



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Lindano: efeito sobre o crescimento, metabolismo energético e resposta antioxidante de *Saccharomyces cerevisiae* em distintos meios de cultura

Tiago André Melicias Pita

Orientação: Prof. Rui Ferreira

Prof^a. Isabel Alves-Pereira

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2014

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Lindano: efeito sobre o crescimento, metabolismo energético e resposta antioxidante de *Saccharomyces cerevisiae* em distintos meios de cultura

Tiago André Melicias Pita

Orientação: Prof. Rui Ferreira

Prof^a. Isabel Alves-Pereira

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2014

“Só sabemos com exatidão quando sabemos pouco,
à medida que vamos adquirindo conhecimentos, instala-se a dúvida.”

Johann Goethe

“A parte que ignoramos é muito maior que tudo quanto sabemos.”

Platão

Inteligência sem vontade, é como uma estrada debaixo de água,
de que serve existir, se não se vê nem é utilizada.

Tiago Pita

Agradecimentos

A concretização deste trabalho apenas foi possível devido à colaboração de algumas pessoas, envolvidas tanto a nível pessoal como profissional, e também aos organismos que proporcionaram os meios para a elaboração deste projeto. Assim, agradeço:

- aos meus orientadores, o Prof. Rui Ferreira e a Prof^a. Isabel Alves-Pereira, pelo conhecimento que me transmitiram, pela disponibilidade e boa disposição que tornou tudo mais simples, e pela dedicação e apoio demonstrados, tornando todo o processo mais proveitoso e gratificante;

- ao instituto de ciências agrárias e ambientais mediterrânicas, ICAAM, pelas facilidades, apoio financeiro e material imprescindíveis à realização do trabalho experimental;

- ao departamento de química, Universidade de Évora, pelas comodidades facultadas à concretização desta investigação;

- às colegas de laboratório, Marta, Joana e Rita, que sempre se mostraram disponíveis a ajudar em tudo o que precisasse, e que sempre contribuíram com a sua simpatia para que existisse um ambiente harmonioso, fundamental para o desenvolvimento de qualquer trabalho.

- à minha família, e em especial à minha namorada, Tânia, pelo apoio, compreensão e interesse que sempre demonstraram durante todo o processo de realização desta dissertação.

Índice

Índice de figuras	ii
Índice de quadros	iii
Abreviaturas e nomenclatura de enzimas	v
Resumo	ix
Abstract	xi
1. Fundamento Teórico	1
1.1. Lindano.....	1
1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
1.3. Stress Oxidativo	8
2. Problema e Objetivos	15
2.1. Problema.....	15
2.2. Objetivo geral.....	15
2.3. Objetivos específicos	15
3. Metodologia	17
3.1. Estratégia.....	17
3.2. Diagrama do trabalho	20
3.3. Procedimento experimental	21
3.3.1. Material biológico	21
3.3.2. Meios de cultura.....	21
3.3.3. Culturas celulares e ensaio de exposição ao lindano	21
3.3.4. Obtenção da curva de crescimento.....	22
3.3.5. Determinação da biomassa.....	22
3.3.6. Fracionamento celular.....	22
3.3.6.1. Obtenção dos lisados celulares	22
3.3.6.2. Preparação das frações do sobrenadante e do sedimento pós 12000 g	22
3.3.7. Doseamentos nas frações subcelulares	22
3.3.7.1. Proteína	22
3.3.7.2. Glutationo e dissulfureto de glutationo	23
3.3.7.3. Espécies reativas de oxigénio	24
3.3.7.4. Malonodialdeído	24
3.3.8. Determinação de atividades enzimáticas nas frações subcelulares.....	24
3.3.8.1. Fosfatase alcalina	24
3.3.8.2. Lactato desidrogenase	25
3.3.8.3. Lipoxigenases	25
3.3.8.4. Glucose-6-fosfato desidrogenase	26
3.3.8.5. Glutationo redutase	26

3.3.8.6. Fosfolipoperóxido glutationo peroxidase 2	26
3.3.8.7. Catalases.....	27
3.3.8.8. Cu, Zn - Superóxido Dismutase (SOD1)	27
3.3.8.9. γ -Glutamyltranspeptidase	28
3.3.9. Análise estatística dos resultados	28
3.4. Material	28
3.5. Equipamento	29
3.6. Reagentes.....	29
4. Resultados e discussão.....	31
4.1 Influência da composição do meio de cultura e da exposição ao lindano no crescimento e sobrevivência celular de <i>S. cerevisiae</i>	31
4.2 Efeito do lindano em sistemas antioxidantes e metabolismo energético de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	32
5. Conclusões	45
6. Referências bibliográficas.....	50
Anexos.....	59

Índice de figuras

Figura 1.1 – Representação estrutural do lindano.	1
Figura 1.2 – Ciclo celular de <i>S. cerevisiae</i>	5
Figura 1.3 – Curva de crescimento típica de uma cultura de <i>S. cerevisiae</i>	6
Figura 1.4 – Metabolismo energético de <i>S. cerevisiae</i>	7
Figura 1.5 – Origem de ROS e sistema antioxidante.	9
Figura 1.6 – Ciclo do γ -glutamilato.....	13
Figura 4.1 – Curvas de crescimento de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , obtidas pela contagem de cfu, e peso do resíduo seco de amostras da cultura de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ , na ausência e na presença de lindano nos distintos meios de cultura.....	32
Figura 4.2 – Conteúdo em tióis não-proteicos, GSH+GSSG, GSH e GSSG do sobrenadante pós 12000 g e do sedimento obtidos de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	34
Figura 4.3 – Razão GSH/GSSG e conteúdo em ROS e MDA do sobrenadante pós 12000 g e do sedimento obtidos de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	36
Figura 4.4 – Atividade enzimática SOD1, CTT1 e CTA1 obtidas de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	38

Figura 4.5 – Atividade enzimática PHGPx2 e LOX, obtidas de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	39
Figura 4.6 – Atividade enzimática GR e G6PD obtidas de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃ . 41	
Figura 4.7 – Atividade enzimática ALP, LDH e γ -GT obtidas de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	42
Figura A1 - Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de proteínas... 60	
Figura A2 - Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSH..... 60	
Figura A3 - Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSSG..... 60	
Figura A4 - Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de ROS. 60	
Figura A5 - Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de MDA. 61	
Figura A6 - Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática ALP de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	61
Figura A7 - Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática LDH de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	62
Figura A8 - Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática LOX de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	62
Figura A9 - Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática G6PD de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	63
Figura A10 - Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática GR de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	63
Figura A11 - Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática PHGPx2 (H ₂ O ₂) de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	64
Figura A12 - Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática PHGPx2 (t-BHP) de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	64
Figura A13 - Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática CTT1 de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	65
Figura A14 - Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática CTA1 de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	65
Figura A15 - Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática SOD de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	66
Figura A16 - Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática γ -GT de células de <i>S. cerevisiae</i> UE-ME ₃	66

Índice de quadros

Quadro A1 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”)	67
---	----

Abreviaturas e nomenclatura de enzimas

γ -HCH – gama-hexaclorociclohexano

AIF – fator indutor de apoptose (do inglês, *Apoptosis Inducing Factor*)

ALP – fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1)

APAF1 – fator ativador de proteases pró-apoptóticas 1 (do inglês, *Apoptotic Protease Activating Factor 1*)

ATP – adenosina trifosfato

ATPase – adenosina trifosfatase (EC 3.6.1.3)

BSA – albumina de soro bovino (do inglês, *Bovine Serum Albumin*)

CED-4 – proteína de morte celular 4 (do inglês, *Cell Death Protein 4*)

cfu – unidades formadoras de colônias (do inglês, *colony forming unit*)

COX – ciclooxigenase

CTA1 – catalase peroxissomal (EC 1.11.1.6)

CTT1 – catalase citoplasmática (EC 1.11.1.6)

CYP – gene codificante de citocromo P₄₅₀ em rato (EC 1.14.14.1)

DCF – 2',7'-diclorofluoresceína

DCFH – 2',7'-diclorofluoresceína (forma reduzida)

DL₅₀ – dose letal 50

DNA – ácido desoxirribonucleico

EC – extracelular

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

ETC – cadeia transportadora de elétrons

G6P – glucose-6-fosfato

G6PD – glucose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49)

GABA_A – recetor do ácido gama-aminobutírico

GPx – glutationo peroxidase (EC 1.11.1.9)

GR – glutationo redutase (EC 1.6.4.2)

GSH – glutationo

GSSG – dissulfureto de glutationo

GST – glutationo-s-transferase

H₂O₂ – peróxido de hidrogénio

HCl – ácido clorídrico

HNE – 4-hidroxinonenal

HPETE – ácidos hidroperoxieicosatetraenóicos
HPLA – ácido hidroperoxilinoico
IC₅₀ – dose de inibição 50
LA – ácido linoleico
LDH – lactato desidrogenase (EC 1.1.1. 28)
LOOH – lipoperóxidos
LOX – lipoxigenase
MAO – monoaminoxidases
MDA – malonodialdeído
NAD⁺ – dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma oxidada)
NADH – dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
NADP⁺ – fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma oxidada)
NADPH – fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
NaOH – hidróxido de sódio
NBT - Azul de tetrazólio nitro
NEM – *N*-etilmaleimida
O₂ – dióxigénio
O₂^{•-} – radical anião superóxido
OH⁻ – anião hidróxido
OH[•] - radical hidroxilo
OPT – *o*-fetaldeído
PHGPx – fosfolipoperóxido glutationo peroxidase (EC 1.11.1.12)
pNP – *p*-nitrofenol
pNPP – *p*-nitrofenilfosfato
POP – poluente orgânico persistente
PUFA's – ácidos gordos polinsaturados (do inglês, *polyunsaturated fatty acids*)
RC – cadeia respiratória (do inglês, *Respiratory Chain*)
ROOH – peróxido
ROS – espécies reativas de oxigénio (do inglês, *Reactive oxygen species*)
SDS – duodecilssulfato de sódio
SOD – superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)
TBA – ácido tiobarbitúrico
t-BHP – *t*-butil peróxido
TDL0 – dose mínima capaz de provocar toxicidade

TRX – tioredoxina

UV – ultravioleta

WHO – Organização Mundial de Saúde (do inglês, *World Health Organization*)

YED – meio restritivo em peptona

YEP – meio restritivo em glucose

YEPD – meio rico

γ -GT – γ -glutamil transpeptidase

Resumo

A exposição ao lindano despoletou um decréscimo da capacidade antioxidante citoplasmática, mediada pelo glutatióno, bem como das atividades enzimáticas fosfatase alcalina, lactato desidrogenase e γ -glutamil transpeptidase de *Saccharomyces cerevisiae* crescidas em meio rico, respostas insuficientes para prevenir stress oxidativo e perda de viabilidade celular detetadas para o nível de 50 μM de inseticida. A carência nutritiva despoletou mecanismos de formação/eliminação de espécies reativas de oxigénio, bem como de disponibilização energética, com aumento das atividades lipoxigenase, fosfolipoperóxido glutatióno peroxidase superóxido dismutase, fosfatase alcalina e γ -glutamil transpeptidase citoplasmáticas. A exposição ao lindano (50 μM) de células crescidas em carência de glucose, usualmente respiratórias, induziu stress oxidativo com decréscimo da viabilidade celular, das atividades fosfatase alcalina e catalase, bem como um aumento das atividades lactato desidrogenase e γ -glutamil transpeptidase citoplasmáticas. A transição respiratório-fermentativa, bem como o incremento de vias de biotransformação indiciam uma eventual utilização do lindano como fonte de carbono.

Lindane: effects on growth, energy metabolism and antioxidant response of *Saccharomyces cerevisiae* at different culture media.

Abstract

Lindane exposure triggered a decrease in antioxidant glutathione-mediated power, as well as a decrease in enzyme activities alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase and γ -glutamyl transpeptidase of cytoplasm of *Saccharomyces cerevisiae* grown in rich medium, poor response to prevent oxidative stress and loss of cell viability detected to the level of 50 μ M of insecticide. The nutrient deficiency triggered mechanisms of formation/elimination of reactive oxygen species, as well as energy availability, with an increase lipoxygenase, phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, superoxide dismutase, alkaline phosphatase and γ -glutamyl transpeptidase activities of cytoplasm. Exposure to 50 μ M lindane of cells grown in glucose deprivation, usually respiratory, induced oxidative stress, loss of cell viability and a decrease of alkaline phosphatase and catalase activities as well as an increase in lactate dehydrogenase and γ -glutamyl transpeptidase activities of cytoplasm. The respiratory-fermentative transition, and an increment of biotransformation pathways suggest a possible use of lindane as carbon source.

1. Fundamento Teórico

1.1. Lindano

Os produtos organoclorados têm sido amplamente utilizados como fungicidas, inseticidas e pesticidas. O lindano, o isómero γ do hexaclorociclohexano (γ -HCH) (fig. 1.1), é um inseticida organoclorado muito utilizado até a sua produção em larga escala ser descontinuada e a sua utilização proibida na Europa, à semelhança do que aconteceu com outros compostos organoclorados, devido essencialmente à sua toxicidade ambiental. No entanto, apesar da maior parte dos países desenvolvidos terem interditado a sua utilização há cerca de 40 anos, ainda se encontra muito presente no ambiente, sendo motivo de grande preocupação (Bernabia, 2013; Michalowicz, 2013; Hfaiedh, 2011).

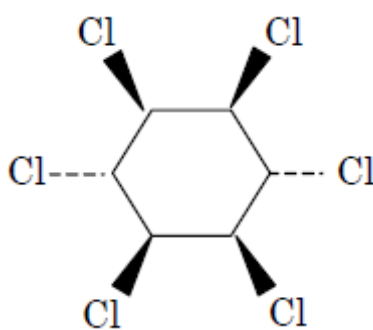


Figura 1.1 – Representação estrutural do lindano (adaptado de Parveen, 2003).

O lindano é considerado pela organização mundial de saúde (WHO) como um agente moderadamente perigoso. Este apresenta uma DL_{50} entre 56-250 mg/kg em murganhos e entre 140-190 mg/kg em ratos. Em humanos estima-se que a dose mínima capaz de provocar toxicidade (TDL0) se situa entre 111-180 mg/kg. Em paramécias o IC_{50} localiza-se entre 5,94-92,1 μ M, variando em função da espécie exposta ao xenobiótico e do tempo de exposição (WHO, 2004; Miyoshi, 2003; Parveen, 2003)

A população em geral contacta maioritariamente com este inseticida através da alimentação, podendo este ser detetado em produtos lácteos, carne, peixe, frutos, produtos hortícolas, chás, especiarias, ovos, entre outros. Para a maioria dos produtos alimentares o valor máximo de lindano permitido pela WHO é de 0,01 mg/kg, estando também contemplado este valor na lei portuguesa. Relativamente à água de consumo o limite é de 0,002 mg/L, sendo que nas águas superficiais o valor encontrado apresenta-se normalmente bem abaixo do limite (0,01-0,1 μ g/L) (WHO, 2004; Decreto-Lei nº 68/2003).

Este fitofármaco, apesar de apresentar efeitos tóxicos nos seres vivos é também utilizado para fins medicinais, nomeadamente como escabicida e pediculicida no tratamento

da sarna e da pediculose em humanos, respetivamente, e como ectoparasiticida em animais (Hfaiedh, 2011).

Carateriza-se por ser um composto muito pouco hidrolisável, o que leva à sua persistência na natureza e logo, à ubiquidade no ecossistema global. Também o facto de ser bioacumulável implica a sua presença ao longo da cadeia alimentar o que leva em última instância à exposição do homem a este pesticida, sendo assim a via digestiva a principal via de exposição. No entanto, este também pode ser absorvido através da via cutânea e respiratória, estando esta exposição associada a um contato mais direto, menos comum hoje em dia, uma vez que o seu uso foi banido na maioria dos países (Benarbia, 2013; Hfaiedh, 2012; Hfaiedh, 2011).

A bioacumulação ao nível dos animais dá-se essencialmente ao nível lipídico pois trata-se de um composto lipossolúvel, sendo assim acumula-se um pouco por todo o organismo, sendo facilmente ingerido pelo animal subsequente na cadeia alimentar. Logo, o Homem estando no topo da cadeia alimentar vai estar exposto a níveis de concentração de lindano mais elevados, no entanto baixos, mas que possuem mesmo assim toxicidade. Além da exposição devida ao consumo de animais, plantas ou águas contaminadas, existe ainda a exposição ao lindano dos bebés tanto durante a gestação como na amamentação materna (Benarbia, 2013).

