

CONTROLE POPULACIONAL DE CIANOBACTÉRIAS TÓXICAS ATRAVÉS DE RADIAÇÃO GAMA INTEGRADA A AGENTES FÍSICOS EXÓGENOS

Cavalcante-Silva, E.¹, Hereman, T. C.², Buch, B.³, Gouvêa-Barros, S.⁴, Arthur, V.⁵, Bittencourt-Oliveira, M. C.⁶, Arruda-Neto, J. D. T.⁷

¹Instituto de Ciências Biomédicas/Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, erika.final@ig.com.br

^{2,3,4}Escola Superior de agricultura Luiz de Queiroz/Departamento de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, hereman@esalq.usp.br², bbuch@esalq.usp.br³, sgbarros@esalq.usp.br⁴

⁵Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, arthur@cena.usp.br

⁶Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Departamento de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, mbitt@esalq.usp.br

⁴Instituto de Física/Departamento de Física Experimental, Universidade de São Paulo, arruda@usp.br

Resumo - A *Microcystis panniformis* Komárek et al. (Cyanobacteria) é uma microalga comum em ecossistemas aquáticos tropicais e produz a microcistina, uma toxina que causa envenenamento e promove tumores hepáticos. O uso de radiação ionizante é visto como um processo promissor no seu controle populacional em mananciais utilizados pra abastecimento público de água. Neste estudo avaliou-se a radiosensibilidade da cianobactéria *M. panniformis* à radiação gama e também o comportamento dessas à temperatura através de curvas de sobrevivência visando futuros estudos e direcionamento no manejo de cianobactérias tóxicas. Foram obtidas curvas de sobrevivência para os tratamentos 1) dose de 5KGy de radiação gama seguidos de aquecimento a 40°C durante 1h e 30 min.; 2) dose de 5KGy de radiação gama; 3) aquecimento a 40°C durante 1h e 30 min.. Após 48h, observou-se que a radiação seguida de hipertermia induz três vezes mais mortes celulares, comparativamente ao que ocorre apenas por irradiação.

Palavras-chave: cianobactéria, radiação gama, temperatura, reparo do DNA, toxina.

Área do Conhecimento: I – Ciências Exatas e da Terra

Introdução

Microcystis panniformis Komárek et al. (Cyanobacteria) é uma cianobactéria de ocorrência tropical [1] responsável por florações tóxicas em corpos d'água eutrofizados que geralmente abastecem populações humanas causando graves problemas de Saúde pública [2]. Algumas populações são produtoras de microcistina, uma hepatotoxina causadora de intoxicações, hemorragias e tumores hepáticos que é liberada na água através da lise celular. O caso mais grave registrado mundialmente envolvendo esta toxina ocorreu em Caruaru, PE, quando vários pacientes de uma clínica de hemodiálise morreram devido à presença de microcistinas na água acima do nível permitido [3].

Em decorrência da sua toxicidade, foram desenvolvidos processos e técnicas para a remoção de toxinas da água, como irradiação com UV, uso de solo na retenção de microcistina, ozinização, oxidação e carvão ativado [4, 5, 6, 7]. No entanto, custo, eficiência e complexidade são fatores limitantes à sua implantação em sistemas de tratamento de água e esgoto. No presente estudo, uso de radiação gama é visto como um processo promissor no controle populacional em mananciais utilizados para abastecimento público

de água. Até o momento, este é o primeiro e único estudo verificando os efeitos de radiação gama em cianobactérias e visa direcionar as novas estratégias e futuros modelos de aplicação tecnológica. Do ponto de vista acadêmico, o estudo em questão permitirá investigar o papel desempenhado por agentes físicos exógenos, como o calor, na eficiência de reparo ao DNA danificado pela ação de radiações ionizantes [10, 11, 12], bem como, inferir modelos de sinalização de mecanismos de reparo enzimático.

As radiações ionizantes são agentes deletérios do material genético e, por vezes, são capazes de promover as quebras duplas da molécula de DNA (DSB, *double strand break*) as quais, inadequadamente ou não reparadas, podem produzir mutações ou levar a apoptose. Determinadas doses de radiação gama podem ser utilizadas para controle de populações de cianobactérias tóxicas se a integridade da membrana celular for preservada, não havendo, portanto, a liberação da toxina ao ecossistema aquático.

