

Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras

Manuela Côrte-Real¹, Filipe Sansonetty^{2,3}, Paula Ludovico¹, Cristina Prudêncio⁴, Fernando Rodrigues², Margarida Fortuna^{5,6}, Maria João Sousa¹, Manuel Teixeira da Silva⁷ e Cecília Leão^{1,2}

¹ Centro de Ciências do Ambiente - Departamento de Biologia, Universidade do Minho, 4710-057, Braga, Portugal.

² Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde, Escola de Ciências da Saúde, Universidade do Minho, 4710-057, Braga, Portugal.

³ Laboratório de Citometria, IPATIMUP, 4200, Porto, Portugal.

⁴ Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, Portugal.

⁵ Instituto de Genética Médica Jacinto Magalhães.

⁶ Instituto Politécnico da Saúde do Norte - Escola Superior de Saúde de Vale do Ave, Porto, Portugal.

⁷ Laboratório de Imunobiologia, IBMC, 4150-171 Porto, Portugal.

RESUMO*

Neste artigo começamos por apresentar uma breve introdução à citologia analítica descrevendo alguns conceitos importantes desta disciplina bem como um dos instrumentos que a torna possível - o citómetro de fluxo. Referimos alguns dos aspectos relevantes desta instrumentação, em particular a possibilidade de medir a estrutura e o funcionamento de células vivas e de separar sub-populações celulares para posterior obtenção de culturas puras. Discutimos ainda os fundamentos de algumas aplicações e apresentamos os resultados obtidos nos nossos laboratórios com os seguintes estudos: i) efeitos de fungicidas no ciclo celular de leveduras; ii) relação entre a presença de proteínas de efluxo activas e a menor susceptibilidade de leveduras a antifúngicos; iii) avaliação de alterações estruturais e funcionais induzidas pelo ácido acético e sua relação com perda de viabilidade celular em populações de *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygosaccharomyces bailii*; iv) determinação do potencial de membrana mitocondrial e avaliação da função mitocondrial de leveduras; v) determinação da ploidia de DNA em leveduras; vi) monitorização *in vivo* de processos celulares em *S. cerevisiae* e vii) morte celular programada induzida pelo ácido acético em *S. cerevisiae*. No decurso destes trabalhos, optimizámos diferentes protocolos de marcação celular recorrendo aos seguintes fluorocromos: SYBR® Green I para a marcação de DNA; calceína-M, BCECF-AM, Rh123 e DiOC5 para a detecção de proteínas de efluxo activo; DAF, FUN-1®, IP e Rh123 para a avaliação da integridade estrutural e funcional da célula; Rh123 para a avaliação de potencial de membrana mitocondrial, anexina V-FITC para a detecção de fosfatidilserina no folheto externo da membrana citoplasmática e FITC conjugado com dUTP (reação de TUNEL) para a detecção de fragmentação internucleosomal de DNA.

Palavras chave: biologia de leveduras, citologia analítica; citometria de fluxo; marcações específicas com fluorocromos.

1. Breve introdução à citologia analítica

A citologia analítica também designada por citologia quantitativa ou citometria¹, tem como principal meta contribuir para o conhecimento integrado das diversas estruturas e funções dos mais variados tipos de células - celulómica (1) e das respectivas populações. A aproximação a esta meta tem sido possível graças por um lado a um desenvolvimento combinado de novas metodologias e por outro, de nova instrumentação sofisticada sob a forma de citómetros, quer de fluxo quer de imagem. Adiante vamos referir e descrever de forma sucinta o que é a citometria de fluxo, por esta ser a tecnologia que temos utilizado para fazer citologia analítica. Os citómetros de fluxo tornam possível pôr em prática o conceito básico da citologia analítica, que consiste na medição simultânea de múltiplos parâmetros (ver Tabela I) em cada célula individualmente e num número elevado de células de uma população celular pura ou até, de uma sub-população componente de uma população celular heterogénea². De facto, com os citómetros actuais podemos realizar medições multidimensionais globais

* Abreviaturas: SYBR® Green I; calceína-AM (acetoximetil - calceína); BCECF-AM (acetoximetil - 2', 7' -bis-(2-carboxietil)-5-(e -6)- carboxifluoresceína); Rh123 (rodamina 123); DiOC5 (iodeto de 3, 3' -dipentiloxacarbocianina); DAF (diacetato de fluoresceína), FUN-1®, IP (iodeto de propídeo); anexina V-FITC (isotiocianato de fluoresceína); TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End Labelling).

¹ Nesta breve introdução utilizaremos o termo citologia analítica.

² "sorting" analítico.

Tabela I. Exemplos de parâmetros celulares que podem ser medidos por citometria de fluxo.*

	Estruturais	Funcionais
Intrínsecos	Tamanho relativo Complexidade relativa	Grupos prostéticos de algumas enzimas Clorofila Outros pigmentos fotossintéticos
Extrínsecos	DNA total # RNA total Proteínas totais	Cálcio intracelular ## pH intracelular Potencial de membrana plasmática Potencial de membrana mitocondrial* Estado redox da célula ⁵ Fluidez da membrana

* Adaptado de forma resumida de Shapiro (1994). Segundo este autor os parâmetros celulares podem ser classificados em, estruturais e funcionais, quer intrínsecos (em que não é necessário qualquer pré-tratamento) quer extrínsecos (em que é necessário pré-tratamento, p.ex. fixação e marcação com um fluorocromo).
#Salvador *et al.* (1998); Carneiro *et al.* (1992); Castro *et al.* (2001); ##do Céu Monteiro *et al.* (1999); *Ludovico *et al.* (2001a); ⁵Lage *et al.* (2001)

em populações/sub-populações de células eucarióticas ou procarióticas, ou em populações/sub-populações de partículas biológicas sub-celulares, ou até em populações/sub-populações de partículas artificiais como micro-esferas³. Medir vários parâmetros estruturais e/ou funcionais em populações de células vivas e funcionantes, sem as invadir “fisicamente”, i.e. sem afectar a sua integridade ou afectando-a minimamente e com a possibilidade de observação, ao longo do tempo, é um outro conceito, que se pode designar por citologia analítica funcional (2,3,4). Ainda outro conceito importante está relacionado com o facto de, com base numa análise citológica quantitativa, ser possível, separar fisicamente sub-populações celulares puras (*‘cell sorting’*), a partir de populações heterogéneas. As células podem ser separadas vivas e funcionantes, aliás podem ser separadas exactamente em função de estarem vivas e funcionantes.

A identificação de fenótipos, estruturais e/ou funcionais, consegue-se através da marcação de um ou mais

componentes celulares pela ligação directa de um marcador específico a moléculas estruturais ou funcionais das células. Analisando a Tabela I, verificamos que a grande maioria das medições citométricas implicam a utilização de fluorocromos. Na prática a marcação de componentes celulares pode ser obtida alternativamente pela: 1) ligação específica (em muitos casos estequiométrica) de fluorocromos aos componentes estruturais de interesse. São exemplo os fluorocromos que marcam os ácidos nucleicos de cadeia dupla sendo o IP um dos mais usados; 2) distribuição do fluorocromo em compartimentos celulares específicos; 3) utilização de fluorocromos cuja distribuição específica em determinados compartimentos sub-celulares é dependente do seu estado funcional. É um exemplo típico o compartimento mitocondrial; 4) ligação indirecta do marcador específico a moléculas estruturais ou funcionais; 5) utilização de ligandos específicos, anticorpos ou lectinas conjugados com fluorocromos. A fluoresceína e ficoeritrina são exemplo de dois fluorocromos muito usados para este efeito; 6) marcação negativa: por vezes usa-se uma não ausência de marcação ou uma exclusão do marcador. Por exemplo o IP, em princípio não penetra a membrana citoplasmática de uma célula viva. Este facto reflecte portanto uma integridade da membrana. Quando aquele fluorocromo cora a célula e

especificamente o núcleo, é porque a célula perdeu a integridade da sua membrana periférica ou seja está *moribunda* ou morta. Estes processos de marcação constituem uma forma de revelar indirectamente, estruturas e funções que presentemente são impossíveis de quantificar de outra forma. Exemplos de vários tipos de amostras e sondas fluorescentes que podem ser utilizadas em medições citométricas determinadas por citometria de fluxo são apresentados na Tabela II. Na figura 1 apresenta-se um diagrama ilustrativo do princípio de funcionamento de um citómetro de fluxo.

A importância conceptual da citologia analítica advém do facto de adicionar à citologia convencional qualitativa, que se baseia numa análise subjectiva da morfologia celular e da citoquímica, a componente quantitativa objectiva. Quem *faz* ou *investe* na citologia analítica, pretende que as suas análises citométricas sejam cada vez mais: a) específicas, com menor probabilidade de falsos positivos, b) sensíveis, com menor probabilidade de falsos negativos, c) reprodutíveis e robustas estatisticamente e d) automáticas e rápidas, porque são obtidas com instrumentos de medida especiais - os citómetros.

A hematologia e a imunologia celular foram sem dúvida as duas áreas da Biologia que impulsionaram o desenvolvimento da tecnologia da citometria de fluxo. No entanto, posteriormente a utilização desta instrumentação foi generalizada a outras áreas e a estudos com outras células, nomeadamente vegetais e microbianas. Em particular no domínio da microbiologia, o nosso grupo tem vindo nos últimos seis anos a explorar a citologia analítica em estudos de biologia de leveduras, especificamente no que respeita à elucidação dos mecanismos celulares e moleculares de resposta a citotóxicos. Essencialmente, estes estudos têm visado a identificação de possíveis mecanismos subjacentes ao fenótipo de resistência/susceptibilidade a fungicidas (de interesse agrícola ou clínico) ou a ácidos carboxílicos

³ Presentemente utilizam-se misturas de subpopulações de micro-esferas, que diferem no tamanho e na cor, para fazer o que se designa neste momento por citometria molecular; mas que seria mais correcto designar por moleculometria; a palavra técnica inglesa para desinar esta abordagem é *Multiplexing*

Tabela II. Exemplos de tipos de amostras e sondas fluorescentes que podem ser utilizadas em medições citométricas susceptíveis de serem obtidas com um citómetro de fluxo.*

ENSAIOS BIOQUÍMICOS POR CITOMETRIA DE FLUXO: AMOSTRAS E SONDAS	
Tipo de amostra biológica	
<ul style="list-style-type: none"> Organismos pluricelulares "Cell spheroids" Hibridomas Fusões celulares Células humanas Células animais Protoplastos de células vegetais Células procariotas Leveduras Microalgas 	<ul style="list-style-type: none"> Núcleos isolados Elementos subcelulares Cromossomas Lipossomas Corpos de Mallory Fibras de placas amilóides Fracções membranares Partículas virais Antigénios solúveis Sequências de DNA
Tipos de fluorocromos e marcadores fluorescentes	
<ul style="list-style-type: none"> Fluorocromos que reagem com grupos químicos específicos Pares de fluorocromos com transferência de energia por ressonância Anticorpos fluorescentes Lectinas fluorescentes Sequências nucleotídicas fluorescentes Lípidos fluorescentes 	<ul style="list-style-type: none"> Indicadores de pH fluorescentes Quelantes iónicos fluorescentes Sondas fluorescentes com distribuição sensível ao potencial de membrana Substratos fluorogénicos de enzimas intracelulares Macromoléculas fluorescentes Partículas sintéticas fluorescentes Moléculas endógenas fluorescentes

* Adaptado de O'Connor et al., 2001.

fracos.

