

MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA
RAMO DE TECNOLOGIAS DE PROTEÇÃO AMBIENTAL

Estudo da Toxicidade do Chumbo na Levedura
Saccharomyces cerevisiae

Cátia Filipa Assunção de Sousa

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DO
PORTO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM TECNOLOGIAS DE PROTEÇÃO AMBIENTAL

ORIENTADOR: Professor Doutor Eduardo Jorge Valente Soares

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ISEP

Setembro 2013

Agradecimentos

Este espaço é dedicado a todas as pessoas que me ajudaram, direta ou indiretamente, a cumprir os meus objetivos e a superar mais uma etapa na minha vida. Deste modo, não posso deixar de expressar o meu sincero agradecimento.

Ao Professor Doutor Eduardo Soares, meu orientador, um agradecimento muito especial por me ter concedido a oportunidade de trabalhar e conhecer mais de perto a área de microbiologia. Agradeço a disponibilidade, a sabedoria e os conhecimentos transmitidos ao longo deste trabalho.

Ao Departamento de Engenharia Química do Instituto Superior de Engenharia do Porto e ao Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia (IBB), pelas facilidades em termos de instalações, equipamentos e financiamento necessários à realização desta tese de mestrado.

À Doutora Manuela Machado, pela amizade construída ao longo deste trabalho. O meu mais sincero agradecimento por todos os momentos de trabalho conjunto, apoio e pela facilidade com que me transmitiu os conhecimentos necessários para este trabalho.

À minha família, em especial ao meu irmão, pela paciência, apoio e dedicação, acreditando sempre em mim e no meu trabalho.

Ao Ricardo, agradeço com um carinho muito especial a presença, a partilha, a compreensão e o incentivo fundamentais ao longo deste meu trabalho.

Muito Obrigada.

Resumo

O chumbo é um importante poluente ambiental. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* constitui um modelo útil para o estudo dos efeitos tóxicos do chumbo. O conhecimento dos mecanismos de defesa e resistência à presença de metais pesados poderá ser útil em tecnologias de proteção ambiental, nomeadamente no desenvolvimento de novas metodologias para a biorremediação de metais pesados.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o impacto do Pb na capacidade proliferativa, na integridade membranar e na produção intracelular de espécies reativas de oxigénio (ROS), na estirpe laboratorial da levedura *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (estirpe selvagem, WT). Foi também estudado o papel das mitocôndrias, como fonte de ROS induzida por Pb, e o envolvimento da H⁺-ATPase vacuolar (V-ATPase) e de transportadores vacuolares pertencentes à superfamília ABC (de *ATP-binding cassette*) na defesa contra a toxicidade do Pb.

O estudo cinético do impacto de duas concentrações de Pb na viabilidade das leveduras (avaliado através de um ensaio clonogénico), na integridade da membrana celular (determinada com iodeto de propídio) e na produção intracelular de ROS (o anião superóxido foi detetado com dihidroetídio e o peróxido de hidrogénio com 2',7'-diclorodihidrofluoresceína), revelou uma perda progressiva da capacidade proliferativa (53 e 17% de células viáveis, após a exposição durante 3h a 250 ou 1000 µmol/l de chumbo, respetivamente), coincidente com a acumulação intracelular de anião superóxido e de peróxido de hidrogénio, na ausência de perda da integridade membranar.

A importância das mitocôndrias na produção de ROS, induzida por chumbo, foi levada a cabo usando um mutante deficiente respiratório desprovido de ADN mitocondrial (ρ^0). Quando comparado com a respetiva estirpe parental, o mutante ρ^0 apresentou uma maior resistência ao Pb e uma menor produção de ROS induzida por Pb. A exposição das células da estirpe BY4741 a 250 e 1000 µmol/l de chumbo originou a formação de 49 e 58% de células deficientes respiratórias, respetivamente.

A função da V-ATPase, na desintoxicação de chumbo, foi avaliada utilizando mutantes com uma estrutura vacuolar normal mas defetivos em subunidades da V-ATPase (*vma1Δ*, *vma2Δ*, *vma3Δ* e *vph1Δ*). Comparativamente às células da estirpe WT, todos os mutantes testados, sem V-ATPase funcional, apresentaram uma maior suscetibilidade ao Pb.

O papel dos transportadores vacuolares pertencentes à superfamília ABC, na defesa contra a toxicidade induzida por chumbo, foi levada a cabo utilizando mutantes

sem os transportadores Ycf1p ou Vmr1p. Os resultados preliminares mostraram que quando comparadas com as células da estirpe WT, as células das estirpes *ycf1* Δ ou *vmr1* Δ não apresentavam uma maior perda da viabilidade.

A modificação da morfologia vacuolar, em células expostas a chumbo, foi visualizada utilizando a estirpe Vma2p-GFP. O tratamento das células com Pb originou a fusão dos vacúolos de tamanho médio num único vacúolo de grande dimensão.

Em conclusão, os estudos desenvolvidos no presente trabalho, utilizando a estirpe laboratorial BY4741, mostraram que a perda da capacidade proliferativa das leveduras, induzida pelo chumbo, pode ser atribuída à acumulação intracelular do anião superóxido e de peróxido de hidrogénio. As mitocôndrias parecem ser uma das principais fontes de ROS induzido por Pb e, simultaneamente, um dos principais alvos da sua toxicidade. Em *S. cerevisiae*, o vacúolo desempenha um papel importante na desintoxicação do Pb. A modificação da morfologia vacuolar após exposição ao chumbo poderá ser a consequência da acumulação de Pb no vacúolo. Enquanto os transportadores da superfamília ABC parecem não estar envolvidos na sequestração vacuolar de Pb, é necessária a presença, num estado funcional, da V-ATPase para que ocorra a compartimentação do Pb. Muito provavelmente, a compartimentação do Pb no vacúolo previne a sua acumulação no citosol e o desencadear dos respetivos efeitos tóxicos.

Palavras-chave: espécies reativas de oxigénio (ROS); H⁺-ATPase vacuolar (V-ATPase); integridade membranas; levedura; mitocôndria; mutantes deficientes respiratórios; toxicidade do chumbo (Pb); transportadores ABC da membrana vacuolar; viabilidade.

Abstract

Lead is an important environmental pollutant. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* constitutes a useful model for the study of the toxic effects of lead. The knowledge of defence and resistance mechanisms to the presence of heavy metals can be useful in technologies of environmental protection, namely in the development of new methodologies for the bioremediation of heavy metals.

The aim of this work was to evaluate the impact of Pb on proliferation capacity, membrane integrity and intracellular production of reactive oxygen species (ROS), on laboratory strain of *S. cerevisiae* BY4741 (wild type strain, WT). The role of mitochondria, as a source of ROS Pb-induced, and the involvement of vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) and vacuolar transporters belonging to the ATP-binding cassette (ABC) superfamily in the defence against Pb toxicity was also evaluated.

The kinetic study of the impact of two Pb concentrations on yeast viability (evaluated using a clonogenic assay), cell membrane integrity (assessed using propidium iodide) and the intracellular ROS production (the superoxide anion was detected with dihydroethidium and the hydrogen peroxide with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate), revealed a progressive loss of proliferation capacity (53 and 17% of viable cells, after 3h of exposition to 250 or 1000 $\mu\text{mol/l}$ Pb, respectively), which was coincident with the intracellular accumulation of superoxide anion and hydrogen peroxide, in the absence of the loss of cell membrane integrity.

The importance of mitochondria in the production of ROS Pb-induced was carried out using a respiratory deficient mutant devoid of DNA mitochondrial (ρ^0 mutant). Comparatively to the WT strain, the ρ^0 mutant displayed an increased resistance to Pb and a reduced production of ROS Pb-induced. The exposition of cells from BY4741 strain to 250 or 1000 $\mu\text{mol/l}$ Pb originated the formation of 49 or 58 % of respiratory-deficient cells, respectively.

The function of V-ATPase, in Pb detoxification, was evaluated using mutants with structurally normal vacuoles but defective in subunits (*vma1 Δ* , *vma2 Δ* , *vma3 Δ* and *vph1 Δ*) of V-ATPase. All mutants tested, lacking a functional V-ATPase, displayed an increased susceptibility to Pb, comparatively to cells from WT strain.

The role of vacuolar transporters belonging to ABC superfamily in the defence against Pb-induced toxicity was carried out using mutants without the transporters Ycf1p or Vmr1p. Preliminary results showed that cells from *ycf1 Δ* or *vmr1 Δ* strains did not display an increased loss of viability comparatively to WT strain.

Modification of vacuolar morphology, in Pb-exposed cells, was visualized using a Vma2p-GFP strain. The treatment of yeast cells with Pb originated the fusion of the medium-size vacuolar lobes into one enlarged vacuole.

In conclusion, the studies carried out in the present work, using the laboratory strain of *S. cerevisiae* BY4741, showed that the loss of yeast cells proliferation capacity Pb-induced can be attributed to the intracellular accumulation of superoxide anion and hydrogen peroxide. Mitochondria seem to be one of the main sources of ROS Pb-induced and simultaneously one of the targets of its toxicity. The vacuole plays an important role in the detoxification of Pb in *S. cerevisiae*. The modification of vacuolar morphology upon Pb exposition can be the consequence of Pb accumulation in the vacuole. While the ABC transporters seem not to be involved in the vacuolar sequestration of Pb, a functional V-ATPase is required for Pb compartmentalization. Most likely, Pb is compartmentalized in the vacuole preventing its accumulation in cytosol and the resultant toxic effect.

Keywords: deficient respiratory mutants; lead (Pb) toxicity; membrane integrity; mitochondria; reactive oxygen species (ROS); vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase); vacuolar membrane ABC transporters; viability; yeast

Índice Geral

| | |
|---|------|
| Agradecimentos | i |
| Resumo | iii |
| Abstract | v |
| Índice Geral | vii |
| Índice de Figuras | xi |
| Índice de Tabelas | xiii |
| Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos | xv |
| Capítulo 1 - Introdução | 1 |
| 1.1. Metais pesados e a sua toxicidade | 3 |
| 1.2. Uso e contaminação ambiental por chumbo | 3 |
| 1.3. Efeitos tóxicos induzidos pelo chumbo | 6 |
| 1.3.1. No ser humano | 6 |
| 1.3.2. Na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 6 |
| 1.4. Produção de espécies reativas de oxigénio | 7 |
| 1.4.1. Peroxidação lipídica e o papel da membrana | 8 |
| 1.4.2. Oxidação das proteínas | 9 |
| 1.4.3. Oxidação do ADN | 9 |
| 1.4.4. O <i>stress</i> oxidativo nas mitocôndrias | 9 |
| 1.5. Mecanismos de desintoxicação: efluxo, quelatação e sequestração vacuolar | 11 |
| 1.5.1. Efluxo e quelatação | 11 |
| 1.5.2. Sequestração vacuolar | 12 |
| 1.5.2.1. Funções do vacúolo e morfologia | 12 |
| 1.5.2.2. Constituição e papel da V-ATPase | 12 |
| 1.5.2.3. Mutantes VPS Classe C | 13 |
| 1.5.2.4. Papel da superfamília ABC | 14 |
| 1.6. Objetivos da presente dissertação | 15 |
| Capítulo 2 – Materiais e Métodos | 17 |

| | | |
|---|---|----|
| 2.1. | Microrganismos | 19 |
| 2.2. | Condições de crescimento..... | 20 |
| 2.3. | Determinação do número de células..... | 20 |
| 2.4. | Preparação da suspensão de células | 20 |
| 2.5. | Avaliação da suscetibilidade ao chumbo | 21 |
| 2.6. | Estudo da integridade membranar | 21 |
| 2.7. | Determinação da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) | 22 |
| 2.8. | Obtenção de mutantes deficientes respiratórios (ρ^0)..... | 23 |
| 2.9. | Quantificação de mutantes deficientes respiratórios | 23 |
| 2.10. | Coloração do ADN nuclear e mitocondrial..... | 23 |
| 2.11. | Análise da morfologia vacuolar | 24 |
| 2.12. | Reprodutibilidade dos resultados e tratamento estatístico..... | 24 |
| Capítulo 3 – Resultados e Discussão | | 25 |
| 3.1. | Estudo da toxicidade do chumbo | 27 |
| 3.1.1. | Perda da capacidade proliferativa..... | 27 |
| 3.1.2. | Perda da integridade membranar | 28 |
| 3.1.3. | Indução de espécies reativas de oxigénio | 30 |
| 3.2. | Papel das mitocôndrias no <i>stress</i> oxidativo induzido por chumbo..... | 33 |
| 3.2.1. | Obtenção de mutantes ρ^0 | 33 |
| 3.2.2. | Sensibilidade ao chumbo da estirpe BY4741 e do respetivo mutante ρ^0 | 34 |
| 3.2.3. | Avaliação da indução de mutantes deficientes respiratórios | 36 |
| 3.3. | Papel do vacúolo na desintoxicação do chumbo | 39 |
| 3.3.1. | Ausência de vacúolo e hipersensibilidade ao chumbo | 39 |
| 3.3.2. | O papel da H ⁺ -ATPase (V-ATPase)..... | 39 |
| 3.3.3. | Avaliação do contributo da subfamília de transportadores ABCC | 43 |
| 3.3.4. | Modificação da morfologia do vacúolo induzida por chumbo | 44 |
| Capítulo 4 – Conclusões..... | | 47 |
| 4.1. | Conclusões..... | 49 |
| Capítulo 5 – Sugestões para trabalhos futuros | | 51 |

| | |
|---|----|
| 5.1. Sugestões para trabalhos futuros | 53 |
| Referências Bibliográficas | 55 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1.1 – O papel do ADN mitocondrial no <i>stress</i> oxidativo..... | 10 |
| Figura 1.2 – Modelo estrutural da V-ATPase e designação das subunidades constituintes de cada domínio..... | 13 |
| Figura 1.3 – Localização dos diferentes transportadores da superfamília ABC na levedura <i>S. cerevisiae</i> | 14 |
| Figura 2.1 – Plaqueamento em YEPD-agar para determinação da viabilidade celular. | 21 |
| Figura 3.1 – Viabilidade da levedura <i>S. cerevisiae</i> BY4741 durante a exposição ao chumbo..... | 28 |
| Figura 3.2 – Integridade membranas das células da levedura <i>S. cerevisiae</i> BY4741 durante a exposição ao chumbo. | 29 |
| Figura 3.3 – Produção de ROS pela levedura <i>S. cerevisiae</i> BY4741 quando exposta a 1000 $\mu\text{mol/l}$ de chumbo..... | 31 |
| Figura 3.4 – Visualização da acumulação intracelular de ROS pela levedura <i>S. cerevisiae</i> BY4741 quando exposta a 1000 $\mu\text{mol/l}$ de chumbo. | 32 |
| Figura 3.5 – Crescimento em placa dos mutantes ρ^0 | 33 |
| Figura 3.6 – Visualização do ADN por coloração com DAPI. | 34 |
| Figura 3.7 – Sensibilidade ao chumbo da levedura <i>S. cerevisiae</i> BY4741 e do respetivo mutante ρ^0 | 35 |
| Figura 3.8 – Produção de ROS pela levedura <i>S. cerevisiae</i> BY4741 e respetivo mutante ρ^0 , induzido pela presença de chumbo. | 36 |
| Figura 3.9 – Formação de mutantes deficientes respiratórios (DR), induzidos pela presença de chumbo, na levedura <i>S. cerevisiae</i> BY4741. | 37 |
| Figura 3.10 – Comparação da suscetibilidade ao chumbo da levedura <i>S. cerevisiae</i> BY4741 (WT) com os mutantes com deleção de subunidades da H^+ -ATPase vacuolar. | 41 |
| Figura 3.11 – Comparação da suscetibilidade ao chumbo da levedura <i>S. cerevisiae</i> BY4741 (WT) com mutantes defetivos em transportadores vacuolares pertencentes à subfamília ABCC | 44 |
| Figura 3.12 – Impacto do chumbo na morfologia vacuolar | 45 |