Os objetivos do estudo são: a) avaliar a interferência do calor na eficiência de reparo de DNA celular danificado pela ação de radiação ionizante utilizando como indicador as curvas de sobrevivência, admitindo-se que as células cujo

DNA não foi reparado não sobrevivem; b) avaliar a radiosensibilidade da cianobactéria *M. panniformis* à radiação gama através de curvas de sobrevivência visando futuros estudos e direcionamentos no manejo de cianobactérias tóxicas.

Materiais e Métodos

Foi coletada uma amostra de água no reservatório de Barra Bonita, São Paulo, Brasil e, através de técnicas de micromanipulação, uma colônia de *M. panniformis* foi isolada em tubos de 10 ml de BG-11 [13] modificado por Bittencourt-Oliveira [14].

Amostras desta cepa BCCUSP100 (*Brazilian Cyanobacteria Collection of University of São Paulo*) foram mantidas sob condições controladas de cultivo:

- intensidade luminosa 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$;
- temperatura de $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$;
- fotoperíodo 14:10 claro-escuro;
- meio BG-11.

50mL do cultivo no 21º dia da curva de crescimento, na fase exponencial, com uma densidade celular de $8,5 \pm 0,5 \times 10^6$ céls.mL⁻¹, foram transferidos para tubos de ensaio de vidro transparente com tampa de rosca.

As amostras, em triplicata, foram submetidas aos seguintes experimentos:

a) Tratamento 1: irradiação com dose de 5K Gy de radiação gama a partir da fonte de Cobalto (⁶⁰Co) (modelo *Gammacell*) seguidos de aquecimento à $40 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 1h e 30 min. em estufa de crescimento;

b) Tratamento 2: irradiação com dose de 5K Gy de radiação gama a partir da mesma fonte;

c) Tratamento 3: aquecimento à $40 \pm 1^\circ\text{C}$ durante o mesmo período de tempo; e

d) Controle sem qualquer tratamento.

Para a obtenção das curvas de sobrevivência foram coletadas amostras em triplicata de todos os tubos com os Tratamentos 1, 2, 3 e o controle durante o período de 35 dias. As densidades celulares foram obtidas após 1º (t_1), 2º (t_2), 3º (t_3), 7º (t_7) e 35º (t_{35}), dia após a exposição dos cultivos aos agentes físicos. No entanto, não foram contabilizados o 3º e 7º dia dos Tratamentos 1 e 2 devido ao reduzido ao número de células presentes às limitações impostas pelo pequeno volume do tubo e da área de exposição do irradiador.

Amostras de DNA genômico de todos os tratamentos e controle foram extraídas imediatamente após o término dos experimentos através do método com tampão CTAB [15]. Foi feita amplificação do gene que codifica para a sintetase de microcistina através da técnica de

PCR. A análise molecular realizada teve a finalidade de testar a integridade de um dos sítios gênicos envolvidos na biossíntese de microcistina – o *mcyB*, bem como verificar as concentrações moleculares ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) dos fragmentos amplificados logo após os tratamentos.

Resultados

Para as amostras do Tratamento 1 (irradiadas e aquecidas) observou-se uma queda brusca no número de células com uma redução média 49,4% no 1º dia (t_1) após o tratamento (t_0-t_1). Esta redução foi ainda mais evidente no 2º dia (t_2) com 95,3% de mortes em relação ao dia anterior (t_1-t_2). Com isso, ocorreram 97,6% de mortes celulares no t_2 em relação ao t_0 (t_0-t_2). Após o 2º dia, a queda da densidade populacional foi lenta e gradual, com uma redução de 87,6% no 35º dia (t_{35}).

Para as amostras do Tratamento 2 (somente irradiadas) a redução foi menor que a ocorrida no Tratamento 1. Observou-se uma queda média no número de células em t_1 e t_2 em relação a t_0 de 22,3 e 67,0%, respectivamente. A diferença na queda entre t_2 e t_1 foi de 57,6%.

Para as amostras do Tratamento 3, observou-se em t_1 a redução média de 16% do número de células em relação ao t_0 . Contudo, em t_2 foi observado um aumento médio de 12% em relação a t_1 com recuperação da taxa de crescimento semelhante ao controle, porém com um número de células ligeiramente menor devido às perdas ocorridas no tratamento térmico.

