND6 L3MBTL1, AGO3, THBS1, TNRC6C | H3F3A, HIST1H3A, PRMT6 |
| 24 h, 25 mM | C21-steroid hormone metabolic process (GO:0008207) | 5/45 | 23/14433 | 7,56E+05 | 4,26E+08 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | AKR1D1, DHRS2 |
| 24 h, 25 mM | Quinone metabolic process (GO:1901661) | 4/45 | 11/14433 | 2,68E+06 | 7,54E+08 | AKR1B10, AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | |
| 24 h, 25 mM | Glycoside metabolic process (GO:0016137) | 4/45 | 15/14433 | 1,10E+07 | 2,06E+09 | AKR1B10, AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | |
| 24 h, 25 mM | Cellular response to oxygen-containing compound (GO:1901701) | 8/45 | 275/14433 | 1,84E+08 | 2,58E+14 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3, FOS, JUN, ZFP36, EGR1, CAPN2 | |
| 24 h, 25 mM | Cellular response to hormone stimulus (GO:0032870) | 5/45 | 81/14433 | 5,03E+07 | 5,67E+13 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3, JUN, ABCC2 | |
| 24 h, 25 mM | Progesterone metabolic process (GO:0042448) | 3/45 | 12/14433 | 6,11E+07 | 5,73E+14 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | |
| 24 h, 25 mM | Prostanoid metabolic process (GO:0006692) | 3/45 | 13/14433 | 7,93E+08 | 6,37E+14 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | |
| 24 h, 25 mM | Cellular response to acid chemical (GO:0071229) | 5/45 | 92/14433 | 9,42E+08 | 6,63E+14 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3, EGR1, CAPN2 | |
| 24 h, 25 mM | Steroid metabolic | 5/45 | 100/14433 | 1,42E+09 | 8,86E+14 | AKR1C1, AKR1C4, | AKR1D1, |

| | | | | | | | |
|-------------|---|------|-----------|----------|----------|---------------------------------|--------|
| | process (GO:0008202) | | | | | AKR1C3 | DHRS2 |
| 24 h, 25 mM | Cellular response to oxidative stress (GO:0034599) | 5/45 | 116/14433 | 2,91E+09 | 1,58E+14 | HMOX1, AKR1C3, FOS, JUN | DHRS2 |
| 24 h, 25 mM | Positive regulation of cell death (GO:0010942) | 4/45 | 58/14433 | 3,09E+09 | 1,58E+14 | AKR1C3, FOS, EGR1 | DKK1 |
| 24 h, 25 mM | Androgen metabolic process (GO:0008209) | 3/45 | 21/14433 | 3,62E+09 | 1,64E+14 | AKR1C4, SPP1 | AKR1D1 |
| 24 h, 25 mM | Response to reactive oxygen species (GO:0000302) | 4/45 | 61/14433 | 3,78E+09 | 1,64E+14 | HMOX1, AKR1C3, FOS, JUN | |
| 24 h, 25 mM | Diterpenoid metabolic process (GO:0016101) | 4/45 | 63/14433 | 4,29E+09 | 1,73E+14 | AKR1B10, AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | |
| 24 h, 25 mM | Prostaglandin metabolic process (GO:0006693) | 3/45 | 26/14433 | 7,00E+08 | 2,63E+14 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | |
| 24 h, 25 mM | Retinoid metabolic process (GO:0001523) | 4/45 | 76/14433 | 8,98E+09 | 3,16E+14 | AKR1B10, AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | |
| 24 h, 25 mM | Cellular response to cadmium ion (GO:0071276) | 3/45 | 30/14433 | 1,08E+14 | 3,59E+14 | AKR1C3, FOS, JUN | |
| 24 h, 25 mM | Bile acid metabolic process (GO:0008206) | 3/45 | 31/14433 | 1,20E+14 | 3,75E+14 | AKR1C1, AKR1C4 | AKR1D1 |
| 24 h, 25 mM | Response to cadmium ion (GO:0046686) | 3/45 | 32/14433 | 1,32E+14 | 3,91E+14 | AKR1C3, FOS, JUN | |

| | | | | | | | |
|-------------|---|------|-----------|----------|----------|--------------------|--------|
| 24 h, 25 mM | Regulation of cell death (GO:0010941) | 4/45 | 97/14433 | 2,31E+14 | 6,42E+14 | AKR1C3, JUN, IER3 | DKK1 |
| 24 h, 25 mM | Positive regulation of neuron death (GO:1901216) | 3/45 | 39/14433 | 2,39E+14 | 6,42E+14 | FOS, EGR1 | DKK1 |
| 24 h, 25 mM | Organic hydroxy compound biosynthetic process (GO:1901617) | 3/45 | 50/14433 | 5,01E+14 | 1,20E+14 | AKR1C4, AKR1C3 | AKR1D1 |
| 24 h, 25 mM | Cellular response to reactive oxygen species (GO:0034614) | 3/45 | 66/14433 | 1,13E+14 | 2,05E+14 | AKR1C3, FOS, JUN | |
| 24 h, 25 mM | Regulation of neuron death (GO:1901214) | 3/45 | 73/14433 | 1,51E+13 | 2,39E+14 | FOS, EGR1 | DKK1 |
| 24 h, 25 mM | Transforming growth factor beta receptor signaling pathway (GO:0007179) | 3/45 | 77/14433 | 1,76E+14 | 2,55E+14 | GDF15, FOS, JUN | |
| 24 h, 25 mM | Steroid biosynthetic process (GO:0006694) | 3/45 | 80/14433 | 1,97E+13 | 2,70E+14 | AKR1C4, AKR1C3 | AKR1D1 |
| 24 h, 25 mM | Skin development (GO:0043588) | 3/45 | 95/14433 | 3,21E+14 | 3,96E+14 | AKR1C3, CLDN4, SFN | |
| 24 h, 25 mM | Interleukin-1-mediated signaling pathway (GO:0070498) | 3/45 | 96/14433 | 3,31E+14 | 3,96E+14 | EGR1, SQSTM1 | MAP2K6 |
| 24 h, 25 mM | Regulation of cytoskeleton organization (GO:0051493) | 3/45 | 96/14433 | 3,31E+14 | 3,96E+14 | ODAM, RHOQ, CAPN2 | |
| 24 h, 25 mM | Cellular response to | 3/45 | 101/14433 | 3,81E+14 | 4,29E+14 | AKR1C3, FOS, | |

| | | | | | | | |
|-------------|---|------|-----------|----------|----------|---------------------------|--------|
| 24 h, 25 mM | metal ion (GO:0071248) | 3/45 | 101/14433 | 3,81E+14 | 4,29E+14 | JUN GDF15, FOS, JUN | |
| 24 h, 25 mM | Cellular response to transforming growth factor beta stimulus (GO:0071560) | 3/45 | 107/14433 | 4,48E+14 | 4,60E+14 | ATF3, JUN, CEBPB | |
| 24 h, 25 mM | Response to endoplasmic reticulum stress (GO:0034976) | 4/45 | 216/14433 | 4,50E+14 | 4,60E+14 | PIM1, JUN, GADD45B | MAP2K6 |
| 24 h, 25 mM | Regulation of cell cycle (GO:0051726) | | | | | | |

Tabela 13 - Processos e vias compartilhados entre os bancos de dados no tratamento de 2 h com 2.5 mM. As cores verde e vermelha representam os DEGs negativa e positivamente regulados pelo ALA, respectivamente.

| Banco de dados | Descrição | Genes |
|----------------|---|---|
| | FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA | |
| GO | NADH dehydrogenase (quinone) activity (GO:0050136) | MT-ND3, MT-ND5, MT-ND1 |
| | NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity (GO:0008137) | MT-ND3, MT-ND5, MT-ND1 |
| | Mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone (GO:0006120) | NDUFB3, NDUFB10, NDUFS5, NDUFS6, NDUFB4, NDUFA1 |
| | Mitochondrial respiratory chain complex assembly (GO:0033108) | NDUFB3, PET100, UQCR10, NDUFB10, NDUFS5, NDUFS6, NDUFB4, NDUFA1, NDUFAF3, SDHAF3 |
| | Mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport (GO:0042775) | NDUFB3, UQCR10, UQCRQ, NDUFB10, NDUFS5, NDUFS6, NDUFB4, SDHC, NDUFA1 |
| | Respiratory electron transport chain (GO:0022904) | MT-CO1 |
| | Mitochondrial respiratory chain complex I assembly (GO:0032981) | NDUFB3, UQCR10, UQCRQ, NDUFB10, NDUFS5, NDUFS6, NDUFB4, SDHC |
| | Mitochondrial respiratory chain complex I biogenesis (GO:0097031) | NDUFB3, NDUFB10, NDUFS5, NDUFS6 |
| | NADH dehydrogenase complex assembly (GO:0010257) | NDUFB4, NDUFA1, NDUFAF3 |
| | The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport_Homo sapiens_R-HSA-1428517 | MT-ND3, MT-ND5, MT-ND1 |
| REACTOME | | SLC16A3, LDHAL6A, PDK1 |
| | | NDUFB3, NDUFB10, NDUFS5, NDUFS6 |
| | | NDUFB3, UQCR10, UQCRQ, NDUFB10, NDUFS5, NDUFS6, NDUFB4, SDHC, NDUFA1, TACO1, NDUFAF3, PDHA1, PDK2 |

| | RETICULO ENDOPLASMATICO | | |
|----------|---|--|-----------------------|
| GO | Protein homotetramerization (GO:0051289) | DECR1, ACOT13, ALDH5A1, GNMT, ACACB, GPX3, HM13 | CAT, CTH, CD79A |
| | Protein homotetramerization (GO:0051289) | DECR1, ACOT13, ALDH5A1, GNMT, ACACB, GPX3, HM13 | CAT, CTH, CD79A |
| | Protein tetramerization (GO:0051262) | DECR1, ACOT13, ALDH5A1, GNMT, ACACB, GPX3 | CAT, CTH, CD79A, HM13 |
| | Response to endoplasmic reticulum stress (GO:0034976) | HERPUD1, DNAJB9, HSP90B1, TRIB3, CEBPB, FICD, ATF3, DNAJC10, ATF6, OS9, | ANKS4B |
| | IRE1-mediated unfolded protein response (GO:0036498) | DNAJB9, DNAJC3, SRPRB, ARFGAP1, DNAJB11, PDIA5, EDEM1, SEC61A1, ACADVL | |
| REACTOME | XBP1(S) activates chaperone genes_Homo sapiens_R-HSA-381038 | DNAJB9, DNAJC3, SRPRB, ARFGAP1, DNAJB11, PDIA5, EDEM1, SEC61A1, ACADVL | |
| | IRE1alpha activates chaperones_Homo sapiens_R-HSA-381070 | DNAJB9, DNAJC3, SRPRB, ARFGAP1, DNAJB11, PDIA5, EDEM1, SEC61A1, ACADVL | |
| | Unfolded Protein Response (UPR)_Homo sapiens_R-HSA-381119 | IGFBP1, HERPUD1, DNAJB9, DNAJC3, HSP90B1, ATF3, SRPRB, ARFGAP1, DNAJB11, CALR, ATF6, PDIA5, EDEM1, SEC61A1, ACADVL | |
| KEGG | Protein processing in endoplasmic reticulum | HERPUD1, DNAJC3, HSP90B1, DNAJC10, DNAJB11, CALR, ATF6, RPN2, OS9, SSR4, EDEM1, RRBP1, STT3B, SEC61A1, CANX | RAD23B, EIF2AK4 |

| | RESPONSA IONS METALICOS | | |
|----------|---|-------------------------------|---|
| GO | Response to zinc ion (GO:0010043) | SLC30A7 | MT1F, MT1M, MT1H, MT1L, MT1B, MT2A, CRIP1 |
| | Cellular response to zinc ion (GO:0071294) | | MT1F, MT1M, MT1H, MT1L, MT1B, MT2A |
| | Cellular divalent inorganic cation homeostasis (GO:0072503) | CALR, ATP2A2, SLC39A14 | TMEM203, MT2A, MT1M, T1H, MT1L, MT1B, MT1F, RGN, EPHX2 |
| | Cellular response to copper ion (GO:0071280) | | MT1F, MT1M, PRNP, MT1H, MT1L, MT1B, MT2A |
| | Cellular divalent inorganic cation homeostasis (GO:0072503) | CALR, ATP2A2, SLC39A14 | RGN, MT1F, EPHX2, MT1M, MT1H, MT1L, MT1B, TMEM203, MT2A |
| | Response to copper ion (GO:0046688) | | MT1F, MT1M, PRNP, MT1H, MT1L, MT1B, MT2A |
| | Cellular zinc ion homeostasis (GO:0006882) | SLC39A14, MT2A | MT1F, MT1M, MT1H, MT1L, MT1B |
| | Zinc ion homeostasis (GO:0055069) | SLC39A14, MT2A | MT1F, MT1M, MT1H, MT1L, MT1B, |
| | Metallothioneins bind metals_Homo sapiens_R-HSA-5661231 | | MT1F, MT1M, MT1H, MT1B, MT2A |
| REACTOME | Response to metal ions_Homo sapiens_R-HSA-5660526 | | MT1F, MT1M, MT1H, MT1B, MT2A |

Tabela 14 - Processos e vias compartilhados pelos bancos de dados no tratamento de 24 h com 25 mM. As cores verde e vermelha representam os DEGs negativa e positivamente regulados pelo ALA, respectivamente.

| Banco de dados | Descrição | Genes |
|----------------|--|---|
| | METABOLISMO CELULAR | |
| GO | Steroid metabolic process (GO:0008202) | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 DHRS2, AKR1D1 |
| | C21-steroid Hormônio metabolic process (GO:0008207) | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 DHRS2, AKR1D1 |
| | Quinone metabolic process (GO:1901661) | AKR1B10, AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 |
| | Glycoside metabolic process (GO:0016137) | AKR1B10, AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 |
| | Cellular response to Hormônio stimulus (GO:0032870) | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3, JUN, ABCC2 |
| | Cellular response to acid chemical (GO:0071229) | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3, EGR1, CAPN2 |
| | Progesterone metabolic process (GO:0042448) | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 |
| | Prostanoid metabolic process (GO:0006692) | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 |
| | Prostaglandin metabolic process (GO:0006693) | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 |
| | Steroid biosynthetic process (GO:0006694) | AKR1C4, AKR1C3 AKR1D1 |
| | Retinoid metabolic process (GO:0001523) | AKR1B10, AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 |
| | Cellular response to cadmium ion (GO:0071276) | AKR1C3, FOS, JUN |
| | Bile acid metabolic process (GO:0008206) | AKR1C1, AKR1C4, AKR1D1 |
| | Organic hydroxy compound biosynthetic process (GO:1901617) | AKR1C4, AKR1C3 AKR1D1 |
| | Diterpenoid metabolic process (GO:0016101) | AKR1B10, AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 |
| | Androgen metabolic process (GO:0008209) | AKR1C4, SPP1 AKR1D1 |
| REACTOME | Retinoid metabolism and transport_Homo sapiens_R-HSA-975634 | AKR1B10, AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 |
| | Bile acid and bile salt metabolism_Homo sapiens_R-HSA-194068 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 AKR1D1 |

| | | | |
|----------|--|---------------------------------|--------|
| | Synthesis of bile acids and bile salts via 24-hydroxycholesterol_Homo sapiens_R-HSA-193775 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | AKR1D1 |
| | Synthesis of bile acids and bile salts via 27-hydroxycholesterol_Homo sapiens_R-HSA-193807 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | AKR1D1 |
| | Synthesis of bile acids and bile salts via 7alpha-hydroxycholesterol_Homo sapiens_R-HSA-193368 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | AKR1D1 |
| | Synthesis of bile acids and bile salts_Homo sapiens_R-HSA-192105 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | AKR1D1 |
| | Metabolism of vitamins and cofactors_Homo sapiens_R-HSA-196854 | AKR1B10, AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | |
| | Metabolism of fat-soluble vitamins_Homo sapiens_R-HSA-680667 | AKR1B10, AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | |
| | Visual phototransduction_Homo sapiens_R-HSA-2187338 | AKR1B10, AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | |
| KEGG | Steroid hormone biosynthesis | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | AKR1D1 |
| | REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR/ SENESCÊNCIA/MORTE CELULAR | | |
| REACTOME | Oxidative Stress Induced Senescence_Homo sapiens_R-HSA-2559580 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| | Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP)_Homo sapiens_R-HSA-2559582 | FOS, JUN, CEBPB | |
| | Cellular Senescence_Homo sapiens_R-HSA-2559583 | FOS, JUN, CEBPB | MAP2K6 |
| GO | Regulation of cell cycle (GO:0051726) | PIM1, JUN, GADD45B, | MAP2K6 |
| | Regulation of cell death (GO:0010941) | AKR1C3, JUN, IER3 | DKK1 |
| | Positive regulation of neuron death (GO:1901216) | FOS, EGR1 | DKK1 |
| | Positive regulation of cell death (GO:0010942) | AKR1C3, FOS, EGR1 | DKK1 |
| | Regulation of neuron death (GO:1901214) | FOS, EGR1 | DKK1 |
| | ESTRESSE OXIDATIVO | | |
| GO | Cellular response to oxidative stress (GO:0034599) | HMOX1, AKR1C3, FOS, JUN | DHRS2 |
| | Response to reactive oxygen species (GO:0000302) | HMOX1, AKR1C3, FOS, JUN | |

| | | | |
|----------|---|--|--------|
| REACTOME | Cellular response to reactive oxygen species (GO:0034614) | AKR1C3, FOS, JUN | |
| REACTOME | Cellular response to oxygen-containing compound (GO:1901701) | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3, FOS, JUN, ZFP36, EGR1, CAPN2 | |
| REACTOME | Oxidative Stress Induced Senescence_Homo sapiens_R-HSA-2559580 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| | SISTEMAIMUNE | | |
| REACTOME | MyD88 cascade initiated on plasma membrane_Homo sapiens_R-HSA-975871 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| | Toll Like Receptor 3 (TLR3) Cascade_Homo sapiens_R-HSA-168164 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| | TRIF-mediated TLR3, TLR4 signaling_Homo sapiens_R-HSA-937061 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| | TRAF6 Mediated Induction of proinflammatory cytokines_Homo sapiens_R-HSA-168180 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| | MAP kinase activation in TLR cascade_Homo sapiens_R-HSA-450294 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| | MyD88 dependent cascade initiated on endosome_Homo sapiens_R-HSA-975155 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| | Toll Like Receptor 7, 8 (TLR7, 8) Cascade_Homo sapiens_R-HSA-168181 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| | Toll Like Receptor 9 (TLR9) Cascade_Homo sapiens_R-HSA-168138 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| | Toll Like Receptor 10 (TLR10) Cascade_Homo sapiens_R-HSA-168142 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| | Toll Like Receptor 5 (TLR5) Cascade_Homo sapiens_R-HSA-168176 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| | TRAF6 mediated induction of NFkB and MAP kinases upon TLR7, 8 or 9 activation_Homo sapiens_R-HSA-975138 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| | MyD88:Mal cascade initiated on plasma membrane_Homo sapiens_R-HSA-166058 | FOS, JUN | MAP2K6 |

| | | | |
|------|--|-----------------|--------|
| | Toll Like Receptor 2 (TLR2) Cascade_Homo sapiens_R-HSA-181438 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| | Toll Like Receptor TLR1:TLR2 Cascade_Homo sapiens_R-HSA-168179 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| | Toll Like Receptor TLR6:TLR2 Cascade_Homo sapiens_R-HSA-168188 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| | MyD88-independent TLR3, TLR4 cascade_Homo sapiens_R-HSA-166166 | FOS, JUN | MAP2K6 |
| | Cellular response to transforming growth factor beta stimulus (GO:0071560) | GDF15, FOS, JUN | |
| GO | Interleukin-1-mediated signaling pathway (GO:0070498) | EGR1, SQSTM1 | MAP2K6 |
| | Transforming growth factor beta receptor signaling pathway (GO:0007179) | GDF15, FOS, JUN | |
| KEGG | Toll-like receptor signaling pathway | FOS, JUN, SPP1 | MAP2K6 |
| KEGG | TNF signaling pathway | FOS, JUN, CEBPB | MAP2K6 |

Tabela 15 - Categorização dos termos enriquecidos em “Processos biológicos” pelo Gene Ontology. A coluna GeneRatio reporta a razão do número de DEGs encontrados para cada termo enriquecido, dentro da lista de genes diferencialmente expressos em cada tratamento, que estão incluídos no banco de dados; BgRatio representa a razão entre o número de genes presentes na via e o número total de genes presentes no banco de dados; FDR reporta o nível de significância do termo enriquecido e a coluna Genes descreve os DEGs responsáveis pelo enriquecimento de cada termo. Os termos foram agrupados por cores de acordo com as classes definidas. Na coluna Genes, as cores verde e vermelha representam os DEGs negativa e positivamente regulados pelo ALA, respectivamente.

| Tratamento | Descrição | Classe | Subclasse | GeneRatio | BgRatio | FDR | Genes |
|-------------|--|---------------------|------------------------------|-----------|----------|----------|--|
| 2 h, 2.5 mM | Respiratory electron transport chain (GO:0022904) | Mitocôndria | Fosforilação oxidativa | 14/523 | 95/14433 | 9,70E-03 | NDUFB3, UQCR10, UQCRQ, NDUFB10, NDUFS5, MTCO1, NDUFS6, NDUFB4, SDHC, NDUFA1, ALDH5A1, MT-ND3, MT-ND5, MT-ND1 |
| | Cellular response to copper ion (GO:0071280) | Sinalização celular | Homeostase de íons metálicos | 7/523 | 22/14433 | 9,70E-03 | MT1F, MT1M, PRNP, MT1H, MT1L, MT1B, MT2A, |
| | Mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport (GO:0042775) | Mitocôndria | Fosforilação oxidativa | 13/523 | 86/14433 | 9,70E-03 | NDUFB3, UQCR10, UQCRQ, NDUFB10, NDUFS5, MTCO1, NDUFS6, NDUFB4, SDHC, NDUFA1, MT-ND3, MT-ND5, |

| | | | | | | |
|---|-------------------------|-------------------------------------|--------|-----------|----------|--|
| Response to zinc ion (GO:0010043) | Sinalização celular | Homeostase de íons metálicos | 8/523 | 33/14433 | 1,03E-02 | MT-ND1 MT1F, MT1M, MT1H, MT1L, MT1B, CRIP1, MT2A, SLC30A7 |
| Protein tetramerization (GO:0051262) | Enovelamento protéico | Conformação estrutural | 13/523 | 91/14433 | 1,05E-02 | CAT, CTH, CD79A, DECR1, ACOT13, HIST1H3A, GPX3, HIST3H3, HM13, XRCC6, ALDH5A1, GNMT, ACACB, |
| Response to copper ion (GO:0046688) | Sinalização celular | Homeostase de íons metálicos | 7/523 | 26/14433 | 1,05E-02 | MT1F, MT1M, PRNP, MT1H, MT1L, MT1B, MT2A |
| Response to endoplasmic reticulum stress (GO:0034976) | Retículo endoplasmático | Estresse no retículo endoplasmático | 14/523 | 107/14433 | 1,05E-02 | HERPUD1, DNAJB9, HSP90B1, TRIB3, CEBPB, FICD, ATF3, DNAJC10, ATF6, OS9, ATP2A2, PDIA5, BBC3, ANKS4B |
| Protein homotetramerization (GO:0051289) | Enovelamento protéico | Conformação estrutural | 10/523 | 58/14433 | 1,05E-02 | CAT, CTH, CD79A, DECR1, ACOT13, HM13, ALDH5A1, |

| | | | | | | |
|---|---------------------|--------------------------------|--------|----------|----------|--|
| Mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone (GO:0006120) | Mitocôndria | Fosforilação oxidativa | 9/523 | 47/14433 | 1,05E-02 | GNMT, ACACB, GPX3 NDUFB3, NDUFB10, NDUFS5, NDUFS6, NDUFB4, NDUFA1, MT-ND3, MT-ND5, MT-ND1 |
| Mitochondrial respiratory chain complex assembly (GO:0033108) | Mitocôndria | Fosforilação oxidativa | 13/523 | 98/14433 | 1,18E-02 | NDUFB3, PET100, UQCR10, NDUFB10, NDUFS5, NDUFS6, NDUFB4, NDUFA1, NDUFAF3, SDHAF3, MT-ND3, MT-ND5, MT-ND1 |
| Cellular response to zinc ion (GO:0071294) | Sinalização celular | Homeostase de íons metálicos | 6/523 | 20/14433 | 1,18E-02 | MT1F, MT1M, MT1H, MT1L, MT1B, MT2A |
| Regulation of axon guidance (GO:1902667) | Axônio | Regulação da orientação axonal | 5/523 | 14/14433 | 1,67E-02 | VEGFA, PLXNA3, ZSWIM6, ZSWIM8, PLXNA1 |
| Mitochondrial respiratory chain complex I assembly (GO:0032981) | Mitocôndria | Fosforilação oxidativa | 10/523 | 65/14433 | 1,67E-02 | NDUFB3, NDUFB10, NDUFS5, NDUFS6, NDUFB4, NDUFA1, NDUFAF3, MT-ND3, MT-ND5, MT-ND1 |

| | | | | | | |
|---|-------------------------|-------------------------------------|--------|-----------|----------|--|
| Mitochondrial respiratory chain complex I biogenesis (GO:0097031) | Mitocôndria | Fosforilação oxidativa | 10/523 | 65/14433 | 1,67E-02 | NDUFB3, NDUFB10, NDUFS5, NDUFS6, NDUFB4, NDUFA1, NDUFAF3, MT-ND3, MT-ND5, MT-ND1 |
| NADH dehydrogenase complex assembly (GO:0010257) | Mitocôndria | Fosforilação oxidativa | 10/523 | 65/14433 | 1,67E-02 | NDUFB3, NDUFB10, NDUFS5, NDUFS6, NDUFB4, NDUFA1, NDUFAF3, MT-ND3, MT-ND5, MT-ND1 |
| Cellular zinc ion homeostasis (GO:0006882) | Sinalização celular | Homeostase de íons metálicos | 7/523 | 32/14433 | 1,67E-02 | MT1F, MT1M, MT1H, MT1L, MT1B, SLC39A14, MT2A |
| Zinc ion homeostasis (GO:0055069) | Sinalização celular | Homeostase de íons metálicos | 7/523 | 32/14433 | 1,67E-02 | MT1F, MT1M, MT1H, MT1L, MT1B, SLC39A14, MT2A |
| IRE1-mediated unfolded protein response (GO:0036498) | Retículo endoplasmático | Estresse no retículo endoplasmático | 9/523 | 58/14433 | 2,87E-02 | DNAJB9, DNAJC3, SRPRB, ARFGAP1, DNAJB11, PDIA5, EDEM1, SEC61A1, ACADVL |
| Cellular divalent inorganic cation | Sinalização celular | Homeostase de íons metálicos | 12/523 | 102/14433 | 3,89E-02 | RGN, MT1F, EPHX2, MT1M, MT1H, CALR, |

| | | | | | | | |
|---------------------|--|-------------|-------------------------------|-------|-----------|----------|---|
| | homeostasis (GO:0072503) | | | | | | MT1L, MT1B, ATP2A2, SLC39A14, TMEM203, MT2A |
| 2 h, 25 mM | Regulation of cell cycle (GO:0051726) | Núcleo | Regulação do ciclo celular | 3/8 | 216/14433 | 1,43E-02 | MAP3K8, GADD45A, JUN |
| 24 h, 2.5 mM | Regulation of megakaryocyte differentiation (GO:0045652) | Núcleo | Diferenciação celular | 7/231 | 50/14433 | 1,55E-02 | L3MBTL1, AGO3, H3F3A, THBS1, HIST1H3A, PRMT6, TNRC6C |
| | Respiratory electron transport chain (GO:0022904) | Mitocôndria | Fosforilação oxidativa | 9/231 | 95/14433 | 1,55E-02 | MT-CO1, MT-ND5, MT-ND1, MT-CO2, D2HGDH, MT-ND2, MT-CO3, MT-ND3, MT-ND6 |
| | Mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport (GO:0042775) | Mitocôndria | Fosforilação oxidativa | 8/231 | 86/14433 | 3,17E-02 | MT-CO1, MT-ND5, MT-ND1, MT-CO2, MT-ND2, MT-CO3, MT-ND3, MT-ND6 |
| | Regulation of myeloid cell differentiation | Núcleo | Diferenciação celular | 7/231 | 66/14433 | 3,17E-02 | L3MBTL1, AGO3, H3F3A, THBS1, HIST1H3A, PRMT6, |