Índice de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1.1 – Valores limite para a concentração de chumbo no solo, ar e água, em Portugal | 5 |
| Tabela 1.2 – Níveis de concentração máxima de chumbo no solo, ar e água segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos..... | 5 |
| Tabela 2.1 – Estirpes da levedura <i>S. cerevisiae</i> usadas neste trabalho..... | 19 |
| Tabela 3.1 – Efeito do chumbo na viabilidade das diferentes estirpes da <i>S. cerevisiae</i> | 42 |

Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos

- Acr3p – Transportador vacuolar de As (III)
ADN – Ácido desoxirribonucleico
ATP – Adenosina trifosfato
ARN – Ácido ribonucleico
DAPI – 4,6-diamino-2-fenilindol
DHE – Dihidroetídio
DO₆₀₀ – Densidade ótica a 600 nm
EC – Concentração efetiva (Abreviatura em Inglês)
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra acético
GFP – Proteína verde fluorescente (Sigla em Inglês)
GR – Glutathione redutase
GSH – Glutathione na forma reduzida
GSSG -Glutathione na forma oxidada
H₂DCFDA – Diacetato de 2', 7' – diclorofluoresceína
HEPES – Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfónico
IARC - Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (Sigla em Inglês)
IP – Iodeto de propídeo
MES – Ácido 2-morfolinoetanosulfónico
MT – Metalotioneína
OH[•] – Radical hidroxilo
¹O₂ – Oxigénio singlete
O₂^{•-} – Anião superóxido
PBS – Tampão fosfato-salino (Abreviatura em Inglês)
Pca1p – Transportador de Cd (II)
ROS – Espécies reativas de oxigénio (Abreviatura em Inglês)
rpm – Rotações por minuto
UFC – Unidade formadora de colónia
URF – Unidade relativa de fluorescência
US-EPA – Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América
V-ATPase – H⁺ ATPase vacuolar
Vmr1p – Transportador vacuolar da família ABC
WT – Estirpe selvagem – controlo (Abreviatura em Inglês)
Ycf1p – Transportador vacuolar da família ABC

Capítulo 1 - Introdução

1.1. Metais pesados e a sua toxicidade

A poluição do meio ambiente por metais deve-se, sobretudo, aos efeitos antropogénicos associados a diversas atividades industriais e agrícolas. Os metais podem, ainda, ser libertados naturalmente no meio ambiente, por exemplo, através da erosão das rochas ou devido a fenómenos vulcânicos (Avery 2001).

São geralmente considerados metais pesados os compostos metálicos cuja densidade seja superior a 5 g/cm³ (Barakat 2011). Os metais pesados são caracterizados segundo as suas propriedades físicas, tais como a ductilidade, a condutividade térmica e elétrica, a refletividade e a capacidade de reação com os sistemas biológicos, onde ocorre a perda de um ou mais eletrões (Nelson *et al.* 2010). Face às características que apresentam, os metais pesados não são destruídos ou degradados permanecendo no ambiente num longo período de tempo e, conseqüentemente, podem ser acumulados pelos organismos, entrando em ciclos redox, formando iões e compostos organometálicos (Nelson *et al.* 2010). Certos metais, tais como zinco e cobre, são essenciais para os seres vivos pois intervêm no metabolismo celular. Porém, em concentrações elevadas, podem também ser tóxicos para os organismos. Metais como o chumbo, cádmio e o mercúrio, não têm qualquer função celular identificada apresentando, por isso, uma elevada toxicidade, mesmo em pequenas concentrações (Gadd 1993).

Nos seres humanos, os metais estão associados a diferentes condições degenerativas, tais como neurotoxicidade, nefrotoxicidade, genotoxicidade e carcinogénese. Assim sendo, é necessário manter um adequado balanço homeostático dos metais essenciais ao organismo já que o seu excesso ou deficiência podem causar doenças, como por exemplo, a síndrome de Menkes associada a uma deficiência de cobre, a doença de Wilson que é causada por uma acumulação de cobre no cérebro e fígado e a anemia provocada pela deficiência de ferro (Avery 2001).

1.2. Uso e contaminação ambiental por chumbo

O chumbo apresenta uma temperatura de fusão baixa e uma cor cinza-azulada, podendo ser encontrado em abundância na crosta terrestre. Porém, encontra-se geralmente associado a outros elementos, aparecendo em menor quantidade na forma livre. Tal como a generalidade dos metais pesados, o chumbo ocorre naturalmente no ambiente, sendo que a maior parte dos níveis elevados encontrados são provenientes das atividades antropogénicas. Os níveis ambientais de chumbo aumentaram mais de

1000 vezes em três séculos como resultado destas atividades. O maior aumento ocorreu entre 1950 e 2000, devido ao uso de chumbo como aditivo na gasolina (ATSDR 2007).

Este metal é resistente à corrosão uma vez que, quando exposto ao ar ou à água, formam-se finos filmes de compostos de chumbo que protegem o metal do ataque. O chumbo é facilmente moldado e pode ser combinado com outros metais para formar ligas metálicas. O chumbo e as suas ligas metálicas são comumente encontrados em tubos, baterias, pesos, munições e chapas de proteção da radiação. Contudo, estima-se que a maior utilização do chumbo esteja relacionada com a produção de baterias na indústria automóvel. Os compostos de chumbo estão presentes em pigmentos para tintas, corantes e esmaltes cerâmicos. Nos últimos anos, a quantidade de chumbo, usada nestes produtos, tem vindo a diminuir por forma a reduzir os efeitos tóxicos causados nas pessoas e nos animais. Os compostos tetraetil e tetrametilchumbo foram usados como aditivos em gasolina; todavia, o uso destes compostos foi proibido nos EUA e na Europa, no final da década de 90. O tetraetilchumbo pode, ainda hoje, ser utilizado como aditivo na gasolina para aviões e num vasto número de países em desenvolvimento. O uso do chumbo em munições tem-se mantido relativamente constante ao longo dos anos. Contudo, a utilização deste metal tem vindo a ser reduzida em diversas áreas, uma vez que origina danos no meio ambiente (ATSDR 2007). Ainda assim, a produção e o consumo de chumbo tem vindo a crescer em todo o mundo e, em 2012, a produção total anual foi cerca de 10,6 milhões de toneladas (ILZSG 2013).

O chumbo pode ingressar no meio ambiente por diferentes meios. Este metal é libertado para o ar através da queima de carvão, petróleo e de diferentes resíduos. Antes de ser proibido o uso de chumbo na gasolina, a maior parte de chumbo libertado para o ar era proveniente dos veículos, como se observou no ano de 1979, onde foram libertadas cerca de 94,6 milhões de toneladas de chumbo nos EUA. Uma vez na atmosfera, pequenas partículas de chumbo podem percorrer longas distâncias, sendo removidas do ar pela chuva ou partículas que caem nos solos ou nas águas. Nos solos, têm sido referidas outras fontes possíveis de contaminação por chumbo, como é o caso do uso dos pesticidas, a deposição de resíduos contaminados em aterros, fragmentos de tintas com chumbo provenientes de edifícios, pontes e outras estruturas e poeiras oriundas da queima de gasolina com chumbo. Os seres humanos podem estar expostos ao chumbo por ingestão (comida e/ou água) ou por inalação de ar contaminado. Uma outra forma de contaminação é através da pele pelo uso de cosméticos que contenham chumbo (ATSDR 2007).

Várias regulamentações têm vindo a ser implementadas nos EUA e na Europa com o objetivo de reduzir ou mesmo eliminar a utilização do chumbo em aditivos, na gasolina, tintas e sistemas de distribuição de águas, por forma a reduzir a libertação, no meio ambiente, deste metal pesado. O chumbo é considerado um poluente prioritário pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US – EPA 2006). Assim, torna-se necessário determinar quais os níveis de tolerância máxima adequados para este poluente no solo, ar e água, de modo a reduzir os seus danos nos organismos e no meio ambiente.

Na Tabela 1.1, são apresentados os valores de concentração máximos de chumbo admitidos no solo, ar e águas para consumo humano, em Portugal.

Tabela 1.1 – Valores limite para a concentração de chumbo no solo, ar e água, em Portugal (decreto – lei nº 118/2006; decreto – lei nº 102/2010; decreto – lei nº 306/2007).

| Metal pesado | Valor limite nos solos (mg/mg matéria seca) | Valor limite no ar ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) | Concentração na água para consumo humano ($\mu\text{g}/\text{l}$) |
|---------------------|--|---|---|
| Pb | 50 - 450 | 0,5 | 10 |

Os limites máximos de concentração de chumbo no solo, ar e água, de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, estão apresentados na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 – Níveis de concentração máxima de chumbo no solo, ar e água segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (adaptado de Duruibe *et al.* 2007).

| Metal pesado | Máxima concentração nos solos (mg/l) | Máxima concentração no ar (mg/m^3) | Concentração na água para consumo humano (mg/l) |
|---------------------|---|--|--|
| Pb | 420 | - | 0,01 |

1.3. Efeitos tóxicos induzidos pelo chumbo

A exposição ao chumbo pode ter consequências severas para os organismos. Os danos causados pela exposição a este metal pesado variam mediante a dose, a duração e modo de contato e a interação com outros químicos (ATSDR 2007).

1.3.1. No ser humano

O organismo humano não tem a capacidade de transformar o chumbo noutra composto menos tóxico. Num adulto, cerca de 99% do chumbo ingerido é eliminado em poucas semanas, enquanto nas crianças apenas 32% é eliminado (ATSDR 2007). Em condições de exposição contínua, como grande parte do chumbo não é eliminado, este metal vai ser acumulado no organismo.

O chumbo provoca uma variedade de respostas adversas no ser humano, sendo particularmente críticos os efeitos neurológicos, tanto em adultos como em crianças (ATSDR 2007). O chumbo, no ser humano, pode ainda afetar o sistema hematopoiético e a homeostasia do cálcio. Este metal apresenta a capacidade de inibir ou imitar a ação do cálcio e ao interagir com os grupos sulfidrílo das proteínas pode alterar a sua conformação. A exposição a este metal pode ainda causar anemia, fraqueza muscular, aumento da pressão sanguínea e disfunção dos sistemas de reprodução. A níveis elevados de exposição, o chumbo pode danificar severamente o cérebro e rins, podendo mesmo levar à morte (Moreira e Moreira 2004). As crianças são mais sensíveis aos efeitos causados pelo chumbo. Para além dos danos referidos, o desenvolvimento físico e mental das crianças pode ser afetado quando estas são expostas ao metal, mesmo em pequenas concentrações. Em grávidas, a exposição a elevados níveis deste metal pode provocar aborto espontâneo ou o nascimento prematuro (ATSDR 2007; Moreira e Moreira 2004). A IARC (*International Agency for Research on Cancer*) defende que o chumbo, especialmente na forma inorgânica, pode ser um composto cancerígeno para os seres humanos. Contudo, o seu nível de carcinogenicidade ainda não foi determinado, quer para o chumbo quer para os seus derivados (ATSDR 2007).

1.3.2. Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*

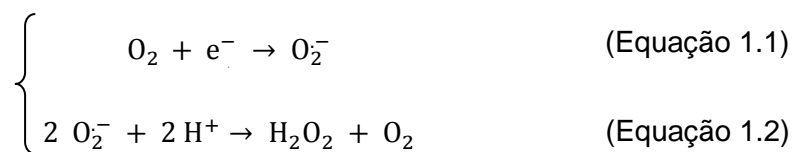
As células de levedura, especialmente de *Saccharomyces cerevisiae*, constituem um modelo adequado para o estudo dos efeitos tóxicos do chumbo. Isto deve-se ao facto de serem células eucarióticas, facilmente cultiváveis em laboratório

(uso de meios de cultura sem requisitos nutricionais especiais e baixo tempo de duplicação) e por apresentarem o genoma completamente sequenciado (Van der Heggen *et al.* 2010; Goffeau *et al.* 1996).

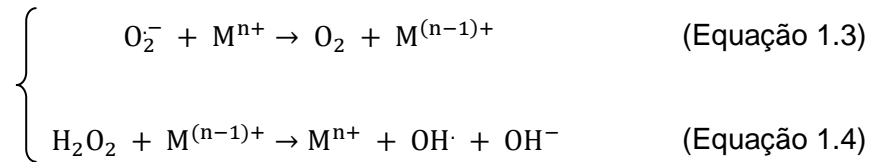
O chumbo provoca, na levedura *S. cerevisiae*, a perda da capacidade proliferativa (Chen e Wang 2007; Sakamoto *et al.* 2010; Suh *et al.* 1999; Soares *et al.* 2002, 2003), inibe a atividade metabólica (Van der Heggen *et al.* 2010), impede a assimilação do ião amónio, inibe a síntese proteica, e reduz a razão ADN/ARN (Chen e Wang 2007). Adicionalmente, provoca alterações morfológicas nucleares e a produção de espécies reativas de oxigénio, cuja acumulação pode induzir e regular a morte celular por apoptose (Bussche e Soares 2011). Um estudo com a cicloheximida mostrou que a perda da viabilidade induzida pelo chumbo está, também, dependente da síntese de proteínas, uma vez que a presença deste composto atenua a perda de viabilidade (Van der Heggen *et al.* 2010; Bussche e Soares 2011). Recentemente, foi mostrado que a glutatona (GSH) deve estar envolvida na defesa contra a toxicidade induzida pelo chumbo, dado que a depleção de GSH aumenta a sensibilidade ao chumbo e o seu enriquecimento celular apresenta um efeito contrário; no entanto, em concentrações fisiológicas, a GSH parece não ser suficiente para prevenir os efeitos tóxicos induzidos pelo chumbo (Perez *et al.* 2013).

1.4. Produção de espécies reativas de oxigénio

As espécies reativas de oxigénio (*Reactive Oxygen Species*, ROS), tais como o anião superóxido (O_2^-) (Equação 1.1), os radicais hidroxilo (OH^\cdot) e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Equação 1.2), resultam do metabolismo aeróbio (Avery 2001; Perrone *et al.* 2008).



A indução da produção de ROS por metais pode ocorrer de diferentes formas. Um aumento na produção de ROS pode ser provocado por metais redox – ativos ou por metais redox – inativos (Ercal *et al.* 2001). As reações de Fenton (Equação 1.3) ou Haber-Weiss (Equação 1.3 e 1.4) são catalisadas por metais redox – ativos, como por exemplo o cobre, o ferro e o crómio, originando radicais altamente reativos como os radicais hidroxilo, a partir do anião superóxido e do peróxido de hidrogénio (Avery 2001).



Os mecanismos mais prováveis para o *stress* oxidativo causado por metais redox – inativos, tais como o chumbo, o cádmio e o mercúrio, são a depleção dos grupos tióis e a danificação do sistema de defesa antioxidante da célula.