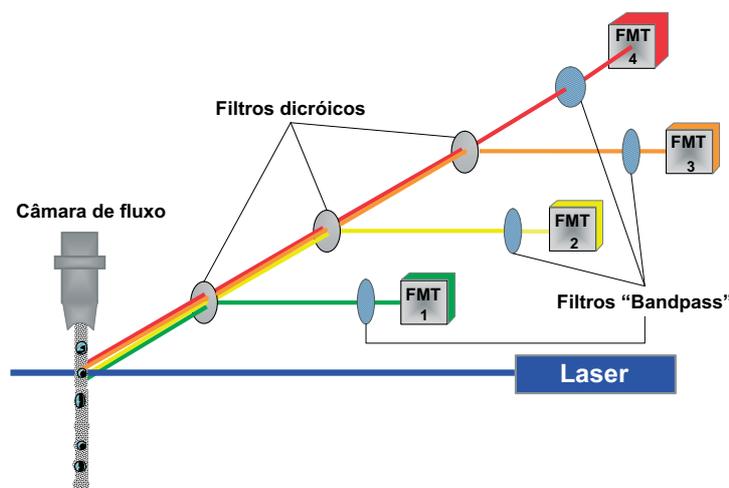
No que respeita aos fungicidas, tentámos, por um lado, avaliar os seus efeitos no ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae* (2.1) e, por outro, estudar os mecanismos de resistência pleiotrópica àquelas drogas (2.2). Estes estudos conduziram à optimização de um protocolo para

análise do ciclo celular em leveduras e ao desenvolvimento de protocolos para a detecção funcional de proteínas de efluxo activo cuja actividade está frequentemente na base da redução de susceptibilidade de leveduras a antifúngicos.

Quanto aos ácidos carboxílicos fracos, estes são frequentemente utilizados

como conservantes de alimentos, onde as leveduras podem predominar como flora contaminante. No entanto, as leveduras diferem significativamente na susceptibilidade a estes compostos. Com efeito, *Zygosaccharomyces bailii*, frequentemente implicada na deterioração de alimentos, é capaz de tolerar meios ácidos (presença de ácidos carboxílicos fracos a baixos valores de pH) nos quais *Saccharomyces cerevisiae* não sobrevive. Estudos comparativos dos efeitos de ácidos em *S. cerevisiae* e *Z. bailii* revelaram que em ambas as espécies estes compostos induzem inibição do crescimento (Cardoso, 1994) e da fermentação (Pampulha, 1989) e estimulam a acidificação intracelular (Cardoso, 1994) e a perda de viabilidade celular (Pinto et al., 1989). Embora os efeitos descritos fossem idênticos nas duas espécies, em *Z. bailii* só eram observados para concentrações mais elevadas de ácidos. Posteriormente, foi demonstrado que este comportamento está associado à menor permeabilidade da membrana de *Z. bailii* à forma não dissociada dos ácidos e que, pelo menos no caso dos ácidos acético (Rodrigues, 2001), benzóico e sórbico (Mollapour e Piper, 2001), está associado à capacidade desta espécie, em contraste com *S. cerevisiae*, utilizar estes ácidos como substratos na presença de glucose. No entanto, a identificação de

Figura 1 - Representação esquemática de um citómetro de fluxo (adaptada de slide disponível em Purdue University Cytometry Laboratories, ver endereço da internet nº 3). Num citómetro de fluxo em funcionamento, as células em suspensão são obrigadas a fluir, em fluxo laminar, por um sistema adequado de focagem hidrodinâmica (a câmara de fluxo), de tal modo que se dispõem em fila única intersectando um feixe de iluminação com origem numa ou mais fontes de iluminação (laser(s) e/ou lâmpada de vapor de mercúrio). Quando uma célula (ou partícula microscópica) intersecta o feixe de luz, provoca um processo de dispersão fotónica e/ou de emissão de fluorescência, cuja intensidade depende das características da célula. Os fótons dispersos frontalmente, podem ser colhidos directamente por um fotodiodo (é o caso do detector de dispersão frontal) ou podem ser colhidos a 90° (ortogonalmente) por lentes, espelhos dicróicos e filtros ópticos e focados em fotomultiplicadores (é o caso da dispersão ortogonal ou lateral e das fluorescências). Presentemente a maior parte dos citómetros possuem pelo menos 5 fotomultiplicadores (FMT): um para dispersão lateral e quatro para fluorescências. Alguns citómetros recentes têm a possibilidade de medir cinco ou seis fluorescências simultaneamente. Os sinais luminosos, amplificados e convertidos em pulsos electrónicos pelos detectores referidos, são então medidos e sofrem uma conversão analógica-digital. Os sinais digitalizados são processados por analisadores em vários canais, de tal modo que é possível ir acumulando os sinais em tempo real (sob a forma de histogramas mono- ou biparamétricos que são visualizados no monitor do computador) e portanto verificando simultaneamente, as distribuições dos valores da frequência e/ou densidade, de cada parâmetro celular.



outros efeitos citotóxicos dos ácidos, que comprometem a viabilidade e que por fim conduzem à morte celular poderia contribuir para o melhoramento e/ou desenvolvimento de novas estratégias de preservação de alimentos. Neste sentido, procurou-se avaliar por citometria de fluxo as alterações estruturais e funcionais, durante a perda de viabilidade induzida pelo ácido acético em *Z. bailii* e *S. cerevisiae* (2.3 e 2.4). Ainda no âmbito dos estudos sobre os mecanismos de resistência a ácidos fracos em leveduras, uma outra vertente do trabalho contemplou a caracterização das bases moleculares de resistência a ácidos em *Z. bailii* e o desenvolvimento de um sistema genético funcional nesta espécie, como ponto de partida para a exploração do património genético desta levedura ácido-resistente, em particular para a construção genética de estirpes de *S. cerevisiae* mais resistentes a ácidos. Para tal, foram realizadas diferentes tarefas, entre as quais a obtenção de mutantes auxotróficos, que evidenciaram a necessidade de confirmação da ploidia da estirpe de *Z. bailii* em estudo e, posteriormente de obtenção de um conjunto de estirpes haplóides desta espécie. A ploidia de DNA da estirpe parental de *Z. bailii* bem como dos mutantes haplóides obtidos foi determinada por citometria de fluxo e utilizando o protocolo por nós optimizado (2.5). O desenvolvimento de metodologias, com base na utilização de proteínas fluorescentes, com vista à monitorização *in vivo* de processos celulares em *S. cerevisiae* é focado no ponto 2.6. Por último, referimos os trabalhos realizados pelo nosso grupo respeitantes à elucidação da morte celular de *S. cerevisiae* induzida pelo ácido acético e que demonstraram que este ácido em concentrações determinadas induz um processo de morte celular programada (2.7). A detecção de diferentes marcadores apoptóticos foi essencialmente baseada em análises de microscopia de epifluorescência e electrónica de transmissão. Todos estes aspectos do estudo da Biologia de Leveduras que foram realizados recorrendo à Citologia Analítica, serão descritos

com algum pormenor no decorrer deste artigo.

2.1. Avaliação dos efeitos de fungicidas no ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*

A utilização da citometria de fluxo para o estudo do ciclo celular de células de eucariontes superiores é prática comum e está de algum modo padronizada. Em contrapartida a sua aplicação ao estudo do ciclo celular de leveduras, é bem mais recente. Adicionalmente, a maioria dos protocolos de marcação descritos para a análise do DNA de leveduras por citometria de fluxo não permitem, em contraste com os utilizados para células animais, uma discriminação clara e quantificação das células nas diferentes fases do ciclo, nomeadamente na fase S. A medição precisa do conteúdo de DNA e a estimativa da percentagem de células nas diferentes fases, é de certa forma determinada pelo coeficiente de variação (CV) dos picos num histograma de DNA. Enquanto que em células animais é possível obter valores de CV entre 1 e 3 %, para células de levedura os valores referidos na literatura eram da ordem dos 9-10 %.

Por isso, e numa tentativa de desenvolver uma metodologia que permitisse uma análise mais rigorosa do ciclo celular de leveduras procedeu-se à optimização de um protocolo de marcação que conduzisse a uma redução significativa dos valores de CV da medida do conteúdo em DNA (Fortuna *et al.*, 2000). A estratégia subjacente ao desenvolvimento desse protocolo baseou-se nos seguintes critérios: 1) utilização de SYBR® Green I, um dos fluorocromos disponíveis com maior sensibilidade e selectividade para a detecção de DNA de cadeia dupla; 2) fixação das células de levedura pelo etanol, que não interfere com a qualidade da marcação e permite o processamento/marcação em simultâneo de amostras preparadas a tempos diferentes; 3) eliminação de RNA de cadeia dupla

com recurso ao tratamento com RNase; 4) diminuição ou eliminação total de precipitados de proteínas nos diferentes compartimentos celulares através da utilização de proteinase K para uma diminuição da marcação inespecífica; 5) aumento da permeabilidade celular, pelo tratamento das células com Triton X-100; 6) eliminação da maior parte dos agregados celulares com recurso a uma ultrasonicação breve e pouco intensa; e 7) utilização de micro-esferas fluorescentes como padrão interno.

A aplicação do protocolo de marcação optimizado às espécies *S. cerevisiae* (W303-1A) e *Z. bailii* (ISA 1307) conduziu à obtenção de distribuições de DNA com resolução elevada (CVs a meia altura do pico da ordem dos 3-4 %) (Fig. 2A). A inclusão no protocolo citométrico de aquisição de um histograma biparamétrico de área *versus* altura do pico (Fig. 2B), permitiu-nos ainda a discriminação entre agregados de duas células em G₀ ou G₁ ou de uma célula individualizada em G₂ ou M, uma vez que estes dois tipos de partículas produzem sinais com áreas iguais mas alturas de pico diferentes. Por outro lado, foi possível observar, especialmente em populações de leveduras com elevada sincronia de células G₂ ou M em divisão, uma sub-população celular com conteúdo de DNA equivalente ao de uma célula em G₂ ou M, mas com altura do pico menor. Após a separação física, por citometria de fluxo (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) e análise da sub-população por microscopia laser confocal, verificou-se que esta era constituída quase exclusivamente por pares de células mãe-filha não totalmente separadas, mas já com cariocinese completa. Esta aparente assincronia entre cariocinese e citocinese deve ser, portanto tomada em conta na análise de histogramas para a quantificação de células de levedura nas diferentes fases do ciclo celular. Por outro lado, dado que em leveduras o DNA mitocondrial pode representar até 5-20 % do DNA celular total (Dujon, 1981), condições experimentais que interfiram com o número total de mitocôndrias por

