



_Avaliação do efeito da microcistina-LR no crescimento, sistema antioxidante e indução de apoptose em *Saccharomyces cerevisiae*

Elisabete Valério^{1,2}, Arminda Vilares¹, Alexandre Campos², Paulo Pereira¹, Vítor Vasconcelos^{2,3}

elisabete.valerio@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Água e Solo. Departamento de Saúde Ambiental, INSA.

(2) Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, Universidade do Porto.

(3) Departamento de Biologia. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto.

_Introdução

Algumas das toxinas mais comuns presentes na água doce são produzidas por cianobactérias, em particular as microcistinas (MC). Estas toxinas são conhecidas por causar hepatotoxicidade aguda em humanos e animais e por atuarem como promotores tumorais sendo reconhecidas pela International Agency for Research on Cancer (IARC), como agentes potencialmente carcinogénicos para o ser humano (1). Em células de mamíferos, o mecanismo de toxicidade das microcistinas é atribuída a um processo que envolve várias vias, um deles relacionado com a inibição das fosfatases proteicas PP1 / PP2A e a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) (2). Porém, a informação toxicológica e epidemiológica disponível não permite ainda estabelecer inequivocamente uma relação causa-efeito entre a exposição humana às MC e efeitos adversos na saúde.

Neste trabalho pretendeu-se usar a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para compreender melhor os mecanismos de toxicidade induzidos pela microcistina-LR. Este é o organismo eucariótico mais simples e estudado que tem sido amplamente utilizado como modelo no estudo de mecanismos de toxicidade, devido à facilidade de acesso à informação sobre o seu genoma (totalmente sequenciado e anotado), proteoma e processos bioquímicos correspondentes. Acresce que cerca de 31% das proteínas codificadas no genoma da levedura têm um ortólogo humano e aproximadamente 50% dos genes de doenças humanas têm um ortólogo na levedura. Existe ainda uma elevada conservação das estruturas celulares e enzimáticas e resposta ao stress oxidativo

como nos eucariotas superiores (3).

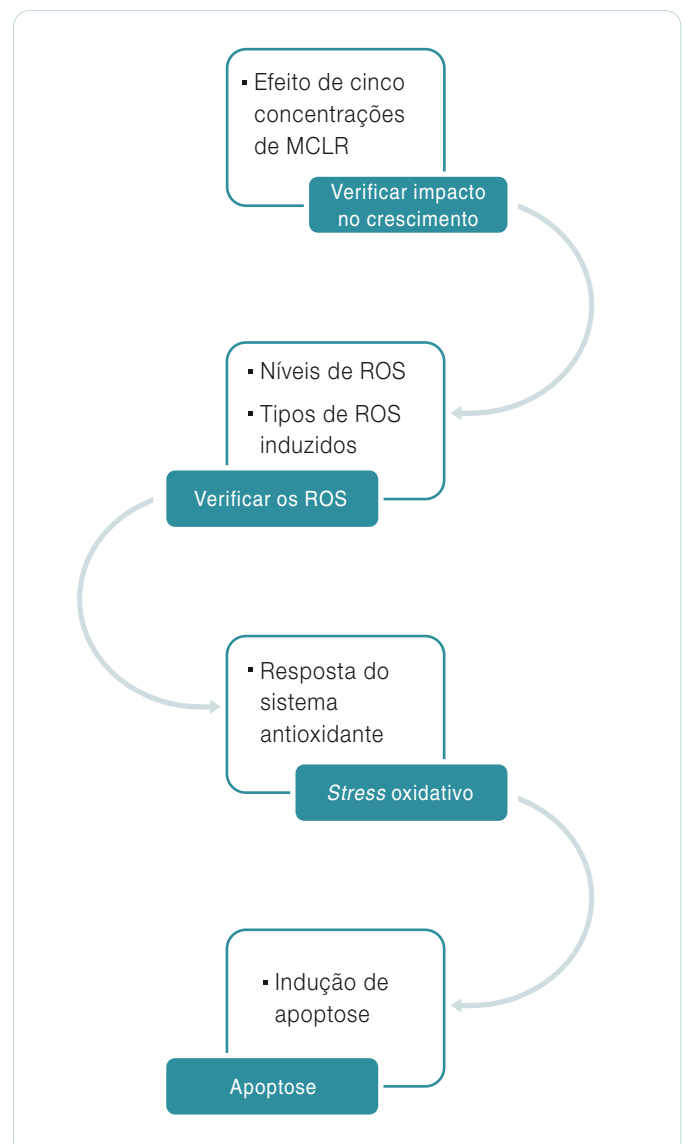
_Objetivos

Neste estudo pretendeu-se avaliar os efeitos de várias concentrações de microcistina-LR (MCLR) no crescimento, níveis de ROS, resposta do sistema antioxidante e indução de apoptose na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

_Metodologia

Na figura 1 está representada a abordagem metodológica empregue para avaliar os efeitos da MCLR nas células da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* VL3 (Zymaflore).

Figura 1: Abordagem metodológica empregue para avaliar os efeitos da MCLR nas células da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* VL3 (Zymaflore).

