

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).

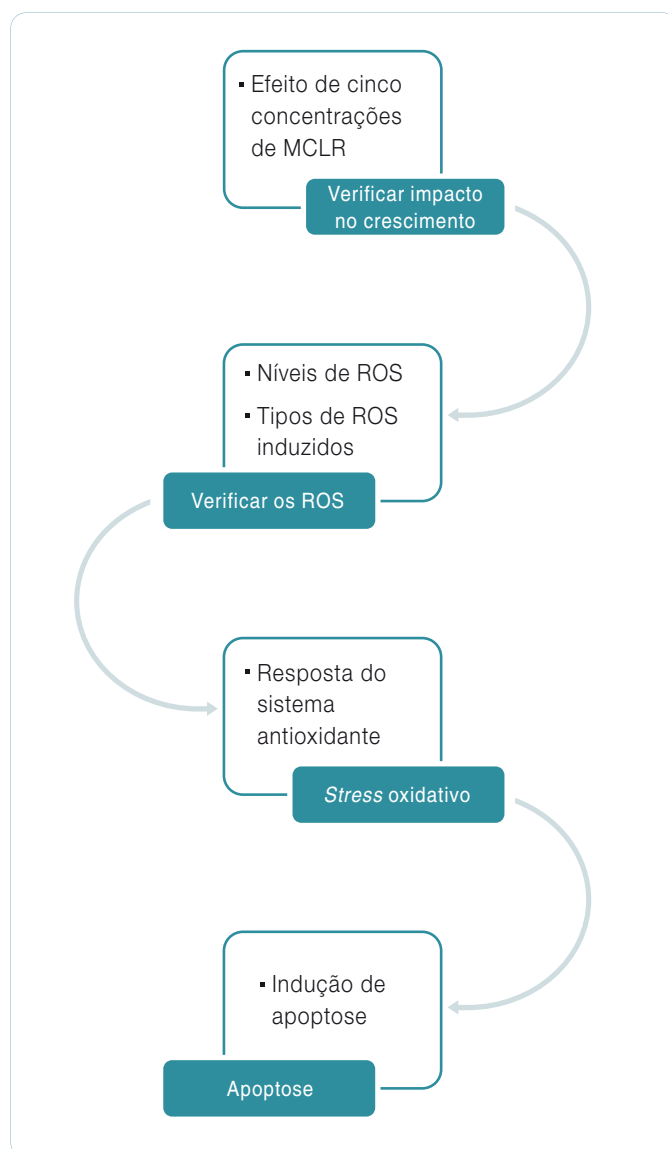
Objetivos

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).

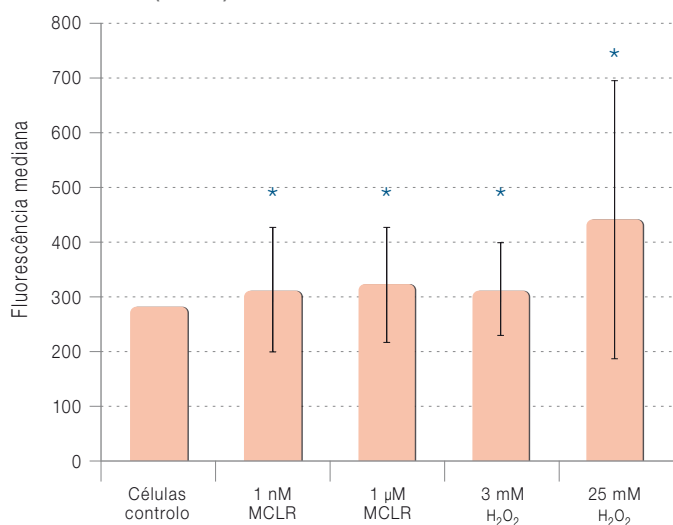


Resultados e discussão

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).



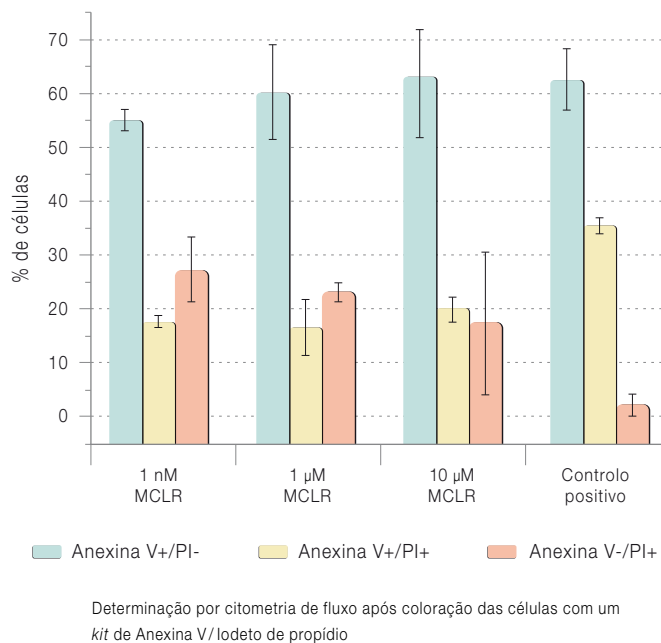
* Diferenças significativas entre as células tratadas e as células controlo (p < 0,05).

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.



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