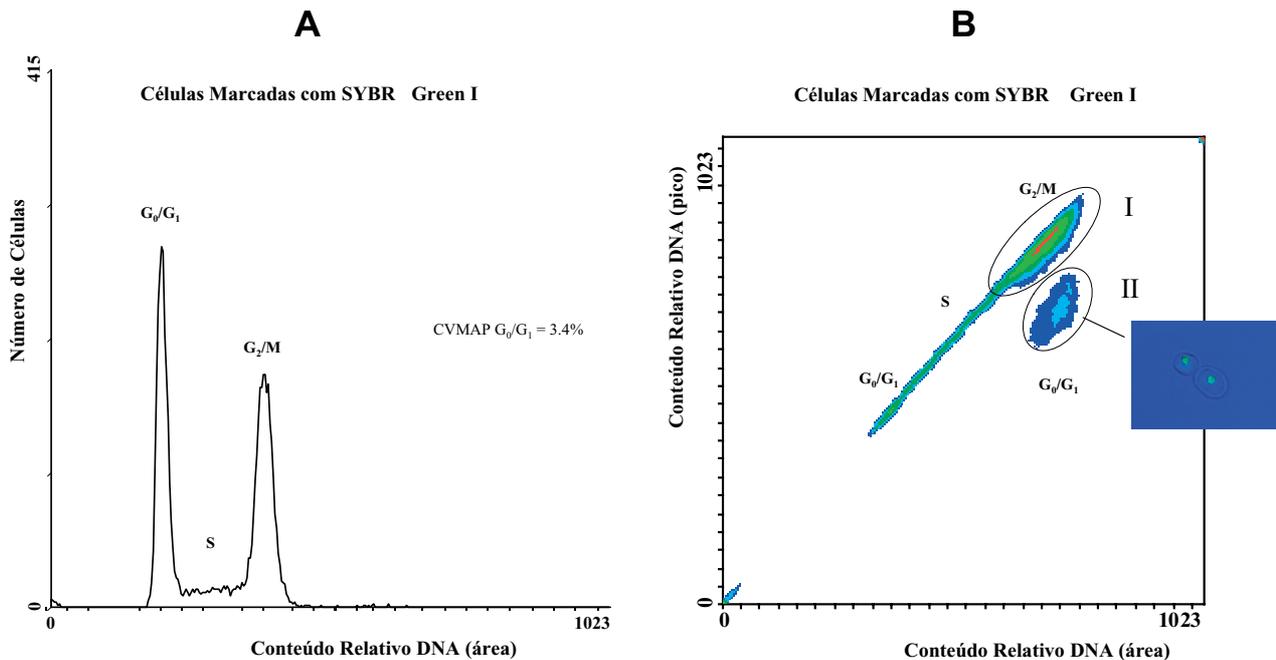


Figura 2 – (A) Histograma monoparamétrico de DNA de *S. cerevisiae* W303-1A ($n=30000$) após marcação com SYBR[®]Green I. Este histograma ilustra a possibilidade de obter distribuições de DNA com picos de células em G_0/G_1 e G_2/M com CVs baixos e uma fase S perfeitamente identificável. (B) Histograma biparamétrico de DNA (área do sinal de fluorescência verde *versus* pico do sinal de fluorescência verde) para *S. cerevisiae* W303-1A ($n=30000$) após marcação com SYBR[®] Green I. Duas sub-populações celulares (I e II) são visíveis na região G_2/M : a *sub-população I* constituída por células em gemulação, ainda sem divisão nuclear (G_2) e por células com núcleos nas primeiras fases de cariocinese (mitose nuclear incompleta); e a *sub-população II* constituída exclusivamente por pares de células mãe-filha não totalmente separadas, mas já com cariocinese completa.

célula e/ou com a síntese de DNA mitocondrial, devem ser consideradas na análise das distribuições de DNA.

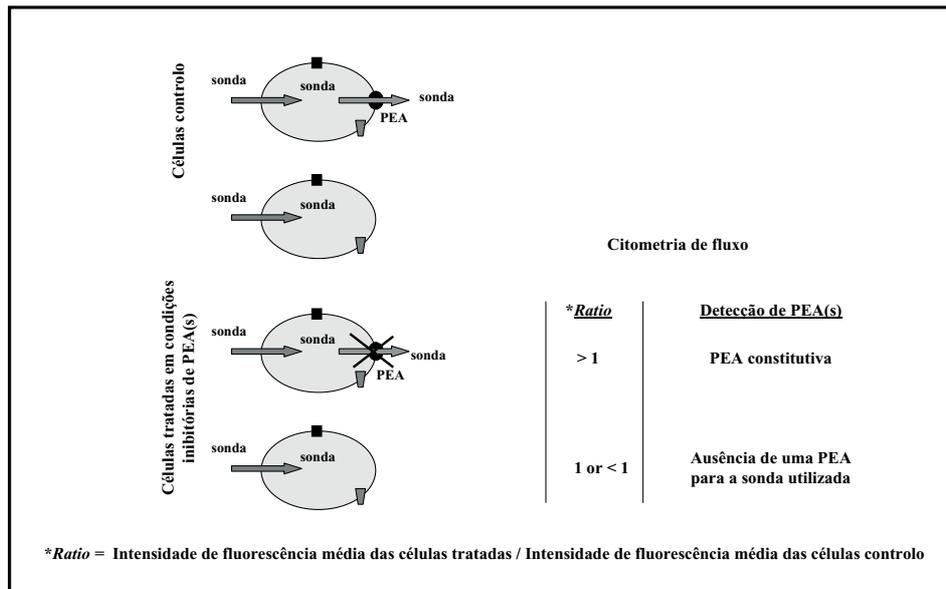
O protocolo otimizado foi então posteriormente utilizado para o estudo inicialmente proposto de avaliação do efeito de fungicidas de uso corrente na agricultura no ciclo celular de *S. cerevisiae*. O tratamento de células com benomil, um inibidor da polimerização de microtúbulos, levou a uma acumulação crescente da população nas fases G_2/M , o que permitiu a validação do protocolo otimizado. Por outro lado, o diclofluanida não induziu alterações na cinética do ciclo celular, mas conduziu a um aumento da razão de fluorescência micro-esferas/(células do pico G_0/G_1). Este resultado reflete uma diminuição do conteúdo em DNA desta população, que poderá estar associada a uma redução do conteúdo em DNA mitocondrial, consistente com a redução da taxa de respiração observada em estudos anteriores (Ribeiro *et al.*, 2000). A melhoria significativa obtida na quantificação das diferentes fases do ciclo celular de levedura, bem como

a utilização de padrões internos, permitirá por conseguinte, a aplicação deste protocolo a outros estudos cujo objectivo seja a detecção de alterações no conteúdo total de DNA e/ou variações na cinética do ciclo celular em resposta a diferentes compostos xenobióticos.

2.2. Relação entre a presença de proteínas de efluxo activo e a menor susceptibilidade de leveduras a antifúngicos

Nos últimos anos, o uso extensivo de antibióticos e de outras drogas contribuiu para a emergência em diferentes tipos celulares de um fenótipo de resistência a drogas. Um dos mecanismos de resistência a drogas mais generalizado é o seu efluxo mediado por proteínas de efluxo activo. Neste sentido, tentámos desenvolver novas metodologias para a detecção funcional, por microscopia de epifluorescência e por citometria de fluxo de proteínas de efluxo activo constitutivamente expressas, relacio-

nadas com resistência primária ou induzidas após tratamento com drogas, relacionadas com resistência secundária (Prudêncio *et al.*, 2000). No primeiro caso, foram usadas diferentes sondas fluorescentes (calceína-AM, BCECF-AM, Rh123 e DiOC₅), como substratos de proteínas de efluxo activo, e diferentes condições inibitórias de transporte (incubação com verapamil, depleção de ATP ou com o protonóforo CCCP). O aumento de fluorescência observado em condições inibitórias, quer por microscopia de epifluorescência (Fig. 3) quer por citometria de fluxo, é indicativo da presença de proteínas de efluxo activo constitutivamente expressa(s). Para avaliar diferenças no nível de fluorescência entre células controlo (CC) e células tratadas (CT), em condições inibitórias, foi calculada um *ratio* entre o valor médio de fluorescência de CT e CC (Esquema 1). Utilizando estas metodologias foi possível detectar proteínas de efluxo activo pertencentes à família das ABC (“ATP Binding Cassete proteins”) ou à superfamília das MFS (“Major Facilitator Superfamily”) em 16 espécies de leveduras (Tabela III).



Esquema 1 - Estratégia utilizada para a detecção de proteínas de efluxo activo (PEA) constitutivas.

Para a detecção de proteínas de efluxo activo induzidas também se recorreu à estimativa de um *ratio* entre o valor médio de fluorescência de CT e CC (Esquema 2). A obtenção de valores de *ratio* menores do que um, após incubação com a droga é indicativo da presença de uma proteína de efluxo activo induzida(s). Esta foi a situação observada por citometria de fluxo, em *S. cerevisiae* e em *Kluyveromyces marxianus* após incubação com benomil e cicloheximida (Fig. 4). A obtenção de valores de *ratio* próximos de um, quando a incubação com a droga foi realizada na presença de fluoreto de sódio (um inibidor da síntese de novo de proteínas) permitiu reforçar a hipótese de indução de proteínas de efluxo activo pelo benomil e pela cicloheximida em *S. cerevisiae* e *K. marxianus*, respectivamente. Por sua vez, a presença de proteínas de efluxo activo nas referidas estirpes estava relacionada com a sua maior resistência, avaliada pela determinação de concentrações inibitórias mínimas (CIMs) das respectivas drogas. Estes protocolos, quando aplicados àquelas duas espécies e a dois isolados clínicos de *Candida* (*C. albicans* e *C. krusei*), permitiram estabelecer uma relação entre a presença de proteínas de efluxo activo e a maior resistência de leveduras a agentes antimicrobianos com aplicação no

tratamento de candidoses, nomeadamente o fluconazol, 5-fluorocitosina e a amfotericina B (Prudêncio, 2000). A comparação dos resultados de susceptibilidade das quatro espécies atrás referidas obtidos pela determinação de CIM(s) e pela detecção de proteínas de efluxo activo por citometria de fluxo, revelou um único resultado inconsistente num total de doze (Tabela IV). Este foi o caso de *C. krusei* classificada como resistente à 5-fluorocitosina pela determinação de CIM e que se comportou como falso negativo na detecção por citometria de fluxo. Contudo, todos os resultados positivos por citometria de fluxo para a detecção de resistência foram também positivos pela determinação do CIM, indicando a não ocorrência de falsos positivos por citometria de fluxo. A optimização de protocolos de marcação com outros fluorocromos para detecção funcional de proteínas de efluxo activo em isolados clínicos de espécies de *Candida* e a sua utilização no rastreio de susceptibilidade a antifúngicos de utilização clínica pode ser consultada em Pina-Vaz *et al.* (2000 a e b; 2001 a e b).

No seu conjunto, os resultados obtidos nestes estudos poderão ser relevantes sob o ponto de vista biotecnológico, agrícola ou clínico. Em particular na prática clínica, a metodologia desenvolvida poderá ser útil para a prescrição de uma terapia

adequada no tratamento de infecções provocadas por espécies do género *Candida* ou por outras leveduras patogénicas.