| | | | | | | | |
|---------------------------------------|---|----------------------|---|------|----------|------------------------------------|--|
| 24 h, 25 mM | (GO:0045637) | | | | | | TNRC6C |
| | C21-steroid hormone metabolic process | Metabolismo | Metabolismo hormonal | 5/45 | 5/45 | 7,56E-09 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3, AKR1D1, DHRS2 |
| | (GO:0008207) | | | | | | |
| | Quinone metabolic process | Metabolismo | Metabolismo oxidativo de compostos | 4/45 | 4/45 | 2,68E-08 | AKR1B10, AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 |
| | (GO:1901661) | | | | | | |
| | Glycoside metabolic process | Metabolismo | Metabolismo de compostos fornecedores de D-glicose | 4/45 | 4/45 | 1,10E-07 | AKR1B10, AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 |
| | (GO:0016137) | | | | | | |
| | Cellular response to oxygen-containing compound | Sinalização celular | Sinalização mediada por compostos contendo oxigênio | 8/45 | 8/45 | 1,84E-06 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3, FOS, JUN, ZFP36, EGR1, CAPN2 |
| (GO:1901701) | | | | | | | |
| Cellular response to hormone stimulus | Sinalização celular | Sinalização hormonal | 5/45 | 5/45 | 5,03E-06 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3, JUN, ABCC2 | |
| (GO:0032870) | | | | | | | |
| Progesterone metabolic process | Metabolismo | Metabolismo hormonal | 3/45 | 3/45 | 6,11E-06 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 | |

| | | | | | | | |
|--------------|---------------------------------------|---------------------|-------------------------------|------|------|----------|---------------------------------------|
| (GO:0042448) | Prostanoid metabolic process | Metabolismo | Metabolismo de ácidos graxos | 3/45 | 3/45 | 7,93E-06 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 |
| (GO:0006692) | Cellular response to acid chemical | Sinalização celular | Homeostase de íons | 5/45 | 5/45 | 9,42E-06 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3, EGR1, CAPN2 |
| (GO:0071229) | Steroid metabolic process | Metabolismo | Metabolismo hormonal | 5/45 | 5/45 | 1,42E-05 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3, AKR1D1, DHRS2 |
| (GO:0008202) | Cellular response to oxidative stress | Sinalização celular | Espécies reativas de oxigênio | 5/45 | 5/45 | 2,91E-05 | HMOX1, AKR1C3, FOS, JUN, DHRS2 |
| (GO:0034599) | Positive regulation of cell death | Sinalização celular | Sinalização de morte celular | 4/45 | 4/45 | 3,09E-05 | AKR1C3, FOS, DKK1, EGR1 |
| (GO:0010942) | Androgen metabolic process | Metabolismo | Metabolismo hormonal | 3/45 | 3/45 | 3,62E-05 | AKR1C4, AKR1D1, SPP1 |
| (GO:0008209) | Response to reactive oxygen species | Sinalização celular | Espécies reativas de oxigênio | 4/45 | 4/45 | 3,78E-05 | HMOX1, AKR1C3, FOS, JUN |

| | | | | | | |
|---------------------------------------|---------------------|---|------|------|----------|---------------------------------|
| (GO:0000302) | | | | | | |
| Diterpenoid metabolic process | Metabolismo | Metabolismo de metabólitos secundários | 4/45 | 4/45 | 4,29E-05 | AKR1B10, AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 |
| (GO:0016101) | | | | | | |
| Prostaglandin metabolic process | Metabolismo | Metabolismo lipídico | 3/45 | 3/45 | 7,00E-05 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 |
| (GO:0006693) | | | | | | |
| Retinoid metabolic process | Metabolismo | Metabolismo de congêneres da vitamina A | 4/45 | 4/45 | 8,98E-05 | AKR1B10, AKR1C1, AKR1C4, AKR1C3 |
| (GO:0001523) | | | | | | |
| Cellular response to cadmium ion | Sinalização celular | Homeostase de íons metálicos | 3/45 | 3/45 | 1,08E-04 | AKR1C3, FOS, JUN |
| (GO:0071276) | | | | | | |
| Bile acid metabolic process | Metabolismo | Metabolismo de ácidos biliares | 3/45 | 3/45 | 1,20E-04 | AKR1C1, AKR1C4, AKR1D1 |
| (GO:0008206) | | | | | | |
| Response to cadmium ion | Sinalização celular | Homeostase de íons metálicos | 3/45 | 3/45 | 1,32E-04 | AKR1C3, FOS, JUN |
| (GO:0046686) | | | | | | |
| Regulation of cell death (GO:0010941) | Sinalização celular | Sinalização de morte celular | 4/45 | 4/45 | 2,31E-04 | AKR1C3, JUN, DKK1, IER3 |
| Positive regulation | Sinalização | Sinalização de | 3/45 | 3/45 | 2,39E-04 | FOS, DKK1, EGR1 |

| | | | | | | |
|--|------------------------|--|------|------|----------|---------------------------|
| of neuron death (GO:1901216) | celular | morte celular | | | | |
| Organic hydroxy compound biosynthetic process (GO:1901617) | Metabolismo | Metabolismo de compostos orgânicos | 3/45 | 3/45 | 5,01E-04 | AKR1C4, AKR1C3, AKR1D1 |
| Cellular response to reactive oxygen species (GO:0034614) | Sinalização celular | Espécies reativas de oxigênio | 3/45 | 3/45 | 1,13E-03 | AKR1C3, FOS, JUN |
| Regulation of neuron death (GO:1901214) | Sinalização celular | Sinalização de morte celular | 3/45 | 3/45 | 1,51E-03 | FOS, DKK1, EGR1 |
| Transforming growth factor beta receptor signaling pathway (GO:0007179) | Sinalização celular | Sinalização de citocina | 3/45 | 3/45 | 1,76E-03 | GDF15, FOS, JUN |
| Steroid biosynthetic process (GO:0006694) | Metabolismo | Metabolismo hormonal | 3/45 | 3/45 | 1,97E-03 | AKR1C4, AKR1C3, AKR1D1 |
| Skin development (GO:0043588) | Epiderme | Adesão celular | 3/45 | 3/45 | 3,21E-03 | AKR1C3, CLDN4, SFN |

| | | | | | | |
|---|-------------------------|-------------------------------------|------|------|----------|----------------------------|
| Interleukin-1-mediated signaling pathway (GO:0070498) | Sinalização celular | Sinalização de citocina | 3/45 | 3/45 | 3,31E-03 | MAP2K6, EGR1, SQSTM1 |
| Regulation of cytoskeleton organization (GO:0051493) | Citoesqueleto | Organização de filamento estrutural | 3/45 | 3/45 | 3,31E-03 | ODAM, RHOQ, CAPN2 |
| Cellular response to metal ion (GO:0071248) | Sinalização celular | Homeostase de íons metálicos | 3/45 | 3/45 | 3,81E-03 | AKR1C3, FOS, JUN |
| Cellular response to transforming growth factor beta stimulus (GO:0071560) | Sinalização celular | Sinalização de citocina | 3/45 | 3/45 | 3,81E-03 | GDF15, FOS, JUN |
| Response to endoplasmic reticulum stress (GO:0034976) | Retículo endoplasmático | Estresse no retículo endoplasmático | 3/45 | 3/45 | 4,48E-03 | ATF3, JUN, CEBPB |
| Regulation of cell cycle (GO:0051726) | Núcleo | Regulação do ciclo celular | 4/45 | 4/45 | 4,50E-03 | PIM1, JUN, GADD45B, MAP2K6 |

7 REDES DE CONECTIVIDADE

As redes de conectividade são baseadas em informações sobre interações moleculares e anotados e definidos pela equipe de especialistas anotadores e curadores do MetaCore™. As redes foram formadas pelos DEGs regulados positiva e negativamente e seus primeiros vizinhos que poderiam ser DEGs ou não, para demonstrarmos possibilidades de rotas reguladas pelo ALA. Construímos redes somente para os tratamentos de 2 h com 2,5 mM e 24 h como 25 mM (Figuras 27 e 28) devido ao enriquecimento de poucos processos biológicos nos demais tratamentos e porque eles foram semelhantes aos termos enriquecidos em seus respectivos períodos de tratamento.

As redes de conectividade com as principais sinalizações afetadas pelo tratamento com ALA foram correspondentes às verificadas anteriormente na análise de enriquecimento. A rede do tratamento de 2 h como 2,5 mM foi conectada pelos fatores de transcrição C/EBP e AP-1 e amplamente relacionada à sinalização da cadeia de fosforilação oxidativa (parte superior esquerda) e à resposta a proteína mal enovelada (parte inferior esquerda) pela presença de vários DEGs em ambas as vias. Particularmente, para processos envolvendo o retículo endoplasmático, observamos a participação do complexo sec61 e do gene ATF-6 α . Consistentemente, alguns genes codificantes para proteínas ligantes de Ca²⁺ como calretinina e calreticulina também foram regulados. Na parte superior direita, observamos que ALA modulou, mas sem significância, a sinalização do fator de transcrição NF- κ B e a via apoptótica através de genes Bcl-2, Bak, PUMA e Bax.

Para o tratamento de 24 h como 25 mM, a rede foi conectada pelos fatores de transcrição AP-1, EGR1 e C/EBP. Na parte superior direita, as vias de transdução de sinais de MAPKs e Rho GTPase foram fracamente moduladas. Contudo, alguns genes downstream à sinalização poderiam ser importantes efetores modulados pelo ALA como a β -catenina, o sequestrador 1 (p62), ciclina D1, heme oxigenase 1, aldose redutase e GADD45 β . Na parte superior esquerda, β -catenina, uma proteína envolvida na adesão célula-célula (ABERLE; SCHWARTZ; KEMLER, 1996) e sinalização Wnt, foi regulada negativamente. Supressão da sinalização de β -catenina foi reportada atenuar disfunções hepáticas decorrentes de porfirias (SAGGI et al., 2019). Na parte inferior esquerda, o sequestrador 1 (p62), que atua na modulação de processos autofágicos (PANKIV et al., 2007) e apoptóticos (JIN et al., 2009) foi

modulado positivamente. Ciclina D1 e GADD45 β , envolvidos na transição e parada do ciclo celular foram reprimidos e induzidos, respectivamente. Heme oxigenase 1, que teve sua expressão induzida, promove a degradação de heme, além de possuir propriedades anti-inflamatórias. Aldose reductase, que atua no metabolismo de compostos contendo grupamentos aldeído e cetonas, também foi regulada positivamente.

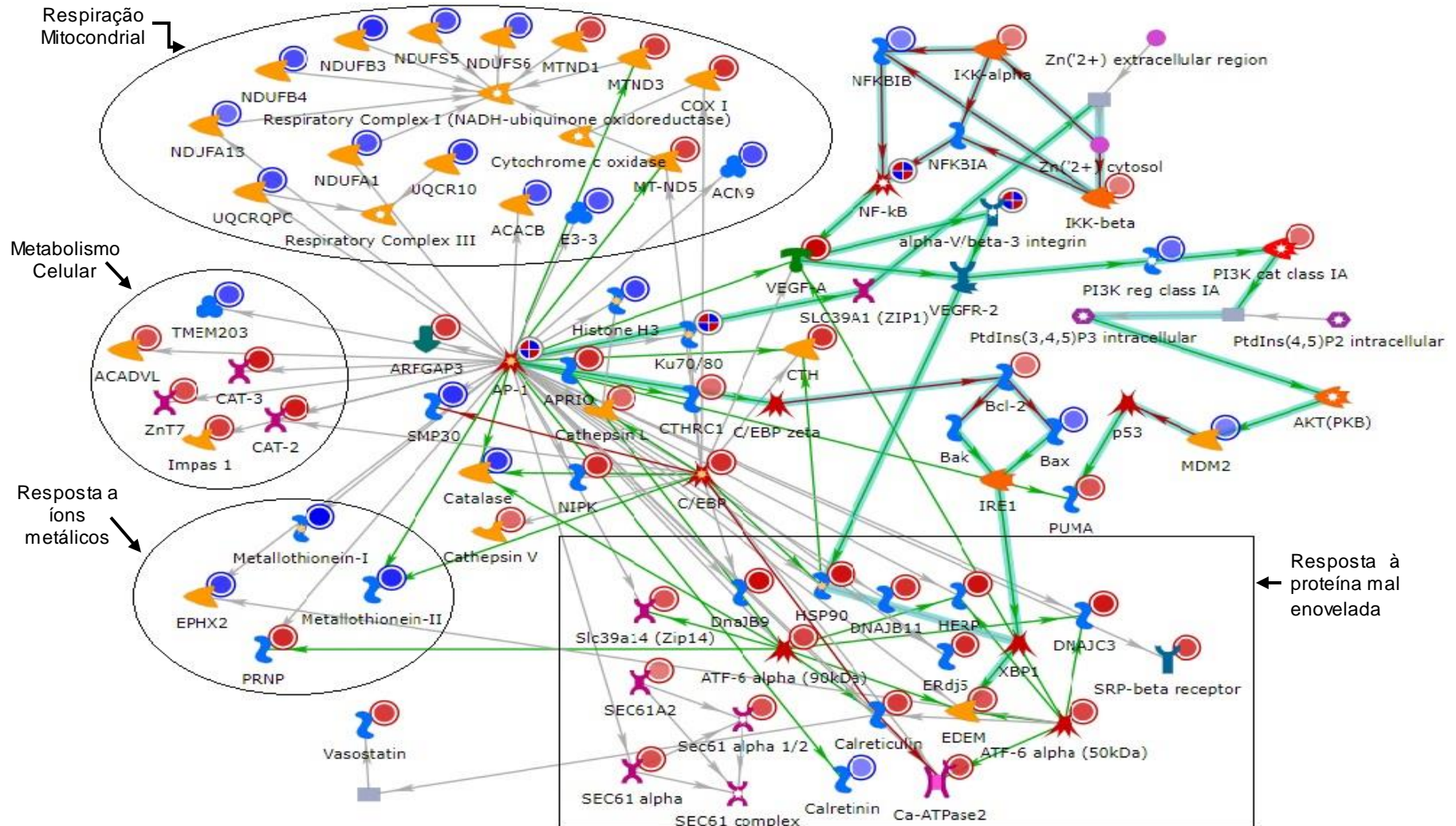


Figura 27 - Rede de conectividade do tratamento de 2 h com 2,5 mM. O círculo localizado à direita de cada símbolo corresponde ao nível de expressão do respectivo gene: círculos vermelhos correspondem aos DEGs regulados positivamente. Os círculos azuis representam os DEGs regulados negativamente. A legenda detalhada da figura está disponível no apêndice B.

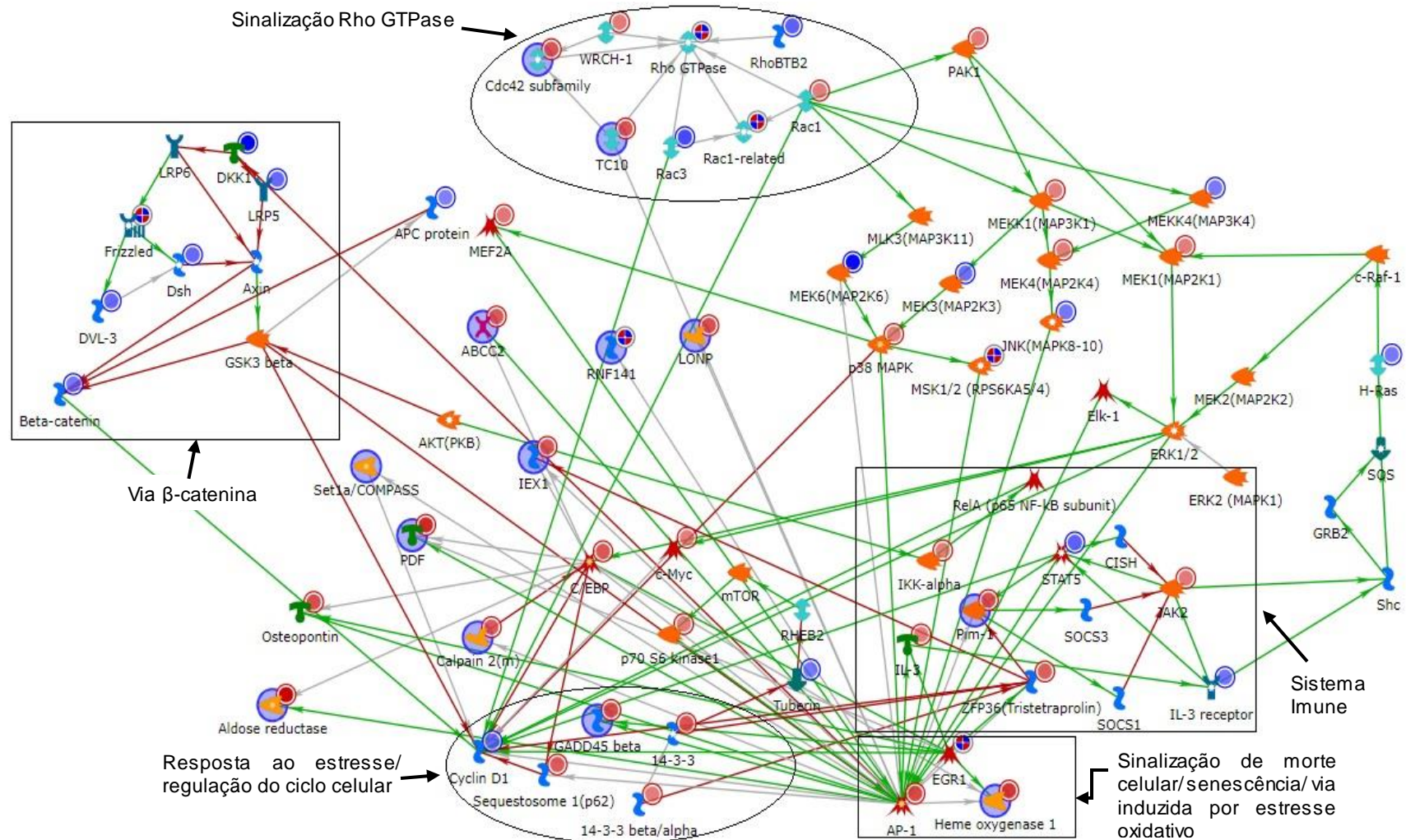


Figura 28 - Rede de conectividade do tratamento de 24 h com 25 mM. O círculo localizado à direita de cada símbolo corresponde ao nível de expressão do respectivo gene: círculos vermelhos correspondem aos DEGs regulados positivamente. Os círculos azuis representam os DEGs regulados negativamente. A legenda detalhada da figura está disponível no apêndice B.

8 DISCUSSÃO

Dados da literatura apontam uma associação entre o acúmulo tecidual de ALA, em concentrações supra-fisiológicas, e a sintomatologia de portadores de porfirias hepáticas agudas, particularmente em portadores de porfiria aguda intermitente (PAI). Durante os episódios de ataques agudos, o sistema neurovisceral de portadores de PAI é afetado produzindo uma gama de manifestações clínicas que variam de acordo com a gravidade dos ataques porfíricos (TILBERY; WILSON; EDNA, 1979). Além disso, é sugerido que a frequência dos ataques, seguida pelo acúmulo de ALA, pode estar correlacionada ao aumento do número de casos de hepatocarcinoma celular em portadores sintomáticos (LANG et al., 2015; LITHNER; WETTERBERG, 1984; SARDH et al., 2013), uma vez que estudos demonstram que ALA pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) sendo genotóxico para hepatócitos (ONUKEI et al., 2002b). Apesar disto, outros processos biológicos regulados por concentrações aumentadas de ALA são fracamente explorados em termos de expressão gênica e vias de sinalização molecular. Deste modo, no presente estudo, caracterizamos as diferenças de expressão gênica de HepG2 tratadas com ALA utilizando a tecnologia de *microarray*. O *microarray* é um método de caráter exploratório amplamente utilizado para identificação de genes diferencialmente expressos (DEGs) (SHANGGUAN; TAN; ZHANG, 2015). Para esta finalidade, utilizamos concentrações supra-fisiológicas de ALA visto que esta é uma molécula endógena, que não é citotóxica por si só e por ser hipotetizado que ALA é potencialmente tóxico quando acumulado no fígado de portadores de PAI (LITHNER; WETTERBERG, 1984). Submetemos células HepG2 ao tratamento com concentrações de 2.5 mM e 25 mM, durante 2 h e 24 h, e analisamos seu perfil transcricional combinando análise de enriquecimento funcional e de vias de sinalização, empregando os bancos de dados KEGG, Reactome e Gene Ontology, com a construção de redes de conectividade. Devido ao experimento ter tido moderado enriquecimento de vias e similaridade dos termos enriquecidos entre os três bancos de dados, optamos pela utilização da categorização e construção de redes de conectividade das vias enriquecidas somente dos “Processos Biológicos” obtidos pelo Gene Ontology cujo banco de dados possui abordagem mais ampla e generalista em comparação com o KEGG e Reactome. Acreditamos que esta

escolha foi mais informativa para nossa compreensão a cerca dos mecanismos regulados pelo ALA.

A clusterização hierárquica dos perfis de expressão dos diferentes tratamentos revelou maior similaridade entre os tratamentos de 2 h e 24 h, com 2,5 mM, e 2 h e 24 h, com 25 mM (Figura 19 e 20). Observamos que, pelo menos parcialmente, os genes apresentaram uma inversão na expressão diferencial entre as duas concentrações. Esse resultado foi um indício de que diferentes níveis de concentração de ALA podem estimular respostas celulares e mecanismos moleculares e distintos.

Com base na análise de bioinformática, encontramos 1437 genes diferencialmente expressos (DEGs) (2 h 2.5 mM= 891; 2 h 25 mM= 10; 24 h 2.5 mM= 470; 24 h 25 mM= 66). Analisando o diagrama de Venn (Figura 21) observamos que apenas dois genes foram comuns a todos os tratamentos: GDF15 e AKR1B10, ambos regulados positivamente (Tabela 6).

O gene GDF15 (“growth differentiation factor 15”) é um membro da superfamília do fator de crescimento TGF- β na qual desempenha importantes funções associadas ao crescimento, proliferação, sobrevivência, migração e apoptose (YAMASHITA; YONETA; HIDA, 2009). Contudo, o nível de expressão de GDF15 é associado à severidade de lesões mitocondriais, sendo considerado um potencial biomarcador (FUJITA et al., 2015). Uma correlação positiva entre GDF15 e protoporfirina IX foi encontrada em portadores de protoporfiria eritropoiética, porém sua associação a danos hepáticos não foi diretamente estabelecida (BARMAN-AKSOEZEN et al., 2017).

O gene AKR1B10 (“aldo-keto reductase family 1 member 10”) é um gene relacionado ao metabolismo de aldeídos, cuja regulação positiva em todos os tratamentos pode estar relacionada com a presença de ácido 4,5-dioxovalérico (DOVA), o aldeído resultante da oxidação do ALA.

A tabela 7 exhibe alguns os DEGs exclusivos de cada tratamento; comparando os genes e suas funções pudemos identificar que os DEGs regulados apontavam para vias de sinalização diferentes. No tratamento de 2 h com 2,5 mM de ALA, observamos que os genes DNAJB9 (“DNAJ heat shock protein family (HSP40), member 9”) HERPUD1 (“Homocysteine inducible ER protein with ubiquitin like domain 1”) e HSP90B1 (“heat shock protein 90 beta family member 1”) foram regulados positivamente e os três estão relacionados com vias de resposta à

proteína mal enovelada (DOMBROSKI et al., 2010). Encontramos os genes GADD45A e GADD45B (“Growth arrest and DNA damage inducible alpha/beta”), como DEGs exclusivos do tratamento de 2 h com 25 mM e 24 h com 25 mM de ALA, respectivamente, o que pode estar relacionado com os danos ao DNA resultante das propriedades pró-oxidantes do ALA, já amplamente descritos na literatura (DOUKI et al., 1998; FRAGA et al., 1994; ONUKI et al., 2002a). Vários DEGs exclusivos foram encontrados no tratamento de 24 h e 2,5 mM, porém a maioria relacionados com o metabolismo de compostos e proteínas. O único gene que achamos relevante citar foi o MALAT1 (“metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1”), que é um regulador da transcrição de vários genes, incluindo alguns envolvidos na metástase e migração celular e também com a regulação da proliferação e adesão celular (LIU; MO; LUO, 2017). No tratamento de 24 h com 25 mM de ALA, foi interessante a presença de DEGs de RNAs não codificantes LINC01173 e LIC02313 (“long intergenic non-protein coding RNA 1173 e 2313”), que estão relacionados à regulação transcricional e pós-transcricional (RANSOHOFF; WEI; KHAVARI, 2018).

Para obtermos mais informações sobre os possíveis mecanismos de ação do ALA nos diferentes tratamentos, realizamos as análises de enriquecimento de vias e processos biológicos.

8.1 Análise de enriquecimento para o tratamento com 2,5 mM e 25 mM

Na análise conjunta do enriquecimento pelo KEGG, Reactome e Processos Biológicos do Gene Ontology para o tratamento de 2 h com 2.5 mM, verificamos que as vias enriquecidas de respiração mitocondrial e cadeia de transporte de elétrons podem estar relacionadas ao aumento da demanda energética celular resultante da via de síntese do heme, ativado pelo ALA exógeno como reportado por Laafi *et al* (LAAFI et al., 2014). Do mesmo modo, a participação de metais como o zinco em várias enzimas como por exemplo na ALA desidratase, presente na síntese do heme, alteraria a necessidade de metais, o que explicaria o enriquecimento de vias das melatotioneínas, que são responsáveis pela regulação da homeostase celular de metais (RUTTKAY-NEDECKY et al., 2013). Interessantemente, as metalotioneínas também apresentam atividades antioxidantes e sua repressão está relacionada ao aumento do estresse oxidativo (NICOLAS et al., 1996). Nesse tratamento, a via que mais se destacou foi a de resposta a proteínas mal enoveladas (“UPR: unfolded

protein response”), um sistema regulador que protege o retículo endoplasmático (ER) da sobrecarga. A UPR é provocada pelo acúmulo de proteína dobradas incorretamente no ER durante períodos de atividade de secreção anormalmente alta (RON; WALTER, 2007) e alguns trabalhos mostram que essa resposta está associada à terapia fotodinâmica (PDT), um tipo de fotoquimioterapia, que utiliza o ALA (0,5 mM - 2 mM) como agente fotossensibilizante, luz e oxigênio para produzir espécies reativas de oxigênio e eliminar células tumorais (ABO-ZEID; ABO-ELFADL; MOSTAFA, 2018; BROEKGAARDEN et al., 2015; NAKAYAMA et al., 2016; WEIJER et al., 2015).

O enriquecimento dos termos da UPR foi mediado pela expressão de genes como HSP90B1, CALR, DNAJC3, CANX e ATF6. Particularmente, CALR e CANX atuam no monitoramento estrutural de proteínas recém-formadas e na manutenção da homeostase de Ca^{2+} (MICHALAK et al., 2009; MICHALAK; PARKER; OPAS, 2002). Além disso, a indução de DNAJC10, OS9, EDEM1, SDF2L1, HERPUD1, DNAJB9 e STT3B é um indicativo de que ALA poderia induzir a via de degradação de proteína associada ao retículo endoplasmático que ubiquitina proteínas danificadas para destruição por proteossomas (LEMUS; GODER, 2014).

Já no tratamento de 2 h e 25 mM, as vias de sinalização enriquecidas no KEGG e no GO estão relacionadas com a regulação do ciclo celular e a via de sinalização de MAPK. O gene GADD45A (“Growth arrest and DNA damage inducible alpha”), que foi um DEG exclusivo desse tratamento, é um dos membros de um grupo de genes cujos níveis de transcrição são aumentados em condições de estresse celular que causam parada de crescimento e de tratamento com agentes que danificam o DNA. A proteína codificada por esse gene responde ao estresse ambiental através da ativação da via p38/JNK pela quinase MTK1/MEKK4. A transcrição desse gene induzida por danos ao DNA é mediada por mecanismos dependentes e independentes de p53 (GU et al., 2000; TONG et al., 2001). Esse resultado indica que o gene GADD45A e as vias associadas podem estar relacionados com a resposta celular aos danos ao DNA causados pelo ALA, pois esse tempo e essa concentração foram os mesmos utilizados em diversos estudos (MENEZES et al., 2018; ONUKI et al., 2004).

Processos biológicos associados à função mitocondrial foram enriquecidos no GO, no tratamento com 2,5 mM de ALA por 24 h. Além disso, regulação de diferenciação de células mielóides e de megacariócitos também enriqueceram.

Essas duas vias podem estar relacionadas com o efeito do ALA na diferenciação de células de mamíferos (LI et al., 1999).

O tratamento de 24 h com 25 mM foi o que enriqueceu o maior número de vias nos três bancos e apresentou vias exclusivas. O gene AKR1B10 que foi um DEG comum entre todos os tratamentos, enriqueceu várias vias, juntamente com outros membros da mesma família de aldo-ceto redutases (AKR1C1, AKR1C3, AKR1C4, AKR1D1). O AKR1B10 participa das reações de fase I do metabolismo de drogas (HANS-J "ORG MARTIN et al., 2006) e na detoxificação de xenobióticos por lipoperoxidação, atuando na redução de grupos funcionais carbonilas de cetonas e aldeídos (BALENDIRAN, 2009) que apresentam similaridades estruturais com o ALA e seu produto final de oxidação, o aldeído DOVA (MONTEIRO et al., 1989). Além disso, a alta concentração de ALA pode ter elevado a produção de heme e consequentemente de ácidos biliares, que são produtos da degradação do heme (JAVITT; RIFKIND; KAPPAS, 1973). A regulação positiva de vários membros da família de aldo-ceto redutases, fez com que houvesse o enriquecimento de outras vias onde essas enzimas também exercem funções metabólicas (metabolismo de prostaglandinas e hormônios esteroides). É interessante citar que o AKR1B10 é reportado ser um contribuinte para a carcinogênese por suprimir a conversão de retinal para ácido retinóico (RUIZ et al., 2009) e que o acúmulo de ácidos biliares pode estar relacionado à disfunção hepatocelular (CHEN et al., 2019).