A exposição a compostos organoclorados está atualmente associada a diversas patologias e disfunções fisiológicas. Foram já detetadas correlações positivas entre a ocorrência de situações patológicas como a obesidade, o cancro, e a diabetes e a concentração de lindano no sangue dos pacientes. Para além disso está comprovado na literatura que o lindano possui propriedades neuro-, geno-, imuno- e hepatotóxicas por testes realizados em roedores (Bernabia, 2013, Hfaiedh, 2012).

Os efeitos tóxicos do lindano ao nível do sistema nervoso estão já descritos em estudos realizados com roedores. Além do tecido adiposo, o cérebro é o órgão onde este pesticida se acumula mais, sendo também capaz de metabolizá-lo. No cérebro, o lindano causa modificações que levam a alterações na atividade motora, na regulação da temperatura e peso corporal, no balanço neuroquímico, metabólico e no fluxo sanguíneo do sistema nervoso central, estando também já associado a doenças do foro neuronal como a doença de Parkinson, devendo-se essencialmente à deterioração dos neurónios dopaminérgicos. Estas alterações provocam, entre outras, hiperexcitabilidade, comportamento desadequado, e até convulsões. A neurotoxicidade do lindano deve-se principalmente ao antagonismo não competitivo com o recetor GABA_A, podendo também afetar outros neurotransmissores, sendo

este o principal mecanismo de ação do composto como inseticida. A resposta tóxica do lindano no cérebro está muito envolvida com a ação do sistema citocromo P₄₅₀, verificando-se a ocorrência de convulsões essencialmente após a metabolização do inseticida pelos isoenzimas CYP2B e CYP1A. Pode-se ainda observar que, quando existe uma exposição ao xenobiótico no estágio pré-natal, a resposta tóxica, a este agente e outros também envolvidos com os mesmos isoenzimas CYP, é mais acentuada na fase pós-natal. A suplementação com vitaminas C e E ou com zinco e magnésio comprovadamente diminuem a neurotoxicidade do lindano. Estão também comprovados em roedores alguns dos efeitos nefastos do inseticida ao nível reprodutor, mesmo em pequena concentração, dado que este tende a acumular-se nos testículos (Hfaiedh, 2012; Hfaiedh, 2011; Sharma, 2010; Johri, 2008; Johri, 2007). A exposição ao lindano ainda na fase uterina pode provocar criptorquidia ou ausência unilateral de gónadas, nanismo, diminuição da quantidade de espermatozoides ao nível dos testículos ou dos epidídimos e ainda diminuição da mobilidade espermática. Quando a exposição ocorre ainda na fase de amamentação observa-se uma diminuição do peso testicular e da quantidade de esperma (Sauviat, 2007). Na idade adulta, quando ocorre a exposição ao xenobiótico, surgem vários efeitos prejudiciais ao nível do sistema reprodutor, principalmente devido ao stress oxidativo provocado pelo inseticida. Neste estágio de vida verifica-se que o lindano provoca diversos efeitos tais como, a atrofia tubular, a necrose de células espermatogénicas, desregulação das células Sertoli e Leydig, alterações da atividade ATPase da membrana plasmática testicular, uma diminuição da espermatogénese e esteroidogénese, diminuição da quantidade de esperma, alterações do metabolismo da testosterona e dos níveis plasmáticos desta hormona, e ainda um desequilíbrio ao nível do sistema de defesa antioxidante testicular. Os efeitos mais acentuados ao nível do esperma devem-se essencialmente ao facto dos espermatozoides apresentarem uma membrana plasmática rica em ácidos gordos polinsaturados (PUFA's), mais suscetível ao ataque de espécies reativas de oxigénio (ROS) (Saradha, 2009; Saradha, 2008; Saradha, 2006). O lindano também provoca alterações ao nível do sistema imunitário em vários organismos desde peixes a mamíferos. A exposição do xenobiótico provoca um aumento da concentração de iões cálcio em diferentes células, incluindo nas junções neuromusculares de sapo, em leucócitos humanos e em macrófagos de porco. Com a alteração da homeostase de cálcio intracelular, o lindano afeta a atividade NADPH oxidase nos macrófagos, o que compromete a sua função imunitária. Em estudos realizados em peixes observou-se que o lindano provoca um aumento do número de leucócitos, incluindo de linfócitos como resposta ao stress provocado por esse agente químico, ocorrendo também um aumento do conteúdo em ROS. Em roedores, o lindano exhibe

uma potente atividade imunossupressora, diminuindo a resposta dos anticorpos e a resistência a doenças infecciosas e ocorrência de neoplasias (Michalowicz, 2013; Saravanan, 2011; Duchiron, 2002; Betoulle, 2000). Em humanos, observou-se uma maior incidência de linfoma não-Hodgkin em trabalhadores que estabeleceram contato direto com o inseticida. Estudos *in vitro* com linfócitos humanos revelaram alterações apoptóticas nestas células quando expostas ao lindano em baixa concentração, e ainda a formação de ROS e redução do potencial transmembranar mitocondrial (Michalowicz, 2013). No fígado, sendo um órgão muito sensível e local de acumulação e de biotransformação do lindano, o xenobiótico apresenta elevada toxicidade. A intoxicação pelo lindano provoca hipertrofia e esteatose, bem como a interrupção do processo de autofagia e inibição da via apoptótica mitocondrial em hepatócitos, o que leva à morte celular por necrose (Michalowicz, 2013; Zucchini-Pascal, 2009). A formação de ROS, como o radical superóxido, é a principal causa da hepatotoxicidade, devendo-se esta principalmente à biotransformação do lindano pelo sistema CYP₄₅₀. Um dos produtos da biotransformação são os policlorociclohexanos que são suscetíveis de sofrer conjugação com o glutathione para eliminação como mercapturados, o que diminui o conteúdo deste tripéptido. Consequentemente, e uma vez que também se observa uma diminuição das atividades superóxido dismutase e catalase, a defesa antioxidante dos hepatócitos é diminuída. Ocorre ainda peroxidação lipídica, mais um sinal de que o lindano é um agente indutor de stress oxidativo (Hfaiedh, 2012; Zucchini-Pascal, 2011, Videla, 2000).

1.2. *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras têm sido amplamente utilizadas em investigação, entre elas destaca-se a *Saccharomyces cerevisiae*, que para além da utilização recente na investigação, é usada há milhares de anos na fermentação do vinho e da cerveja e também na panificação, sendo um processo no qual são convertidos glúcidos, aminoácidos, péptidos, proteínas, entre outros, em álcool e dióxido de carbono, essencialmente. Esta espécie está hoje em dia bem caracterizada ao nível genético, fisiológico e metabólico. Trata-se de um microrganismo unicelular eucariota do reino fungi, medindo 3-8 µm de diâmetro, que se reproduz de forma assexuada ou sexuada. A cultura de *S. cerevisiae* é simples, económica e rápida, ocorrendo uma duplicação do número de células a cada 90 minutos (Held, 2010; MacDonald, 2001).

A *S. cerevisiae* em condições normais de crescimento segue a reprodução assexuada, na qual ocorre a divisão mitótica das células por um processo denominado por *budding*,

podendo este ocorrer tanto em células haplóides como diplóides. Quando a célula se depara com um meio nutricionalmente restrito, com privação de fonte de carbono ou azoto, esta passa a reproduzir-se de forma sexuada, na qual as células diploides sofrem meiose (esporulação), formando quatro células haplóides, do tipo a e α , que por sua vez podem sofrer mitose e conjugar-se novamente para formar células diploides (fig. 1.2) (Neiman, 2005; MacDonald, 2001; Herskowitz, 1988).

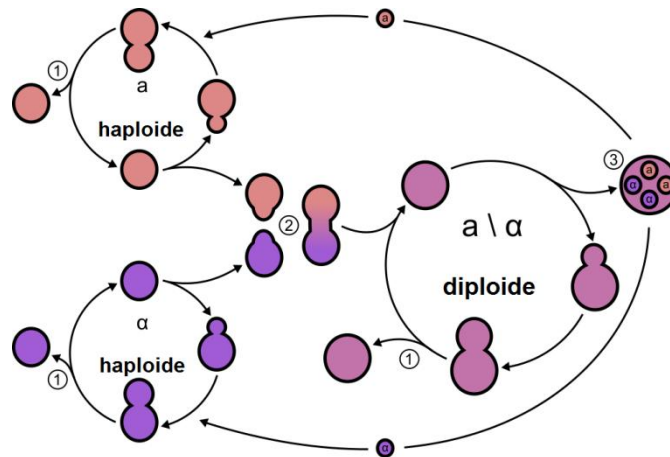


Figura 1.2 – Ciclo celular de *S. cerevisiae*. 1 – Budding, 2 – Conjugação, 3 – Esporo (adaptado de Herskowitz, 1988).

O perfil de crescimento desta levedura é muito semelhante ao de outros microrganismos como as bactérias, caracterizando-se essencialmente por três fases distintas, que são, a fase lag, a fase log ou exponencial e a fase estacionária (fig. 1.3) (Held, 2010; Walker, 1998).

A fase lag caracteriza-se pela ausência de crescimento. Nesta fase a célula ainda se encontra em adaptação às condições do meio envolvente, como a temperatura, pH, disponibilidade de substratos, entre outras. Ocorre então um ajustamento do metabolismo às condições do meio, sintetizando os enzimas necessários para o crescimento e multiplicação celular. Estabelecidas as necessidades bioquímicas para o crescimento, as células começam a multiplicar-se a uma taxa constante, iniciando assim a fase exponencial (log). Na fase log existe uma grande necessidade de energia e conseqüentemente de uma elevada quantidade de fonte de carbono (glucose), para ocorrer a fermentação. Esta fase caracteriza-se pela semelhança das células em termos de composição química, atividade metabólica, e outras características fisiológicas, sendo portanto a fase preferencialmente selecionada para estudos metabólicos. A elevada taxa de multiplicação leva rapidamente à escassez do substrato, o que conseqüentemente pode conduzir a uma alteração do metabolismo para a via respiratória, na qual as células metabolizam os produtos da fermentação como o etanol e ácidos orgânicos. A

alteração do metabolismo pode levar a uma breve atenuação do crescimento durante a fase log, semelhante à fase lag, denominada fase diáuxica (fig. 1.3). Quando esgotam os substratos alimentares, ocorre uma diminuição da multiplicação celular, atingindo-se a fase estacionária, onde as células apesar de não se multiplicarem, mantêm a sua viabilidade celular por muito tempo (Boender, 2011; Held, 2010; Gray, 2004; MacDonald, 2001; Walker, 1998).

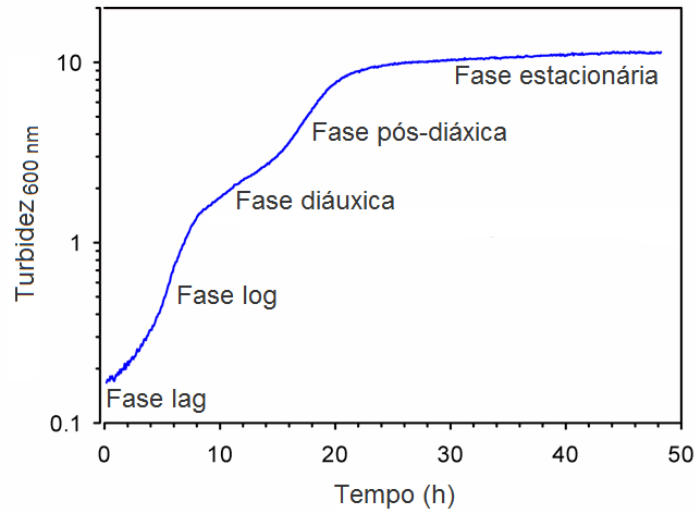


Figura 1.3 – Curva de crescimento típica de uma cultura de *S. cerevisiae* (adaptado de Gray, 2004).

A *S. cerevisiae* é um microrganismo aeróbio facultativo, capaz de adaptar o seu metabolismo (fig. 1.4) de acordo com a disponibilidade em fonte de carbono, optando preferencialmente pela via fermentativa quando dispõe de glucose ou galactose, enquanto que em condições de carência desses substratos, opta pela via respiratória, utilizando por exemplo o etanol ou o lactato como substrato. A levedura, quando está no meio rico em glucose, utiliza preferencialmente a via fermentativa para o metabolismo energético, mesmo em condições de aerobiose, ocorrendo assim a glicólise aeróbia, denominada também de efeito de Warburg, um processo idêntico ao que ocorre em células cancerígenas. No entanto, a literatura também descreve uma transição metabólica respiratória-fermentativa que ocorre quando é fornecida glucose a células até então respiratórias por carência desse nutriente. Esta resposta denomina-se efeito Crabtree. Uma vez captada a glucose do meio extracelular, esta é processada pela glicólise, levando à produção de duas moléculas de piruvato com um rendimento líquido de duas moléculas de ATP e duas de NADH. Entretanto a glucose também pode ser utilizada pela via das pentose fosfato, em que um dos intermediários da glicólise, a glucose-6-fosfato (G6P), é oxidado pelo enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) a 6-fosfogluconolactona, que após um passo de hidrolisação e outro de descarboxilação, origina a ribulose-5-fosfato que é convertida a ribose-5-fosfato. A ribulose-5-fosfato vai então servir de

substrato a uma cadeia de reações não oxidativas que originam, entre outros, dois intermediários da glicólise, a frutose-6-fosfato e o gliceraldeído-3-fosfato. Uma vez formadas as moléculas de piruvato, estas podem ser reduzidas pelo lactato desidrogenase (LDH) a lactato, renovando-se a disponibilidade de NAD^+ para a glicólise. Na impossibilidade de realizar a glicólise pela ausência de substrato, o lactato pode ser novamente convertido pela LDH em piruvato, que é convertido no mitocôndrio em Acetil-CoA, o principal precursor do ciclo do citrato, vulgarmente designado por ciclo de Krebs, passando assim a célula ao metabolismo oxidativo. Esta modificação metabólica implica um aumento da expressão de enzimas antioxidantes para combater o aumento de ROS (Patra, 2014; Renvoisé, 2014; Fets, 2013; Muñoz-Pinedo, 2012; Diaz-Ruiz, 2009; Costa, 2001).

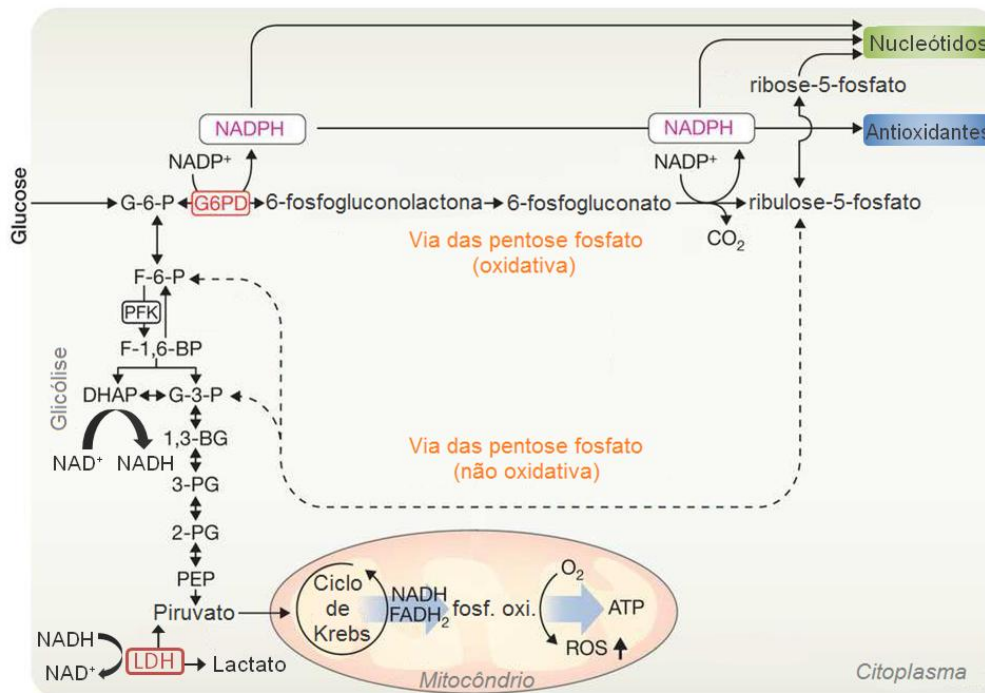


Figura 1.4 – Metabolismo energético de *S. cerevisiae* (adaptado de Fets, 2013).

