INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 977896 E**

(51) Classificação Internacional:
C12Q 1/68 (2006.01) ***C12Q 1/02*** (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1999.04.12**

(30) Prioridade(s): **1998.04.14 EP 9887008**

(43) Data de publicação do pedido: **2000.02.09**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.01.17**
004/2007

(73) Titular(es):
VLAAMSE INSTELLING VOOR TEC. ONDERZOEK (VITO)
BOERETANG 200 B-2400 MOL **BE**

(72) Inventor(es):
DANIL VAN DER LELIE BE
LUC AGNES LOUIS JEAN BOSCO REGNIERS BE
SAFIYH TAGHAVI BE
PHILIPPE GILBERT GHISLAIN CORBISIER BE
LUC PHILIPPINE EDOUARD VERSCHAEVE BE

(74) Mandatário:
PEDRO GIL DA SILVA PELAYO DE SOUSA HENRIQUES
R DE SÁ DA BANDEIRA 706 2 ESQ 4000-432 PORTO PT

(54) Epígrafe: **SISTEMA DE DIAGNÓSTICO E MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO NA PRESENÇA DE UM COMPOSTO GENOTÓXICO NUMA AMOSTRA**

(57) Resumo:

RESUMO

SISTEMA DE DIAGNÓSTICO E MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE UM COMPOSTO GENOTÓXICO NUMA AMOSTRA

O presente invento respeita a um sistema de diagnóstico feito de: um microrganismo transformado capaz de uma elevada actividade informativa quando exposto a uma agressão ambiental, microrganismo esse possuindo uma sequência promotora induzida pela tensão, sendo operativamente ligada a uma sequência informativa codificadora de ácidos nucleicos codificando uma molécula informativa que resulta num sinal que pode ser analisado; e de um microrganismo transformado tendo uma sequência constitutiva e promotora não induzida pela tensão, sendo operativamente ligada a uma sequência informativa codificadora de ácidos nucleicos codificando uma molécula informativa que resulta num sinal que pode ser analisado.

DESCRIÇÃO

SISTEMA DE DIAGNÓSTICO E MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE UM COMPOSTO GENOTÓXICO NUMA AMOSTRA

Campo da invenção

[0001] O presente invento refere-se a um sistema de diagnóstico e a um método para determinar a presença de um composto genotóxico numa amostra.

Bases do invento e estado da técnica

[0002] O Pedido de Patente Internacional WO9741251 descreve uma sequência de ácido nucleico recombinante, um microrganismo hospedeiro compreendendo a dita sequência de ácido nucleico e o uso desse microrganismo hospedeiro para detecção da presença de compostos genotóxicos numa amostra. O aludido teste de genotoxicidade bacteriana é baseado em bioluminescência e permite uma detecção de compostos genotóxicos fácil, muito rápida e barata. O teste mostrou ser pelo menos tão sensível como o teste Ames e o cromoteste SOS e permitir a medição da cinética da genotoxicidade, bem como a avaliação simultânea da toxicidade do composto ou material testado (van der Lelie et al., 1997). Este novo teste, referido como teste VITOTOX®, foi, portanto, considerado como sendo um valioso teste de genotoxicidade e toxicidade de curto prazo, para diferentes propósitos.

[0003] O teste é baseado em bactérias que contêm o operão *lux* de *Vibrio fischeri* sob controlo transcritivo do gene *recN*, que faz parte do sistema SOS. Após a incubação

das bactérias na presença de compostos genotóxicos, o promotor *recN* é desreprimido, resultando na expressão do operão *lux*. Esta expressão resulta na produção de luz em função da genotoxicidade. Originalmente, o teste foi realizado com diferentes estirpes modificadas de *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. As estirpes *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100 e TA104) foram adicionalmente usadas, já que as bactérias são bastante conhecidas para testes de mutagenicidade e porque as mesmas bactérias poderão também ser usadas num teste clássico Ames, caso tal seja requerido. A construção que usa um promotor *recN* até à mutação (*recN* 2-4), dá os melhores resultados em todas as estirpes. Além disso, uma vez que todas as estirpes *Salmonella* deram resultados muito comparáveis, foi proposto, para uso posterior, utilizar apenas as construções TA104 [chamadas TA104 (*recN*2-4)] já que mostraram ser, por vezes, um pouco mais sensíveis do que as outras estirpes híbridas (van der Lelie et al., 1997).

[0004] No entanto, alguns compostos actuam directamente na produção de luz (p. ex., aldeídos e solventes orgânicos) ou aumentam o metabolismo das bactérias criando resultados falsos positivos.

Objectivos do invento

[0005] O presente invento tem por objectivo fornecer um novo sistema de diagnóstico e um novo método, para a detecção de uma agressão ambiental - como seja a presença de um composto genotóxico numa amostra - que não apresentem as desvantagens do estado da arte.

[0006] Um objectivo principal do presente invento é o de fornecer um novo sistema de diagnóstico e um novo método que excluam resultados falso-positivos e falso-negativos.

[0007] Um outro objectivo do presente invento é o de

fornecer um sistema de diagnóstico e um método que possam ser usados para o rastreio de compostos genotóxicos obtidos no campo da indústria química, cosmética ou farmacêutica, como um estudo de pré-validação de compostos químicos, cosméticos e/ou farmacêuticos intermediários ou activos.

[0008] Um último objectivo do presente invento é o de fornecer um sistema de diagnóstico e de método que possibilitem o rastreio automático com base num volume de amostra muito pequeno.

Descrição do invento

[0009] O presente invento refere-se a um sistema de diagnóstico feito de:

- um microrganismo transformado capaz de uma elevada actividade informativa quando exposto a uma agressão ambiental, preferencialmente uma exposição a um composto genotóxico, microrganismo esse possuindo uma sequência promotora induzida pela tensão, preferencialmente uma sequência promotora que é induzida por um composto genotóxico, sendo operativamente ligada a uma sequência informativa codificadora de ácidos nucleicos codificando uma molécula informativa que resulta num sinal que pode ser analisado, e de
- um microrganismo transformado tendo uma sequência constitutiva e promotora não induzida pela tensão, preferencialmente uma sequência constitutiva e promotora que não é induzida por tal composto genotóxico, sendo tal sequência promotora operativamente ligada a uma sequência informativa codificadora de ácidos nucleicos codificando uma molécula informativa que resulta num sinal que pode ser analisado.

[0010] Preferencialmente, ambos os microrganismos transformados são bioluminescentes e o sinal pode ser analisado como produção de luz. Outras possibilidades são a peroxidase, fosfatase alcalina, β-galactose e a sequência genética gus, onde o sinal será analisado como uma modificação colorimétrica ou uma produção de luz quimiluminescente quando usado um analisador colorimétrico ou um aparelho fotomultiplicador.

[0011] Vantajosamente, o sistema de diagnóstico de acordo com o invento é feito de dois microrganismos bioluminescentes transformados, sendo o primeiro microrganismo bioluminescente "activado" na presença de um composto genotóxico, o que resulta num sinal que pode ser analisado como produção de luz, enquanto que a produção de luz do segundo microrganismo bioluminescente não é influenciada pela presença de um composto genotóxico na amostra.

[0012] A sequência de ácidos nucleicos codificadora de um repórter que resulta num sinal que pode ser analisado como produção de luz já foi descrita no estado da técnica. Preferencialmente, os microrganismos bioluminescentes transformados de acordo com o invento compreendem os genes A e B da luciferase, também identificados como complexo expressivo de genes lux, compreendendo os genes luxA e luxB ou um gene luxAB de tradução de fusão. Os microrganismos bioluminescentes transformados também podem compreender os genes C, D e E da luciferase requeridos para a produção de substrato de ácido gordo limitador que é usado na reciclagem.

[0013] De acordo com uma materialização preferencial do presente invento, o sistema de diagnóstico compreende um microrganismo bioluminescente transformado, tendo uma sequência constitutiva e promotora não induzida pela tensão, com uma sequência de consenso Sigma 70 (TTGACA

(-35).....17/18bp.....TATAAT(-10) e cuja transcrição não está regulada positiva ou negativamente a nível do promotor. Tal promotor de consenso é descrito em HOOPES BC e McClure WR (1987): Strategies in Regulation of Transcriptional Initiation; in *Escherichia Coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology, FC Neidhart, JL Ingraham, KB Low, B Maganasik, M Schaechter, HE Umbaeger (eds.), American Society for Microbiology, Washington D.C., pp 1231-1240.