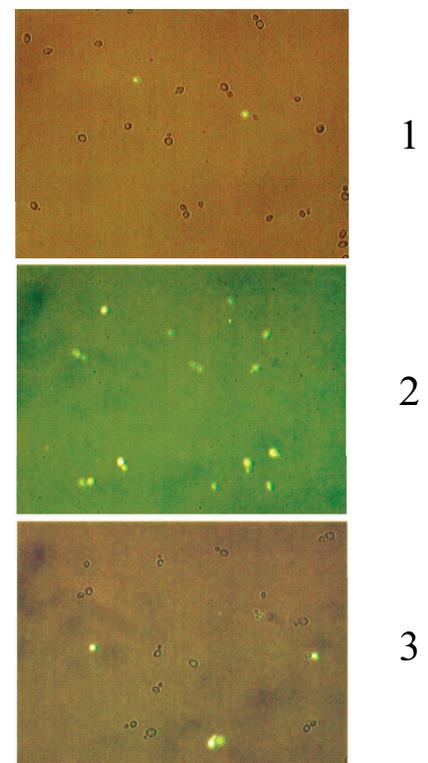
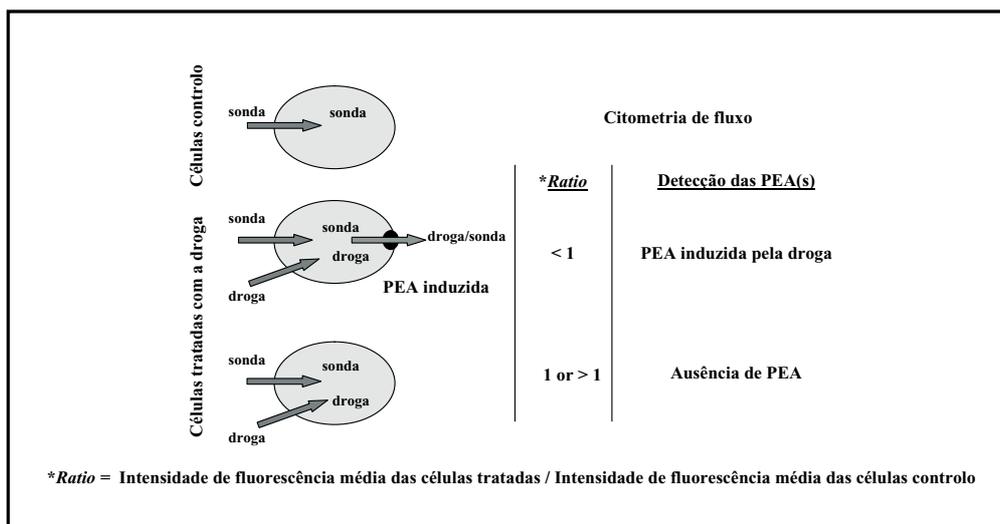


Figura 3 - Imagens digitais de células de *S. cerevisiae* marcadas com calceína-AM, obtidas por microscopia de fluorescência e luz transmitida com uma ampliação de 630x. 1- controlo; 2- resposta positiva da população celular; 3- resposta negativa da população celular.



Esquema 2- Estratégia utilizada para a detecção de proteínas de efluxo activo (PEA) indutíveis.

2.3. Avaliação de alterações estruturais e funcionais induzidas pelo ácido acético e sua relação com a perda de viabilidade celular nas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygosaccharomyces bailii*

Este estudo teve por objectivo avaliar por citometria de fluxo as alterações estruturais e funcionais ocorridas durante a perda de viabilidade celular induzida pelo ácido acético em *S.*

cerevisiae e *Z. bailii* e, desta forma, contribuir para elucidação dos efeitos citotóxicos deste ácido. Para tal, seleccionaram-se três fluorocromos, que permitem a marcação específica de diferentes parâmetros estruturais e funcionais da célula e que, devido à sua capacidade em discriminar células vivas de células mortas, são frequentemente utilizados como sondas de viabilidade celular (Haugland, 2000). Os fluorocromos utilizados no presente estudo foram: o FUN-1[®], que permite avaliar a actividade metabólica nomeadamente

o processamento vacuolar; o DAF, que avalia a actividade esterásica e o IP, que é um intercalador de ácidos nucleicos de cadeia dupla (DNA e RNA), que avalia a integridade da membrana plasmática. O FUN-1[®] entra na célula por difusão passiva e, em células viáveis é processado e concentrado nos vacúolos, gerando estruturas cilíndricas intravacuolares (CIVS). Em células não viáveis o FUN-1[®] permanece no citoplasma e é responsável por uma fluorescência vermelha difusa, com uma intensidade média de fluorescência superior à

Tabela III. Número de respostas determinadas por citometria de fluxo (FCM) e/ou por microscopia de epifluorescência (EFM), indicativas da presença de proteínas de efluxo activo para as diferentes espécies de leveduras. As respostas foram detectadas sob condições inibitórias para proteínas do tipo ABC ou MFS.

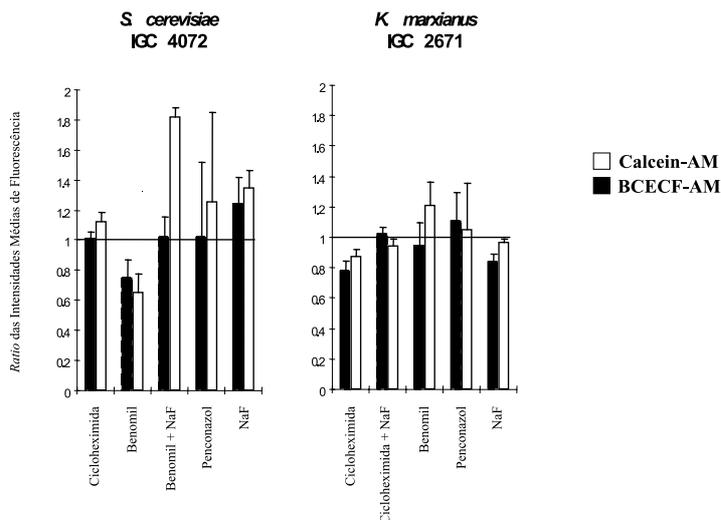
Espécies de leveduras	Proteínas do tipo ABC				Proteínas do tipo MFS	
	Depleção de ATP		Verapamil		CCCP	
	FCM	EFM	FCM	EFM	FCM	EFM
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IGC 4072	3	4	0	1	1	1
<i>Kluyveromyces marxianus</i> IGC 2671	4	4	1	0	1	1
<i>Debaryomyces hansenii</i> IGC 2968	3	1	2	0	0	0
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> ISA 1307	4	4	3	2	1	0
<i>Candida utilis</i> IGC 2578	2	1	3	1	2	1
<i>Issatchenkia orientalis</i> IGC 3806	3	3	2	0	3	1
<i>Pichia membranifaciens</i> IGC 2487	n.d.	3	n.d.	1	n.d.	0
<i>Dekkera anomala</i> IGC 5133	n.d.	1	n.d.	2	n.d.	2
<i>Pichia anomala</i> IGC 4121	n.d.	3	n.d.	1	n.d.	2
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> IGC 4791	n.d.	1	n.d.	1	n.d.	2
<i>Torulaspota delbrueckii</i> ISA 326	n.d.	3	n.d.	1	n.d.	3
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> G2	n.d.	2	n.d.	2	n.d.	2
<i>Lodderomyces elongisporus</i> ISA 1421	n.d.	1	n.d.	1	n.d.	4
<i>Saccharomycodes ludwigii</i> ISA 1083	n.d.	3	n.d.	1	n.d.	3
<i>Kloeckera apiculata</i> ISA 1189	n.d.	3	n.d.	3	n.d.	1
<i>Candida shehatae</i> IGC 3504	n.d.	2	n.d.	0	n.d.	1

n.d. Resultados não determinados

Métodos Analíticos

Figura 4 - *Ratio* das intensidades de fluorescência média de células de *S. cerevisiae* e *K. marxianus* após marcação com calceína-AM ou BCECF-AM. Antes da marcação as células foram incubadas com os agentes anti-microbianos na ausência e na presença de NaF. Os resultados apresentados referem-se a valores médios de *ratio* e respectivos valores de desvio padrão correspondentes a pelo menos cinco experiências independentes ($P < 0,005$).

apresentada por células não viáveis. Assim, células que fluorescem intensamente no vermelho são designadas FUN-1* (-) por oposição às células FUN-1* (+) que formam CIVS. O DAF, que não possui fluorescência, entra nas células e é hidrolisado, por esterases não específicas, a acetato e a fluoresceína, que emite fluorescência verde. A retenção intracelular da fluoresceína depende da integridade da membrana citoplasmática. Células com a integridade da membrana alterada incorporam IP, que marca DNA e RNA, exibindo fluorescência vermelha. A marcação dupla com DAF e IP permite discriminar células que possuem actividade esterásica e que preservam a integridade da membrana plasmática (designadas DAF(+) e IP(-)) de células que perderam a integridade da membrana plasmática e que podem ou não possuir actividade esterásica (designadas DAF(-) e IP(+)). Segundo estas diferentes marcações células FUN-1* (+), DAF(+) e IP(-) são consideradas "viáveis". No entanto, algumas destas células já podem ter perdido a capacidade proliferativa, quando transferidas para um meio adequado e consideradas não viáveis quando avaliadas pela técnica clássica de contagem de unidades formadoras de colónias (u.f.c.). Neste contexto, a citometria de fluxo permite a redefinição do conceito de viabilidade celular de acordo com o parâmetro celular que está a ser monitorizado (p. ex. actividade enzimática intracelular específica) e a introdução do conceito de vitalidade celular (Breeuwer *et al.*, 1994). Assim na sequência de apresentação dos resultados obtidos, quando referirmos a % de células viáveis estimadas por citometria de fluxo vamos utilizar o termo viáveis *entre aspas* dado que, são células não alteradas, relativamente ao parâmetro que se está a medir, mas que podem ou não corresponder a células viáveis



do ponto de vista do microbiologista clássico.

Recorrendo a um protocolo de marcação simples com FUN-1* ou dupla, com DAF e IP, foram monitorizadas ao longo do tempo alterações no processamento intracelular da sonda a nível do vacúolo, na actividade esterásica e na integridade da membrana em células de *Z. bailii* e de *S. cerevisiae* sujeitas a tratamento com 1,5 % ou 3,0 % (v/v) de ácido acético, pH 3,0 (Prudêncio *et al.*, 1998). Os resultados indicam um aumento de células funcional e estruturalmente alteradas (DAF(-), IP(+)) e FUN-1* (-), com o tempo de incubação com o ácido (Fig. 5). Estas alterações foram detectadas pela hidrólise de DAF, processamento de FUN-1* e exclusão do IP. Em *S. cerevisiae* foi observado, após tratamento com o ácido acético (1,5 % ou 3,0 %, v/v), um decréscimo na capacidade de processamento de FUN-1* que precedeu o decréscimo

na actividade esterásica e a perda de integridade da membrana plasmática (Fig. 6A e 6B). Em *Z. bailii*, de forma consistente com a sua maior resistência a ácidos, só foi possível observar alterações semelhantes (Fig. 6D) para a concentração de ácido acético mais elevada (3,0 %, v/v). No entanto, nesta espécie não foi possível monitorizar alterações da actividade esterásica dado que foram observadas alterações independentemente da presença do ácido. Os resultados obtidos por citometria de fluxo foram relacionados com os obtidos pelo método de contagem de u.f.c. Para as amostras controlo (células não tratadas e células mortas com 10,0 %, v/v, de ácido acético), os valores das percentagens de células "viáveis" estimadas por citometria de fluxo e estimadas por contagem de u.f.c. foram idênticos. No entanto, para amostras tratadas com uma concentração de ácido acético inferior ou igual a 3,0 % (v/v), por períodos curtos, nenhuma das

Tabela IV. Relação entre a susceptibilidade de *S. cerevisiae*, *K.marxianus*, *C. albicans* e *C. krusei* a agentes antimicrobianos avaliada por citometria de fluxo (CF) e pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

		fluconazol		5-fluorocitosina		amfotericina B	
		S	R	S	R	S	R
CF	S	2	0	1	1	4	0
	R	0	2	0	2	0	0

S - sensível; R - resistente

Figura 5 - Histogramas monoparamétricos de células de *S. cerevisiae* marcadas com A) DAF e IP e B) FUN[®]-1 após incubação a diferentes tempos com ácido acético, pH 3,0. Em A) e B) a concentração de ácido acético utilizada foi de 1,5 e 1,0 % (v/v), respectivamente.

