

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Avaliação dos efeitos citotóxicos em *Saccharomyces cerevisiae* exposta a cianotoxinas

Sara Cristina Conde Rodrigues

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Versão Provisória

Dissertação orientada por:
Doutora Elisabete Valério
Doutora Margarida Barata

Instituto **Nacional de Saúde**
Doutor Ricardo Jorge



O trabalho apresentado nesta Dissertação de Mestrado foi realizado no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge sob a orientação direta da Doutora Elisabete Valério.

A Professora Doutora Margarida Barata foi a orientadora interna, designada no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à Doutora Elisabete Valério, do Departamento de Saúde Ambiental do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, que foi a orientadora externa deste trabalho, e sem a qual esta tese não seria uma realidade. Estou muito grata por todo o apoio e conhecimento que me foi dado ao longo da dissertação.

Gostaria também de agradecer a todos os restantes elementos do Departamento de Saúde Ambiental do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge que sempre se mostraram disponíveis para me ajudar.

Agradeço também à Professora Doutora Margarida Barata da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, no papel de orientadora interna, pelo constante apoio e disponibilidade sempre que precisei.

Quero ainda agradecer a todos os professores que me acompanharam ao longo do mestrado transmitindo conhecimentos fundamentais e capacidades para desenvolver este projeto.

Por fim, quero agradecer à minha família, amigos e ao meu namorado que sempre estiveram na retaguarda a apoiar e a incentivar a realização de mais uma etapa da minha formação académica.

Sumário

As cianobactérias são microrganismos procariotas que se encontram maioritariamente em comunidades fitoplanctónicas. Sob condições favoráveis, estas são capazes de atingir grandes densidades celulares (*blooms*). Algumas espécies de cianobactérias produzem cianotoxinas que podem ser prejudiciais para a saúde pública e animal.

Das cianotoxinas conhecidas, foram escolhidas a Microcistina-LR (MC-LR) e a Cilindrospermopsina (CYL) para desenvolver este trabalho. Tendo em conta a frequente ocorrência e a elevada toxicidade da MC-LR, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu um valor limite de concentração desta toxina na água potável de 1 µg/L. Para a CYL ainda não há um valor guia, pelo que não está controlada.

Os ensaios de viabilidade celular são muito usados para procurar moléculas com efeitos na proliferação celular ou efeitos tóxicos que possam levar à morte celular. Para realizar estes ensaios, foi selecionada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), já anteriormente usada para investigar mecanismos moleculares de toxicidade da Microcistina-LR (MC-LR).

Neste estudo foi usado o ensaio de Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), após exposição das leveduras a diferentes concentrações das cianotoxinas. Neste ensaio, células viáveis com metabolismo ativo convertem o reagente MTT num produto de cor roxa, que nos permite quantificar a viabilidade das células testadas, enquanto que células mortas não conseguem fazer essa conversão. Testou-se ainda uma enzima lítica, a Liticase, a qual vai atuar e digerir a camada externa da parede celular.

Para além do ensaio MTT, foi também testado o ensaio de coloração com Azul Tripano (AT), que é usado para determinar o número de células viáveis (que excluem o corante) presentes numa suspensão, onde é feita a contagem das células por observação direta ao microscópio em Câmara de Neubauer.

Este trabalho permitiu dar uma contribuição numa área ainda pouco explorada, referente ao uso de métodos de análise de viabilidade celular para detetar efeitos citotóxicos provocados por duas cianotoxinas, utilizando *S. cerevisiae* como organismo eucariota modelo.

Como conclusões, dos dois métodos usados neste estudo, o ensaio MTT é o mais fiável na medida em que o comportamento dos controlos reflete claramente o que está descrito na literatura para os mesmos ($p \leq 0,05$). Contudo, o método AT revelou ser bastante reprodutível. No que diz respeito às toxinas, não se observam efeitos citotóxicos significativos em *S. cerevisiae* ($p > 0,05$) com nenhuma das duas toxinas testadas. Quando foi usada liticase de forma a facilitar a entrada das toxinas nas células, estes ensaios também não refletiram efeitos citotóxicos significativos ($p > 0,05$).

Palavras-chave: Microcistina-LR, Cilindrospermopsina, Citotoxicidade, Viabilidade celular, *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

Cyanobacteria are prokaryotic microorganisms found mostly in phytoplanktonic communities. Under favorable conditions, they are capable to reach high cell densities (blooms). Some cyanobacterial species produce cyanotoxins that can be harmful to public and animal health.

Among the known cyanotoxins, Microcystin-LR (MC-LR) and Cylindrospermopsin (CYL) were chosen to develop this work. Given the frequent occurrence and high toxicity of MC-LR, World Health Organization (WHO) has established a guideline value for this toxin in drinking water of 1 µg / L. There is still no guideline value for CYL yet, so this toxin is not controlled.

Cell viability assays are widely used to look for molecules with effects on cell proliferation or toxic effects that may lead to cell death. To perform these assays, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), already previously used to investigate molecular mechanisms of Microcystin-LR (MC-LR) toxicity, was selected to perform this study.

In this study the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium (MTT) bromide assay was used after exposure of yeast cells to different concentrations of these two cyanotoxins. In this assay, viable cells with active metabolism convert MTT reagent into a purple product, which allows us to quantify the viability of the cells tested, while dead cells cannot make this conversion. We also tested a lytic enzyme, Liticase, which will act on the outer layer of the cell wall, degrading it.

In addition to the MTT assay, the Trypan Blue staining assay, which is used to determine the number of viable cells (able to exclude the dye) that are present in a suspension, was also tested. The cells are counted by direct observation under the microscope in a Neubauer Chamber.

This work intended to give a contribution to an area still under-explored, related with the use of cell viability tests to evaluated cytotoxic effect of two cyanotoxins, and the yeast *S. cerevisiae* as eukaryotic model organism.

As conclusions, from the two methods used in this study, the MTT assay is the most reliable and reproducible as the behavior of the controls clearly reflects what is described in the literature for them ($p \leq 0.05$). For toxins, no significant cytotoxic effects are observed in *S. cerevisiae* ($p > 0.05$). Liticase was tested to facilitate the toxins entrance into the cells, however, these trials also did not reflect significant effects ($p > 0.05$).

Keywords: Microcystin-LR, Cylindrospermopsin, Cytotoxicity, Cell viability, *Saccharomyces cerevisiae*

Índice

Agradecimentos.....	i
Abstract	iii
Índice de Figuras	v
Abreviaturas	vii
1. Introdução	1
1.1 Cianobactérias.....	1
1.2 Cianotoxinas.....	2
1.2.1 Microcistina-LR	3
1.2.1 Cilindropermopsina	6
1.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
1.4 Ensaio de Viabilidade	8
1.4.1 Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).....	8
1.4.2 Azul Tripano (AT)	9
2. Materiais e Métodos	12
2.1 Estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e condições de crescimento	12
2.5 Ensaio com Azul Tripano	14
3. Resultados	17
3.1 Controlos	17
3.2 Toxinas.....	19
3.3 Liticase	23
4. Discussão.....	26
5. Conclusões e Perspetivas Futuras	29
6. Referências Bibliográficas	30
7. Sitiografia.....	35

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Comparação entre a ultraestrutura celular da cianobactéria e uma bactéria Gram-negativa típica. CE - Camada externa serrada; ME - Membrana externa; P - Peptidoglicano; MC - Membrana citoplasmática (Adaptado de Hoiczky & Hansel, 2000).....	1
Figura 1.2 - Fatores ambientais que influenciam o aparecimento de <i>blooms</i> de cianobactérias e exposição humana (Adaptado de Merel <i>et al.</i> , 2013).....	2
Figura 1.3 - Estrutura da Microcistina (Campos & Vasconcelos, 2010). Na microcistina-LR: ADDA representa o ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4, 6-dienóico, Mdha representa N-metil-dihidro-alanina, D-MeAsp representa ácido D-eritro-metil-aspártico, D-Glu representa D-glutamato, X representa a Leucina (L), Z representa a Arginina (A) e R1 e R2 representam grupos metilo (CH ₃).....	5
Figura 1.4 - Estrutura da Cilindrospermopsina (Mello <i>et al.</i> , 2017).....	6
Figura 1.5 - Ciclo de vida de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Adaptado de Rescan, 2017).....	7
Figura 1.6 - Leveduras de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> VL3 em suspensão celular (Ampliação 400x, Sara Rodrigues).....	8
Figura 1.7 - Princípio do ensaio de MTT (Adaptado de Stockert <i>et al.</i> , 2012).....	9
Figura 1.8 - Teste de Exclusão de Azul Tripano (Adaptado de http://docplayer.com.br/58313012-Helaine-mirelli-de-almeida.html).....	10
Figura 2.1 - <i>S. cerevisiae</i> (VR5 e VL3, respetivamente) em meio YPD sólido.....	12
Figura 2.2 - Curva de crescimento de <i>S. cerevisiae</i> VL3 na presença de 1 nM de MC-LR pura (círculos cinzentos) comparada ao controlo negativo (quadrados pretos). * indica os pontos em que foram obtidas diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controlo (Adaptado de Valério <i>et al.</i> , 2014).....	13
Figura 2.3 - Células viáveis (sem coloração) e células não viáveis (azuis – seta branca) (Ampliação 400x, Sara Rodrigues).....	15
Figura 2.4 - Câmara de Neubauer (https://www.labhouse.com.br/camara-de-neubauer-dupla-espelhada).....	15
Figura 2.5 - Procedimento com o ensaio MTT em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
Figura 3.1 - Viabilidade celular de <i>S. cerevisiae</i> VL3 com o método Azul Tripano, após inoculação da placa durante 4h ou 5h para dois volumes diferentes - 1 mL e 2 mL, expostos a diferentes fatores de <i>stress</i> . Os dados apresentados mostram a média e as respetivas barras de erro representam o desvio padrão de três amostras independentes ($n=3$) ($p > 0,05$; Teste-t).....	17
Figura 3.2 - Viabilidade celular de <i>S. cerevisiae</i> VL3 com ensaio MTT, após exposição a diferentes fatores de <i>stress</i> durante 4 h. Os dados apresentados mostram a média e as respetivas barras de erro representam o desvio padrão de três amostras independentes ($n=3$). Asterisco (*)	

indica uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ($p \leq 0,05$; Teste-t).....18

Figura 3.3 - Viabilidade celular de *S. cerevisiae* VR5 com o ensaio MTT, após exposição aos dois fatores de *stress* durante 4 h. Os dados apresentados mostram a média e as respetivas barras de erro representam o desvio padrão de três amostras independentes (n=3). Asterisco (*) indica uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ($p \leq 0,05$; Teste-t).....19

Figura 3.4 - Viabilidade celular de *S. cerevisiae* VL3 com ensaio AT, após exposição a MC-LR durante 4 h. Os dados apresentados mostram a média e as respetivas barras de erro representam o desvio padrão de três amostras independentes (n=3) ($p > 0,05$; Teste-t).....20

Figura 3.5 - Viabilidade celular de *S. cerevisiae* VL3 com ensaio AT, após exposição a CYL durante 4 h. Os dados apresentados mostram a média e as respetivas barras de erro representam o desvio padrão de três amostras independentes (n=3) ($p > 0,05$; Teste-t).....20

Figura 3.6 - Viabilidade celular de *S. cerevisiae* VL3 com ensaio MTT, após exposição a MC-LR durante 4 h. Os dados apresentados mostram a média e as respetivas barras de erro representam o desvio padrão de três amostras independentes (n=3) ($p > 0,05$; Teste-t).....21

Figura 3.7 - Viabilidade celular de *S. cerevisiae* VR5 com ensaio MTT, após exposição a MC-LR durante 4 h. Os dados apresentados mostram a média e as respetivas barras de erro representam o desvio padrão de três amostras independentes (n=3) ($p > 0,05$; Teste-t).....22

Figura 3.8 - Viabilidade celular de *S. cerevisiae* VL3 com ensaio MTT, após exposição a CYL durante 4 h. Os dados apresentados mostram a média e as respetivas barras de erro representam o desvio padrão de três amostras independentes (n=3) ($p > 0,05$; Teste-t).....22

Figura 3.9 - Viabilidade celular de *S. cerevisiae* VR5 com ensaio MTT, após exposição a CYL durante 4 h. Os dados apresentados mostram a média e as respetivas barras de erro representam o desvio padrão de três amostras independentes (n=3) ($p > 0,05$; Teste-t).....23

Figura 3.10 - Viabilidade celular de *S. cerevisiae* VL3 com ensaio MTT, após exposição a MC-LR e liticase durante 4 h. Os dados apresentados mostram a média e as respetivas barras de erro representam o desvio padrão de três amostras independentes (n=3) ($p > 0,05$; Teste-t). CN = Controlo Negativo.....24

Figura 3.11 – Células de *S. cerevisiae* (CN) após ensaio com o reagente MTT (à esquerda) e células de *S. cerevisiae* com Liticase (CN + Liticase) com reagente MTT (à direita) (Ampliação 1000x, Sara Rodrigues).....24

Abreviaturas

ADDA – Ácido-(2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4, 6-dienóico

AT – Azul Tripano

CN – Controlo negativo

CYL – Cilindrospermopsina

DMSO – Dimetilsulfóxido

FDA - Diacetato Fluorescente

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogénio

LDH - Lactato Desidrogenase

MC-LR – Microcistina-LR

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil-tetrazólio

OATP – Polipeptídeo transportador de aniões orgânicos

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Tampão fosfato-salino

PP's – Fosfatases proteicas

ROS – Espécies reativas de oxigénio

S. cerevisiae – *Saccharomyces cerevisiae*

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

YPD – Extrato de Levedura (1%), Peptona (2%), Dextrose (2%) (p/v)

YPDA – Extrato de Levedura (1%), Peptona (2%), Dextrose (2%) (p/v), Agar (2%)

1. Introdução

1.1 Cianobactérias

As Cianobactérias (também chamadas de algas verdes-azuis) são microrganismos fotossintéticos (Van Apeldoorn *et al.*, 2007; Drobac *et al.*, 2016), procariotas, possuindo uma parede celular do tipo gram-negativa. No entanto, através de microscopia eletrônica, sabe-se que a parede celular das cianobactérias tem uma camada de peptidoglicano mais espessa que um organismo gram-negativo típico (Figura 1.1) (Castenholz, 2015).

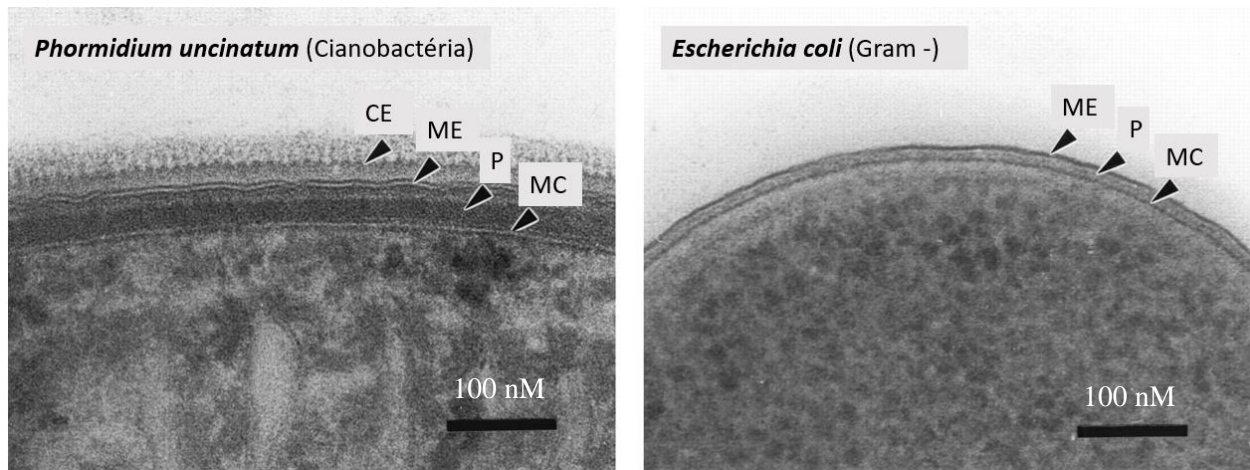


Figura 1.1 - Comparação entre a ultraestrutura celular da cianobactéria e uma bactéria Gram-negativa típica. CE - Camada externa serrada; ME - Membrana externa; P - Peptidoglicano; MC - Membrana citoplasmática (Adaptado de Hoiczuk & Hansel, 2000).