[0014] De acordo com uma materialização preferencial do presente invento, os microrganismos bioluminescentes transformados são seleccionados do grupo consistindo de *E. coli.* ou *Salmonella thyphimurium* e são vantajosamente microrganismos adequados ao teste Ames, preferencialmente seleccionados do grupo que contém TA98, TA100, TA102, TA104, TA1535, TA1538, TA7001 a TA7006 e TA7041 a TA7046, ou tendo o microrganismo com número de depósito LMG P-18318. O microrganismo com número de depósito LMG P-18318 será doravante identificado como estirpe "*prl*".

[0015] Vantajosamente, a sequência promotora induzida pela tensão no microrganismo bioluminescente transformado do sistema de diagnóstico de acordo com o invento é seleccionada do grupo compreendendo groEL, dnaK, grpE, phoA, glnA, lon, lysU, rpoD, clpB, clpP, uspA, katG, uvrA, frdA, micF, fabA, lac, his, sodA, sodB, soi-28, recA, xthA, narG, recF, recJ, recN, recO, recQ, ruv, uvrD, ars, cad, mer, pco e sfiA.

[0016] De acordo com uma materialização preferencial do presente invento, a sequência promotora induzida pela tensão é *rec*N, vantajosamente *rec*N2-4. Tal microrganismo será doravante identificado como estirpe "*rec*N2-4".

[0017] Numa materialização preferencial, o sistema de diagnóstico de acordo com o invento compreende um microrganismo bioluminescente transformado que tem uma sequência promotora induzida pela tensão que é uma

sequência promotora regulada por SOS, tendo preferencialmente uma razão de indução superior a 40 e compreendendo, vantajosamente, uma mutação que melhora a resistência ou regulação do promotor, não destruindo tal mutação a regulação SOS.

[0018] Um exemplo específico de sequência promotora de *recN* mutada é descrito no Pedido de Patente Internacional PCT/EP96/01745 e aqui incorporado por referência.

[0019] Tal sequência promotora induzida pela tensão também compreende um promotor com mutação, preferencialmente um promotor com mutação na região -35 de tal promotor, descrito no Pedido de Patente Internacional PCT/EP96/01745 e aqui incorporado por referência.

[0020] O presente invento também se refere a um estojo de diagnóstico compreendendo os elementos do sistema de diagnóstico de acordo com a invenção e possivelmente reagentes adicionais, diluentes e/ou suportes sólidos, necessários para tal diagnóstico, tal como uma solução tampão, uma solução compreendendo um marcador específico tal como X-galactose (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galacto-sida) para um diagnóstico baseado no uso de uma sequência genética de β-galactose, o luminol para um diagnóstico baseado no uso de uma sequência genética de peroxidase, etc...

[0021] O presente invento também se refere a um método geral para o diagnóstico de uma tensão ou agressão ambiental, preferencialmente para determinar a presença, numa amostra, de um composto genotóxico. O dito método compreende as fases de exposição do sistema de diagnóstico de acordo com a invenção à dita agressão ambiental (preferencialmente compreendendo a fase de exposição do sistema de diagnóstico ao composto genotóxico presente na amostra) e de medição de um sinal, preferencialmente uma mudança na luminescência de tal sistema de diagnóstico.

[0022] O presente invento também se refere a um método

para determinar a cinética da genotoxicidade de um composto numa amostra, baseado no método acima mencionado, no qual se procede à medição da luminescência, quer dos microrganismos transformados inductíveis, quer dos microrganismos transformados constitutivos, em múltiplos pontos no tempo, preferencialmente de modo contínuo, e, adicionalmente, se leva a cabo a determinação da razão (S/N) entre o sinal e o ruído para os microrganismos transformados nos ditos ponto e tempo, dividindo a razão S/N do microrganismo inductível pela dos microrganismos constitutivos, e a representação desses dados; traduzindo tal representação a cinética corrigida da genotoxicidade do composto genotóxico na amostra.

[0023] Vantajosamente, o sistema de diagnóstico e o método de acordo com o invento podem ser combinados com o método e teste Ames e/ou o método e cromoteste SOS, como se descreve mais adiante.

[0024] O presente invento também se refere a um método de análise de uma agressão ambiental, compreendendo as fases de:

- realização do diagnóstico de tal agressão ambiental, conforme descrito acima;
- cálculo da razão entre o sinal e o ruído de ambos os microrganismos transformados;
- classificação de tal agressão ambiental como tóxica se, pelo menos, uma das razões entre o sinal e o ruído calculadas for mais baixa que 0,8;
- classificação de tal agressão ambiental como não tendo efeito se a razão entre o sinal e o ruído do microrganismo que compreende uma sequência promotora induzida pela tensão ficar entre 0,8 e 1,2; e
- classificação de tal agressão ambiental como indutora e genotóxica se a razão entre o sinal e o ruído do microrganismo que compreende a sequência promotora

induzida pela tensão for mais alta do que 1,2 e se for, pelo menos, 50% mais alta do que a razão entre o sinal e o ruído do microrganismo que compreende a sequência promotora constitutiva.

[0025] O presente invento será descrito em detalhe nos seguintes exemplos não limitativos, com referência às seguintes figuras.

Breve descrição dos desenhos

[0026]

Figura 1 representa a razão entre o sinal e o ruído, para epicloridrina, nas estirpes *rec*N2-4 e *pr1*.

Figura 2 representa a razão entre o sinal e o ruído, para $ZnCl_2$, nas estirpes *rec*N2-4 e *pr1*.

Figura 3 representa a razão entre o sinal e o ruído, para azeto de sódio, nas estirpes *rec*N2-4 e *pr1*.

Figura 4 representa a razão entre o sinal e o ruído, para nifuroxazida, nas estirpes *rec*N2-4 e *pr1*.

Figura 5 representa um esquema de determinação para diferenciar os possíveis resultados de um teste de diagnóstico conforme o invento.

Figura 6 representa uma instalação de acordo com o invento.

Descrição detalhada do invento

MATERIAIS E MÉTODOS

Teste Ames e cromoteste SOS

[0027] O cromoteste SOS e o teste Ames são testes de genotoxicidade bacteriana bastante conhecidos e largamente usados (p. ex., Quillardet & Hofnung, 1993; Mersh--Sundermann et al., 1994; Mortelmans et al., 1986). O teste Ames "clássico" habitualmente foi efectuado com estirpes *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100, usando o protocolo padrão descrito por Maron e Ames (1983). O cromoteste SOS foi adquirido como um estojo de teste, da Orgenics ltd (Yavne, Israel). O teste foi realizado tal como indicado nas instruções dos fabricantes.

O teste VITOTOX®

Estirpe *Salmonella typhimurium*

[0028] A região promotora *rec*N, que foi parte do gene *rec*N da *E. coli* (Rostas et al., 1987), contém dois locais de ligação LexA. Um local de ligação LexA sobrepõe-se à região -35, enquanto o segundo se sobrepõe à região -10 e ao ponto de partida da transcrição do promotor *rec*N. O promotor *rec*N da *E. coli* foi clonado a montante do operão luxCDABE do vector de expressão pMOL877 (van der Lelie et al., 1997). Isto resultou em pMOL1066. Uma vez que o promotor *rec*N está sob controlo do sistema SOS bacteriano, a expressão do operão *lux* tornou-se regulada por SOS. Isto resulta na produção de luz na presença de genotoxinas. Alguns derivados do promotor *rec*N foram também clonados em pMOL877. Um, sem o local LexA2, resultou em pMOL1067, um tendo um promotor com mutação (pMOL1068), sendo outro uma combinação de ambos (pMOL1069). Todas as construções foram introduzidas nas estirpes TA98, TA100 e TA104 do teste Ames e mostraram-se aptas a detectar compostos genotóxicos. No entanto, como os melhores resultados foram obtidos com a estirpe TA104 (pMOL1068), esta estirpe foi adicionalmente usada no chamado teste VITOTOX®. Ela foi