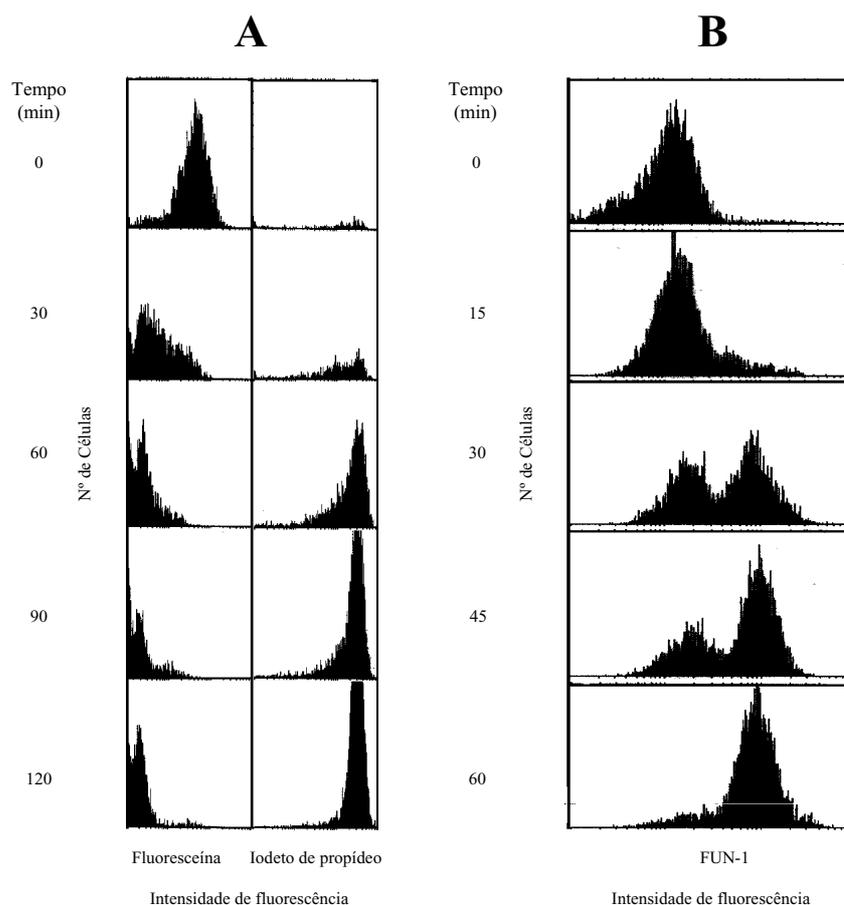
sondas fluorescentes permitiu obter por citometria de fluxo resultados comparáveis com os obtidos pela contagem de u.f.c. Na base destas diferenças está, entre outros, o facto de a três sondas medirem parâmetros celulares distintos.

Adicionalmente, em ambas as leveduras a detecção de perda da integridade da membrana plasmática, avaliada por IP, foi somente observada após perda total da capacidade proliferativa avaliada por contagem de u.f.c. Estes resultados parecem indicar que o primeiro ou um dos primeiros alvos celulares da actividade citotóxica do ácido acético nas leveduras estudadas terá uma localização intracelular.

2.4 Determinação do potencial de membrana mitocondrial em leveduras e avaliação de alterações da função mitocondrial induzidas pelo ácido acético

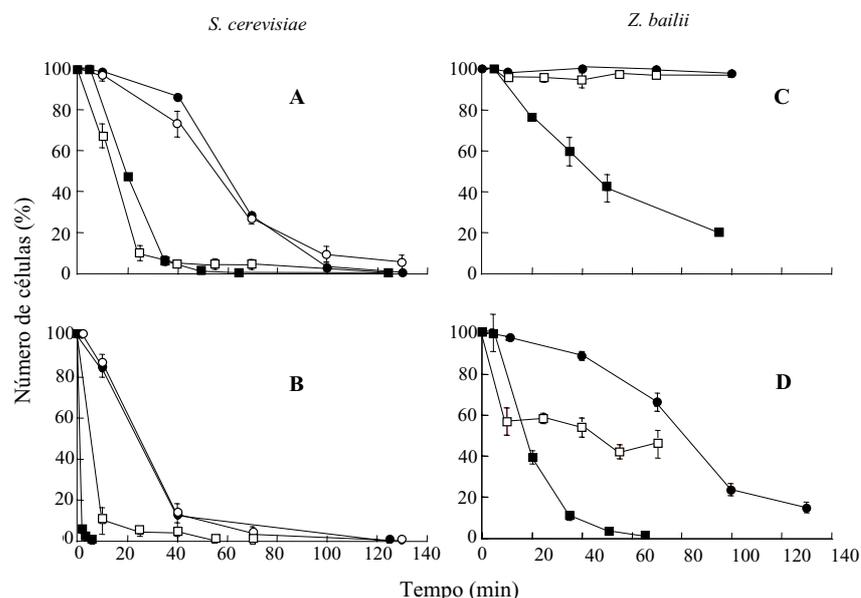
Na tentativa de elucidar se o alvo intracelular de acção do ácido acético era a mitocôndria, procedeu-se à avaliação de alterações da função mitocondrial. O potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) é um parâmetro essencial para a avaliação do estado funcional da mitocôndria e do estado fisiológico da célula. Dada a dimensão reduzida das mitocôndrias, a medição directa do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) torna-se uma tarefa difícil. Esta dificuldade tem sido ultrapassada pela utilização de métodos indirectos

Figura 6 - Relação entre o número de células viáveis (%) estimadas por contagem de u.f.c. (quadrados fechados) e o número de células "viáveis" (%) estimadas por citometria de fluxo com IP (círculos fechados) e FUN-1[®] (quadrados abertos) marcadas após incubação a pH 3,0 e a 25° C na presença de 1,5 % (A, C) e 3,0 % (B, D) (v/v) de ácido acético.



que recorrem à utilização de cationes lipofílicos, em particular com propriedades fluorescentes como é o caso da Rh123. Este catião acumula-se electrofóreticamente na mitocôndria em função do $\Delta\Psi_m$ e tem sido utilizado em diferentes estudos do metabolismo mitocondrial, por citometria

de fluxo (p. ex. ver referências em Ludovico, 1999). Embora estejam disponíveis diferentes protocolos para avaliação do $\Delta\Psi_m$ em células animais, foi necessário proceder à sua optimização e validação em leveduras. A optimização das condições de marcação com a Rh123, permiti-



ram-nos definir um protocolo para avaliação qualitativa, por citometria de fluxo, do $\Delta\Psi_m$ em leveduras (Ludovico *et al.*, 2001a). A marcação de microrganismos com compostos fluorescentes é um processo influenciado por diferentes parâmetros físico-químicos entre os quais se podem destacar o pH, a temperatura, a concentração de fluorocromo e de células, o tempo de incubação, a composição do meio e o fenómeno de *quenching* da sonda. A utilização de sondas fluorescentes para avaliação de parâmetros fisiológicos, muito em particular para detecção de alterações do $\Delta\Psi_m$, requer ainda que a intensidade de fluorescência medida seja independente de outros factores, como o volume celular ou o número de mitocôndrias por célula. Estes factores, entre outros, podem afectar o nível de fluorescência, sem que contudo tal corresponda a uma variação do $\Delta\Psi_m$. Neste sentido, os dados citométricos respeitantes à marcação com Rh123, foram expressos sob a forma do valor de R (dado pela razão entre o logaritmo de fluorescência e o logaritmo da dispersão frontal) numa tentativa de normalização do sinal de fluorescência em relação ao volume celular, medido ou correlacionado em parte pelo sinal de dispersão frontal

da luz. A observação de um aumento ou decréscimo do valor de R por tratamento com agentes polarizantes ou despolarizantes, permitiu verificar que a marcação com Rh123 indica, efectivamente, alterações do $\Delta\Psi_m$. A optimização do protocolo de marcação permitiu a selecção de uma concentração de Rh123 de 50 nM, valor significativamente inferior aos descritos na literatura. Tal facto representa um aspecto positivo, uma vez que, se por um lado conduz certamente a uma marcação inespecífica mais reduzida, por outro, minimiza os possíveis efeitos tóxicos da sonda para as células. Adicionalmente, o processo de optimização do protocolo de marcação em *S. cerevisiae* e *Z. bailii* revelou a existência de diferenças entre as duas espécies evidenciando até, para a mesma espécie, dependência da marcação em função da fase de crescimento. Esta dependência com a fase de crescimento poderá ser atribuída, entre outros factores, a variações: i) da permeabilidade da membrana plasmática à Rh123; ii) do número de mitocôndrias por célula e iii) do $\Delta\Psi_m$ ao longo da curva de crescimento, indicando que a generalização de protocolos de marcação com um dado fluorocromo, entre estirpes do mesmo microrganismo,

ou entre microrganismos distintos, deverá ser cautelosa tornando-se desejável, para cada caso particular, proceder à optimização das condições de marcação.

Observou-se ainda que, com base no valor de R, era possível discriminar células “viáveis” (não alteradas) de células mortas (Fig. 7), sugerindo a utilização da Rh123 como sonda de “viabilidade” celular (Ludovico *et al.*, 2001a). Por microscopia de epifluorescência foi possível observar que células mortas apresentavam uma fluorescência intensa e difusa por todo o citoplasma, enquanto que células “viáveis” apresentam uma marcação mitocondrial específica.

Uma vez optimizado o protocolo de marcação com a Rh123, procedeu-se à determinação do $\Delta\Psi_m$ e da cinética de “viabilidade” celular avaliada pela marcação com Rh123, IP e pela contagem de u.f.c. em células de *S. cerevisiae* e *Z. bailii* tratadas com ácido acético (1,0 %, 1,8 % ou 3 %, v/v). Os resultados mostraram que, em ambas as leveduras, a função mitocondrial é afectada pelo tratamento com ácido ocorrendo uma diminuição da fluorescência correspondente a uma despolarização do $\Delta\Psi_m$. Por outro lado, a utilização da Rh123 como sonda de “viabilidade” não permitiu, para os tratamentos testados, detectar células mortas de *Z. bailii* enquanto que, células mortas de *S. cerevisiae* foram detectadas para os tempos mais longos de tratamento com ácido (Fig. 8). No entanto, comparando com as marcações com FUN-1^o, DAF e IP, a Rh123 demonstrou ser a sonda que mais tardiamente detecta a perda de “viabilidade”, indicando que alterações estruturais da mitocôndria não constituem um dos eventos celulares precoces de acção do ácido. De facto, grande percentagem de células que perderam a capacidade proliferativa e a integridade da membrana plasmática e que exibiram uma despolarização do $\Delta\Psi_m$, mantêm a capacidade de marcar especificamente as mitocôndrias, pelo que foram consideradas “viáveis” segundo este parâmetro.