O crescimento das culturas de *S. cerevisiae* pode ser acompanhado por diversos métodos, diretos ou indiretos. A contagem de células pode realizar-se por microscopia ou por citometria de fluxo, no entanto nestas técnicas não se distinguem as células vivas das mortas. Quando se pretende quantificar apenas as células viáveis utiliza-se um método indireto, em que, utilizando uma série de diluições da cultura, se contam as unidades formadoras de colónias (cfu) em meio sólido. Em alternativa à contagem de células pode-se determinar a massa celular, diretamente pela biomassa (peso seco), ou então indiretamente por turbidimetria, pela absorvência a 640 nm. Além destas aproximações, existem métodos menos

diretos de avaliar o crescimento de uma cultura de células, em que se estimam marcadores da atividade celular, como o consumo de glucose, a produção de dióxido de carbono, e a determinação da atividade de alguns enzimas, em particular a fosfatase alcalina (Walker, 1998).

O termo fosfatase alcalina (ALP) designa uma família de enzimas que se encontra presente em muitas espécies, desde as bactérias ao ser humano. Na espécie humana existem quatro subfamílias de isoenzimas, três das quais apresentam uma distribuição específica, encontrando-se no intestino, na placenta e em células germinativas, sendo que a quarta subfamília exibe uma distribuição indiferenciada em vários órgãos. Na *S. cerevisiae*, o enzima ALP é codificado pelos genes *PHO8* ou *PHO13*, sendo o primeiro enzima uma proteína dimérica dependente de Mg^{2+}/Zn^{2+} , e o segundo uma proteína monomérica. A atividade enzimática deste enzima compreende a hidrólise de uma série de compostos fosfatados como a adenosina trifosfato (ATP), ribonucleósidos e desoxinucleósidos polifosfatos, e ainda polimetafosfatos. O enzima ALP está então fortemente implicado na disponibilização do potencial químico indispensável à proliferação celular (Linder, 2013; Ali, 2005; Tuleva, 1998; Klionsky, 1989; Heppel, 1962).

1.3. Stress Oxidativo

O stress oxidativo define-se essencialmente por um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes nos sistemas biológicos. Caracteriza-se por uma incapacidade de desintoxicação do excesso de espécies reativas de oxigénio (ROS) produzidas e/ou incapacidade para reparar os danos inerentes, que podem ser de cariz proteico, lipídico ou genómico. Esta condição está atualmente associada a algumas patologias neurodegenerativas, cardiovasculares, metabólicas e inflamatórias, bem como ao cancro (Choudhary, 2014; Walsh, 2014; Vurusaner, 2012; Franco, 2010).

O aparecimento do dióxigénio na atmosfera permitiu o desenvolvimento de mecanismos de produção de energia mais eficientes, no entanto introduziu ao mesmo tempo um problema de toxicidade, devido à alta reatividade do oxigénio. As ROS são subprodutos do metabolismo energético, originados essencialmente ao nível do mitocondrio, aos quais a célula se adaptou, desenvolvendo mecanismos antioxidantes para combater estas entidades químicas e os seus danos. No entanto, quando os níveis de produção de ROS são muito elevados, a célula pode não conseguir responder a essa alteração. A ocorrência de níveis anormais de ROS pode advir de vários fatores ambientais, como exposição à radiação

ultravioleta (UV), metais e xenobióticos, incluindo os inseticidas (fig. 1.5). Os componentes celulares e os xenobióticos podem sofrer autooxidação através da radiação UV formando ROS, como os peróxidos e lipoperóxidos. Os inseticidas, como o lindano, podem provocar o aumento da produção de ROS, pela ativação metabólica com indução do sistema citocromo P₄₅₀ (Al-Gubory, 2014; Lushchak, 2011; Cipak, 2008).

A nível celular, a maioria das ROS formadas provém da produção de energia via cadeia respiratória (RC) sendo consumido desta forma 90% de todo o dioxigénio utilizado pela célula. Cerca de 10 % desse dioxigénio acaba por ser reduzido por apenas um eletrão que escapa da RC, formando espécies reativas. O retículo endoplasmático é a segunda fonte de ROS, sendo um local de catabolismo de químicos celulares e extracelulares por via P₄₅₀ que implica etapas de oxidação-redução e a utilização de cadeias transportadoras de eletrões geradoras de ROS. Alguma quantidade de ROS pode ainda ser produzida no citoplasma e peroxissomas pela ação de diferentes oxidases (Martínez-Reyes, 2014; Lushchak, 2011).

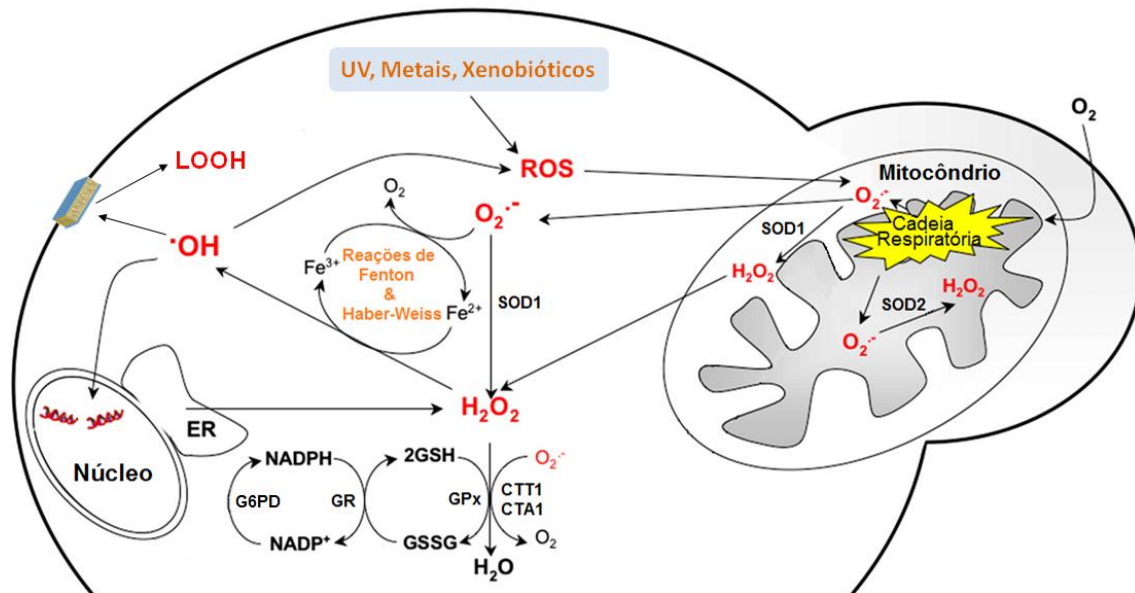


Figura 1.5 – Origem de ROS e sistema antioxidante. $\cdot\text{OH}$ – radical hidroxilo, CTA1 – catalase peroxissomal, CTT1 – catalase citoplasmática, ER – retículo endoplasmático, G6PD – glucose-6-fosfato desidrogenase, GPx – glutatióno peroxidase, GR – glutatióno redutase, GSH – glutatióno, GSSG – dissulfureto de glutatióno, H_2O_2 – peróxido de hidrogénio, LOOH – lipoperóxidos, $\text{O}_2^{\cdot-}$ – radical anião superóxido, OH^{\cdot} – radical hidroxilo, ROS – espécies reativas de oxigénio, SOD – superóxido dismutase (adaptado de Perrone, 2008).

O radical anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) é a principal espécie reativa a ocorrer, sendo formada tanto nas cadeias transportadoras de eletrões como pela ação de oxidases, como as NADPH oxidases e as monoaminoxidases (MAO). Na RC, a produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ ocorre maioritariamente ao nível dos complexos I, II e III. Os três complexos libertam radicais para a matriz mitocondrial, no entanto o complexo III também liberta radicais para o espaço

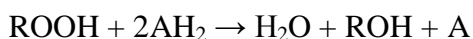
intermembranar alcançando facilmente o citoplasma. O $O_2^{\cdot-}$ pode então sofrer a ação do enzima superóxido dismutase (SOD) que transforma este radical em peróxido de hidrogénio (H_2O_2). O H_2O_2 por sua vez também pode originar, através de reações de Fenton ou de Haber-Weiss, a formação de outra espécie reativa, o radical hidroxilo (OH^{\cdot}), o mais perigoso. As reações tipo Fenton ocorrem entre o H_2O_2 e o ião ferroso (Fe^{2+}), na qual este ião catalisa a libertação de um eletrão do peróxido gerando o anião hidroxilo (OH^-) e o radical hidroxilo (OH^{\cdot}). A reação de Haber-Weiss pode ocorrer entre duas ROS, o H_2O_2 e o $O_2^{\cdot-}$, originando OH^- , O_2 e OH^{\cdot} (Al-Gubory, 2014; Martínez-Reyes, 2014; Mailoux, 2013).

O enzima superóxido dismutase catalisa a reação de dismutação do radical anião superóxido em peróxido de hidrogénio. Apesar deste enzima transformar uma espécie reativa noutra, é considerado um importante agente antioxidante, uma vez que o peróxido pode então ser facilmente degradado em água e dióxigénio por ação de outros enzimas. Existem três principais isoformas de SODs em eucariotas, a Cu,Zn-SOD (SOD1), que está presente no citoplasma, núcleo e espaço intermembranar mitocondrial, a Mn-SOD (SOD2), presente na matriz mitocondrial, e a EC-Cu,Zn-SOD (SOD3) presente no espaço extracelular (EC). A Cu, Zn-SOD apresenta um papel fundamental na defesa antioxidante, tendo-se observado que leveduras mutantes sem expressão deste enzima são incapazes de crescer em condições respiratórias (Silva, 2014; Heink, 2013; Herrero, 2008).

Os sistemas enzimáticos antioxidantes das células eucariotas, descritos na fig. 1.5, envolvem processos enzimáticos e não enzimáticos. Algumas moléculas antioxidantes fazem parte das defesas não enzimáticas, como o glutathione, algumas vitaminas (A, C e E) e carotenoides (β -caroteno). Entre os enzimas antioxidantes, constam para além da SOD, catalases e glutathione peroxidases. Estes últimos enzimas, as GPx, utilizam co-fatores gerados pelos enzimas glutathione redutase e glucose-6-fosfato desidrogenase incluídos em duas vias metabólicas vitais, o ciclo de oxidação-redução do glutathione e a via das pentoses fosfato (Al-Gubory, 2014; Griboff, 2014; Silva, 2013; Lushchack, 2011).

Em eucariotas, tal como em *S. cerevisiae* existem dois tipos de catalases, CTA1, peroxissomal, envolvida na desintoxicação do H_2O_2 formado por acetil-CoA oxidases durante a β -oxidação, e CTT1, citoplasmático, menos relevante na desintoxicação basal de H_2O_2 , cuja expressão aumenta em condições de stress oxidativo, osmótico e de carência de fonte de carbono. Estes enzimas são dos mais eficientes na desintoxicação de peróxidos, podendo exercer a sua ação por duas vias, uma catalítica e outra peroxidativa. A via catalítica dismuta duas moléculas de H_2O_2 , com formação de $2H_2O$ e O_2 , enquanto que a via peroxidativa utiliza

doadores de H, como o metanol, o etanol, ou ácido fórmico para eliminar peróxidos de acordo com a equação (Fransen, 2012; Herrero, 2008; Matés, 2000):



O saudável ambiente redutor celular é mantido pelo tripéptido glutationo, γ -L-glutamyl-L-cisteinilglicina, o tiol não proteico maioritário da célula, bem como pelo seu produto de oxidação, o dissulfureto de glutationo (GSSG). O GSH é sintetizado apenas no citoplasma, sendo posteriormente distribuído pelos diferentes compartimentos celulares, tais como mitocondrio, núcleo e retículo endoplasmático, onde exerce diversas ações, atuando ao nível da proliferação celular, da apoptose, da transcrição, bem como da defesa antioxidante, onde pode atuar diretamente na excreção de xenobióticos e outros subprodutos celulares, conjugando-se com estes, ou então servindo como cofator de enzimas antioxidantes como glutationo peroxidases (GPx) (Mailloux, 2013; Dardalhon, 2012; Fransen, 2012; Biswas, 2009; Matés, 2000).

O termo fosfolipoperoxido glutationo peroxidase (PHGPx) designa um conjunto de proteínas monoméricas, maioritariamente localizadas em sistemas membranares e no citoplasma que estão envolvidas na redução de peróxidos de colesterol ou de fosfolípidos, produtos da peroxidação lipídica (Pacitti, 2013; Toppo, 2009; Imai, 2003). Em *S. cerevisiae* expressam-se três PHGPx, codificadas pelos genes *GPx1*, *GPx2* e *GPx3*. Estas PHGPx distinguem-se das detetadas em mamíferos relativamente ao centro ativo que não contém selénio mas apenas o resíduo de cisteína. Este perfil enzimático particular confere a esta levedura elevada resistência ao stress oxidativo, uma vez que remove eficientemente os produtos gerados pelos danos oxidativos nos lípidos e esteróis de membrana, assegurando na mesma a capacidade de desintoxicação para o H_2O_2 . O enzima PHGPx3 encontra-se expresso no metabolismo normal de *S. cerevisiae* assegurando a defesa antioxidante basal do meio intracelular, sendo o principal responsável pela prevenção da peroxidação dos lípidos de membrana, bem como da defesa contra danos oxidativos, encontrando-se distribuído apenas no meio intracelular ao nível do espaço intermembranar mitocondrial e da matriz peroxissomal. Para além da função antioxidante, este enzima funciona ainda como um sensor e transdutor da resposta ao stress provocado pelo peróxido de hidrogénio, através do fator de transcrição Yap1, que é o principal regulador de genes envolvidos no stress oxidativo. A PHGPx2 encontra-se localizada no citoplasma, na face citoplasmática da membrana externa mitocondrial e na face da matriz da membrana interna mitocondrial, sendo a sua expressão

induzida transcricionalmente como resposta ao stress oxidativo por vias reguladas pelo Yap1, observando-se também uma regulação da sua expressão pela concentração de Ca^{2+} . Além disso, atipicamente o estado redox do centro ativo deste enzima é regulado por duas tiorredoxinas citoplasmáticas (TRX1 e TRX2) em vez do GSH. Por último, o PHGPx1 encontra-se localizado na matriz peroxissomal e também na face citoplasmática da membrana externa mitocondrial, sendo induzido pela carência de glucose. Num contexto evolutivo, a expressão destes três PHGPx, conjuntamente com a ausência de síntese de PUFA's é expectável num organismo que se adaptou a elevados fluxos de ROS gerados nas membranas ou em torno destas (Morano, 2012; Lee, 2011; Muthukumar, 2011; Herrero, 2008; Avery, 2004; Avery, 2001). O consumo de glutatióno pelos GPx, é compensado pelo flavoenzima glutatióno redutase (GR) que regenera o dissulfureto de glutatióno citoplasmático em GSH recorrendo aos equivalentes redutores sob a forma de NADPH produzidos pelo enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (Al-Gubory, 2014; Rui-Yan, 2007; Sebollela, 2004).

O enzima G6PD, catalisa o passo de desidrogenação da D-glucose-6-fosfato proveniente da glicólise, em 6-fosfogluconolactona, reduzindo de forma acoplada o cofator NADP^+ a NADPH, o passo limitante da via das pentoses fosfato. A formação de equivalentes redutores sob a forma de NADPH é essencial para duas funções essenciais da célula, a biossíntese *de novo* de lípidos e a proteção dos tecidos contra danos oxidativos (Ho, 2012; Asensio, 2007; Felix, 2002).

Para além do papel que o glutatióno desempenha na defesa antioxidante enzimática, também pode eliminar os agentes pro-oxidantes de forma direta conjugando-se com estes. O GSH pode conjugar-se com eletrófilos, como o 4-hidroxinonenal (HNE), bem como xenobióticos, de forma não-enzimática ou enzimática. O processo enzimático é catabolizado pelo glutatióno-S-transferase (GST) que despoleta um ataque nucleofilo do grupo sulfidrilo do GSH sobre um grupo eletrofilo do substrato. O lindano pode ser eliminado da célula por esta via, depois de ser metabolizado em policlorociclohexanos (Padma, 2011; Wünschmann, 2010; Adamis, 2009; Forman, 2009).