As amostras de DNA molecular apresentaram diferenças através da visualização do gel de eletroforese. Houve amplificação do gene que codifica para a sintetase de microcistina (*mcyB*) de todos os tratamentos com concentrações igualmente variáveis demonstrando a integridade daquele sítio gênico. Constatou-se as menores concentrações moleculares nas amostras provenientes dos Tratamentos 1 e 2, sendo $T1 < T2 < T3$.

Discussão

A dose de 5K Gy não foi suficiente para eliminar a totalidade das células, indicando uma alta radioresistência de *Microcystis panniformis* às radiações gama quando comparada a outros microrganismos procaríotos [7, 8, 9, 10, 17]. Segundo Imamura et al [10] que investigaram a radioresistência de *Deinococcus radiodurans*, uma bactéria capaz de sobreviver a doses extremas de radiação (mais de 9 K Gy) sem sofrer mutação, a alta resistência apresentada deve-se a eficiência da capacidade de reparo da dupla quebra do DNA [11, 12]. Os mecanismos de defesa e reparo ainda não foram totalmente esclarecidos [10,11,12]. A alta tolerância das cianobactérias às radiações

pode ser entendida por sua origem remota, cerca de 3.8 bilhões de anos atrás, quando radiações ionizantes atingiam o planeta, devido à ausência de proteção através da camada de ozônio [16].

Ao término do experimento (t_{35}) os tratamentos 1 e 2 chegaram à mesma densidade celular ($2,3-2,5 \times 10^4$ cels.mL⁻¹). No entanto, o Tratamento 1 apresentou 97,6% de mortes celulares após 48 horas enquanto que o 2, apenas 67%. Do total de mortes das células iniciais no Tratamento 1, 16% ocorreram pela ação isolada do calor e 81,6% pela combinação de irradiação e perturbação térmica dos mecanismos de reparo. Embora não constitua uma prova direta, este último resultado sugere fortemente que com o aumento da agitação térmica no interior celular torna-se muito mais difícil e incerto o deslocamento das enzimas de reparo, bem como o reconhecimento por estas do sítio de dano no DNA. Em não havendo reparo, a opção mais provável para a célula é a de evoluir para a apoptose.

Salienta-se que em ambos os tratamentos, em t_2 ocorreram mais mortes celulares. Isto provavelmente aconteceu em decorrência da produção de radicais hidroxilas, átomos de H e elétrons hidratados que causam mudanças químicas na água e danos às células. Portanto em t_2 há a contribuição de radicais livres e substâncias não existentes anteriormente potencializando a morte celular.

A análise de DNA total e amplificado foi compatível com os dados obtidos através das curvas de sobrevivência com concentrações moleculares decrescentes nos tratamentos 3, 2, e 1. As reduções das concentrações do fragmento amplificado observadas poderiam estar, em parte, relacionadas ao menor número de células presentes. A diferença entre o número de células em t_1 em relação a t_0 (t_0-t_1) nos tratamentos 2 e 3 foi, respectivamente, 6,6 e 7, 1×10^{-6} , ou seja, apenas 7%. Mas após a amplificação do gene que codifica para a sintetase de microcistina os valores encontrados para as concentrações foram muito diferentes. Isto indica a possibilidade do DNA ter se danificado de forma irreparável e independente da quebra da parede celular, corroborando com o conhecimento de que a parede celular das cianobactérias é resistente.

Conclusão

A utilização da radiação gama é uma tecnologia promissora que poderá ser direcionada ao manejo de populações de cianobactérias tóxicas, se adequadamente ajustada.

O tratamento 1 associando radiação gama e posterior aquecimento provocou mais danos celulares do que se aplicados separadamente. A agitação térmica provavelmente interfere destrutivamente nos processos de deslocamento

de enzimas reparadoras, impedindo o reparo do DNA e conseqüentemente induzindo a apoptose. Esta metodologia pode ser ainda estendida para o tratamento de pessoas com câncer, no intuito de reduzir as doses de radiação e, no entanto, alcançar os mesmos resultados através da aplicação de um agente físico exógeno que interfira no reparo de DNA e leve as células cancerígenas a apoptose, minimizando os efeitos nocivos causados às células circundantes ao tumor.