As células desenvolvem vários sistemas de defesa antioxidantes contra o ROS. A glutathiona (γ -glutamil-L-cisteinil-glicina, GSH) desempenha um papel importante na proteção das células contra o *stress* oxidativo. A GSH é constituída por grupos de ácido carboxílico, um grupo amina, um grupo sulfidrilo e duas ligações peptídicas como locais de ligação para os metais. O grupo funcional, -SH, é importante para a ligação do metal. A glutathiona redutase (GR) contribui para o sistema de defesa antioxidante uma vez que possibilita a regeneração da glutathiona da sua forma oxidada (GSSG) à sua forma reduzida (GSH). Quando presente, o chumbo vai interferir com a ligação bissulfito presente no centro ativo da GR, inibindo a enzima. Outras enzimas antioxidantes podem também ser alvo do chumbo, como por exemplo a peroxidase, a catalase e a superóxido dismutase. Estas enzimas atuam diretamente na remoção das espécies reativas de oxigénio (Ercal *et al.* 2001). Assim, a inibição da redução da GSSG e de outras enzimas antioxidantes conduz a um aumento da suscetibilidade das células aos danos oxidativos.

As espécies reativas de oxigénio têm a capacidade de provocar uma deterioração oxidativa nas proteínas, lípidos e ADN. Os danos causados pelo ROS estão relacionados com diferentes doenças degenerativas, como por exemplo a esclerose lateral amiotrófica, a doença de Alzheimer, a ataxia de Friedreich e o cancro (Avery 2011; Roberts *et al.* 2009).

1.4.1. Peroxidação lipídica e o papel da membrana

A membrana celular tem como funções principais assegurar os processos de transporte celulares e formar uma barreira seletiva. A disfunção da membrana está normalmente associada à perda de viabilidade celular. Entre as espécies reativas de oxigénio, o anião superóxido e o radical hidroxilo, geralmente, iniciam o processo autocatalítico da peroxidação lipídica (Avery 2011; Halliwell e Gutteridge 1999). A peroxidação lipídica consiste na conversão dos lípidos insaturados em lípidos hidroperóxidos polares, que pode causar um aumento da fluidez da membrana, o

efluxo de solutos citosólicos e a perda da atividade proteica da membrana. Uma peroxidação extensa tem sido relacionada com a desintegração da integridade da membrana e a morte celular (Avery 2001).

1.4.2. Oxidação das proteínas

Certas proteínas são mais vulneráveis à oxidação do que outras. Os fatores que determinam essa suscetibilidade são a presença de certos aminoácidos sensíveis à oxidação, tais como a cisteína, metionina e histidina, a localização da proteína na célula, a configuração molecular, o grau de degradação e a presença de locais de ligação de metais. A oxidação das proteínas está associada a reações específicas no processo metabólico e à modificação das funções que desempenham, podendo mesmo conduzir à inativação da proteína (Avery 2001, 2011).

1.4.3. Oxidação do ADN

Os principais ROS que afetam diretamente o ADN são o radical hidroxilo e o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), que é um poderoso oxidante. Os danos causados pela oxidação no ADN são a modificação das bases, a ligação das proteínas do ADN e a depurinação. Estes efeitos são semelhantes aos observados durante a exposição a metais. Ocorre um aumento da mutagenicidade devido à replicação errática e/ou à reparação dos danos causados no ADN (Halliwell e Gutteridge 1999).

1.4.4. O stress oxidativo nas mitocôndrias

A mitocôndria tem um papel importante em atividades celulares cruciais, tais como, a produção de ATP, através da fosforilação oxidativa, a biossíntese de pirimidinas e esteróides, a homeostasia do cálcio e do ferro e a intervenção na morte celular programada, por exemplo, a apoptose (Van Houten *et al.* 2006). É na membrana interior da mitocôndria que ocorre a fosforilação oxidativa, essencial para a manutenção do gradiente de prótons (Rickwood *et al.* 1988). Neste processo, a produção de ATP ocorre através do fluxo de elétrons que conduz à transferência de prótons ao longo da membrana interna mitocondrial, produzindo um potencial na mesma (Fariss *et al.* 2005). O último aceitador de elétrons é o oxigênio molecular que é reduzido a água. No entanto, durante a transferência de elétrons, uma certa porção escapa e ocorre a redução do oxigênio molecular na forma de anião superóxido (O_2^-) (Van Houten *et al.* 2006; Fariss *et al.* 2005). É estimado que cerca de 1% do oxigênio

consumido pode resultar na formação de ROS, que é maioritariamente produzido na mitocôndria. A produção mitocondrial do anião superóxido pode, na presença de ferro e através da reação de Fenton, resultar na formação de radicais hidroxilo muito reativos. Assim, o sistema antioxidante mitocondrial, enzimático ou não enzimático, é inibido pelo ROS conduzindo à morte ou a danos nas células (Fariss *et al.* 2005).

Um alvo crítico do *stress* oxidativo é o ADN mitocondrial, o que pode levar a danos letais numa célula. Os danos causados no ADN mitocondrial precedem a perda do transporte de eletrões, do potencial da membrana mitocondrial e da produção de ATP (Fig.1.1). Quando danificado, o ADN mitocondrial pode ainda amplificar o efeito do *stress* oxidativo pela diminuição da expressão de proteínas importantes no transporte de eletrões, levando a um ciclo vicioso de produção de ROS e de desregulação do organelo. Todos estes fatores podem conduzir à morte celular (Van Houten *et al.* 2006).

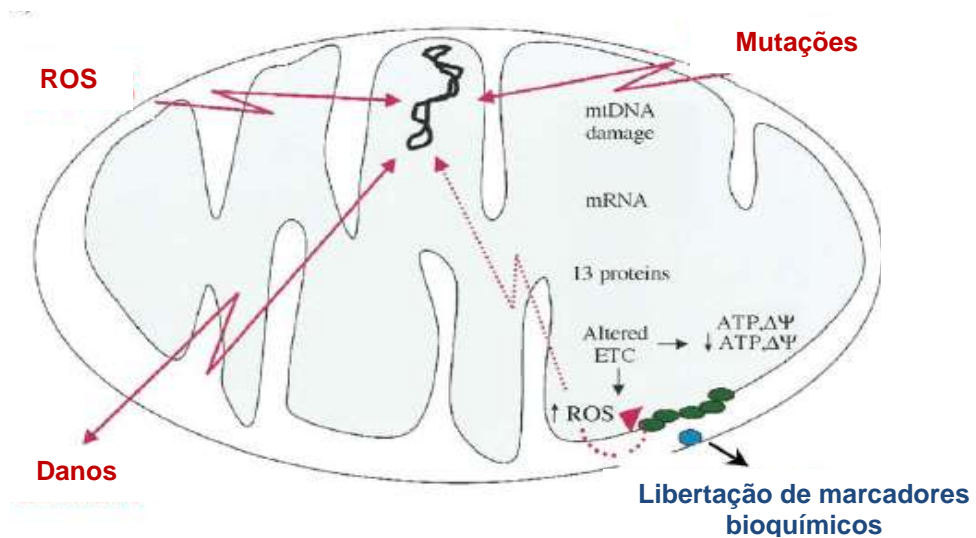


Figura 1.1 – O papel do ADN mitocondrial no *stress* oxidativo. Os danos do ADN mitocondrial podem levar à perda da expressão de proteínas, diminuição do transporte de eletrões que aumentam a produção de ROS, a perda do potencial da membrana mitocondrial e a liberação de marcadores que conduzem à morte celular (adaptado de Van Houten *et al.* 2006).

1.5. Mecanismos de desintoxicação: efluxo, quelatação e sequestração vacuolar

As células utilizam vários mecanismos de tolerância com o objetivo de regular o acesso aos metais essenciais e controlar os danos causados por metais tóxicos (Wysocki e Tamás 2010). Quando presentes no citosol, os metais podem sofrer os seguintes mecanismos de desintoxicação: efluxo, quelatação e sequestração vacuolar. Para este último mecanismo, o vacúolo apresenta um papel muito importante em todo o processo.

1.5.1. Efluxo e quelatação

Na levedura *S. cerevisiae*, encontram-se caracterizadas, com detalhe, duas vias de exportação de metais, designadas de Acr3p e Pca1p, as quais catalisam o efluxo de As(III) e Cd (II), respetivamente. Acr3p é um membro da família de transportadores resistentes ao As (III), pertencentes à superfamília de transportadores BART (*bile/arsenite/riboflavin*), que promovem o efluxo de As (III). As células deficientes em Acr3p são altamente sensíveis ao As (III). Quando o gene *ACR3* está presente, verifica-se uma diminuição dos níveis citosólicos de As, melhorando a tolerância da célula ao metal. Estes efeitos mostram o papel fundamental do gene *ACR3* no efluxo de As (III) (Mansour *et al.* 2007). Pca1p pertence à superfamília ATPase tipo P_{1B}, a qual está sempre presente nas células e efetua o transporte de uma grande variedade de metais, tais como: Ag, Cd, Co, Cu, Pb and Zn. O transportador Pca1p constitui a principal via de exportação do Cd, desempenhando um papel fundamental na tolerância da célula a este metal (Wysocki e Tamás 2010; Adle *et al.* 2007).

As proteínas e péptidos de baixo peso molecular ricos em cisteína, tais como a glutathione (GSH) e as metalotioneínas (MT), contribuem para a desintoxicação de metais por quelatação. Este mecanismo leva à formação de complexos que são reconhecidos como substrato pelos transportadores para posterior exportação e, conseqüentemente, conduz à diminuição de metais presentes no citosol, como por exemplo o Cd, Cu, Ag, Hg, Zn e o As (Wysocki e Tamás 2010).

1.5.2. Sequestração vacuolar

A sequestração vacuolar, isto é, o transporte de metais para o interior do vacúolo, é também um mecanismo importante de desintoxicação nos eucariontes.

1.5.2.1. Funções do vacúolo e morfologia

As principais funções do vacúolo são o isolamento de componentes que podem ser prejudiciais ou tóxicos para a célula (sequestração vacuolar) e a manutenção da pressão hidrostática interna na mesma (Junqueira e Carneiro 2000).

O vacúolo é o organelo cuja morfologia é altamente reativa a diferentes estímulos intra e extracelulares. Durante a fase exponencial, as células metabolicamente ativas têm vacúolos constituídos por múltiplos lóbulos de tamanho médio. Esses lóbulos fundem-se num único vacúolo na fase estacionária ou com a privação de glucose. Um efeito mais notório ocorre quando a célula é exposta a um *stress* osmótico, onde o seu vacúolo se fragmenta em pequenas vesículas. Porém, quando exposto a condições hipotónicas, o vacúolo tende a expandir, ocupando uma grande parte do volume da célula (Li e Kane 2009).

1.5.2.2. Constituição e papel da V-ATPase

As H⁺-ATPases vacuolares (V-ATPase) são funcionalmente bombas de prótons. Nas células eucarióticas, as V-ATPases são responsáveis pela acidificação de vários organelos, incluindo os lisossomas, os endossomas, o vacúolo e o complexo de Golgi (Kane 2007). As V-ATPases contribuem para o controlo do pH celular em todos os componentes celulares referidos (Kane 2007; Li e Kane 2009).

Nos eucariontes, as V-ATPases apresentam uma estrutura muito semelhante, constituídas por cerca de 14 subunidades, organizadas em dois domínios: o domínio V1, periférico, e o domínio V0, associado à membrana (Figura 1.2). O domínio V0 é responsável pelo transporte de prótons através da membrana. As subunidades que o constituem são a *a*, *d*, *c*, *c'*, *c''* e *e*, onde as subunidades *c*, *c'* e *c''* são proteínas hidrofóbicas, denominadas de proteolípidos. O domínio V1 está associado à hidrólise de ATP, do qual fazem parte as subunidades A a H. As subunidades A e B intervêm na hidrólise de ATP, enquanto as subunidades E e G formam as hastes periféricas que unem as subunidades catalíticas à subunidade *a* do domínio V0 e estabilizam o complexo durante a rotação. As subunidades D e F, constituem o rotor central,

responsáveis pela ligação da energia libertada na hidrólise de ATP à rotação das subunidades *c* em relação à subunidade *a* (Figura 1.2) (Zhang et al. 2008).

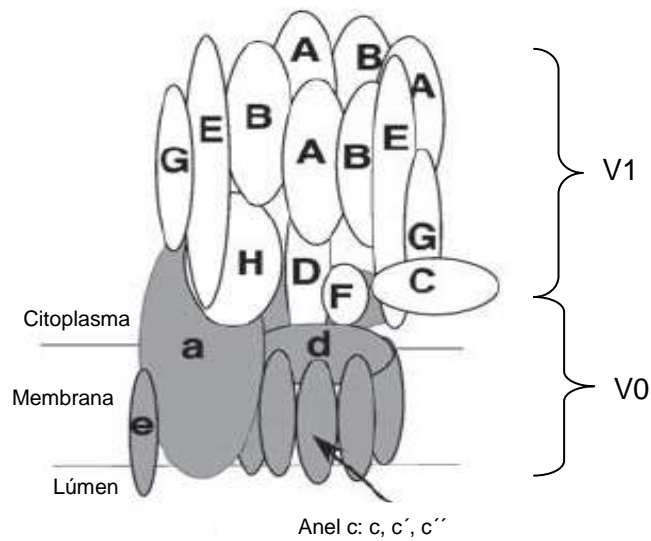


Figura 1.2 – Modelo estrutural da V-ATPase e designação das subunidades constituintes de cada domínio (adaptado de Kane 2007).

A eliminação de qualquer uma das subunidades da V-ATPase, referidas anteriormente, resulta na formação de fenótipos muito similares. Estes mutantes são caracterizados por terem um crescimento suscetível ao pH e ao cálcio, uma morfologia anormal do vacúolo, incapacidade de crescimento com fontes de carbono não fermentáveis, sensibilidade à presença de iões metálicos e às variadas formas de *stress oxidativo* (Kane 2007).

1.5.2.3. Mutantes VPS Classe C

Na levedura *S. cerevisiae*, a família de proteínas VPS (*Vacuolar Protein Sorting*) é codificada por mais de 50 genes. Os quatro genes VPS da classe C, *VPS11* (*PEP 5*), *VPS16*, *VPS18* (*PEP 3*) e *VPS33*, codificam proteínas que são essenciais para a biogénese do vacúolo. Leveduras deficientes em qualquer um destes genes não apresentam qualquer estrutura do tipo vacuolar, o que resulta num aumento drástico da sensibilidade à morte celular (Banta et al. 1988; Raymond et al. 1992; Eisenberg et al. 2010).

1.5.2.4. Papel da superfamília ABC

A família de transportadores mais comum no mecanismo de desintoxicação de metais por sequestração vacuolar é a superfamília ABC (*ATP-binding cassette*). Os transportadores pertencentes à superfamília ABC catalisam o transporte através da membrana citoplasmática e vacuolar, dependente de ATP, de vários compostos (Fig.1.3). Estes transportadores são constituídos por duas metades homólogas: o domínio MSD (*membrane spanning domain*) e o domínio NBD (*nucleotide-binding domain*). A superfamília ABC encontra-se dividida em várias subfamílias, baseadas na afinidade de sequências dentro do domínio NBD (Paumi *et al.* 2009).