extensivamente descrita anteriormente e foi designada como TA104 *rec*N2-4, já que contém o fragmento *rec*N2-4 PCR (van der Lelie et al., 1997). Além de TA104 *rec*N2-4 (a estirpe de prova), a chamada estirpe TA104 *prl* é agora adicionada como "estirpe de controlo". O plasmídeo pMOL1046 foi construído através da clonagem aleatória de fragmentos de DNA dissolvidos *Eco*RI a partir de *Alcaligenes eutrophus* CH34, em *lux*CDABE - expressão de vector (pMOL877). *A. eutrophus* CH34 (ATCC 43123) é uma bactéria gram-negativa não patogénica do solo, derivada de um tanque de decantação de uma fábrica de zinco (Mergeay et al., 1985, J. Bact). Após a transformação em *E. coli* 1106 (Murray et al., 1977, Mol. Gen.Genet.), foram seleccionados clones para a produção de luz. O melhor clone intrinsecamente emissor de luz, dando a mais alta produção de luz tal como quantificada num luminómetro (medidor de luz), foi então seleccionado de entre os diferentes transformados de plasmídeo (=plasmídeo pMOL1046) e introduzidos na estirpe *S. typhimurium* TA104. Esta foi denominada estirpe "*prl*". Contém genes *lux*CDABE sob controlo de um promotor constitutivo para que a produção de luz não seja influenciada por compostos genotóxicos. A estirpe *prl* é usada em paralelo com a estirpe *rec*N2-4 e é cultivada e tratada exactamente do mesmo modo.

Procedimento do teste

1. Culturas

[0029] As bactérias foram incubadas durante a noite num misturador rotativo a 37°C num meio *869*; este é um meio de crescimento normal equivalente ao meio Luria Broth suplementado com $CaCl_2$ extra para permitir um crescimento bacteriano optimizado, encontrando-se descrito em van der Lelie et al. (1997, Mutation Res.). Na manhã seguinte, a

suspensão bacteriana foi diluída 10 vezes em meio *869* e 50µl da diluição foram então introduzidos em 2,5ml do meio *869* e incubados durante mais uma hora a 37°C num misturador rotativo (170rpm).

2. Preparação de placas com 96 poços

[0030] Entretanto foram preparadas placas de 96 poços para conter 10µl de solvente, ou do composto a testar em diferentes concentrações, ou do controlo positivo para testar a genotoxicidade, com (2-AF) ou sem (4-NQO) mistura S9. A mistura S9, preparada de acordo com Maron e Ames (1983, Mutation Res.), é usada para detectar a presença de compostos que só se tornam genotóxicos depois de activação metabólica. A mistura S9 foi preparada de fresco antes de ser usada. Para testes com mistura S9, adicionaram-se 140µl de bactérias (*rec*N2-4 ou *prl*) a 860µl de meio *869* pobre e 400µl de mistura S9. Foram então adicionados 90µl desta mistura aos 10µl de solução já presentes nos poços. Para testes sem a mistura S9, foram adicionados 1260µl de meio *869* pobre a 140µl da suspensão bacteriana, sendo então 90µl da mistura transferidos para os poços contendo 10µl do composto a testar ou controlos.

3. Medidas de genotoxicidade e toxicidade

[0031] Um luminómetro de microplacas de 96 poços (Luminoscan da Berthold) foi usado para a medição da produção de luz após a exposição aos compostos do teste. A emissão de luz de cada poço foi medida cada 5 minutos durante 5 horas (30°C, 1s/poço, 60 ciclos de 300s cada). Depois de completadas as medições, os dados foram transferidos para uma macro folha de cálculo MS Excel e foi calculada, para cada medição, a razão (S/N) entre o sinal e o ruído, como sendo o quociente entre a produção

de luz das células expostas e a produção de luz de células não expostas. Um composto foi considerado genotóxico quando a razão S/N foi maior que 2 para, pelo menos, duas concentrações e quando foi observada uma clara relação dose-efeito. Na segunda experiência, na qual foi introduzida a estirpe TA104 *prl*, a razão S/N foi calculada para as estirpes *rec*N2-4 e *prl* separadamente, assim como a razão (*rec/prl*) entre os valores S/N máximos e médios das estirpes *rec*N2-4 e *prl*. Todos os cálculos foram efectuados entre 60 e 240 minutos de incubação. Neste caso, um composto é considerado genotóxico quando a razão S/N, na estirpe *rec*N2-4, for 1,5 x maior do que o valor do solvente de controlo (e não "2" como foi inicialmente feito), mas só quando este crescimento não for acompanhado por um crescimento comparável na estirpe *prl* (que indicaria um mecanismo de indução não genotóxica). Um composto é genotóxico quando a razão da razão S/N da *rec*N2-4 sobre a da estirpe *prl* for igual ou maior do que 1,5 (limite estabelecido com base experimental). Deste modo podem ser evitados resultados "falso positivos".

[0032] Os resultados "falso negativos" podem ser identificados quando a razão S/N da estirpe *rec*N2-4 ficar entre 0,8 e 1,2, enquanto que a razão S/N do sensor *prl* desce abaixo de 0,8. Isto é tipicamente o caso de amostras que são genotóxicas e tóxicas ao mesmo tempo.

[0033] A estirpe *prl* é além disso muito valiosa para a avaliação da toxicidade. A toxicidade bacteriana é assumida quando a emissão de luz decresce substancialmente num modo dependente da dose e atinge valores S/N mais baixos do que 0,8 dentro dos primeiros 30 minutos do teste.

[0034] É possível a automatização do sistema, usando uma instalação tal como descrita na fig. 6. Um aparelho de detecção (2), compreendendo, pelo menos, um detector para o sinal que é emitido a partir de um sistema de

diagnóstico tal como acima descrito, está ligado a um computador (1) que recebe e processa os dados do detector, em conformidade com o método de análise acima descrito e tal como clarificado na figura 5. Deste modo, é possível uma análise automatizada de amostras e a sua classificação como tóxicas e/ou genotóxicas.

Os compostos do teste

[0035] Um número de compostos bem conhecidos disponíveis comercialmente, que haviam sido anteriormente avaliados apenas com a estirpe TA104 *rec*N2-4 (veja-se van der Lelie et al., 1997), foram reavaliados no presente trabalho usando as estirpes TA104 *rec*N2-4 e TA104 *prl*. Eles são dados na tabela 1.

Tabela 1: resultados do teste VITOTOX para produtos químicos seleccionados

COMPOSTO*	S9**	GAMA DE DOSES TESTADA	S/R>2 (*rec*N2-4)	MÁX	MÉDIA	Concentração para a qual a razão das razões S/R de rec/prl >1,5 TÓXICO (*prl*)
Furazolidona	-	0,125-32ppb	0,25ppb	0,5ppb	0,25ppb	
4NQO	-	0,4-102ppb	0,8ppb	1,6ppb	0,8ppb	-
Nifuroxazida	-	2-256ppb	8ppb	16ppb	8ppb	+
MMC	-	3,9-500ppb	31,2ppb	31,2ppb	15,6ppb	-
3-Nitrofluoranteno	-	7,9-1000ppb	15,7ppb	31,3ppb	15,7ppb	-
3-Nitrofluoranteno	+25	7,9-1000ppb	15,7ppb	31,2ppb	15,7ppb	-
Nifuroxazida	-	0,04-5,12ppm	0,04ppm	0,04ppm	0,04ppm	+
3Nitrofluoranteno	-	0,004-0,512ppm	0,032ppm	0,064ppm	0,032ppm	-
Carbadox	-	0,04-5,12ppm	0,08ppm	0,08ppm	0,04ppm	