Em conclusão, e tendo em conta o apresentado e discutido nos itens

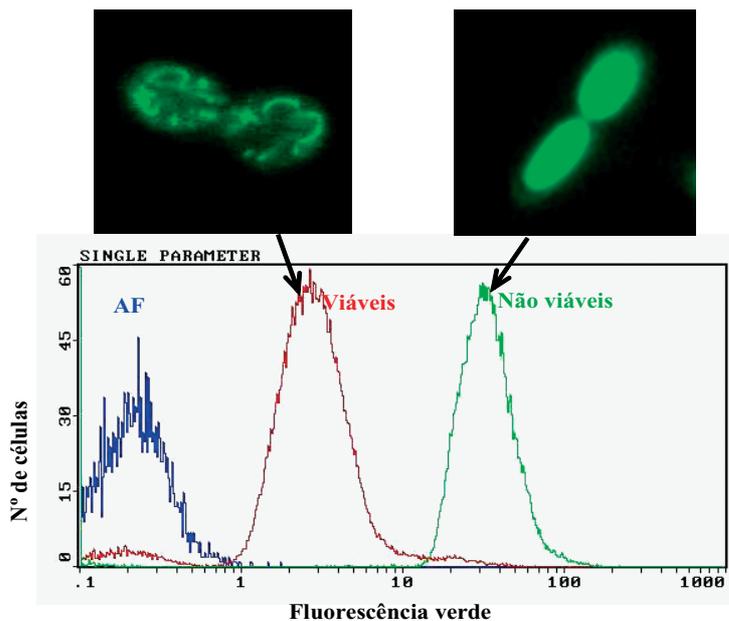


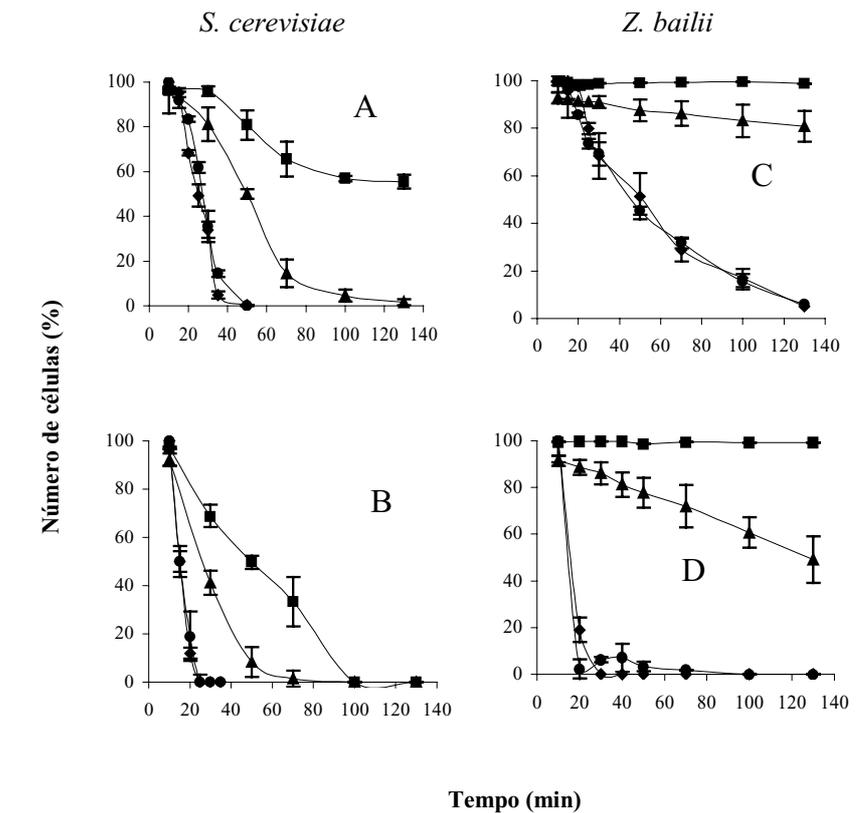
Figura 7 – Sobreposição de histogramas monoparamétricos de fluorescência verde de células de *Z. bailii* marcadas com Rh123. Suspensão controlo de células não tratadas (viáveis) e de células mortas por fervura (não viáveis) e correspondentes fotomicrografias (ampliação total de 1700x). AF- autofluorescência (células não marcadas).

Figura 8 - Relação entre o número de células viáveis (%) estimadas por contagem de u.f.c. (na presença, ◆, ou ausência, ●, de Rh123) e o número de células "viáveis" (%) estimadas por citometria de fluxo e marcação com IP (▲) ou Rh123 (■) após incubação a pH 3,0 e a 26° C na presença de 1,0 % (A) 1,8 % (B, C) e 3,0 % (D) (v/v) de ácido acético.

2.3 e 2.4, a aplicação da citometria de fluxo e o uso de diferentes sondas fluorescentes constitui uma ferramenta analítica poderosa para a elucidação dos mecanismos subjacentes aos efeitos citotóxicos de ácidos, ou de outras drogas em leveduras. De facto, dependendo da sonda usada, esta metodologia associada a uma abordagem cinética, poderá permitir a detecção de alterações celulares precoces ou tardias e assim sequenciar os eventos celulares associados à perda de viabilidade induzida por um determinado agente letal. No entanto, é de realçar que neste tipo de estudos se deve ter em conta que: a) métodos diferentes (sondas diferentes) medem parâmetros distintos; b) é essencial uma abordagem cinética para tratamentos sub-letais e c) diferenças específicas inerentes a determinados tipos celulares e/ou ao agente letal podem interferir com as determinações limitando a generalização de uma dada sonda para avaliação de uma função celular específica. Por fim é concebível que para cada situação experimental se possa identificar um fluorocromo cuja fluorescência se correlacione com a capacidade proliferativa avaliada por c.f.u. Tal sonda permitirá a aplicação da citometria de fluxo, com todas as suas vantagens, como alternativa ao método clássico de enumeração de colónias.

2.5. Determinação da ploidia de DNA em leveduras

O conhecimento da ploidia de DNA de leveduras é cada vez mais necessário em estudos de *Biologia Molecular* destes microrganismos, particularmente, em estudos da função de genes em leveduras não convencionais. Espécies de *Candida albicans* são um exemplo bem conhe-



cido da dificuldade de realização desses estudos dado que, possuindo uma ploidia superior à haplóide, a obtenção de *null mutants* envolve a interrupção de mais do que um alelo. A ploidia, terminologia utilizada pelos citogeneticistas, é função do tipo e do número de cromossomas por célula. Por outro lado, a ploidia de DNA, é definida pelos citologistas como a quantidade relativa de DNA presente na célula.

No decorrer dos estudos de biologia molecular da estirpe *Z. bailii* ISA 1307 realizados no nosso laboratório foram surgindo diversos dados que apontavam para uma ploidia desta estirpe superior à haplóide. Na impossibilidade de obter nesta estirpe mutantes para marcas recessivas, utilizámos o protocolo, anteriormente descrito para análise de ciclo celular, no sentido da quantificação do seu conteúdo em DNA. Neste estudo, a estirpe haplóide de *S. cerevisiae* W303-1A e a estirpe tipo de *Z. bailii* (IGC 5167) foram utilizadas como termo de comparação. A observação dos histogramas de DNA obtidos para a levedura *S. cerevisiae* W303-

1A e para as estirpes ISA 1307 e IGC 5167 de *Z. bailii* apontavam para diferenças no conteúdo em DNA das três estirpes. Com vista à avaliação destas diferenças no conteúdo em DNA procedeu-se à estimativa de índices de DNA dados pela razão entre as intensidades de fluorescência média dos picos G_0/G_1 da estirpe problema e de uma estirpe de referência. As estirpes *S. cerevisiae* W303-1A e *Z. bailii* ISA 1307 foram utilizadas como referência respectivamente para a estimativa dos índices de DNA 1 e 2 (Tabela V). Os valores do índice de DNA 1 obtidos para as estirpes *Z. bailii* ISA 1307 e IGC 5167 apontam, respectivamente, para um conteúdo em DNA cerca de 2,1 e 1,4 vezes superior ao de *S. cerevisiae* W303-1A. No entanto, estes valores por si só não podem ser interpretados como uma indicação da ploidia da estirpe *Z. bailii* ISA 1307, uma vez que a abordagem citométrica não permite uma avaliação absoluta mas apenas relativa do conteúdo em DNA. O número de cromossomas da estirpe tipo de *Z. bailii* é de 5, e apresentam uma massa molecular total de cerca de 7,7 Mb (Torok *et al.*, 1992). Tendo

em atenção quer os valores do índice de DNA 1 quer a massa molecular do genoma haplóide de *S. cerevisiae* (13,1 Mb) pôde-se inferir que a estirpe tipo de *Z. bailii* é diplóide. A estirpe ISA 1307 de *Z. bailii* tem mais três cromossomas do que a estirpe tipo, explicando o valor mais elevado do índice de DNA 1 da primeira estirpe comparativamente com o da segunda. Por outro lado, os valores do índice de DNA 2 obtidos para as estirpes *Z. bailii* IGC 5167 e *S. cerevisiae* W303-1A apontam, respectivamente, para um conteúdo em DNA cerca de 0,7 e 0,5 vezes inferior ao de *Z. bailii* ISA 1307. Neste contexto, para a interpretação citométrica da ploidia de leveduras torna-se importante o conhecimento do número e massa de cromossomas da estirpe em estudo dado que o conteúdo em DNA pode ser diferente, mesmo entre estirpes de uma mesma espécie. Embora na literatura *Z. bailii* seja descrita como uma espécie haplóide os dados acima referidos, consistentemente com outros estudos realizados com a estirpe ISA 1307 desta espécie (Rodrigues, 2001), apontam para que a estirpe em estudo não seja haplóide. No sentido de esclarecer este aspecto, procedeu-se à obtenção de mutantes haplóides de *Z. bailii* ISA 1307 pelo tratamento com benomil (droga que interfere com a segregação dos cromossomas durante a divisão celular) e selecção num meio com canavanina (droga que permite uma selecção positiva para uma mutação recessiva). Desta forma foram isolados cerca de 50 mutantes resistentes à canavanina e o seu conteúdo em DNA foi determinado de acordo com a metodologia anteriormente referida. A obtenção de valores de cerca de 0,5 para o índice de DNA 2 de três mutantes (H15, H50 e H51) aponta para uma redução de cerca de 50 % do conteúdo de DNA comparativamente com o da estirpe parental (Tabela V). Utilizando a estirpe H15, foi possível obter mutantes para marcas recessivas, nomeadamente mutantes auxotróficos e resistentes à cicloheximida. Estes resultados, no seu conjunto, indicam que a estirpe ISA 1307 de *Z. bailii* é diplóide e que os correspondentes mutantes (H15,

Tabela V. Comparação do conteúdo em DNA de leveduras, avaliado por citometria de fluxo. Intensidade média de fluorescência (IMF) de células na fase G_0/G_1 (IMF G_0/G_1), coeficiente de variação a meia altura do pico (CVMAP, %), razão entre a IMF de células em fase G_0/G_1 e G_2/M , Índice de DNA de cada levedura em estudo em relação a *S. cerevisiae* W303-1A (Índice DNA 1) e *Z. bailii* ISA 1307 (Índice DNA 2).

Leveduras	IMF G_0/G_1	CVMAP	Razão	Índice DNA 1	Índice DNA 2
<i>S. cerevisiae</i> W303 1A	45.6±0.6	6.7	2.1	1.0	0.50
<i>Z. bailii</i> ISA 1307	96.5±0.7	7.1	1.8	2.1	1.00
<i>Z. bailii</i> IGC 5167 ^T	64.5±0.7	6.5	1.9	1.4	0.70
<i>Z. bailii</i> H15	52.5±2.1	6.3	2.1	1.1	0.50
<i>Z. bailii</i> H50	49.5±0.7	5.7	2.2	1.1	0.50
<i>Z. bailii</i> H51	52.5±0.7	6.5	2.1	1.1	0.50

H50 e H51) são haplóides.