O ciclo do γ -glutamilato apresenta então um papel fundamental na excreção dos conjugados do glutatióno. Este ciclo compreende a catabolização e a síntese de GSH com a intervenção de vários enzimas (fig. 1.6). Na levedura, os conjugados do GSH são transportados para o vacúolo, utilizando como meio de transporte principalmente a proteína YCF1 e também um sistema acoplado a ATPases. Dentro do vacúolo encontra-se o enzima γ -glutamil transpeptidase (γ -GT) ligado à membrana interna vacuolar, que é o enzima que catalisa a remoção do resíduo L-glutamato do GSH com a libertação do conjugado Cys-Gly-

S-conjugado, que com a ação de outras peptidases acaba por libertar o conjugado para ser excretado da célula. Os resíduos de aminoácidos serão transportados novamente para o citoplasma de modo a ser sintetizado de novo o GSH, mantendo-se assim o ciclo do γ -glutamilato (Singh, 2013; Wünschmann, 2010; Adamis, 2009; Mehdi, 2001).

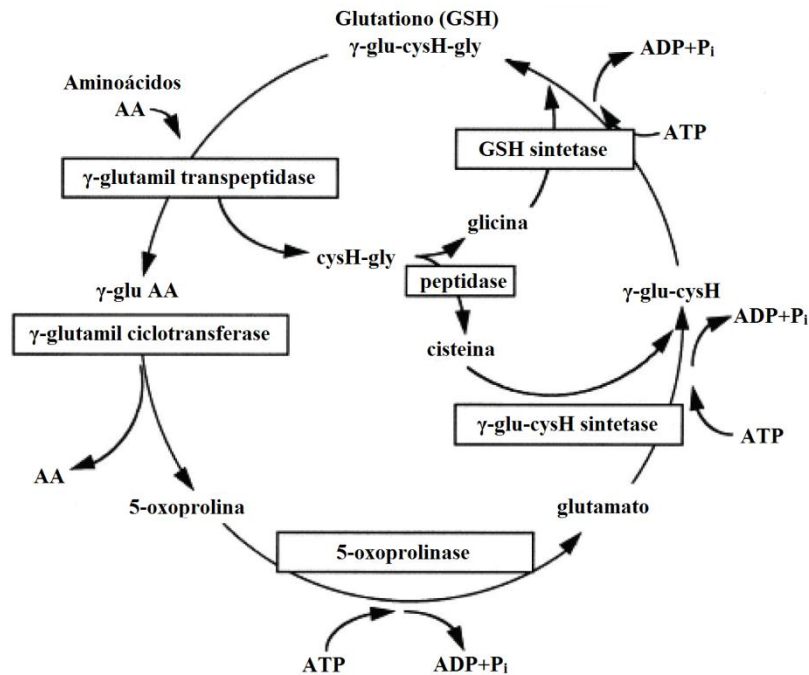


Figura 1.6 – Ciclo do γ -glutamilato (adaptado de Singh, 2013).

A peroxidação lipídica é um dos principais efeitos da exposição às espécies reativas de oxigénio. Os ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) são esterificados maioritariamente ao nível da membrana, local único na levedura, por esta não possuir enzimas necessários à sua síntese. Na levedura, os PUFAs são absorvidos do meio extracelular e acoplados às membranas lipídicas, apresentando-se maioritariamente ligados aos fosfolípidos. Os PUFAs podem sofrer oxidação de forma enzimática ou não-enzimática quando esta ocorre diretamente pela ação de radicais como o radical hidroxilo. O radical hidroxilo provoca uma reação em cadeia dos PUFAs, primeiro o radical provoca a libertação do hidrogénio do chamado grupo metileno reativo (LH) formando um carbono radical central (L^{\bullet}), que rapidamente reage com o dioxigénio (O_2), originando um radical lipoperóxido (LOO^{\bullet}) que por sua vez pode reagir novamente com um PUFA. Esta última reação para além de levar à formação de outro radical lipídico, também origina lipoperóxido ($LOOH$). A oxidação enzimática ocorre através de enzimas como as lipoxigenases (LOX) e as ciclooxigenases (COX) que oxidam o ácido araquidónico em ácidos hidroperoxieicosatetraenóicos (HPETE), prostaglandinas, leucotrienos, entre outros. Para além do ácido araquidónico as LOX podem

ter como substrato o ácido linoleico e o ácido oleico. A decomposição e metabolização dos lipoperóxidos resultantes da peroxidação lipídica enzimática ou não-enzimática leva à formação de compostos reativos como o malonodialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (HNE). Estes compostos finais da peroxidação lipídica apresentam um papel preponderante na danificação das células ao reagirem com as proteínas e com o DNA, contribuindo para estabelecer um estado de stress oxidativo, com todas as consequências que esta situação acarreta, tal como a ocorrência da morte celular (Joo, 2012; Hill, 2011; Niki, 2009; Cipak, 2008; Cipak, 2006; Abuja, 2001).

O stress oxidativo pode despoletar em última instância morte celular por processo ativo, usualmente designado por apoptose que apesar de ser mais característica do reino animalia, também se manifesta em organismos unicelulares como a levedura. Para além da apoptose, existem outros processos de morte celular como a autofagia, semelhante à apoptose, onde ocorre uma degradação mais seletiva de um organelo como resposta a carência nutricional, ou a necrose, que não sendo um processo de morte programado, torna-se mais mais extremo e destrutivo, sem ocorrer a formação de vesículas, mas onde ocorre dilatação excepcional da célula que leva à rutura e libertação de todo o seu conteúdo celular para o meio envolvente. A apoptose ocorre quando a célula não consegue combater eficazmente um estado de oxidação elevado no meio intracelular, estando envolvidos danos no material genético, nas membranas e nas proteínas. Este processo de morte caracteriza-se pela condensação da cromatina, fragmentação do núcleo e degradação do DNA, perda do potencial membranar mitocondrial, externalização de fosfatidilserinas e formação de corpos apoptóticos. Provavelmente a levedura não dispõe de todos os reguladores da apoptose animal, como a família Bax/Bcl-2, caspases ou APAF-1/CED-4. No entanto, a expressão heteróloga de indutores de apoptose Bax, caspases, p53, ou CED-4/APAF-1 em leveduras, induz a morte celular de *S. cerevisiae*. Observou-se também que apesar da levedura não dispor dos mesmos reguladores animais, possui outros com função similar, tais como a metacaspase YCA-1, o fator indutor de apoptose AIF e nucleases que permitem o desenvolvimento de um processo de morte programada similar aos metazoários, com libertação do citocromo c do mitocôndrio, característica da apoptose. Tanto a levedura como os humanos possuem uma via de morte celular programada comum regulada pelo Dnm1p (Drp1 em humanos) que é inibida por uma Bcl-2 ou similar (Ramsdale, 2012; Abdelwahid, 2011; Khoury, 2008; Perrone, 2008; Chen, 2003).

2. Problema e Objetivos

2.1. Problema

O lindano foi abundantemente utilizado como inseticida até á cerca de 40 anos, tendo-se verificado desde então uma diminuição da sua utilização através de regulamentação proibitiva à medida que se foi conhecendo melhor os seus efeitos tóxicos ambientais. No entanto, tratando-se de um composto POP que apresenta fraca hidrolisação e que se caracteriza por ser bioacumulável, evidencia-se uma disseminação deste xenobiótico a nível global e inevitavelmente uma exposição do Homem a este agente tóxico. A literatura descreve extensamente os efeitos do lindano em muitas espécies animais, atribuindo propriedades tóxicas ao nível neuronal, hepático, reprodutor e imunológico. A exposição da população em geral a este xenobiótico apesar de ser residual, induz stress oxidativo, podendo acarretar consequências não conhecidas atualmente.

Tendo em consideração todos estes fatos, é imprescindível que se esclareça o mecanismo de toxicidade deste inseticida, percebendo ao nível metabólico as alterações que este provoca e de que forma estas podem ser atenuadas, desenvolvendo procedimentos que permitam a deteção precoce da resposta tóxica a este xenobiótico, bem como a minimização dos seus efeitos deletérios.

2.2. Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho foi testar a H_0 : “O lindano não perturba o crescimento, o metabolismo energético e a resposta antioxidante de *Saccharomyces cerevisiae* em distintos meios de cultura.”

2.3. Objetivos específicos

Conhecer...

- ☐ aplicações, distribuição ambiental, e propriedades biológicas do lindano;
- ☐ perfil de crescimento, metabolismo energético e antioxidante de *S. cerevisiae*;
- ☐ propriedades fisico-químicas, origem metabólica e efeitos biológicos das ROS;
- ☐ propriedades fisico-químicas, distribuição celular e funções biológicas em eucariotas do GSH e GSSG;
- ☐ origem metabólica e propriedades físico-química do MDA;

- 📖 propriedades cinéticas e função biológica dos enzimas ALP, LDH, LOX, G6PD, GR, PHGPx2, CTT1, CTA1, SOD1 e γ -GT.

Compreender...

- 🗨 mecanismo de ação do lindano como inseticida e como agente tóxico ambiental;
- 🗨 as alterações no crescimento da *S. cerevisiae* perante meios restritivo e em exposição a agentes de stress;
- 🗨 significado biológico do conteúdo em MDA e ROS;
- 🗨 papel do GSH e GSSG na manutenção do estado redox intracelular;
- 🗨 papel dos enzimas ALP, LDH, LOX, G6PD, GR, PHGPx2, CTT1, CTA1, SOD1 e γ -GT na estabilização do ambiente redutor intracelular, na resposta à restrição nutricional e exposição a agentes de stress.

Valorizar...

- 👉 atividade biológica do lindano;
- 👉 atividade enzimática ALP como marcador de proliferação celular;
- 👉 conteúdo em ROS como marcador de stress oxidativo;
- 👉 conteúdo em MDA como marcador de danos celulares;
- 👉 razão GSH/GSSG como indicador do potencial redox;
- 👉 curvas de calibração e de reação para determinar os parâmetros bioquímicos;
- 👉 atividade enzimática LOX como marcador de peroxidação lipídica;
- 👉 atividades G6PD, GR, PHGPx2, CTT1, CTA1 e SOD1, como marcadoras da resposta antioxidante;
- 👉 atividade γ -GT como marcador de excreção;
- 👉 atividade LDH como marcador do metabolismo energético.

Aplicar...

- 👉 determinação dos efeitos do lindano em *S. cerevisiae* e dos mecanismos de resposta envolvidos;
- 👉 estratégia e metodologia aplicadas na determinação da toxicidade por químicos;
- 👉 prevenção e desintoxicação de compostos organoclorados;
- 👉 contribuir para regulamentar o uso de organoclorados e a presença destes no consumo humano;
- 👉 biorremediação.

3. Metodologia

3.1. Estratégia

A realização dos objetivos delineados para este trabalho obedece ao plano:

Local de Realização: Laboratório de Bioquímica Analítica, fase III do colégio Luís António Verney, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora

Apoio financeiro: Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrâneas - ICAAM, Fundação para a Ciência e a Tecnologia – FCT, Departamento de Química, Universidade de Évora.

Duração: 1 ano letivo.

Modelo Biológico: levedura *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃.

Coleção: estirpe isolada em mostos de vinhos regionais do Alentejo depositada na coleção do Laboratório de Enologia da Universidade de Évora.

Agente de stress: lindano.

Ensaio:

Controlos, em meio rico ou meio restritivo em glucose ou em peptona sem indutor de stress

Teste, presença de lindano (5 e 50 μM) no meio de cultura

Tratamentos: as leveduras cresceram durante 72 h, respeitando os ensaios descritos na tabela:

		YEPD	YEP	YED
Lindano (μM)	0 (controlo)	I	IV	VII
	5	II	V	VIII
	50	III	VI	IX

YEPD – meio rico (extrato de levedura (1%), peptona (2%) e glucose (2%))

YEP – meio restritivo em glucose (extrato de levedura (1%) e peptona (2%))

YED – meio restritivo em peptona (extrato de levedura (1%) e glucose (2%))

Resultados obtidos ao longo da cultura: acompanhamento do crescimento da cultura pela determinação das unidades formadoras de colónias (cfu).

Resultados obtidos no final da cultura: determinação da biomassa (peso seco).

Frações subcelulares selecionadas:

- sobrenadante pós 12000 g
- sedimento pós 12000 g

Parâmetros a analisar:

- Marcadores de crescimento e viabilidade celular;
 - ✓ cfu
 - ✓ peso seco
 - ✓ proteínas no sobrenadante e sedimento pós 12000 g
 - ✓ GSH e GSSG no sobrenadante e sedimento pós 12000 g

- Marcadores energéticos
 - ✓ ALP
 - ✓ LDH

- Marcadores de stress e danos celulares
 - ✓ ROS no sobrenadante e sedimento pós 12000 g
 - ✓ LOX
 - ✓ MDA no sobrenadante e sedimento pós 12000 g

- Marcadores de sistemas antioxidantes:
 - ✓ G6PD
 - ✓ GR
 - ✓ PHGPx2
 - ✓ CTT1
 - ✓ CTA1
 - ✓ SOD1

- Marcador de eliminação
 - ✓ γ -GT

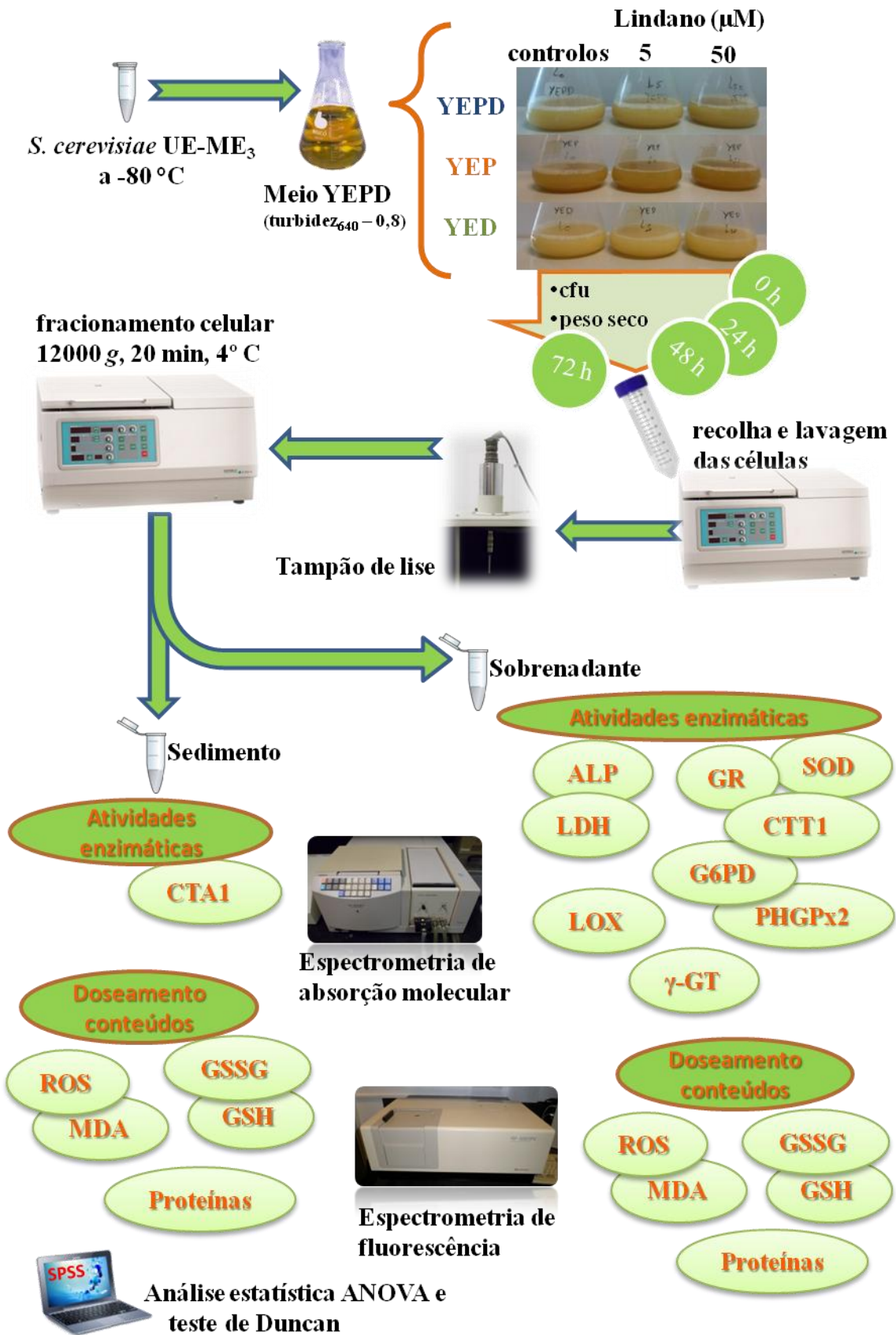
Técnicas utilizadas:

- Análise de imagens – analisador de imagens BioRad
- Desintegração celular – homogeneizador de sonda de ultra-sons
- Fracionamento celular – centrifugação diferencial
- Conteúdos:
 - ✓ Proteínas – espectrometria de absorção molecular
 - ✓ GSH, GSSG, ROS e MDA – espectrometria de fluorescência
- Atividades enzimáticas:
 - ✓ ALP, LDH, LOX, G6PD, GR, PHGPx2, CTT1, CTA1, SOD1 e γ -GT – espectrometria de absorção molecular

Análise estatística dos resultados:

Teste de significância de Duncan e análise de variância simples, ANOVA I, para os resultados obtidos sobre a cultura, incluindo cfu, peso seco, conteúdos e atividades enzimáticas obtidos a partir de cinco experiências independentes.