As outras vias enriquecidas apresentaram processos biológicos interligados que foram considerados os mais relevantes para a compreensão dos mecanismos de ação do ALA. Nos processos biológicos do GO, várias vias relacionadas ao estresse oxidativo foram enriquecidas (resposta celular ao estresse oxidativo, resposta a espécies reativas de oxigênio (ROS), resposta celular a ROS e resposta celular a compostos contendo oxigênio).

A hipótese mais aceita atualmente para explicar a origem dos danos celulares e teciduais provocados por ALA é a indução de um ambiente oxidativo mediante a oxidação de ALA (DOUKI et al., 1998; KARBOWNIK et al., 2000; LAAFI et al., 2014). O desbalanço do ambiente redox intracelular causa efeitos prejudiciais que afetam várias estruturas como membranas lipídicas, DNA e proteínas (DRÖGE, 2002). Vários estudos demonstram evidências dos efeitos pró-oxidantes do ALA como lipoperoxidação (MENEZES et al., 2018; WEISS et al., 2003), oxidação de bases nitrogenadas do DNA in vitro (DOUKI et al., 1998) e in vivo (FRAGA et al., 1994) e

quebras de fitas de DNA (ONUKEI et al., 1994) e promoção de disfunções mitocondriais (LAAFI et al., 2014; ONUKEI et al., 2004). O ambiente de estresse oxidativo pode estar relacionado com o enriquecimento das vias de senescência (fenótipo secretório associado a senescência, senescência celular e senescência induzida por estresse oxidativo) (YOUNG; NARITA, 2009), de regulação do ciclo e morte celular (regulação positiva da morte celular, regulação de morte neuronal) e à proliferação (via de sinalização pelo receptor TGF- β e resposta celular ao TGF- β) (BURDON; GILL; RICE-EVANS, 1989) e da resposta do estresse do retículo (MALHOTRA; KAUFMAN, 2007).

Além disso, muitas vias associadas ao sistema imune e inflamação foram enriquecidas em 24h e 25 mM (sinalização por receptores toll-like, sinalização por IL-1, cascata TLR3/TLR4 mediada por TRIF, cascatas independente e dependente de MyD88, indução pró-inflamatória mediada por TRAF6, indução de NF- κ B e MAP quinases por TRAF6 através da ativação de TLR7/8 ou 9, etc.). A produção de ROS e o desencadeamento de processos inflamatórios são intrinsecamente relacionados, cuja inflamação crônica de baixo grau é uma característica de desordens metabólicas (BAKER; HAYDEN; GHOSH, 2011) e de processos carcinogênicos (WARIS; AHSAN, 2006). Consistentemente, verificamos o enriquecimento das vias de sinalização como “TGF- β ” e “IL-1” e, em especial, múltiplos termos relacionados aos receptores TLRs foram enriquecidos pelo Reactome. Storjord *et al* propuseram que um nível basal de inflamação poderia estar associado à sintomatologia de PAI, após verificação de níveis sistêmicos elevados de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em portadores de PAI. Além disso, esses autores sugeriram que ALA, porfobilinogênio e/ou várias outras porfirinas poderiam atuar como padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (STORJORD et al., 2017), o que coincide com os termos associados aos receptores TLRs observados neste estudo. O envolvimento de porfirinas na indução de estímulos inflamatórios também foi reportado em camundongos *knockout* PBGD^{-/-} injetados semanalmente com hemina para verificação da relação entre a recorrente administração de hemina e a frequência de ataques porfíricos em portadores de PAI (SCOAZEC et al., 2018).

Vários estudos indicam uma correlação entre o estresse oxidativo, o estresse do retículo endoplasmático, a inflamação e a patogênese de doenças (ZHANG, 2010).

A via de transdução de sinais IRE1 α -sXBP1 do retículo endoplasmático regula a expressão de GDF15 e, sob condições de estresse celular, estimula respostas envolvidas em processos inflamatórios, fibróticos e do metabolismo lipídico hepático (LEE et al., 2013). A IRE1 α -sXBP1 atua na lipogênese através da regulação de fatores de transcrição como proteínas de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP) (LEE et al., 2013). O GDF15 é implicado na β -oxidação de ácidos graxos e distúrbios nesta via contribuem para o desenvolvimento de esteatose hepática (CALDWELL et al., 1999). Consequentemente, a resposta à proteína mal enovelada está intimamente relacionada à progressão de distúrbios metabólicos no fígado como a doença do fígado gorduroso não alcoólica e esteato-hepatite não alcoólica (HENKEL; GREEN, 2013). Acúmulo de grânulos de lipídios foram reportadas em fígado de portadores de PAI (BIEMPICA et al., 1974).

8.2 Redes de conectividades gênica para o tratamento de 2 h com 2,5 mM

Os conectores da rede para o tratamento de 2 h com 2.5 mM foram os fatores de transcrição AP-1 e C/EBP. Proteínas c-Fos e c-Jun são componentes de AP-1, sendo este envolvido em uma série de processos celulares como proliferação, diferenciação, apoptose e resposta celular ao estresse (ANGEL; KARIN, 1991).

A análise de vias realizada pelo MetaCore foi concordante com o observado na análise de enriquecimento indicando, entre outras, sinalizações de genes relacionados à função mitocondrial e à resposta à proteína mal enovelada. A mobilização de múltiplos genes relacionados à resposta à proteína mal enovelada sugere que esta via é um importante mecanismo implicado na ação do ALA.

A sinalização gerada por proteínas mitocondriais e citoplasmáticas danificadas promove um aumento da expressão de genes de choque térmico e chaperonas desencadeando a resposta à proteína mal enovelada (SCHRÖDER; KAUFMAN, 2005; SHPILKA; HAYNES, 2018). Em especial, distúrbios no retículo endoplasmático desregulam o tráfego de Ca²⁺ para o lúmen alterando sua homeostase intracelular (CARRERAS-SUREDA; PIHÁN; HETZ, 2018). Íons Ca²⁺ são envolvidos em múltiplas atividades como síntese e secreção de proteínas, expressão gênica e progressão do ciclo (COE; MICHALAK, 2009). Chaperonas ligantes de Ca²⁺ como a calreticulina, regulada positivamente em nosso estudo, monitoram a conformação de proteínas sintetizadas e, quando em altas

concentrações, podem conduzir a apoptose celular (MICHALAK et al., 2009). Outro grupo de proteínas induzidas pelo acúmulo de ALA foi o complexo SEC61 responsável pela translocação intracelular de polipeptídeos (GÖRLICH et al., 1992) e interconecta a importação de proteínas à resposta à proteínas mal enoveladas (SUNDARAM et al., 2017).

8.3 Redes de conectividade gênica para o tratamento de 24 h com 25 mM

Os conectores da rede do tratamento de 24 h com 25 mM também foram fatores de transcrição associados a vias de transdução de sinais estimuladas por uma variedade de estresse celular, incluindo o oxidativo, como o c-EBP/ β , ERK1/2, CREB1, Elk-1 e EGR1 (BAHRAMI; DRABLØS, 2016).

Modificações estruturais em mitocôndrias e a presença destas em vacúolos autofágicos, foram anteriormente reportadas em portadores de PAI (BIEMPICA et al., 1974). O DEG SQSTM1, regulado positivamente pelo ALA, codifica para sequestosome/p62, uma proteína implicada na degradação autofágica de proteínas agregadas (LIU et al., 2016). O sequestosome/p62 é associado à resposta antioxidativa (KOMATSU et al., 2010), à indução de apoptose (JIN et al., 2009) e acumula-se nas mitocôndrias durante o processo de mitofagia (XIAO et al., 2018). Sequestosome/p62 ocorre em inclusões citoplasmáticas e nucleares em várias doenças humanas (KUUSISTO; SALMINEN; ALAFUZOFF, 2001), particularmente participando da formação dos dois tipos de agregados proteicos patogênicos em doenças crônicas hepáticas: corpúsculos de Mallory-Denk, encontrados em esteato-hepatite alcoólica e não-alcoólica, e corpúsculos intracelular de hialina, presentes em hepatocarcinoma (DENK et al., 2006). Corpúsculos de Mallory-Denk foram presentes em fígado de ratos alimentados com o agente porfirinogênico 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC) (ZATLOUKAL et al., 2007).

A parada do ciclo celular e a ativação de checkpoints são eventos que ocorrem frequentemente quando a célula é exposta a agentes que danificam o DNA (MURRAY; CARR, 2018) mediante a expressão de genes como a ciclina D1 e o GADD45B, que foram alterados após o tratamento com ALA. O potencial genotóxico de ALA e seus derivados é bem descrito na literatura tanto *in vivo* quanto *in vitro* (ONUKI et al., 2002c). Em ratos tratados com injeção intraperitoneal de ALA, o nível de 8-oxo-dGuo no DNA de fígado foi 4,5 vezes maior que nos ratos não tratados

(FRAGA et al., 1994). Concentrações crescentes de ALA promoveram danos ao DNA nuclear e mitocondrial de fibroblastos SVNF e células PC12 (ONUUKI et al., 2004). Já foi demonstrado que o DHPY, na presença de íons cobre, é capaz de promover quebras de fita simples de DNA plasmidial e aumento de 8-oxo-dGuo *in vitro* (TEIXEIRA et al., 2001). O ALA e o DOVA apresentam ação mutagênica em cepas de *Salmonella thyphimurium* utilizadas no teste de Ames e também em E.coli PQ37 utilizadas no Cromoteste (ONUUKI et al., 2002a). Em plasmídeo pBR322, ALA e DOVA provocaram oxidação e quebras de fita de DNA provavelmente devido a formação de adutos com dGuo (ONUUKI et al., 1994). A exposição de plasmídeo pUC19 ao ALA, acompanhado de Fe²⁺, induziu quebras de fita de DNA. O Fe²⁺ pode ser crucial para indução de dano ao DNA causado por ALA *in vivo* (ONUUKI et al., 1994).

Pelo menos parcialmente, o ALA exógeno é dirigido às mitocôndrias para participar da via de biossíntese do heme (LAAFI et al., 2014). Deste modo, o aumento da expressão de HMOX1 poderia ser devido ao acúmulo de heme em HepG2, uma vez que a proteína codificada por este gene atua na clivagem do anel tetrapirrólico liberando biliverdina, monóxido de carbono e Fe²⁺, este último conhecido por ser indutor de ROS (KOPPENOL; BOUNDS, 2012). Além disso, o HMOX1 também é implicado em respostas imuno-regulatórias e o aumento da sua expressão tem sido associado ao acúmulo de ALA (FUJINO et al., 2016).

Recentemente, a mobilização do sistema imune tem sido implicada no mecanismo de ação de ALA (STORJORD et al., 2017). O envolvimento de porfirinas na indução de estímulos inflamatórios também foi reportado em camundongos *knockout* PBGD ^{-/-} injetados semanalmente com hemina. Além do acúmulo de hemina, devido à deficiência de PBGD pressupõe-se também o acúmulo de ALA e porfobilinogênio. A expressão gênica de citocinas no tecido hepático desses camundongos foi significativamente induzida como IL-1 β , IL-6, IL-12p40 e TNF- α , consistente com a ativação de macrófagos M1, e IL-10, IL-13, Mrc1, Mgl1, ATF1, Cd91, Cd163 e HMOX1, sugerindo a ativação de macrófagos M2 (SCOAZEC et al., 2018). Além do envolvimento da resposta imune (DONG; DAVIS; FLAVELL, 2002), a via MAPK é envolvida em uma série de vias de transdução de sinais que modulam a diferenciação, proliferação e morte celular (KESHET; SEGER, 2010). Particularmente, o gene MAP3K8 codifica para uma quinase de resposta inflamatória *downstream* aos receptores do tipo Toll (TLR) e dos receptores de TNF- α e IL-1,

sendo ativada mediante a fosforilação e degradação de p105, uma subunidade de NF- κ B (LANG et al., 2004).

A sinalização da resposta inflamatória observada na rede foi *downstream* ao AP-1 pelo HMOX1, IL-3, STAT5, subunidade de NF- κ B p65 e através da família Rho GTPase. Rho GTPase Rac1 desencadeia função chave em respostas inflamatórias (NAGASE et al., 2016) e sua superexpressão promove injúria hepática e fibrose mediante a produção de ROS (CHOI et al., 2006). Além disso, Rho GTPases regulam o citoesqueleto e adesão celular interagindo com quinases (HODGE; RIDLEY, 2016). As vias Rho GTPase e Wnt/ β -catenina são interconectadas e podem ser implicadas na hepatocarcinogênese (EL-SERAG; RUDOLPH, 2007). Rho GTPases são mediadores da sinalização de Wnt (BEHARI et al., 2010). Camundongos *knockout* para a via Wnt/ β -catenina submetidos à dieta contendo DDC apresentaram menor taxa de agregação proteica, melhora na atividade proteossomal e redução de processos autofágicos, consequentemente diminuindo lesões hepáticas desencadeadas pelo acúmulo de porfirinas (SAGGI et al., 2019). A via Wnt/ β -catenina é importante na proteção de hepatócitos contra o estresse oxidativo (TAO et al., 2013) e sua deficiência tem sido demonstrada promover injúria hepática (BEHARI et al., 2010). Além disso, β -catenina parece estar envolvida no metabolismo de xenobióticos e detoxificação de drogas (SEKINE et al., 2006). Apesar de não ter sido DEG, observamos a repressão do gene codificante para β -catenina. Assim como observado para porfirinas, a desregulação de Wnt/ β -catenina e vias correlacionadas como as de Rho GTPases poderiam estar associadas às disfunções celulares causadas pelo ALA.

8.4 Hepatócitos primários de ratos *versus* HepG2

Verificamos similaridades e diferenças entre as proteínas expressas em HPRs e a expressão gênica de HepG2 tratadas com ALA. Em HPRs, o tratamento com ALA 25 mM por 2 h induziu uma diminuição da expressão das proteínas *Bcl-2*, *OGG1* e *HMGCoAr* e um aumento da *p53*. Já as proteínas catalase, *SOD* e *NF- κ B* não tiveram suas expressões alteradas. Notamos que no tratamento de 2 h com 2,5 mM em HepG2, os genes *OGG1*, *NF- κ B*, catalase (*CAT*), superóxido dismutase (*SOD*) e *HMG-CoAr* não tiveram expressão diferencial estatisticamente significativa, apresentando *Log Fold-Change* (LFC) 0,62, -0,14, -1,66, -1,16 e 0,23,

respectivamente. Para o tratamento de 2 h com 25 mM, como observado para a expressão de proteínas em HPRs, os genes *OGG1*, *NF-κB*, *CAT*, *SOD* e *HMG-CoAr*, apresentaram LFC 0,23, 0,29, -0,02, -0,12 e -0,05, respectivamente. Em ambos os tipos celulares, ALA não modulou significativamente a expressão de *NF-κB*. Além de estar envolvido em respostas a ROS, *NF-κB* atua também em respostas imunológicas como a inflamação (LAWRENCE, 2009). Em HPRs, observamos um aumento nos níveis de expressão proteica de p53 juntamente com a diminuição da expressão de *Bcl-2*, sendo esta última envolvida em sinalizações anti-apoptóticas (OPFERMAN; KOTHARI, 2018). A p53 é uma proteína supressora tumoral implicada em funções primordiais como parada do ciclo celular, reparo de DNA e apoptose (VELCULESCU; EL-DEIRY, 1996). Danos ao DNA e outros sinais de estresse celular aumentam a expressão de p53 (MEEK, 2004). Vários estudos relataram que ALA promove lesões em DNA como quebras de fitas simples e oxidação de bases (FRAGA et al., 1994; ONUKI et al., 1994, 2004). Em HepG2, p53 não foi diferencialmente expresso, contudo sinalizações de morte celular reguladas por genes *downstream* ao p53 como PUMA e Bax no tratamento de 2 h com 2,5 mM (Figura 27) e sinalizações de regulação do ciclo celular nos demais tratamentos, como o enriquecimento de vias relacionadas ao ciclo celular em 2 h e 25 mM e à morte celular no tratamento de 24 h com 25 mM poderia ser um indício da modulação de p53 por ALA, como observado para HPRs. Já para a expressão gênica de *Bcl-2* em HepG2, observamos um ligeiro aumento de sua expressão, LFC 0,20 e 0,16 em 2 h com 2,5 mM e 2 h 25 mM, respectivamente.

A dosagem de *CAT* e *SOD* não foi alterada em HPRs provavelmente devido à ativação imediata de vias de morte celular. Em HepG2, observamos ligeira diminuição da expressão destes genes no tratamento de 2h com 2,5 mM e 2 h com 25 mM. Ainda para HPRs, observamos uma diminuição dose-dependente da expressão proteica de *HMG-CoAr*. Já em HepG2, verificamos uma ligeira diminuição da expressão deste gene com LFC -0,05 (2 h e 25 mM).

Vários genes associados ao metabolismo lipídico foram DEGs no tratamento de 2 h com 2,5 mM como *LDLR*, *PCSK9*, *DGAT2*, *EPHX2* e *AKR1C1*, respectivamente. Estes genes são envolvidos na homeostase de colesterol e triglicerídeos. *DGAT2*, uma enzima presente no RE e associada à mitocôndria, catalisa a formação de triglicerídeos a partir de diacilglicerol e Acil-CoA (STONE et al., 2009). Já *PCSK9* regula a concentração de lipoproteína de baixa densidade

(LDL) por induzir a destruição de receptores *LDLR* (LAGACE, 2014). Parker *et al* sugeriram que a homeostase do esterol e a síntese de ácidos biliares, vias de sinalizações enriquecidas em HepG2 (Figura 26), são asseguradas pela inibição combinada de HMG-CoAr e *PCSK9* (PARKER *et al.*, 2013).

9 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que o tratamento de HepG2 com ALA foi capaz de alterar a expressão de vários genes, sendo que o perfil de expressão e as vias enriquecidas no KEGG, Reactome e GO foram substancialmente diferentes entre as concentrações e tempos utilizados. Em suma, as mais notáveis diferenças entre as vias reguladas por ALA de acordo com a concentração e o período de exposição foram: a) 2 h com 2,5 mM, enriquecimento de vias relacionadas à fosforilação oxidativa mitocondrial, homeostase de íons metálicos, e à resposta a proteínas mal enoveladas do retículo endoplasmático; b) 2 h com 25 mM, vias associadas à regulação do ciclo celular; c) 24 h com 2,5 mM, vias relacionadas à fosforilação oxidativa mitocondrial e à diferenciação celular; d) 24 h com 25 mM, vias associadas à processo metabólicos de detoxificação de cetonas e aldeídos, sinalização induzida por estresse oxidativo, regulação de morte celular, senescência, e vias relacionadas à resposta imunológica (Quadro 1).

Esse estudo foi importante para indicar quais processos celulares podem estar envolvidos nos mecanismos de ação diretos e indiretos do ALA e contribuir para melhor compreender seu papel nos sintomas de doenças como as porfirias agudas, principalmente em relação ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em pacientes portadores de PAI.

Quadro 1 - Sumarização das vias enriquecidas pelo “Processos Biológicos” do Gene Ontology em cada tratamento.

| 2 h, 2.5 mM | 24 h, 2.5 mM |
|--|---|
| <p>Fosforilação oxidativa mitocondrial</p> <p>Homeostase de íon metálicos</p> <p>Resposta a proteínas mal enoveladas do retículo endoplasmático</p> <p>Total de DEGs do tratamento/controle: 891 N.º de vias enriquecidas: 19</p> | <p>Fosforilação oxidativa mitocondrial</p> <p>Diferenciação celular</p> <p>Total de DEGs do tratamento/controle: 470 N.º de vias enriquecidas: 4</p> |
| 2 h, 25 mM | 24 h, 25 mM |
| <p>Regulação do ciclo celular</p> <p>Total de DEGs do tratamento/controle: 10 N.º de vias enriquecidas: 1</p> | <p>Estresse oxidativo</p> <p>Sinalização celular induzida por espécies reativas de oxigênio</p> <p>Regulação do ciclo celular</p> <p>Regulação de morte celular</p> <p>Homeostase de íon metálicos</p> <p>Processos metabólicos de detoxificação</p> <p>Estresse no retículo endoplasmático</p> <p>Senescência</p> <p>Respostas imunológicas</p> <p>Total de DEGs do tratamento/controle: 66 N.º de vias enriquecidas: 33</p> |

10 PERSPECTIVAS

As perspectivas para o prosseguimento do trabalho são:

- Validação pela técnica de PCR em tempo real das alterações na expressão gênica.
- Expressão proteica.
- Confirmação das relações entre alteração gênica e os processos celulares afetados através de análises funcionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERLE, H.; SCHWARTZ, H.; KEMLER, R. Cadherin-catenin complex: Protein interactions and their implications for cadherin function. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 61, n. 4, p. 514–523, 1996.
- ABO-ZEID, M. A. M.; ABO-ELFADL, M. T.; MOSTAFA, S. M. Photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid triggered DNA damage of adenocarcinoma breast cancer and hepatocellular carcinoma cell lines. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [s. l.], v. 21, n. January, p. 351–356, 2018.
- AKSHATHA, L. N.; RUKMINI, M. S.; SHENOY, M. T.; SADASHIVA RAO, P.; PRASHANTH, B. Lead poisoning mimicking acute porphyria! **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, [s. l.], v. 8, n. 12, p. 1–2, 2014.
- ANDANT, C.; PUY, H.; BOGARD, C.; FAIVRE, J.; SOULÉ, J. C.; NORDMANN, Y.; DEYBACH, J. C. Hepatocellular carcinoma in patients with acute hepatic porphyria: Frequency of occurrence and related factors. **Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 933–939, 2000.
- ANDANT, C.; PUY, H.; DEYBACH, J. C.; SOULÉ, J. C.; NORDMANN, Y. Occurrence of hepatocellular carcinoma in a case of hereditary coproporphyrin. **The American Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 92, n. 8, p. 1389–90, 1997.
- ANDANT, C.; PUY, H.; FAIVRE, J.; DEYBACH, J.-C. Acute Hepatic Porphyrias and Primary Liver Cancer. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 338, n. 25, p. 1853–1854, 1998.
- ANDERSON, P. M.; REDDY, R. M.; ANDERSON, K. E.; DESNICK, R. J. Characterization of the porphobilinogen deaminase deficiency in acute intermittent porphyria - Immunologic evidence for heterogeneity of the genetic defect. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 1–12, 1981.
- ANDERSSON, C.; LITHNER, F. Hypertension and renal disease in patients with acute intermittent porphyria. **Journal of Internal Medicine**, [s. l.], v. 236, n. 2, p. 169–175, 1994.
- ANGEL, P.; KARIN, M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. **BBA - Reviews on Cancer**, [s. l.], v. 1072, n. 2–3, p. 129–157, 1991.
- ASHBURNER, M.; BALL, C. A.; BLAKE, J. A.; BOTSTEIN, D.; BUTLER, H.;

CHERRY, J. M.; DAVIS, A. P.; DOLINSKI, K.; DWIGHT, S. S.; EPPIG, J. T.; HARRIS, M. A.; HILL, D. P.; ISSEL-TARVER, L.; KASARSKIS, A.; LEWIS, S.; MATESE, J. C.; RICHARDSON, J. E.; RINGWALD, M.; RUBIN, GERALD M. SHERLOCK, G. Gene Ontology: tool for the unification of biology. The gene ontology consortium. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 25–29, 2000.

BAHRAMI, S.; DRABLØS, F. Gene regulation in the immediate-early response process. **Advances in Biological Regulation**, [s. l.], v. 62, n. 7491, p. 37–49, 2016.

BAKER, R. G.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 11–22, 2011.

BALENDIRAN, G. Fibrates in the Chemical Action of Daunorubicin. **Current Cancer Drug Targets**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 366–369, 2009.

BARAVELLI, C. M.; SANDBERG, S.; AARSAND, A. K.; NILSEN, R. M.; TOLLÅNES, M. C. Acute hepatic porphyria and Cancer risk: a nationwide cohort study. **Journal of Internal Medicine**, [s. l.], v. 282, n. 3, p. 229–240, 2017.

BARMAN-AKSOEZEN, J.; GIRELLI, D.; AURIZI, C.; SCHNEIDER-YIN, X.; CAMPOSTRINI, N.; BARBIERI, L.; MINDER, E. I.; BIOLCATI, G. Disturbed iron metabolism in erythropoietic protoporphyria and association of GDF15 and gender with disease severity. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 433–441, 2017.

BEHARI, J.; YEH, T. H.; KRAULAND, L.; OTRUBA, W.; CIEPLY, B.; HAUTH, B.; APTE, U.; WU, T.; EVANS, R.; MONGA, S. P. S. Liver-specific β -catenin knockout mice exhibit defective bile acid and cholesterol homeostasis and increased susceptibility to diet-induced steatohepatitis. **American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 176, n. 2, p. 744–753, 2010.

BENGTSSON, N. O.; HARDELL, L. Porphyrins, porphyrins and hepatocellular cancer. **Br. J. Cancer**, [s. l.], v. 54, p. 115–117, 1986.

BIEMPICA, L.; GOLDFISCHER, S.; KOSOWER, N.; MA, M. H. Hepatic porphyrias. Cytochemical and ultrastructural studies of liver in acute intermittent porphyria and porphyria cutanea tarda. **Arch Pathol**, [s. l.], v. 98, n. 5, p. 336–43, 1974.

BISSELL, D. M.; WANG, B. Review Article Acute Hepatic Porphyria. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, [s. l.], v. 3, p. 17–26, 2015.

BJERSING, L.; ANDERSSON, C.; LITHNER, F. Hepatocellular carcinoma in patients from northern Sweden with acute intermittent porphyria: Morphology and mutations.

Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 393–397, 1996.

BONKOVSKY. Acute porphyrias in the USA. **American Journal of Medicine**, [s. l.], v. 127, n. 12, p. 1233–1241, 2014.

BONKOWSKY, H. L.; SINCLAIR, P. R.; SINCLAIR, J. F. Hepatic heme metabolism and its control. **Yale Journal of Biology and Medicine**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 13–37, 1979.

BRENNAN, M. J. W.; CANTRILL, R. C. δ -Aminolaevulinic acid and amino acid neurotransmitters. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 49–58, 1981.

BROEKGAARDEN, M.; WEIJER, R.; VAN GULIK, T. M.; HAMBLIN, M. R.; HEGER, M. Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular basis for pharmacological inhibition strategies. **Cancer and Metastasis Reviews**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 643–690, 2015.

BURDON, R. H.; GILL, V.; RICE-EVANS, C. Cell proliferation and oxidative stress. **Free Radical Research**, [s. l.], v. 7, n. 3–6, p. 149–159, 1989.

BUTLER, R. A.; GEORGE, S. The Nonenzymatic Cyclic Dimerisation Acid. **Tetrahedron**, [s. l.], v. 48, n. 37, p. 7879–7886, 1992.

BYLESJÖ, I.; WIKBERG, A.; ANDERSSON, C. Clinical aspects of acute intermittent porphyria in northern Sweden: A population-based study. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, [s. l.], v. 69, n. 5, p. 612–618, 2009.

CALDWELL, S. H.; SWERDLOW, R. H.; KHAN, E. M.; IEZZONI, J. C.; HESPENHEIDE, E. E.; PARKS, J. K.; PARKER, W. D. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. **Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 430–434, 1999.

CARNEIRO, R. C.; REITER, R. J. Melatonin protects against lipid peroxidation induced by delta-aminolevulinic acid in rat cerebellum, cortex and hippocampus. **Neuroscience**, [s. l.], v. 82, n. 1, p. 293–299, 1998.

CARRERAS-SUREDA, A.; PIHÁN, P.; HETZ, C. Calcium signaling at the endoplasmic reticulum: fine-tuning stress responses. **Cell Calcium**, [s. l.], v. 70, n. August 2017, p. 24–31, 2018.

CASTELL, J. V.; JOVER, R.; MARTÍNEZ-JIMÉNEZ, C. P.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J. Hepatocyte cell lines: Their use, scope and limitations in drug metabolism studies.

Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 183–212, 2006.

CHEN, E. Y.; TAN, C. M.; KOU, Y.; DUAN, Q.; WANG, Z.; MEIRELLES, G. V.; AND, N. R. C.; MA'AYAN, A. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. **BMC Bioinformatics**, [s. l.], v. 157, n. 4, p. 1–14, 2013.

CHEN, H.; BOUTROS, P. C. Venn Diagram: A package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. **BMC Bioinformatics**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 35, 2011.

CHOI, S. S.; SICKLICK, J. K.; MA, Q.; YANG, L.; HUANG, J.; QI, Y.; CHEN, W.; LI, Y. X.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P. J.; DIEHL, A. M. Sustained activation of Rac1 in hepatic stellate cells promotes liver injury and fibrosis in mice. **Hepatology**, [s. l.], v. 44, n. 5, p. 1267–1277, 2006.