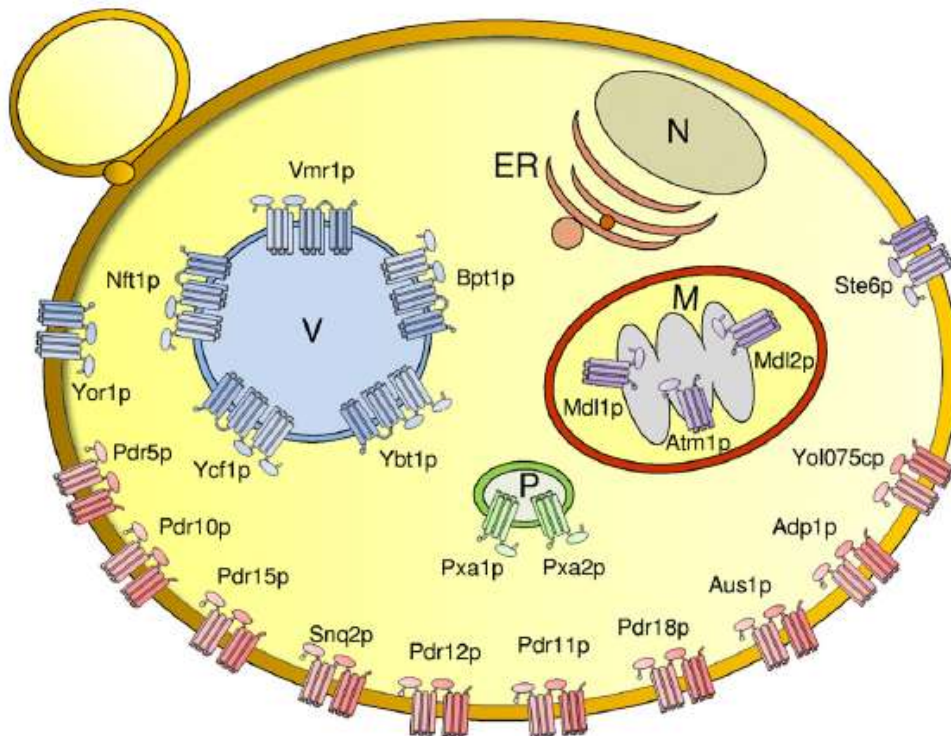


Figura 1.3 – Localização dos diferentes transportadores da superfamília ABC na levedura *S. cerevisiae*. A subfamília ABCC está representada a azul. ER – retículo endoplasmático; M – mitocôndria; N – núcleo; P – peroxissoma; V – vacúolo (adaptado de Paumi *et al.* 2009).

Os transportadores da subfamília ABCC apresentam um papel importante na sequestração de xenobióticos e de metabolitos tóxicos os quais são previamente conjugados com a GSH, glicuronídeo ou sulfato (Paumi *et al.* 2009). Na levedura *S. cerevisiae* o transportador Ycf1p foi o primeiro transportador identificado pertencente à subfamília de transportadores ABCC, representa uma importante via de sequestração

vacuolar de metais (nomeadamente de cádmio) e xenobióticos conjugados com a GSH. Pode ainda transportar outros compostos citotóxicos, tais como, toxinas celulares endógenas que se formam normalmente no processo metabólico. As células sem o transportador Ycf1p são muito sensíveis ao Cd, Hg, Pb e Sb (III) e moderadamente ao As (III), crescendo normalmente na presença de outros metais. O Ycf1p catalisa o transporte de metais como o As, Cd e o Hg (Wysocki e Tamás 2010). Vmr1p é outro transportador importante pertencente à subfamília ABCC e está especialmente envolvido na sequestração de variadas drogas. Na ausência deste transportador, as células tornam-se sensíveis à presença de certos metais, como o Cd e o Hg (Paumi *et al.* 2009).

1.6. Objetivos da presente dissertação

O presente trabalho tem como objetivo contribuir para a elucidação dos mecanismos associados com os efeitos tóxicos do chumbo, bem como os respetivos mecanismos de defesa, usando como modelo celular a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Para o efeito será:

- 1) efetuado um estudo cinético da viabilidade celular, integridade membranar e produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) em leveduras expostas a duas concentrações de Pb;
- 2) examinado o contributo das mitocôndrias na produção de ROS induzido por chumbo;
- 3) avaliada a importância da H⁺-ATPase vacuolar (V-ATPase) e de transportadores presentes na membrana vacuolar, pertencentes à superfamília ABC, na defesa contra a toxicidade do Pb;
- 4) visualizado o impacto do Pb na morfologia vacuolar.

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

2.1. Microrganismos

As estirpes da levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na presente dissertação encontram-se indicadas na Tabela 2.1. A estirpe BY4741 foi usada como controlo (WT). Todas as estirpes foram obtidas da EUROSCARF (Frankfurt, Alemanha), exceto a estirpe 95700 (Vma2p-GFP) que foi obtida da *yeast Green Fluorescent Protein clone collection* (Invitrogen, EUA).

Tabela 2.1 – Estirpes da levedura *S. cerevisiae* usadas neste trabalho.

| Referência | Estirpe | Genótipo | Comentário |
|------------------------|-----------------------|---|---|
| BY4741 | Estirpe selvagem (WT) | (MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0) | Estirpe controlo |
| Y03883 | <i>vma1</i> Δ | BY4741; <i>YDL185w::kanMX4</i> | Sem a subunidade A do setor catalítico da V-ATPase |
| Y03266 | <i>vma2</i> Δ | BY4741; <i>YBR127c::kanMX4</i> | Sem a subunidade B do setor catalítico da V-ATPase |
| Y00268 | <i>vma3</i> Δ | BY4741; <i>YEL027w::kanMX4</i> | Sem a subunidade c (proteólípido) da V-ATPase |
| Y07328 | <i>vph1</i> Δ | BY4741; <i>YOR270c::kanMX4</i> | Sem a subunidade a da V-ATPase |
| Y04069 | <i>ycf1</i> Δ | BY4741; <i>YHL035c::kanMX4</i> | Sem a proteína da membrana vacuolar Ycf1p |
| Y00928 | <i>vmr1</i> Δ | BY4741; <i>YHL035c::kanMX4</i> | Sem a proteína da membrana vacuolar Vmr1p |
| 95700 (YBR127c) | Vma2p-GFP | BY4741; <i>VMA2-GFP</i> | Subunidade B do setor catalítico da V-ATPase (Vma2p) marcada na região terminal-C com a proteína verde fluorescente (GFP) |

2.2. Condições de crescimento

As estirpes foram armazenadas a 4°C, em tubos contendo YEPD – agar: 1% (m/v) extrato de levedura, 2% (m/v) peptona, 2% (m/v) glucose e 2% (m/v) agar. Os mutantes foram mantidos sob uma pressão seletiva em YEPD – agar com 0,02% (p/v) geneticina.

As pré-culturas foram preparadas em 10 ou 40 ml, de meio líquido YEPD ou YEPGli [1% (m/v) extrato de levedura, 2% (m/v) peptona e 2% (v/v) glicerol], em frascos de Erlenmeyer de 100 ml de capacidade. As células foram incubadas, num agitador orbital, a 25°C e 150 rpm, durante 8 (YEPD) ou 24h (YEPGli).

As culturas, em fase exponencial de crescimento, foram obtidas por inoculação de 40 ou 100 ml de meio líquido YEPD ou YEPGli, em frasco Erlenmeyer com 100 ou 250 ml de capacidade, respetivamente, com o volume apropriado da pré-cultura por forma a se obter, após 16h (YEPD) ou 24h (YEPGli) uma $DO_{600} \sim 1$. As culturas foram incubadas nas mesmas condições das pré-culturas.

2.3. Determinação do número de células

As células retiradas dos frascos de Erlenmeyer foram diluídas (10 ou 20x) em água desionizada, uma vez que densidade ótica (DO) a 600 nm não deve ser superior a 0,6. A DO foi medida num espectrofotómetro com o comprimento de onda de 600 nm. O número de células foi determinado segundo a Equação 2.1.

$$N^{\circ} \text{ células} \times 10^6/\text{ml} = 20,237 \times DO_{600} - 0,1348 \quad (\text{Equação 2.1})$$

2.4. Preparação da suspensão de células

As células, em fase exponencial de crescimento, foram removidas por centrifugação (2000 x g, 5 minutos) e lavadas duas vezes com água desionizada. Posteriormente, as células foram suspensas em 10 ml de água desionizada. Todo este tratamento foi realizado em condições estéreis. A determinação do número de células foi efetuada de acordo com o procedimento descrito na secção 2.3.

2.5. Avaliação da suscetibilidade ao chumbo

As células foram obtidas e preparadas como descrito nas secções 2.2. e 2.4. Em seguida, foram colocadas em tampão MES (10 mmol/l, pH 6,0), com 2% (m/v) de glucose ou 2% (m/v) de glicerol. Posteriormente, foi adicionado um volume apropriado de uma solução padrão (2000 mg/l, Merck) de chumbo ou de água desionizada, de modo a se obter uma gama de trabalho de 0 a 1000 $\mu\text{mol/l}$ de chumbo. As suspensões celulares, em frascos Erlenmeyer de 100 ou 250 ml de capacidade, foram agitadas a 150 rpm a 25°C, durante 3 horas.

Foram retiradas duas amostras de 1 ml, antes e após a adição do chumbo, para tubos contendo 9 ml de EDTA (3 mmol/l) estéril. As amostras foram, seguidamente, diluídas em 9 ml de água desionizada estéril (3 ou 4 vezes) e foi realizado o plaqueamento em YEPD-agar (Figura 2.1) ou YEPGli-agar. As colónias foram contadas após 3 a 5 dias de incubação a 25°C. A viabilidade celular foi determinada usando o número de unidades formadoras de colónias (UFC) no tempo zero (100%).



Figura 2.1 – Plaqueamento em YEPD-agar para determinação da viabilidade celular.

2.6. Estudo da integridade membranar

A avaliação da integridade membranar foi realizada usando o iodeto de propídeo (IP). O ensaio foi preparado como descrito na secção 2.5; 5 minutos antes dos tempos definidos (indicados na figura 3.2), foi retirado 1 ml da suspensão para um Eppendorf, ao qual foi adicionado IP (numa concentração final de 3 $\mu\text{g/ml}$), sendo depois colocado a incubar, no escuro, a 25°C. Após incubação, as amostras foram diluídas em tampão MES (de modo a se obter uma densidade de 2×10^6 células/ml). A

análise das amostras foi efetuada no citómetro de imagem Tali (Invitrogen, Life). Em cada ensaio foram analisadas cerca de 10000 células, utilizando o canal vermelho (Ex = 543/22 nm; Em = 585 nm).

Como controlo positivo, as células foram inativadas a 65°C, durante 60 minutos e, posteriormente, coradas e analisadas de acordo com o procedimento descrito para o ensaio com chumbo.

2.7. Determinação da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS)

A avaliação da produção intracelular de ROS foi efetuada com as sondas H₂DCFDA e DHE. Para o efeito, as células foram suspensas numa concentração final de 1×10^7 células/ml em tampão MES (10 mmol/l e pH 6,0), com 2% (m/v) de glucose e adicionado H₂DCFDA numa concentração final de 20 µmol/l. As suspensões celulares foram homogeneizadas e incubadas durante 20 minutos, no escuro, a 25°C. Posteriormente, foi adicionado um volume apropriado da solução de chumbo ou de água desionizada, por forma a se obterem concentrações entre 0 e 1000 µmol/l. Para a coloração com DHE o procedimento foi similar ao descrito para o H₂DCFDA. Para tal, as células foram incubadas com DHE, numa concentração final de 8 µmol/l, durante 10 minutos, a 25°C, no escuro, antes da adição de chumbo ou de água desionizada (controlo).

A intensidade de fluorescência foi medida, em intervalos de tempo definidos, num leitor de microplacas (PerkinElmer, Victor³). Para o H₂DCFDA, o comprimento de onda de excitação foi de 485/14 nm e de emissão 535/25 nm. No caso do DHE, o comprimento de onda de excitação foi de 485/14 nm e de emissão 620/8 nm. O valor de fluorescência, unidade relativa de fluorescência (URF), foi corrigido subtraindo o valor da autofluorescência do tampão, do chumbo e da sonda fluorescente usada.

Para a análise por microscopia de fluorescência, as células foram tratadas como descrito em cima e observadas em microscópio equipado com um sistema de filtros I3 (H₂DCFDA/IP) ou N2.1 (DHE) da Leica. As imagens foram adquiridas usando uma câmara Leica DC 300F e processadas usando *software* Leica IM50.

2.8. Obtenção de mutantes deficientes respiratórios (ρ^0)

A obtenção de mutantes deficientes respiratórios foi realizada de acordo com o procedimento descrito na literatura (Rickwood *et al.* 1988). Deste modo, as células da estirpe BY4741, em fase exponencial de crescimento ($DO_{600nm} \approx 0,5$), foram inoculadas numa concentração final de 1×10^5 células/ml, em 10 ml de YEPD, contendo brometo de etídio numa concentração final de 40 $\mu\text{g/ml}$. A cultura foi incubada no escuro, a 25°C, com uma agitação de 150 rpm. Após 24 h, 100 μl da cultura foi reinoculada em 10 ml de YEPD, contendo brometo de etídio numa concentração final de 40 $\mu\text{g/ml}$ e incubada nas condições anteriormente descritas. Após 24h, foi efetuada uma diluição sucessiva da cultura, em água desionizada, e realizado o plaqueamento em YEPD-agar. As placas foram incubadas a 25°C, durante 3 a 5 dias. Foram selecionadas 10 colónias as quais foram sujeitas a um rastreio de confirmação quanto à sua deficiência respiratória utilizando-se para o efeito placas de YEPD e YEPGli. Os mutantes incapazes de crescer em YEPGli foram novamente plaqueados em YEPD e YEPGli e subsequentemente observados microscopicamente, após coloração com DAPI, como descrito na secção 2.10.

2.9. Quantificação de mutantes deficientes respiratórios

A quantificação de mutantes deficientes respiratórios em células expostas a chumbo foi realizada através do plaqueamento, da diluição conveniente, em YEPD-agar e em YEPGli-agar. A percentagem de deficientes respiratórios (%DR) foi determinada através da equação 2.2:

$$\% \text{ DR} = (\text{n}^\circ\text{colónias YEPD} - \text{n}^\circ\text{colónias YEPGli}) / (\text{n}^\circ\text{colónias YEPD}) \times 100 \quad (\text{Equação 2.2})$$

2.10. Coloração do ADN nuclear e mitocondrial

Para a coloração do núcleo e das mitocôndrias foi usado o corante 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Células das culturas em fase exponencial de crescimento foram centrifugadas, lavadas e seguidamente suspensas em PBS (40 mmol/l, pH 7,4). As células foram coradas com DAPI (numa concentração final de 3 $\mu\text{mol/l}$) e incubadas, à temperatura ambiente, no escuro, durante 15 minutos. As células foram analisadas num microscópio de fluorescência, equipado com um sistema de filtros A (Leica). As imagens foram adquiridas e processadas como descrito anteriormente.

2.11. Análise da morfologia vacuolar

A análise da morfologia vacuolar das células expostas a chumbo foi efetuada recorrendo-se à estirpe Vma2p-GFP. Esta estirpe apresenta a subunidade B do domínio V1 (Vma2p) da V-ATPase marcada no seu terminal C com a proteína verde fluorescente (GFP), o que permite localizar a membrana vacuolar sem necessidade de qualquer coloração (Sambade *et al.* 2005).

As células da estirpe Vma2p-GFP, em fase exponencial de crescimento ($DO_{600} \sim 1.0$) foram lavadas e tratadas como descrito para a estirpe BY4741. Subsequentemente, as células foram lavadas e suspensas em tampão HEPES (10 mmol/l, pH 7,4), com 2% (m/v) de glucose e observadas num microscópio de fluorescência, equipado com um sistema de filtros GFP (Leica). As imagens foram adquiridas e processadas como descrito anteriormente.

2.12. Reprodutibilidade dos resultados e tratamento estatístico

Todas as experiências foram repetidas independentemente, duas a seis vezes. A medição de fluorescência, em cada experiência, foi efetuada em quadruplicado. Os resultados estão apresentados como a média das experiências e os respetivos desvios padrão com um limite de confiança de 95%.

Os valores das médias da viabilidade celular foram sujeitos a um tratamento estatístico: *one-way* ANOVA, seguido pelo método comparação múltipla de Tukey – Kramer ou teste *t*, para amostras independentes.