3.2. Diagrama do trabalho



3.3. Procedimento experimental

3.3.1. Material biológico

A levedura vínica *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME₃ foi o modelo biológico escolhido para a realização deste trabalho. Isolada de mostos de vinhos do Alentejo e depositada na coleção do laboratório de enologia da Universidade de Évora, a levedura encontrava-se armazenada no nosso laboratório em meio de cultura com glicerol a -80 °C.

3.3.2. Meios de cultura

Meio YEPD (1/3 de líquido para 2/3 de ar) – Utilizando água ultrapura, preparou-se uma solução de extrato de levedura (10 g/L) e peptona (20 g/L) que foi esterilizada pelo calor húmido. Posteriormente adicionou-se glucose (20 g/L) esterilizada por filtração (filtro 0,22 µm). Para preparar o meio sólido adicionou-se ainda agar (20 g/L).

Meio YEP (1/3 de líquido para 2/3 de ar) – Utilizando água ultrapura, preparou-se uma solução de extrato de levedura (10 g/L) e peptona (20 g/L) que foi esterilizada pelo calor húmido.

Meio YED (1/3 de líquido para 2/3 de ar) – Utilizando água ultrapura, preparou-se uma solução de extrato de levedura (10 g/L) que foi esterilizada pelo calor húmido. Posteriormente adicionou-se glucose (20 g/L) esterilizada por filtração (filtro 0,22 µm).

Meios YEPD/YEP/YED com lindano (1/3 de líquido para 2/3 de ar) – Preparam-se por adição do volume adequado de solução mãe de lindano (100 µM), esterilizada por filtração (filtro 0,22 µm), a meio YEPD, YEP ou YED, de modo a obter as concentrações pretendidas (5 e 50 µM).

3.3.3. Culturas celulares e ensaio de exposição ao lindano

As células provenientes de uma colónia de *S. cerevisiae* UE-ME₃ conservadas a -80 °C foram cultivadas em meio YEPD líquido e crescidas *overnight*, a 28 °C com agitação orbital constante de 150 rpm. Inoculou-se meio YEPD com esta cultura fresca, e acompanhou-se o crescimento da cultura lendo a turbidez a 640 nm. Uma vez na fase exponencial média ($t_{640nm} = 0,8$), obtiveram-se inóculos de 10⁶ células/mL dessa cultura para iniciar os ensaios de exposição ao agente de stress com concentração diferente de lindano, 5 e 50 µM, e respetivo controlo nos distintos meios de cultura, os quais foram mantidos nas mesmas condições de cultura inicialmente referidas durante 72 h.

3.3.4. Obtenção da curva de crescimento

O crescimento da cultura foi acompanhado através da determinação das cfu nos tempos 0, 24, 48 e 72 h de crescimento. Para a determinação das cfu foi necessário realizar diluições decimais que foram inoculadas em meio sólido YEPD sólido e incubadas a 28 °C até cessar o aparecimento de novas colónias.

3.3.5. Determinação da biomassa

Para a determinação da biomassa final recolheram-se alíquotas em triplicado dos meios de cultura do tempo 72 h para tubos previamente tarados e de seguida colocados a 65 °C até o peso se tornar constante. Ao peso final subtraiu-se o peso do tubo vazio para se obter o peso seco das células (biomassa).

3.3.6. Fracionamento celular

3.3.6.1. Obtenção dos lisados celulares

Após as 72 h de crescimento, as células das culturas controlo e de exposição ao lindano dos diferentes meios de cultura foram recolhidas por centrifugação a 5000 g durante 10 min e lavadas 2 vezes com água ultrapura estéril. As células foram ressuspensas em 10 mL de tampão fosfato (10 mM) pH 7,0 (tampão de lise), mantidas a 4 °C e lisadas em homogeneizador de ultrassons (3 vezes 5 min.; 0,1; 1).

3.3.6.2. Preparação das frações do sobrenadante e do sedimento pós 12000 g

As frações celulares pós 12000 g foram obtidas segundo o procedimento geral de Lake (1987). Após a lise com ultrassons, os homogeneizados foram centrifugados a 12000 g, 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido e o sedimento, ressuspensado em 1,5 mL de tampão de lise, foram guardados em alíquotas a -20 °C, para posterior utilização nas determinações de conteúdos e atividades enzimáticas.

3.3.7. Doseamentos nas frações subcelulares

3.3.7.1. Proteína

Para o doseamento da proteína utilizou-se o método descrito por Lowry (1951), que se baseia na reação entre o ácido fosfomolibdicofosfotúngstico (reagente de Folin-Ciocalteu) e os resíduos aromáticos tirosina e triptofano das proteínas. Dado que a reação é catalisada pelo

cobre em meio alcalino, forma-se um complexo heteromolibdênio de cor azul intensa em concentração proporcional à concentração de proteína presente no meio.

Na realização deste método foi utilizado o reagente de Lowry, preparado com 1 mL de sulfato de cobre 1%, 1 mL de tartarato de sódio e potássio 2%, perfazendo o volume final de 100 mL com carbonato de sódio 2%, e o reagente de Folin Ciocalteu obtido por diluição do reagente comercial com água destilada na proporção de 1:1. A um volume adequado de amostra de sobrenadante ou sedimento pós 12000 g diluído em NaOH (0,5 M) adicionou-se 1,25 mL de reagente de Lowry e agitou-se. Após 10 min adicionou-se 125 μ L de reagente de Folin Ciocalteu, agitou-se novamente e deixou-se reagir pelo menos 30 min. De seguida procedeu-se à leitura da absorvência a 720 nm.

Para determinar a concentração de proteínas presente nas amostras interpolou-se os resultados da leitura das amostras na curva de calibração (fig. A1). Esta curva foi obtida seguindo a mesma metodologia descrita para as amostra utilizando soluções de BSA de diferente concentração, entre 50 e 200 μ g/mL.

3.3.7.2. Glutationo e dissulfureto de glutationo

A quantificação de GSH e GSSG foi realizada segundo método descrito por Hissin (1976), neste é utilizado o o-fetaldeído (OPT) no desenvolvimento de um fluoróforo quantificável por espectrometria de fluorescência e o *N*-etilmaleimida (NEM) para sequestrar o GSH endógeno presente na amostra.

Na quantificação de GSH, adicionou-se amostras de sobrenadante ou sedimento pós 12000 g ao tampão fosfato (0,1 M) pH 8,0 com EDTA 0,005 M e ao OPT (solução comercial incompleta) na proporção de 1:30:2. Após incubada durante 15 min à temperatura ambiente, com agitação, leu-se a potência de fluorescência da mistura reacional ao $\lambda_{\text{excitação}}$ de 350 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ de 420 nm.

A quantificação de GSSG, em sobrenadante e sedimento pós 12000 g, foi realizada numa mistura reacional constituída pela amostra em NEM (0,04 M), OPT e NaOH (0,1 M) na proporção de 1:1:18, a qual incubou 15 min à temperatura ambiente. A fluorescência foi lida ao $\lambda_{\text{excitação}}$ de 350 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ de 420 nm.

Construíram-se curvas de calibração do GSH e GSSG, no intervalo entre 1 e 100 μ M de GSH (fig. A2) e entre 2 e 80 μ M de GSSG (fig. A3), respetivamente, utilizando o mesmo procedimento adotado para as amostras. Estas serviram para determinar a concentração de GSH e GSSG presente nas amostras, por interpolação da potência de fluorescência.

3.3.7.3. Espécies reativas de oxigênio

O conteúdo em espécies reativas de oxigênio foi quantificado segundo o método descrito por LeBel (1992). Neste é quantificada a formação de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) por espectrometria de fluorescência, o qual se forma, na presença de hidrogênio, pela oxidação do DCFH.

Para determinar o conteúdo em ROS incubou-se a 37 °C durante 10 min a mistura de reação, constituída pela amostra, de sobrenadante ou sedimento pós 12000 g, e pelo DCFH, preparado em tampão fosfato (25 mM) pH 7,4, adicionando o tampão Tris-HCl 40 mM pH 7,4 no volume adequado a constituir a proporção de 1:40. Após a incubação leu-se a potência de fluorescência ao $\lambda_{\text{excitação}}$ 485 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ de 520 nm.

Por fim, determinou-se o conteúdo em ROS nas amostras, interpolando os resultados na curva de calibração, anteriormente preparada com peróxido de hidrogênio no intervalo entre 20 e 400 μM (fig. A4).

3.3.7.4. Malonodialdeído

Na determinação do conteúdo em MDA utilizou-se o método descrito por Ohkawa (1979) e Durfinová (2007). Este método baseia-se na quantificação, por espectrometria de fluorescência, do fluoróforo originado a partir da oxidação do ácido tiobarbitúrico (TBA) pelo malonodialdeído.

Numa mistura de duodecilsulfato de sódio (SDS) (8,1 %) e TBA (0,4 %) em ácido acético (10 %) pH 3,5, adicionou-se a amostra de sobrenadante ou sedimento pós 12000 g na proporção de 2:30:1, deixando reagir durante 1 h a 95 °C, com agitação. De seguida interrompeu-se a reação por arrefecimento a 4 °C durante 15 min e adição de *n*-butanol (1:1). Para permitir a separação das fases deixou-se repousar durante 1 h, recolhendo-se então a fase orgânica para a leitura da potência de fluorescência ao $\lambda_{\text{excitação}}$ de 515 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ de 553 nm.

Para quantificar a concentração de MDA presente nas amostras construiu-se uma curva de calibração no intervalo entre 2,5 e 100 μM (fig. A5) seguindo a mesma metodologia descrita para as amostras, utilizando malonodialdeído gerado por hidrólise de 1,1,3,3-tetrametoxipropano em meio ácido (Turton, 1997).

3.3.8. Determinação de atividades enzimáticas nas frações subcelulares

3.3.8.1. Fosfatase alcalina

A atividade catalítica fosfatase alcalina foi detetada pelo método descrito por Bretaudiere (1984), no qual se quantifica a formação de *p*-nitrofenol (*p*NP), pelo aumento de

absorvência a 405 nm, pela hidrólise das ligações fosfoéster do *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP), o substrato cromogéneo sintético, de acordo com a reação:

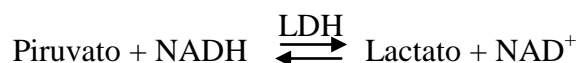


Em células de absorção molecular a mistura de reação, constituída pelo substrato (*p*NPP) em tampão tris-HCl (0,5M) pH 8,5 e amostras de sobrenadante pós 12000 *g* (0,075 mg proteína/mL), foi incubada à temperatura de 37 °C.

Determinado o coeficiente angular das curvas de reação (0,9928683 < r < 0,9990963, fig. A6) traçadas durante os 180 s, utilizou-se o coeficiente de absorvidade molar para o *p*NPP de 18,5 mM⁻¹cm⁻¹ para determinar os valores da atividade fosfatase alcalina.

3.3.8.2. Lactato desidrogenase

Para determinar a atividade lactato desidrogenase procedeu-se de acordo com a seguinte reação (Romano, 1969; Moss, 1955; Meister, 1950):



A reação de desidrogenação deu-se a 25 °C numa mistura de reação constituída pela amostra de sobrenadante pós 12000 *g* (0,113 mg de proteína/mL), piruvato (2,5 mg/mL) e NADH (10 mg/mL) em tampão fosfato (0,1 M) pH 7,0. Acompanhou-se o consumo de NADH pelo decréscimo da absorvência a 339 nm durante 300 s.

Aplicando o coeficiente de absorvidade molar para o NADH de 6,22 mM⁻¹.cm⁻¹ ao coeficiente angular das curvas de reação (0,9164397 < r < 0,9940940, fig. A7), traçadas durante os 300 s, determinou-se os valores da atividade G6PD.

3.3.8.3. Lipoxigenases

A determinação da atividade lipoxigenase realizou-se segundo o método descrito por Gata (1996). À mistura de reação constituída pela solução de ácido linoleico (LA) (0,01 M) em NaOH (0,02 M) e o agente emulsionante Tween 20, em tampão acetato de sódio (50 mM) pH 7,6, adicionou-se a amostra de sobrenadante pós 12000 *g* (0,075 mg proteína/mL), deixando-se reagir à temperatura de 30 °C. A reação foi acompanhada a 234 nm durante 300 s, registando-se a absorvência do produto da peroxidação do ácido linoleico, o ácido hidroperóxilinoleico (HPLA).

Para determinar os valores da atividade LOX utilizou-se coeficiente angular das curvas de reação ($0,9199198 < r < 0,9785866$, fig. A8), traçadas durante os 300 s, e o coeficiente de absorvância molar para o HPLA de $25 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.3.8.4. Glucose-6-fosfato desidrogenase

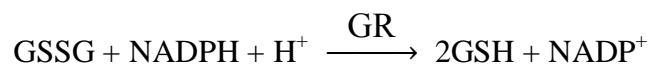
A determinação atividade glucose-6-fosfato desidrogenase teve por base a reação que se segue, acompanhando-se a formação de NADPH pela leitura da absorvância a 340 nm (Postma, 1989; Bergmeyer, 1983).

A mistura de reação preparada em tampão tris-HCl (1 M) pH 8,0, constituída por NADP^+ (0,04 M), MgCl_2 (0,5 M), glucose 6-fosfato (0,1 M) foi incubada nas células de absorção molecular a 37°C , tendo-se iniciado a reação pela adição de amostra de sobrenadante pós 12000 g (0,037 mg proteína/mL).

Utilizando o coeficiente de absorvância molar para o NADPH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e o coeficiente angular das curvas de reação ($0,9960783 < r < 0,9988442$, fig. A9), traçadas durante os 300 s, determinou-se os valores da atividade G6PD.

3.3.8.5. Glutathione redutase

Para determinar a atividade glutathione redutase utilizou-se o método descrito por Goldberg (1986), baseado na seguinte reação:



Após a incubação a 37°C durante 5 min da mistura de reação, composta por EDTA (15 mM) GSSG (635 mM) e sobrenadante pós 12000 g (0,075 mg proteína/mL), em tampão fosfato (0,12 M) pH 7,2, iniciou-se a reação de redução do GSSG pela adição de NADPH (9,6 mM), tendo-se registado a oxidação do NADPH pelo decréscimo da absorvância a 340 nm durante 240 s.

Para determinar a atividade glutathione redutase utilizou-se o coeficiente angular das curvas de reação ($0,9624102 < r < 0,9990429$, fig. A10), utilizando o coeficiente de absorvância molar para o NADPH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.3.8.6. Fosfolipoperóxido glutathione peroxidase 2

A atividade enzimática PHGPx2 determinou-se segundo o método descrito por Flohé (1984). Na mistura de reação, constituída por tampão fosfato (0,12 M) pH 7,2, GSH (5 mM),

GR (0,24 U/mL), NADPH (1,6 mM) e amostra de sobrenadante pós 12000 g (0,037 mg proteína/mL), iniciou-se a reação a 37 °C pela adição de H₂O₂ (20 mM) ou *tert*-butil peróxido (t-BHP) (1 mM), tendo-se determinado o consumo de NADPH pela variação da absorvência a 340 nm durante 60 ou 420 s, respetivamente.