Estão presentes em ambientes aquáticos como lagos, águas de recreio e reservatórios (Pantelić *et al.*, 2013), estando em grande maioria nas comunidades fitoplantônicas em águas duras, quentes e enriquecidas em nutrientes (azoto e fósforo) (Chong *et al.*, 2000; Codd *et al.*, 2005; Bellém *et al.*, 2013). Sob condições favoráveis como fatores químicos, biológicos e físicos, incluindo a disponibilidade de nutrientes e a temperatura da água (Merel *et al.*, 2013), as cianobactérias atingem altas densidades celulares, designadas como florescências ou *blooms* (Pantelić *et al.*, 2013; Bellém *et al.*, 2013; Valério *et al.*, 2014), sendo um efeito comum da eutrofização e mudanças climáticas (Figura 1.2) (Chong *et al.*, 2000; Freitas *et al.*, 2015; Drobac *et al.*, 2016).

A ocorrência destes *blooms* tem aumentado também pela atividade humana, por exemplo por práticas agrícolas intensivas, escorrências não controladas de esgotos e uso de detergentes ricos em fosfatos, estando associados a mudanças ambientais negativas como alterações dos ecossistemas (Pantelić *et al.*, 2013).

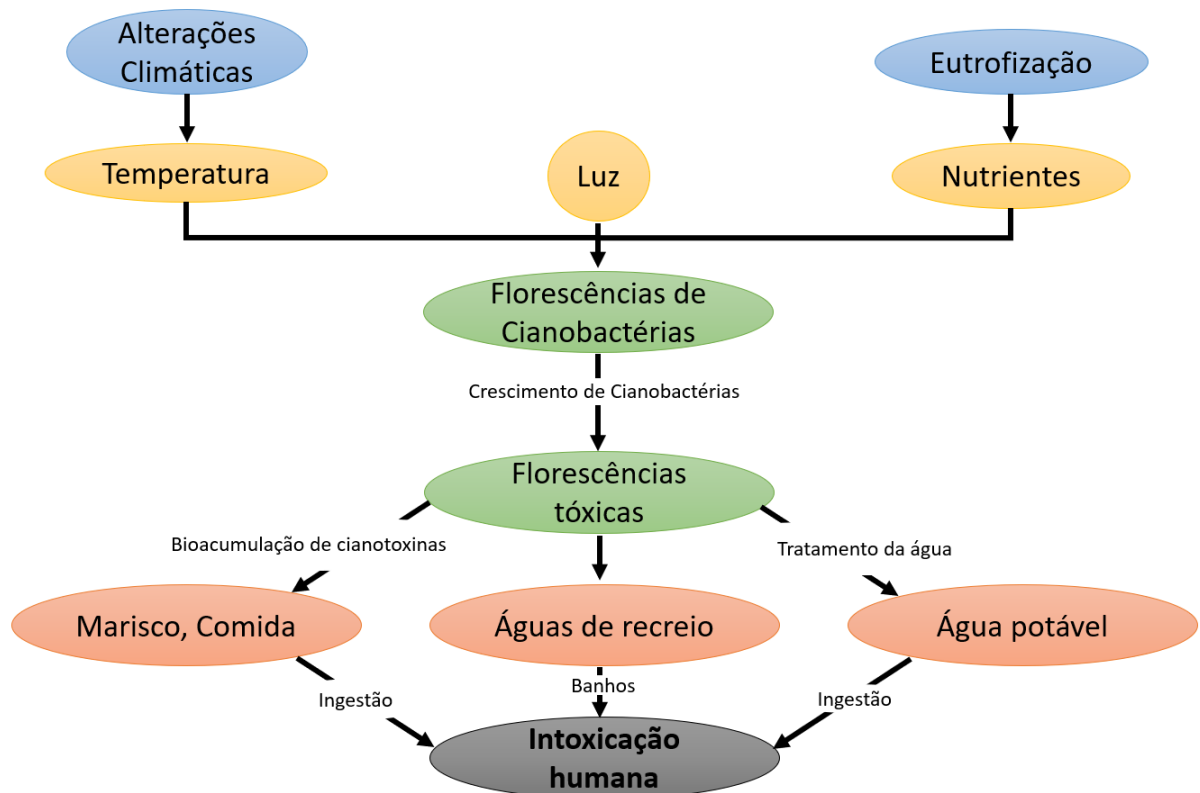


Figura 1.2 - Fatores ambientais que influenciam o aparecimento de *blooms* de cianobactérias e a possível exposição humana a estes (Adaptado de Merel *et al.*, 2013).

Estes *blooms* podem ser tóxicos na medida em que algumas espécies de cianobactérias produzem cianotoxinas, as quais podem causar efeitos negativos e até mortalidade (Figura 1.2). Por isso, para controlar a ocorrência de florescências de cianobactérias, é necessário prevenir o processo de eutrofização e proliferação destas (Pantelić *et al.*, 2013).

As cianobactérias mais comuns presentes nos *blooms* incluem espécies de *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, ou *Oscillatoria* (Chong *et al.*, 2000; Pantelić *et al.*, 2013). Determinados *blooms* são ricos em diversas espécies de cianobactérias das quais, muitas delas, podem produzir um ou mais do que um tipo de cianotoxinas (Pantelić *et al.*, 2013; Drobac *et al.*, 2016), podendo assim causar problemas graves na saúde pública e animal (Chong *et al.*, 2000; Bellém *et al.*, 2013; Valério *et al.*, 2014).

1.2 Cianotoxinas

As cianotoxinas são consideradas na sua maioria metabólitos secundários produzidos pelas cianobactérias. Estas podem ser libertadas na água, principalmente durante a senescência ou lise das cianobactérias. Existe uma grande diversidade de cianotoxinas e estas são classificadas de acordo com a sua estrutura química e toxicidade (Briand *et al.*, 2003). Du *et al.* em 2019 considerou 4 classes de cianotoxinas baseando-se no órgão alvo principal: **hepatotoxinas** (onde se incluem as microcistinas e cilindrospermopsina), **neurotoxinas**, **citotoxinas** e **dermatotoxinas**.

Já outros autores as classificam de acordo com a sua estrutura química em péptidos cíclicos, que é o caso das microcistinas e nodularinas; alcalóides, como neurotoxinas e

cilindrospermopsina (Bellém *et al.*, 2013; Pantelić *et al.*, 2013); lipopéptidos, aminoácidos não proteicos e lipoglicanos (Du *et al.*, 2019).

As cianotoxinas são solúveis em água o que dificulta a redução da sua concentração ou remoção. Posto isto, Pantelić *et al.* descreveu, em 2013, que a remoção das cianotoxinas nos tratamentos de água potável pode ser realizado através de três processos: remoção física, inativação química e inativação biológica. Estes processos devem ser graduais, já que a morte repentina das células de cianobactérias liberta grandes quantidades de cianotoxinas levando a uma maior necessidade de uso de produtos químicos prejudiciais ao ecossistema (Pantelić *et al.*, 2013).

Há registos de morte de gado (Briand *et al.*, 2003; Dreher *et al.*, 2019), animais selvagens e aves aquáticas após o consumo de água contaminada com cianobactérias (Chong *et al.*, 2000). Adicionalmente, existem também relatos de ocorrências de morte de cães na América do Norte após nadarem num rio contaminado (Puschner *et al.*, 2008; Backer *et al.*, 2013).

Estão descritos problemas de saúde associados à ingestão de água com acumulação de cianobactérias, como por exemplo, dor abdominal, vômitos, diarreia, irritação da pele, ataques asmáticos, náuseas, dor de cabeça, tontura, febre, hipoxia, cianose, paralisia e paragem respiratória ou cardíaca, levando à morte (Pantelić *et al.*, 2013). Não há ainda registo de mortes de seres humanos por ingestão de água contaminada, o que se pode justificar por não consumirem água potável com altas densidades celulares tendo, no entanto, sido já relatados sintomas gastrointestinais e dermatológicos em pessoas que entraram em contato com água contaminada (Chong *et al.*, 2000). No entanto, em 1996, foi relatado um caso que aconteceu numa clínica de diálise na cidade de Caruaru, no Brasil, em que morreram 54 doentes por intoxicação com microcistinas após tratamento de hemodiálise em que foi utilizada água contaminada (Jochimsen *et al.*, 1998; Azevedo *et al.*, 2002; Leal *et al.*, 2004).

Estes estão também expostos à possibilidade de consumo de cianotoxinas através de água contaminada, através do consumo de peixes, vegetais e suplementos alimentares (Merel *et al.*, 2013; Buratti *et al.*, 2017). As cianotoxinas já foram encontradas em tecidos de peixe no mundo inteiro levantando preocupações com os efeitos negativos que a sua bioacumulação poderá ter nos animais e nas pessoas que os consumam. É então importante controlar as concentrações de cianotoxinas em locais de crescimento de animais aquáticos para consumo humano (aquacultura) (Pantelić *et al.*, 2013; Drobac *et al.*, 2016). Para além disso, outros estudos relatam que o uso de água de irrigação com *blooms* de cianobactérias pode ser indesejável para a agricultura pois afeta de forma negativa o rendimento, a qualidade e a segurança das culturas (Freitas *et al.*, 2015).

1.2.1 Microcistina-LR

As cianotoxinas mais comuns e ubíquas são as microcistinas, que são hepatotoxinas do grupo dos péptidos cíclicos (Bellém *et al.*, 2013; Menezes *et al.*, 2013; Pantelić *et al.*, 2013). Estas podem-se acumular em organismos aquáticos e serem transmitidas para níveis tróficos superiores, com potencial carcinogenicidade (Codd *et al.*, 2005; Van Apeldoorn *et al.*, 2007; Menezes *et al.*, 2013; Valério *et al.*, 2014). Alguns autores relataram intoxicações também em humanos (Azevedo *et al.*, 2002; Msagati *et al.*, 2006).

Estas cianotoxinas são muito estáveis e resistentes à temperatura, hidrólise química e oxidação. Embora possam ser degradadas por proteases bacterianas, na maioria dos casos estas não estão presentes nos meios aquáticos onde ocorrem, pelo que as microcistinas permanecem intactas na água (Azevedo *et al.*, 2002; Pantelić *et al.*, 2013).

Os seus efeitos em células de organismos eucariotas superiores, como animais e plantas tem sido amplamente estudado, no entanto ainda não se conseguiu uma caracterização completa dos efeitos desta toxina. As microcistinas, após a ingestão, precisam de transporte ativo até às células que é feito por polipéptidos transportadores de aniões orgânicos (OATP's) e são expressos principalmente nas células do fígado (Fischer *et al.*, 2005; Pantelić *et al.*, 2013; Drobac *et al.*, 2016). São responsáveis pela absorção independente de sódio de grandes aniões anfipáticos e atuam como permutadores de aniões orgânicos (Menezes *et al.*, 2013). O envolvimento destes OATP's já foi comprovado em humanos, ratos e peixes (Fischer *et al.*, 2005; Drobac *et al.*, 2016). As microcistinas são portanto intensamente absorvidas e concentradas no fígado devido à elevada presença de transportadores OATP (Azevedo *et al.*, 2002; Fisher *et al.*, 2010; Van der Merwe, 2014). Nas células hepáticas, esta toxina causa desorganização dos microfilamentos e microtúbulos. Pode também induzir nefrotoxicidade porque apesar de ser acumulada no fígado e eliminado pela via biliar, uma pequena percentagem é filtrada nos rins e eliminada na urina tornando, também, por isso os rins num potencial alvo (Menezes *et al.*, 2013). Está já relatado por estudos epidemiológicos que o aumento do hepatocarcinoma humano (Yu, 1995; Ueno *et al.*, 1996) e do cancro colorretal (Zhou *et al.*, 2002) se deve a ingestão de água frequentemente contaminada por microcistinas.

A microcistina-LR (MC-LR) é uma das variantes mais comuns e estudadas (Beasley *et al.*, 2000) por ser a mais tóxica e frequente destas microcistinas (Campos & Vasconcelos, 2010; Menezes *et al.*, 2013; Pantelić *et al.*, 2013; Freitas *et al.*, 2015), sendo que algumas cianobactérias produzem mais do que uma variante de microcistina (Msagati *et al.*, 2006; Bellém *et al.*, 2013). A principal cianobactéria identificada como produtora de MC-LR é a *Microcystis aeruginosa* (Chong *et al.*, 2000; Freitas *et al.*, 2015; Drobac *et al.*, 2016) mas também cianobactérias dos géneros *Planktothrix*, *Nostoc*, *Anabaena* (Pantelić *et al.*, 2013), *Anabaenopsis*, *Hapalosiphon* e *Nodularia* (Valério *et al.*, 2016).

Relativamente à toxicidade, são conhecidos dois mecanismos da MC-LR em animais e plantas superiores, sendo eles: inibição irreversível das fosfatases 1 e 2A que desfosforilam as proteínas nos resíduos serina e treonina (PP1, PP2A) por ligação covalente (Menezes *et al.*, 2013; Pantelić *et al.*, 2013; Freitas *et al.*, 2015), e indução de *stress* oxidativo pela produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) em plantas superiores e leveduras (Valério *et al.*, 2014; Freitas *et al.*, 2015; Mello *et al.*, 2017). Foi já relatado que a inibição da atividade das fosfatases interfere na homeostasia e na estrutura dos hepatócitos o que provoca a uma alteração da organização do tecido hepático, necrose e hemorragia hepática, que em casos graves pode levar à morte dos indivíduos intoxicados (Menezes *et al.*, 2013).

O aminoácido não polar presente na estrutura da microcistina ácido-(2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4, 6-dienóico (ADDA), é um componente relevante na sua toxicidade (Figura 1.3). A clivagem desta cadeia ADDA do péptido cíclico inativa as microcistinas levando à incapacidade de inibir a fosfatase proteica (Pantelić *et al.*, 2013; Mello *et al.*, 2017). Também o ácido D-glutâmico da molécula de MC-LR é importante na hepatotoxicidade (Pantelić *et al.*, 2013).