Os valores de EC_{50} representam a concentração de chumbo que causa a perda de 50% da capacidade proliferativa da população (viabilidade), usando como comparação o controlo positivo (células não expostas a chumbo). Os valores de concentração efetiva (EC) foram calculados utilizando o programa TOXCALC versão 5.0.32 (Tidepool Scientific Software).

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

3.1. Estudo da toxicidade do chumbo

Primeiramente, o presente trabalho teve como objetivo o estudo do efeito tóxico induzido pelo chumbo na levedura *S. cerevisiae*, através da análise da viabilidade celular, da integridade membranar e da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS).

3.1.1. Perda da capacidade proliferativa

A presença de chumbo pode ter diversas consequências na levedura *S. cerevisiae*, tais como a perda da viabilidade celular (Van der Heggen *et al.* 2010) e a produção de espécies reativas de oxigénio (Bussche e Soares 2011). Os estudos anteriormente descritos foram realizados numa estirpe industrial (cervejeira). No presente trabalho, foi avaliado o impacto de duas concentrações de chumbo, 250 e 1000 $\mu\text{mol/l}$, na viabilidade celular (estimada pela capacidade das células proliferarem em YEPD – agar) da estirpe laboratorial BY4741.

Analisando a Figura 3.1 verifica-se que, para ambas as concentrações de chumbo, há uma perda progressiva da capacidade de proliferação celular da estirpe BY4741. Para a concentração de 250 $\mu\text{mol/l}$ Pb, ao fim de 3 horas, ~53% das células apresentaram a capacidade de formar colónias. Para 1000 $\mu\text{mol/l}$, ao fim de 3 horas, a viabilidade celular da estirpe foi de ~17%. No estudo anteriormente referido (Bussche e Soares 2011), onde foi usada uma estirpe industrial da levedura *S. cerevisiae*, as células incubadas com 1000 $\mu\text{mol/l}$, durante 6 horas, apresentaram uma viabilidade de 16% (Bussche e Soares 2011). Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram verificar que a estirpe laboratorial BY4741 é mais sensível ao chumbo que a estirpe cervejeira.

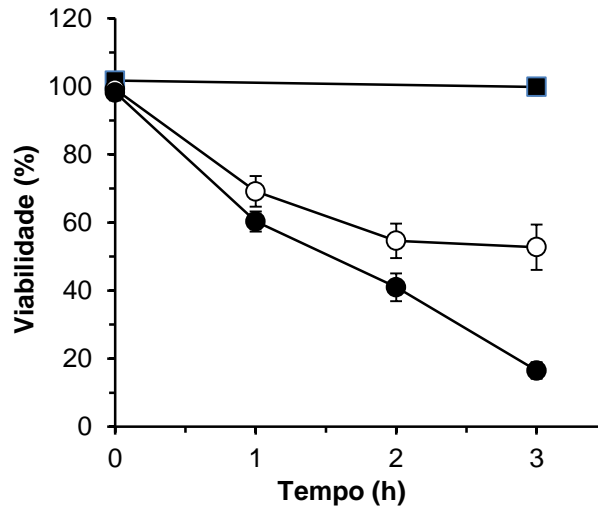


Figura 3.1 – Viabilidade da levedura *S. cerevisiae* BY4741 durante a exposição ao chumbo. As células foram suspensas no tampão MES (10 mmol/l a pH 6,0), com 2% (m/v) de glucose, tratadas na ausência de chumbo (quadrados a preto) ou com as concentrações de 250 µmol/l (círculos a branco) ou 1000 µmol/l Pb (círculos a preto). A viabilidade foi estimada pela contagem de unidades formadoras de colónias (UFC). Os valores apresentados correspondem à média de pelo menos seis experiências independentes. Os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais). Para todos os tempos de ensaio, a diferença entre 250 e 1000 µmol/l de chumbo é muito significativa (teste *t* para amostras independentes; $P < 0,001$).

3.1.2. Perda da integridade membranas

A morte celular pode estar relacionada com vários fatores, tais como, a perda da capacidade proliferativa e a ruptura da membrana celular. No entanto, está descrito que é possível ocorrer a perda da capacidade proliferativa sem que haja a perda da integridade da membrana celular (Wloch-Salamon e Bem 2013).

Para se avaliar o efeito do Pb na integridade da membrana celular, as células da estirpe *S. cerevisiae* BY4741 após a exposição a duas concentrações de chumbo (250 e 1000 µmol/l) foram incubadas com IP; a análise das células foi efetuada por citometria de imagem (Figura 3.2A). O IP é excluído das células com a membrana íntegra; pelo contrário, as células com a membrana celular danificada são penetradas pelo corante o qual apresenta uma marcada fluorescência laranja-vermelho após se ligar aos ácidos nucleicos (Haugland 2005) (células IP positivo – Figura 3.2B).

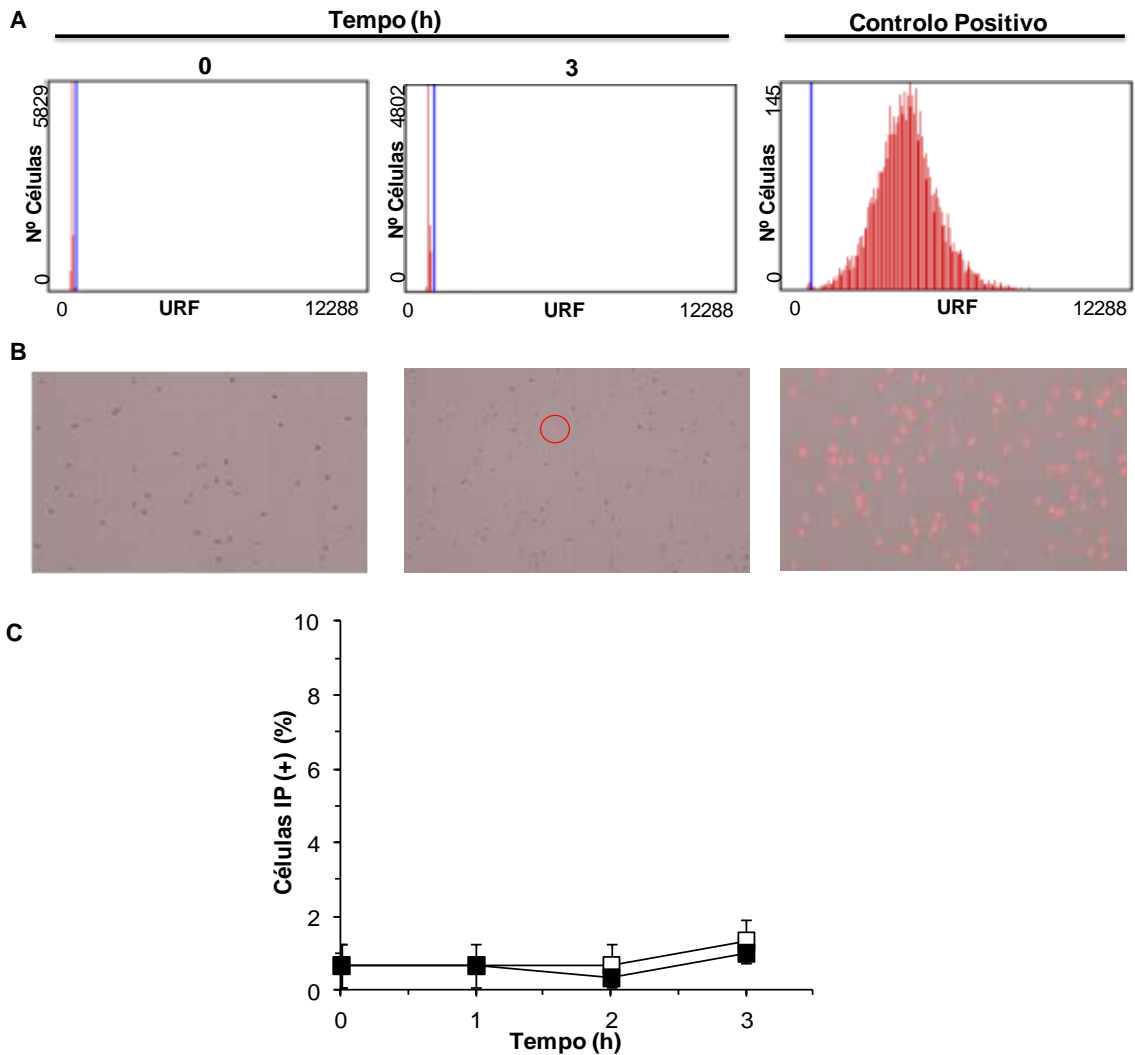


Figura 3.2 – Integridade membranar das células da levedura *S. cerevisiae* BY4741 durante a exposição ao chumbo. As células (1×10^7 células/ml) foram suspensas no tampão MES e incubadas com 250 $\mu\text{mol/l}$ ou 1000 $\mu\text{mol/l}$ Pb; a tempos definidos as células foram incubadas com IP. A – Histogramas obtidos por citometria de imagem para células no início do ensaio ($t=0$) ou após 3h de exposição a 1000 $\mu\text{mol/l}$ Pb; como controlo positivo (perda da integridade membranar da população celular) as células foram tratadas termicamente (65°C, 60 min); a linha azul representa o limiar de URF selecionado. B – Fotos de imagens representativas das condições referidas em A; o círculo a vermelho identifica uma célula IP positiva. C – Evolução da perda da integridade membranar (percentagem de células IP positivo) das leveduras incubadas com 250 $\mu\text{mol/l}$ (quadrados a preto) ou 1000 $\mu\text{mol/l}$ Pb (quadrados a branco). Os valores apresentados correspondem à média de três experiências independentes. Os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais).

Na figura 3.2C é possível observar que não ocorre uma perda importante da integridade da membrana celular, ao longo do tempo de exposição ao chumbo. Ao fim de 3 horas, a perda da integridade membranar (células IP positivo) é semelhante (~1 %) para ambas as concentrações de chumbo. A análise comparativa da capacidade proliferativa (Figura 3.1) e da integridade membranar (Figura 3.2) da estirpe laboratorial usada no presente trabalho, quando exposta até 1000 $\mu\text{mol/l}$ Pb, permite concluir que a incapacidade das células se multiplicarem não está associada à perda da integridade membranar. Assim, a morte celular não tem como consequência direta a disrupção da membrana celular. Estes resultados estão de acordo com os descritos na literatura, para uma estirpe industrial da levedura *S. cerevisiae*, segundo os quais as células incubadas com 1000 $\mu\text{mol/l}$, durante 6 horas, não apresentaram uma perda apreciável da integridade membranar (Bussche e Soares 2011).

3.1.3. Indução de espécies reativas de oxigénio

Formas de vida aeróbias requerem que o organismo seja capaz de resistir aos danos causados pelo ROS (Avery 2011). Está descrito que certos metais têm a capacidade de promover danos através da indução da produção de ROS nas células, podendo ainda conduzir à inibição do crescimento e à morte celular (Avery 2001). Nesse sentido, foi realizado o estudo da influência do chumbo na produção de ROS na estirpe BY4741, utilizando-se para o efeito duas sondas: diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (H_2DCFDA) e dihidroetídio (DHE). A sonda H_2DCFDA , na presença de H_2O_2 , é oxidada a 2',7'-diclorofluoresceína e exibe fluorescência verde. A sonda DHE na presença do anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) é oxidada a etídio, produzindo uma fluorescência vermelha (Guaragnella *et al.* 2007).

A figura 3.3 apresenta os resultados obtidos para ambas as sondas com a concentração de 1000 $\mu\text{mol/l}$ de Pb. Pela análise da figura, verifica-se que, em termos cinéticos, o anião superóxido precede o aparecimento do peróxido de hidrogénio; a formação de anião superóxido foi detetada entre os 45 e 60 minutos, enquanto a formação de peróxido de hidrogénio foi detetada entre os 60 e 90 minutos. Resultados similares foram observados quando as células foram expostas a 250 $\mu\text{mol/l}$ de chumbo (resultados não mostrados). Estes resultados estão de acordo com o que foi anteriormente descrito (Equação 1.2 - Capítulo 1), uma vez que o anião superóxido dá origem ao H_2O_2 (Avery 2001; Perrone *et al.* 2008). É possível ainda observar através da figura 3.3 que a presença de chumbo aumenta drasticamente a produção de ROS nas células da estirpe BY4741.

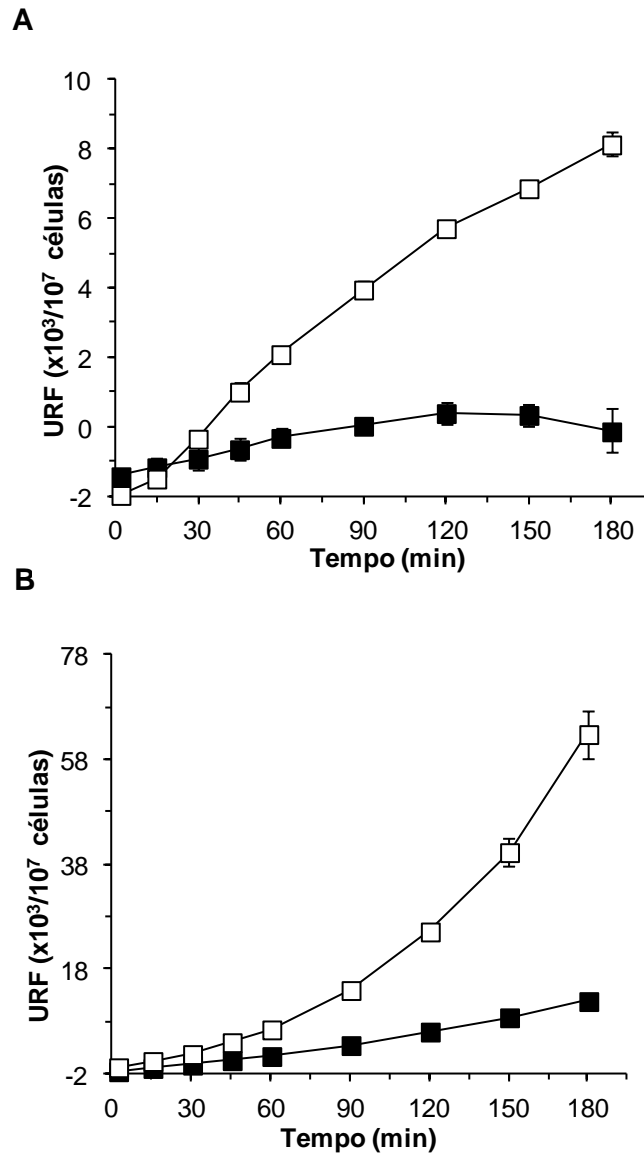


Figura 3.3 – Produção de ROS pela levedura *S. cerevisiae* BY4741 quando exposta a 1000 $\mu\text{mol/l}$ de chumbo. A – Utilização da sonda DHE para monitorizar a produção do anião superóxido. B – Utilização da sonda H₂DCFDA para avaliar a produção de H₂O₂. As células foram incubadas em tampão MES com DHE ou com H₂DCFDA, durante 10 e 20 minutos, respetivamente, e colocadas na ausência de chumbo (quadrados pretos) ou na presença de 1000 $\mu\text{mol/l}$ de chumbo (quadrados brancos). Os valores apresentados correspondem à média de quatro medições de fluorescência. Os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais). A figura é uma representação típica de uma experiência repetida pelo menos seis vezes.