Ácido nalidíssico	-	0,02-2,56ppm	0,16ppm	0,16ppm	0,16ppm	+
2,4,5,7	-	0,01-1,28ppm	0,08ppm	0,16ppm	0,04ppm	+
Tetranitro-9-fluorenona						
B (a) P	-25	0,025-6,4ppm	0,2ppm	0,2ppm	0,1pm	-
2AF	+25	0,2-3,2ppm	0,2ppm	0,2ppm	0,2ppm	-
B(a)P	+25	0,1-1,6ppm	0,2ppm	0,2pm	0,2pm	-
2,7	+25	0,04-10ppm	0,62ppm	0,62ppm	0,62ppm	-
Dinitrofluoreno						
B (a) P	+100	0,1-12,8ppm	0,8ppm	0,8ppm	0,4ppm	-
ICR 191 Acridina	-	0,02-2,5ppm	0,62ppm	1,25ppm	0,31ppm	-
a-Naftilamina	+25	0,08-10ppm	5ppm	2,5ppm	2,5ppm	-
4Nitro-o-	-	0,79-100ppm	3,1ppm	3,1ppm	1,57ppm	+
-Fenilenodiamina						
Fluoranteno	+100	3,1-400ppm	3,1ppm	3,1ppm	3,1ppm	-
H_2O_2	-	0,25-32ppm	2ppm	4ppm	2ppm	+
$K_2Cr_2O_7$	-	0,5-64ppm	4ppm	4ppm	4ppm	+
Fenantreno	+100	3,1-400ppm	6,2ppm	6,2ppm	6,2ppm	+
MMS	-	4-64ppm	16ppm	8ppm	8ppm	-
MMS	-	0,5-128ppm	8ppm	8ppm	8ppm	-
Criseno	+100	0,15-20ppm	-	10ppm	5 ppm	-
4-Nitro-o-	+25	0,79-100ppm	12,5ppm	12,5ppm	12,5ppm	+
-Fenilenodiamina						
N-	+25	3,25-480ppm	120ppm	120ppm	240ppm	-
-Nitrosodietilamina						
Epicloridrina	-	4-512ppm	120ppm	256ppm	120ppm	-
EMS	-	8-1024ppm	256ppm	256ppm	256ppm	-
Epicloridrina	-	8-1024ppm	256ppm	512ppm	128ppm	+
$ZnCl_2$	-	0,5-64ppm	-	-	-	+
$CdCl_2$	-	0,78-100ppm	-	-	-	+
Comermicina A1	-	1,56-200ppm	-	-	-	+
Azeto de sódio	-	2-256ppm	-	-	-	+
(NaN_3)						
2,7Dinitrofluoreno	-	0,04-10ppm	-	-	-	-

a-Naftilamina	-	0,08-10ppm	-	-	-	-

(*alguns produtos químicos foram investigados várias vezes em diferentes gamas de dosagem ou condições;
** µl/ml de mistura S9 usada na incubação)

RESULTADOS

[0036] Os resultados anunciados anteriormente com o teste VITOTOX® foram obtidos com a estirpe *Salmonella typhimurium* TA104 *rec*N2-4 (van der Lelie et al., 1997). De modo a melhorar ainda mais o teste, introduziu-se a estirpe *prl*. Os resultados obtidos com a estirpe *rec*N2-4 deveriam ser avaliados em comparação com os resultados obtidos com a estirpe *prl* onde o aumento da produção de luz não pode ser devido a uma ocorrência genotóxica. Consequentemente, um aumento de produção de luz pela estirpe *rec*N2-4 apenas pode ser interpretado como indicação de genotoxicidade quando não é acompanhado de um aumento comparável na produção de luz pela estirpe *prl*.

[0037] Usando ambas as estirpes bacterianas reavaliaram-se vários químicos estudados anteriormente. Os resultados são dados na tabela 1. A tabela dá as concentrações para as quais o valor S/N máximo na estirpe de prova *rec*N2-4 se torna ≥ 2, assim como as concentrações onde a razão entre os máximos e as médias das razões S/N da *rec*N2-4 e da *prl* alcança 1,5 ou mais (*rec/prl*). Finalmente, a tabela também indica a presença de toxicidade dentro da gama de dosagens testada, tal como avaliada a partir das curvas das razões S/N da *prl*. Pode-se ver que compostos genotóxicos conhecidos foram efectivamente avaliados como genotóxicos, enquanto que compostos não genotóxicos não mostraram a razão de razões S/N necessária na gama de dosagens dada.

Alguns exemplos dos resultados foram representados graficamente nas figuras 1-4 (exemplos de testes sem mistura S9). A figura 1 mostra as curvas S/N para epicloridrina nas estirpes *rec*N2-4 e *prl*. Na estirpe *rec*N2-4 os valores S/N tornam-se maiores do que 2 para a dose de 256ppm, (não mostrado) enquanto que os valores S/N na estirpe *prl* não se afastam muito de 1. A figura 2 mostra os resultados para $ZnCl_2$, que, a concentrações mais elevadas do que 7,4µM e para a *Salmonella typhimurium* TA104, não é genotóxico mas é tóxico (não mostrado). O azeto de sódio (ou azida de sódio) é dado como um terceiro exemplo na figura 3. Neste caso, a razão S/N foi consideravelmente mais elevada do que 2 em ambas as estirpes *rec*N2-4 e *prl*, obtendo-se indicações de toxicidade com o tempo (S/N<0,8). A figura 4 mostra os resultados que foram obtidos para nifuroxazida. Relativamente à estirpe *rec*N2-4 as doses mais baixas foram aparentemente mais genotóxicas que as doses mais altas, mas a estirpe *prl* mostrou uma diminuição na produção de luz dependente da dose, que indica toxicidade.

DISCUSSÃO

[0038] O teste VITOTOX® é um método sensível e rápido de detecção de compostos genotóxicos (van der Lelie et al., 1997). No entanto, se só fosse usada a estirpe *rec*N2-4 (como foi inicialmente feito), seriam possíveis algumas interpretações erróneas. O presente invento é baseado no uso da estirpe *prl*. O valor acrescentado da estirpe *prl* foi mostrado por meio de alguns exemplos. Na figura 1 é dado um exemplo de um composto genotóxico (epicloridrina) que não era tóxico para a gama de dosagem dada. Com base nos resultados obtidos a partir apenas da estirpe *rec*N2-4 pode-se concluir que o composto foi genotóxico, já que foi observado um aumento na produção de luz dependente da dose

e excedendo o valor do "ruído" por um factor maior do que dois (S/N>2). A introdução da estirpe *prl* apenas confirmou esta avaliação. Se tivesse sido encontrado um aumento na produção de luz na estirpe *prl* dever-se-ia concluir que tal fora de facto devido a outro mecanismo de indução que não o da genotoxicidade (por exemplo, uma elevada proliferação de células que intensificaria o "nível de ruído" comparado com o das culturas não expostas, etc.). Mas tal não foi o caso. Também não houve sinal de toxicidade, já que não houve diminuição na produção de luz. Isto foi já claramente o caso para o $ZnCl_2$, tal como indicado pelas curvas da figura 2. A figura mostra que para a estirpe *rec*N2-4 a dose de 3,7 µM não é nem genotóxica nem tóxica, mas que para doses elevadas se observa uma diminuição na emissão de luz que indica um efeito tóxico seguido por uma certa recuperação para doses mais baixas. Isto é confirmado pela estirpe *prl* onde a recuperação é ainda mais visível em doses até 58,8 µM $ZnCl_2$ (não mostrado). A partir de 117,5 µM $ZnCl_2$, a recuperação já não é possível. Consequentemente, o $ZnCl_2$ revelou-se não genotóxico e apenas a dose mais baixa mostrou ser isenta de qualquer toxicidade.

[0039] Tal como indicado na introdução e na secção materiais e métodos, o teste VITOTOX® é, essencialmente, baseado na detecção de um sinal SOS. Assim, teoricamente, deveria produzir resultados que estivessem mais de acordo com o cromoteste SOS do que com o teste Ames. No entanto, foram anteriormente encontradas algumas diferenças. Os Inventores referiram, por exemplo, uma resposta "positiva" para azeto de sódio, quando este composto normalmente é classificado como "negativo" no cromoteste SOS (van der Lelie et al, 1997). Uma razão para esta discrepância poderia ser a de que o teste VITOTOX® usa a estirpe *Salmonella typhimurium* TA104 do teste Ames e, consequentemente, tem as mesmas características, por

exemplo, reduzida capacidade de reparação do DNA e elevada permeabilidade às moléculas complexas (como a maioria dos compostos farmacêuticos). Esta é certamente uma explicação válida para muitos casos, mas, provavelmente, não para uma molécula pequena como o azeto de sódio (NaN_3). Neste caso outra razão para a diferença de resultados com o cromoteste SOS pode ser antecipada. Pode ser, por exemplo, que o aumento na produção de luz, tal como encontrado na estirpe *rec*N2-4, seja devido a outro mecanismo de indução que não o da genotoxicidade. Com a introdução da estirpe *pr1* está-se apto a verificar esta suposição. Como se demonstra na figura 3, a produção de luz observada na estirpe *rec*N2-4 não é devida à genotoxicidade, já que o aumento na emissão de luz também é observado na estirpe *pr1* e este não pode ser devido a uma resposta SOS. O azeto de sódio deverá, assim, ser interpretado no presente teste como não genotóxico. É um bom exemplo de um "composto" que seria um "falso positivo" quando apenas fosse usada a estirpe *rec*N2-4.