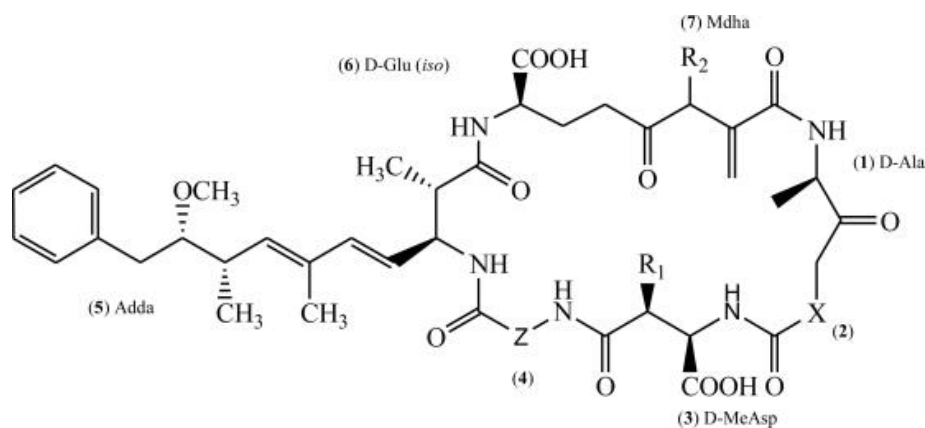


Figura 1.3 - Estrutura da Microcistina (Campos & Vasconcelos, 2010). Na microcistina-LR: ADDA representa o ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4, 6-dienóico, Mdha representa N-metil-dihidro-alanina, D-MeAsp representa ácido D-eritro-metil-aspártico, D-Glu representa D-glutamato, X representa a Leucina (L), Z representa a Arginina (A) e R1 e R2 representam grupos metilo (CH₃).

Também se verificou esta toxina em plantas inibe a germinação, diminui o crescimento e produtividade das culturas, altera o conteúdo de clorofila e a fotossíntese, e induz mudanças nos mecanismos antioxidantes. Foi também observado que, a exposição de algumas espécies de plantas/vegetais a extratos contendo microcistinas resulta em mudanças no conteúdo mineral das raízes de uma forma dependente de concentração e, mais recentemente, que extratos de *blooms* de cianobactérias contendo microcistinas induzem mudanças na assimilação mineral (Freitas *et al.*, 2015).

Diversos estudos recorreram a linhas celulares Vero-E6, células epiteliais renais de macaco verde africano *Cercopithecus aethiops*, para testar os efeitos tóxicos de MC-LR. Menezes *et al.* (2013) provaram que a MC-LR reduz a viabilidade celular dependente da concentração tendo este acontecimento sido associado a fenômenos de apoptose e necrose (Menezes *et al.*, 2013).

O estudo de Valério *et al.* (2014) com *S. cerevisiae* descreve que não houve alteração no crescimento da levedura quando exposta a MC-LR. No entanto, *S. cerevisiae* possui um sistema de eliminação intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) com enzimas específicas do sistema antioxidante. Relativamente a este fenômeno, os autores verificaram que a exposição da levedura à MC-LR ativou as enzimas específicas do sistema antioxidante, sugerindo que a eliminação de ROS permitiu a *S. cerevisiae*, manter o crescimento. Pelo método de citometria de fluxo, Valério *et al.* (2014) confirmaram que MC-LR induziu apoptose e necrose, estando de acordo com os resultados obtidos anteriormente em células de mamíferos (Valério *et al.*, 2014).

Devido à proliferação de cianobactérias tóxicas e a possibilidade de bioacumulação das cianotoxinas, torna-se necessário a existência de programas de controlo de cianobactérias com o intuito de se desenvolver, atempadamente, tratamentos para a água potável (Pantelić *et al.*, 2013). Tendo em conta a sua elevada toxicidade foi, em 1998, estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) a concentração de 1 µg/L (1 nM) como valor limite para a microcistina-LR na água potável (WHO, 2017).

1.2.1 Cilindrospermopsina

A cilindrospermopsina (CYL) é uma cianotoxina alcaloide produzida principalmente por *Cylindrospermopsis raciborskii* (Welker *et al.*, 2002; Freitas *et al.*, 2015), mas também por diversas cianobactérias tais como: *Aphanizomenon ovalisporum*, *Anabaena flos-aquae*, *Raphidiopsis curvata* (Buratti *et al.*, 2017), *Umezakia natans* e *Anabaena bergii* (Valério *et al.*, 2010; Pantelić *et al.*, 2013).

Está descrita como sendo um alcalóide tricíclico (Figura 1.4) (Van Apeldoorn *et al.* 2007; Pantelić *et al.*, 2013; Buratti *et al.*, 2017) e já em 2008, Froscio *et al.*, a categorizou como inibidora da síntese de proteínas (Terao *et al.*, 1994; Valério *et al.*, 2010; Cirés *et al.*, 2011; Freitas *et al.*, 2015) com intensidades similares em extratos celulares de plantas e mamíferos (Freitas *et al.*, 2015). O seu principal alvo é também o fígado (Terao *et al.*, 1994; Runnegar *et al.*, 1995; Froscio *et al.*, 2003), tal como a microcistina, no entanto recorre a mecanismos diferentes (Welker *et al.*, 2002). A CYL é um inibidor da síntese de proteínas, causa stress oxidativo e danos no DNA (Kubickova *et al.*, 2019). Terao *et al.* (1994) também relataram danos nos rins, timo e coração, em ratos. Para além disso, foi também descrito que causa inibição do citocromo P-450, principalmente presente em células hepáticas, provocando fragmentação do DNA, em consequência da genotoxicidade da CYL (Terao *et al.*, 1994; Runnegar *et al.*, 1995; Froscio *et al.*, 2003; Valério *et al.*, 2010; Cirés *et al.*, 2011; Van der Merwe, 2014; Mello *et al.*, 2017). A toxicidade da CYL é atenuada por diferentes inibidores do citocromo P-450, sugerindo que a indução da atividade do P-450 é responsável pela bioativação da CYL (Kubickova *et al.*, 2019).

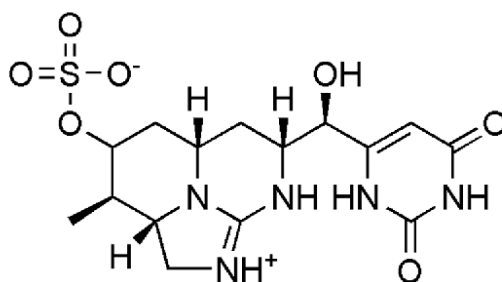


Figura 1.4 - Estrutura da Cilindrospermopsina (Mello *et al.*, 2017).

Esta toxina é ainda resistente à variação de temperatura, ao pH (Pantelić *et al.*, 2013) e à luz (Van Apeldoorn *et al.*, 2007; Pantelić *et al.*, 2013; Van der Merwe, 2014). Durante uma florescência de cianobactérias, a CYL pode ser encontrada tanto na água (extracelular) como no interior das células (intracelular), sendo que a sua maioria é encontrada extracelularmente (Van Apeldoorn *et al.*, 2007).

A sua ocorrência estava principalmente associada a regiões tropicais, mas já foi identificada em França, Alemanha, Brasil, Portugal, Hungria, Áustria, Grécia, Eslováquia, Tailândia, México e Senegal (Van Apeldoorn *et al.*, 2007).

Em 1979, foi descrito um episódio de intoxicação humana associado a *blooms* de *C. raciborskii* num reservatório de abastecimento de água em Queensland (Froscio *et al.*, 2003; Pantelić *et al.*, 2013; Van der Merwe, 2014).

Estudos anteriores sobre os efeitos desta toxina nas plantas indicam que esta atua na redução da germinação de pólen (Van Apeldoorn *et al.*, 2007), na indução de *stress* oxidativo e na inibição do crescimento (Freitas *et al.*, 2015).

1.3 *Saccharomyces cerevisiae*

O género *Saccharomyces* pertence ao Reino Fungi e ao Filo *Ascomycota*. Caracteriza-se por leveduras fermentadoras de açúcares (C₆). A sua reprodução pode ser assexuada, por gemulação, ou sexuada através da diferenciação de ascósporos contidos em ascos (Figura 1.5). A sua parede celular é constituída por β -glucanos, manoproteínas e quitina (Fleuri e Sato, 2008a).

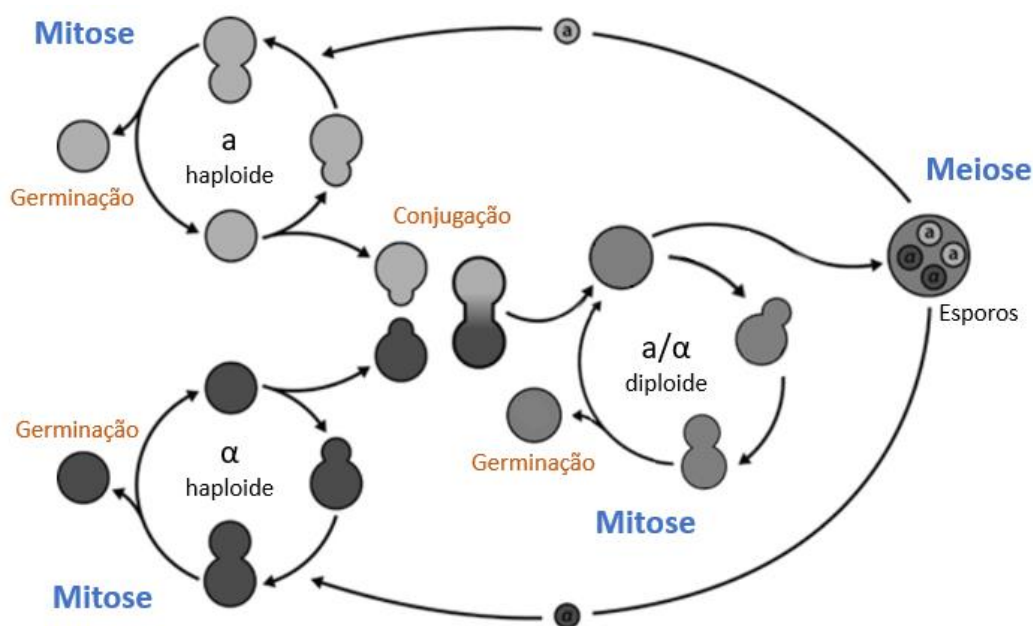


Figura 1.5 - Ciclo de vida de *Saccharomyces cerevisiae* (Adaptado de Rescan, 2017).

Saccharomyces cerevisiae (Figura 1.6) é uma levedura muitas vezes escolhida para pesquisas com o objetivo de investigar processos básicos importantes para os seres vivos (Menacho-Márquez e Murguía, 2007). Menacho-Márquez e Murguía (2007) referenciaram as semelhanças entre o genoma da *S. cerevisiae* e o do Homem. Segundo estes autores, estas correspondências ocorrem em 31% das proteínas codificadas no genoma da levedura, tendo assim um ortólogo humano e, ainda, 50% dos genes que codificam para doenças humanas possuem ortólogos na levedura. É um dos organismos eucarióticos mais simples, sendo, por isso, considerado como organismo eucariótico modelo, tendo já o seu genoma bem estudado. Por estes motivos, esta levedura tornou-se um bom modelo eucariota. Usar *S. cerevisiae* em estudos tem variadas vantagens, entre as quais se destacam: expressão de proteínas de qualquer origem, indução de expressão génica, manipulação de níveis de RNA e recombinação homóloga de fragmentos de DNA (Menacho-Márquez e Murguía, 2007). Esta levedura tem particular interesse no nosso estudo porque já foi anteriormente usada em investigações de toxicidade da Microcistina-LR (MC-LR) (Valério *et al.*, 2014). O seu tempo de duplicação é de 90 min e é estável quer na forma haploide quer na forma diploide, ou seja, não sofrem muitas mutações espontâneas (Menacho-Márquez e Murguía, 2007).

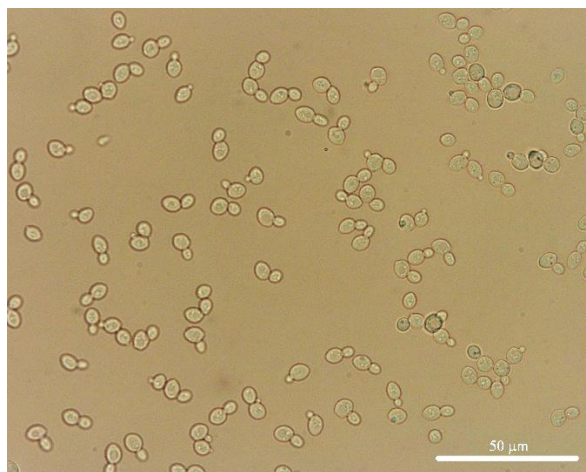


Figura 1.6 - Leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* VL3 em suspensão celular (Ampliação 400x, Sara Rodrigues).

1.4 Ensaios de Viabilidade

1.4.1 Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)

Ensaios de viabilidade celular são muito usados para procurar moléculas com efeitos na proliferação celular ou efeitos tóxicos que possam levar à morte celular. Por isso, para avaliar os efeitos citotóxicos decidimos usar um ensaio de viabilidade celular que determina a capacidade funcional das mitocôndrias (Stockert *et al.*, 2012) após exposição das leveduras a diferentes concentrações de cianotoxinas: o ensaio colorimétrico de Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Chong *et al.*, 2000; Van Meerloo *et al.*, 2011).

No método do MTT ocorre a redução de sais de tetrazólio (que têm cor amarela) por células metabolicamente ativas, o que leva à precipitação de formazano (cor púrpura) no interior das células (Figura 1.7). Estes sais podem ser solubilizados com DMSO ou propanol, para que seja medida a absorvância correspondente, permitindo assim quantificar a viabilidade das células testadas, uma vez que as células mortas não conseguem fazer essa conversão (Bernas *et al.*, 2002; Van Meerloo *et al.*, 2011). A taxa de redução de tetrazólio é proporcional à taxa de proliferação (Téparic *et al.*, 2004). Os valores das absorvâncias dependem da concentração do reagente MTT, do tempo de incubação, do número de células viáveis e da sua atividade metabólica (Van Meerloo *et al.*, 2011).

O composto roxo formado é um precipitado insolúvel intracelular que se acumula em redor da parede celular embora também se encontre no meio de cultura. Por este motivo, é necessário que se solubilize para que seja medida a absorvância correspondente.

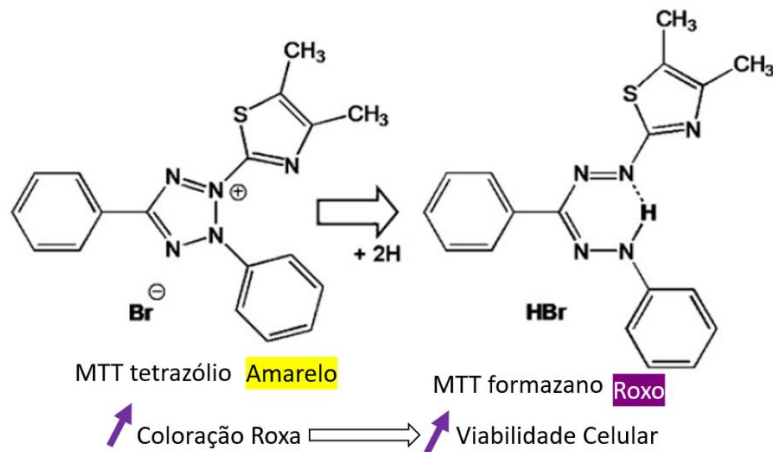


Figura 1.7 - Princípio do ensaio de MTT (Adaptado de Stockert *et al.*, 2012)

Geralmente, a atividade mitocondrial na maioria das células viáveis é constante e, por isso, o aumento ou diminuição no número destas células está linearmente relacionado com a atividade mitocondrial (Van Meerloo *et al.*, 2011). A redução do MTT indica uma atividade de oxidação-redução. Esta reação surge normalmente associada às enzimas mitocondriais, mas as conclusões de Bernas *et al.* (2002) indicam que a maioria do MTT é reduzida noutros locais como citoplasma e regiões das membranas plasmáticas (Bernas *et al.*, 2002).