Utilizando coeficiente de absorvência molar para o NADPH de 6,22 mM⁻¹.cm⁻¹ e o coeficiente angular das curvas de reação (0,9573984 < r < 0,9997729 e 0,9703362 < r < 0,9980912 respetivamente, fig. A11 e A12), determinou-se os valores da atividade PHGPx2 utilizando como substrato o H₂O₂ ou o t-BHP.

3.3.8.7. Catalases

Para determinar a atividade enzimática catalase utilizou-se o método espectrofotométrico proposto por Beers (1952). A uma mistura reacional a 25 °C, constituída por peróxido de hidrogénio (30 mM) em tampão fosfato (50 mM) pH 7,0, e amostra de sobrenadante pós 12000 g (0,015 mg proteína/mL) ou de sedimento (0,004 mg proteína/mL) para determinar a atividade CTT1 ou CTA1, respetivamente. A reação foi acompanhada durante 60 ou 300 s, observando-se o consumo de H₂O₂ pela leitura de absorvência a 240 nm.

Para determinar os valores da atividade CTT 1 e CTA 1 utilizou-se coeficiente angular das curvas de reação (0,9837525 < r < 0,9993758 e 0,9693111 < r < 0,9994194, fig. A13 e A14), traçadas durante 60 ou 300 s, e o coeficiente de absorvência molar para o H₂O₂ de 0,0435 mM⁻¹.cm⁻¹.

3.3.8.8. Cu, Zn - Superóxido Dismutase (SOD1)

A determinação da atividade SOD1 realizou-se segundo o método descrito por Oberley e Spitz (1984), que se baseia na quantificação do produto cromogénico da redução do azul de tetrazólio nitro (NBT) pelo radical anião superóxido proveniente da ação da xantina oxidase. Trata-se então de um método indireto, uma vez que na presença do enzima SOD1, este compete com o NBT na oxidação do radical anião superóxido.

A mistura de reação, constituída por xantina (3 mM), EDTA (3 mM), NBT (0,75 mM), BSA 15% p/v), amostra de sobrenadante (0,094 mg de proteína/mL) e xantina oxidase (0,8 U/mg) foi preparada em tampão fosfato (50 mM) pH 7,8. A reação ocorreu à temperatura de 25 °C, tendo-se registado a absorvência a 560 nm durante 420 s. Para determinar a atividade SOD1 realizou-se um branco no qual não se adicionou a amostra, sendo o valor obtido determinante para apurar a atividade SOD1 de 1 U, que é a quantidade de enzima

presente na amostra que causa 50 % de inibição da taxa de redução do sal de tetrazólio, utilizando o coeficiente angular da curva de reação do branco e das amostras ($0,9726131 < r < 0,9988897$, fig. A15).

3.3.8.9. γ -Glutamyltranspeptidase

Para determinar a atividade γ -GT procedeu-se de acordo com o método descrito por Szasz (1976), segundo a seguinte reação. A mistura de reação deste ensaio era constituída por duas soluções, uma de glicilglicina (8,3 mM) e cloreto de magnésio hexahidratado (10 mM) em tampão tris-HCl (100 mM) pH 8,2, e outra de γ -glutamyl-*p*-nitroanilida em tampão tris-HCl (100 mM) pH 8,2. A reação foi iniciada a 37 °C com a adição da amostra de sobrenadante pós 12000 g (0,075 mg proteína/mL), ocorrendo então a transpeptidação do resíduo γ -glutamyl. Registou-se então a absorvência a 405 durante 3600 s, observando-se a formação do produto de reação, o *p*-nitroanilida.

A atividade γ -GT foi calculada a partir do coeficiente angular das curvas de reação ($0,9458453 < r < 0,9995265$, A16), traçadas durante os 3600 s, utilizando o coeficiente de absorvidade molar para o *p*-nitroanilida de $9,9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.3.9. Análise estatística dos resultados

O teste de significância Duncan e a Análise de variância simples, ANOVA I, para os parâmetros analisados na levedura *S. cerevisiae* UE-ME₃, utilizando o programa SPSS para Windows, versão 19, licenciado para a Universidade de Évora.

3.4. Material

- Erlenmeyers
- Espátulas
- Frascos de vidro
- Gobelés
- Magnetos
- Micropipetas: P₂; P₁₀; P₂₀; P₁₀₀; P₁₀₀₀; P₅₀₀₀ e respetivas pontas
- Microtubos
- Pipetas de Pasteur
- Suportes
- Tubos de centrífuga
- Tubos de ensaio

3.5. Equipamento

- Analisador de imagens BioRad Gel Doc EQ BioRad com software Quantity-one
- Autoclave da marca Selecta, modelo microclave
- Balança analítica da marca Mettler, modelo AE 200
- Balança micro-analítica da marca Mettler Toledo, modelo AX 205
- Banho termostaticado com agitação da marca Memmert, modelo 3200 R
- Bidestilador da marca Aquatron, modelo A 4D
- Espectrofluorímetro de feixe simples da marca Shimadzu, modelo RF-5001 PC
- Espectrofotómetro de feixe duplo da marca Hitachi, modelo U2000, com banho termostaticado e sistema de circulação de água da marca Grant
- Estufa de incubação da marca Kowell, modelo D2-1
- Homogeneizador de sonda de ultra-sons da marca Branson Sonifier, modelo 450
- Microcentrifuga da marca Beckman, modelo Microfuge E™
- Placa de agitação da marca Labinco, modelo L34
- Potenciómetro da marca Metrohm, modelo 691
- Supercentrifuga da marca Hermle, modelo Z323 K
- Vortex da marca Heidolph, modelo Reax 2000

3.6. Reagentes

- 1,1,3,3-tetrametoxipropano, Sigma, St. Louis
- 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, Sigma, St. Louis
- 2,7-diclorofluoroceína diacetato, pró-análise, Sigma, St. Louis
- Acetato de sódio trihidratado, 99 %, Panreac, Barcelona
- Ácido clorídrico, pró-análise (d = 1,19) 37%, MERCK, Darmstadt
- Ácido etilenodiaminotetracético, Sigma, St. Louis
- Ácido linoleico, Sigma, St. Louis
- Ácido triobarbitúrico, pró-análise, 99%, MERCK, Darmstadt
- Azul de tetrazólio nitro (NBT), 99%, Sigma, St. Louis
- Carbonato de sódio anidro, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt
- Cloreto de magnésio hidratado, 99%, Sigma, St. Louis
- Dihidrogenofosfato de potássio, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt
- Dihidrogenofosfato de sódio, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt
- Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (sal de sódio), pró-análise, 97,0%, Sigma, St. Louis
- Duodecilsulfato de sódio, Sigma, St. Louis
- Etanol, pró-análise (d = 0,79) 99,8%, MERCK, Darmstadt
- Extrato de Levedura, pró-análise, Sigma, St. Louis
- Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado (sal sódico) pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis

- Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (sal sódico) pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Glicilglicina, 98,0%, MERCK, Darmstadt
- Glicilglicina, MERCK, Darmstadt
- Glucose, pró-análise, Sigma, St. Louis
- Glucose-6-fosfato desidrogenase, Sigma, St. Louis
- Glutationo dissulfureto, pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Glutationo redutase, Sigma, St. Louis
- Glutationo, pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Hidrogenofosfato de sódio anidro, pró-análise, 99%, MERCK, Darmstadt
- Hidrogenofosfato dipotássio, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt
- Hidróxido de sódio, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt
- Lindano pestanal, Riedel de Haën, Seelze
- *N*-etilmaleimida, Sigma, St. Louis
- *o*-fetaldeído, Sigma, St. Louis
- Peptona, pró-análise, Sigma, St. Louis
- Peróxido de hidrogénio, pró-análise, 30%, Sigma, St. Louis
- Piruvato de sódio, 99,0 %, Sigma, St. Louis
- Reagente fenólico, segundo Folin-Ciocalteu, pró-análise, Sigma, St. Louis
- Sulfato de cobre, pró-análise, 99,5-102,9%, Panreac, Barcelona
- Tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado, pró-análise, 99,9%, MERCK, Darmstadt
- *t*-butil peróxido, Sigma, St. Louis
- Tris (hidroximetil) aminometano, pró-análise, 99,9%, MERCK, Darmstadt
- Tween 20, pro-análise, MERCK, Darmstadt
- Xantina oxidase, Sigma, St. Louis
- Xantina, 99%, Sigma, St. Louis
- γ -glutamil-p-nitroanilina, Sigma, St. Louis

4. Resultados e discussão

O lindano ou γ -hexaclorociclohexano tem sido aplicado como produto fitofarmacêutico de largo espectro na agricultura como ectoparasiticida em tratamentos veterinários e humanos, no controlo da sarna e da pediculose. Apesar dos descritos efeitos terapêuticos é considerado um químico tóxico, ambientalmente persistente, bioacumulável e com capacidade para distribuição à distância, factos que o tornaram um poluente global com distribuição ubíqua pelos ecossistemas. A organização mundial de saúde classificou-o como moderadamente perigoso encontrando-se o seu uso proibido em Portugal (Benarbia, 2013; Hfaiedh, 2012; Hfaiedh, 2011; WHO, 2004).

A caracterização fina dos seus efeitos tóxicos em eucariotas, bem como a descoberta de novos microrganismos capazes de o metabolizar e aplicáveis em biotransformação, tornaram-se abordagens inevitáveis para a banir a sua utilização e remoção dos ecossistemas.

Assim o principal alvo deste estudo foi testar a H_0 : “O lindano não perturba o crescimento, o metabolismo energético e a resposta antioxidante de *Saccharomyces cerevisiae* em distintos meios de cultura “.

4.1 Influência da composição do meio de cultura e da exposição ao lindano no crescimento e sobrevivência celular de *S. cerevisiae*

O perfil de crescimento de *S. cerevisiae* UE-ME₃ (fig. 4.1A) em meio rico (YEPD) diferiu significativamente do perfil de crescimento detetado em leveduras crescidas em meios restritivos, YEP (sem glucose) e YED (sem peptona), a partir das 12 h de cultura, ocorrendo um decréscimo da viabilidade celular em qualquer desses meios. A exposição ao lindano, na concentração de 50 μ M provocou uma perda significativa da viabilidade celular em leveduras crescidas em meio rico ($p < 0,01$). Resposta idêntica foi observada em células crescidas em meio YEP, expostas ao lindano (5 μ M). No entanto a exposição de *S. cerevisiae* ao composto hexaclorado em meio restritivo YED não perturbou o perfil de crescimento, tendo sido detetada viabilidade celular semelhante ao controlo para qualquer dos níveis de exposição ao xenobiótico ($p < 0,01$).

A deteção da biomassa produzida em qualquer das condições de ensaio foi realizada com recurso ao peso do resíduo seco de amostras das culturas. Assim, a fig. 4.1B revela um decréscimo significativo da biomassa produzida por *S. cerevisiae* crescidas em meios restritivos, comparativamente com meio rico ($p < 0,01$). No entanto, não foram detetadas

alterações significativas da biomassa produzida por células crescidas em qualquer dos meios, na ausência e na presença de lindano ($p < 0,01$).

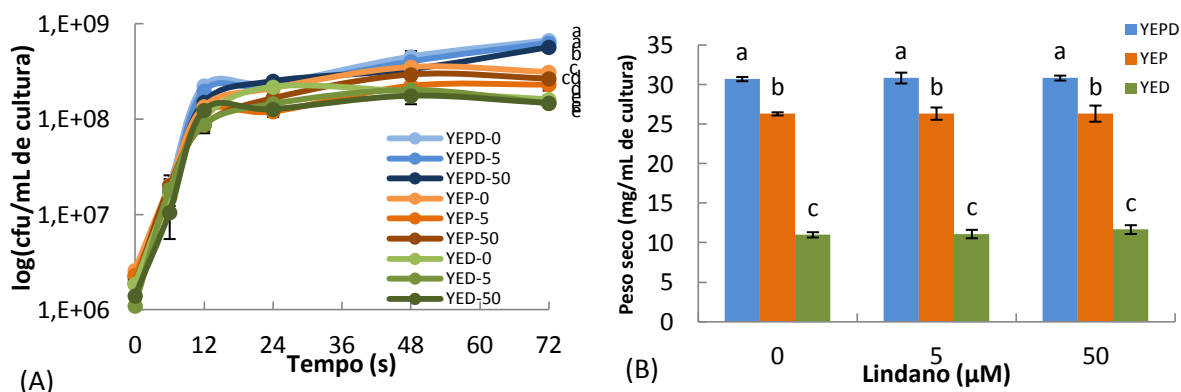


Figura 4.1 – Curvas de crescimento de *S. cerevisiae* UE-ME₃ (A), obtidas pela contagem de cfu, e peso do resíduo seco de amostras da cultura de *S. cerevisiae* UE-ME₃ (B), na ausência e na presença de lindano nos distintos meios de cultura. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. Os pontos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

4.2 Efeito do lindano em sistemas antioxidantes e metabolismo energético de *S. cerevisiae* UE-ME₃

A fig. 4.2A permite observar que o conteúdo em tióis não-proteicos do sobrenadante pós 12000 g não diferia significativamente em qualquer dos meios controlo. Contudo a exposição ao lindano provocou um decréscimo deste conteúdo em leveduras crescidas em meio rico e meio com carência de glucose, não sendo perturbado esse mesmo conteúdo em meios com carência de peptona. No entanto, ao nível do sedimento pós 12000 g (fig. 4.2B), rico em mitocondrios e peroxissomas, detetaram-se níveis superiores do conteúdo em tióis totais em células crescidas em meio rico, comparativamente com o detetado em meios restritivos. No que diz respeito à resposta ao agente químico, a referida figura permite detetar no meio rico um perfil de resposta idêntico ao do sobrenadante pós 12000 g com um decréscimo significativo para o nível de exposição 50 µM ($p < 0,01$). Relativamente aos meios restritivos YEP e YED observou-se no primeiro caso um aumento significativo (34 %) ($p < 0,01$) do conteúdo em tióis não proteicos em células expostas a lindano 5 µM, enquanto no segundo caso ocorreu um aumento desse conteúdo para ambos os níveis de exposição, diferindo também entre si os valores detetados em células crescidas na presença de 5 e 50 µM (33 e 101 %, respetivamente). Como a síntese de glutathione em células de levedura se dá no citoplasma este conjunto de resultados permite inferir eventuais alterações no transporte do glutathione para o mitocondrio, determinados pela composição do meio e pela presença de lindano. Quando avaliamos em pormenor o conteúdo em glutathione do sobrenadante pós

12000 g (fig. 4.2C) continuamos a não detetar diferenças significativas entre células crescidas nos diferentes meios de controlo (YEPD, YEP, YED), assim como um perfil de resposta ao lindano semelhante ao detetado no conteúdo em tióis totais de células crescidas em meio rico e células crescidas sem glucose. Contudo surgem dados novos relativos a este conteúdo no sobrenadante pós 12000 g de células crescidas em meio restritivo sem peptona que diminui significativamente na presença de lindano 50 μM (19 %) ($p < 0,01$). A fig. 4.2D mostra também a ocorrência de diferenças significativas no conteúdo em glutathione do sedimento pós 12000 g de células crescidas nos meios restritivos controlo, sendo detetado um valor superior em leveduras crescidas em carência de peptona ($p < 0,01$). Estas respostas foram idênticas às detetadas para o conteúdo em tióis totais. Ao compararmos os níveis de glutathione do sedimento pós 12000 g de células crescidas na presença de lindano observa-se um decréscimo significativo dos níveis do tripéptido de células crescidas em meio rico, perfil inverso ao detetado para células crescidas em qualquer dos meios restritivos, com aumento significativo em qualquer dos níveis de exposição ao lindano em meio YED (28 e 79 % para 5 e 50 μM , respetivamente) ($p < 0,01$), tal como observado na figura anterior (4.2B), e um aumento do referido conteúdo em células crescidas em meio YEP expostas ao lindano (50 μM) ($p < 0,01$). Continuando a análise de pormenor a fig. 4.2E revela um acréscimo significativo no conteúdo em dissulfureto de glutathione do sobrenadante pós 12000 g de células controlo crescidas em meio restritivo YED ($p < 0,01$). Foi também interessante observar um decréscimo deste conteúdo em células crescidas em meio rico e expostas ao lindano, perfil correlacionável com o conteúdo em glutathione e o conteúdo em tióis não proteicos comentados anteriormente. Um perfil de resposta idêntico foi detetado no conteúdo em dissulfureto de glutathione do sobrenadante pós 12000 g de células crescidas em meio com carência em glucose (YEP) onde se detetou um decréscimo significativo (24 %) para a concentração de 50 μM ($p < 0,01$). Todavia com a exposição ao lindano de células crescidas com carência de fonte de azoto (YED) detetou-se um perfil de resposta contrário ao observado nos outros meios, ocorrendo um aumento significativo do conteúdo em dissulfureto de glutathione das células expostas a qualquer dos níveis de lindano ($p < 0,01$). A fig. 4.2F revela níveis de dissulfureto de glutathione do sedimento pós 12000 g significativamente inferiores em células crescidas em meios restritivos, também diferentes entre si, sendo detetados valores mais elevados em células crescidas em meio carente em peptona ($p < 0,01$). A exposição ao lindano provocou um aumento do conteúdo de dissulfureto de glutathione em células crescidas em meio YED (36 e 112 % para 5 e 50 μM , respetivamente), resposta apenas detetada para células crescidas em

meio YEP com lindano 5 μM . A alteração no conteúdo em dissulfureto de glutationo permite inferir alterações no ambiente redox na resposta à carência de nutrientes nos meios restritivos ou ao inseticida. Os resultados obtidos relativamente ao conteúdo em tióis não-proteicos estão de acordo com os encontrados na literatura (Mailloux, 2013; Dardalhon, 2012; Fransen, 2012; Biswas, 2009; Song, 2006; Izawa, 1995).