[0040] Os Inventores testaram e compararam muitos mais compostos farmacêuticos com os outros testes bacterianos. Os resultados obtidos pelos diferentes testes estavam, a maioria das vezes, completamente de acordo uns com os outros. Além disso, o teste VITOTOX® é, normalmente, muito mais sensível do que o teste Ames ou o cromoteste SOS, visto que as concentrações mínimas detectáveis são 1-100 vezes mais baixas no teste VITOTOX®.

[0041] Outra vantagem de usar a estirpe *pr1* é a de que, além da genotoxicidade, a toxicidade pode ser melhor avaliada do que somente com a estirpe *rec*N2-4. Um composto genotóxico que é investigado para dosagens próximas do limite de toxicidade pode mostrar razões S/N na estirpe *rec*N2-4 que são "intermédias" entre a genotoxicidade e a toxicidade, uma vez que o aumento na produção de luz (devido a genotoxicidade) compete com a diminuição (devida

à toxicidade), resultando numa razão S/N ≅1. O composto seria, portanto, interpretado como não sendo nem genotóxico nem tóxico (resultado falso negativo). A estirpe *prl* mostrará claramente uma diminuição na emissão de luz, indicando que o composto já é tóxico na dosagem dada. Isto é mostrado, pelo menos para algumas doses, na figura 4 onde a nifuroxazida foi tomada como exemplo. Pode verificar-se que as doses mais baixas deram a maior resposta genotóxica, atendendo à toxicidade ser dependente da dose. As curvas S/N para a estirpe *prl* indicam claramente que apenas as doses mais baixas, até 0,16ppm, não eram tóxicas. As doses mais elevadas podem mostrar toxicidade combinada com genotoxicidade (por exemplo, 0,32ppm) ou podem ser demasiado tóxicas para mostrar genotoxicidade (doses mais elevadas).

[0042] Ambas as estirpes *rec*N2-4 e *prl* demonstraram ser capazes de detectar concentrações tóxicas de um composto. No entanto, a estirpe *prl* é mais valiosa nos testes de toxicidade, uma vez que as curvas S/N não podem ser influenciadas pela genotoxicidade e, consequentemente, reflectem apenas a toxicidade (ou a sua ausência). A estirpe *prl* aparentemente providencia uma ferramenta perfeita para aqueles que apenas estejam interessados na determinação da toxicidade. Presentemente, está-se a comparar as determinações de toxicidade em produtos químicos e misturas complexas, obtidas com a estirpe *prl* e com o teste Microtox®. Este último é um dos testes de toxicidade microbiana correntemente mais usados e melhor aceite internacionalmente, o qual é também baseado na bioluminescência (Hasting, 1978; Férard et al., 1983). De acordo com os dados limitados de que já se dispõe, o teste VITOTOX® fornece os mesmos resultados que o teste Microtox® sendo, contudo, mais fácil de executar e, na maioria das vezes, muito mais sensível. O teste VITOTOX®,

ou apenas o seu elemento *prl*, pode, assim, ser também considerado como um teste de toxicidade extremamente valioso, pelo menos quando estes resultados preliminares puderem ser confirmados.

[0043] Em suma, pode salientar-se que as estirpes *Salmonella typhimurium* TA104 *rec*N2-4 e TA104 *prl* fornecem sistemas de teste de genotoxicidade e/ou toxicidade muito valiosos. Ambas as estirpes deveriam ser usadas simultaneamente para os testes de genotoxicidade enquanto que apenas é requerida a estirpe *prl* para testes de toxicidade. Foi demonstrado que o teste VITOTOX® fornece uma resposta muito rápida (dentro de 2-4 horas) e é muito sensível em relação à (geno)toxicidade de produtos químicos e pode ser, por esse motivo, muito útil no rastreio e pré-rastreio de novos produtos químicos e intermediários. Como o teste é efectuado em placas de 96 poços é possível investigar, pelo menos, 8 produtos químicos (com e sem adição de uma fracção de enzima metabólica S9) por dia ou 40 produtos químicos por semana. As medições ocorrem automaticamente e, além disso, a recolha e tratamento de dados pode também ser quase completamente automática. A robotização das microplacas deverá ser capaz de multiplicar este número por um factor de 10. Aumentos de escala, por exemplo, pelo aumento do número de poços por placa é óbvio. Os custos de mão-de-obra são, assim, fortemente reduzidos.

[0044] Finalmente, um ponto suplementar e muito importante é o de que apenas são requeridos pequeníssimos volumes do composto a testar (menos de 20mg). Isto é particularmente importante para a indústria farmacêutica onde apenas algumas centenas de miligramas de um composto estão disponíveis na *fase de descoberta*. De facto, é quase impossível proceder ao rastreio desses novos produtos químicos com (a maior parte d)os outros sistemas de teste.

[0045] Foi feito um depósito da estirpe "*prl*" em

conformidade com o Tratado de Budapeste sob o número de depósito LMG P-18318 no BCCM/LMG, Laboratorium voor Microbiologie - Bacteriënverzameling, Universiteit Gent, K. L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent, Bélgica.

REFERÊNCIAS

[0046]

Férard JF, et al., (1983): Application d'un test d'inhibition de luminiscence bactérienne de l'étude toxicologique d'effluents complexes et de substances chimique. Revue Française des Sciences de l'Eau 2: 221 - 237.

Hasting JW (1978): Bacterial bioluminescense: an overview. In: Methods in Enzymology. Academic Press, pp. 125 - 152.

Maron DM, Ames BN (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Res.113: 173 - 215.

Mergeay M, et al., (1985): *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. J. Bacteriology, 162, 328 - 334.

Mersch-Sundermann V, et al., (1994): SOS induction in *Encherichia coli* and *Salmonella* mutagenicity: a comparison using 300 compounds. Mutagenesis 9: 205 - 224.

Mortelmans K et al., (1986): *Salmonella* mutagenicity tests: II. Results from the testing of 270 chemicals.

Environ. Molec. Mutagen. 8, suppl. 7: 1 - 119.

Murray NE, et al., (1997): Lambdoid phages that simplify the recovery of in vitro recombinants. Mol.Gen.Genet. 150: 53 - 61.

Quillardet P, Hofnung M (1993): The SOS chromotest: a review. Mutation Res. 297: 235 - 279.

Rostas K et al., (1987): Nucleotide sequence and LexA regulation of *Escherichia coli recN* gene. Nucl. Acids Res. 15 : 5041-5049.

van der Lelie D et al., (1997): The VITO-TOX test, a SOS-bioluminescence *Salmonella typhimurium* test to measure genotoxicity kinetics. Mutation Res.389: 279 - 290.

van der Lelie D. et al., (1997): Two-component regulatory system involved in transcriptional control of heavy-metal homeostasis in *Alcaligenes eutrophus*. Molecular Microbiology 23 (3): 439 - 503.

Porto, 17 de Abril de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Sistema de diagnóstico consistindo:

   - num microrganismo transformado capaz de uma elevada actividade informativa quando exposto a uma agressão ambiental, microrganismo esse possuindo uma sequência promotora induzida pela tensão, sendo operativamente ligada a uma sequência informativa codificadora de ácidos nucleicos codificando uma molécula informativa que resulta num sinal que pode ser analisado, e
   - num microrganismo transformado tendo uma sequência constitutiva e promotora não induzida pela tensão, sendo operativamente ligada a uma sequência informativa codificadora de ácidos nucleicos codificando uma molécula informativa que resulta num sinal que pode ser analisado,

   sendo os ditos microrganismos adequados para detectarem co-operativamente a dita agressão ambiental, eliminando simultaneamente os resultados falsamente positivos e falsamente negativos.

2. Sistema de acordo com a reivindicação 1, no qual o sinal é analisado como produção de luz e/ou modificação colorimétrica.