As células incubadas com o H₂DCFDA e com 1000 µmol/l de chumbo, durante 3 horas, apresentam uma forte fluorescência verde devido à acumulação intracelular de ROS (Figura 3.4). O mesmo é observado com o DHE, para as mesmas condições, onde as células exibem uma nítida fluorescência vermelha (Figura 3.4). No controlo (células incubadas na ausência de chumbo), quando é usado o H₂DCFDA, não se observa a acumulação de H₂O₂ no interior da célula. Relativamente ao DHE, o controlo apresenta apenas uma ténue fluorescência vermelha.

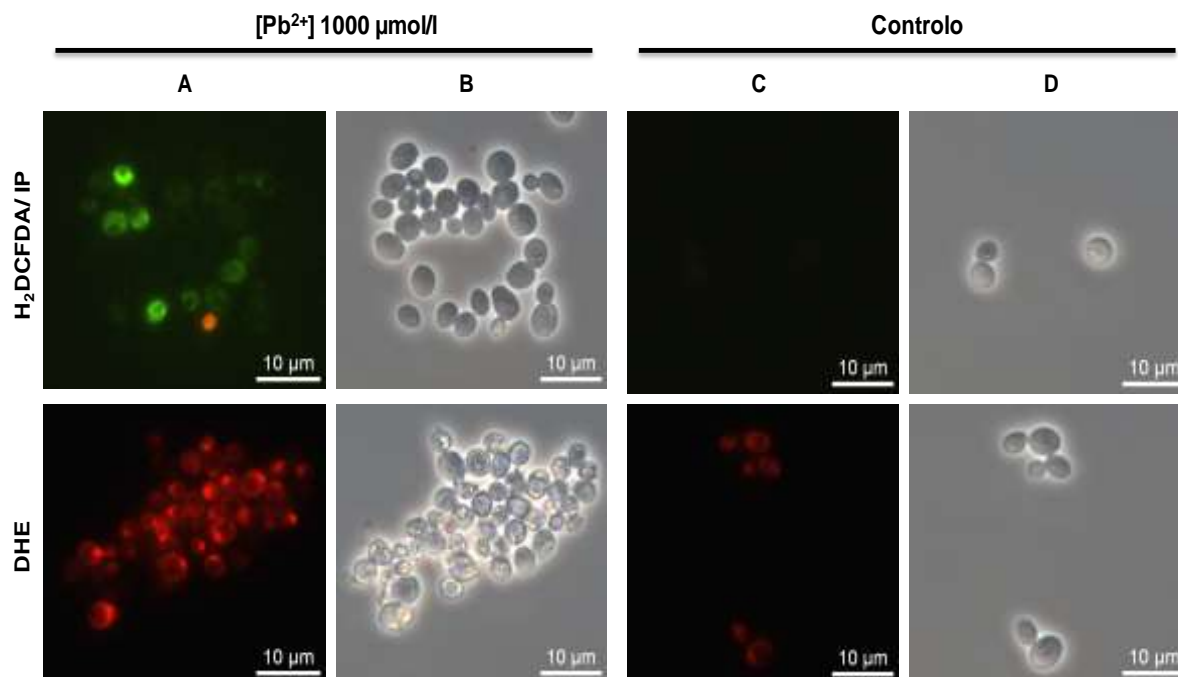


Figura 3.4 – Visualização da acumulação intracelular de ROS pela levedura *S. cerevisiae* BY4741 quando exposta a 1000 µmol/l de chumbo. As células foram incubadas com H₂DCFDA e IP ou com DHE, sendo posteriormente colocadas na ausência (controlo) ou na presença de 1000 µmol/L de chumbo, durante 3h. Fotografias de microscopia de fluorescência (A e C) e fotografias de microscopia de contraste de fase das mesmas células (B e D).

Em resumo, a produção do anião superóxido antecede a produção de H₂O₂ em células de *S. cerevisiae* expostas a chumbo. Por outro lado, foi possível observar que o tratamento com chumbo aumenta drasticamente a produção e acumulação de ROS nas células, o que similarmente pode ser observado para a perda de viabilidade celular (Figura 3.1). Em conjunto, estes resultados sugerem que a produção elevada de ROS, induzida pelo chumbo, poderá estar na origem da perda da capacidade de proliferação da levedura em estudo.

3.2. Papel das mitocôndrias no *stress* oxidativo induzido por chumbo

Um outro objetivo deste trabalho consistiu na avaliação da influência das mitocôndrias na produção de ROS induzido pelo chumbo.

3.2.1. Obtenção de mutantes ρ^0

A levedura *S. cerevisiae* é um microrganismo aeróbio facultativo e, por isso, tem a capacidade de sobreviver a mutações no ADN mitocondrial ou à sua ausência. Uma célula normal da levedura *S. cerevisiae* contém cerca de 20-35 moléculas de ADN mitocondrial (Rickwood *et al.* 1988). As mutações no ADN mitocondrial das células respiratórias competentes resultam em células deficientes respiratórias. Quando as mutações conduzem à perda de todo o ADN mitocondrial os mutantes são designados por mutantes ρ^0 (Rickwood *et al.* 1988).

Está descrito que as mitocôndrias, especificamente a cadeia respiratória, são frequentemente a maior fonte de produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) (Milgrom *et al.* 2007). Deste modo, foi estudada a influência das mitocôndrias no *stress* oxidativo induzido pelo chumbo. Para tal, foi usado um mutante ρ^0 , obtido após a incubação da estirpe BY4741 com brometo de etídio. Os mutantes ρ^0 são incapazes de crescer em fontes de carbono não fermentáveis, como é o caso do glicerol (Figura 3.5).

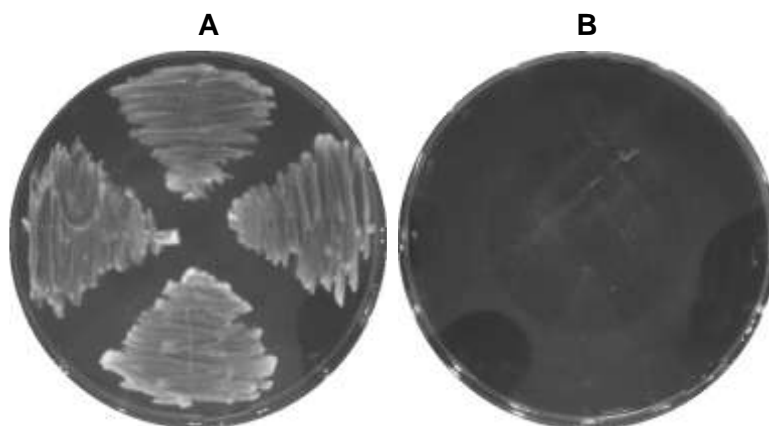


Figura 3.5 – Crescimento em placa dos mutantes ρ^0 . A – Crescimento em YEPA-agar. B – Incapacidade de crescimento em fonte de carbono não fermentável (glicerol), YEPLi-agar.

Para confirmar a perda total do ADN mitocondrial do mutante utilizado neste trabalho foi usado o corante 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que cora o ADN existente quer no núcleo quer nas mitocôndrias das células (Figura 3.6).

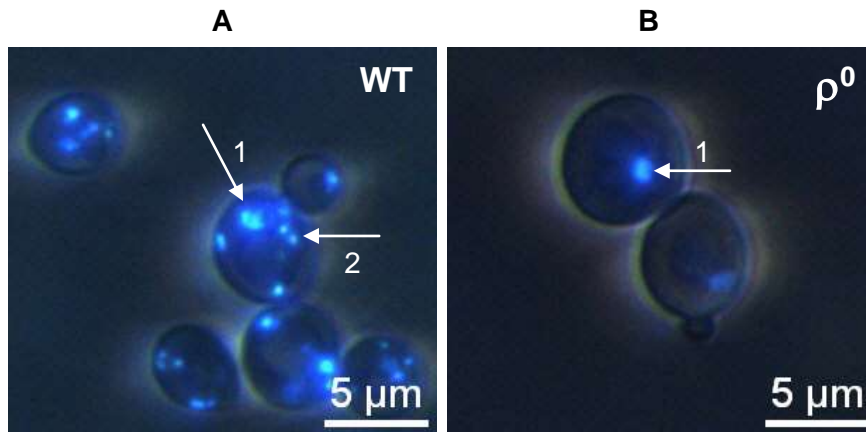


Figura 3.6 – Visualização do ADN por coloração com DAPI. A – Visualização do ADN nuclear e mitocondrial da estirpe BY4741. B – Visualização do ADN nuclear do mutante ρ^0 . Seta 1: núcleo; seta 2: mitocôndrias.

3.2.2. Sensibilidade ao chumbo da estirpe BY4741 e do respetivo mutante ρ^0

Para o estudo do papel das mitocôndrias na produção de ROS foi comparada a suscetibilidade a diferentes concentrações de chumbo do mutante ρ^0 e da estirpe WT. Tal como se pode observar na figura 3.7, a suscetibilidade ao chumbo, para as concentrações de 100 a 1000 $\mu\text{mol/l}$, da estirpe BY4741 é significativamente maior ($P < 0,001$) que a do mutante ρ^0 . As células da estirpe parental, incubadas durante 3 horas com 100 $\mu\text{mol/l}$ de chumbo, apresentam uma viabilidade de 62%, enquanto as células do mutante ρ^0 , incubadas nas mesmas condições, apresentam uma viabilidade de 89% (Figura 3.7). As células da estirpe BY4741 incubadas com 250, 500 e 1000 $\mu\text{mol/l}$ de chumbo apresentam uma viabilidade de 51, 33 e 13%, respetivamente. No entanto, para as mesmas condições, o mutante ρ^0 apresenta uma viabilidade de ~ 79, 53 e 24%, respetivamente (Figura 3.7).

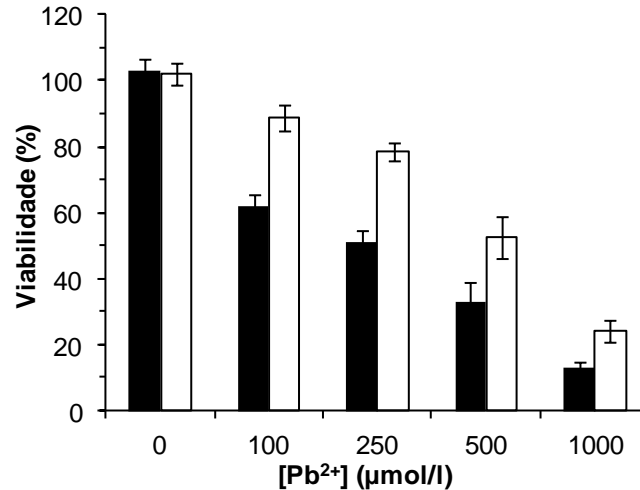


Figura 3.7 – Sensibilidade ao chumbo da levedura *S. cerevisiae* BY4741 e do respetivo mutante ρ^0 . As células, na fase exponencial de crescimento, da estirpe BY4741 (barra preta) e do mutante ρ^0 (barra branca) foram suspensas no tampão MES e tratadas com diferentes concentrações de chumbo, durante 3 horas. A viabilidade foi estimada pela contagem de unidades formadoras de colónias (UFC). Os valores apresentados correspondem à média de pelo menos seis experiências independentes. Os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais). Para as concentrações de Pb testadas, a diferença entre a estirpe BY4741 e o mutante ρ^0 é muito significativa (teste t para amostras independentes; $P < 0,001$).

A estirpe parental (BY4741) apresenta uma maior perda de viabilidade (avaliada por um ensaio clonogénico) que o respetivo mutante ρ^0 . Esta diferença de suscetibilidade ao chumbo poderá estar associada a uma maior acumulação intracelular de ROS na estirpe BY4741. Com o objetivo de testar esta possibilidade, as células da estirpe BY4741 e do respetivo mutante ρ^0 foram incubadas com H_2DCFDA e subsequentemente expostas a duas concentrações de chumbo. Como se pode observar na figura 3.8, a estirpe BY4741 apresenta uma maior produção de ROS que o respetivo mutante ρ^0 , para as concentrações de 250 e 1000 $\mu mol/l$ de chumbo. Assim, estes resultados sugerem que uma parte, importante, da produção de ROS tem origem nas mitocôndrias embora haja também uma outra fonte de produção, possivelmente de origem citoplasmática, uma vez que o mutante ρ^0 apresenta produção de ROS, ainda que valores muito mais baixos (Figura 3.8).

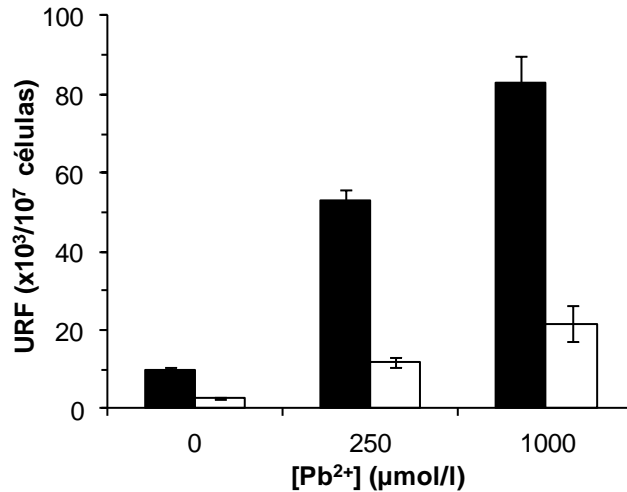


Figura 3.8 – Produção de ROS pela levedura *S. cerevisiae* BY4741 e respetivo mutante ρ^0 , induzido pela presença de chumbo. As células da estirpe BY4741 (barra preta) e do mutante ρ^0 (barra branca) foram incubadas em tampão MES com o H₂DCFDA, durante 20 minutos, e colocadas na presença de 250 e 1000 $\mu\text{mol/l}$ de chumbo, durante 3 horas. Os valores apresentados correspondem à média de quatro medições de fluorescência. Os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais). A figura é uma representação típica de uma experiência repetida três vezes.

Em resumo, o mutante ρ^0 , sem o ADN mitocondrial, apresentou uma maior resistência à morte induzida pelo chumbo do que a respetiva estirpe parental e, uma menor produção de ROS. Estes resultados sugerem que as mitocôndrias, em particular a cadeia respiratória, são uma das principais fontes de *stress* oxidativo induzido pelo Pb, aumentando, por isso, a suscetibilidade à morte celular.

3.2.3. Avaliação da indução de mutantes deficientes respiratórios

Na subsecção anterior verificou-se que as mitocôndrias são uma das principais fontes de ROS induzido pelo chumbo. Com o objetivo de verificar se as mitocôndrias são também um dos alvos do ROS produzido, efetuou-se a avaliação de formação de mutantes deficientes respiratórios induzidos pelo chumbo. Para tal, foi realizado o plaqueamento em YEPGli-agar e em YEPD-agar, das células da estirpe BY4741 após exposição a duas concentrações de chumbo. Uma vez que as células que formam colónias em YEPGli-agar são competentes respiratórias, sabendo-se o número total de células viáveis (obtidas nas placas de YEPD-agar), foi possível obter a percentagem de células deficientes respiratórias.

Pela análise da Figura 3.9, verifica-se que a presença do chumbo aumenta a formação de mutantes deficientes respiratórios. Ao fim de 3 horas de exposição ao metal, a percentagem de formação de mutantes é de ~49 e ~58, para 250 e 1000 $\mu\text{mol/l}$ Pb, respetivamente. No controlo (incubação na ausência de chumbo) ocorreu, uma formação de mutantes deficientes respiratórios de cerca de 2%. Este valor está de acordo com os resultados descritos na literatura, segundo os quais a perda da função mitocondrial ocorre espontaneamente, podendo uma população de leveduras conter $\leq 2\%$ de respiradores deficientes (Kennedy *et al.* 2003).