O ensaio MTT em leveduras ainda não está bem estudado. Téparic *et al.* (2004) e Kirtuthika & Padma (2013) usaram o MTT em *Saccharomyces cerevisiae*, no entanto a metodologia utilizada difere da usada neste estudo pelo que não temos uma base de comparação. Estudos anteriores desenvolvidos por Barreiros *et al.*, 2017, no Instituto Ricardo Jorge, com a mesma metodologia mas usando extratos celulares purificados de microcistina, não revelaram efeitos citotóxicos de MC-LR em *S. cerevisiae*.

1.4.2 Azul Tripano (AT)

Para além do ensaio MTT, usou-se também o ensaio de coloração com Azul Tripano que é usado para determinar o número de células viáveis presentes numa suspensão. O princípio deste teste consiste no facto das células viáveis possuírem membranas celulares intactas que excluem determinados corantes ao contrário das células mortas. O corante é simplesmente misturado com a suspensão e esta é observada ao microscópio ótico para contagem das células que retêm o corante - células não viáveis, e das células que o excluem - células viáveis (Figura 1.8). A contagem celular é feita usando uma câmara de Neubauer (Strober, 2015).

Até ao momento não existem estudos que tenham usado o ensaio de coloração com AT para avaliar a citotoxicidade em *Saccharomyces cerevisiae*.

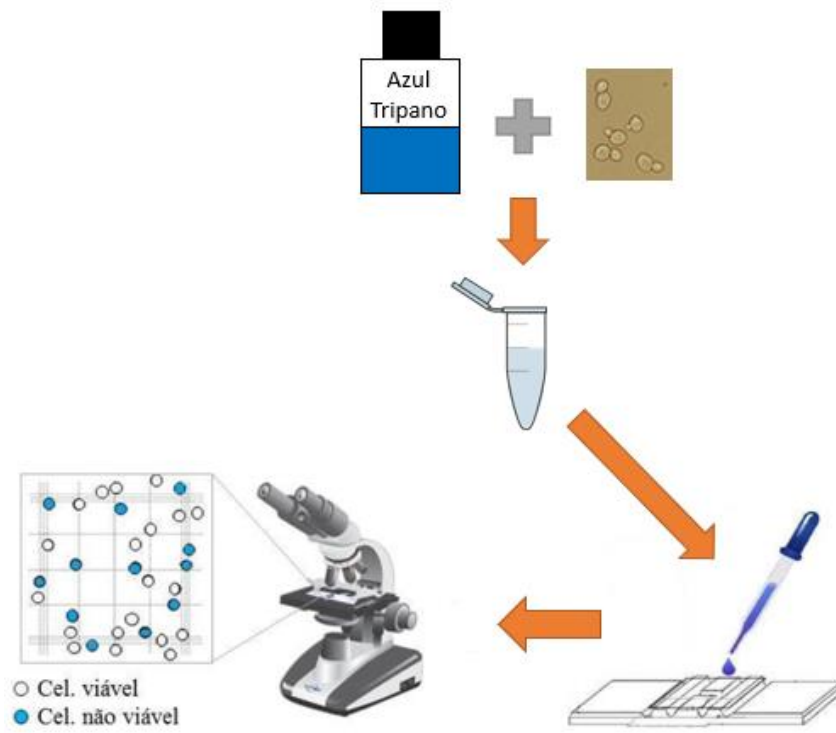


Figura 1.8 - Teste de Exclusão de Azul Tripano (Adaptado de <http://docplayer.com.br/58313012-Helaine-mirelli-de-almeida.html>)

Objetivos

As florescências (*blooms*) de cianobactérias têm-se tornado mais frequentes e, conseqüentemente, a exposição do Homem às toxinas que possam estar também presentes, tem sido um fator de preocupação. Apesar disso, a OMS ainda só estabeleceu valor guia para a Microcistina na água. A concentração desta cianotoxinas na água de consumo tem por isso vindo a ser vigiada, pelo que há um menor risco de exposição aguda, mas não de exposição crónica. Em relação à Cilindropermopsina, não há valor guia estabelecido, pelo que não existe um controlo da sua ocorrência e concentrações nas massas de água.

Este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos da exposição a baixas concentrações de MC-LR e CYL usando *Saccharomyces cerevisiae* como sistema modelo. Os objetivos específicos são:

1. Avaliar a viabilidade das células de *S. cerevisiae* expostas a diferentes concentrações de MC-LR;
2. Avaliar a viabilidade das células de *S. cerevisiae* expostas a diferentes concentrações de CYL;
3. Comparar os efeitos citotóxicos com as duas cianotoxinas no organismo modelo em estudo.

2. Materiais e Métodos

2.1 Estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* e condições de crescimento

Devido ao facto de ser um organismo unicelular, eucariótico e de fácil manipulação, *Saccharomyces cerevisiae*, também conhecida como levedura de padreiro, foi o organismo usado nos nossos ensaios de citotoxicidade. Usámos as estirpes VL3, disponibilizada comercialmente sob a forma liofilizada pela Zymaflore®, e VR5 também disponibilizada comercialmente sob a forma liofilizada pela Fermicru®, normalmente usadas para fabrico de vinho.

Para obter células viáveis em suspensão, colocaram-se alguns grãos das culturas liofilizadas de *S. cerevisiae* de cada uma das estirpes estudadas em 1 mL de água desionizada esterilizada (num *ependorf* de 1,5 mL). Colocou-se 50 µL dessa suspensão em meio sólido de Extrato de Levedura (1%), Peptona (2%), Dextrose (2%) e Ágar (2%) (YPD), usando a técnica do espalhamento com ansa (Figura 2.1). As culturas foram incubadas à temperatura ambiente e depois foram armazenadas no frigorífico a 4°C. Repetiu-se este procedimento a cada quatro semanas para evitar usar culturas envelhecidas para a preparação dos pré-inóculos.

Todos os processos que envolveram a manipulação de culturas e meios de crescimento foram realizados em câmara de fluxo laminar (*Hera Safe*®) por forma a manter as condições de assépsia.

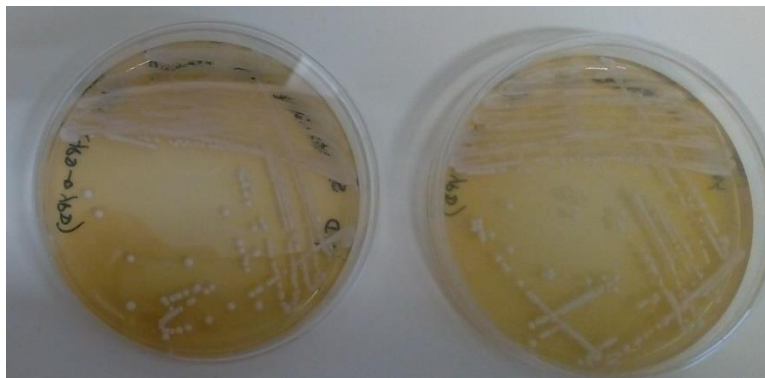


Figura 2.1 - *S. cerevisiae* (VR5 e VL3, respetivamente) em meio YPD sólido.

2.1.1 Pré-inóculos

A partir da cultura em meio sólido, ressuspendeu-se uma colónia de levedura em 20 mL de meio YPD líquido num frasco de cultura de 100 mL (Duran®). O pré-inóculo foi deixado a crescer durante a noite em estufa (FitoClima s600 Aralab®) a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ em agitação a 350 rpm (em agitador IKA Labortechnik®).

2.2 Controlos usados

No dia seguinte, inoculou-se uma placa de 24 poços (Starstedt®) com 1 mL de suspensão em cada poço com densidade ótica (600 nm) ajustada de 0,05, correspondendo aproximadamente a 5×10^5 células/mL (Sherman, F. (1991) *Methods Enzymol.* 194, 3-21; Pangloss). As culturas cresceram durante quatro horas em estufa (FitoClima s600 Aralab®) a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, com agitação a 350 rpm (IKA Labortechnik®). Após as quatro horas, mediu-se a densidade ótica final.

Foram escolhidas às 4 h porque foi neste ponto do crescimento de *S. cerevisiae* que Valério *et al.* (2014) perceberam que as culturas começaram a recuperar atingindo aproximadamente a mesma densidade ótica do controlo, ou mesmo superando-o no final da experiência (Figura 2.2), pelo que pretendíamos ter as células na transição para a fase exponencial.

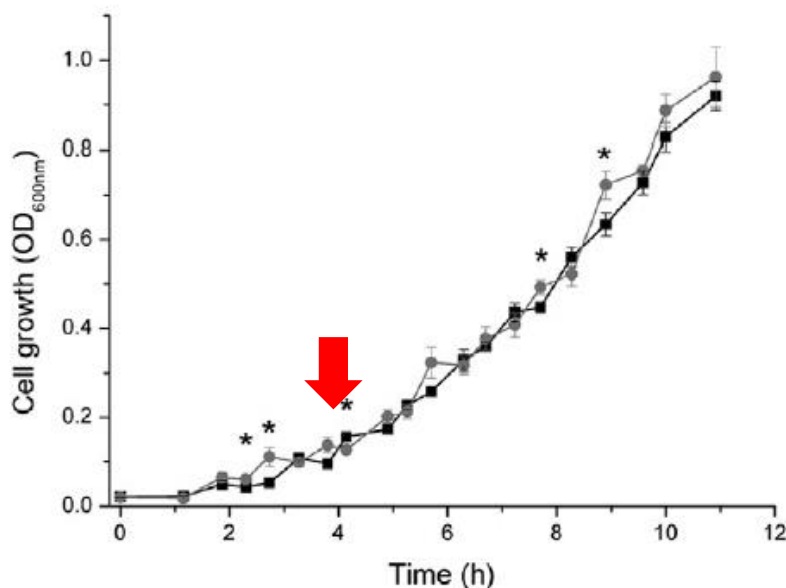


Figura 2.2 - Curva de crescimento de *S. cerevisiae* VL3 na presença de 1 nM de MC-LR pura (círculos cinzentos) comparada ao controlo negativo (quadrados pretos). * indica os pontos em que foram obtidas diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controlo (Adaptado de Valério *et al.*, 2014).

Definição dos controlos: consideramos como controlo negativo as células com viabilidade celular a 100% e como controlo positivo, o fator de stress, isto é, o parâmetro que nos mostra o efeito citotóxico pela perda de viabilidade celular.

Testaram-se dois controlos positivos com base nos resultados obtidos em estudos anteriores desenvolvidos pelo laboratório (Valério *et al.*, 2014; Barreiros *et al.*, 2017), o Peróxido de Hidrogénio (H_2O_2) (Sigma-Aldrich®) e o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) (Invitrogen®), numa concentração final de 50 mM e 5%, respetivamente. O H_2O_2 (agente oxidante) induz produção de ROS e o SDS (detergente) atua na lise celular.

Devido aos diferentes níveis de toxicidade quando adicionados a *S. cerevisiae*, cada um dos controlos teve um tempo específico de exposição, 30 minutos para o H_2O_2 e uma hora para o SDS. Passado o tempo de exposição, transferiu-se 1 mL de cada poço para *ependorfs* de 1,5 mL e centrifugou-se por 2 minutos a 9000 rpm (Eppendorf 5415C Centrifuge®). Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 500 μ L de tampão fosfato-salino (PBS) e voltou-se a centrifugar. Descartou-se novamente o sobrenadante e ressuspendeu-se em 100 μ L de PBS e colocou-se em gelo.

2.3 Toxinas testadas

Optou-se por testar toxinas puras ao invés de extratos purificados, também usados anteriormente em estudos deste laboratório (Barreiros *et al.*, 2017), de forma a poder atribuir os efeitos exclusivamente à toxina e não a outro qualquer composto que possa estar presente no extrato. Para tal, as toxinas usadas estão disponibilizadas comercialmente nos Kits da Abraxis®: Microcystins-ADDA ELISA e Cylindrospermopsin ELISA. Os kits vêm preparados com diferentes padrões, no caso da Microcistina: Padrão 0 ppb, Padrão 0,15 ppb, Padrão 0,40 ppb, Padrão 1,0 ppb, Padrão 2,0 ppb e Padrão 5,0 ppb, e no caso da Cilindrospermopsina: Padrão 0 ppb, Padrão 0,05 ppb, Padrão 0,10 ppb, Padrão 0,25 ppb, Padrão 0,50 ppb, Padrão 1,0 ppb e Padrão 2,0 ppb. O kit serve para deteção quantitativa da microcistina ou cilindrospermopsina, respetivamente.

Para os ensaios com as toxinas, usaram-se pré-inóculos de *Saccharomyces cerevisiae* como descrito no ponto 2.1.1. No dia do ensaio, inoculou-se uma placa de 24 poços (Starstedt®), onde em cada poço foi adicionada a suspensão celular com densidade ótica final (600 nm) de 0,05, e o volume necessário de toxina para a concentração final pretendida, de forma a obter um volume final de 1 mL por poço.

Testaram-se diferentes concentrações a partir de diferentes padrões de MC-LR: Padrão 0; 0,2 nM; 0,4 nM e 1 nM, mas com o mesmo volume inicial (200 µL). Para a CYL, também se testaram diferentes concentrações a partir de diferentes padrões de Cilindrospermopsina: Padrão 0; 0,1 nM; 0,2 nM e 0,4 nM usando sempre o mesmo volume inicial (200 µL).

As placas foram incubadas em estufa (FitoClima s600 Aralab®) a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ com 350 rpm de agitação (IKA Labortechnik®) durante 4 h. Passadas as 4 h, foi medida a densidade ótica final num dos poços. Passou-se 1 mL de cada poço para *ependorfs* de 1,5 mL e centrifugou-se por 2 minutos a 9000 rpm (Eppendorf 5415C Centrifuge®). Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 500 µL de PBS e voltou-se a centrifugar. Descartou-se novamente o sobrenadante e ressuspendeu-se em 100 µL de PBS e colocou-se em gelo.

2.4 Ensaios com liticase

No caso da Microcistina-LR, fizeram-se ainda testes com a liticase antes da realização dos ensaios com MTT. Utilizou-se o volume de 1 µL de liticase (~2U) (Sigma a 1 mg/mL), simultaneamente com a adição de MC-LR aos poços com a suspensão celular numa placa de 24 poços (Starstedt®), para um volume final de 1 mL.

A partir deste ponto, foi seguido o mesmo protocolo de centrifugações e lavagens já descrito para os controlos no ponto 2.2 e para as toxinas no ponto 2.3. Ressuspendeu-se o *pellet* em 100 µL de PBS e colocou-se em gelo.

2.5 Ensaios com Azul Tripano

O ensaio de coloração com azul tripano é usado para determinar o número de células viáveis presentes numa suspensão celular. O corante é simplesmente misturado com a suspensão e esta é observada em microscópio ótico para contagem das células que retêm o corante, células não viáveis (azuis), e das células que o excluem, células viáveis (sem coloração) (Figura 2.3).

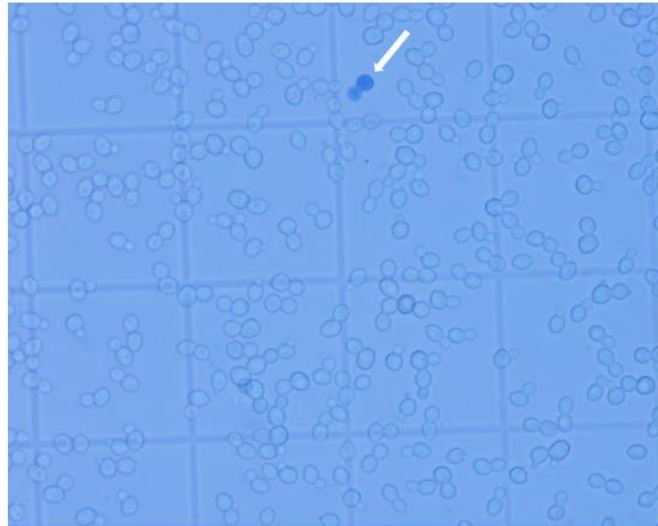


Figura 2.3 - Células viáveis (sem coloração) e células não viáveis (azuis – seta branca) (Ampliação 400x, Sara Rodrigues)

Para contagem ao microscópio, colocou-se 50 μL da suspensão de células em PBS num novo *ependorf* e adicionou-se 50 μL de corante azul tripano, de forma a obter uma diluição de 1:2. A observação e contagem foi feita com câmara de Neubauer. Contaram-se 16 quadrados pequenos (Figura 2.4) num total de 200-300 células para cada condição testada. A percentagem de células viáveis foi obtida dividindo o número de células viáveis pelo número total de células contadas e multiplicando por 100.