COE, H.; MICHALAK, M. Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. **General Physiology and Biophysics**, [s. l.], v. 28, p. 96–103, 2009.

CROFT, D.; O'KELLY, G.; WU, G.; HAW, R.; GILLESPIE, M.; MATTHEWS, L.; CAUDY, M.; GARAPATI, P.; GOPINATH, G.; JASSAL, B.; JUPE, S.; KALATSKAYA, I.; MAYMAHAJAN, S.; MAY, B.; NDEGWA, N.; SCHMIDT, E.; SHAMOVSKY, V.; YUNG, C.; BIRNEY, E.; HERMJAKOB, H.; D'EUSTACHIO, P.; STEIN, L. Reactome: A database of reactions, pathways and biological processes. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 691–697, 2011.

DEMASI, M.; PENATTI, C. A. A.; DELUCIA, R.; BECHARA, E. J. H. The prooxidant effect of 5-aminolevulinic acid in the brain tissue of rats: Implications in neuropsychiatric manifestations in porphyrias. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 291–299, 1996.

DENK, H.; STUMPTNER, C.; FUCHSBICHLER, A.; MÜLLER, T.; FARR, G. H.; MÜLLER, W.; TERRACCIANO, L.; ZATLOUKAL, K. Are the Mallory bodies and intracellular hyaline bodies in neoplastic and non-neoplastic hepatocytes related? **Journal of Pathology**, [s. l.], v. 208, n. 5, p. 653–661, 2006.

DESJARDINS, P.; CONKLIN, D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], n. 45, p. 1–4, 2010.

DESNICK, R. J.; OSTASIEWICZ, L. T.; TISHLER, P. A.; MUSTAJOKI, P. Acute intermittent porphyria: Characterization of a novel mutation in the structural gene for porphobilinogen deaminase. Demonstration of noncatalytic enzyme intermediates

stabilized by bound substrate. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 76, n. 2, p. 865–874, 1985.

DEYBACH, J.-C.; PUY, H. Hepatocellular carcinoma without cirrhosis: think acute hepatic porphyrias and vice versa. **Journal of Internal Medicine**, [s. l.], v. 269, n. 5, p. 521–524, 2011.

DI MASCIO, P.; TEIXEIRA, P. C.; ONUKI, J.; MEDEIROS, M. H. G.; DÖRNEMANN, D.; DOUKI, T.; CADET, J. DNA damage by 5-aminolevulinic and 4,5-dioxovaleric acids in the presence of ferritin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 373, n. 2, p. 368–374, 2000.

DOMBROSKI, B. A.; NAYAK, R. R.; EWENS, K. G.; ANKENER, W.; CHEUNG, V. G.; SPIELMAN, R. S. Gene Expression and Genetic Variation in Response to Endoplasmic Reticulum Stress in Human Cells. **American Journal of Human Genetics**, [s. l.], v. 86, n. 5, p. 719–729, 2010.

DONG, C.; DAVIS, R. J.; FLAVELL, R. A. Map K Inases in the I Mmune R Esponse . **Annual Review of Immunology**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 55–72, 2002.

DOUKI, T.; ONUKI, J.; MEDEIROS, M. H. G.; BECHARA, E. J. H.; CADET, J.; DI MASCIO, P. Hydroxyl radicals are involved in the oxidation of isolated and cellular DNA bases by 4-aminolevulinic acid. **Febs Letters**, [s. l.], v. 428, n. 1–2, p. 93–96, 1998.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 82, n. 1, p. 47–95, 2002.

EL-SERAG, H. B.; RUDOLPH, K. L. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 132, n. 7, p. 2557–2576, 2007.

FLODERUS, Y.; SARDH, E.; MÖLLER, C.; ANDERSSON, C.; REJKJAER, L.; ANDERSSON, D. E. H.; HARPER, P. Variations in porphobilinogen and 5-aminolevulinic acid concentrations in plasma and urine from asymptomatic carriers of the acute intermittent porphyria gene with increased porphyrin precursor excretion. **Clinical Chemistry**, [s. l.], v. 52, n. 4, p. 701–707, 2006.

FRAGA, C. G.; ONUKI, J.; LUCESOLI, F.; BECHARA, E. J. H.; MASCIO, P. Di. 5-aminolevulinic acid mediates the in vivo and in vitro formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. **Carcinogenesis**, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 2241–2244, 1994.

FRIESEN, J. A.; RODWELL, V. W. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A

- (HMG-CoA) reductases. **Genome Biology**, [s. l.], v. 5, n. 11, 2004.
- FUJINO, M.; NISHIO, Y.; ITO, H.; TANAKA, T.; LI, X. K. 5-Aminolevulinic acid regulates the inflammatory response and alloimmune reaction. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 37, p. 71–78, 2016.
- FUJITA, Y.; ITO, M.; KOJIMA, T.; YATSUGA, S.; KOGA, Y.; TANAKA, M. GDF15 is a novel biomarker to evaluate efficacy of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. **Mitochondrion**, [s. l.], v. 20, p. 34–42, 2015.
- FURY, W.; BATLIWALLA, F.; GREGERSEN, P. K.; LI, W. Overlapping probabilities of top ranking gene lists, hypergeometric distribution, and stringency of gene selection criterion. In: CONF PROC IEEE ENG MED BIOL SOC 2006, **Anais... : IEEE**, 2006.
- GERMANAUD, J.; LUTHIER, F.; CAUSSE, X.; KERDRAON, R.; GROSSETTI, D.; GARGOT, D.; NORDMANN, Y. A case of association between hepatocellular carcinoma and porphyria variegata. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 29, n. 7, p. 671–2, 1994.
- GÖRLICH, D.; PREHN, S.; HARTMANN, E.; KALIES, K. U.; RAPOPORT, T. A. A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. **Cell**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 489–503, 1992.
- GOTO, M. K. and S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 27–30, 2000.
- GU, X.; CHICAS, A.; OLMIER, M.; TAYA, Y.; TYAGI, S.; KRAMER, F. R.; BARGONETTI, J. A DNA damage signal is required for p53 to activate gadd45. **Cancer Research**, [s. l.], v. 60, n. 6, p. 1711–1719, 2000.
- GUBLER, J. G.; BARGETZI, M. J.; MEYER, U. A. Primary liver carcinoma in two sisters with acute intermittent porphyria. **The American Journal of Medicine**, [s. l.], v. 89, n. 4, p. 541, 1990.
- GUGUEN-GUILLOUZO, C.; GUILLOUZO, A. **Methods for preparation of adult and fetal hepatocytes. In Research in Isolated and Cultured Hepatocytes**. INSERM ed. Paris.
- HANDSCHIN, C.; LIN, J.; RHEE, J.; PEYER, A. K.; CHIN, S.; WU, P. H.; MEYER, U. A.; SPIEGELMAN, B. M. Nutritional regulation of hepatic heme biosynthesis and porphyria through PGC-1 α . **Cell**, [s. l.], v. 122, n. 4, p. 505–515, 2005.
- HANS-J ÖRG MARTIN; BREYER-PFAFF, U.; WSOL, V.; VENZ, S.; BLOCK, S.;

- MASER, E. Purification and characterization of akr1b10 from human liver: role in carbonyl reduction of xenobiotics. **Pharmacology**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 464–470, 2006.
- HEMANN, M.; LOWE, S. The p53–Bcl-2 connection. **Cell Death & Differentiation**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 1256–1259, 2006.
- HENKEL, A.; GREEN, R. M. The unfolded protein response in fatty liver disease. **Seminars in Liver Disease**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 321–329, 2013.
- HERNANDEZ-GEA, V.; TOFFANIN, S.; FRIEDMAN, S. L.; LLOVET, J. M. Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 144, n. 3, p. 512–527, 2013.
- HIFT, R. J.; MEISSNER, P. N. An analysis of 112 acute porphyric attacks in Cape Town, South Africa: Evidence that acute intermittent porphyria and variegate porphyria differ in susceptibility and severity. **Medicine**, [s. l.], v. 84, n. 1, p. 48–60, 2005.
- HINDMARSH, J. T. Clinical Disorders of Porphyrin Metabolism. **Clinical Biochemistry**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 209–219, 1982.
- HINDMARSH, J. T. The porphyrias: Recent advances. **Clinical Chemistry**, [s. l.], v. 32, n. 7, p. 1255–1263, 1986.
- HODGE, R. G.; RIDLEY, A. J. Regulating Rho GTPases and their regulators. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 496–510, 2016.
- INNALA, E.; ANDERSSON, C. Screening for hepatocellular carcinoma in acute intermittent porphyria: a 15-year follow-up in northern Sweden. **Journal of Internal Medicine**, [s. l.], v. 269, n. 5, p. 538–545, 2011.
- JAVITT, N. B.; RIFKIND, A.; KAPPAS, A. Porphyrin-heme pathway: Regulation by intermediates in bile acid synthesis. **Science**, [s. l.], v. 182, n. 4114, p. 841–842, 1973.
- JIANG, L.; BERRAONDO, P.; JERICÓ, D.; GUEY, L. T.; SAMPEDRO, A.; FRASSETTO, A.; BENENATO, K. E.; BURKE, K.; SANTAMARÍA, E.; ALEGRE, M.; PEJENAUTE, Á.; KALARIYA, M.; BUTCHER, W.; PARK, J. S.; ZHU, X.; SABNIS, S.; KUMARASINGHE, E. S.; SALERNO, T.; KENNEY, M.; LUKACS, C. M.; ÁVILA, M. A.; MARTINI, P. G. V.; FONTANELLAS, A. Systemic messenger RNA as an etiological treatment for acute intermittent porphyria. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 24, n. 12, p. 1899–1909, 2018.

- JIN, Z.; LI, Y.; PITTI, R.; LAWRENCE, D.; PHAM, V. C.; LILL, J. R.; ASHKENAZI, A. Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. **Cell**, [s. l.], v. 137, n. 4, p. 721–735, 2009.
- KARBOWNIK, M.; REITER, R. J.; GARCIA, J. J.; TAN, D. X.; QI, W.; MANCHESTER, L. C. Melatonin reduces rat hepatic macromolecular damage due to oxidative stress caused by [delta]-aminolevulinic acid. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s. l.], v. 1523, n. 2–3, p. 140–146, 2000.
- KAUPPINEN, R.; MUSTAJOKI, P. Acute hepatic porphyria and hepatocellular carcinoma. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 117–120, 1988.
- KESHET, Y.; SEGER, R. **The MAP Kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions**. Second Edi ed. New Jersey: Springer, 2010. v. 250
- KLUNGLAND, A.; BJELLAND, S. Oxidative damage to purines in DNA: Role of mammalian Ogg1. **DNA Repair**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 481–488, 2007.
- KOMATSU, M.; KUROKAWA, H.; WAGURI, S.; TAGUCHI, K.; KOBAYASHI, A.; ICHIMURA, Y.; SOU, Y. S.; UENO, I.; SAKAMOTO, A.; TONG, K. I.; KIM, M.; NISHITO, Y.; IEMURA, S. I.; NATSUME, T.; UENO, T.; KOMINAMI, E.; MOTOHASHI, H.; TANAKA, K.; YAMAMOTO, M. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 213–223, 2010.
- KOPPENOL, W. H.; BOUNDS, P. L. **Redox-active metals: Iron and copper**. Principles ed. New York: Nova Sci, 2012.
- KUUSISTO, E.; SALMINEN, A.; ALAFUZOFF, I. Ubiquitin-binding protein p62 is present in neuronal and glial inclusions in human tauopathies and synucleinopathies. **NeuroReport**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 2085–2090, 2001.
- LAAFI, J.; HOMEDAN, C.; JACQUES, C.; GUEGUEN, N.; SCHMITT, C.; PUY, H.; REYNIER, P.; CARMEN MARTINEZ, M.; MALTHIÈRY, Y. Pro-oxidant effect of ALA is implicated in mitochondrial dysfunction of HepG2 cells. **Biochimie**, [s. l.], v. 106, p. 157–166, 2014.
- LANG, E.; SCHÄFER, M.; SCHWENDER, H.; NEUMANN, N. J.; FRANK, J. Occurrence of Malignant Tumours in the Acute Hepatic Porphyrias. **JIMD reports**, [s. l.], v. 22, p. 17–22, 2015.
- LANG, V.; SYMONS, A.; WATTON, S. J.; JANZEN, J.; SONEJI, Y.; BEINKE, S.;

- HOWELL, S.; LEY, S. C. ABIN-2 Forms a Ternary Complex with TPL-2 and NF- κ B p105 and Is Essential for TPL-2 Protein Stability. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 24, n. 12, p. 5235–5248, 2004.
- LAWRENCE, T. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 6, p. 1–11, 2009.
- LEE, A.-H.; SCAPA, E. F.; COHEN, D. E.; GLIMCHER, L. H. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. **Science**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 233–236, 2013.
- LEMUS, L.; GODER, V. Regulation of Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation (ERAD) by Ubiquitin. **Cells**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 824–847, 2014.
- LI, G.; SZEWCZUK, M. R.; POTTIER, R. H.; KENNEDY, J. C. Effect of Mammalian Cell Differentiation on Response to Exogenous 5-Aminolevulinic Acid. **Photochemistry and Photobiology**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 231–235, 1999.
- LINDBERG, R. L. P.; MARTINI, R.; BAUMGARTNER, M.; ERNE, B.; BORG, J.; ZIELASEK, J.; RICKER, K.; STECK, A.; TOYKA, K. V.; MEYER, U. A. Motor neuropathy in porphobilinogen deaminase-deficient mice imitates the peripheral neuropathy of human acute porphyria. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 103, n. 8, p. 1127–1134, 1999.
- LINDBERG, R. L. P.; PORCHER, C.; GRANDCHAMP, B.; LEDERMANN, B.; BÜRKI, K.; BRANDNER, S.; AGUZZI, A.; MEYER, U. A. Porphobilinogen deaminase deficiency in mice causes a neuropathy resembling that of human hepatic porphyria. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 195–199, 1996.
- LITHNER, F.; WETTERBERG, L. Hepatocellular Carcinoma in Patients with Acute Intermittent Porphyria. **Acta Medica Scandinavica**, [s. l.], v. 215, n. 3, p. 271–274, 1984.
- LIU, J.; MO, Y.; LUO, D. MALAT1-mediated tumorigenesis 4 . EXPRESSION OF MALAT1 IN CANCER 3 . STRUCTURE AND BIOGENESIS OF. **Frontiers in Bioscience**, [s. l.], n. 1, p. 66–80, 2017.
- LIU, W. J.; YE, L.; HUANG, W. F.; GUO, L. J.; XU, Z. G.; WU, H. L.; YANG, C.; LIU, H. F. P62 Links the Autophagy Pathway and the Ubiquitin-Proteasome System Upon Ubiquitinated Protein Degradation. **Cellular and Molecular Biology Letters**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 1–14, 2016.
- LLOVET, J. M.; ZUCMAN-ROSSI, J.; PIKARSKY, E.; SANGRO, B.; SCHWARTZ,

M.; SHERMAN, M.; GORES, And G. Hepatocellular carcinoma. **The Lancet**, [s. l.], v. 391, n. 10127, p. 1301–1314, 2018.

LOK, A. S.; SEEFF, L. B.; MORGAN, T. R.; DI BISCEGLIE, A. M.; STERLING, R. K.; CURTO, T. M.; EVERSON, G. T.; LINDSAY, K. L.; LEE, W. M.; BONKOVSKY, H. L.; DIENSTAG, J. L.; GHANY, M. G.; MORISHIMA, C.; GOODMAN, Z. D. Incidence of Hepatocellular Carcinoma and Associated Risk Factors in Hepatitis C-Related Advanced Liver Disease. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 136, n. 1, p. 138–148, 2009.

LONGO, D. L. Porphyrin. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 377, n. 9, p. 862–872, 2017.

MAITRA, D.; ELENBAAS, J. S.; WHITESALL, S. E.; BASRUR, V.; D’ALECY, L. G.; OMARY, M. B. Ambient light promotes selective subcellular proteotoxicity after endogenous and exogenous porphyrinogenic stress. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 290, n. 39, p. 23711–23724, 2015.

MALHOTRA, J. D.; KAUFMAN, R. J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: A vicious cycle or a double-edged sword? **Antioxidants and Redox Signaling**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 2277–2293, 2007.

MARION, B.; REJESKI, J.; RUDNICK, S.; BONKOVSKY, H. L.; BONKOVSKY, H. L.; E-, N. R. C.; FOREST, W. Porphyrins – An overview and update for physicians and their staffs. **Medical Research Archives - KE**, [s. l.], v. 5, n. 9, p. 1–22, 2017.

MARTHA S. LINET; GRIDLEY, G.; NYREN, O.; MELLEMKJAER, L.; OLSEN, J. H.; KEEHN, S.; ADAMI, H.-O.; JOSEPH F. FRAUMENI, J. Primary liver cancer, other malignancies, and mortality risks following porphyria: A cohort study in Denmark and Sweden. **American Journal of Epidemiology**, [s. l.], v. 149, n. 11, p. 1010–1015, 1999.

MEDLOCK, A. E.; MEISSNER, P. N.; DAVIDSON, B. P.; CORRIGALL, A. V.; DAILEY, H. A. A mouse model for South African (R59W) variegate porphyria: construction and initial characterization. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 71–78, 2002.

MEEK, D. W. The p53 response to DNA damage. **DNA Repair**, [s. l.], v. 3, n. 8–9, p. 1049–1056, 2004.

MENEZES, P. R.; GONZÁLEZ, C. B.; DESOUZA, A. O.; MARIA, D. A.; ONUKI, J. Effect of 5-aminolevulinic acid on the expression of carcinogenesis-related proteins in cultured primary hepatocytes. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 45, n. 6, p.

2801–2809, 2018.

MEYER, U. A.; SCHUURMANS, M. M.; LINDBERG, R. L. P. Acute porphyrias: Pathogenesis of neurological manifestations. **Seminars in Liver Disease**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 43–52, 1998.

MICHALAK, M.; GROENENDYK, J.; SZABO, E.; GOLD, L. I.; OPAS, M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 417, n. 3, p. 651–666, 2009.

MICHALAK, M.; PARKER, J. M. R.; OPAS, M. Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. **Cell Calcium**, [s. l.], v. 32, n. 5–6, p. 269–278, 2002.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical biochemistry**, [s. l.], v. 86, n. 1, p. 271–8, 1978.

MONTEIRO, H. P.; ABDALLA, D. S.; FALJONI-ALÁRIO, A.; BECHARA, E. J. Generation of active oxygen species during coupled autoxidation of oxyhemoglobin and 8-aminolevulinic acid. **Biochimica et biophysica acta**, [s. l.], v. 881, n. 1, p. 100–106, 1986.

MONTEIRO, H. P.; ABDALLA, D. S. P.; AUGUSTO, O.; BECHARA, E. J. H. Free radical generation during δ-Aminolevulinic acid autoxidation: Induction by hemoglobin and connections with porphyriopathies. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 271, n. 1, p. 206–216, 1989.

MURRAY, J. M.; CARR, A. M. Integrating DNA damage repair with the cell cycle. **Current Opinion in Cell Biology**, [s. l.], v. 52, p. 120–125, 2018.

NAGASE, M.; KURIHARA, H.; AIBA, A.; YOUNG, M. J.; SAKAI, T. Deletion of Rac1GTPase in the myeloid lineage protects against inflammation-mediated kidney injury in Mice. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 1–17, 2016.

NAKAYAMA, T.; OTSUKA, S.; KOBAYASHI, T.; OKAJIMA, H.; MATSUMOTO, K.; HAGIYA, Y.; INOUE, K.; SHUIN, T.; NAKAJIMA, M.; TANAKA, T.; OGURA, S. I. Dormant cancer cells accumulate high protoporphyrin IX levels and are sensitive to 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. October, p. 1–6, 2016.

NICOLAS, M. G.; FUJIKI, K.; MURAYAMA, K.; SUZUKI, M. T.; SHINDO, N.; HOTTA, Y.; IWATA, F.; FUJIMURA, T.; YOSHIKAWA, Y.; CHO, F.; KANAI, A. Studies on the

mechanism of early onset macular degeneration in cynomolgus monkeys. II. Suppression of metallothionein synthesis in the retina in oxidative stress. **Experimental Eye Research**, [s. l.], v. 62, n. 4, p. 399–408, 1996.

NOBLE, J. E. **Quantification of protein concentration using UV absorbance and coomassie dyes**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2014. v. 536

NORIEGA, G. O.; TOMARO, M. L.; DEL BATLLE, A. M. C. Bilirubin is highly effective in preventing in vivo δ -aminolevulinic acid-induced oxidative cell damage. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, [s. l.], v. 1638, n. 2, p. 173–178, 2003.

ONUKI, J.; CHEN, Y.; TEIXEIRA, P. C.; SCHUMACHER, R. I.; MEDEIROS, M. H. G.; VAN HOUTEN, B.; DI MASCIO, P. Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by 5-aminolevulinic acid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 432, n. 2, p. 178–187, 2004.

ONUKI, J.; MEDEIROS, M. H. G.; BECHARA, E. J. H.; MASCIO, P. Di. 5-Aminolevulinic acid induces single-strand breaks in plasmid pBR322 DNA in the presence of Fe²⁺ ions. **BBA - Molecular Basis of Disease**, [s. l.], v. 1225, n. 3, p. 259–263, 1994.

ONUKI, J.; RECH, C. M.; MEDEIROS, M. H. G.; UMBUZEIRO, G. D. A.; DI MASCIO, P. Genotoxicity of 5-aminolevulinic and 4,5-dioxovaleric acids in the salmonella/microsuspension mutagenicity assay and SOS chromotest. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 63–70, 2002. a.

ONUKI, J.; TEIXEIRA, P. C.; MEDEIROS, M. H. G.; DORNEMANN, D.; DOUKI, T.; CADET, J.; MASCIO, P. Di. Is 5-aminolevulinic acid involved in the hepatocellular carcinogenesis of acute intermittent porphyria? **Cellular and Molecular Biology**, [s. l.], p. 17–26, 2002. b.

ONUKI, J.; TEIXEIRA, P. C.; MEDEIROS, M. H. G.; MASCIO, P. Di. Danos ao DNA promovidos por ácido 5-aminolevulínico: Possível associação com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em portadores de porfiria aguda intermitente. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 594–608, 2002. c.

OPFERMAN, J. T.; KOTHARI, A. Anti-apoptotic BCL-2 family members in development. **Cell Death and Differentiation**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 37–45, 2018.

OSTERNACK, B. R. Porphyria: Analysis of Register from Brazilian Association of Porphyria (ABRAPO). **Hematology & Transfusion International Journal**, [s. l.], v.

2, n. 6, p. 2015–2017, 2016.

PANKIV, S.; CLAUSEN, T. H.; LAMARK, T.; BRECH, A.; BRUUN, J. A.; OUTZEN, H.; ØVERVATN, A.; BJØRKØY, G.; JOHANSEN, T. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy*[S]. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 282, n. 33, p. 24131–24145, 2007.

PARKER, R. A.; GARCIA, R.; RYAN, C. S.; LIU, X.; SHIPKOVA, P.; LIVANOV, V.; PATEL, P.; HO, S. P. Bile acid and sterol metabolism with combined HMG-CoA reductase and PCSK9 suppression. **Journal of Lipid Research**, [s. l.], v. 54, n. 9, p. 2400–2409, 2013.

PEOC'H, K.; MANCEAU, H.; KARIM, Z.; WAHLIN, S.; GOUYA, L.; PUY, H.; DEYBACH, J. C. Hepatocellular carcinoma in acute hepatic porphyrias: A Damocles Sword. **Molecular Genetics and Metabolism**, [s. l.], n. August, p. 1–6, 2018.

PUY, H.; GOUYA, L.; DEYBACH, J. C. Porphyrias. **The Lancet**, [s. l.], v. 375, n. 9718, p. 924–937, 2010.

QIU, G. H.; XIE, X.; XU, F.; SHI, X.; WANG, Y.; DENG, L. Distinctive pharmacological differences between liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B. **Cytotechnology**, [s. l.], v. 67, n. 1, p. 1–12, 2014.

RAMANUJAM, V. M. S.; ANDERSON, K. E. Porphyria diagnostics-part 1: A brief overview of the porphyrias. **Current Protocols in Human Genetics**, [s. l.], p. 1–36, 2015.

RANSOHOFF, J. D.; WEI, Y.; KHAVARI, P. A. The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 143–157, 2018.

RAWLA, P.; SUNKARA, T.; MURALIDHARAN, P.; RAJ, J. P. Update in global trends and aetiology of hepatocellular carcinoma. **Contemporary Oncology**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 141–150, 2018.

RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 519–529, 2007.

RUIZ, F. X.; GALLEGRO, O.; ARDÈVOL, A.; MORO, A.; DOMÍNGUEZ, M.; ALVAREZ, S.; ALVAREZ, R.; DE LERA, A. R.; ROVIRA, C.; FITA, I.; PARÉS, X.; FARRÉS, J. Aldo-keto reductases from the AKR1B subfamily: Retinoid specificity and control of

cellular retinoic acid levels. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 178, n. 1–3, p. 171–177, 2009.

RUTTKAY-NEDECKY, B.; NEJDL, L.; GUMULEC, J.; ZITKA, O.; MASARIK, M.; ECKSCHLAGER, T.; STIBOROVA, M.; ADAM, V.; KIZEK, R. The role of metallothionein in oxidative stress. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 6044–6066, 2013.

SAGGI, H.; MAITRA, D.; JIANG, A.; ZHANG, R.; WANG, P.; CORNUET, P.; SINGH, S.; LOCKER, J.; MA, X.; DAILEY, H.; ABRAMS, M.; OMARY, M. B.; MONGA, S. P.; NEJAK-BOWEN, K. Loss of hepatocyte β -catenin protects mice from experimental porphyria-associated liver injury. **Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 70, n. 1, p. 108–117, 2019.

SARDH, E.; WAHLIN, S.; BJÖRNSTEDT, M.; HARPER, P.; ANDERSSON, D. E. H. High risk of primary liver cancer in a cohort of 179 patients with Acute Hepatic Porphyria. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, [s. l.], v. 36, n. 6, p. 1063–1071, 2013.

SASAKI, Y. Does oxidative stress participate in the development of hepatocellular carcinoma? **Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 41, n. 12, p. 1135–1148, 2006.

SASSA, S.; KAPPAS, A. Hereditary tyrosinemia and the heme biosynthetic pathway. Profound inhibition of δ -aminolevulinic acid dehydratase activity by succinylacetone. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 625–634, 1983.

SASSA, S.; KAPPAS, A. Molecular aspects of the inherited porphyrias. **Journal of Internal Medicine**, [s. l.], v. 247, n. 2, p. 169–178, 2000.

SCHNEIDER-YIN, X.; VAN TUYLL VAN SEROOSKERKEN, A. M.; SIEGESMUND, M.; WENT, P.; BARMAN-AKSÖZEN, J.; BLADERGROEN, R. S.; KOMMINOTH, P.; CLOOTS, R. H. E.; WINNENPENNINCKX, V. J.; ZUR HAUSEN, A.; WEBER, M.; DRIESSEN, A.; POBLETE-GUTIÉRREZ, P.; BAUER, P.; SCHROEDER, C.; VAN GEEL, M.; MINDER, E. I.; FRANK, J. Biallelic inactivation of protoporphyrinogen oxidase and hydroxymethylbilane synthase is associated with liver cancer in acute porphyrias. **Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 734–738, 2015.

SCHRÖDER, M.; KAUFMAN, R. J. ER stress and the unfolded protein response. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [s. l.], v. 569, n. 1–2, p. 29–63, 2005.

SCHROEDER, A.; MUELLER, O.; STOCKER, S.; SALOWSKY, R.; LEIBER, M.;

GASSMANN, M.; LIGHTFOOT, S.; MENZEL, W.; GRANZOW, M.; RAGG, T. The RIN: An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Molecular Biology**, [s. l.], v. 7, p. 1–14, 2006.

SCHULZE, K.; NAULT, J. C.; VILLANUEVA, A. Genetic profiling of hepatocellular carcinoma using next-generation sequencing. **Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 65, n. 5, p. 1031–1042, 2016.

SCOAZEC, J.-Y.; SANDBERG, S.; SARDH, E.; HARPER, P.; DEYBACH, J.-C.; BENECKE, A.; CHICHE, L.; ABIAN, J.; LEFEBVRE, T.; PUY, H.; HOV, J. R.; KARIM, Z.; CARRASCAL, M.; PARADIS, V.; BAZILLE, C.; MIRMIRAN, A.; LETTERON, P.; GOUYA, L.; SCHMITT, C.; YU, A.; TO-FIGUERAS, J.; AARSAND, A. K.; DELABY, C.; SANDVIK, A. K.; LENGLET, H.; WAHLIN, S.; MANCEAU, H.; PEOC'H, K. Recurrent attacks of acute hepatic porphyria: major role of the chronic inflammatory response in the liver. **Journal of Internal Medicine**, [s. l.], v. 284, n. 1, p. 78–91, 2018.

SEKINE, S.; LAN, B. Y. A.; BEDOLLI, M.; FENG, S.; HEBROK, M. Liver-specific loss of β -catenin blocks glutamine synthesis pathway activity and cytochrome P450 expression in mice. **Hepatology**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 817–825, 2006.