3. Sistema de acordo com a reivindicação 1 ou 2, no qual o microrganismo bioluminescente transformado é *E. coli*.

4. Sistema de acordo com as reivindicações 1 ou 2, no qual o microrganismo bioluminescente transformado é uma *Salmonella thyphimurium*, sendo, preferencialmente,

um microrganismo adequado ao teste Ames, vantajosamente seleccionado do grupo que contém TA98, TA100, TA102, TA104, TA1535, TA1538, TA7001 a TA7006 e TA7041 a TA7046, ou tendo o microrganismo com número de depósito LMG P-18318.

5. Sistema de acordo com qualquer uma das anteriores reivindicações 1 a 4, no qual a sequência promotora induzida pela tensão é seleccionada do grupo compreendendo groEL, dnaK, grpE, phoA, glnA, lon, lysU, rpoD, clpB, clpP, uspA, katG, uvrA, frdA, micF, fabA, lac, his, sodA, sodB, soi-28, recA, xthA, narG, recF, recJ, recN, recO, recQ, ruv, uvrD, ars, cad, mer, pco e sfiA.

6. Sistema de acordo com qualquer uma das anteriores reivindicações 1 a 5, no qual a sequência constitutiva e promotora não induzida pela tensão é uma sequência com uma sequência de consenso Sigma 70 (TTGACA (-35).....17/18 bp.....TATAAT (-10)) e cuja transcrição não está regulada positiva ou negativamente a nível do promotor.

7. Sistema de acordo com qualquer uma das anteriores reivindicações 1 a 6, no qual a sequência de ácidos nucleicos codificadora do repórter compreende os genes A e B da luciferase ou um gene luxAB de tradução de fusão.

8. Sistema de acordo com qualquer uma das anteriores reivindicações 1 a 7, no qual a sequência de ácidos nucleicos codificadora do repórter compreende os genes A e B da luciferase e os genes C, D e E da luciferase requeridos para a produção de substracto de ácido gordo limitador que é usado na reciclagem.

9. Sistema de acordo com qualquer uma das anteriores reivindicações 1 a 8, no qual a agressão ambiental é a presença, numa amostra, de um composto genotóxico e/ou tóxico.

10. Um estojo de diagnóstico compreendendo os elementos do sistema de diagnóstico conforme qualquer uma das anteriores reivindicações 1 a 9 e, possivelmente, reagentes adicionais, diluentes e/ou suportes sólidos, necessários.

11. Método para o diagnóstico de uma agressão ambiental, preferencialmente, para determinar a presença, numa amostra, de um composto genotóxico e/ou tóxico, compreendendo as fases de:

- exposição do sistema de diagnóstico conforme qualquer uma das anteriores reivindicações 1 a 8, a tal agressão ambiental, e
- medição de um sinal do(s) microrganismo(s) bioluminescente(s) transformado(s) de tal sistema de diagnóstico.

12. Método para determinar a cinética da genotoxicidade de um composto numa amostra com o sistema de diagnóstico de qualquer uma das reivindicações 1 a 9, no qual se procede à medição da luminescência, quer dos microrganismos transformados inductíveis, quer dos microrganismos transformados constitutivos, em múltiplos pontos no tempo, preferencialmente de modo contínuo, e, adicionalmente, se leva a cabo a determinação da razão (S/N) entre o sinal e o ruído para os microrganismos transformados nos ditos ponto e tempo, a divisão da razão S/N do microrganismo

inductível pela dos microrganismos constitutivos, e a representação desses dados; traduzindo tal representação a cinética corrigida da genotoxicidade do composto genotóxico na amostra.

13. Método de análise de uma agressão ambiental, compreendendo as fases de:

- realização do diagnóstico de tal agressão ambiental, conforme descrito na reivindicação 11;
- cálculo da razão entre o sinal e o ruído de ambos os microrganismos transformados;
- classificação de tal agressão ambiental como tóxica se, pelo menos, uma das razões entre o sinal e o ruído calculadas for mais baixa que 0,8;
- classificação de tal agressão ambiental como não tendo efeito se a razão entre o sinal e o ruído do microrganismo que compreende uma sequência promotora induzida pela tensão ficar entre 0,8 e 1,2; e
- classificação de tal agressão ambiental como indutora e genotóxica se a razão entre o sinal e o ruído do microrganismo que compreende a sequência promotora induzida pela tensão for mais alta do que 1,2 e se for, pelo menos, 50% mais alta do que a razão entre o sinal e o ruído do microrganismo que compreende a sequência promotora constitutiva.

Porto, 17 de Abril de 2007

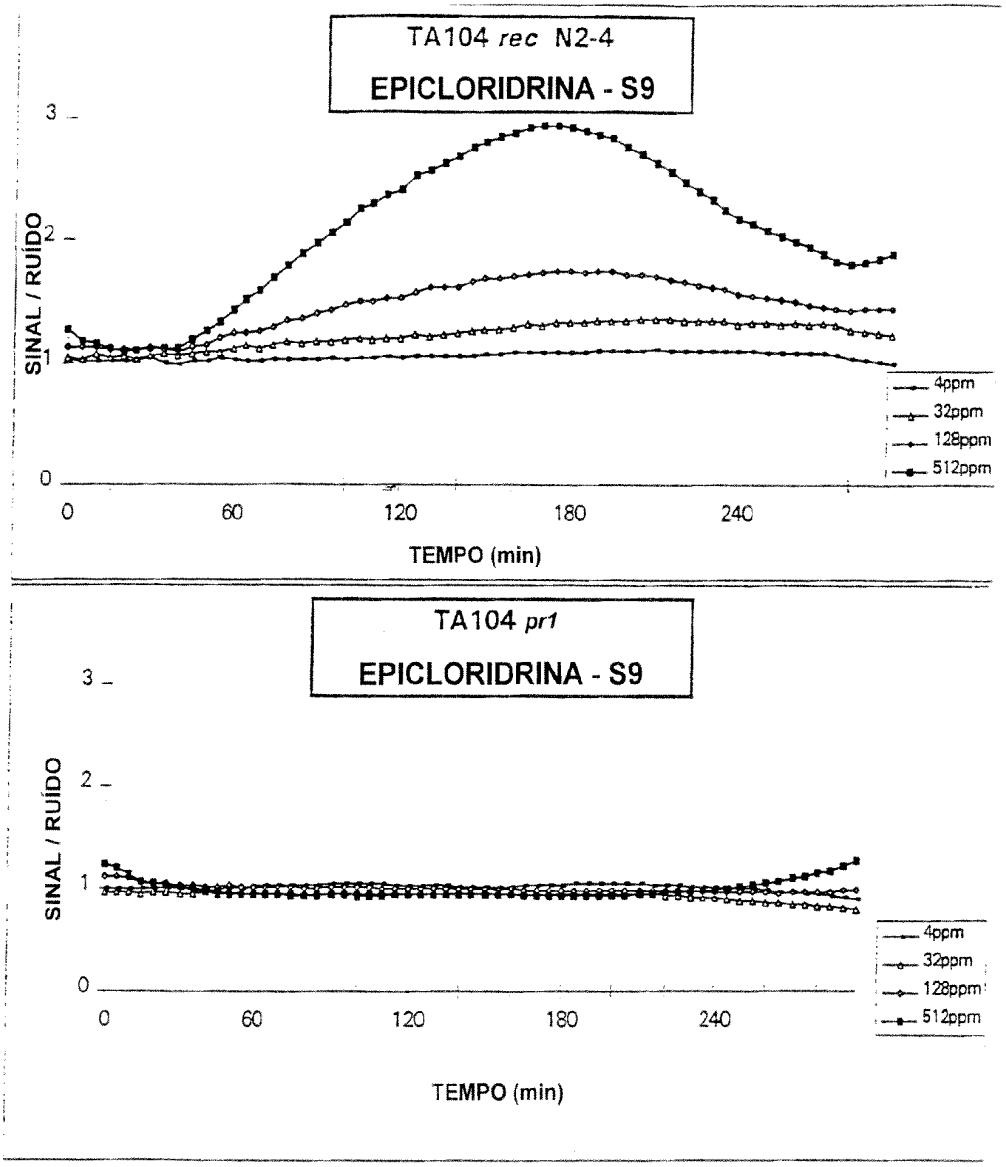
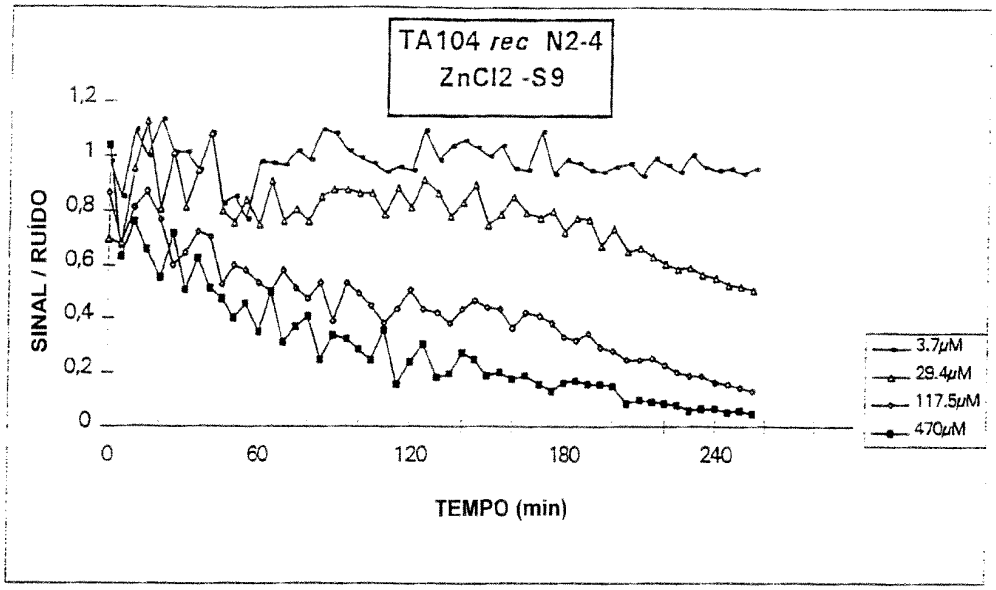