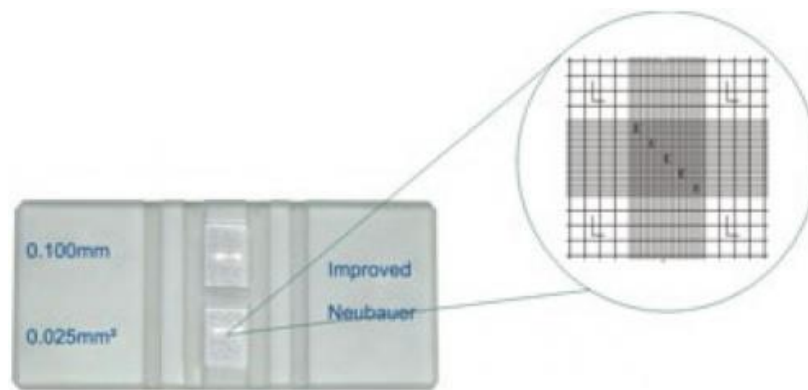


Figura 2.4 - Câmara de Neubauer (<https://www.labhouse.com.br/camara-de-neubauer-dupla-espelhada>).

2.6 Ensaio de MTT

Para avaliar a citotoxicidade das cianotoxinas, usou-se o ensaio de viabilidade celular MTT¹. Este composto foi diluído em tampão fosfato-salino (PBS) para obter uma concentração final de 0,5 mg/mL. Este é imediatamente guardado no escuro pois é fotossensível (Van Meerloo *et al.*, 2011).

¹ NOTA: O MTT é um reagente tóxico (Van Meerloo *et al.*, 2011).

Após as lavagens, adicionou-se 100 μL de reagente MTT a cada amostra ressuspensa em 100 μL de PBS e incubou-se em estufa (FitoClima s600 Aralab®) com 350 rpm de agitação (IKA Labortechnik®), a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 2 horas no escuro.

Passadas as duas horas, centrifugaram-se as amostras dois minutos a 9000 rpm (Eppendorf 5415C Centrifuge®). Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se a *pellet* em 300 μL de Dimetilsulfóxido (DMSO) (ThermoFisher®), para dissolver os cristais de formazano, e colocou-se 100 μL de cada amostra numa placa de 96 poços (Starstedt®), num total de três réplicas. Deixou-se a placa no escuro, porque o reagente é fotossensível, à temperatura ambiente durante 15 minutos (Figura 2.5).

Por fim, fez-se as leituras das absorvâncias num leitor de placas (ThermoFisher Labsystems®) a 570 nm com filtro de referência a 690 nm, para fazer a correção reduzindo o *background* (Van Merloo *et al.*, 2011).

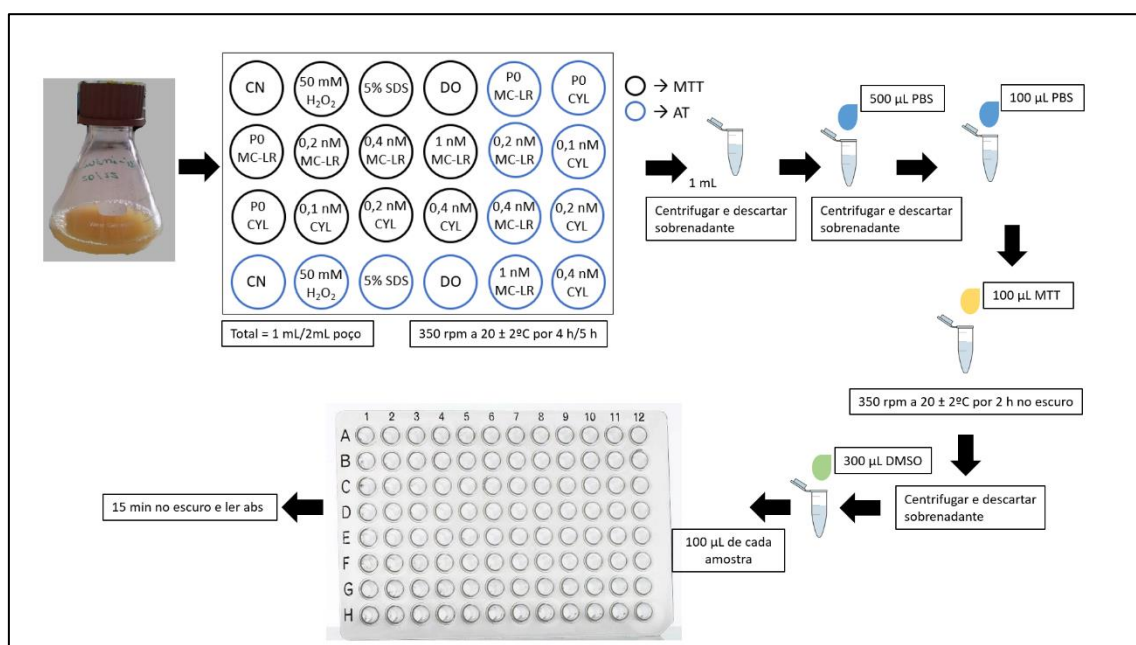


Figura 2.5 – Procedimento com o ensaio MTT em *Saccharomyces cerevisiae*.

3. Resultados

3.1 Controlos

Neste estudo usaram-se dois métodos para avaliar a citotoxicidade de cianotoxinas em *Saccharomyces cerevisiae*: o ensaio com azul tripano e o ensaio MTT. Para verificar que os métodos estavam a funcionar corretamente usaram-se dois controlos positivos: o Peróxido de Hidrogénio (H₂O₂) e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). Para o H₂O₂ usou-se a concentração de 50 mM com um tempo de exposição de 30 min e para o SDS usou-se a concentração de 5% com um tempo de exposição de 1h (Barreiros *et al.*, 2017).

Aplicou-se o Teste-t de Student a todas as condições testadas. Este teste permite avaliar se existem diferenças significativas entre as médias de duas amostras, neste caso bicaudal. Nos resultados deste estudo, obtiveram-se valores de *p* muito próximos de 0,5, o que mostra não haver uma relação concentração-resposta.

Nos ensaios com o AT, começou-se por testar dois tempos distintos de incubação de *S. cerevisiae* VL3, 4 h e 5 h, após inoculação da placa de 24 poços a 20 ± 2°C, e também dois volumes diferentes para cada controlo, 1 mL e 2 mL. Foram escolhidos estes parâmetros para definir a melhor condição para desenvolver os restantes testes.

O gráfico da Figura 3.1 representa os resultados com o ensaio AT para os controlos testados. Verifica-se que os diferentes tempos de incubação e os dois volumes testados não afetam significativamente a viabilidade celular da estirpe de *S. cerevisiae* avaliada quando comparados com o controlo negativo (CN) e não existem diferenças significativas entre cada um dos parâmetros (*p* > 0,05).

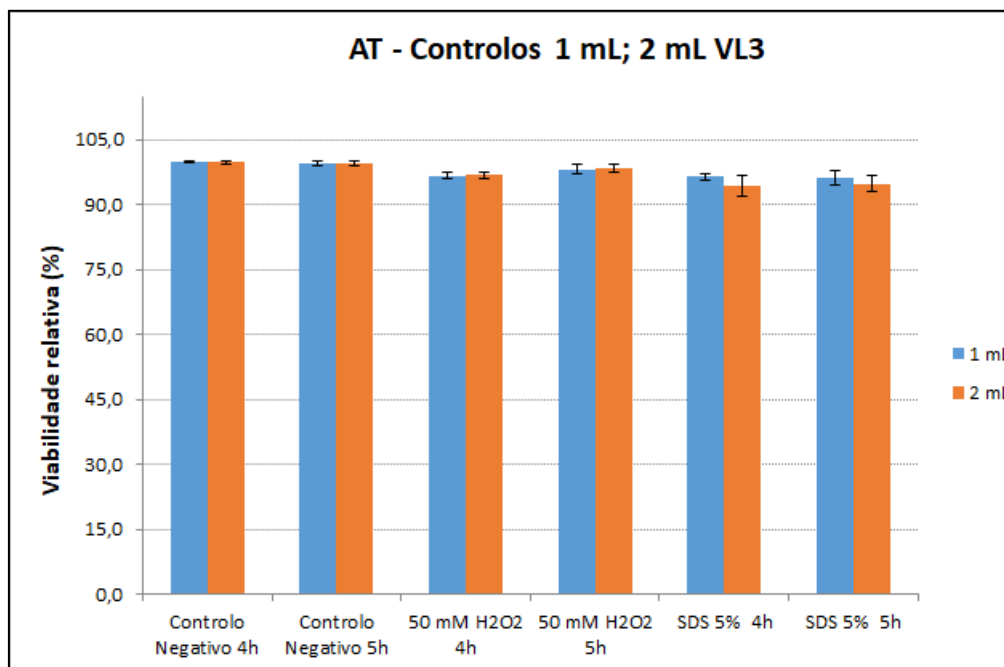


Figura 3.1 - Viabilidade celular de *S. cerevisiae* VL3 com o método Azul Tripa, após inoculação da placa durante 4h ou 5h para dois volumes diferentes - 1 mL e 2 mL, expostos a diferentes fatores de stress. Os dados apresentados mostram a média e as respetivas barras de erro representam o desvio padrão de três amostras independentes (n=3) (*p* > 0,05; Teste-t).

No gráfico da Figura 3.2, apresentam-se os resultados obtidos para os controlos com o ensaio de MTT. Torna-se evidente pelos resultados apresentados que os dois controlos positivos testados afetam significativamente ($p \leq 0,05$) a viabilidade celular da estirpe de *S. cerevisiae* avaliada, comparados com o controlo negativo. Relativamente ao H_2O_2 , é evidente uma diminuição na viabilidade celular de cerca de 59,5% para o volume de 1 mL e de aproximadamente 55,9% para o volume de 2 mL. Em relação ao SDS, vemos uma diminuição de 89,2% na viabilidade celular para 1 mL e de 84,9% para 2 mL. De acordo com os resultados obtidos, não se observaram diferenças significativas entre os volumes de 1 mL e 2 mL ($p > 0,05$).

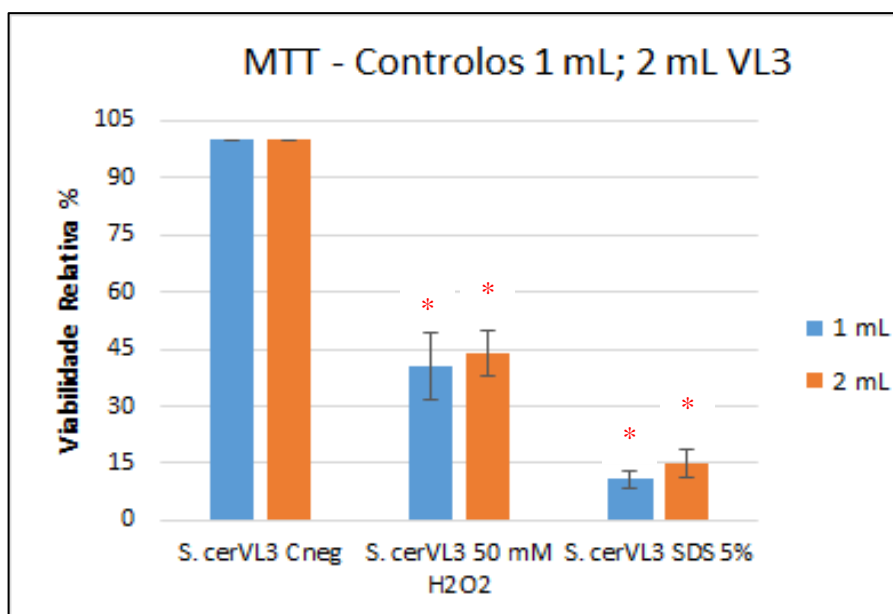


Figura 3.2 - Viabilidade celular de *S. cerevisiae* VL3 com ensaio MTT, após exposição a diferentes fatores de stress, durante 4 h. Os dados apresentados mostram a média e as respetivas barras de erro representam o desvio padrão de três amostras independentes (n=3). Asterisco (*) indica uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ($p \leq 0,05$; Teste-t).

Para o ensaio com MTT, foi testada também a estirpe *S. cerevisiae* VR5 sob as mesmas condições de ensaio da estirpe *S. cerevisiae* VL3, mas usando apenas o volume de 1 mL e incubação de 4 h.

Os dois controlos positivos testados afetam significativamente a viabilidade celular de *S. cerevisiae* VR5, quando comparados com o controlo negativo ($p \leq 0,05$). verifica-se ainda, uma diminuição na viabilidade celular de cerca de 59% para o H_2O_2 e uma perda de 90% para o SDS (Figura 3.3).

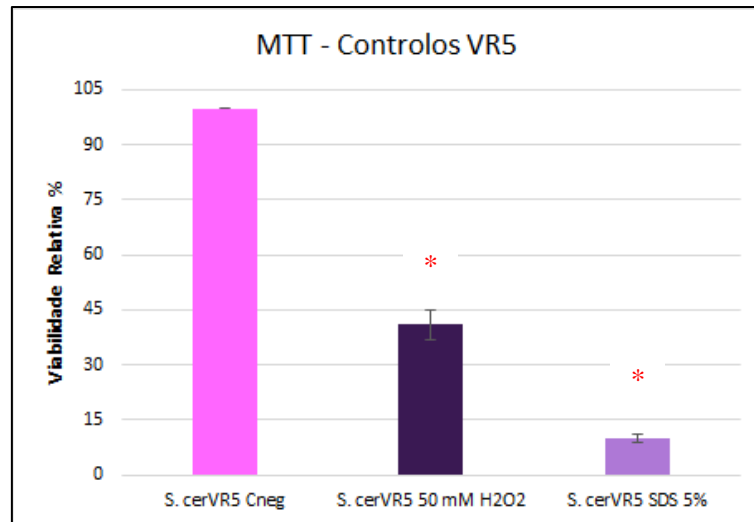


Figura 3.3 - Viabilidade celular de *S. cerevisiae* VR5 com o ensaio MTT, após exposição aos dois fatores de stress, durante 4 h. Os dados apresentados mostram a média e as respetivas barras de erro representam o desvio padrão de três amostras independentes (n=3). Asterisco (*) indica uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ($p \leq 0,05$; Teste-t).

Tendo em conta os resultados obtidos em todos os parâmetros testados em ambos os ensaios e a diferença na densidade ótica, optou-se por usar apenas o tempo de incubação de 4 h e o volume de 1 mL, tendo em conta que estas medidas são onde se reflete um maior crescimento celular e também a maior perda de viabilidade celular, como condições ótimas para desenvolver todos os ensaios restantes, em três réplicas biológicas.