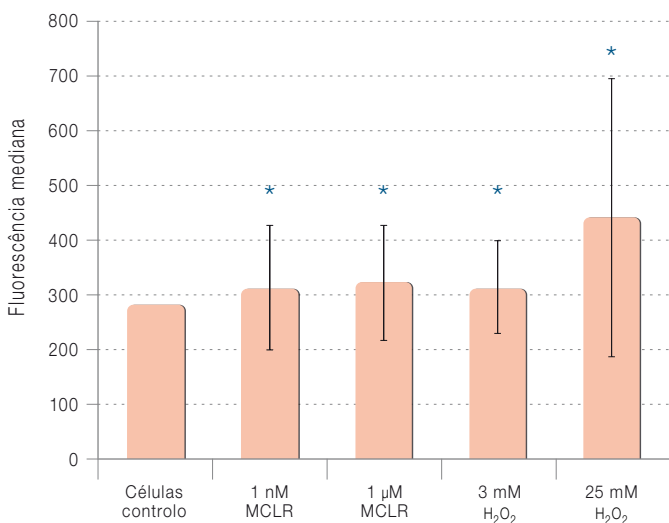


Resultados e discussão

Verificou-se que o crescimento microbiano não foi inibido na presença das várias concentrações de toxina testadas (1 nM, 10 nM, 1 µM, 10 µM e 100 µM), relativamente ao controlo.

Contudo, após coloração das células com fluorocromos, verificou-se que a exposição das células à toxina induziu um aumento dos níveis intracelulares dos ROS totais, como se pode verificar no gráfico 1. A presença de 1 nM de MCLR provocou um aumento de 11% enquanto a concentração de 1 µM de MCLR levou a um aumento de 14% dos níveis de fluorescência. A presença de H₂O₂ foi usada como controlo positivo, em que a concentração de 3 mM causou um aumento de 11% vs. 57% de aumento induzido pela presença de 25 mM de H₂O₂.

Gráfico 1: Fluorescência mediana (± desvio padrão) das células coradas com Dihidrorodamina 123 (DHR123) para avaliar os níveis intracelulares globais de ROS (n=200).



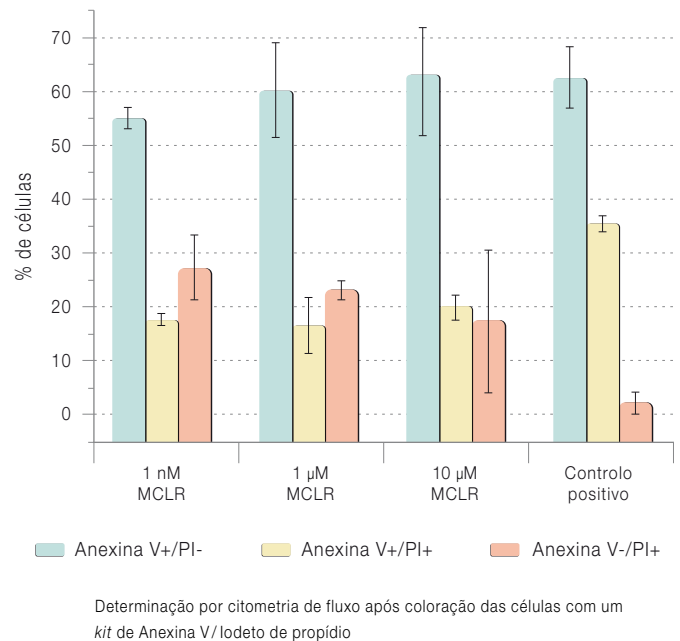
* Diferenças significativas entre as células tratadas e as células controlo (p < 0,05).

Este aumento provocou uma ativação do sistema antioxidante, especialmente na resposta da catalase, em que se observou o dobro da atividade relativa com 1 nM de MCLR e um aumento de 60% com 1 µM de MCLR. Além disso, observou-se uma inibição da SOD1, com uma diminuição de 40% com 1 nM de MCLR e menos 20% com 1 µM MCLR. Este resultado, em conjunto com os tipos de ROS possivelmente presentes, sugere que a espécie reativa de oxigénio maioritariamente induzida seja o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) (4).

Podemos supor que o aumento da atividade relativa da catalase foi a forma das células superarem o aumento dos níveis de ROS, levando à eliminação dos mesmos, o que pode explicar a ausência de impacto da presença da toxina no crescimento da levedura.

Observaram-se ainda sinais de apoptose após coloração das células *in vivo* com DAPI e também após avaliação das células coradas com um kit de Anexina V-FITC / iodeto de propídeo por citometria de fluxo (gráfico 2).

Gráfico 2: Percentagem de células (média ± σ) em início de apoptose (azul), apoptose tardia (amarelo) e necrose (laranja) após exposição a MCLR (n = 3).



Determinação por citometria de fluxo após coloração das células com um kit de Anexina V / iodeto de propídeo

Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* VL3 apresenta alguns dos principais efeitos tóxicos induzidos pela microcistina-LR em eucariotas superiores. Esta levedura, comprovou assim ser um simples e bom modelo eucariótico para futuramente estudar em mais detalhe os mecanismos moleculares de toxicidade induzidos pela microcistina-LR.



artigos breves_ n. 7

Agradecimentos

Os autores agradecem ao prof. Rui Malhó pelo apoio nos ensaios de fluorescência. Este trabalho foi parcialmente financiado pelo Programa Operacional Potencial Humano, pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia através da Bolsa de pós-doc SFRH/BPD/75922/2011 e o Projeto PEst-C/MAR/LA0015/2013.

Artigo adaptado de: Valério E, Vilares A, Campos A, et al. Effects of microcystin-LR on *Saccharomyces cerevisiae* growth, oxidative stress and apoptosis. *Toxicol.* 2014;90:191-8.

Referências bibliográficas:

- (1) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Ingested nitrate and nitrite and cyanobacterial peptide toxins. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2006. p. 326-412. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; 94). [LINK](#)
- (2) Campos A, Vasconcelos V. Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *Int J Mol Sci.* 2010;11(1):268-87. [LINK](#)
- (3) Menacho-Márquez M, Murguía JR. Yeast on drugs: *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for anticancer drug research. *Clin Transl Oncol.* 2007;9(4):221-8.
- (4) Bowler C, Van Camp W, Van Montagu M, et al. Superoxide dismutase in plants. *Crit Rev Plant Sci.* 1994;13(3):199-218