Em jeito de conclusão, a determinação da ploidia de leveduras requer a utilização integrada das metodologias acima descritas que permitem adicionalmente seleccionar mutantes haplóides. Estes mutantes, por sua vez, constituem ferramentas valiosas para estudos integrados de biologia molecular e fisiologia de leveduras.

2.6. Monitorização *in vivo* de processos celulares em *Saccharomyces cerevisiae*

A proteína fluorescente verde (GFP) tem sido utilizada para marcar estruturas celulares bem como para avaliar níveis de transcrição e *turnover* de proteínas em diferentes organismos, nomeadamente em leveduras. Num dos nossos estudos, que visava seguir a fusão nuclear durante o processo de conjugação em *S. cerevisiae* (Rodrigues *et al.*, 2001), decidimos explorar a utilização de duas proteínas fluorescentes distintas, a GFP e uma proteína fluorescente vermelha (DsRed). Uma vez que a DsRed nunca tinha sido expressa em leveduras foram desenvolvidos novos plasmídeos para a sua expressão. Assim foi possível verificar em primeiro lugar que, o gene *DsRed* podia ser expresso em *S. cerevisiae* sob a forma de uma proteína funcional (fluorescente)

com localização citoplasmática (Fig. 9I). Por outro lado, a adição de um sinal de localização nuclear (NLS) a esta proteína, endereçou-a para o compartimento nuclear (Fig. 9IIB). A localização nuclear da proteína fluorescente vermelha foi confirmada pela co-localização (sobreposição) da fluorescência vermelha com a fluorescência azul obtida pela marcação com DAPI, uma sonda específica para DNA (Fig. 9IIC). Foi ainda possível co-expressar os genes *GFP* e *DsRed-NLS* sem efeitos citotóxicos aparentes (Fig. 9III). Uma vez que pretendíamos visualizar a fusão nuclear durante o processo de conjugação, transformámos um dos *mating types* de *S. cerevisiae* com o plasmídeo contendo a construção *DsRed-NLS* e o *mating type* oposto com o plasmídeo contendo a construção *yEGFP3-NLS*. A indução da conjugação entre os dois *mating types*, permitiu seguir a fusão nuclear (Fig. 9IV) ao longo do processo (Rodrigues *et al.*, 2001).

2.7. Morte celular programada induzida pelo ácido acético em *Saccharomyces cerevisiae*

O ácido acético figura como um dos sub-produtos da fermentação alcoólica levada a cabo por *S. cerevisiae* (Beelman e Gallander, 1979).

Conforme referido anteriormente, o ácido acético à semelhança de outros ácidos carboxílicos, a valores baixos de pH e acima de determinados valores de concentração, afecta diferentes processos celulares. Demonstrou-se ainda que o ácido acético é capaz de induzir em *S. cerevisiae* dois tipos de morte celular nomeadamente, a morte de alta e baixa entalpia (Pinto *et al.*, 1989).

A morte celular tem sido descrita como podendo ocorrer por um processo accidental, não programado ou, por oposição, por um processo programado, activo, sujeito a regulação genética e que conduz ao suicídio celular. Regra geral, o primeiro e segundo tipos de morte têm sido associados, respectivamente, a um fenótipo necrótico e apoptótico, que são, por sua vez, caracterizados por alterações estruturais e funcionais típicas e que são utilizadas como

marcadores específicos de cada processo. Neste contexto, e desconhecendo qual o processo de morte induzido pelo ácido acético em *S. cerevisiae*, tentámos elucidar esta questão.

A morte celular programada foi descrita pela primeira vez por Wyllie *et al.* (1972) como sendo um fenómeno característico e específico de células de mamíferos. A forma morfológica mais comum de morte celular programada foi designada de apoptose e descrita como um fenómeno que permitia aos organismos remover rapidamente sem resposta inflamatória células mutadas, danificadas, infectadas ou simplesmente dispensáveis para o organismo. A apoptose era considerada como resultado de um processo adquirido durante a evolução dos organismos multicelulares. Neste sentido, não era aceite que organismos unicelulares possuíssem um processo de morte celular programada. No entanto, nos últimos anos surgiu na literatura um conjunto de evidências que suporta a ocorrência de um processo de morte celular programada em bactérias e eucariotes unicelulares. Adicionalmente, a constatação de que os seres unicelulares não vivem na natureza como células individualizadas mas

em comunidades e, o facto de que populações microbianas possuem um genoma proveniente de um ancestral comum, levou a questionar o conceito de morte celular programada como um fenómeno exclusivo de mamíferos ou seres pluricelulares.

As leveduras têm sido extensivamente exploradas como modelo biológico para o estudo de proteínas reguladoras da apoptose em metazoários. No entanto, a ideia de que em determinadas condições *S. cerevisiae* “decide” morrer foi inicialmente alvo de forte controvérsia. Contudo, nos últimos anos, começaram a surgir evidências que suportam tal hipótese. Com efeito, foi demonstrado em *S. cerevisiae* que um mutante termossensível do ciclo celular *cdc48^{8556G}* (Madeo *et al.*, 1997), e que a depleção em glutatona ou a exposição a concentrações baixas extracelulares de H₂O₂ (Madeo *et al.*, 1999) ou a radiações ultravioletas (Carratore *et al.*, 2001) desencadeiam um processo apoptótico. Laun *et al.* (2001) observaram ainda a ocorrência deste processo em células envelhecidas após 25-35 gerações. Contribuindo para este conjunto de evidências, o nosso grupo demonstrou recentemente que em *S. cerevisiae* o ácido acético também é capaz de desencadear um processo de morte celular programada com um fenótipo apoptótico (Ludovico *et al.*, 2001b). Verificou-se que o tratamento de *S. cerevisiae* com 20-200 mM de ácido acético, durante 200 minutos a pH 3.0, conduzia à perda de viabilidade das células. Contudo, a concentração de ácido necessária para a ocorrência de um processo activo de morte celular revelou-se crítica. Com efeito, enquanto que a morte celular observada para concentrações acima de 80 mM não era inibida pela cicloheximida (inibidor da síntese proteica) e estava associada a alterações ultraestruturais típicas de necrose, a morte induzida por concentrações mais baixas de ácido acético (20-80 mM) foi parcialmente inibida por cicloheximida. Nestas células foi possível detectar diferentes alterações estruturais típicas de apoptose nomeadamente: i) condensação extensiva de cromatina na periferia

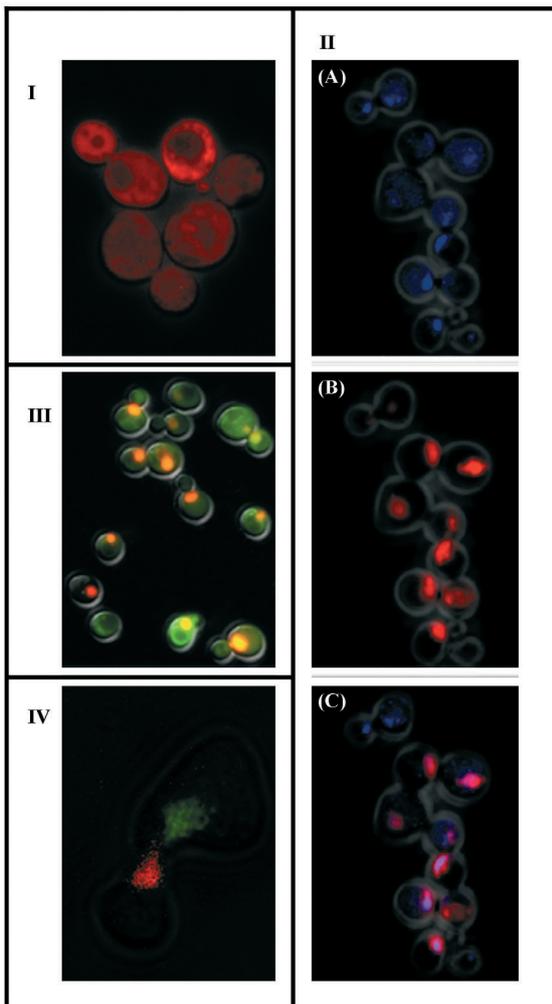


Figura 9 - Microscopia de epifluorescência de células de *S. cerevisiae* a expressarem: I, o gene DsRed; II, o gene DsRed-NLS, após marcação de DNA com DAPI em azul (A), fluorescência vermelha da DsRed em vermelho (B), e a sobreposição das duas cores (co-localização) em violeta (C); III, os genes DsRed-NLS e GFP. IV, Microscopia laser confocal de *S. cerevisiae* durante conjugação: uma das células com o núcleo marcado com a GFP-NLS (coloração verde) e a outra, com o núcleo marcado com a DsRed-NLS (coloração vermelho).

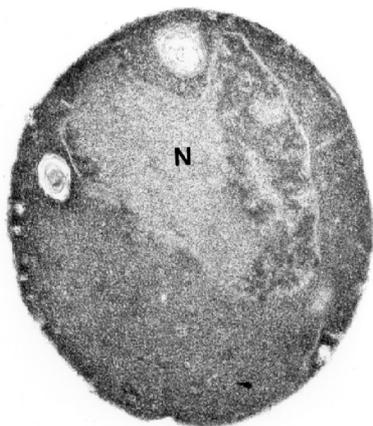


Figura 10 – Fotografia de microscopia electrónica de células de *S. cerevisiae* tratadas com 40 mM de ácido acético durante 200 min. N: núcleo 14 000x.

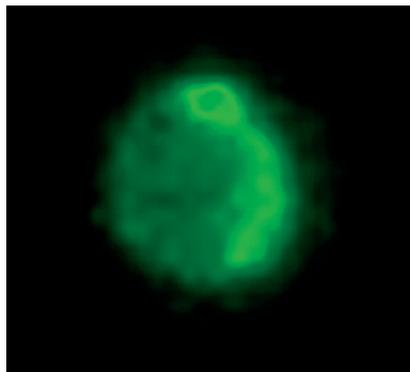


Figura 11 – Células de *S. cerevisiae*, tratadas com 40 mM de ácido acético durante 200 min e marcadas com anexina V e IP. A célula tem um fenótipo anexina V (+) e IP (-) o que indica que ocorreu exposição de fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática com preservação da integridade dessa membrana.

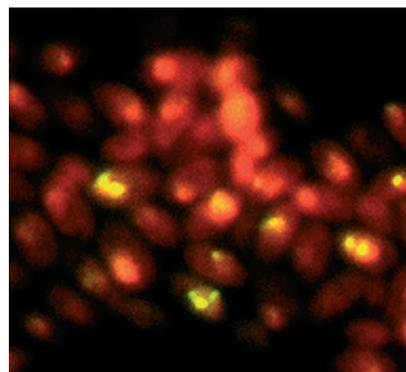


Figura 12 – Reacção de TUNEL após tratamento das células de *S. cerevisiae* com 40 mM de ácido acético durante 200 minutos. O fenótipo TUNEL (+) é indicado pela fluorescência nuclear amarela correspondente à sobreposição da fluorescência vermelha do IP com a verde da ficoeritrina conjugada com os nucleótidos introduzidos nos locais de fragmentação de DNA.

do invólucro nuclear observada por microscopia electrónica de transmissão (Fig. 10); ii) exposição de fosfatidilserina na superfície da membrana citoplasmática avaliada por reacção com anexina V conjugada com FITC (Fig. 11) e iii) ocorrência de quebras de DNA avaliada por TUNEL (Fig. 12). O facto de o ácido acético ser um sub-produto da fermentação alcoólica produzida por *S. cerevisiae* e, portanto, bastante “familiar” no seu ambiente natural, parece indicar que este processo, à semelhança do que acontece nos eucariontes superiores, pode ter um papel fisiológico relevante no ciclo de vida da levedura.