Referências

- [1] Komárek, J., Komárková-Legnerová, J., Sant'Anna, C.L., Azevedo, M.T.P. and Senna, P.A.C.. Two common *Microcystis* species (Chroococcales, Cyanobacteria) from tropical America, including *M. panniformis* sp. nov. Cryptogam. Algol. V. 23, p. 159-177, 2002.
- [2] Cood, G.A., Bell, S.G., Kaya, K., Ward, C.J., Beattie, K.A. and Metcalf, J.S. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. Europ. J. Phycol. 34, p. 405-415, 1999.
- [3] Jochimsen, E.M.; Carmichael, W.W.; Na, J.; Cardo, D.M.; Cookson, S.T.; Holmes, C.E.M.; Antunes, B.C.; Melo Filho, D.A.; Lyra, T.M.; Barreto, V.S.T.; Azevedo, S.M.F.O and Jarvis, W. R. (1998) Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. New Engl J Med 338: p. 873-878.
- [4] Zukovs, G. Kollar, J., Monteith, H.D., Ho, K.W.A. and Ross, S.A. (1986) Disinfection of low quality wastewaters by ultraviolet light irradiation. J. Water Pollut. Control Fed 58: p. 199-206.
- [5] Gehringer, P. and Eschweiler, H. (2002) The dose rate effect with radiation processing of water – an interpretative approach. Radiation Phys. Chem. 65: p. 379-386.
- [6] Dietrich, J.P., Basagaoglu, H., Loge, F.J. and Ginn, T.R. (2003) Preliminary assessment of transport processes influencing the penetration of chlorine into wastewater particles and the subsequent inactivation of particle-associated organisms. Water Res. 37: p. 139-149.
- [7] Taghipour, F. (2004) Ultraviolet and ionizing radiation for microorganism inactivation. Water Res. 38: p. 3940-3948, 2004.
- [8] Thompson, J.A. and Blatchley, E.R. (2000) Gamma irradiation for inactivation of *C. parvum*, *E. coli*, and Coliphage MS-2. J. Environ. Eng. 126: p. 761-768, 2000.

[9] Sommer, R., Pribil, W., Appelt, S., Gehringer, P., Eschweiler, H. Leth, H., cabaj, A. and Haider, T (2001) Inactivation of bacteriophages in water by means of non-ionizing (UV-253.7nm) and ionizing (Gamma) radiation: a comparative approach. *Water Res.* 35: p. 3109-3116, 2001.

[10] Imamura, M., Sawada, S.; Kasahara-Imamura, M.; Harima, K. and Harada, K. (2002) Synergistic cell-killing effect of a combination of hyperthermia and heavy ion beam irradiation: In expectation of a breakthrough in the treatment of refractory cancers (Review). *Int. J. Mol. Medicine* 9: p. 11-18, 2002.

[11] Levin-Zaidman, S.; Englander, J.; Shimoni, E.; Sharma, A. K.; Minton, K. W. and Minsky, A. (2003) Ringlike structure of the *Deinococcus radiodurans* genome: a key to radioresistance? *Science* 299: p. 254-256, 2003.

[12] Rajan, R. and Bell, C.E. (2004) Crystal structure of RecA from *Deinococcus radiodurans*: Insights into the structural basis of extreme radioresistance. *J. Mol. Biol.* 344: p. 951-963, 2004.

[13] Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. and Stanier, R.Y. (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111, p. 1-61, 1979.

[14] Bittencourt-Oliveira, M.C. (2000) Development of *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing (Cyanophyceae/Cyanobacteria) under cultivation and its taxonomic implications. *Algolog. Stud.* 99, p. 27-37, 2000.

[15] Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-159
[19] Castenholz, R.W. and Garcia-Pichel, F. (2000) Cyanobacterial responses to UV-Radiation. In: *The Ecology of Cyanobacteria: their Diversity in Time and Space* (Whitton, B.A. and Potts, M. Eds). p.591-611. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands

[16] Rawat, K.P., Sharma, A. and Rao, S.M. (1998) Microbiological and Physical Analysis of Radiation Disinfected Municipal Sewage. *Water Res.* 32: p. 737-740, 1998.