TA104 rec N2-4
EPICLORIDRINA - S9
SINAL / RUÍDO
TEMPO (min)
4ppm
32ppm
128ppm
512ppm
TA104 pr1
EPICLORIDRINA - S9
SINAL / RUÍDO
TEMPO (min)
4ppm
32ppm
128ppm
512ppm

Fig. 1


TA104 rec N2-4
ZnCl2 -S9
SINAL / RUÍDO
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
60
120
180
240
TEMPO (min)
3.7µM
29.4µM
117.5µM
470µM

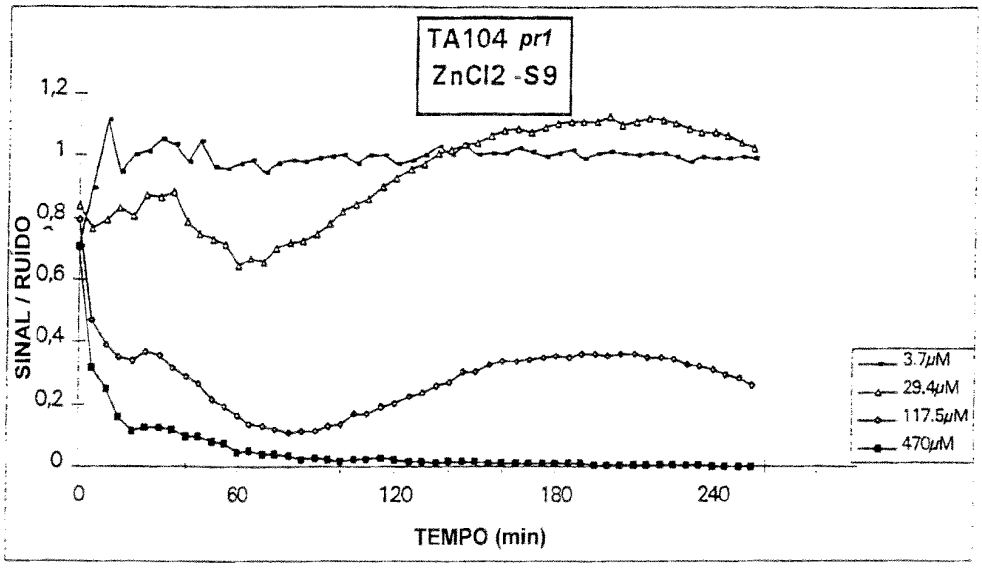
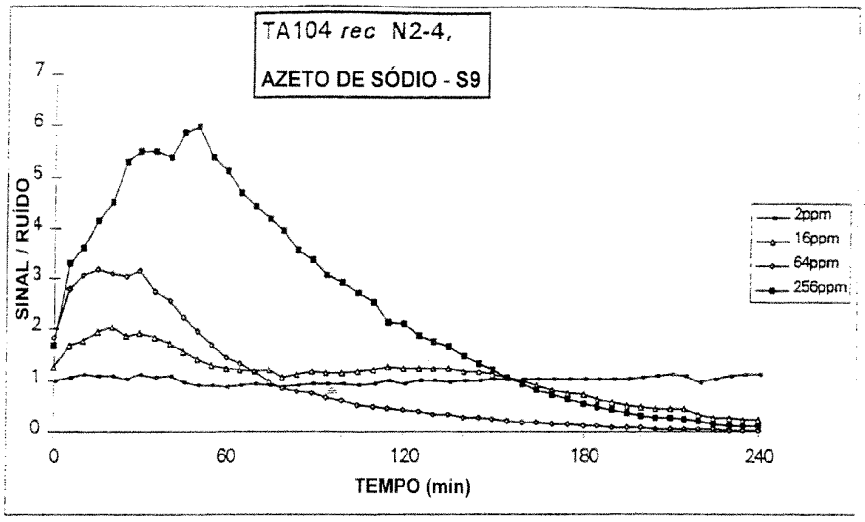

TA104 pr1
ZnCl2 -S9
SINAL / RUÍDO
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
60
120
180
240
TEMPO (min)
3.7µM
29.4µM
117.5µM
470µM

Fig.2


TA104 rec N2-4,
AZETO DE SÓDIO - S9
SINAL / RUÍDO
TEMPO (min)
2ppm
16ppm
64ppm
256ppm

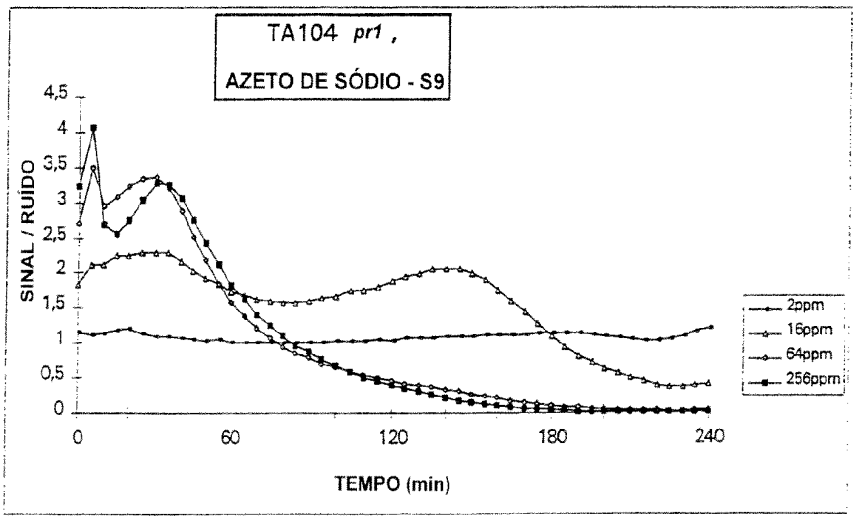
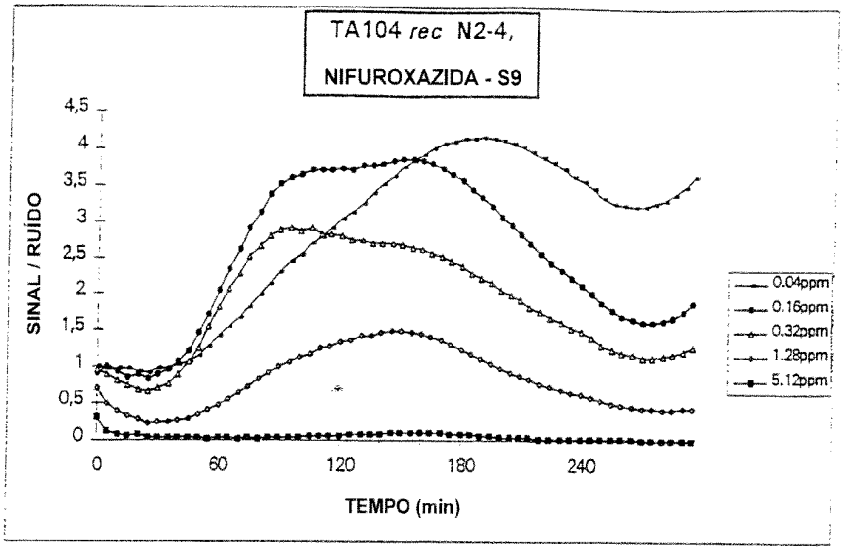