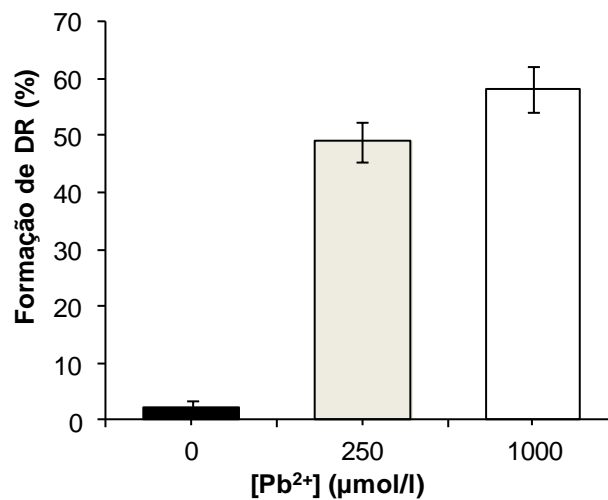


Figura 3.9 – Formação de mutantes deficientes respiratórios (DR), induzidos pela presença de chumbo, na levedura *S. cerevisiae* BY4741. As células foram suspensas no tampão MES e tratadas com diferentes concentrações de chumbo, durante 3 horas. A viabilidade foi estimada pela contagem de unidades formadoras de colónias (UFC). Os valores apresentados correspondem à média de sete experiências independentes. Os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais). A diferença de formação de respiradores deficientes na ausência e na presença das duas concentrações de chumbo é muito significativa ($P < 0,001$) (ANOVA e método de Tukey - Kramer).

Os resultados obtidos nesta secção sugerem que as mitocôndrias são uma das principais fontes de formação de ROS, induzidas pelo chumbo, e são também um dos alvos da sua toxicidade.

3.3. Papel do vacúolo na desintoxicação do chumbo¹

Por último, foi estudado o papel do vacúolo como mecanismo de defesa contra a toxicidade de metais, nomeadamente o chumbo.

3.3.1. Ausência de vacúolo e hipersensibilidade ao chumbo

O vacúolo da levedura é um organelo cujas funcionalidades são semelhantes aos lisossomas dos mamíferos e ao vacúolo das células das plantas. Os vacúolos são um compartimento ácido, desempenham um papel importante na autofagia, na regulação do pH citosólico, na homeostasia de iões e no armazenamento de metabolitos (Eide *et al.* 2005; Klionsky *et al.* 1990; Nakatogawa *et al.* 2009). O vacúolo é igualmente importante na desintoxicação de metais pesados, através da sua acumulação (sequestração vacuolar) (Wysocki e Tamás 2010). A análise comparativa da perda de proliferação celular entre a estirpe BY4741 (estirpe WT) e a estirpe *vps16Δ*, pertencente à classe C VPS, desprovida de qualquer estrutura do tipo vacuolar, permitiu verificar que a ausência de vacúolo aumenta muito significativamente a suscetibilidade à presença de chumbo o que indica, fortemente, o envolvimento do vacúolo na desintoxicação do chumbo (Perez 2012).

3.3.2. O papel da H⁺-ATPase (V-ATPase)

Tendo em conta a importância do vacúolo na proteção contra a toxicidade induzida por Pb, foi avaliada a função da H⁺-ATPase vacuolar (V-ATPase) na desintoxicação do chumbo. Foram usados quatro mutantes com deleção de subunidades da V-ATPase (mutantes *vma*): dois mutantes sem uma das subunidades do domínio catalítico V1, especificamente, a subunidade A (*vma1Δ*) e a subunidade B (*vma2Δ*); e, dois mutantes sem as subunidades do domínio V0, associadas à membrana: a subunidade *a* (*vph1Δ*) e a subunidade *c* (*vma3Δ*). Encontra-se descrito que a deleção de qualquer gene que codifica as subunidades da V-ATPase (com a exceção dos genes *VPH1* e *STV1*) elimina a típica acidificação vacuolar, provocando a perda da atividade da V-ATPase (fenótipo *Vma*⁻). Este fenótipo apresenta uma maior

¹ A presente secção contém parte da seguinte publicação:
Sousa, C.A., Perez, R.R. e Soares, E.V. 2013. *Saccharomyces cerevisiae* mutants affected in vacuole assembly or vacuolar H⁺-ATPase are hypersensitive to lead (Pb) toxicity. *Current Microbiology* (DOI 10.1007/s00284-013-0438-y)

sensibilidade a valores elevados de pH extracelular e incapacidade de crescer em fontes de carbono não fermentáveis (Kane 2006; Kane 2007). Os resultados obtidos, no presente trabalho, mostram que a deleção de qualquer um dos genes que codificam as subunidades da V-ATPase origina um aumento muito significativo ($P < 0,01$) da suscetibilidade ao chumbo (para todas as concentrações de chumbo e para todos os mutantes testados), comparativamente à estirpe parental BY4741 (WT) (Figura 3.10). Para 100 $\mu\text{mol/l}$ de chumbo, a deleção do gene *VPH1* afetou menos significativamente ($P < 0,05$), em comparação com os outros três mutantes *vma* testados, a suscetibilidade ao efeito tóxico do chumbo (Figura 3.10). Encontra-se descrito um efeito similar relativamente à sensibilidade do mutante *vph1 Δ* ao peróxido de hidrogénio (Milgrom *et al.* 2007) e ao herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (Fernandes *et al.* 2003). Para uma concentração mais alta de chumbo (250 $\mu\text{mol/l}$), os mutantes sem as subunidades A e B do domínio catalítico, onde ocorre a hidrólise do ATP, apresentaram um significativo ($P < 0,05$) aumento da suscetibilidade ao chumbo, relativamente aos mutantes sem as subunidades a e c do domínio membranar. Para a concentração mais elevada de chumbo testada (500 $\mu\text{mol/l}$), o mutante *vma2 Δ* é significativamente ($P < 0,05$) mais sensível que os mutantes *vma1 Δ* , *vma3 Δ* e *vph1 Δ* (Figura 3.10). Está descrito que os mutantes *vma2 Δ* e *vma3 Δ* são defeituosos na atividade da V-ATPase, mas apresentam uma morfologia normal dos vacúolos (Nelson e Nelson 1990). Os resultados obtidos neste trabalho, com as estirpes *vma*, indicam que a presença de uma V-ATPase funcional é importante na defesa contra os efeitos tóxicos do chumbo.

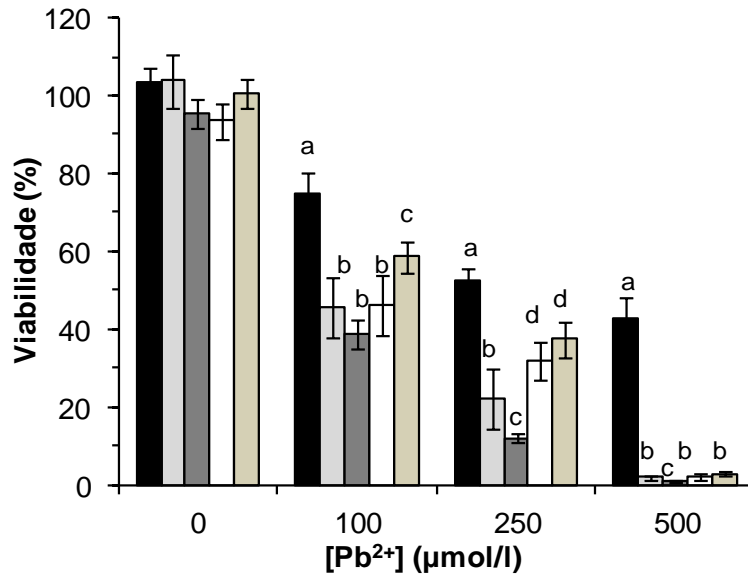


Figura 3.10 – Comparação da suscetibilidade ao chumbo da levedura *S. cerevisiae* BY4741 (WT) com os mutantes com deleção de subunidades da H⁺-ATPase vacuolar. 1x10⁷ células/ml, na fase exponencial de crescimento, da estirpe WT (barra preta) e dos mutantes *vma1*Δ (barra cinzento claro), *vma2*Δ (barra cinzento escuro), *vma3*Δ (barra branca) e *vph1*Δ (barra bege escuro) foram tratadas como descrito na figura 3.7. A viabilidade foi estimada pela contagem das unidades formadoras de colónias (UFC). Cada barra representa a média de quatro experiências independentes. Os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais). As diferenças estatísticas entre a WT e os mutantes *vma* foram analisadas por ANOVA e pelo método de Tukey-Kramer de comparação múltipla. Para cada concentração de chumbo, as médias, representadas com diferentes letras, são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Os valores do EC₅₀ para a estirpe WT são 1,9-3,3 vezes maiores que para os mutantes *vma* (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Efeito do chumbo na viabilidade das diferentes estirpes da *S. cerevisiae*.

| Estirpe | EC ₅₀ (μmol/l) ^a |
|--------------|--|
| WT | 266 |
| <i>vma1Δ</i> | 86 |
| <i>vma2Δ</i> | 80 |
| <i>vma3Δ</i> | 106 |
| <i>vph1Δ</i> | 139 |

^a EC – Concentração efetiva. EC₅₀ corresponde à concentração de Pb que induz a perda da viabilidade de 50% da população. As células foram suspensas em tampão MES (10 mmol/l, pH 6,0), contendo 2% (m/v) glucose, com diferentes concentrações de chumbo, durante 3 horas. A viabilidade foi avaliada pelo plaqueamento das células em YEPD-agar. Os valores foram obtidos a partir de quatro experiências independentes ($n = 16$).

Nas leveduras, o vacúolo constitui um importante compartimento de reserva de ferro e cálcio; a troca vacuolar de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$, dependente do estabelecimento de um gradiente de prótons gerado pela V-ATPase, parece desempenhar um papel importante na homeostasia do cálcio (Li e Kane 2009). Alguns metais pesados são também sequestrados no vacúolo (Wysocki e Tamás 2010). A perda de atividade de V-ATPase compromete a atividade de alguns transportadores e a manutenção de reservas de polifosfatos no vacúolo, os quais podem sequestrar íons metálicos no seu interior (MacDiarmid *et al.* 2002; Li e Kane 2009). Do mesmo modo, o chumbo também pode ser sequestrado no vacúolo, num processo dependente de um gradiente de H^{+} gerado pela V-ATPase. Consistente com esta possibilidade, mutantes *vma*, os quais não dispõem de V-ATPase funcional e, conseqüentemente, apresentam uma perda de acidificação do vacúolo (Kane 2006), exibem uma suscetibilidade aumentada ao chumbo. Neste contexto, a compartimentação do Pb, no vacúolo, pode ser vista como uma forma de regulação da concentração citosólica do Pb, no sentido de minimizar os seus efeitos tóxicos. Encontra-se descrito um processo de desintoxicação similar nas plantas; uma vez no citosol, a maior parte do Pb é sequestrado no vacúolo, constituindo, desta forma, um mecanismo de desintoxicação (Sharma e Dubey 2005; Jiang e Liu 2010; Phang *et al.* 2011).

3.3.3. Avaliação do contributo da subfamília de transportadores ABCC

Os transportadores vacuolares ABCC, pertencentes à superfamília de transportadores ABC, como é o caso dos transportadores Ycf1p e Vmr1p, são muito importantes no mecanismo de desintoxicação por sequestração vacuolar de substâncias orgânicas tóxicas e de metais pesados como é o caso de Cd e de Hg (Paumi *et al.* 2009; Wysocki e Tamás 2010). Prévéral *et al.* (2006) sugere o envolvimento de Ycf1p no transporte vacuolar de Pb, Sb, Hg e As, baseado na incapacidade da estirpe *ycf1Δ* crescer na presença destes metais; contudo, estes resultados devem ser vistos com alguma precaução tendo em conta a complexação e/ou precipitação do Pb pelos componentes do meio de cultura.

No presente estudo, a suscetibilidade (através de um ensaio clonogénico) à presença de chumbo da estirpe BY4741 (WT) foi comparada com a de dois mutantes: um defetivo no transportador vacuolar Ycf1p (estirpe *ycf1Δ*) e o outro defetivo no transportador vacuolar Vmr1p (estirpe *vmr1Δ*). A exposição ao chumbo ocorreu no tampão MES, o qual não complexa o chumbo (Soares *et al.* 1999). Uma vez que o promotor do gene *VMR1* apresenta uma maior atividade quando o crescimento ocorre numa fonte de carbono não fermentável, como é o caso do glicerol (Wawrzycka *et al.* 2010), o crescimento das estirpes, a exposição ao chumbo e o ensaio de clonogenicidade ocorreu na presença de glicerol.

A figura 3.11 apresenta os resultados obtidos para as três estirpes, durante a exposição ao chumbo. Como se pode verificar não houve uma alteração apreciável da viabilidade celular para todas as concentrações de chumbo estudadas. Foi observado um resultado similar quando a concentração de chumbo foi elevada para 1000 $\mu\text{mol/l}$ (resultados não mostrados). O crescimento e exposição ao Pb numa fonte de carbono não fermentescível parece aumentar a resistência ao Pb, comparativamente ao crescimento na presença de glucose. Hanselaer (2013) observou que as células das estirpes *ycf1Δ* e *vmr1Δ*, em fase exponencial ou em fase estacionária, crescidas em YEPD, perdem a viabilidade celular após exposição ao chumbo; contudo, estas estirpes não apresentam uma maior suscetibilidade ao Pb que a estirpe WT.

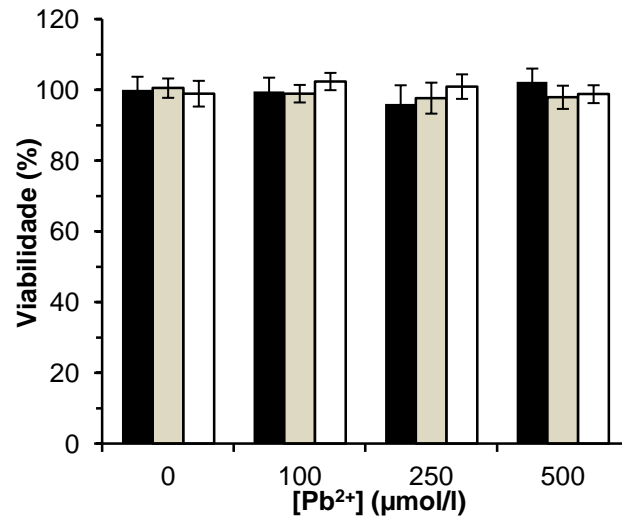


Figura 3.11 – Comparação da suscetibilidade ao chumbo da levedura *S. cerevisiae* BY4741 (WT) com mutantes defetivos em transportadores vacuolares pertencentes à subfamília ABCC. As células das estirpes WT (barra preta), *ycf1*Δ (barra cinza) e *vmr1*Δ (barra branca), cresceram em YEPGLi e foram suspensas em tampão MES, com 2% (v/v) glicerol, na presença de diferentes concentrações de chumbo, durante 3 horas. A viabilidade foi avaliada através da capacidade das células proliferarem em YEPGLi-agar. Os valores foram obtidos a partir de pelo menos duas experiências independentes, realizadas em duplicado. Os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais).

Tendo em conta os resultados obtidos não foi possível clarificar o papel dos transportadores ABCC, na desintoxicação do chumbo. Deste modo, sugere-se a realização de experiências adicionais por forma a esclarecer se os transportadores pertencentes à subfamília ABCC estão envolvidos no processo de sequestração vacuolar do Pb.