3.2 Toxinas

Tendo confirmado que o ensaio com o AT funciona corretamente na levedura *S. cerevisiae* VL3, testou-se o ensaio nas células expostas às toxinas Microcistina-LR e Cilindrospormopsina. As células estiveram expostas durante 4 h a diferentes concentrações finais de MC-LR: Padrão 0 (CN); 0,2 nM; 0,4 nM e 1 nM e de CYL: Padrão 0 (CN); 0,1 nM; 0,2 nM e 0,4 nM.

Os resultados das toxinas são comparados ao Padrão 0, tendo este sido usado como controlo negativo. A escolha do Padrão 0 como controlo negativo compreende-se com o facto de os ensaios iniciais deste estudo revelarem perdas de viabilidade celular das culturas incubadas com o Padrão 0 em relação ao controlo negativo habitualmente usado (YPD + suspensão de leveduras) (dados não mostrados). Portanto, estes resultados não expetáveis à partida, podem ser consequência da composição do eluente em que se encontram dissolvidas as toxinas.

Podemos comprovar que todas as concentrações de MC-LR (Figura 3.4) aumentaram ligeiramente a viabilidade celular ($p > 0,05$), sendo que a 0,2 nM aumentou cerca de 3%, a 0,4 nM aumentou cerca de 2% e a 1 nM aumentou cerca de 4%, em relação ao Padrão 0, o que vai contra os resultados esperados.

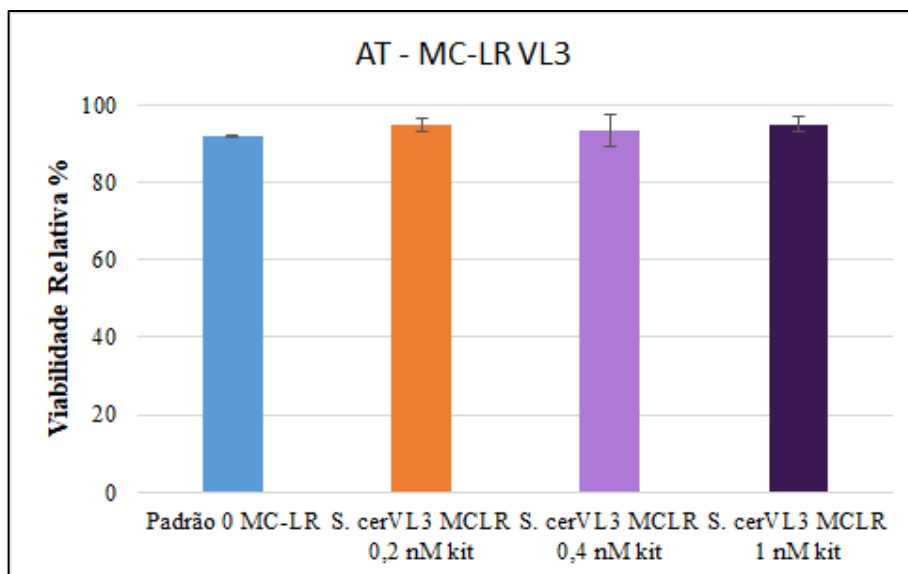


Figura 3.4 - Viabilidade celular de *S. cerevisiae* VL3 com ensaio AT, após exposição a MC-LR durante 4 h. Os dados apresentados mostram a média e as respectivas barras de erro representam o desvio padrão de três amostras independentes (n=3) ($p > 0,05$; Teste-t).

Tendo em conta os resultados não significativos obtidos com MC-LR, testou-se a CYL, uma vez que está descrito que é citotóxica para células de mamíferos, podendo assim servir também como um controlo positivo com os métodos usados neste trabalho. Na Figura 3.5, podemos observar que as concentrações de CYL de 0,1 nM e 0,4 nM aumentaram também ligeiramente, de forma não significativa ($p > 0,05$), a viabilidade celular em cerca de 4% enquanto que a concentração de 0,2 nM diminuiu a viabilidade celular em cerca de 3%, em comparação com o Padrão 0.

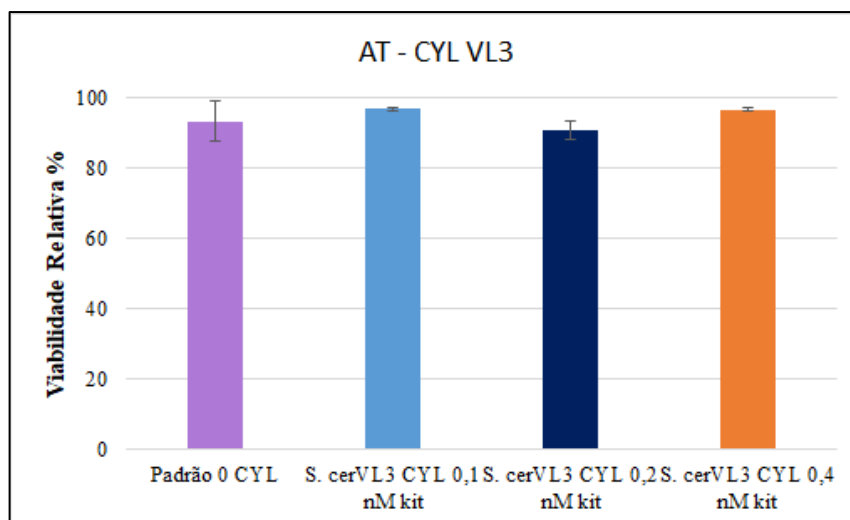


Figura 3.5 - Viabilidade celular de *S. cerevisiae* VL3 com ensaio AT, após exposição a CYL durante 4 h. Os dados apresentados mostram a média e as respectivas barras de erro representam o desvio padrão de três amostras independentes (n=3) ($p > 0,05$; Teste-t).

Em relação aos ensaios com MTT, aplicou-se também o ensaio a células expostas a MC-LR e CYL, recorrendo a duas estirpes de *S. cerevisiae*, VL3 e VR5. Os ensaios decorreram sob as mesmas condições dos ensaios com AT, 4 h de incubação e volume de 1 mL com as diferentes concentrações de MC-LR (0,2 nM; 0,4 nM e 1 nM) e CYL (0,1 nM; 0,2 nM, 0,4 nM).

Pode-se observar na Figura 3.6, que as concentrações de 0,2 nM e 1 nM aumentaram a viabilidade celular, sendo que a 0,2 nM aumentou cerca de 0,2% e a 1 nM aumentou cerca de 8,3%, em relação ao Padrão 0. Relativamente à concentração de 0,4 nM, verifica-se que esta foi a única que diminuiu ligeiramente a viabilidade celular em relação ao padrão ($p > 0,05$), em cerca de 3,8% .

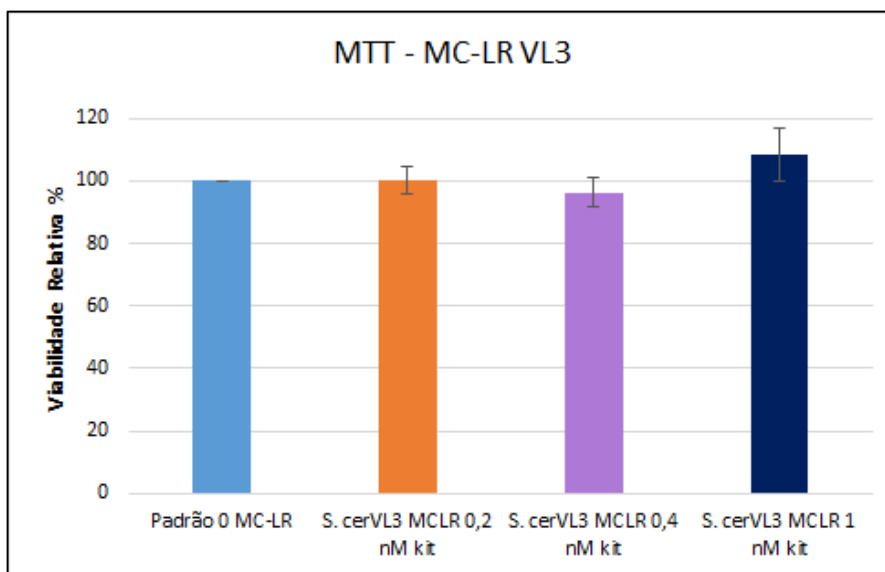


Figura 3.6 - Viabilidade celular de *S. cerevisiae* VL3 com ensaio MTT, após exposição a MC-LR durante 4 h. Os dados apresentados mostram a média e as respectivas barras de erro representam o desvio padrão de três amostras independentes (n=3) ($p > 0,05$; Teste-t).

Na Figura 3.7, estão representadas as viabilidades celulares da estirpe VR5 exposta a MC-LR. As concentrações de 0,2 nM e 0,4 nM aumentaram a viabilidade celular em cerca de 7,3% e 15,3, respetivamente. Pelo contrário, a concentração de 1 nM diminuiu ligeiramente a viabilidade celular em cerca de 3,3%, em relação ao Padrão 0 ($p > 0,05$).

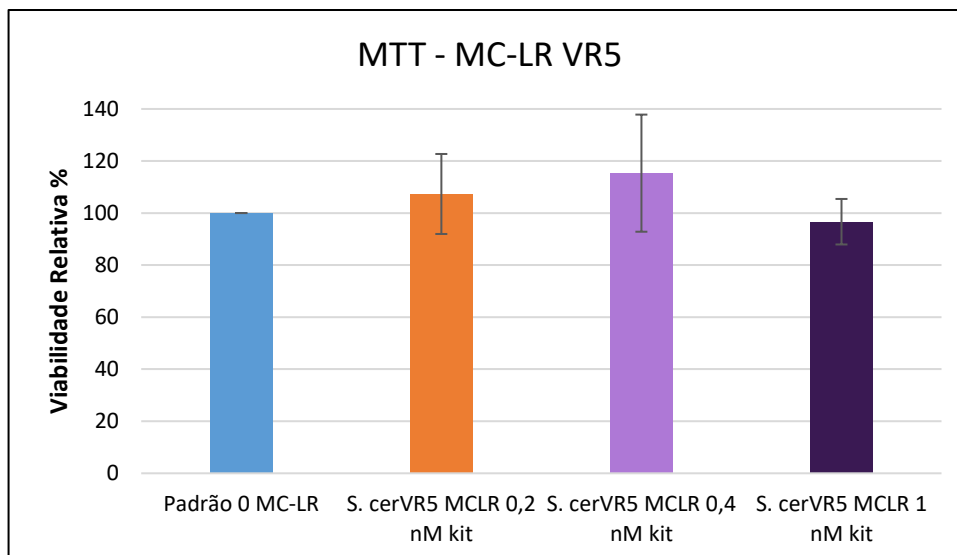


Figura 3.7 - Viabilidade celular de *S. cerevisiae* VR5 com ensaio MTT, após exposição a MC-LR durante 4 h. Os dados apresentados mostram a média e as respectivas barras de erro representam o desvio padrão de três amostras independentes (n=3) ($p > 0,05$; Teste-t).

No que respeita aos resultados com a levedura exposta à CYL, pode-se concluir que, a estirpe VL3 (Figura 3.8), para a concentração de 0,4 nM, não há diferenças em relação ao padrão, a sua viabilidade celular é 100%. As concentrações de 0,1 nM e 0,2 nM aumentaram a viabilidade celular em cerca de 14,5% e 7,5%, respetivamente, em relação ao Padrão 0 ($p > 0,05$).

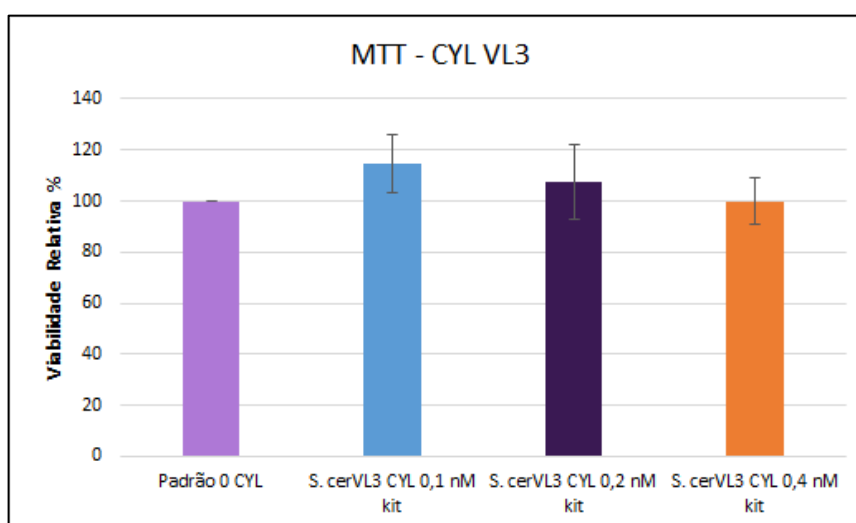


Figura 3.8 - Viabilidade celular de *S. cerevisiae* VL3 com ensaio MTT, após exposição a CYL durante 4 h. Os dados apresentados mostram a média e as respectivas barras de erro representam o desvio padrão de três amostras independentes (n=3) ($p > 0,05$; Teste-t).

Relativamente à estirpe VR5 pode ver-se na Figura 3.9, que todas as concentrações aumentaram a viabilidade celular, sendo que a 0,1 nM aumentou cerca de 12%, a 0,2 nM aumentou cerca de 2% e a 0,4 nM aumentou cerca de 2,3%, em relação ao Padrão 0, ($p > 0,05$).

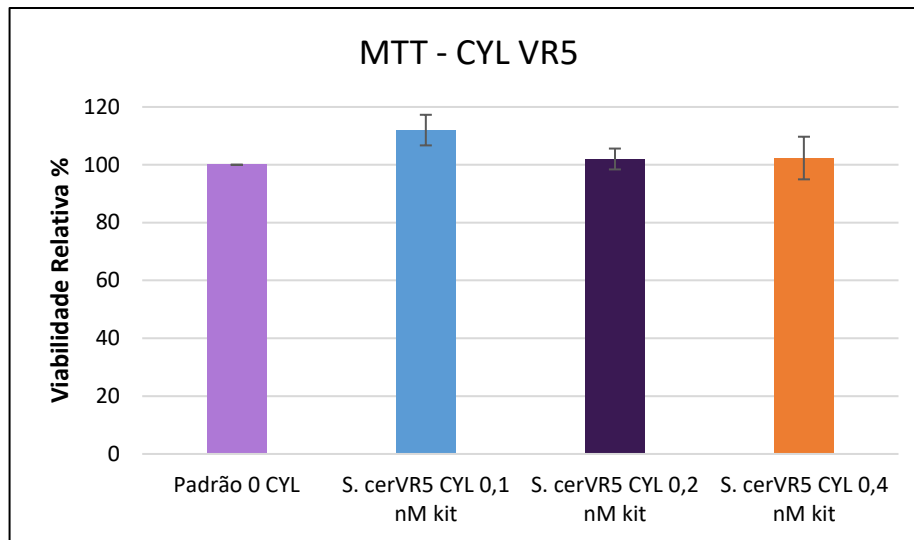


Figura 3.9 - Viabilidade celular de *S. cerevisiae* VR5 com ensaio MTT, após exposição a CYL durante 4 h. Os dados apresentados mostram a média e as respectivas barras de erro representam o desvio padrão de três amostras independentes (n=3) ($p > 0,05$; Teste-t).

3.3 Liticase

Após realizar os ensaios com MTT para a *S. cerevisiae* VL3 e VR5 expostas a ambas as cianotoxinas estudadas, MC-LR e CYL, realizou-se o ensaio para células expostas a Microcistina-LR em simultâneo com Liticase, durante o crescimento celular de *S. cerevisiae* VL3 para realizar os ensaios de viabilidade com MTT.