3. Considerações finais

A análise da célula como um todo ocupa uma posição chave no espectro actual da actividade científica que inclui o novo mundo das “...ómicas”. Na sua essência, os processos biológicos são determinados pelo genoma, revelados pelo transcriptoma, movidos pelo proteoma e em última instância levados a cabo pela célula (5). Assim a celulómica (análise citométrica multiparamétrica da heterogeneidade celular de citomas-sistemas multicelulares/orgãos/organismos) emerge como unidade integradora e não reductionista para o estudo racional das “...ómicas” dado que: i) medições ao nível da citómica podem ser usadas para o estabelecimento de descri-

ções matemáticas de alterações nos sistemas biológicos complexos e ii) a citómica vai desencadear a procura de tecnologias já existentes ou a exigência de novas técnicas de análise de células individuais (5). Neste contexto, a citologia analítica tem um papel fulcral. A evolução da citologia analítica resultou e continua a resultar da conjugação de esforços multidisciplinares. Com efeito, com base em conhecimentos em áreas tão diversas como a optoelectrónica (lasers), a electrónica dos fotosensores (fotodíodos e fotomultiplicadores), a química dos fluorocromos e o *hardware* e *software* dos computadores, tem sido possível no âmbito da citologia analítica conseguir medições antes inacessíveis pelas técnicas clássicas de bioquímica. Os resultados apresentados são também o exemplo de que a citologia analítica, quando aplicada a estudos de biologia de leveduras, tem inúmeras potencialidades e que irá contribuir para novos avanços nesta área científica.

Agradecimentos

A investigação realizada pelo nosso grupo, no âmbito dos trabalhos referidos neste artigo, foi financiada pelo projecto Europeu - AIR-2-CT93-0830, pelo programa PRAXIS XXI P/AGR/11135/1998 e pelo programa PAMAF do INIA (projectos nº 2025

e 6088). Os dois últimos projectos financiaram ainda duas bolsas de investigação atribuídas a P. Ludovico e M. Fortuna. Os autores gostariam ainda de manifestar o seu reconhecimento pela apoio técnico na aquisição de dados citométricos prestada ao longo de parte do trabalho por Alexandre Salvador e Cristina Freitas. F. Rodrigues beneficiou de uma bolsa de doutoramento da FCT e P. Ludovico é bolsista de doutoramento da FCT. O trabalho respeitante à monitorização *in vivo* de processos celulares em leveduras foi realizada em colaboração com Martin Hemert e Yde Steensma (Klusius Laboratory, Leiden University).

Referências e endereços da internet referidos no texto

Referências

- Beelman, R. B. e Gallander, J. F. (1979). Wine deacidification. *Adv. Food Res.*, 25:1-53.
- Breeuwer, P., Drocourt, J.-L., Rombouts, F. M. e Abee, T. (1994). Energy-dependent, carrier-mediated extrusion of carboxyfluorescein from *Saccharomyces cerevisiae* allows rapid assessment of cell viability by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 1467-1472.
- Cardoso, H. (1994). *Toxicidade do ácido acético e outros ácidos monocarboxílicos de cadeia curta em Saccharomyces cerevisiae*. Tese de Doutoramento. Universidade do

- Minho, Braga.
- Carratore, R., Croce, C., Simili, M., Taccini, E., Scavuzzo, M., Sbrana, S. (2002). Cell cycle and morphological alterations as indicative of apoptosis promoted by UV irradiation in *S. cerevisiae*. *Mutation Research* 513,183-191.
- Carneiro, F., Moutinho-Ribeiro, M., David, L., Seixas, M., Sansonetty, F., Soares, P., Serrano, A., Sobrinho-Simões, M. (1992). Signet ring cell carcinoma of the stomach: a morphometric, ultrastructural, and DNA cytometric study. *Ultrastruct. Pathol.*,16(6): 603-14.
- Castro, P., Sansonetty, F., Soares, P., Dias, A., Sobrinho-Simões, M. (2001). Fetal adenomas and minimally invasive follicular carcinomas of the thyroid frequently display a triploid or near triploid DNA pattern. *Virchows Arch.*, 438(4):336-42.
- do Ceu Monteiro, M., Sansonetty, F., Goncalves, M.J., O'Connor, J.E. (1999). Flow cytometric kinetic assay of calcium mobilization in whole blood platelets using Fluo-3 and CD41. *Cytometry*, 1;35(4):302-10.
- Dujon, B. (1981). *The molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae*. (J.N. Stratem, E.W. Jones, and J.R. Broach, eds.) pp. 505-625. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY.
- Fortuna M., Sousa M.J., Salvador A., Sansonetty F., Côrte-Real M. e Leão C. (2000). "Cell cycle analysis of Yeasts". Current Protocols in Cytometry (Unit 11.13), published by *John Wiley & Sons, Inc.*
- Haugland, R. P. (2000). *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*, Molecular Probes.
- Lage, O.M., Sansonetty, F., O'Connor, J.E., Parente, A.M. (2001). Flow cytometric analysis of chronic and acute toxicity of copper(II) on the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *Cytometry*, 1;44(3):226-35.
- Laun, P., Pichova, A., Madeo, F., Fuchs, J., Ellinger, A., Kohlwein, S., Dawes, I., Frohlich, K.U. and Breitenbach, M. (2001). Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Mol. Microbiol.*, 39:1166-1173.
- Ludovico, P. (1999). *Efeitos do ácido acético no potencial de membrana mitocondrial e sua relação com a perda de integridade e viabilidade celular em Zygosaccharomyces bailii e Saccharomyces cerevisiae*. Tese de Mestrado, Universidade do Minho, Braga, Portugal.
- Ludovico, P., Sansonetty, F. and Côrte-Real, M. (2001a). Assessment of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry. *Microbiology*, 147: 3335-3343.
- Ludovico, P., Sousa, M.J., Silva, M.T., Leão, C. and Côrte-Real, M. (2001b). *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology*, 147:2409-2415.
- Madeo, F., Fröhlich, E. and Fröhlich, K.U. (1997). A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J. Cell Biol.*, 139:729-734.
- Madeo F., Frohlich E., Ligr M., Grey M., Sigrist S. J., Wolf D.H., and Frohlich K.U. (1999). Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.*, 145:757-767.
- Mollapour, M. e Piper, P.W. (2001). Targeted gene deletion in *Zygosaccharomyces bailii*. *Yeast*, 18: 173-186.
- O'Connor, J.-E., Callaghan, R. C., Escudero, M., Herrera, G., Martínez, A., Monteiro, M.-C. and Montolíu, H. (2001). The relevance of flow cytometry for biochemical analysis. *IUBMB Life*, 51: 231-239.
- Pampulha, M. E. F. (1989). *Efeito do ácido acético na fermentação e nos parâmetros de crescimento em Saccharomyces cerevisiae*. Tese de Doutorado. Universidade Técnica de Lisboa.
- Pina-Vaz, C., Sansonetty, F., Rodrigues, A.G., Costa-Oliveira, S., Tavares, C., Martinez-de-Oliveira, J. (2001a) Cytometric approach for a rapid evaluation of susceptibility of *Candida* strains to antifungals. *Clin. Microbiol. Infect.*, 7(11):609-18.
- Pina-Vaz, C., Sansonetty, F., Rodrigues, A.G., Costa-de-Oliveira, S., Martinez-de-Oliveira, J., Fonseca, A.F. (2001b). Susceptibility to fluconazole of *Candida* clinical isolates determined by FUN-1 staining with flow cytometry and epifluorescence microscopy, *J. Med. Microbiol.* 50(4):375-82.
- Pina-Vaz, C., Rodrigues, A.G., Sansonetty, F., Martinez-De-Oliveira, J., Fonseca, A.F., Mardh, P.A. (2000a). Antifungal activity of local anesthetics against *Candida* species. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.*, 8(3-4):124-37.
- Pina-Vaz, C., Sansonetty, F., Rodrigues, A.G., Martinez-De-Oliveira, J., Fonseca, A.F., Mardh, P.A. (2000b). Antifungal activity of ibuprofen alone and in combination with fluconazole against *Candida* species. *J. Med. Microbiol.*, 49(9):831-40.
- Pinto, I., Cardoso, H., Leão, C. e van Uden, N. (1989). High enthalpy and low enthalpy death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by acetic acid. *Biotechnol. Bioeng.*, 33: 1350-1352.
- Prudêncio, C., Sansonetty, F. e Côrte-Real, M. (1998). Flow cytometric assessment of cell structural and functional changes induced by acetic acid in the yeasts *Zygosaccharomyces bailii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Cytometry*, 31:307-313.
- Prudêncio, C., Sansonetty, F., Sousa, M. J., Côrte-Real, M. e Leão, C. (2000). Rapid detection of efflux pumps and their relation with drug resistance in yeast cells. *Cytometry*, 39:26-35.
- Prudêncio, C., (2000). *Drug-resistance in yeasts: flow cytometric studies*. Tese de doutoramento, Universidade do Minho, Braga, Portugal.
- Ribeiro, I. C., Veríssimo, I., Moniz, L., Cardoso, H., Sousa, M. J., Soares, A.M.V.M. e Leão, C. (2000). Yeasts as a model for assessing the toxicity of the fungicides penconazol, cymoxanil and dichlofluanid. *Chemosphere*, 41, 1637-1642.
- Rodrigues, F., van Hemert, M., Steensma, H.Y., Corte-Real, M., and Leao, C. (2001). Red fluorescent protein (DsRed) as a reporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol* 183:3791-3794.
- Rodrigues, F. (2001). *Physiological and molecular genetic studies on Zygosaccharomyces bailii* ISA 1307. Tese de doutoramento, Universidade do Minho, Braga, Portugal.
- Salvador, A., Sansonetty, F., Schmitt, F.C. (1998). Breve referência às determinações do conteúdo em ADN, em células humanas por citometria. *Revista Técnica de Anatomia Patológica* 2: 18-22.
- Torok, T., Royer, C., Rockhold, D., and King, A.D. (1992). Electrophoretic karyotyping of yeasts, and southern blotting using whole chromosomes as templates for the probe preparation. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 38: 313-325.
- Wyllie, A. H., Kerr, J.F.R. and Currie, A.R. (1972). Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Ver. Cytol.*, 68: 251-306.
- Shapiro, H. M. (1994) *Practical Flow Cytometry*, 3rd Edition Wiley Liss, New York.

Endereços da internet referidos no texto

1. <http://www.genomicglossaries.com/content/omes.asp>
2. <http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/hg/hoy/>
3. <http://www.cyto.purdue.edu/>
4. <http://www.biochem.mpg.de/valet/cytorel.html>
5. <http://www.isac-net.org/enews/Summer01/world.htm>

Outros endereços da internet

International Society of Analytical Cytology:
<http://www.isac-net.org/>

Empresas fornecedoras de citômetros de fluxo:

Beckman Coulter:

<http://www.beckmancoulter.com>

Beckton Dickinson:

<http://www.bd.com>

Partec:

<http://www.partec.de/>

Cytomation:

<http://www.cytomation.com/>