SHANGGUAN, H.; TAN, S. Y.; ZHANG, J. R. Bioinformatics analysis of gene expression profiles in hepatocellular carcinoma. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 11, p. 2054–2061, 2015.

SHPILKA, T.; HAYNES, C. M. The mitochondrial UPR: Mechanisms, physiological functions and implications in ageing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 109–120, 2018.

SILVER, J. D.; RITCHIE, M. E.; SMYTH, G. K. Microarray background correction: Maximum likelihood estimation for the normal-exponential convolution. **Biostatistics**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 352–363, 2009.

SOONAWALLA, Z. F.; ORUG, T.; BADMINTON, M. N.; ELDER, G. H.; RHODES, J. M.; BRAMHALL, S. R.; ELIAS, E. Liver transplantation as a cure for acute intermittent porphyria. **Lancet**, [s. l.], v. 363, n. 9410, p. 705–706, 2004.

STEIN, P. E.; BADMINTON, M. N.; REES, D. C. Update review of the acute porphyrias. **British Journal of Haematology**, [s. l.], v. 176, n. 4, p. 527–538, 2017.

STENSON, P. D.; MORT, M.; BALL, E. V.; SHAW, K.; PHILLIPS, A. D.; COOPER, D. N. The Human Gene Mutation Database: Building a comprehensive mutation

repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. **Human Genetics**, [s. l.], v. 133, n. 1, p. 1–9, 2014.

STORJORD, E.; DAHL, J. A.; LANDSEM, A.; FURE, H.; LUDVIKSEN, J. K.; GOLDBECK-WOOD, S.; KARLSEN, B. O.; BERG, K. S.; MOLLNES, T. E.; W. NIELSEN, E.; BREKKE, O. L. Systemic inflammation in acute intermittent porphyria: a case–control study. **Clinical and Experimental Immunology**, [s. l.], v. 187, n. 3, p. 466–479, 2017.

SUNDARAM, A.; PLUMB, R.; APPATHURAI, S.; MARIAPPAN, M. The Sec61 translocon limits IRE1 α signaling during the unfolded protein response. **eLife**, [s. l.], v. 6, p. 1–20, 2017.

TAO, G. Z.; LEHWALD, N.; JANG, K. Y.; BAEK, J.; XU, B.; OMARY, M. B.; SYLVESTER, K. G. Wnt/ β -catenin signaling protects mouse liver against oxidative stress-induced apoptosis through the inhibition of forkhead transcription factor FoxO3. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 288, n. 24, p. 17214–17224, 2013.

TEIXEIRA, P. C.; ONUKI, J.; MEDEIROS, M. H. G.; DÖRNEMANN, D.; DI MASCIO, P. DNA damage by 3,6-dihydropyrazine-2,5-dipropanoic acid, the cyclic dimerization product of 5-aminolevulinic acid. **Biological Chemistry**, [s. l.], v. 382, n. 6, p. 913–918, 2001.

TIDMAN, M. J.; HIGGINS, E. M.; ELDER, G. H.; MACDONALD, D. M. Variegate porphyria associated with hepatocellular carcinoma. **British Journal of Dermatology**, [s. l.], v. 121, n. 4, p. 503–505, 1989.

TILBERY, C. P.; WILSON, L.; EDNA, S. Aspectos disautonômicos da porfiria aguda intermitente. **Arq. Neuro-Psiquiatria**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 7, 1979.

TONG, T.; FAN, W.; ZHAO, H.; JIN, S.; FAN, F.; BLANCK, P.; ALOMO, I.; RAJASEKARAN, B.; LIU, Y.; HOLBROOK, N. J.; ZHAN, Q. Involvement of the MAP kinase pathways in induction of GADD45 following UV radiation. **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 269, n. 1, p. 64–72, 2001.

TOYOKUNI, S.; OKAMOTO, K.; YODOI, J.; HIAI, H. Persistent oxidative stress in cancer. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 358, n. 1, p. 1–3, 1995.

UNZU, C.; SAMPEDRO, A.; MAULEÓN, I.; VANRELL, L.; DUBROT, J.; DE SALAMANCA, R. E.; GONZÁLEZ-ASEGUINOLAZA, G.; MELERO, I.; PRIETO, J.; FONTANELLAS, A. Porphobilinogen deaminase over-expression in hepatocytes, but

not in erythrocytes, prevents accumulation of toxic porphyrin precursors in a mouse model of acute intermittent porphyria. **Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 417–424, 2010.

VELCULESCU, V. E.; EL-DEIRY, W. S. Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. **Clinical Chemistry**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 858–868, 1996.

WANG, B.; RUDNICK, S.; CENGIA, B.; BONKOVSKY, H. L. Acute Hepatic Porphyrins: Review and Recent Progress. **Hepatology Communications**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 193–206, 2019.

WANG, B.; WEN, X.; QIN, X.; WANG, Z.; TAN, Y.; SHEN, Y.; XI, Z. Quantitative structural insight into human variegate porphyria disease. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 288, n. 17, p. 11731–11740, 2013.

WARIS, G.; AHSAN, H. Reactive oxygen species: Role in the development of cancer and various chronic conditions. **Journal of Carcinogenesis**, [s. l.], v. 5, p. 1–8, 2006.

WEIJER, R.; BROEKGAARDEN, M.; VAN GOLEN, R. F.; BULLE, E.; NIEUWENHUIS, E.; JONGEJAN, A.; MOERLAND, P. D.; VAN KAMPEN, A. H. C.; VAN GULIK, T. M.; HEGER, M. Low-power photodynamic therapy induces survival signaling in perihilar cholangiocarcinoma cells. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1–17, 2015.

WEISS, T. S.; PAHERNIK, S.; SCHERUEBL, I.; JAUCH, K.; THASLER, W. E. Cellular damage to human hepatocytes through repeated application of 5-aminolevulinic acid. **Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 476–482, 2003.

WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant graphics for data analysis**. Texas: Springer, 2009. v. 35

WILE, A. G.; COFFEY, J.; NAHABEDIAN, M. Y.; BAGHDASSARIAN, R.; MASON, G. R.; BERNS, M. W. Laser photoradiation therapy of cancer: An update of the experience at the university of California, Irvine. **Lasers in Surgery and Medicine**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 5–12, 1984.

WILKINSON, L.; FRIENDLY, M. History corner the history of the cluster heat map. **American Statistician**, [s. l.], v. 63, n. 2, p. 179–184, 2009.

XIAO, Y.; ZHOU, Y.; LU, Y.; ZHOU, K.; CAI, W. PHB2 interacts with LC3 and SQSTM1 is required for bile acids-induced mitophagy in cholestatic liver. **Cell Death and Disease**, [s. l.], v. 9, n. 2, 2018.

YAMASHITA, T.; YONETA, A.; HIDA, T. Macrophage inhibitory cytokine-1: A new

- player in melanoma development. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 129, n. 2, p. 262–264, 2009.
- YANG, Y. H.; DUDOIT, S.; LUU, P.; LIN, D. M.; PENG, V.; NGAI, J.; SPEED, T. P. Normalization for cDNA microarray data: A robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. **Selected Works of Terry Speed**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 591–600, 2012.
- YANG, Y. H.; SPEED, T. Design issues for cDNA microarray experiments. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 3, n. 8, p. 579–588, 2002.
- YASUDA, M.; DESNICK, R. J. Murine models of the human porphyrias: Contributions toward understanding disease pathogenesis and the development of new therapies. **Molecular Genetics and Metabolism**, [s. l.], p. 10, 2019.
- YASUDA, M.; GAN, L.; CHEN, B.; KADIRVEL, S.; YU, C.; PHILLIPS, J. D.; NEW, M. I.; LIEBOW, A.; FITZGERALD, K.; QUERBES, W.; DESNICK, R. J. RNAi-mediated silencing of hepatic *Alas1* effectively prevents and treats the induced acute attacks in acute intermittent porphyria mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 111, n. 21, p. 7777–7782, 2014.
- YOUNG, A. R. J.; NARITA, M. SASP reflects senescence. **EMBO Reports**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 228–230, 2009.
- YU, G.; WANG, L. G.; HAN, Y.; HE, Q. Y. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. **OMICS A Journal of Integrative Biology**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 284–287, 2012.
- ZATLOUKAL, K.; FRENCH, S. W.; STUMPTNER, C.; STRNAD, P.; HARADA, M.; TOIVOLA, D. M.; CADRIN, M.; OMARY, M. B. From Mallory to Mallory-Denk bodies: What, how and why? **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 313, n. 10, p. 2033–2049, 2007.
- ZEHIR, A.; BENAYED, R.; SHAH, R. H.; SYED, A.; AL, E. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. **Physiology & behavior**, [s. l.], v. 176, n. 3, p. 139–148, 2017.
- ZHANG, K. Integration of ER stress, oxidative stress and the inflammatory response in health and disease. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 33–40, 2010.

ANEXO A

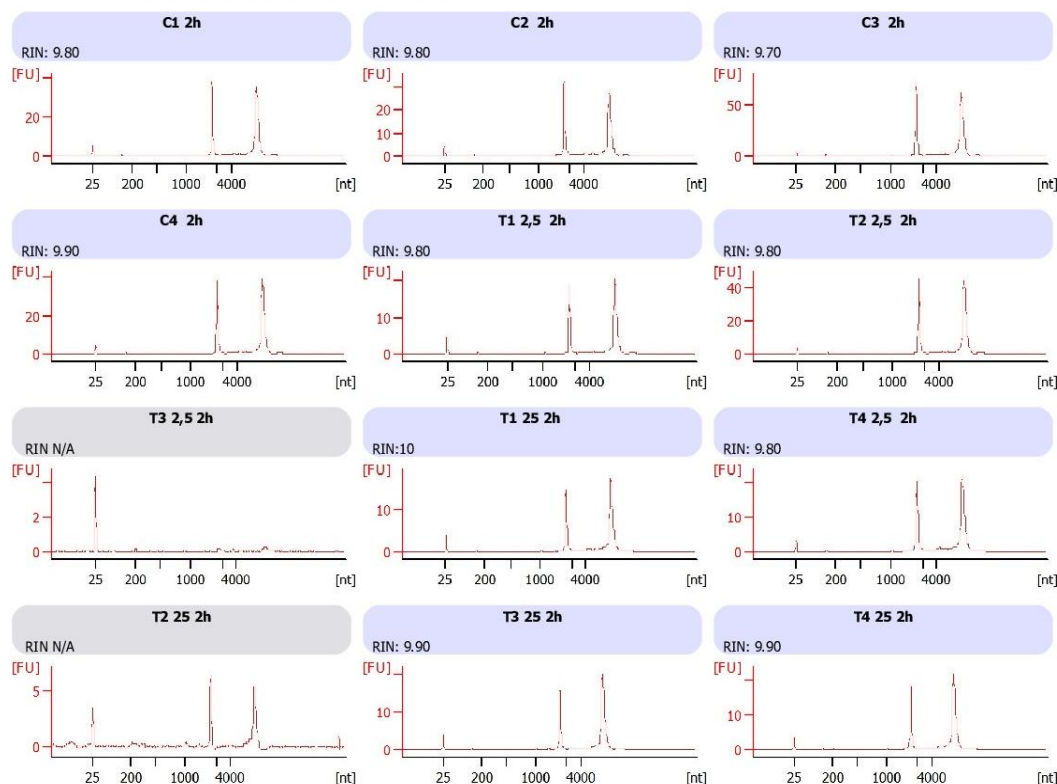
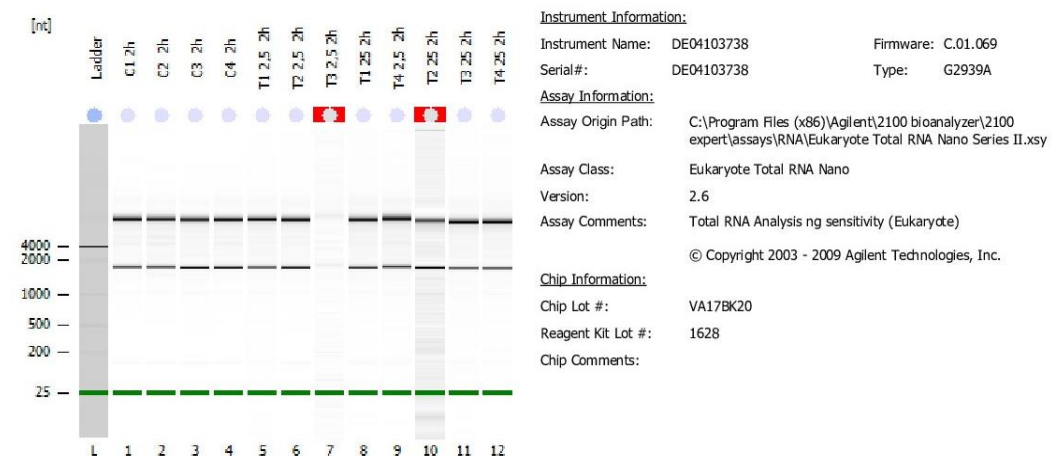
Quantificação e análise da integridade de RNA das amostras tratadas por 2 h com ALA

2100 expert_Eukaryote Total RNA Nano_DE04103738_2018-03-27_10-11-52.xad

Page 1 of 18

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano_DE04103738_2018-03-27_10-11-52.xad

Created: 27/03/2018 10:11:51
 Modified: 27/03/2018 10:47:16

Electrophoresis File Run Summary

2100 Expert (B.02.08.SI648)

© Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Printed: 27/03/2018 10:48:04

Figura 29 - Eletroforese capilar e eletroferograma.

Bandas da corrida eletroforética realizada no Bioanalyzer realizada no Bioanalyzer (Agilent Technologies®): L - marcador de peso molecular/ 1 a 4 - amostras-controle/ 5, 6, 7 e 9 - tratamento 2,5mM/ 8, 10, 11 e 12- tratamento 25mM).

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano_DE04103738_2018-03-27_10-11-52.xad

Created: 27/03/2018 10:11:51
 Modified: 27/03/2018 10:47:16

Electrophoresis File Run Summary (Chip Summary)

| Sample Name | Sample Comment | Status | Result Label | Result Color |
|-------------|----------------|--------|-------------------|--------------|
| C1 2h | | ✓ | RIN: 9.80 | |
| C2 2h | | ✓ | RIN: 9.80 | |
| C3 2h | | ✓ | RIN: 9.70 | |
| C4 2h | | ✓ | RIN: 9.90 | |
| T1 2,5 2h | | ✓ | RIN: 9.80 | |
| T2 2,5 2h | | ✓ | RIN: 9.80 | |
| T3 2,5 2h | | ✓ | RIN N/A | |
| T1 25 2h | | ✓ | RIN:10 | |
| T4 2,5 2h | | ✓ | RIN: 9.80 | |
| T2 25 2h | | ✓ | RIN N/A | |
| T3 25 2h | | ✓ | RIN: 9.90 | |
| T4 25 2h | | ✓ | RIN: 9.90 | |
| Ladder | | ✓ | All Other Samples | |

Chip Lot #

VA17BK20

Reagent Kit Lot #

1628

Chip Comments :

Figura 30 - RIN das amostras tratadas por 2 h com o ALA.
 A coluna Sample Name indica as amostras tratadas e coluna Result Label, seus respectivos RIN.

ANEXO B

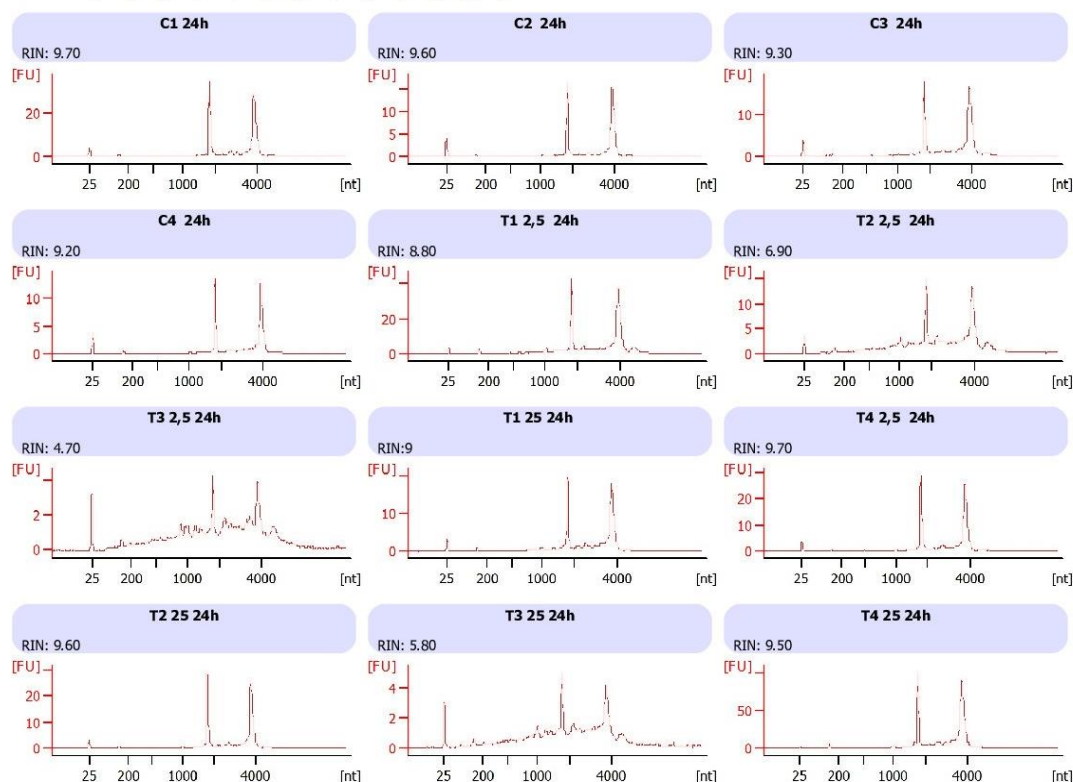
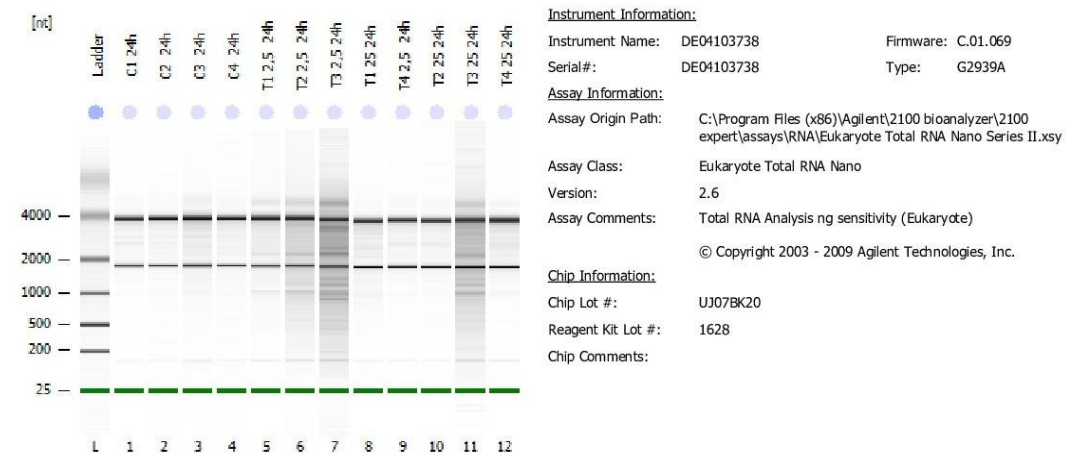
Quantificação e análise da integridade de RNA das amostras tratadas por 24 h com ALA

2100 expert_Eukaryote Total RNA Nano_DE04103738_2018-03-27_10-54-42.xad

Page 1 of 18

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano_DE04103738_2018-03-27_10-54-42.xad

Created: 27/03/2018 10:54:42
 Modified: 27/03/2018 11:17:46

Electrophoresis File Run Summary

2100 Expert (B.02.08.S1648)

© Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Printed: 27/03/2018 11:22:47

Figura 31 - Eletroforese capilar e eletroferograma.

Bandas da corrida eletroforética realizada no Bioanalyzer realizada no Bioanalyzer (Agilent Technologies®): (L- marcador de peso molecular/ 1 a 4 - amostras-controle/ 5, 6, 7 e 9- tratamento 2,5mM 8, 10, 11 e 12- tratamento 25mM.

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano_DE04103738_2018-03-27_10-54-42.xad

Created: 27/03/2018 10:54:42
 Modified: 27/03/2018 11:17:46

Electrophoresis File Run Summary (Chip Summary)

| Sample Name | Sample Comment | Stat Result Label | Result Color |
|-------------|----------------|---------------------|--------------|
| C1 24h | | ✓ RIN: 9.70 | |
| C2 24h | | ✓ RIN: 9.60 | |
| C3 24h | | ✓ RIN: 9.30 | |
| C4 24h | | ✓ RIN: 9.20 | |
| T1 2,5 24h | | ✓ RIN: 8.80 | |
| T2 2,5 24h | | ✓ RIN: 6.90 | |
| T3 2,5 24h | | ✓ RIN: 4.70 | |
| T1 25 24h | | ✓ RIN:9 | |
| T4 2,5 24h | | ✓ RIN: 9.70 | |
| T2 25 24h | | ✓ RIN: 9.60 | |
| T3 25 24h | | ✓ RIN: 5.80 | |
| T4 25 24h | | ✓ RIN: 9.50 | |
| Ladder | | ✓ All Other Samples | |

Chip Lot #

UJ07BK20

Reagent Kit Lot #

1628

Chip Comments :

Figura 32 - RIN das amostras tratadas por 2 h com o ALA.
 A coluna Sample Name indica as amostras tratadas e coluna Result Label, seus respectivos RIN.

ANEXO C

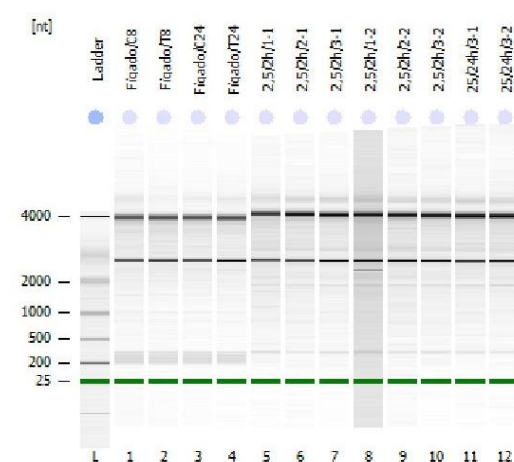
Quantificação e análise da integridade de RNA das amostras reanalisadas

2100 expert_Eukaryote Total RNA Nano_DE04103738_2018-05-02_11-04-24.xad

Page 1 of 14

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano_DE04103738_2018-05-02_11-04-24.xadCreated: 02/05/2018 11:04:24
Modified: 02/05/2018 11:28:11

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

Instrument Name: DE04103738
Serial #: DE04103738
Firmware: C.01.069
Type: G2939A

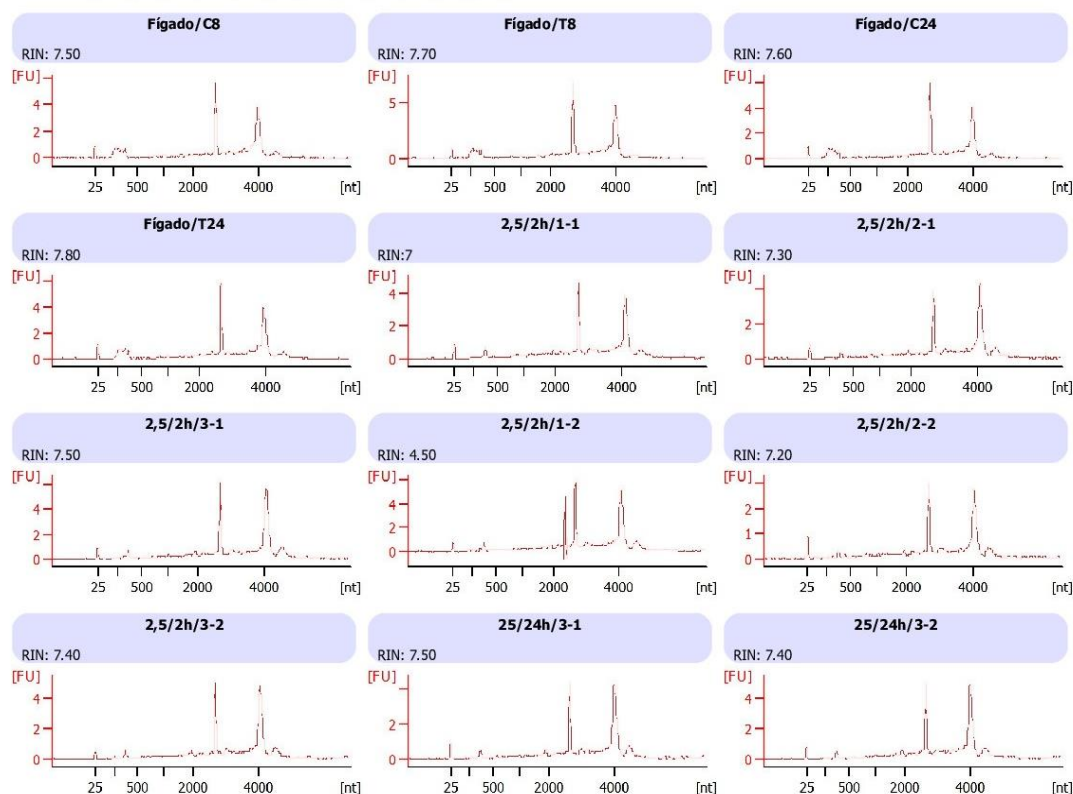
Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files (x86)\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Eukaryote Total RNA Nano Series II.xsy

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
Version: 2.6
Assay Comments: Total RNA Analysis ng sensitivity (Eukaryote)

© Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Chip Information:

Chip Lot #: UJ07BK20
Reagent Kit Lot #: 1628
Chip Comments:

2100 Expert (B.02.08.SI648)

© Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Printed: 02/05/2018 11:29:59

Figura 33 - Eletroforese capilar e eletroferograma.

Bandas da corrida eletroforética realizada no Bioanalyzer realizada no Bioanalyzer (Agilent Technologies®). Nossas amostras estão localizadas do quinto vial em diante: (L- marcador de peso molecular/ 2 h: 5, 6, 7, 8, 9 e 10- tratamento 2,5 mM/ 24 h: 11 e 12- tratamento 25 mM) realizada no Bioanalyzer (Agilent Technologies®).

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano_DE04103738_2018-03-27_10-54-42.xad

Created: 27/03/2018 10:54:42
 Modified: 27/03/2018 11:17:46

Electrophoresis File Run Summary (Chip Summary)

| Sample Name | Sample Comment | Stat Result Label | Result Color |
|-------------|----------------|---------------------|--------------|
| C1 24h | | ✓ RIN: 9.70 | |
| C2 24h | | ✓ RIN: 9.60 | |
| C3 24h | | ✓ RIN: 9.30 | |
| C4 24h | | ✓ RIN: 9.20 | |
| T1 2,5 24h | | ✓ RIN: 8.80 | |
| T2 2,5 24h | | ✓ RIN: 6.90 | |
| T3 2,5 24h | | ✓ RIN: 4.70 | |
| T1 25 24h | | ✓ RIN:9 | |
| T4 2,5 24h | | ✓ RIN: 9.70 | |
| T2 25 24h | | ✓ RIN: 9.60 | |
| T3 25 24h | | ✓ RIN: 5.80 | |
| T4 25 24h | | ✓ RIN: 9.50 | |
| Ladder | | ✓ All Other Samples | |

Chip Lot

UJ07BK20

Reagent Kit Lot

1628

Chip Comments :

Figura 34 - RIN das amostras reanalisadas.

A coluna Sample Name indica as amostras tratadas e coluna Result Label, seus respectivos RIN. Nossas amostras estão localizadas do quinto poço em diante.

ANEXO D

Controle de qualidade de hibridização (distribuição de intensidades)

Tabela 16 - Distribuição das intensidades de probes Spike-In e não controles das amostras de 2 h.
As letras de A e H correspondem aos arrays da lâmina.

Net Signal Statistics - Agilent SpiKels

| | A | | B | | C | | D | | E | | F | | G | | H | |
|-------------------|-------|------|-------|------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 |
| Spots saturados | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 99% Sig. Distrib. | 46892 | 9727 | 22046 | 9689 | 52158 | 17675 | 76606 | 3895 | 17466 | 18250 | 18594 | 22739 | 16442 | 27511 | 16173 | 26422 |
| 50% Sig. Distrib. | 5993 | 1159 | 3591 | 938 | 7166 | 1436 | 10665 | 510 | 3185 | 1858 | 3479 | 2195 | 2837 | 2732 | 2719 | 2622 |
| 1% Sig. Distrib. | 569 | 137 | 376 | 140 | 764 | 200 | 1179 | 93 | 347 | 194 | 384 | 228 | 322 | 276 | 312 | 246 |

Tabela 17 - Distribuição das intensidades de probes Spike-In e não controles das amostras de 24 h.
As letras de I e P correspondem aos arrays da lâmina.