A lise enzimática de células de leveduras consiste na digestão da parede celular para o qual são necessárias essencialmente duas enzimas: a protease lítica para a camada externa e a β -1,3 glucanase lítica para a camada interna. Neste estudo, usamos a liticase a qual vai atuar na camada externa da parede celular (Fleuri e Sato, 2008b; Fleuri e Sato, 2010), de forma a permeabilizar as células (uma vez que a parede é digerida pela Liticase), para facilitar a entrada quer da toxina quer do MTT. A toxina e a enzima foram adicionadas às células de levedura na placa, e o ensaio com MTT foi realizado da mesma forma que as anteriores. As células tiveram um tempo de incubação de 4 h e o volume final de 1 mL. Usaram-se os padrões de toxina do kit, menor padrão (Padrão 0) e padrão (Padrão 5) com maior $[MC-LR]_{\text{final}}$ (1 nM), e também a toxina pura dissolvida em PBS a uma concentração final de 1 nM.

No gráfico da Figura 3.10, verifica-se que a liticase tem efeito na perda de viabilidade (barra verde), cerca de 2,5%, relativamente ao controlo (YPD + suspensão celular), pelo que este parâmetro confirma o bom funcionamento do teste.

O menor padrão de toxina, Padrão 0, serve de controlo para o maior padrão do kit, 1 nM MC-LR, com e sem liticase, tendo-se verificado a perda de viabilidade. As células com liticase e toxina perdem viabilidade celular em cerca de 6,7% (barra amarela) enquanto que as células sem liticase mas com toxina perdem viabilidade celular em cerca de 5% (barra lilás).

Relativamente à MC-LR em PBS, observa-se que as células perdem viabilidade celular quando estão na presença de liticase em cerca de 2% (barra cinzenta) contrariamente ao que acontece na ausência de liticase, uma vez que neste caso existe um aumento na viabilidade celular

de cerca de 9,5% (barra vermelho escura), em relação ao controlo. Todos estes resultados estão ligeiramente alterados relativamente ao respectivo controlo (CN), mas sem significado estatístico ($p > 0,05$).

Comparando os resultados obtidos para 1 nM MC-LR do Kit e em PBS, observa-se que existe realmente algum componente no padrão 5 que interfere na citotoxicidade. A Liticase por si só, não mostra diferenças significativas ($p > 0,05$) na citotoxicidade.

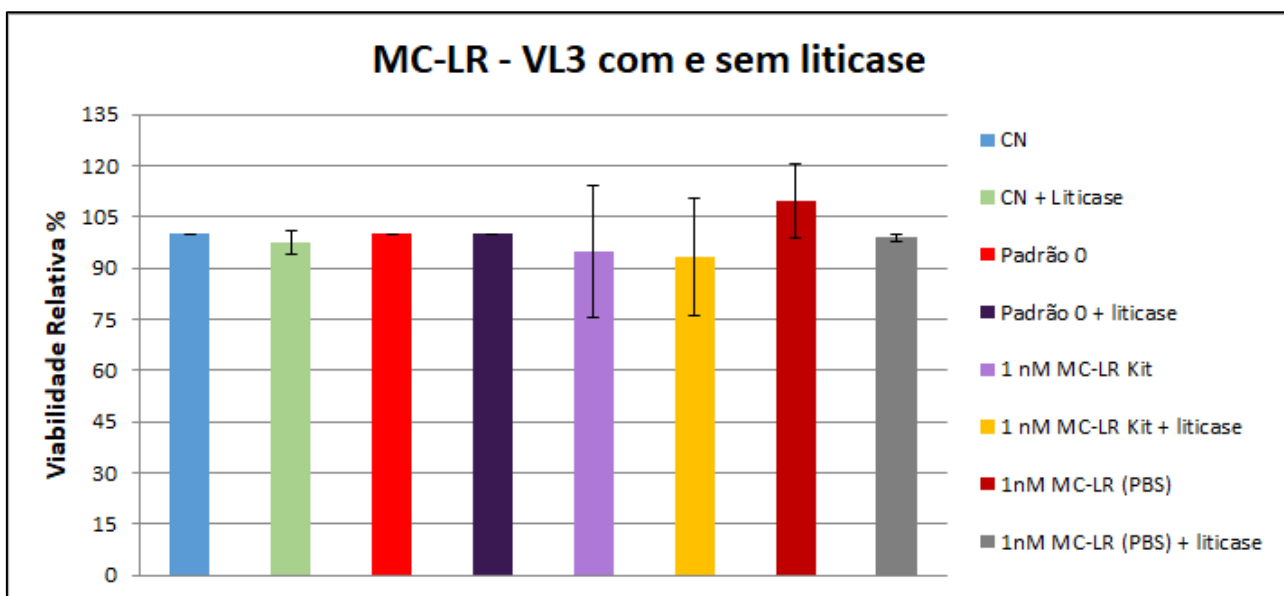


Figura 3.10 - Viabilidade celular de *S. cerevisiae* VL3 com ensaio MTT, após exposição a MC-LR e liticase durante 4 h. Os dados apresentados mostram a média e as respectivas barras de erro representam o desvio padrão de três amostras independentes ($n=3$) ($p > 0,05$; Teste-t). CN = Controlo Negativo.

Observou-se também as leveduras ao microscópio de forma a verificar que a liticase interferiu na digestão da parede celular (Figura 3.11).

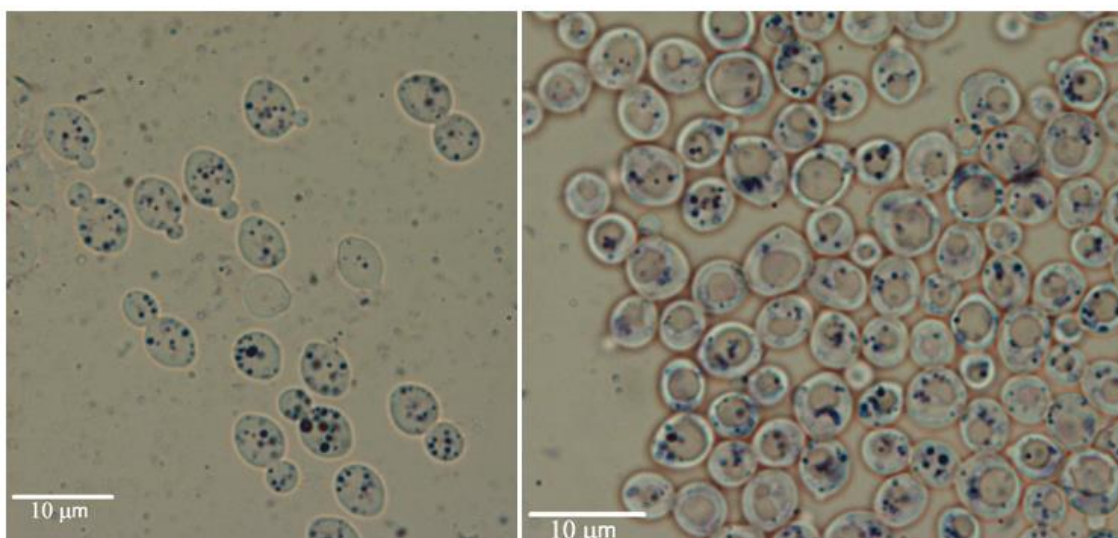


Figura 3.11 – Células de *S. cerevisiae* (CN) após ensaio com o reagente MTT (à esquerda) e células de *S. cerevisiae* com Liticase (CN + Liticase) com reagente MTT (à direita) (Ampliação 1000x, Sara Rodrigues).

São visíveis os protoplastos confirmando que a Liticase interagiu com a *S. cerevisiae*, digerindo a sua parede celular, pelo que se confirma que o problema de as toxinas não serem capazes de afetar a levedura (apresentar efeitos citotóxicos) não está relacionado com o facto de estas terem parede celular e isso dificultar a entrada das toxinas nas células.

4. Discussão

Ao longo deste estudo, foi avaliada a citotoxicidade da Microcistina-LR e da Cilindrospermopsina em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Para isto, foram usadas as estirpes VL3 e VR5, de forma a inferir se o comportamento seria diferente entre diferentes estirpes de uma mesma espécie.

Estão descritos diferentes métodos para testar a citotoxicidade de microcistinas, em células Vero-E6 e *Microcystis aeruginosa* (cianobactéria). Estes incluem o teste Lactato Desidrogenase (LDH), Vermelho Neutro (Dias *et al.*, 2009), Diacetato Fluorescente (FDA), *Evan's Blue*, autofluorescência e o MTT (Li & Song, 2007). De entre estes, o método usado neste estudo, o MTT, pois foi descrito como sendo o mais sensível e fiável (Li & Song, 2007).

No que respeita à citotoxicidade da cilindrospermopsina, alguns estudos anteriores usaram células de diferentes carcinomas humanos (C3A; HepG2; NCI-N87; HCT-8; HuTu-80; CaCo-2) e células Vero-E6 (células de rim de macaco verde africano), tendo recorrido ao MTT como método de ensaio. Verificou-se que todas as linhas celulares foram sensíveis a esta cianotoxina, demonstrando assim a sua citotoxicidade (Froscio *et al.*, 2009).

De forma a verificar que ambos os ensaios funcionavam de forma eficaz com as estirpes de *S. cerevisiae*, VL3 e VR5, utilizaram-se dois controlos positivos que, de acordo com estudos anteriores, causam danos às células e afetam a viabilidade celular (Valério *et al.*, 2014; Barreiros *et al.*, 2017). O SDS, um detergente, com tempo de exposição de 1 h, e o H₂O₂, um agente oxidante, com tempo de exposição de 30 min, demonstraram provocar uma perda de viabilidade não significativa no ensaio com o azul tripano. Foram escolhidos estes tempos porque estudos prévios (Chong *et al.*, 2000), inclusive do laboratório (Barreiros *et al.*, 2017), mostraram haver uma relação concentração-resposta significativa. Neste estudo, o facto de não se terem observado efeitos citotóxicos dos controlos com o ensaio com AT pode dever-se ao facto de este método não ser adequado para usar neste tipo de células. Contrariamente, no ensaio com MTT, observou-se uma perda de viabilidade significativa ($p \leq 0,05$) que variou de forma dependente da dose (dados não mostrados), estando de acordo com outros estudos desenvolvidos anteriormente neste laboratório (Barreiros *et al.*, 2017). Por outro lado, não foi observada uma perda de viabilidade significativa em função do tempo (4h vs 5h).

Estudos anteriores, que usaram linhas celulares de mamíferos (HepG2 (Chong *et al.*, 2000); Vero-E6 (Chong *et al.*, 2000; Dias *et al.*, 2009) e AML12 descrevem efeitos citotóxicos de microcistinas (Dias *et al.*, 2008). No entanto, esses estudos diferem do presente estudo uma vez que as linhas celulares escolhidas, sendo células de mamíferos, não possuem parede celular e também porque estas se encontravam em substratos aderentes. Segundo os estudos já referidos, há uma correlação negativa entre a viabilidade celular e a concentração de MC-LR com efeito citotóxico dependente da dose-tempo de MC-LR na viabilidade celular (Chong *et al.*, 2000; Dias *et al.*, 2009; Menezes *et al.*, 2013).

De forma a perceber se o facto de não se verificarem alterações na viabilidade celular de *S. cerevisiae* exposta à MC-LR estaria relacionada com a dificuldade de estas toxinas entrarem na célula, recorreu-se à enzima liticase que atua na digestão da parede celular. Mediante os resultados obtidos, pode-se concluir que mesmo na presença da liticase, não se verificaram perdas de viabilidade celular significativas. Também não se observaram diferenças significativas entre a MC-LR pura no eluente do kit e a MC-LR pura diluída em PBS. Pelos resultados deste estudo,

não se verifica que o facto de *S. cerevisiae* não ter parede celular ajude na citotoxicidade de MC-LR ($p > 0,05$).

Tendo-se verificado que o ensaio MTT não revelava efeitos na viabilidade celular após exposição com MC-LR, testou-se a cilindropermopsina que funcionaria como um controlo positivo do método, pois é conhecida como sendo citotóxica em células de mamífero (Froscio *et al.*, 2009). No entanto, não existem estudos de avaliação da citotoxicidade de CYL em leveduras. Os resultados obtidos mostraram que o ensaio MTT também não revelou efeitos citotóxicos em *S. cerevisiae* exposta a CYL.

De entre os poucos estudos em que é usado o ensaio MTT em células de levedura, não foi usado o mesmo método nem os mesmos componentes que neste estudo.

O estudo de Valério *et al.* (2014) com *S. cerevisiae* não recorreu aos mesmos métodos deste estudo, no entanto descreve que não houve alteração no crescimento da levedura quando expostas às mesmas concentrações de MC-LR (1 nM) que aqui foram testadas, o que corrobora os resultados observados. Podem-se colocar várias hipóteses para a ausência de resultados citotóxicos, sendo que um deles pode ser devido à elevada taxa de duplicação das leveduras, em que estas consigam superar os possíveis efeitos citotóxicos de MC-LR e CYL, resultando no final numa falta de efeito. No entanto, esta hipótese requer confirmação.

Usou-se um segundo método para verificar se a MC-LR e a CYL causam citotoxicidade em *S. cerevisiae*: o ensaio de coloração com azul tripano. Contudo os resultados obtidos com o AT, também não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) para nenhuma das cianotoxinas. O estudo de Kwizera *et al.* (2017) com AT noutra levedura (*Cryptococcus* spp.), apesar de não usarem a mesma metodologia, concluíram que a coloração com AT não é um método muito preciso.

Comparando os resultados de ambos os métodos usados neste estudo, podemos verificar que, em ambos, não se verifica citotoxicidade significativa das cianotoxinas testadas em *Saccharomyces cerevisiae*. Relativamente ao ensaio MTT, os resultados também podem estar relacionados com o facto de as leituras das absorvâncias serem muito baixas, ou seja, indica que o tempo de incubação para solubilizar o corante formazano não ser suficientemente longo para este tipo de células (<https://www.atcc.org/~media/DA5285A1F52C414E864C966FD78C9A79.ashx>, visitado em 11/10/2019).

Barreiros *et al.* (2017) usaram o método MTT para testar os efeitos citotóxicos de extratos purificados de MC-LR em *S. cerevisiae* a concentrações iguais (1 nM) e superiores às experimentadas neste estudo (10 nM; 100 nM; 1 μ M). Estes autores questionaram se o ensaio de MTT não funcionaria para *S. cerevisiae* tendo em conta que não se verificou efeitos citotóxicos (Barreiros *et al.*, 2017). O presente estudo permitiu esclarecer que, mesmo usando a toxina pura, não há evidências de citotoxicidade na levedura. Também o ensaio com AT não é esclarecedor neste sentido.

Pela análise dos resultados obtidos, pode-se afirmar que o método mais reprodutível é o ensaio com AT, isto porque não se observaram grandes diferenças entre as três réplicas biológicas. No entanto, este é um método muito subjetivo que também depende da experiência do observador e, por esse motivo, considera-se que o ensaio MTT foi o método mais fiável uma vez em que o

comportamento dos controlos reflete claramente o que está descrito na literatura para os mesmos ($p \leq 0,05$) (Dias *et al.*, 2009; Barreiros *et al.*, 2017).

Outro parâmetro que pode ter influenciado os resultados obtidos com estes dois métodos de ensaio, é o facto de as concentrações finais usadas para cada cianotoxina serem muito baixas. Seria interessante, de futuro, testar concentrações superiores e encontrar a concentração máxima a que a levedura possa ser exposta a cada uma das toxinas sem comprometer a sua estrutura celular.