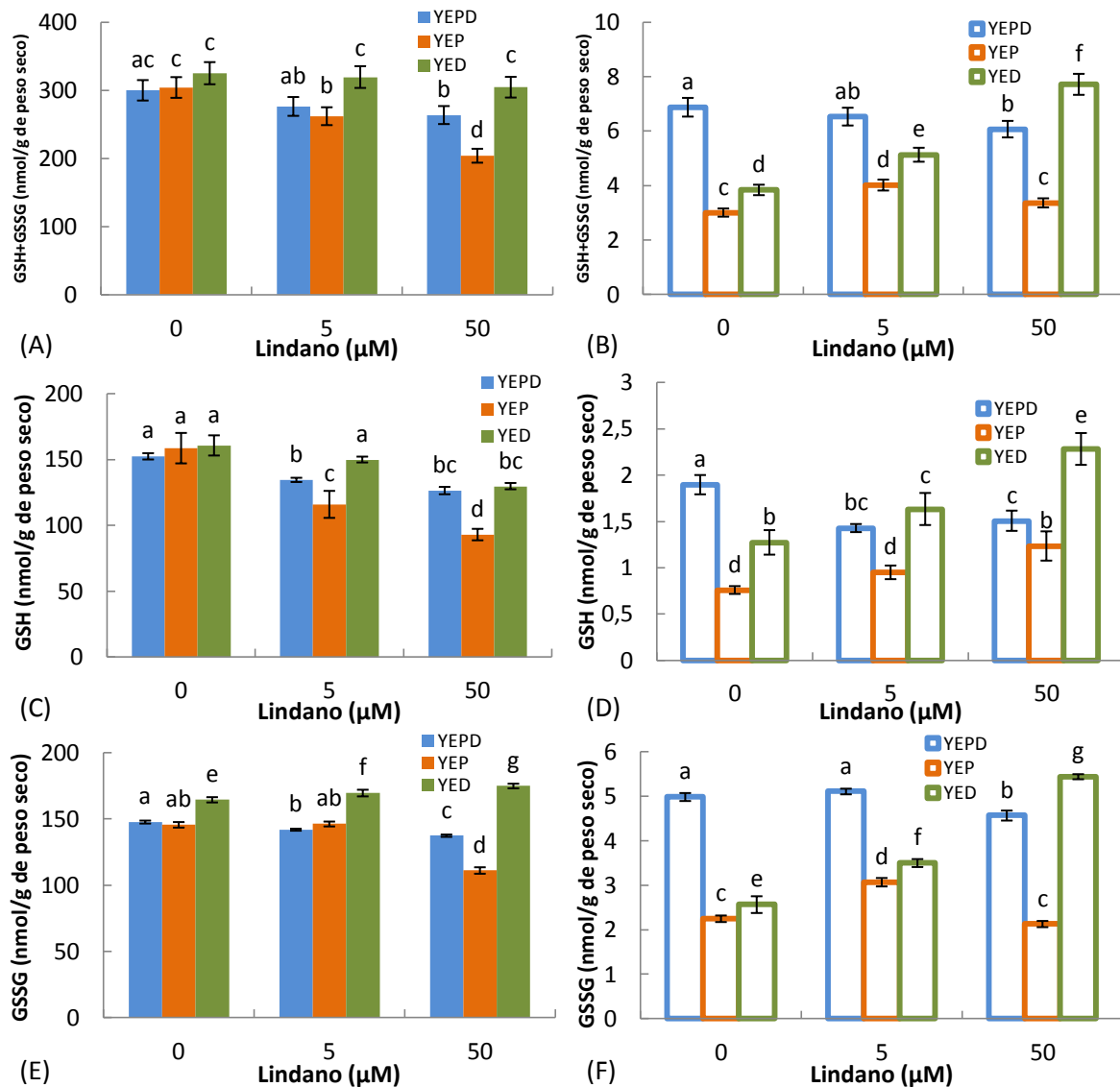


Figura 4.2 – Conteúdo em tióis não-proteicos, GSH+GSSG, GSH e GSSG do sobrenadante pós 12000 g (A, C e E, respetivamente) e do sedimento (B, D e F, respetivamente) obtidos de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas na ausência e na presença de lindano nos distintos meios de cultura. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. Os pontos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

A capacidade antioxidante do par redox GSH/GSSG do sobrenadante pós 12000 g pode ser analisada com recurso à fig. 4.3A, assim podemos observar que não ocorreram diferenças significativas da razão GSH/GSSG do sobrenadante pós 12000 g de células crescidas em

qualquer meio controlo, facto que permite inferir uma boa estabilização do ambiente redutor citoplasmático pelo glutatono, mesmo em condições de carência nutritiva. No entanto a presença de lindano provocou um decréscimo significativo da capacidade antioxidante do sobrenadante pós 12000 g de células expostas ao lindano ($p < 0,01$), facto que já tinha sido indiciado anteriormente pelo aumento de conteúdo em dissulfureto de glutatono descrito para situações de exposição ao lindano na fig. 4.2E e que nos permite assumir que a exposição ao xenobiótico induz stress oxidativo. Contudo quando avaliamos a capacidade antioxidante mediada pelo par redox GSH/GSSG do sedimento pós 12000 g (fig. 4.3B) constatamos que em meios restritivos ocorreu um aumento da razão GSH/GSSG. A exposição ao inseticida de células crescidas em meio rico causou um decréscimo significativo da referida razão ($p < 0,01$), comportamento idêntico ao detetado em células crescidas em meio restritivo em glucose expostas a lindano 5 μM e células crescidas em meio restritivo em peptona expostas ao lindano 50 μM . Os níveis mais elevados da razão GSH/GSSG observado no sedimento pós 12000 g de células crescidas em meio restritivo em glucose comparativamente com células crescidas em meio YEPD, em qualquer das situações estudadas dever-se-á provavelmente a uma transição fermentativa-respiratória que despoleta sistemas antioxidantes quando as leveduras deixam de utilizar a glucose como fonte de carbono. (Fransen, 2012; Biswas, 2009; Diaz-Ruiz, 2009; Costa, 2001)

O conteúdo em espécies reativas de oxigénio (ROS) é descrito na literatura como marcador de stress oxidativo. Assim, pelas fig. 4.3C e 4.3D podemos observar que os níveis de ROS do sobrenadante e sedimento pós 12000 g em células crescidas em meio restritivo em glucose (YEP) eram inferiores aos de células crescidas em meio YEPD e restritivo YED, que neste ultimo caso era significativamente superior ao do meio rico. Estes resultados são espectáveis uma vez que em carência de glucose as células de levedura assumem o metabolismo respiratório, consumindo produtos da fermentação para assegurar a sua sobrevivência. Consequentemente poderão ser despoletados mecanismos antioxidantes para proteger a célula dos subprodutos gerados pelo metabolismo respiratório. Relativamente à exposição ao lindano detetou-se um decréscimo do conteúdo em ROS no sedimento de células crescidas em meio restritivo em peptona e expostas a qualquer dos níveis de lindano testados, bem como um aumento do conteúdo em ROS no sobrenadante de células crescidas em meio YEP e expostas a lindano 50 μM . Apenas neste último caso se detetou uma correlação direta entre a diminuição significativa da razão GSH/GSSG e o aumento do conteúdo em ROS do sobrenadante pós 12000 g. Noutras situações o decréscimo do poder

reduzido assegurado pelo glutatono nem sempre se encontrou relacionado com o aumento do conteúdo em ROS. Tal facto dever-se-á provavelmente à ação de mecanismos de resposta antioxidante enzimáticos e não enzimáticos que regulam o conteúdo celular em ROS e que foram responsáveis pelos bons níveis de sobrevivência de *S. cerevisiae* UE-ME₃ ao inseticida quando comparado com o respetivo controlo, discutidos na fig. 1.1.

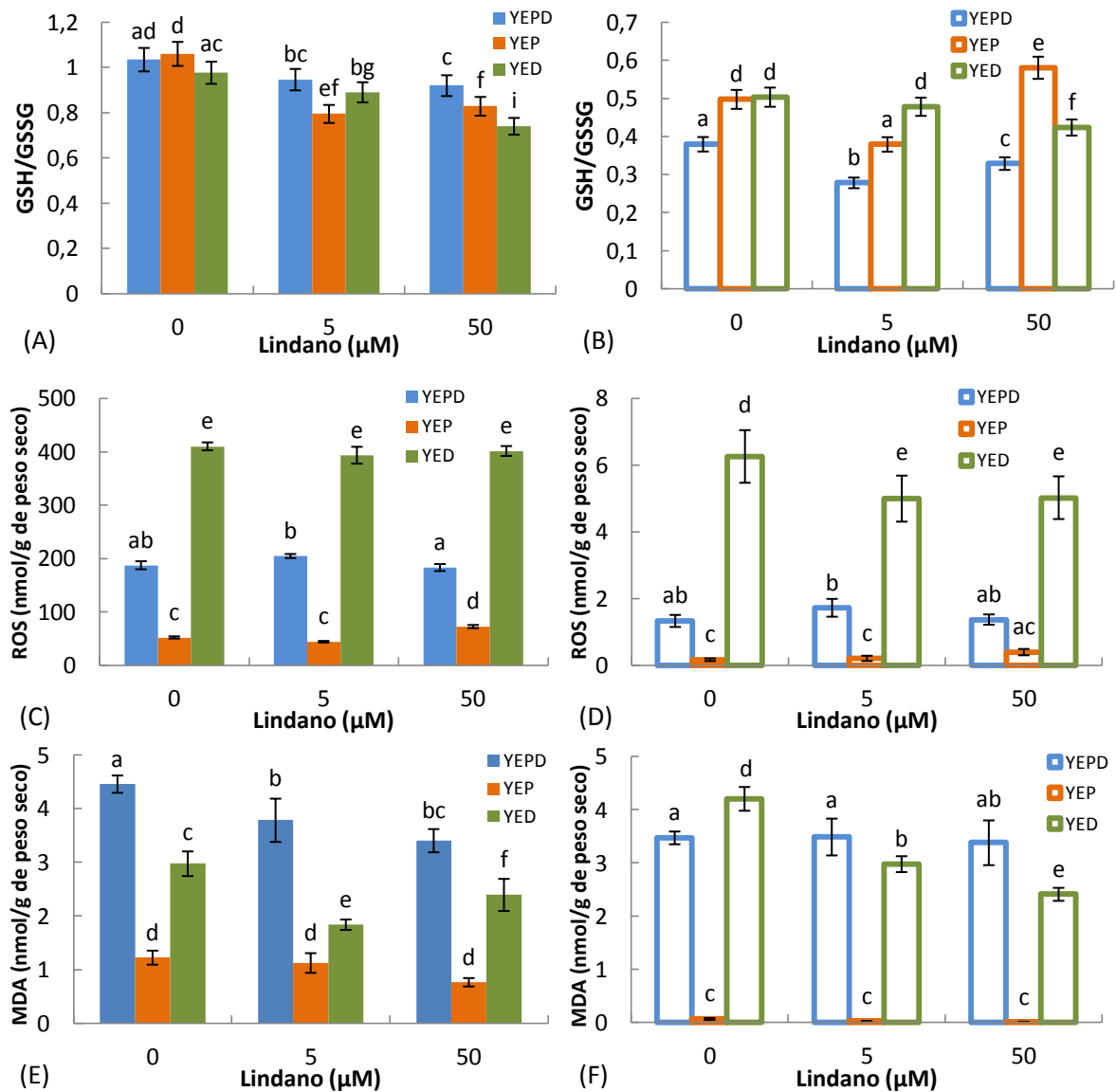


Figura 4.3 – Razão GSH/GSSG e conteúdo em ROS e MDA do sobrenadante pós 12000 g (A, C e E, respetivamente) e do sedimento (B, D e F, respetivamente) obtidos de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas na ausência e na presença de lindano nos distintos meios de cultura. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. Os pontos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

As fig. 4.3E e 4.3F mostram que os níveis de malonaldeído (MDA) do sobrenadante e sedimento pós 12000 g em células crescidas em meios YEPD e YED, na ausência de lindano eram significativamente superiores aos detetados em células crescidas em meio YEP (p

<0,01). De novo, a transição fermentativa-respiratória parece ter despoletado mecanismos antioxidantes que preveniram a ocorrência de danos celulares via peroxidação lipídica. A exposição ao lindano não afetou significativamente o conteúdo em MDA quer do sobrenadante quer do sedimento pós 12000 g de células crescidas em meio YEP ($p < 0,01$). No entanto causou um decréscimo significativo deste conteúdo no sobrenadante de células preferencialmente fermentativas como as crescidas em meio YEPD e YED ($p < 0,01$), resposta que também se observou no sedimento de células crescidas em meio restritivo YED. Os resultados obtidos para o conteúdo em ROS e MDA estão de acordo com os encontrados na literatura (Martínez-Reyes, 2014; Vurusaner, 2012; Lushchack, 2011; Diaz-Ruiz, 2009; Cipak, 2008; Doudican, 2005; Espindola, 2003).

A fig. 4.4 representa a resposta de *S. cerevisiae* a diferentes meios de cultura e ao lindano por mecanismos enzimáticos antioxidantes envolvidos na dismutação do radical anião superóxido, como o enzima Cu,Zn-superóxido dismutase (SOD1) e no consumo do seu produto, o peróxido de hidrogénio, como os enzimas catalases citoplasmática e peroxissomal. Pela fig. 4.4A pode-se observar que os níveis da atividade catalítica SOD 1 foram significativamente mais elevados em células crescidas em meios restritivos ($p < 0,01$), particularmente em meio carente em glucose (YEP) onde as células se encontram maioritariamente respiratórias. A exposição ao lindano (5 μM) causou um decréscimo desta atividade catalítica em células crescidas em meio YEPD e YEP, 45 e 15 %, respetivamente. No entanto a exposição ao nível mais elevado de lindano em células crescidas em meio YEP induziu um aumento significativo desta atividade enzimática comparativamente com os detetados em células crescidas noutros meios de cultura nas mesmas condições de exposição ($p < 0,01$), facto que pode justificar em parte a boa sobrevivência desta população de células ao lindano. A fig. 4.4B revela de novo que as células mais respiratórias foram as que possuíam níveis mais elevados de catalase citoplasmática (CTT1). Por outro lado a presença de lindano no meio de cultura não afetou esta atividade catalítica de células crescidas em meio rico e apenas afetou esta atividade enzimática expressa em células crescidas em meio restritivo com carência em peptona no nível de exposição mais baixo. Todavia observou-se um decréscimo acentuado (76 %) desta atividade enzimática em células respiratórias. Estes resultados levam a supor que o lindano pode ter sido utilizado como fonte de carbono, uma vez que segundo a bibliografia são detetados valores inferiores de CTT1 em células que adotam o metabolismo fermentativo. A remoção de peróxido de hidrogénio ao nível do peroxissoma (CTA1) mostrou-se ser mais elevada em *S. cerevisiae* respiratórias e crescidas em condições de carência de peptona (fig. 4.4C). A exposição ao inseticida manteve o mesmo

perfil de atividade descrito para a ausência do xenobiótico mas em qualquer dos casos de exposição ao lindano ocorreu um aumento desta atividade catalítica. A taxa elevada de CTA1 detetada em células respiratórias expostas ao lindano permite inferir uma eventual indução da β -oxidação ao nível do peroxissoma. Os resultados obtidos para as atividades superóxido dismutase e catalase são similares aos que se encontram na literatura (Heink, 2013; Fransen, 2012; Herrero, 2008; Martins, 2005; Costa, 2002).