TA104 pr1 ,
AZETO DE SÓDIO - S9
SINAL / RUÍDO
TEMPO (min)
2ppm
16ppm
64ppm
256ppm

Fig. 3


TA104 rec N2-4,
NIFUROXAZIDA - S9
SINAL / RUÍDO
4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0
60
120
180
240
TEMPO (min)
0.04ppm
0.16ppm
0.32ppm
1.28ppm
5.12ppm

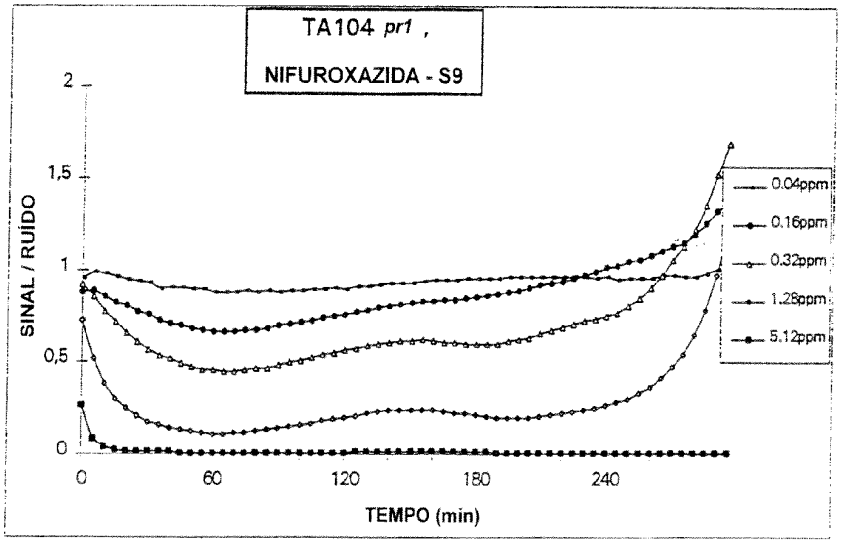

TA104 pr1 ,
NIFUROXAZIDA - S9
SINAL / RUÍDO
2
1,5
1
0,5
0
0
60
120
180
240
TEMPO (min)
0.04ppm
0.16ppm
0.32ppm
1.28ppm
5.12ppm

Fig. 4

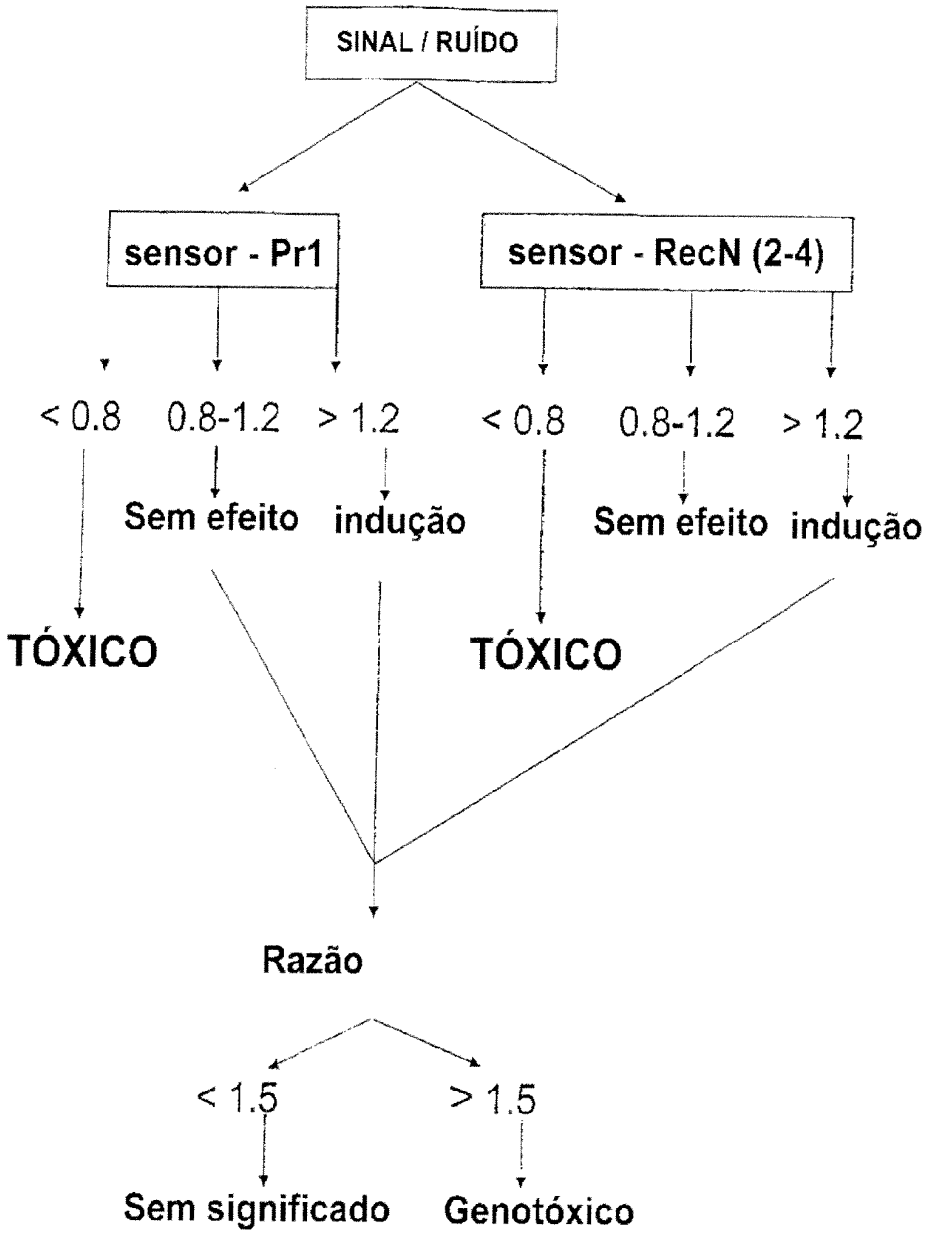

SINAL / RUÍDO
sensor - Pr1
sensor - RecN (2-4)
< 0.8
0.8-1.2
> 1.2
< 0.8
0.8-1.2
> 1.2
Sem efeito
indução
Sem efeito
indução
TÓXICO
TÓXICO
Razão
< 1.5
> 1.5
Sem significado
Genotóxico

Fig. 5

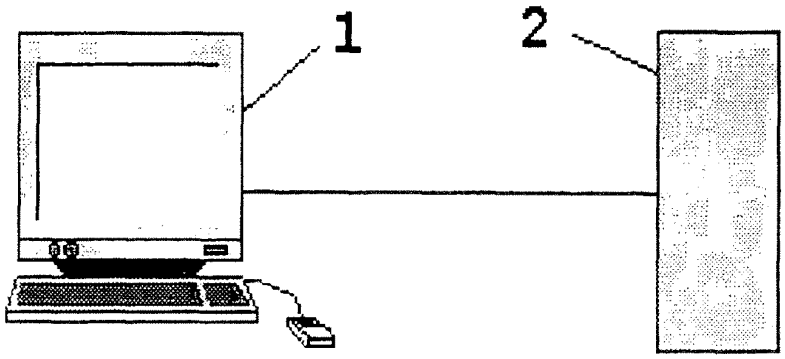


Fig. 6