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

O ensaio MTT funcionou com os controlos positivos testados em *S. cerevisiae*. No entanto, o mesmo não se verificou para as cianotoxinas, o que deve ser confirmado com outros métodos mais específicos como microscopia eletrónica ou citometria de fluxo para confirmação dos efeitos citotóxicos. Assim, não é possível estabelecer uma concentração máxima para a qual a levedura pode ser exposta sem ser comprometida a estrutura celular da levedura (aqui usada como modelo eucariótico).

Segundo Campos & Vasconcelos (2010) as microcistinas não têm capacidade de se difundir facilmente através da membrana plasmática devido ao seu tamanho molecular. São moléculas com alta massa molecular (900-110 Da) (Valério *et al.*, 2016), o que pode ser uma condicionante para a aplicação do ensaio de MTT a leveduras expostas às cianotoxinas testadas, na medida em que podem entrar nas células em quantidades variáveis durante os ensaios. Para complementar este método, seria útil recorrer-se a técnicas de maior resolução como, por exemplo, microscopia eletrónica para confirmar a entrada das toxinas para o interior das células.

Seria também interessante verificar se, recorrendo a concentrações superiores de cada cianotoxina, os resultados do ensaio MTT se manteriam. Adicionalmente, também se poderia utilizar ensaios diretos de observação, como o Vermelho Neutro que atua nos lisossomas de células viáveis, para comparar e verificar o que acontece com *S. cerevisiae* quando exposta a uma ou várias cianotoxinas.

A concentração de 1 nM de MC-LR, pareceu provocar uma estimulação para as células de *S. cerevisiae*, o que normalmente está associado a potencial carcinogénico. Este fenómeno deveria ser portanto confirmado de futuro, já que este é o valor guia definido pela OMS para a concentração de MC-LR na água potável.

6. Referências Bibliográficas

- Azevedo, S. M. F. O., Carmichael, W. W., Jochimsen, E. M., Rinehart, K. L., Lau, S., Shaw, G. R., & Eaglesham, G. K. (2002). Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru - Brazil. *Toxicology*, 181–182, 441–446. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00491-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00491-2)
- Backer, L. C., Landsberg, J. H., Miller, M., Keel, K., & Taylor, T. K. (2013). Canine cyanotoxin poisonings in the United States (1920s-2012): Review of suspected and confirmed cases from three data sources. *Toxins*, 5(9), 1597–1628. <https://doi.org/10.3390/toxins5091597>
- Barreiros, S. (2017) Pesquisa de efeitos genotóxicos e citotóxicos em *Saccharomyces cerevisiae* exposta a microcistinas-LR”. Tese de Mestrado em Biologia Humana e Ambiente. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Beasley, V. R., Lovell, R. A., Holmes, K. R., Walcott, H. E., Schaeffer, D. J., Hoffmann, W. E., & Carmichael, W. W. (2000). Microcystin-Lr decreases hepatic and renal perfusion, and causes circulatory shock, severe hypoglycemia, and terminal hyperkalemia in intravascularly dosed swine. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A*, 61(4), 281–303. <https://doi.org/10.1080/00984100050136599>
- Bellém, F., Nunes, S., & Morais, M. (2013). Cyanobacteria toxicity: Potential public health impact in south portugal populations. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 76(4–5), 263–271. <https://doi.org/10.1080/15287394.2013.757204>
- Bernas, T., & Dobrucki, J. (2002). Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*, 47(4), 236–242. <https://doi.org/10.1002/cyto.10080>
- Briand, J.-F., Jacquet, S., Bernard, C., & Humbert, J.-F. (2003). Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary Research*, 34(4), 361–377. <https://doi.org/10.1051/vetres>
- Buratti, F. M., Manganelli, M., Vichi, S., Stefanelli, M., Scardala, S., Testai, E., & Funari, E. (2017). Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Archives of Toxicology*, 91(3), 1049–1130. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1913-6>
- Campos, A., & Vasconcelos, V. (2010). Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(1), 268–287. <https://doi.org/10.3390/ijms11010268>
- Castenholz, R. W. (2015). General Characteristics of the Cyanobacteria . *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–23. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.cbm00019>
- Chong, M. W. K., Gu, K. D., Lam, P. K. S., Yang, M., & Fong, W. F. (2000). Study on the cytotoxicity of microcystin-LR on cultured cells. *Chemosphere*, 41(1–2), 143–147. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00402-6](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00402-6)
- Cirés, S., Wörmer, L., Timón, J., Wiedner, C., & Quesada, A. (2011). Cylindrospermopsin production and release by the potentially invasive cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* under temperature and light gradients. *Harmful Algae*, 10(6), 668–675. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.05.002>
- Codd, G. A., Morrison, L. F., & Metcalf, J. S. (2005). Cyanobacterial toxins: Risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203(3 SPEC. ISS.), 264–272.

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.02.016>

- Dias, E., Pereira, P., Batoréu, M.C.C., Jordan, P., Silva, M.J., 2008. Cytotoxic and genotoxic effects of microcystins in mammalian cell lines. In: Moestrup, Ø. (Ed.), Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae. International Society for the Study of Harmful Algae and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Copenhagen, pp. 282–285.
- Dias, E., Andrade, M., Alverca, E., Pereira, P., Batoréu, M. C. C., Jordan, P., & Silva, M. J. (2009). Comparative study of the cytotoxic effect of microcystin-LR and purified extracts from *Microcystis aeruginosa* on a kidney cell line. *Toxicon*, 53(5), 487–495. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.029>
- Dreher, T. W., Collart, L. P., Mueller, R. S., Halsey, K. H., Bildfell, R. J., Schreder, P., ... Ferry, R. (2019). *Anabaena/Dolichospermum* as the source of lethal microcystin levels responsible for a large cattle toxicosis event. *Toxicon: X*, 1(July 2018), 100003. <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2018.100003>
- Drobac, D., Tokodi, N., Lujčić, J., Marinović, Z., Subakov-Simić, G., Dulić, T., ... Svirčev, Z. (2016). Cyanobacteria and cyanotoxins in fishponds and their effects on fish tissue. *Harmful Algae*, 55, 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.02.007>
- Du, X., Liu, H., Yuan, L., Wang, Y., Ma, Y., Wang, R., ... Zhang, H. (2019). The diversity of cyanobacterial toxins on structural characterization, distribution and identification: A systematic review. *Toxins*, 11(9), 1–34. <https://doi.org/10.3390/toxins11090530>
- Fischer, A., Hoeger, S. J., Stemmer, K., Feurstein, D. J., Knobeloch, D., Nussler, A., & Dietrich, D. R. (2010). The role of organic anion transporting polypeptides (OATPs/SLCOs) in the toxicity of different microcystin congeners in vitro: A comparison of primary human hepatocytes and OATP-transfected HEK293 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 245(1), 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.02.006>
- Fleuri, L. F., & Sato, H. (2008a). Estudo da Influência de Diferentes Parâmetros na Produção de Enzimas Líticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(2), 299–310.
- Fleuri, L. F., & Sato, H. H. (2008b). B-1,3 Glucanases E Quitinases : Aplicação na Lise de Leveduras e Inibição de Fungos. *Ciência e Agrotecnologia*, 32(4), 1224–1231.
- Fleuri, L. F., & Sato, H. H. (2010). Produção de Protoplastos e Lise da Parede Celular de Leveduras utilizando B-1,3 glucanase. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(2), 471–476.
- Freitas, M., Azevedo, J., Pinto, E., Neves, J., Campos, A., & Vasconcelos, V. (2015). Effects of microcystin-LR, cylindrospermopsin and a microcystin-LR/cylindrospermopsin mixture on growth, oxidative stress and mineral content in lettuce plants (*Lactuca sativa* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 116, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.002>
- Froschio, S. M., Fanok, S., & Humpage, A. R. (2009). Cytotoxicity screening for the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 72(5), 345–349. <https://doi.org/10.1080/15287390802529906>
- Froschio, S. M., Humpage, A. R., Burcham, P. C., & Falconer, I. R. (2003). Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environmental Toxicology*, 18(4), 243–251. <https://doi.org/10.1002/tox.10121>
- Hoiczky, E., & Hansel, A. (2000). Cyanobacterial cell walls: News from an unusual prokaryotic envelope. *Journal of Bacteriology*, 182(5), 1191–1199. <https://doi.org/10.1128/JB.182.5.1191-1199.2000>

- Jochimsen, E. ., Carmichael, W. W., An, J., Cardo, D. M., & Cookson, S.T.; Holmes, C.E.M.; Antunes, B.C.; Melo Filho, D.A.; Lyra, T.M.; Barreto, V.S.T; Azevedo, S.M.F.O. & Jarvis, W. . (1998). Liver failure and death after exposure to microcystins. *The New England Journal of Medicine*, 338(13), 873–878. <https://doi.org/10.1080/13504509.2013.856048>
M4 - Citavi
- Kubickova, B., Babica, P., Hilscherová, K., & Šindlerová, L. (2019). Effects of cyanobacterial toxins on the human gastrointestinal tract and the mucosal innate immune system. *Environmental Sciences Europe*, 31(1). <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0212-2>
- Kwizera, R., Akampurira, A., Kandole, T. K., Nielsen, K., & Kambugu, A. (2017). Evaluation of trypan blue stain in a haemocytometer for rapid detection of cerebrospinal fluid sterility in HIV patients with cryptococcal meningitis Evaluation of trypan blue stain in a haemocytometer for rapid detection of cerebrospinal fluid sterility in HIV patients with cryptococcal meningitis. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1093-4>
- Leal, A. de C., & Soares, M. do C. P. (2004). Hepatotoxicidade da cianotoxina microcistina. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37(suppl 2), 84–89. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822004000700013>
- Li, J., & Song, L. (2007). Applicability of the MTT assay for measuring viability of cyanobacteria and algae, specifically for *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria). *Phycologia*, 46(5), 593–599. <https://doi.org/10.2216/07-11.1>
- Mello, F. D., Braid, N., Marçal, H., Guillemain, G., Nabavi, S. M., & Neilan, B. A. (2017). Mechanisms and Effects Posed by Neurotoxic Products of Cyanobacteria/Microbial Eukaryotes/Dinoflagellates in Algae Blooms: a Review. *Neurotoxicity Research*, 33(1), 153–167. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9780-3>
- Menacho-Márquez, M., & Murguía, J. R. (2007). Yeast on drugs: *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for anticancer drug research. *Clinical and Translational Oncology*, 9(4), 221–228. <https://doi.org/10.1007/s12094-007-0043-2>
- Menezes, C., Valerio, E., & Dias, E. (2013). The Kidney Vero-E6 Cell Line: A Suitable Model to Study the Toxicity of Microcystins. *New Insights into Toxicity and Drug Testing*. <https://doi.org/10.5772/54463>
- Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E., & Thomas, O. (2013). State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment International*, 59, 303–327. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.013>
- Moffitt, M. C., & Neilan, B. A. (2004). Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), 6353–6362. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6353-6362.2004>
- Msagati, T. A. M., Siame, B. A., & Shushu, D. D. (2006). Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquatic Toxicology*, 78(4), 382–397. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.03.011>
- Paerl, H. W., Fulton, R. S., Moisander, P. H., & Dyble, J. (2001). Harmful Freshwater Algal Blooms, With an Emphasis on Cyanobacteria. *The Scientific World JOURNAL*, 1, 76–113. <https://doi.org/10.1100/tsw.2001.16>
- Pantelić, D., Svirčev, Z., Simeunović, J., Vidović, M., & Trajković, I. (2013). Cyanotoxins: Characteristics, production and degradation routes in drinking water treatment with reference to the situation in Serbia. *Chemosphere*, Vol. 91, pp. 421–441. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.003>

- Puschner, B., Hoff, B., & Tor, E. R. (2008). Diagnosis of anatoxin-a poisoning in dogs from North America. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(1), 89–92. <https://doi.org/10.1177/104063870802000119>
- Rescan, M., Et, P., Curie, M., & Rescan, M. (2017). Evolution des cycles de vie : modélisation et évolution expérimentale sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* To cite this version : HAL Id : tel-01653088.
- Runnegar, M. T., Kong, S., ZHONG, Y.-Z., & Lu, S. C. (1995). Inhibition of Reduced Glutathione Synthesis by Cyanobacterial Alkaloid Cylindrospermopsin in Cultured Rat Hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, 49(2), 219–225. Retrieved from http://ac.els-cdn.com/S0006295294004668/1-s2.0-S0006295294004668-main.pdf?_tid=4801400e-5794-11e4-90cd-00000aacb35d&acdnat=1413725690_d81a968af20fcc39933d28e79492102a
- Sherman, F. (1991) Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* 194, 3-21. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/007668799194004V>
- Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., & Villanueva, Á. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, 114(8), 785–796. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006>
- Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology / Edited by John E. Coligan ... [et al.]*, 111(November), 1–3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>
- Teprarić, R., Stuparević, I., & Mrsa, V. (2004). Increased mortality of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein mutants. *Microbiology*, 150(10), 3145–3150.
- Terao, K., Ohmori, S., Igarashi, K., Ohtani, I., Watanabe, M. F., Harada, K. I., ... Watanabe, M. (1994). Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. *Toxicon*, 32(7), 833–843. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90008-6)
- Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Watanabe, M. F., Park, H. D., ... Yu, S. Z. (1996). Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis*, 17(6), 1317–1321. <https://doi.org/10.1093/carcin/17.6.1317>
- Valério, E., Chaves, S., & Tenreiro, R. (2010). Diversity and impact of prokaryotic toxins on aquatic environments: A review. *Toxins*, 2(10), 2359–2410. <https://doi.org/10.3390/toxins2102359>
- Valério, E., Vasconcelos, V., & Campos, A. (2016). New Insights on the Mode of Action of Microcystins in Animal Cells - A Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 16(13), 1032–1041. <https://doi.org/10.2174/1389557516666160219130553>
- Valério, E., Vilares, A., Campos, A., Pereira, P., & Vasconcelos, V. (2014). Effects of microcystin-LR on *Saccharomyces cerevisiae* growth, oxidative stress and apoptosis. *Toxicon*, 90(1), 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.08.059>
- Van Apeldoorn, M. E., Van Egmond, H. P., Speijers, G. J. A., & Bakker, G. J. I. (2007). Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(1), 7–60. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600185>
- van der Merwe, D. (2014). Freshwater cyanotoxins. *Biomarkers in Toxicology*, 539–548. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404630-6.00031-2>
- Van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: The MTT assay. In *Cancer Cell: Culture: Methods and Protocols, Second Edition, Methods in molecular*

biology (Vol. 731). <https://doi.org/10.1385/1592594069>

Welker, M., Bickel, H., & Fastner, J. (2002). HPLC-PDA detection of cylindrospermopsin - Opportunities and limits. *Water Research*, 36(18), 4659–4663. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00194-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00194-X)

Yu, S. (1995). Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 10, 674–682.

Zhou L, Yu H, Chen K. Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. *Biomedical and Environmental Sciences*. 2002;15:166-71.

7. Sitigrafia

- World Health Organization, 2017. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254637/9789241549950-eng.pdf;jsessionid=13E1ABC4F60339CF37C52557C48577FE?sequence=1> visitado em 12/10/19.
- Zymaflore® https://laffort.com/wp-content/uploads/FP/FP_EN_Zymaflore_VL3.pdf visitado em 22/10/19.
- Fermicru® <https://www.laboratoire-obst.com//media/upload/file/FermicruVR5.pdf> visitado em 22/10/19.
- Pangloss <http://www.pangloss.com/seidel/Protocols/ODvsCells.html> visitado em Junho de 2019