3.3.4. Modificação da morfologia do vacúolo induzida por chumbo

A morfologia do vacúolo de levedura pode mudar em resposta a diferentes condições extracelulares (Li e Kane 2009). Na avaliação do possível impacto do chumbo na morfologia do vacúolo de levedura foi utilizada uma estirpe na qual a subunidade B (*vma2p*) do sector catalítico da V-ATPase se encontra marcada, na região terminal-C, com a proteína verde fluorescente (GFP) (estirpe *Vma2p*-GFP). Este método parece ser particularmente útil na análise do impacto de estímulos externos na morfologia vacuolar, uma vez que não é necessária a coloração da membrana do vacúolo (Izawa e Liu 2010). As células em fase exponencial de

crescimento, após incubação durante 3 horas em tampão MES (pH 6,0) com 2% glucose, na ausência de chumbo, mantiveram a sua morfologia típica vacuolar: a presença de múltiplos lóbulos de tamanho médio (Figura 3.12). Por seu turno, a exposição das células de levedura a 500 $\mu\text{mol/l}$ de chumbo, durante 3 horas, originou a fusão dos lóbulos num único enorme vacúolo. Foi observado a transição entre múltiplos lóbulos de tamanho médio e um único vacúolo na maioria das células expostas a 250 $\mu\text{mol/l}$ de chumbo (Figura 3.12). Estes resultados sugerem que a alteração da morfologia vacuolar de uma estrutura com 3-4 lóbulos de tamanho médio para um único vacúolo pode ser consequência da acumulação de chumbo no vacúolo.

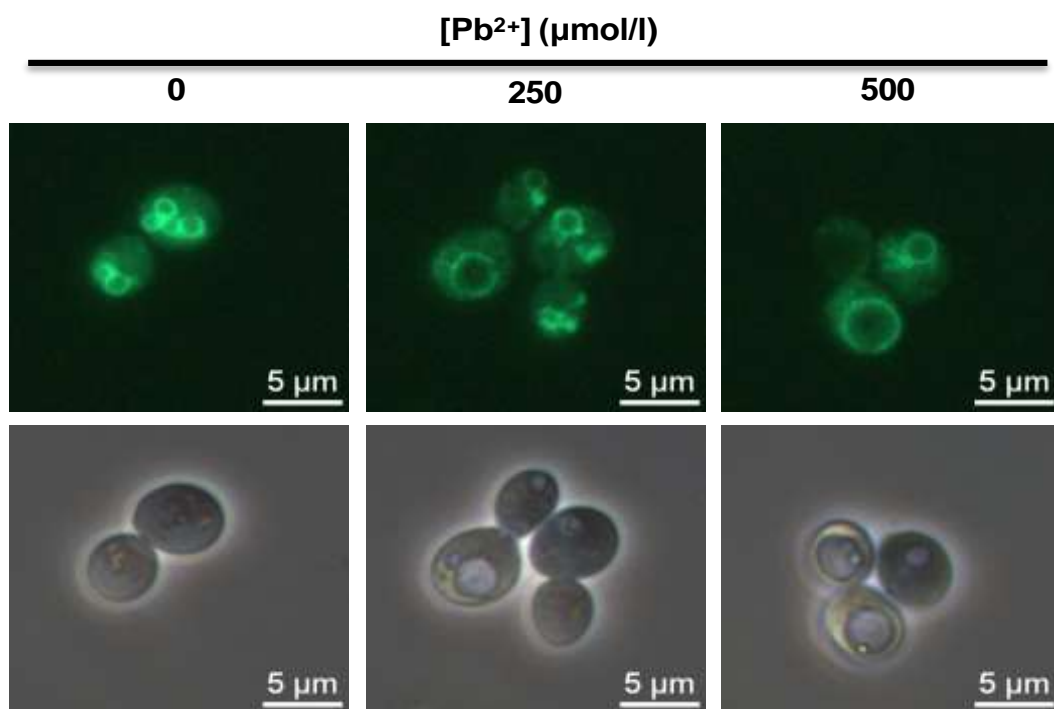


Figura 3.12 – Impacto do chumbo na morfologia vacuolar. As células da estirpe Vma2p-GFP, em fase exponencial de crescimento, foram tratadas como descrito na figura 3.1 e observadas por microscopia de fluorescência (painel superior) ou por microscopia de contraste de fase (painel inferior).

Os resultados apresentados nesta secção mostram que a mutação de genes essenciais à função da V-ATPase (deleção dos genes *VMA1*, *VMA2*, *VMA3* e *VPH1*) induz um aumento da suscetibilidade à toxicidade do chumbo. Estes dados evidenciam a importância do vacúolo na desintoxicação do chumbo na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Possivelmente, a compartimentação do chumbo no vacúolo impede a sua acumulação no citosol e, conseqüentemente, a manifestação dos seus efeitos tóxicos.

Capítulo 4 – Conclusões

4.1. Conclusões

Os estudos desenvolvidos na presente dissertação, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo celular, permitiram obter as seguintes conclusões:

- 1) O Pb, até 1000 $\mu\text{mol/l}$, durante 3h, induz nas leveduras a perda da capacidade proliferativa e a acumulação intracelular de espécies reativas de oxigénio (anião superóxido e peróxido de hidrogénio), na ausência da perda de integridade membranar;
- 2) As mitocôndrias constituem uma das principais fontes de ROS induzido por Pb;
- 3) A acumulação intracelular de ROS, induzido pelo chumbo, origina mutações no ADN mitocondrial, com a consequente produção de células deficientes respiratórias;
- 4) O vacúolo está envolvido na desintoxicação do chumbo, sendo neste processo essencial a presença, num estado funcional, da V-ATPase;
- 5) As proteínas transportadoras da membrana vacuolar Ycf1p e Vmr1p, pertencentes à superfamília ABC, parecem não estar envolvidas na sequestração vacuolar de Pb;
- 6) O chumbo induz uma modificação da morfologia do vacúolo.

Capítulo 5 – Sugestões para trabalhos futuros

5.1. Sugestões para trabalhos futuros

No sentido de continuar, aprofundar e complementar o trabalho desenvolvido na presente dissertação, sugere-se como trabalho futuro, a comparação da capacidade de acumulação de Pb pela estirpe WT com a de mutantes sem vacúolo ou com a função vacuolar comprometida. Adicionalmente, sugere-se um estudo mais aprofundado do possível contributo das proteínas transportadoras pertencentes à superfamília ABC, na sequestração vacuolar do Pb, nomeadamente através do crescimento das estirpes em diferentes fontes de carbono.

Referências Bibliográficas

- Adle DJ, Sinani D, Kim H, Lee J (2007) A cadmium transporting P1B-type ATPase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 282: 947–955
- ATSDR (2007) Toxicological profile for lead. Agency for toxic substances disease registry (ATSDR) US Department of health and human services - Public health services
- Avery SV (2001) Metal toxicity in yeasts and the role of oxidative stress. *Adv Appl Microbiol* 49: 111-142
- Avery SV (2011) Molecular targets of oxidative stress. *J Biol Chem* 434: 201-210
- Banta LM, Robinson JS, Klionsky DJ, Emr SD (1988) Organelle assembly in yeast: characterization of yeast mutants defective in vacuolar biogenesis and protein sorting. *J Cell Biol* 107:1369-1383
- Barakat MA (2011) New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. *Arab J Chem* 4: 361-377
- Bussche VJ, Soares EV (2011) Lead induces oxidative stress and phenotypic markers of apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 90: 679-687
- Campbell I, Duffus JH (1988) Yeast mitochondria – Yeast a practical approach. EDS, IRL Press Oxford
- Chen C, Wang JL (2007) Response of *Saccharomyces cerevisiae* to lead ion stress. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:683–687
- Decreto – lei nº 102/2010, 23 de Setembro de 2010. Anexo XII. Valores limite para a proteção da saúde humana para os poluentes dióxido de enxofre, dióxido de azoto, benzeno, monóxido de carbono, chumbo e PM₁₀. Diário da República, série I, 4197
- Decreto – lei nº 118/2006, 21 de Junho de 2006. Anexo I, Quadro 1. Valores limite de concentração de metais pesados nos solos. Diário da República, série I-A, 4384

Decreto – lei nº 306/2007, de 27 de Agosto, Anexo I. Parâmetros e valores paramétricos. Diário da República, série I, 5758

Duruibe JO, Ogwuegbu MOC, Egwurugwu JN (2007) Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *Int J Phys Sci* 5: 112-118

Eisenberg T, Carmona-Gutierrez D, Büttner S, Tavernarakis N, Madeo F (2010) Necrosis in yeast. *Apoptosis* 15:257–268

Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N (2001) Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem* 1:529–539

Fariss MW, Catherine B, Chan, Patel M, Van Houten B, Orrenius S (2005) Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Mol Interv* 5: 94-111

Fernandes AR, Duraõ PJ, Santos PM, Sa-Correia I (2003) Activation and significance of vacuolar H⁺-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* adaptation and resistance to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 312:1317-1324

Gadd GM (1993) Interaction of fungi with toxic metals. *New Phytol* 124:25-60

Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274:546–567

Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) *Free radicals in biology and medicine*, Oxford University Press, Oxford

Hanselaer S (2013) Role of vacuolar transporters in the defence against lead-induced toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. Tese de Mestrado em Ciências Industriais: Bioquímica. Katholieke Hogeschool St.-Lieven, Gent, Bélgica

Haugland RP (2005) *The Handbook – A guide to fluorescent probes and labelling technologies*, 10th ed. Invitrogen Corp, Eugene, OR, USA

- ILZSG - International Lead and Zinc Study Group (2013) World Refined Lead Supply and Usage. <http://www.ilzsg.org/static/statistics.aspx> (acedido em 14 de Março de 2013)
- Izawa S, Ikeda K, Miki T, Wakai Y, Inoue Y (2010) Vacuolar morphology of *Saccharomyces cerevisiae* during the process of wine making and Japanese sake brewing. *Appl Microbiol Biotechnol* 88:277-282
- Jiang WS, Liu DH (2010) Pb-induced cellular defense system in the root meristematic cells of *Allium sativum* L. *BMC Plant Biol* 10:40
- Junqueira LC, Carneiro J (2000) *Biologia Celular e Molecular*. Guanabara Koogan, 7ª Edição
- Kane PA (2006) The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:177-191
- Kane PM (2007) The long physiological reach of the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 39: 415-421
- Klionsky DJ, Herman PK, Emr SD (1990) The fungal vacuole - composition, function, and biogenesis. *Microbiol Rev* 54:266-292
- Li SC, Kane PM (2009) The yeast lysosome-like vacuole: endpoint and crossroads. *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res* 1793: 650-663
- MacDiarmid CW, Milanick MA, Eide DJ (2002) Biochemical properties of vacuolar zinc transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277:39187-39194
- Mansour NM, Sawhney M, Tamang DG, Vogl C, Saier MH Jr (2007) The bile/arsenite/riboflavin transporter (BART) superfamily. *FEBS J* 274: 612–629
- Milgrom E, Diab H, Middleton F, Kane PM (2007) Loss of vacuolar proton-translocating ATPase activity in yeast results in chronic oxidative stress. *J Biol Chem* 282:7125-7136

- Moreira FR, Moreira JC (2004) Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. *Rev Panam Salud Publica* 15:119–29
- Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y (2009) Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:458-467
- Nelson H, Nelson N (1990) Disruption of genes encoding subunits of yeast vacuolar H⁺-ATPase causes conditional lethality. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87:3503-3507
- Nelson LS, Lewin NA, Howland MA, Hoffman RS, Goldfrank LR, Flomenbaum NE (2010) Goldfrank's – Toxicologic Emergencies. McGraw-Hill Education Europe, 9ª Edição.
- Paumi CM, Chuck M, Snider J, Stagljar I, Michaelis S (2009) ABC transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and their interactors: new technology advances the biology of the ABCC (MRP) subfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* 73:577-593
- Perez RR (2012) Avaliação da glutatona e do vacúolo como mecanismos de defesa contra a toxicidade induzida pelo chumbo na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Tese de Mestrado em Engenharia Química-Tecnologias de Proteção Ambiental. Instituto Superior de Engenharia do Porto
- Perez RR, Sousa CA, Vankeersblick T, Machado MD, Soares EV (2013) Evaluation of the role of glutathione in the lead-induced toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Microbiol* 67: 300-305
- Perrone GG, Tan S, Dawes IW (2008) Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res* 1783: 1354-1368
- Phang IC, Leung DWM, Taylor HH, Burritt DJ (2011) Correlation of growth inhibition with accumulation of Pb in cell wall and changes in response to oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Growth Regul* 64:17-25
- Prévéral S, Ansoborlo E, Mari S, Vavasseur A, Forestier C (2006) Metal(loid)s and radionuclides cytotoxic in *saccharomyces cerevisiae*. Role of YCF1, glutathione and effect of buthionine sulfoximine. *Biochimie* 88:1651-1663

- Raymond CK, Howald-Stevenson I, Vater CA, Stevens TH (1992) Morphological classification of the yeasts vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E *vps* mutants. *Mol Biol Cell* 3:1389-1402
- Roberts R A, Laskin D L, Smith CV, Robertson FM, Allen EMG, Doorn JA, Slikkerk W (2009) Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease. *Toxicol Sci* 112: 4–16
- Sharma P, Dubey RS (2005) Lead toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol* 17: 35-52
- Sambade M, Alba M, Sardon AM, West RW, Kane PM (2005) Genomic screen for yeast vacuolar membrane ATPase mutants. *Genetics* 170:1539-1551
- Sakamoto F, Ohnuki T, Fujii T e Iefuji H (2010) Response of *Saccharomyces cerevisiae* to heavy element stress: lead vs. uranium. *Geomicrobiol J* 27: 240-244
- Soares EV, Duarte APSR, Boaventura RA e Soares HMVM (2002) Viability and release of complexing compounds during accumulation of heavy metals by a brewer's yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 836–841
- Soares EV, Hebbelinck K e Soares HMVM (2003) Toxic effects caused by heavy metals in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a comparative study. *Can J Microbiol* 49: 336–343
- Soares HMVM, Conde PCFL, Almeida AAN, Vasconcelos MTSD (1999) Evaluation of n-substituted aminosulfonic acid pH buffers with a morpholinic ring for cadmium and lead speciation studies by electroanalytical techniques. *Anal Chim Acta* 394:325–335
- Suh JH, Yun JW e Kim DS (1999) Cation (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) exchange in Pb^{2+} accumulation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess Eng* 21: 383–387
- US-EPA (2006) National recommended water quality criteria. United States Environmental Protection Agency EPA. Office of Water, Science and Technology (4304T), Washington, DC

- Van der Heggen M, Martins S, Flores G, Soares EV (2010) Lead toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 88: 1355-1361
- Van Houten B, Woshner V, Santos JH (2006) Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair Rev* 5:145-152
- Wawrzycka D, Sobczak I, Bartosz G, Bocser T, Ulaszewski S, Goffeau A (2010) Vmr1p is a novel vacuolar multidrug resistance ABC transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 10:828-838
- Wloch-Salamon DM, Bem AE (2013) Types of cell death and methods of their detection in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol* 114: 287-298
- Wysocki R, Tamás MJ (2010) How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. *FEMS Microbiol Rev* 34: 925-951
- Zhang Z, Zheng Y, Mazon H, Milgrom E, Kitagawa N, Kish-Trier E, Heck AJR, Kane PM, Wilkens S (2008) Structure of the yeast vacuolar ATPase. *J Biol Chem* 283: 35983–35995