Net Signal Statistics - Non-Control probes

| | I | | J | | K | | L | | M | | N | | O | | P | |
|-------------------|-------|-------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|-------|-------|-------|
| | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 |
| Spots saturados | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 99% Sig. Distrib. | 20108 | 10645 | 18565 | 3883 | 32481 | 4681 | 36210 | 6726 | 16664 | 9895 | 26941 | 6695 | 24261 | 16237 | 26067 | 15416 |
| 50% Sig. Distrib. | 58 | 83 | 60 | 90 | 64 | 86 | 64 | 79 | 64 | 87 | 63 | 63 | 91 | 102 | 64 | 95 |
| 1% Sig. Distrib. | 32 | 56 | 33 | 69 | 35 | 62 | 33 | 56 | 33 | 59 | 32 | 66 | 32 | 65 | 33 | 59 |

Tabela 18 - Distribuição das intensidades de probes Spike-In e não controles das amostras de 24h. As letras de A e H correspondem aos arrays da lâmina.

Net Signal Statistics - Agilent SpiKeln

| | A | | B | | C | | D | | E | | F | | G | | H | |
|-------------------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 |
| Spots saturados | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 99% Sig. Distrib. | 56612 | 33392 | 404453 | 27375 | 22657 | 16901 | 24311 | 11191 | 27284 | 13213 | 23105 | 25815 | 26225 | 34477 | 12701 | 26579 |
| 50% Sig. Distrib. | 7361 | 3643 | 5013 | 2883 | 4102 | 1538 | 4034 | 1149 | 4472 | 1292 | 4334 | 2190 | 4545 | 3230 | 2611 | 2385 |
| 1% Sig. Distrib. | 688 | 295 | 472 | 261 | 368 | 205 | 396 | 144 | 453 | 154 | 401 | 235 | 442 | 248 | 242 | 213 |

Tabela 19 - Distribuição das intensidades de probes Spike-In e não controles das amostras de 24h. As letras de A e H correspondem aos arrays da lâmina.

Net Signal Statistics - Non-Control probes

| | I | | J | | K | | L | | M | | N | | O | | P | |
|-------------------|------|------|-------|------|-------|------|-------|------|------|------|-------|------|-------|-------|-------|-------|
| | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 |
| Spots saturados | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 99% Sig. Distrib. | 9891 | 9091 | 11795 | 5201 | 22295 | 9898 | 20356 | 6604 | 9143 | 7904 | 20493 | 4193 | 16311 | 10768 | 10808 | 10908 |
| 50% Sig. Distrib. | 42 | 84 | 42 | 107 | 51 | 123 | 55 | 79 | 48 | 80 | 49 | 87 | 45 | 74 | 41 | 78 |
| 1% Sig. Distrib. | 29 | 64 | 28 | 79 | 29 | 96 | 29 | 57 | 28 | 57 | 28 | 64 | 27 | 50 | 27 | 57 |

Tabela 20 - Estatísticas das probes do controle negativo da lâmina correspondente ao tratamento de 2 hAs letras de A e H correspondem aos arrays da lâmina.

Negative Control Stats

| | A | | B | | C | | D | | E | | F | | G | | H | |
|-----------------------|------|-----|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 |
| Average Net Signals | 36.4 | 65 | 36.8 | 78 | 38.4 | 73.8 | 36.97 | 65.3 | 37.31 | 67.55 | 36.62 | 73.47 | 37.1 | 77.07 | 37.1 | 73.28 |
| StdDev Net Signals | 3.04 | 6.3 | 2.97 | 4.4 | 3.25 | 5.95 | 3.08 | 5.29 | 3.48 | 6.3 | 3.43 | 4.78 | 3.34 | 7.28 | 3.74 | 6.79 |
| Average BG Sub Signal | -2.8 | -4 | -3.7 | -3.5 | -4.2 | -4.2 | -3.72 | -4.08 | -3.56 | -4.74 | -3.57 | -4.63 | -3.64 | -5.18 | -4.6 | -4.07 |
| Std Dev BG Sub Signal | 2.97 | 3.5 | 2.98 | 3.6 | 3.21 | 4.01 | 3.11 | 4.28 | 3.26 | 3.92 | 3.21 | 3.57 | 3.16 | 4.81 | 3.57 | 4.18 |

Tabela 21 - Estatísticas das probes do controle negativo da lâmina correspondente ao tratamento de 24 h. As letras de I e P correspondem aos arrays da lâmina.

Negative Control Stats

| | I | | J | | K | | L | | M | | N | | O | | P | |
|-----------------------|------|-----|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 | Cy5 | Cy3 |
| Average Net Signals | 34 | 71 | 33.2 | 92 | 33.5 | 107 | 33.38 | 65.9 | 32.61 | 66.92 | 33.06 | 73.49 | 31.9 | 59.74 | 32.3 | 65.63 |
| StdDev Net Signals | 2.9 | 4.5 | 3.06 | 6.7 | 3.11 | 6.47 | 3.6 | 5.67 | 2.79 | 5.22 | 3.03 | 5.06 | 2.92 | 6.13 | 3.19 | 6.34 |
| Average BG Sub Signal | -1.7 | -4 | -2 | -4.7 | -2.3 | -5.8 | -3.48 | -4.13 | -2.35 | -4.66 | -2.98 | -4.37 | -2.15 | -4.85 | -2 | -4.12 |
| Std Dev BG Sub Signal | 2.86 | 3.5 | 2.96 | 4.7 | 3.11 | 4.93 | 3.36 | 4.01 | 2.8 | 4.03 | 3.05 | 3.67 | 2.88 | 3.67 | 3.16 | 4.16 |

ANEXO E

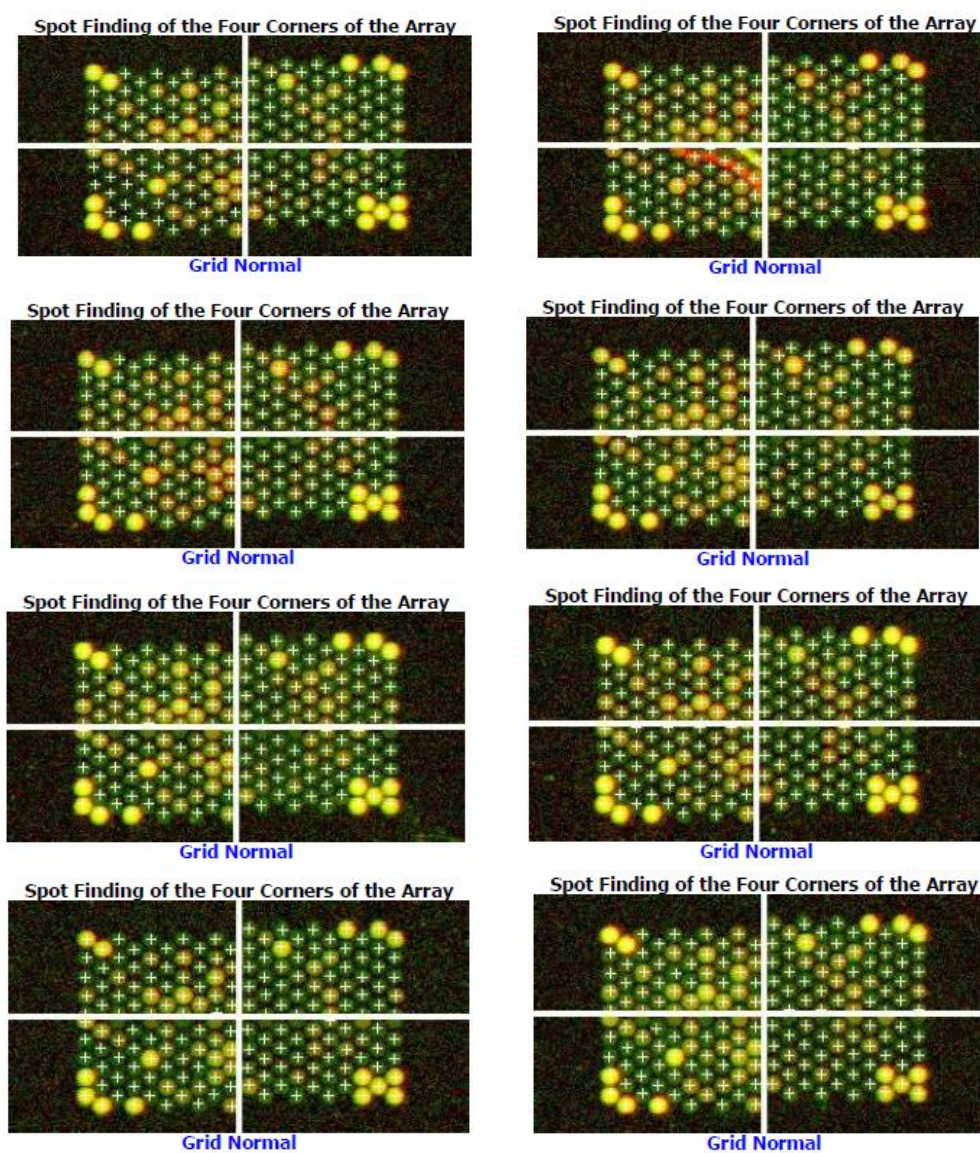
Controle de qualidade de hibridização (localização da região dos spots nos arrays das amostras de 2 h)

Figura 35 - Localização dos spots dos arrays do tratamento de 2 h. A localização da área correta dos spots é verificada pela "cruz" na região central e a expressão "Grid Normal".

ANEXO F

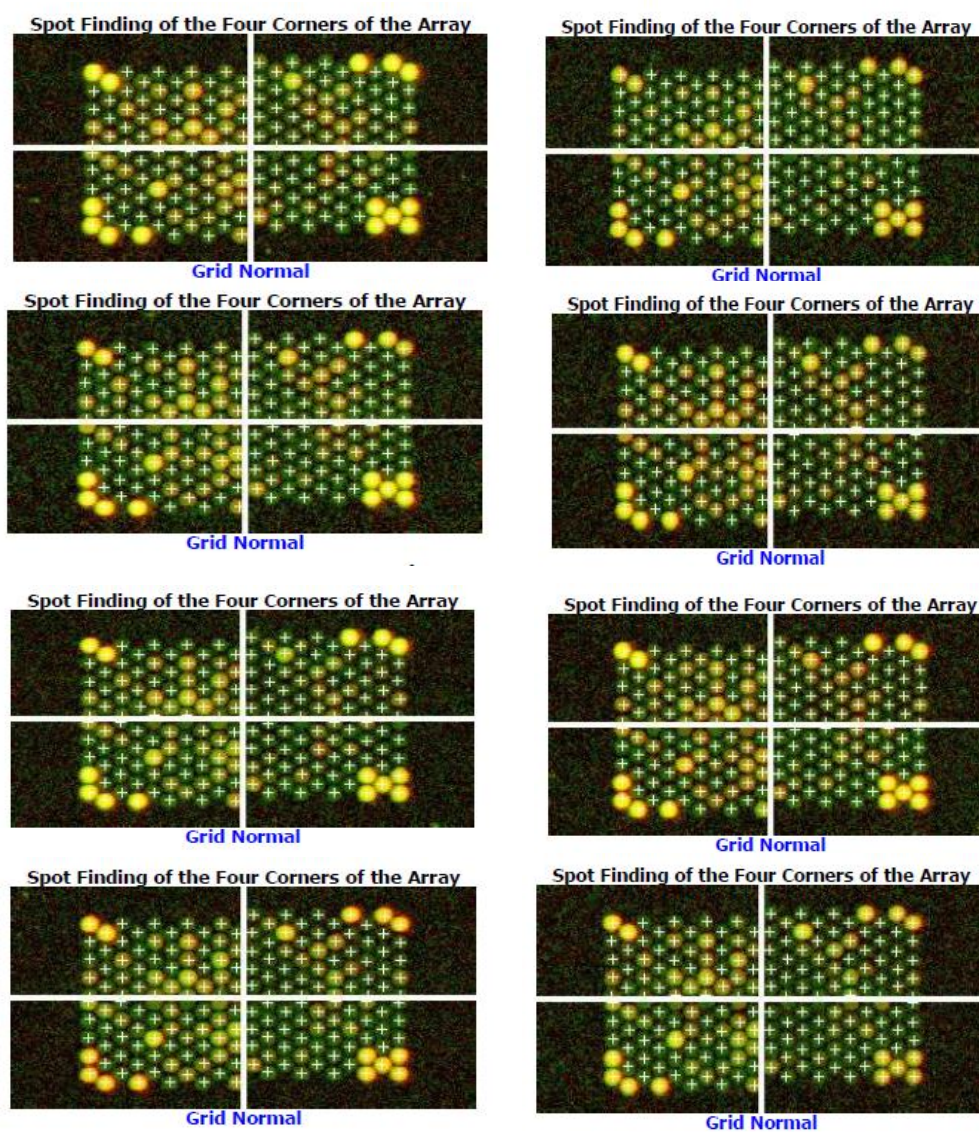
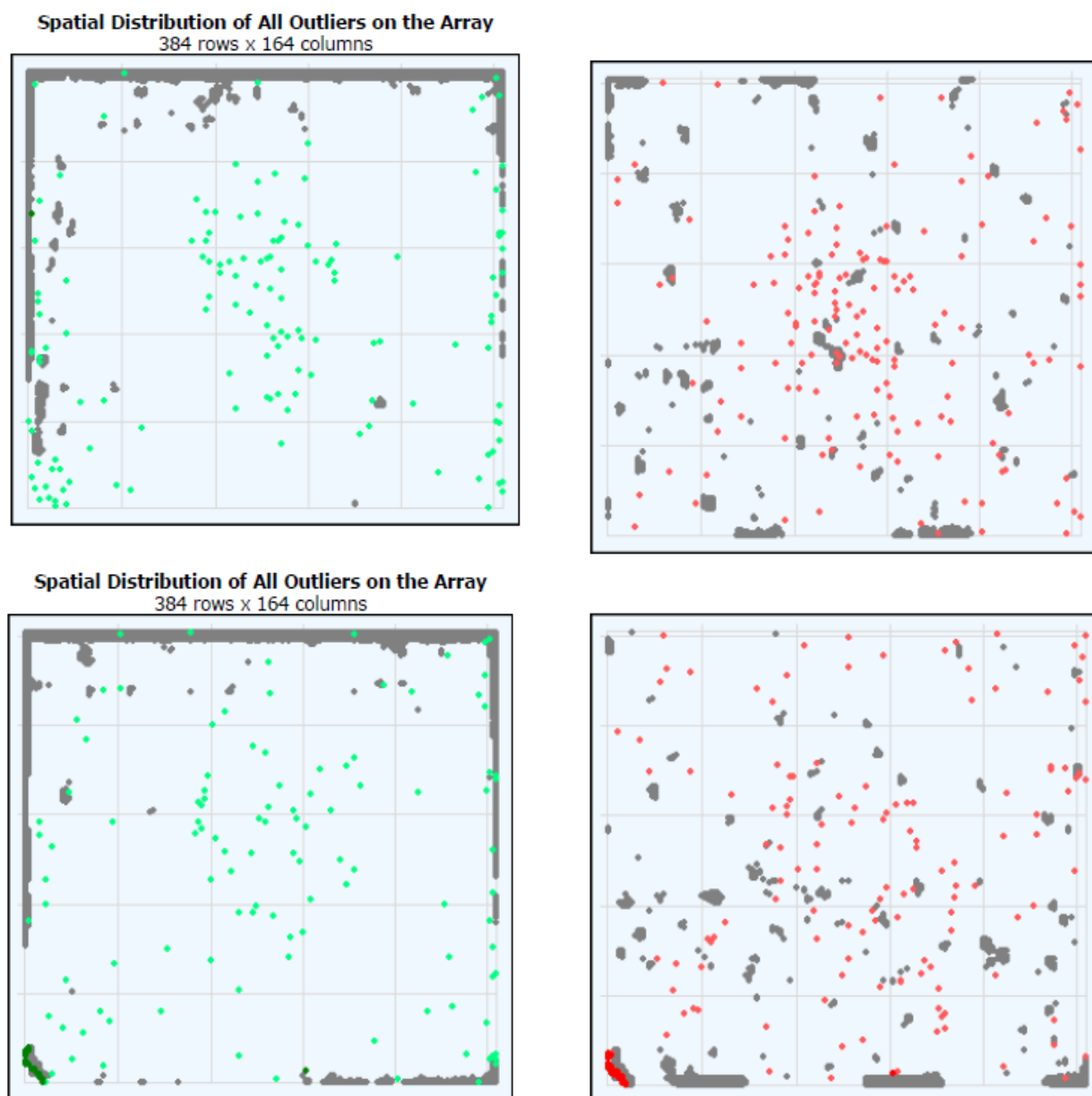
Controle de qualidade de hibridização (localização da região dos spots dos arrays das amostras de 24 h)

Figura 36 - Localização dos spots dos arrays do tratamento de 24 h. A localização da área correta dos spots é verificada pela “cruz” na região central e a expressão “Grid Normal”.

ANEXO G

Distribuição de *outliers* das amostras de 2 hFigura 37 - Distribuição de *outliers* correspondentes aos arrays A e B.

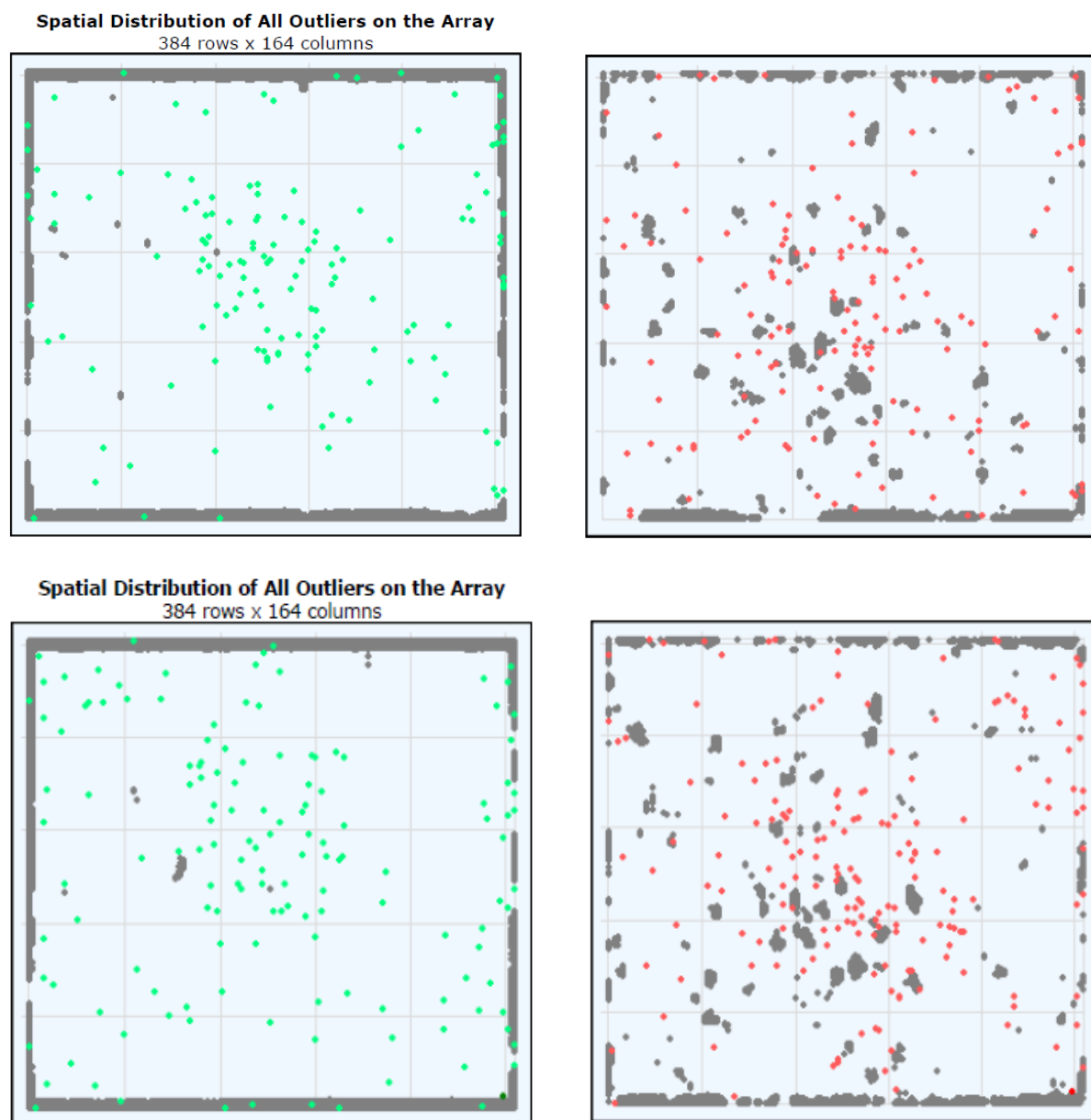


Figura 38 - Distribuição de *outliers* correspondente aos arrays C e D.

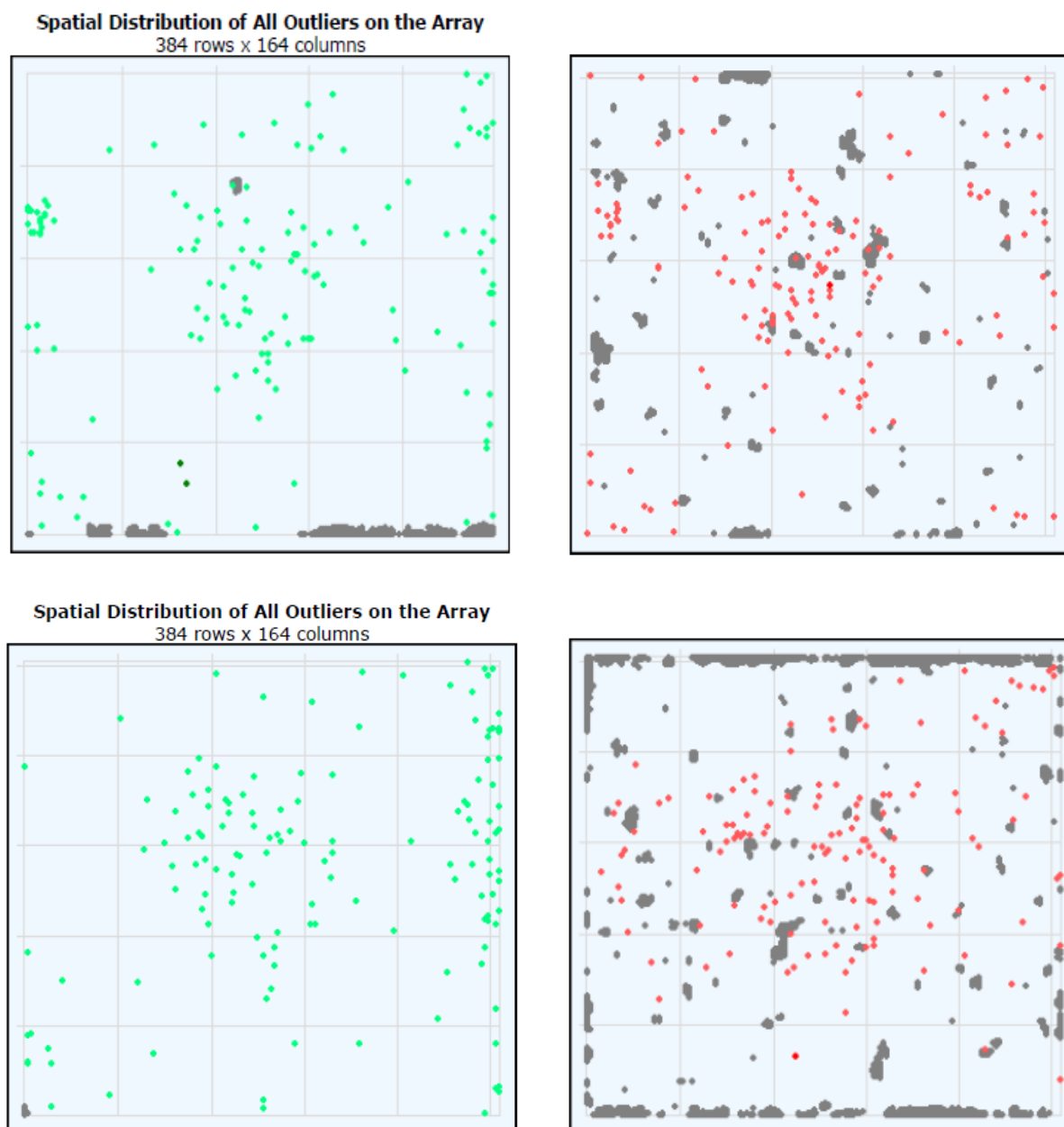


Figura 37 - Distribuição de *outliers* correspondente aos arrays E e F.

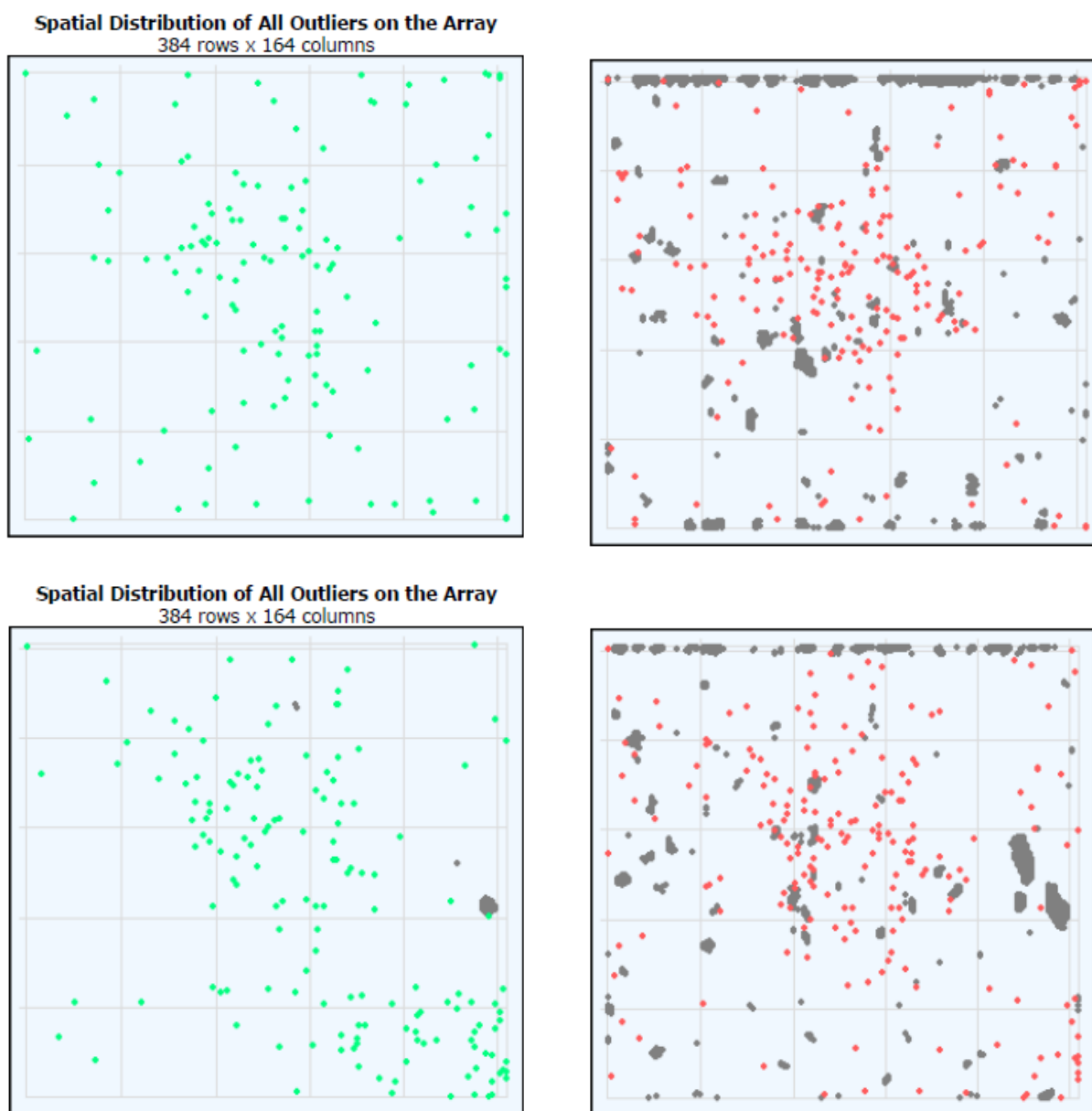


Figura 45 - Distribuição de outliers correspondente aos arrays G e H.

ANEXO H

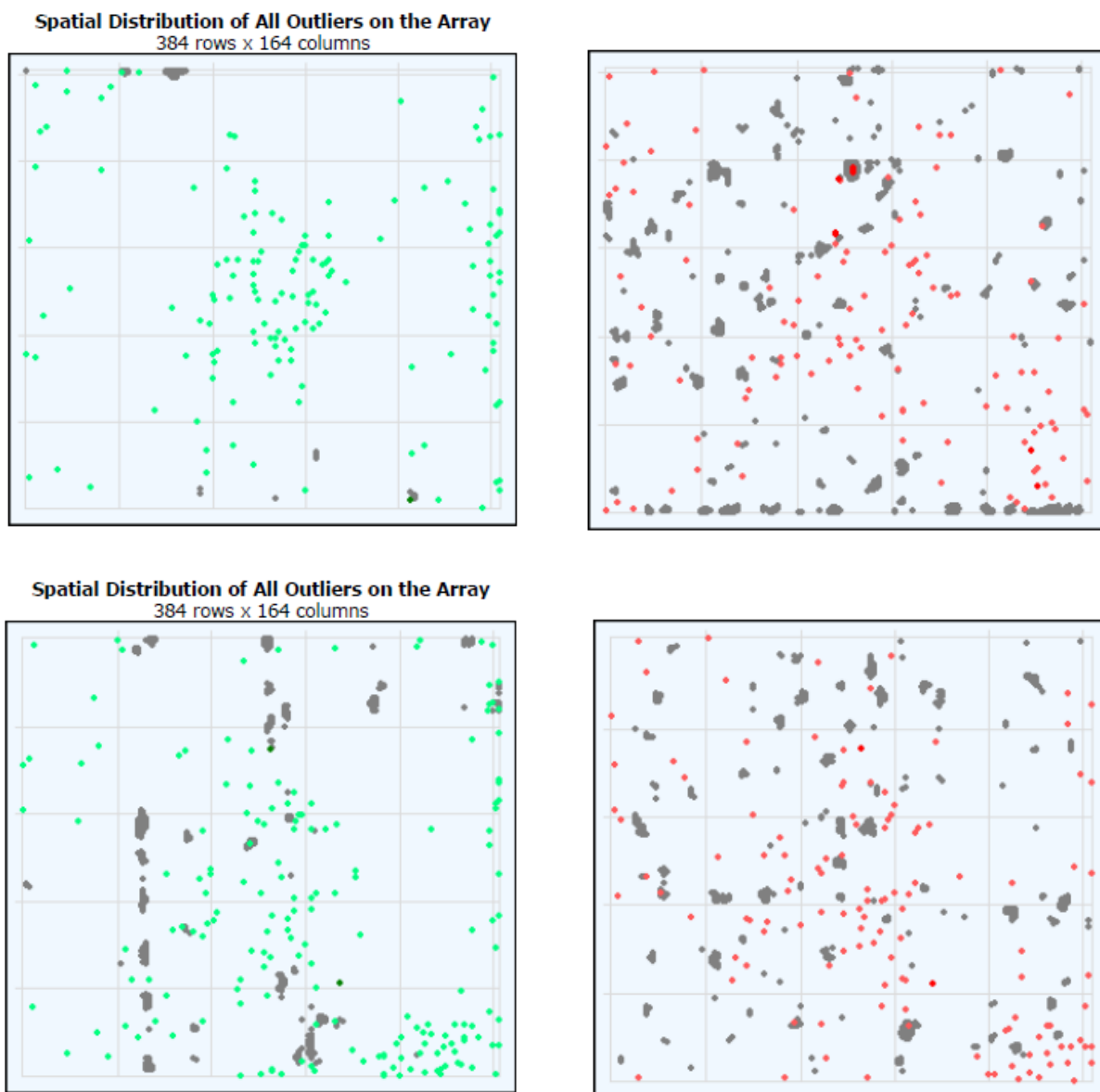
Distribuição de *outliers* das amostras de 24 h

Figura 38 - Distribuição de outliers correspondente aos arrays I e J.

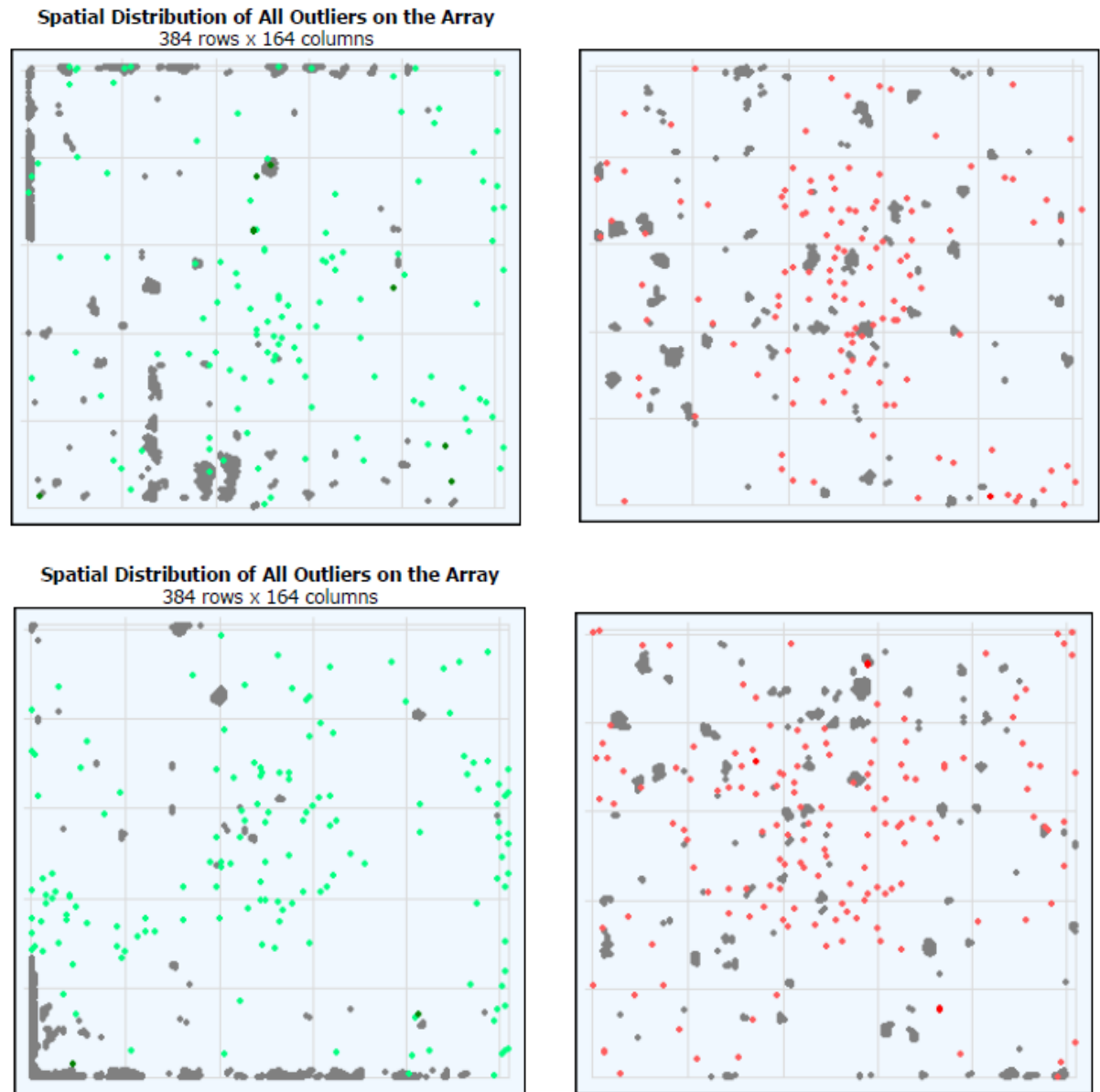


Figura 41 - Distribuição de outliers correspondente aos arrays K e L.

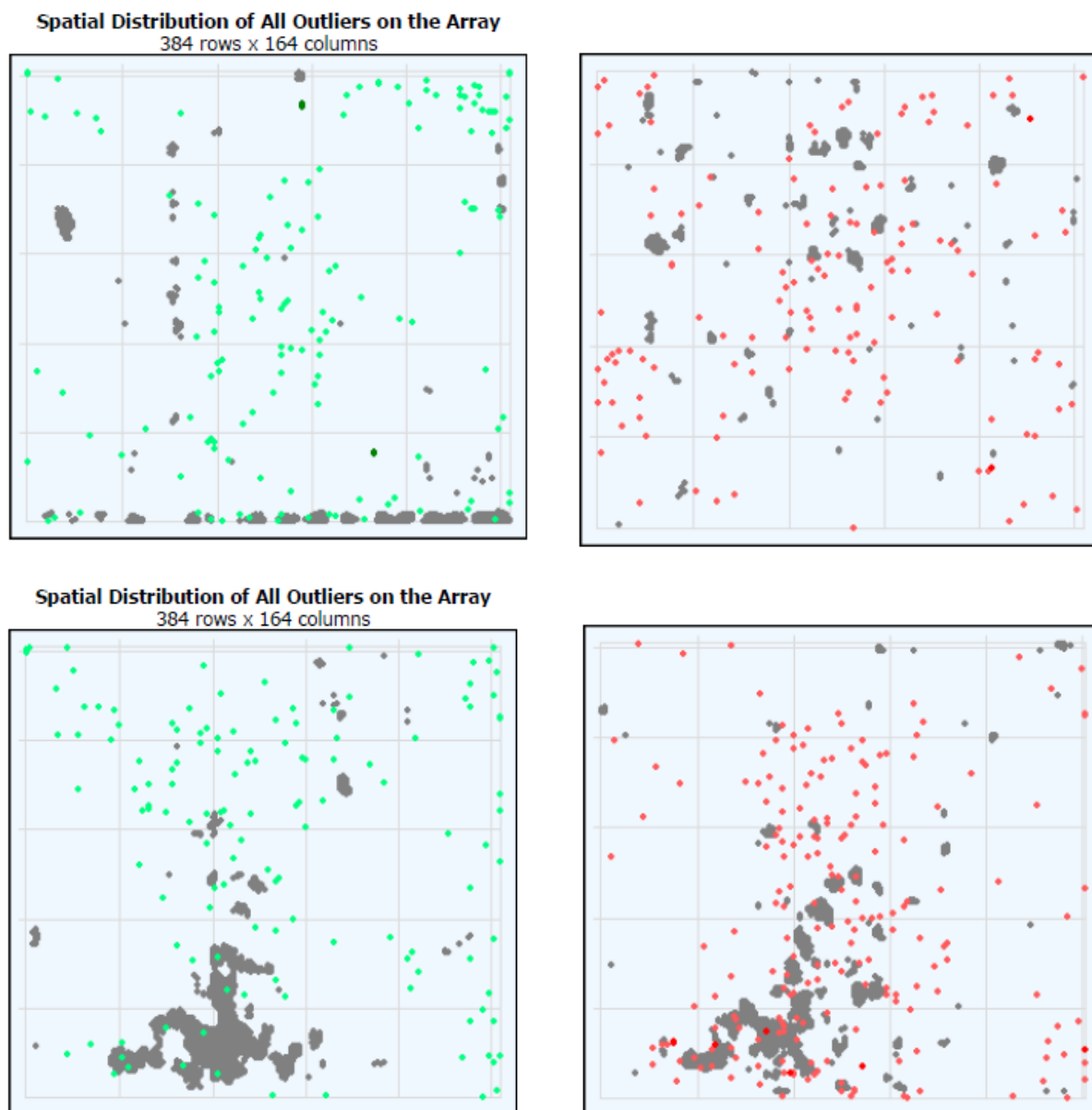


Figura 42 - Distribuição de outliers correspondente aos arrays M e N.

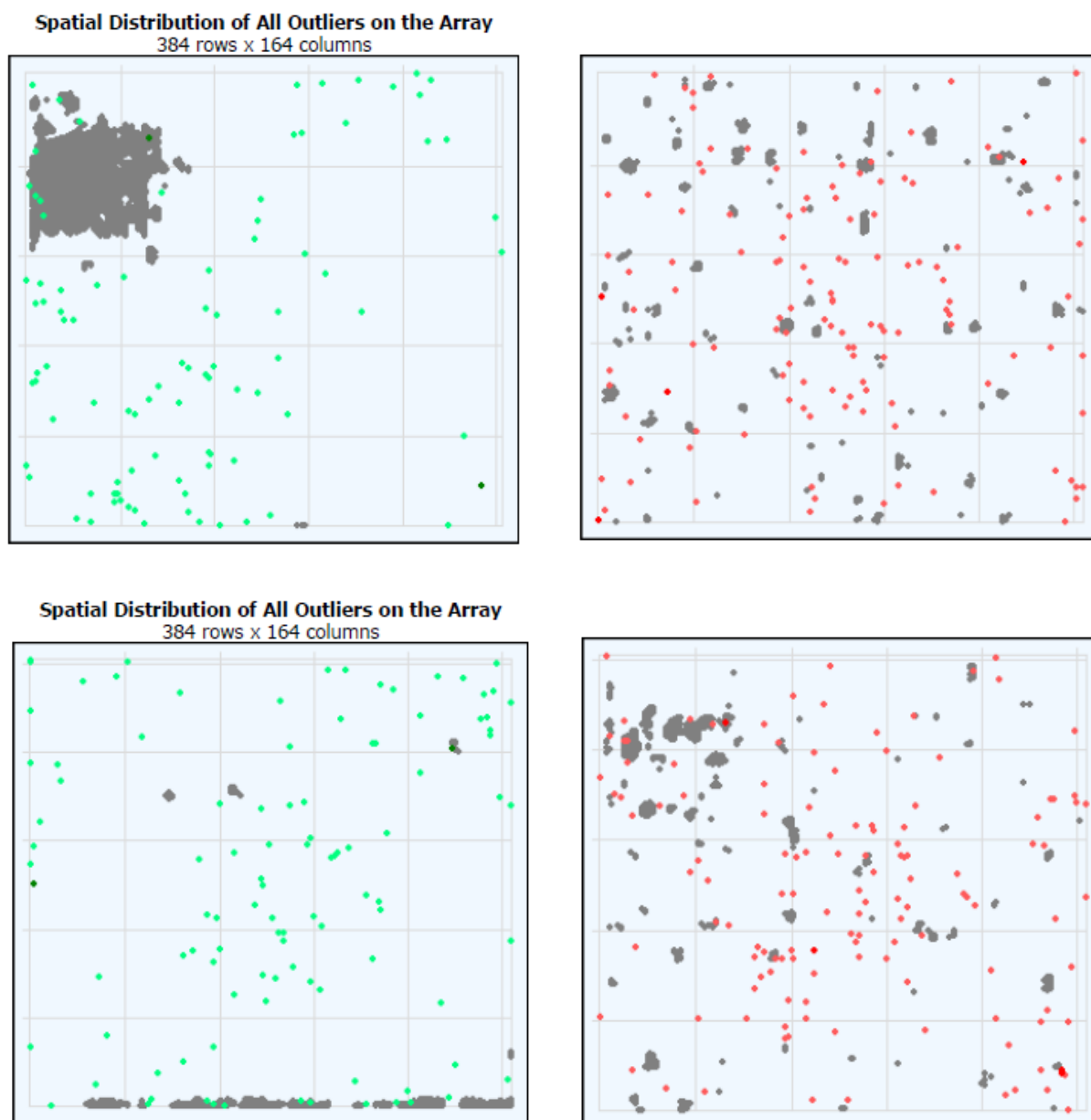


Figura 43- Distribuição de *outliers* correspondente aos arrays O e P.

APÊNDICE A

Molecular Biology Reports (2018) 45:2801–2809
<https://doi.org/10.1007/s11033-018-4367-5>

SHORT COMMUNICATION



Effect of 5-aminolevulinic acid on the expression of carcinogenesis-related proteins in cultured primary hepatocytes

P. R. Menezes¹ · C. B. González^{1,2,3} · A. O. DeSouza¹ · D. A. Maria¹ · J. Onuki¹

Received: 23 April 2018 / Accepted: 6 September 2018 / Published online: 14 September 2018
 © Springer Nature B.V. 2018

Abstract

Acute intermittent porphyria (AIP) is a heme pathway disorder caused by a decrease in the activity and synthesis of porphobilinogen deaminase. Thus, the first heme precursor 5-aminolevulinic acid (ALA) accumulates in the liver. Reactive oxygen species (ROS) resulting from ALA oxidation may be correlated to a higher incidence of hepatocellular carcinoma (HCC) in AIP patients. However, the molecular mechanisms of this relationship have not been thoroughly elucidated to date. In this study, we investigated the effect of increasing levels of ALA on the expression of proteins related to DNA repair, oxidative stress, apoptosis, proliferation and lipid metabolism. Primary rat hepatocytes were isolated by the collagenase perfusion method, lipoperoxidation was evaluated by a TBA fluorimetric assay and Western blotting was used to assess protein abundance. The data showed that ALA treatment promoted a dose-dependent increase of p53 expression, downregulation of Bcl-2, HMG-CoA reductase and OGG1 and an increase in lipoperoxidation. There was no alteration in the expression of the transcription factor NF-κB, catalase and superoxide dismutase. ALA oxidation products induced protein regulation patterns, suggesting the interconnection of cellular processes, such as the intrinsic pathway of apoptosis, redox homeostasis, cell proliferation, lipid metabolism and DNA repair. This study helps to elucidate the molecular mechanisms of hepatotoxicity mediated by ALA pro-oxidant effects and supports the hypothesis that ALA accumulation correlates with a higher incidence of hepatic carcinogenic events.

Keywords 5-Aminolevulinic acid · Acute intermittent porphyria · Hepatocellular carcinoma · Protein expression · Reactive oxygen species · Primary rat hepatocytes

✉ J. Onuki
 janice.onuki@butantan.gov.br
 P. R. Menezes
 patricia.menezes@butantan.gov.br
 C. B. González
 litos1518@gmail.com
 A. O. DeSouza
 ana.souza@butantan.gov.br
 D. A. Maria
 durvanei.maria@butantan.gov.br

¹ Laboratory of Molecular Biology, Butantan Institute, Av. Vital Brasil, 1500, Butantã, São Paulo, SP 05503-900, Brazil

² Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508-900, Brazil

³ Sección de Toxicología, Departamento de Ciencias Forenses, Organismo de Investigación Judicial, Heredia, Costa Rica

Abbreviations

| | |
|-----------|--|
| Bcl-2 | β-Cell lymphoma 2 |
| ALA | 5-Aminolevulinic acid |
| 8-oxodGuo | 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine |
| OGG1 | 8-Oxoguanine DNA glycosylase I |
| AIP | Acute intermittent porphyria |
| CAT | Catalase |
| GAPDH | Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase |
| HCC | Hepatocellular carcinoma |
| HMG-CoAr | Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase |
| NF-κB | Nuclear factor κB |
| ROS | Reactive oxygen species |
| SOD | Superoxide dismutase |
| p53 | Tumor protein p53 |

Introduction

Porphyrias are acquired or inherited metabolic diseases identified by alterations in the activity or the reduced synthesis of heme biosynthetic pathway enzymes, such as porphobilinogen deaminase [1]. Among these diseases, lead poisoning, hereditary tyrosinemia and acute intermittent porphyria (AIP) are characterized by an increase of 5-aminolevulinic acid (ALA) in the urine and plasma. ALA, the first precursor of the heme complex, accumulates heavily in the brain and liver of AIP patients [2]. This accumulation can be the cause of the typical clinical manifestations in AIP patients, such as neuromuscular weakness, neuropsychiatric alterations, attacks of abdominal pain [3] and an increased hepatocellular carcinoma (HCC) incidence [4].

In vitro, ALA oxidation catalyzed by iron/ferritin generates reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical ($\cdot OH$), and the aldehyde 4,5-dioxovaleric acid (DOVA), as final products. In fact, ALA induces several DNA lesions, such as strand breaks in plasmid DNA [5], increases the level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) and radical-induced base degradation products in vitro and in the rat spleen and liver DNA [6, 7]. Moreover, it is reported that ALA induces chromosomal aberrations [8] and mutagenicity by the SOS Chromotest and Ames test [9]. Moreover, ALA impairs the mitochondrial transmembrane potential and damages the inner membrane of isolated rat liver mitochondria through a Ca^{2+} -dependent mechanism [10], which plays a significant role in signaling pathways of apoptosis, proliferation and carcinogenesis [11, 12]. In addition, exposing PC12 and SVNF cells to ALA leads to lesions in nuclear and mitochondrial DNA. ALA produces DNA lesions and alters the morphology of CHO and HepG2 cells, due to apoptosis induction [13]. This evidence suggests that ALA is an endogenous source of ROS which, in turn, overwhelms antioxidant defense mechanisms, resulting in damage to biomolecules and the regulation of signaling pathways involved in the cell survival checkpoints [14] and the carcinogenic process [5, 15]. Although the mechanism for ALA-induced cell transformation and carcinogenesis seems to be the mutations that originate from unrepaired or misrepaired DNA lesions [16], damage to other biomolecules, such as signaling proteins, DNA repair enzymes and lipids, may also play crucial roles in all steps of the tumorigenesis process [17], possibly through ALA derivatives.

The objective of this work was to investigate the effect of ALA on lipoperoxidation and on the expression of selected mammalian proteins related to apoptosis (tumor protein p53 and β -cell lymphoma 2), oxidative stress

(nuclear factor κB , catalase, and superoxide dismutase), cell proliferation (β -cell lymphoma 2 and tumor protein p53), DNA repair (tumor protein p53 and 8-oxoguanine DNA glycosylase I) and lipid metabolism (hydroxymethylglutaryl-CoA reductase). To assess ALA's capacity to alter hepatic protein abundance, we chose primary rat hepatocytes (PRH) as our in vitro model. These cells maintain most normal hepatic functions, including drug-metabolizing enzymes, which makes them a suitable model for chemical toxicity assessments. We chose a short period of treatment (2 h) to monitor the early onset of the alterations, considering the high chemical reactivity of ROS and previous DNA damage studies, which established the pro-oxidant hypothesis of ALA's mechanism. Our data help to elucidate ALA-induced liver injury and substantiate its hypothesized relation to HCC development in symptomatic AIP patients.

Materials and methods

Animals

Male Wistar rats (6–8 weeks old, 200–250 g) were fed and given water ad libitum and were obtained from the Butantan Institute animal house. The experimental procedure was approved by the animal ethics committee of Butantan Institute (CEUAIB 755/10) and was performed in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and the associated guidelines, the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments and complied with the ARRIVE guidelines.

Rat primary hepatocytes: isolation and culture

Rat primary hepatocytes were isolated and cultured following a collagenase perfusion method as detailed elsewhere [18].

Hepatocyte treatments

Immediately after isolation, the primary hepatocytes (2.0×10^6 cells) were seeded in a 25 cm² flask with 5 mL media (DMEM, 10% fetal bovine serum and penicillin:streptomycin 100 UI/mL:0.1 mg/mL). The PRH were incubated for 16 h at 37 °C, with 5% CO₂ in a humidified atmosphere prior to treatment. The cells were exposed to ALA (5–100 mM) in serum-free DMEM to prevent the enhancement or suppression of the chemical stimuli. The hepatocytes were treated for 2 h and were washed with PBS and lysed with ice-cold RIPA buffer containing a proteases and phosphatases inhibitors cocktail (Thermo Scientific, MA, USA). The cell lysates were immediately analyzed or

frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for further analyses. We chose a short period of treatment (2 h) in order to monitor the early onset of the alterations, considering the high chemical reactivity of ROS and for comparisons with previous studies, which established the pro-oxidant mechanism hypothesis [6, 19]. We used a high concentration of ALA, considering that it is an endogenous molecule, which is not cytotoxic per se, and it is hypothesized that it acts as a pro-oxidant only when it is accumulated in the liver of AIP patients.

Protein concentration measurement

The protein concentration of the lysates was determined by the Coomassie protein assay kit (Pierce Chemical Co., IL, USA) as described elsewhere [20].

Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was evaluated by a microscale TBA fluorimetric assay, which was modified from Mihara & Uchiyama [21]. Briefly, 50 μL of the sample was mixed with 1 mL of phosphoric acid and 50 μL of BHT. One milliliter of a 0.67% TBA solution was added to the reaction mixture, which was stirred and incubated in boiling water for 30 min. After being cooled at room temperature, the pink chromogen was extracted by adding 1 mL of butanol and stirring for 30 s. The samples were centrifuged at 680x g for 5 min. The fluorescence of the butanol phase was measured at 515 nm (excitation wavelength) and 553 nm (emission wavelength). The lipid peroxidation was expressed as a percentage of the micromolar of tetraepoxypropane (TEP) equivalents per millimolar of protein.

Western blotting

The extracted proteins (40 μg) were mixed with loading buffer and were heat-denatured at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ water for 2 min, separated on a 12.5% SDS-PAGE gel for 2 h at 100 V and were transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane using a semidry system at 20 V for 30–45 min in transfer buffer (12 mM Tris, 96 mM glycine, 20% methanol, pH 8.3). Bovine serum albumin (1%), containing 0.1% Tween-20, was used to block the membranes overnight at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, and they were later incubated with primary antibodies targeting NF- κB (1:1000) and p53, (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) from Abcam, Bcl-2 (1:1000), catalase (1:1000) and OGG1 (1:1000) from Thermo Scientific, and superoxide dismutase (1:2000) and HMG-CoA reductase (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) from Millipore overnight at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. After three washes with TBS-T for 5 min, the membranes were incubated with an HRP-conjugated second antibody (Goat anti-rabbit IgG (H+L) 1:5000 or Goat anti-mouse IgG1 1:4000) for 1 h at room temperature. Using enhanced chemiluminescence, the bands were revealed

using the SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific, MA, USA) and were visualized at ChemiDoc MP (Bio-Rad Lab, CA, USA). GAPDH or β -actin were used as the loading controls. The image acquisition, band detection and analyses were performed using Image Lab 5.0 Software (BioRad Lab, CA, USA).

Statistical analysis

The data are represented as the mean \pm SEM. A one-way ANOVA and Dunnett's multiple comparison tests were used to analyze the significant differences between the groups.

Results and discussion

PRH were stimulated with increasing concentrations of ALA, which promoted an increase in lipid peroxidation and caused the regulation of oxidative stress-related proteins associated with the onset of carcinogenesis. ALA promoted a dose-dependent increase in p53 protein expression and decreased the protein expressions of Bcl-2, HMG-CoAr and OGG1. No significant alteration in the expression of NF- κB (p105/p50), CAT or SOD was found. It is essential to note that ROS levels are supposed to remain high in all of the tested concentrations.

The oxidative cellular environment induced by ALA on the PRH resulted in an upregulation pattern for p53 and a downregulation pattern for Bcl-2 (Figs. 1, 2). Reactive oxygen species causes activation and direct mutations in p53, which acts as a tumor suppressor [22]. More than 50% of human cancers, especially at the advanced stages, present mutations in the p53 gene or a loss of protein function [23]. The protein p53 plays a pivotal role in sensing and removing nuclear and mitochondrial DNA (mitoDNA) oxidative damage, preventing mutations and genetic instability by mediating DNA repair, cell cycle arrest, senescence and cell death [24]. In the event of failed DNA repair, p53 represses Bcl-2, a known survival signal, and initiates extrinsic and/or intrinsic apoptosis by the transactivation of pro-apoptotic proteins [25]. In fact, the expression of Bcl-2 was significantly decreased in the primary hepatocytes treated with ALA (Fig. 2).

Proteins in the Bcl-2 family are the central regulators of the mitochondrial pathway of apoptosis, acting by sequestering the pro-apoptotic proteins (Bak and Bax) responsible for the formation of the oligomer channels on the outer membrane of the mitochondria, through which the release of cytochrome c to the cytosol occurs [26]. Alterations in this protein indicate that the intrinsic pathway could be the mechanism of apoptosis induced by ALA in hepatocytes [13]. Under different redox states, Bcl-2 promotes, modulates and optimizes mitochondrial respiration [27] and it

frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for further analyses. We chose a short period of treatment (2 h) in order to monitor the early onset of the alterations, considering the high chemical reactivity of ROS and for comparisons with previous studies, which established the pro-oxidant mechanism hypothesis [6, 19]. We used a high concentration of ALA, considering that it is an endogenous molecule, which is not cytotoxic per se, and it is hypothesized that it acts as a pro-oxidant only when it is accumulated in the liver of AIP patients.

Protein concentration measurement

The protein concentration of the lysates was determined by the Coomassie protein assay kit (Pierce Chemical Co., IL, USA) as described elsewhere [20].

Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was evaluated by a microscale TBA fluorimetric assay, which was modified from Mihara & Uchiyama [21]. Briefly, 50 μL of the sample was mixed with 1 mL of phosphoric acid and 50 μL of BHT. One milliliter of a 0.67% TBA solution was added to the reaction mixture, which was stirred and incubated in boiling water for 30 min. After being cooled at room temperature, the pink chromogen was extracted by adding 1 mL of butanol and stirring for 30 s. The samples were centrifuged at 680x g for 5 min. The fluorescence of the butanol phase was measured at 515 nm (excitation wavelength) and 553 nm (emission wavelength). The lipid peroxidation was expressed as a percentage of the micromolar of tetraepoxypropane (TEP) equivalents per millimolar of protein.

Western blotting

The extracted proteins (40 μg) were mixed with loading buffer and were heat-denatured at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ water for 2 min, separated on a 12.5% SDS-PAGE gel for 2 h at 100 V and were transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane using a semidry system at 20 V for 30–45 min in transfer buffer (12 mM Tris, 96 mM glycine, 20% methanol, pH 8.3). Bovine serum albumin (1%), containing 0.1% Tween-20, was used to block the membranes overnight at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, and they were later incubated with primary antibodies targeting NF- κB (1:1000) and p53, (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) from Abcam, Bcl-2 (1:1000), catalase (1:1000) and OGG1 (1:1000) from Thermo Scientific, and superoxide dismutase (1:2000) and HMG-CoA reductase (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) from Millipore overnight at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. After three washes with TBS-T for 5 min, the membranes were incubated with an HRP-conjugated second antibody (Goat anti-rabbit IgG (H+L) 1:5000 or Goat anti-mouse IgG1 1:4000) for 1 h at room temperature. Using enhanced chemiluminescence, the bands were revealed

using the SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific, MA, USA) and were visualized at ChemiDoc MP (Bio-Rad Lab, CA, USA). GAPDH or β -actin were used as the loading controls. The image acquisition, band detection and analyses were performed using Image Lab 5.0 Software (BioRad Lab, CA, USA).

Statistical analysis

The data are represented as the mean \pm SEM. A one-way ANOVA and Dunnett's multiple comparison tests were used to analyze the significant differences between the groups.

Results and discussion

PRH were stimulated with increasing concentrations of ALA, which promoted an increase in lipid peroxidation and caused the regulation of oxidative stress-related proteins associated with the onset of carcinogenesis. ALA promoted a dose-dependent increase in p53 protein expression and decreased the protein expressions of Bcl-2, HMG-CoAr and OGG1. No significant alteration in the expression of NF- κB (p105/p50), CAT or SOD was found. It is essential to note that ROS levels are supposed to remain high in all of the tested concentrations.

The oxidative cellular environment induced by ALA on the PRH resulted in an upregulation pattern for p53 and a downregulation pattern for Bcl-2 (Figs. 1, 2). Reactive oxygen species causes activation and direct mutations in p53, which acts as a tumor suppressor [22]. More than 50% of human cancers, especially at the advanced stages, present mutations in the p53 gene or a loss of protein function [23]. The protein p53 plays a pivotal role in sensing and removing nuclear and mitochondrial DNA (mitoDNA) oxidative damage, preventing mutations and genetic instability by mediating DNA repair, cell cycle arrest, senescence and cell death [24]. In the event of failed DNA repair, p53 represses Bcl-2, a known survival signal, and initiates extrinsic and/or intrinsic apoptosis by the transactivation of pro-apoptotic proteins [25]. In fact, the expression of Bcl-2 was significantly decreased in the primary hepatocytes treated with ALA (Fig. 2).

Proteins in the Bcl-2 family are the central regulators of the mitochondrial pathway of apoptosis, acting by sequestering the pro-apoptotic proteins (Bak and Bax) responsible for the formation of the oligomer channels on the outer membrane of the mitochondria, through which the release of cytochrome c to the cytosol occurs [26]. Alterations in this protein indicate that the intrinsic pathway could be the mechanism of apoptosis induced by ALA in hepatocytes [13]. Under different redox states, Bcl-2 promotes, modulates and optimizes mitochondrial respiration [27] and it

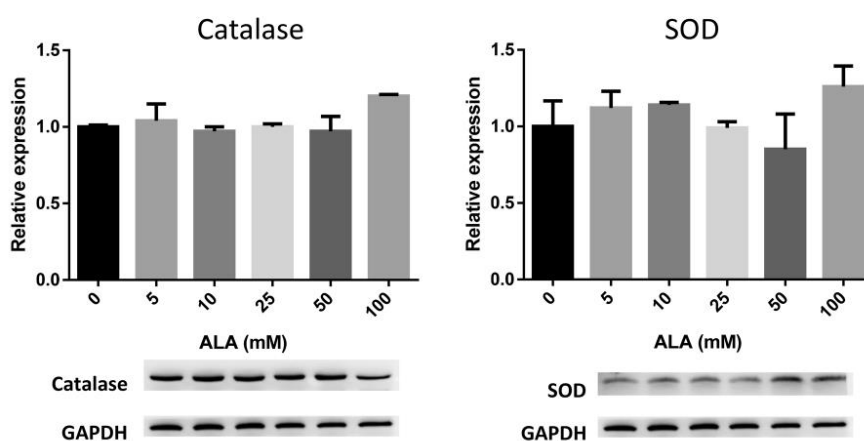


Fig. 3 Effect of ALA on catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) expressions in primary hepatocytes treated with the indicated concentrations (5–100 mM) for 2 h. CAT, SOD and GAPDH primary antibodies, and a chemiluminescent HRP-conjugated goat anti-rabbit Ig (H+L) secondary antibody was used in the Western blotting. The

results are expressed as ratio of CAT or SOD/GAPDH (mean \pm SEM) relative to the control, which was set at 1; the data are derived from four independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus the control

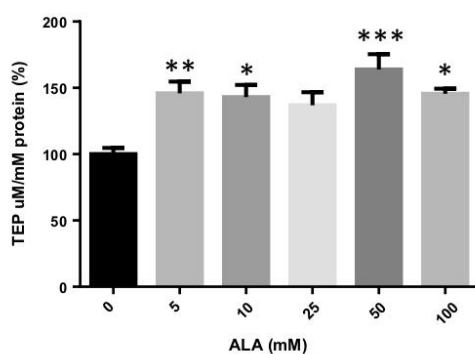


Fig. 4 Microscale TBA fluorimetric assay in primary hepatocytes induced by ALA (0–100 mM). The lipid peroxidation is expressed as a percentage of micromolar of tetraepoxypropane (TEP) equivalents per millimolar of protein. The experiment was performed in four independent cell preparations. The results are expressed as the mean \pm SEM relative to the control, set at 100%. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus the control

which is catalyzed by the enzyme HMG-CoAr [41]. The cholesterol level in tumor cells is higher than in surrounding cells, and the deregulated growth demand leads to an alteration in its synthesis and regulation [42]. Actually, an enhanced cholesterol requirement is closely related to a high cell proliferation [43] and tumor growth [44]. Cancer tissues display a decrease in the expression of the cholesterol

exporter ATP binding cassette transporter A1, an increase in cholesterol uptake via LDL receptors, an upregulation of HMG-CoAr and a loss of its feedback inhibition [45]. Moreover, the trafficking of cholesterol to the mitochondria is increased [46], contributing to mitochondrial dysfunction, chemotherapy resistance and the metabolic reprogramming of tumor cells [47, 48]. Accordingly, HCC presents a cholesterol dependency [49] and metabolic models show that “among 101 metabolites relevant to HCC development, 30% are related to cholesterol biosynthesis” [50]. Indeed, the use of statins has a protective association with the risk of developing liver cancer [51]. In addition, it is hypothesized that the accumulation of cholesterol in the mitochondria alters membrane fluidity, permeability and organization, affecting the function of resident proteins, pore formation, cytochrome c release and the interactions between Bcl-2 proteins, which leads to mitochondria impairment [48].

An elevated level of 8-oxodGuo in DNA was already measured in peritumoral tissue in HCC [52]. Moreover, increased oxidative DNA damage is associated with hepatocarcinogenesis in patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH); the level of 8-oxodGuo in the liver of NASH patients who concomitantly present HCC is higher than the NASH patients without HCC [53]. Although no direct and specific molecular mechanisms can be established regarding the exact role of oxidatively induced DNA lesions, the conversion of the misrepaired or unrepaired lesions to mutations seems to be the leading force conducting cells to transformation and cancer development [52, 54]. Usually,

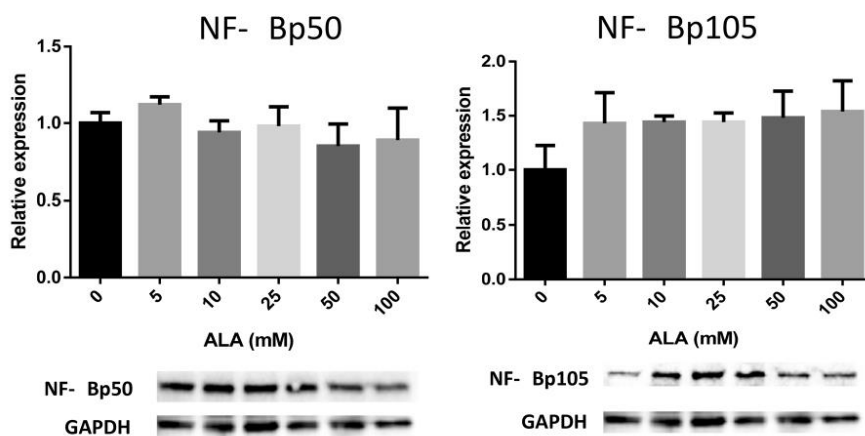


Fig. 5 Effect of ALA on NF- κ B 105/50 expression in primary hepatocytes treated with the indicated concentrations (5–100 mM) for 2 h. The experiment was performed in four independent cell preparations. NF- κ B and GAPDH primary antibodies and a chemiluminescent HRP-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody were used in

the Western blotting. The results are expressed as the ratio of NF- κ B/GAPDH (mean \pm SEM) relative to the control, which was set at 1; that data are derived from four independent experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01 versus the control

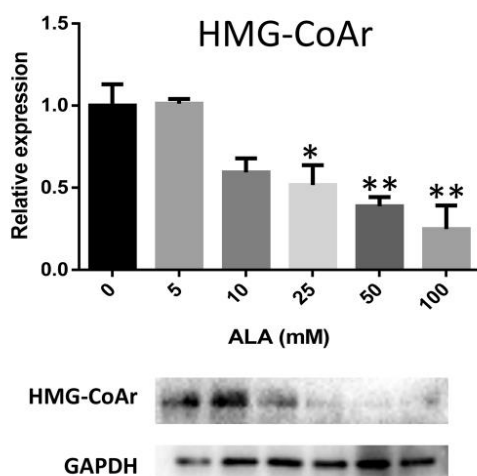


Fig. 6 Effect of ALA on HMG-CoAr expression in primary hepatocytes treated with the indicated concentrations (5–100 mM) for 2 h. HMG-CoAr and GAPDH primary antibodies and a chemiluminescent HRP-conjugated goat anti-rabbit Ig (H+L) secondary antibody were used in the Western blotting. The results are expressed as the ratio of HMG-CoAr/GAPDH (mean \pm SEM) relative to the control, which was set at 1; the data are derived from 4 independent experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01 versus the control

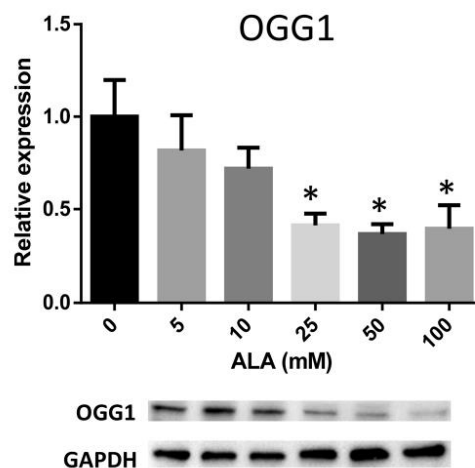


Fig. 7 Effect of ALA on OGG1 expression in primary hepatocytes treated with the indicated concentrations (5–100 mM) for 2 h. OGG1 and GAPDH primary antibodies and a chemiluminescent HRP-conjugated goat anti-rabbit Ig (H+L) secondary antibody were used in the Western blotting. The results are expressed as the ratio of OGG1/GAPDH (mean \pm SEM) relative to the control, which was set at 1; that data are derived from four independent experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01 versus the control

8-oxodGuo causes a transversion from guanine (G) to thymidine (T), modulating gene expression by either changing the sequence context of the transcription factors binding sites or by directly altering DNA–protein interactions [55]. In fact, NF- κ B classically binds to DNA sequences that contains runs of guanines [55, 56]. The access of NF- κ B to its binding motifs can also be affected by architectural changes in DNA induced by OGG1 binding to 8-oxodGuo. Thus, the transcriptional machinery encounters a new epigenetic regulatory mechanism to modulate a timely cellular response to oxidative exposure [55], possibly including the one caused by ALA oxidation.

It is important to emphasize that the cellular processes promoted by ROS do not increase in a linear manner. Following the hierarchical oxidative stress model [57], a low oxidative stress induces the expression of antioxidant enzymes (CAT and SOD), an intermediate level of oxidative stress triggers a microenvironment inflammatory response by NF- κ B and AP-1 activation, and a high level of ROS affects the mitochondrial PT pore and disrupts the electron transfer, thereby resulting in apoptosis or necrosis [57].

Hikita et al. [54] proposed that an enhanced ROS production aggravates oxidative stress events and induces oxidative DNA lesions, especially 8-oxodGuo, which leads to mutations, such as the C > A/G > T transversion, and ultimately leads to HCC development. This hypothesis accounts for the underlying mechanisms for ALA-induced carcinogenesis. A harmful build-up of ALA in the hepatic tissue of AIP patients boosts ROS production, especially hydrogen peroxide and hydroxyl radical. This oxidative cellular environment leads to a redox homeostasis imbalance and regulates the expression of stress-related carcinogenic proteins, such as p53, Bcl-2, HMG-CoAr and OGG1. This scenario is congruent with the hypothesis that ROS-induced tumor promoting events may occur in AIP patients, thereby inducing the onset of HCC.

Conclusions

Using primary rat hepatocytes, we demonstrated that increasing the levels of ALA during a short-term treatment (2 h) altered the expression pattern of oxidative stress-related proteins. ALA induced lipoperoxidation and promoted an increase in p53 expression and a downregulation of Bcl-2, HMG-CoAr and OGG1 proteins. Taken together, our results indicate that ALA's pro-oxidative properties induce a redox homeostasis imbalance, proapoptotic events, and cell proliferation and interfere with lipid metabolism and DNA repair processes.

Acknowledgements This work was supported by the “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo” FAPESP (Grants:

07/01966-5 and 10/51068-6). PRM and CBG received fellowships from “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” - CAPES (Biotechnology Program-USP-33002010156PO and “Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação”-PEC-PG notice 042/2012”).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval The experimental procedure was approved by the animal ethics committee of Butantan Institute (CEUAIB 755/10) and was performed in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and the associated guidelines, the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments and complied with the ARRIVE guidelines.

Research involving human participants All authors declare that this article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.

References

1. Karim Z, Lyoumi S, Nicolas G et al (2015) Porphyrrias: a 2015 update. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 39:412–425. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2015.05.009>
2. Besur S, Schmeltzer P, Bonkovsky HL (2015) Acute porphyrias. *J Emerg Med* 49:305–312. <https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2015.04.034>
3. Bissell DM, Wang B (2015) Acute hepatic porphyria. *J Clin Transl Hepatol* 3:17–26. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2014.00039>
4. Sardh E, Wahlin S, Björnstedt M et al (2013) High risk of primary liver cancer in a cohort of 179 patients with acute hepatic porphyria. *J Inherit Metab Dis* 36:1063–1071. <https://doi.org/10.1007/s10545-012-9576-9>
5. Onuki J, Medeiros MH, Bechara EJ, Di Mascio P (1994) 5-Aminolevulinic acid induces single-strand breaks in plasmid pBR322 DNA in the presence of Fe²⁺ ions. *Biochim Biophys Acta* 1225:259–263
6. Fraga CG, Onuki J, Lucesoli F et al (1994) 5-Aminolevulinic acid mediates the in vivo and in vitro formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Carcinogenesis* 15:2241–2244
7. Douki T, Onuki J, Medeiros MHG et al (1998) Hydroxyl radicals are involved in the oxidation of isolated and cellular DNA bases by 5-aminolevulinic acid. *FEBS Lett* 428:93–96. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00504-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00504-3)
8. Fiedler DM, Eckl PM, Krammer B (1996) Does delta-aminolevulinic acid induce genotoxic effects? *J Photochem Photobiol B* 33:39–44
9. Onuki J, Rech CM, Medeiros MHG et al (2002) Genotoxicity of 5-aminolevulinic and 4,5-dioxovaleric acids in the Salmonella/microsuspension mutagenicity assay and SOS chromotest. *Environ Mol Mutagen* 40:63–70. <https://doi.org/10.1002/em.10083>
10. Homedan C, Schmitt C, Laafi J et al (2015) Mitochondrial energetic defects in muscle and brain of a Hmbs^{-/-} mouse model of acute intermittent porphyria. *Hum Mol Genet* 24:5015–5023. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv222>
11. Ciccarese F, Ciminale V (2017) Escaping death: mitochondrial redox homeostasis in cancer cells. *Front Oncol* 7:117. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00117>

12. Singh KK (2006) Mitochondria damage checkpoint, aging, and cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1067:182–190. <https://doi.org/10.1196/annals.1354.022>
13. Onuki J, Chen Y, Teixeira PC et al (2004) Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by 5-aminolevulinic acid. *Arch Biochem Biophys* 432:178–187. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.09.030>
14. Sies H (2017) Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: oxidative eustress. *Redox Biol* 11:613–619. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>
15. Onuki J, Teixeira PC, Medeiros MHG, Di Mascio P (2002) Danos ao DNA promovidos por ácido 5-aminolevulinico: Possível associação com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em portadores de porfiria aguda intermitente. *Quim Nova* 25:594–608. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000400015>
16. Olinski R, Gackowski D, Rozalski R et al (2003) Oxidative DNA damage in cancer patients: a cause or a consequence of the disease development? *Mutat Res* 531:177–190
17. Rani V, Deep G, Singh RK et al (2016) Oxidative stress and metabolic disorders: pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci* 148:183–193. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.002>
18. Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A (1996) No Title. In: Guillouzo A, Guguen-Guillouzo C (eds) Isolated and cultured hepatocytes. Les Editions INSERM and John Libbey Eurotext, Paris, pp 1–12
19. Onuki J, Teixeira PC, Medeiros MHG et al (2002) Is 5-aminolevulinic acid involved in the hepatocellular carcinogenesis of acute intermittent porphyria? *Cell Mol Biol* 48:17–26
20. Noble JE (2014) Quantification of protein concentration using UV absorbance and coomassie dyes. *Methods Enzymol* 536:17–26. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420070-8.00002-7>
21. Mihara M, Uchiyama M (1978) Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86:271–278
22. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC (2004) p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci* 25:177–181. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.02.009>
23. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991) p53 mutations in human cancers. *Science* 253:49–53
24. Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323–331
25. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M et al (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9:1799–1805
26. Kirkin V, Joos S, Zörnig M (2004) The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1644:229–249. <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2003.08.009>
27. Chong SJF, Low ICC, Pervaiz S (2014) Mitochondrial ROS and involvement of Bcl-2 as a mitochondrial ROS regulator. *Mitochondrion* 19:39–48. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.06.002>
28. Pierce RH, Vail ME, Ralph L et al (2002) Bcl-2 expression inhibits liver carcinogenesis and delays the development of proliferating foci. *Am J Pathol* 160:1555–1560. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61101-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61101-7)
29. Takaki A, Yamamoto K (2015) Control of oxidative stress in hepatocellular carcinoma: helpful or harmful? *World J Hepatol*. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i7.968>
30. Cabrera R, Limaye A, Cabrera R (2012) Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis, and therapeutics. *Hepatic Med Evid Res* 4:19. <https://doi.org/10.2147/HMER.S16316>
31. Vairo G, Innes KM, Adams JM (1996) Bcl-2 has a cell cycle inhibitory function separable from its enhancement of cell survival. *Oncogene* 13:1511–1519
32. Murphy KL, Kittrell FS, Gay JP et al (1999) Bcl-2 expression delays mammary tumor development in dimethylbenz(a)anthracene-treated transgenic mice. *Oncogene* 18:6597–6604. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203099>
33. Um H-D (2016) Bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species. *Oncotarget* 7:5193–5203. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6405>
34. Sun T, Sun B, Zhao X et al (2011) Promotion of tumor cell metastasis and vasculogenic mimicry by way of transcription coactivation by Bcl-2 and Twist1: a study of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 54:1690–1706. <https://doi.org/10.1002/hep.24543>
35. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM et al (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75:241–251
36. Ellerby LM, Ellerby HM, Park SM et al (1996) Shift of the cellular oxidation-reduction potential in neural cells expressing Bcl-2. *J Neurochem* 67:1259–1267
37. Emanuelli T, Pagel FW, Porciúncula LO, Souza DO (2003) Effects of 5-aminolevulinic acid on the glutamatergic neurotransmission. *Neurochem Int* 42:115–121. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(02\)00074-8](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(02)00074-8)
38. Laafi J, Homedan C, Jacques C et al (2014) Pro-oxidant effect of ALA is implicated in mitochondrial dysfunction of HepG2 cells. *Biochimie* 106:157–166. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.08.014>
39. Rossin D, Calfapietra S, Sottero B et al (2017) HNE and cholesterol oxidation products in colorectal inflammation and carcinogenesis. *Free Radic Biol Med*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.017>
40. Douki T, Onuki J, Medeiros MHG et al (1998) DNA alkylation by 4,5-dioxovaleric acid, the final oxidation product of 5-aminolevulinic acid. *Chem Res Toxicol* 11:150–157. <https://doi.org/10.1021/tx970157d>
41. Goldstein JL, Brown MS (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343:425–430. <https://doi.org/10.1038/343425a0>
42. Garcia-Ruiz C, Mari M, Colell A et al (2009) Mitochondrial cholesterol in health and disease. *Histol Histopathol* 24:117–132. <https://doi.org/10.14670/HH-24.117>
43. Lo Sasso G, Celli N, Caboni M et al (2010) Down-regulation of the LXR transcriptome provides the requisite cholesterol levels to proliferating hepatocytes. *Hepatology* 51:1334–1344. <https://doi.org/10.1002/hep.23436>
44. Dang CV (2012) Links between metabolism and cancer. *Genes Dev* 26:877–890. <https://doi.org/10.1101/gad.189365.112>
45. Casey SC, Amedei A, Aquilano K et al (2015) Cancer prevention and therapy through the modulation of the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol* 35:S199–S223. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.007>
46. Montero J, Morales A, Llacuna L et al (2008) Mitochondrial cholesterol contributes to chemotherapy resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 68:5246–5256. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6161>
47. Ribas V, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC (2016) Mitochondria, cholesterol and cancer cell metabolism. *Clin Transl Med* 5:22. <https://doi.org/10.1186/s40169-016-0106-5>
48. Maxfield FR, Tabas I (2005) Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* 438:612–621. <https://doi.org/10.1038/nature04399>
49. Borena W, Strohmaier S, Lukanova A et al (2012) Metabolic risk factors and primary liver cancer in a prospective study of 578,700 adults. *Int J Cancer* 131:193–200. <https://doi.org/10.1002/ijc.26338>
50. Agren R, Mardinoglu A, Asplund A et al (2014) Identification of anticancer drugs for hepatocellular carcinoma through personalized genome-scale metabolic modeling. *Mol Syst Biol* 10:721
51. Singh S, Singh PP (2014) Statins for prevention of hepatocellular cancer: one step closer? *Hepatology* 59:724–726. <https://doi.org/10.1002/hep.26614>

52. Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG (2011) Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res* 711:193–201. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.12.016>
53. Tanaka S, Miyanishi K, Kobune M et al (2013) Increased hepatic oxidative DNA damage in patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 48:1249–1258. <https://doi.org/10.1007/s00535-012-0739-0>
54. Hikita H, Kodama T, Tanaka S et al (2015) Activation of the mitochondrial apoptotic pathway produces reactive oxygen species and oxidative damage in hepatocytes that contribute to liver tumorigenesis. *Cancer Prev Res* 8:693–701. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-15-0022-T>
55. Pan L, Zhu B, Hao W et al (2016) Oxidized guanine base lesions function in 8-oxoguanine DNA glycosylase-1-mediated epigenetic regulation of nuclear factor κ B-driven gene expression. *J Biol Chem* 291:25553–25566. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.751453>
56. Ghosh S, Karin M (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109(Suppl):S81–S96
57. Tonks NK (2005) Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. *Cell* 121:667–670. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.016>

APÉNDICE B

MetaCore

Quick reference guide

User Data

| NETWORKS | MAPS |
|---|------|
| | |
| Up-regulated (+) Object has user data with positive value | |
| | |
| Down-regulated (-) Object has user data with negative value | |
| | |
| Mixed-signal (+/-) Object has user data with both positive and negative values | |
| | |
| Gene variants Object has user data with gene variants | |
| | |
| Mixed data Object has user data with both expression values and gene variants | |

Network Objects

| ENZYMES | GENERIC CLASSES |
|---|--|
| Generic enzyme | Receptor ligand |
| KINASE | Transcription factor |
| Generic kinase | Protein |
| Protein kinase | Compound |
| Lipid kinase | Predicted metabolite or user's structure |
| PHOSPHATASE | Inorganic ion |
| Generic phosphatase | Reaction |
| Protein phosphatase | DNA |
| Lipid phosphatase | RNA |
| PHOSPHOLIPASE | Generic binding protein |
| Generic phospholipase | Cell membrane glycoprotein |
| PROTEASE | G PROTEIN ADAPTOR/REGULATORS |
| Generic protease | G beta/gamma |
| Metalloprotease | Regulators (GDI, GAP, GET, etc.) |
| GTPASE | |
| G-alpha | |
| RAS - superfamily | |
| CHANNELS/TRANSPORTERS | |
| Generic channel | |
| Ligand-gated ion channel | |
| Voltage-gated ion channel | |
| Transporter | |
| RECEPTORS | |
| Generic Receptor | |
| GPCR | |
| Receptors with kinase activity | |
| GROUPS OF OBJECTS | |
| A complex or a group Proteins physically connected into a complex or related as a family | |
| Logical association Proteins linked by logical relations or physical interactions | |
| Custom association Group of collapsed objects chosen by user | |

Interactions between objects

EFFECTS

- Positive / activation
- Negative / inhibition
- Unspecified

LINKS ON NETWORKS

- Incoming interaction
When the mouse is over object, yellow link indicates direction to object
- Outgoing interaction
Cyan link indicates direction FROM the object

MECHANISMS

PHYSICAL INTERACTIONS

- B** Binding
Physical interaction between molecules
- C** Cleavage
Cleavage of a protein at a specific site yielding distinctive peptide fragments. Proteolytic cleavage can be carried out by both enzymes and compounds
- CM** Covalent modifications
Covalent binding of a small chemical groups to protein amino acids or DNA/RNA nucleotides.
- +P** Phosphorylation
Protein activity is altered via addition of a phosphate group
- P** Dephosphorylation
Protein activity is altered via removal of a phosphate group
- T** Transformation
Protein activity regulation by binding & hydrolysis of GTP
- Tn** Transport
Transport of a protein or a compound between organelles
- Z** Catalysis
Catalysis of an enzymatic reaction
- Tr** Transcription regulation
Physical binding of a transcription factor to target gene's promoter
- cRT** Co-regulation of transcription
Influences on gene expression by direct binding with transcription machinery or by chromatin remodelling
- Rg** Regulation
Influence on the biochemical reaction by changing its composition
- M** MicroRNA binding
Regulation of gene expression by binding of microRNA to target mRNA

FUNCTIONAL INTERACTIONS

- IE** Influence on expression
Indirect influence of chemical compound or protein on the amount of another protein
- Cn** Competition
When two molecules compete for the interaction with the third molecule
- ?** Unspecified interactions
Influence on activity of protein or RNA without determined mechanism
- PE** Drug-Drug interactions. Pharmacological effect
Drugs change pharmacological effects of other drugs, for instance by competing for drug metabolism enzymes or organic transporters
- TE** Drug-Drug interactions. Toxic effect
Drugs change toxic effects of other drugs, for instance by competing for drug metabolism enzymes or organic transporters

LOGICAL RELATIONS

- GR** Group relation
Object belongs to a generic group of related objects
- CS** Complex subunit
Protein is a subunit of a protein complex
- SR** Similarity relation
Chemically similar compounds with chosen Tanimoto similarity score

INTERACTIONS FROM CUSTOM LIST (Metalink™)

- Interaction is in the network
Interaction is represented by a thin solid line and is highlighted in blue
- Interaction is in the base, but not in network
Interaction is highlighted in yellow
- Interaction is in the network
Interaction is highlighted in magenta

CANONICAL PATHWAYS

- Canonical pathway
The link is highlighted in a thick cyan or magenta line

LINKS ON MAPS

- Disrupts in disease
- Weakens in disease
- Emerges in disease
- Enhances in disease
- Species specific interactions

Objects on maps

LOCALIZATION

- Mitochondria
- EPR
- Golgi
- Nucleus
- Lysosome
- Peroxisome
- Cytoplasm
- Extracellular

OTHER MAP OBJECTS

Comments

- Note
- Normal process
- Pathological process

Blocks

- Normal process
- Pathological process

- Species specific object
- Path start

For more information, visit clarivate.com/metacore

North America
Philadelphia: +1 800 336 4474
+1 215 386 0100

Latin America
Brazil: +55 11 8370 9845
Other countries: +1 215 823 5674

11.2018
© 2018 Clarivate Analytics

Europe, Middle East and Africa
London: +44 20 7433 4000

Asia Pacific
Singapore: +65 6775 5088
Tokyo: +81 3 4589 3107

clarivate.com

Cortellis
Powering Life Sciences Innovation

Clarivate
Analytics