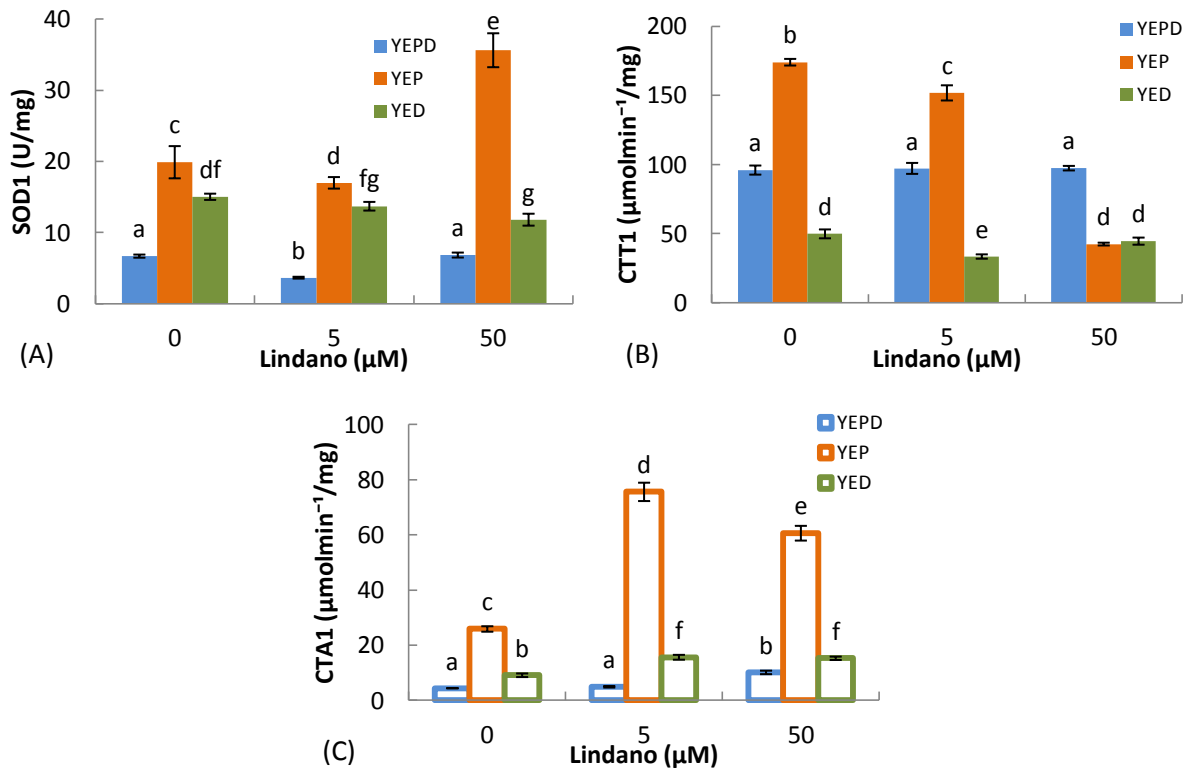


Figura 4.4 – Atividade enzimática SOD1 (A), CTT1 (B) e CTA1 (C) obtidas de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas na ausência e na presença de lindano nos distintos meios de cultura. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. Os pontos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

As peroxidases, fazem parte de mecanismos enzimáticos antioxidantes que estão envolvidos na desintoxicação do peróxido de hidrogénio e de outros peróxidos, prevenindo deste modo a formação de ROS. Na fig. 4.5 encontra-se representada a atividade peroxidase, fosfolipoperóxido glutathione peroxidase 2 (PHGPx2) do citoplasma determinada para os substratos peróxido de hidrogénio e t-butil peróxido. As fig. 4.5A e 4.5B revelam que as células crescidas em meios restritivos exibiam níveis de atividade PHGPx2 significativamente mais elevados do que as células crescidas em meio rico ($p < 0,01$) para qualquer dos substratos, uma marca de stress oxidativo. A atividade PHGPx2 de células crescidas em meio rico não foi afetada por qualquer dos níveis de exposição ao lindano. No entanto, a

presença do inseticida em meios restritivos (YEP, YED) causou um decréscimo significativo dessa atividade catalítica ($p < 0,01$), detetada por qualquer dos substratos, exceto quando o peróxido de hidrogénio foi utilizado como substrato de sobrenadantes pós 12000 g de células crescidas em meio YED e lindano 5 μM , sugerindo que a metabolização do peróxido de hidrogénio por esta atividade catalítica foi superior nestas condições culturais, enquanto que nas demais condições sofreu um decréscimo significativo. Os resultados obtidos para a atividade PHGPx2 estão de acordo com os encontrados na literatura (Pacciti, 2013; Rui-Yan, 2007; Tanaka, 2005; Avery, 2004).

Assim, a sobrevivência das células crescidas em carência de glucose ou peptona parece depender da expressão funcional desta atividade enzimática que foi no entanto severamente perturbada pela presença de lindano, efeito maioritariamente detetado nas células respiratórias. Esta resposta em meio YEP mostra-se positivamente correlacionada com a diminuição da atividade CTT1.

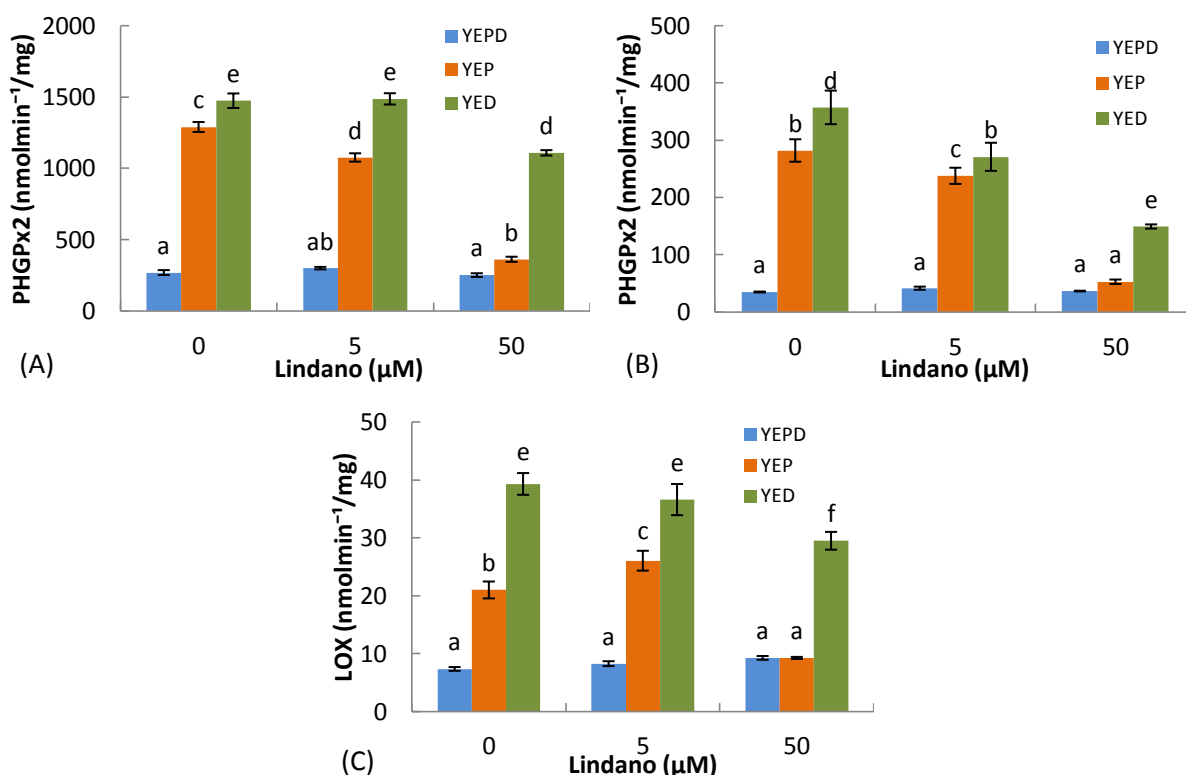


Figura 4.5 – Atividade enzimática PHGPx2 utilizando como substrato o H_2O_2 (A) ou o t-BHP (B), e atividade LOX (C), obtidas de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas na ausência e na presença de lindano nos distintos meios de cultura. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. Os pontos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Os níveis elevados de SOD1 e PHGPx2 nos meios restritivos revelam que a carência de nutrientes despoletou mecanismos de resposta ao stress que estão maioritariamente envolvidos na desintoxicação do radical anião superóxido e consequente redução do peróxido de hidrogénio e/ou de produtos da peroxidação lipídica. Esta suposição mostra-se confirmada na fig. 4.5C onde a atividade lipoxigenase exibe níveis de atividade significativamente superiores em células crescidas nos meios restritivos na ausência e na presença de lindano 5 μ M ($p < 0,01$). Na presença de lindano 50 μ M apenas se observou este efeito em células crescidas em meio YED. Outro aspeto interessante revela que as células respiratórias em presença de lindano 5 μ M exibiam nível de atividade LOX superior ao dos outros tratamentos ($p < 0,01$). O aumento da atividade lipoxigenase nestas condições pode ter contribuído para comprometer a sobrevivência celular das leveduras respiratórias expostas a níveis baixos do xenobiótico (Joo, 2012; Niki, 2009).

A redução do peróxido de hidrogénio ou lipoperóxidos a água ou ao álcool correspondente por glutathione peroxidases é assistida por outro enzima do ciclo redox do glutathione denominado glutathione redutase. A fig. 4.6A revela que os valores mais baixos desta atividade catalítica foram detetados em *S. cerevisiae* crescidas em meio rico ($p < 0,01$). A presença de lindano (5 e 50 μ M) nesse meio causou um aumento dessa atividade enzimática. Contudo nos meios restritivos observou-se uma resposta ao inseticida distinta da anterior, isto é, no caso do meio carente em peptona (YED) ocorreu um decréscimo significativo da atividade GR para os dois níveis de exposição ao lindano que não diferiram entre si, enquanto que no meio YEP não se detetaram alterações com significado estatístico para a concentração mais baixa de lindano, tendo-se verificado um decréscimo significativo (45 %) para a concentração de 50 μ M ocorrendo uma descida para valores idênticos ao controlo do meio rico ($p < 0,01$). Acrescenta-se ainda que células crescidas em meio rico e carente em glucose permaneceram com níveis de glutathione redutase muito inferiores aos das células crescidas em carência de peptona. Este facto aponta para uma atenuação do ciclo do glutathione de *S. cerevisiae* maioritariamente respiratórias quando em presença de lindano (50 μ M) que pode estar em parte relacionado com o decréscimo da atividade lipoxigenase discutida a propósito da fig. 4.5C para este nível de exposição ao inseticida, tema que voltará a ser abordado na fig. 4.7. A fig. 4.6B parece explicar um pouco os resultados caracterizados no início desta discussão (fig. 4.1A). Assim podemos observar que a atividade G6PD se expressa funcionalmente em níveis significativamente mais elevados nas células crescidas em meio rico ($p < 0,01$). Por outro lado, a presença do inseticida provocou um aumento da

atividade catalítica deste enzima nestas condições de crescimento ($p < 0,01$). Deste modo parece que em meio rico ocorre uma melhor disponibilização de equivalentes redutores sob a forma de NADPH que podem ser utilizados na redução do glutationato pelo seu ciclo de oxidação-redução facilitando a reposição dos níveis de GSH no meio celular. No entanto no meio restritivo em peptona a presença de lindano no meio de cultura não perturbou a atividade G6PD de *S. cerevisiae*, embora os valores obtidos sejam inferiores aos do meio rico, em 48 e 40 % para 5 e 50 μM , respetivamente. Mais uma vez a presença de lindano 5 μM não afetou a atividade G6PD de células respiratórias (YEP) mas induziu um decréscimo significativo (66 %) na presença de lindano 50 μM ($p < 0,01$), perfil de resposta correlacionada com a atenuação do ciclo do glutationato discutido anteriormente, bem como com o decréscimo da atividade lipoxigenase. Os resultados obtidos para as atividades enzimáticas GR e G6PD estão de acordo com os encontrados na literatura (Al-Gubory, 2014; Ho, 2012; Hector, 2011; Asensio, 2007; Rui-Yan, 2007; Lushchak, 2005; Sebollela, 2004; Felix, 2002).

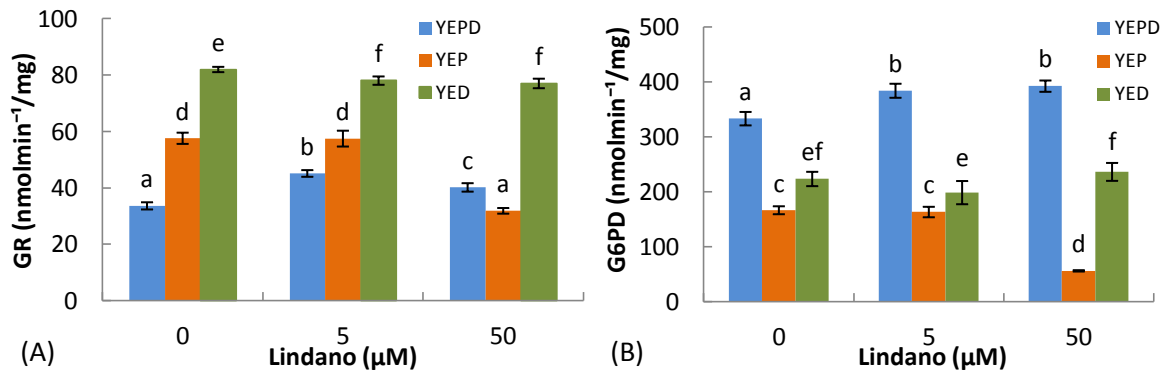


Figura 4.6 – Atividade enzimática GR (A) e G6PD (B) obtidas de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas na ausência e na presença de lindano nos distintos meios de cultura. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. Os pontos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

A fig. 4.7 representa a resposta de três atividades catalíticas (ALP, LDH e GGT) de *S. cerevisiae* a alterações nutricionais do meio de cultura e/ou à presença do inseticida lindano que permitirão confirmar alguns mecanismos de resposta caracterizados nos parágrafos anteriores. Assim, a carência de glucose (YEP) ou de peptona (YED) levou a que a atividade ALP (fig. 4.7A) apresentasse níveis de expressão funcional significativamente superiores aos detetados em meio rico, fazendo supor uma alteração das vias de disponibilização do potencial químico de ligações fosfato em leveduras crescidas em condições de carência nutricional. A referida figura mostra também que a presença de lindano no meio rico, em

qualquer dos níveis de exposição, despoletou um aumento desta atividade enzimática, facto que nos leva a supor uma alteração metabólica relevante para a sua sobrevivência. Todavia a exposição de *S. cerevisiae* ao lindano em meios com carência nutritiva (YEP e YED) provocou um decréscimo significativo ($p < 0,01$) da referida atividade catalítica, percentualmente mais acentuado (72 %) em células maioritariamente respiratórias e expostas ao inseticida na concentração de 50 μM . As alterações agora descritas a propósito da exposição ao lindano em meios de carência nutritiva poderão explicar em parte a perda de viabilidade celular referida na fig. 4.1A (Linder, 2013; Tariq Ali, 2005; Tuleva, 1998; Heppel, 1962).

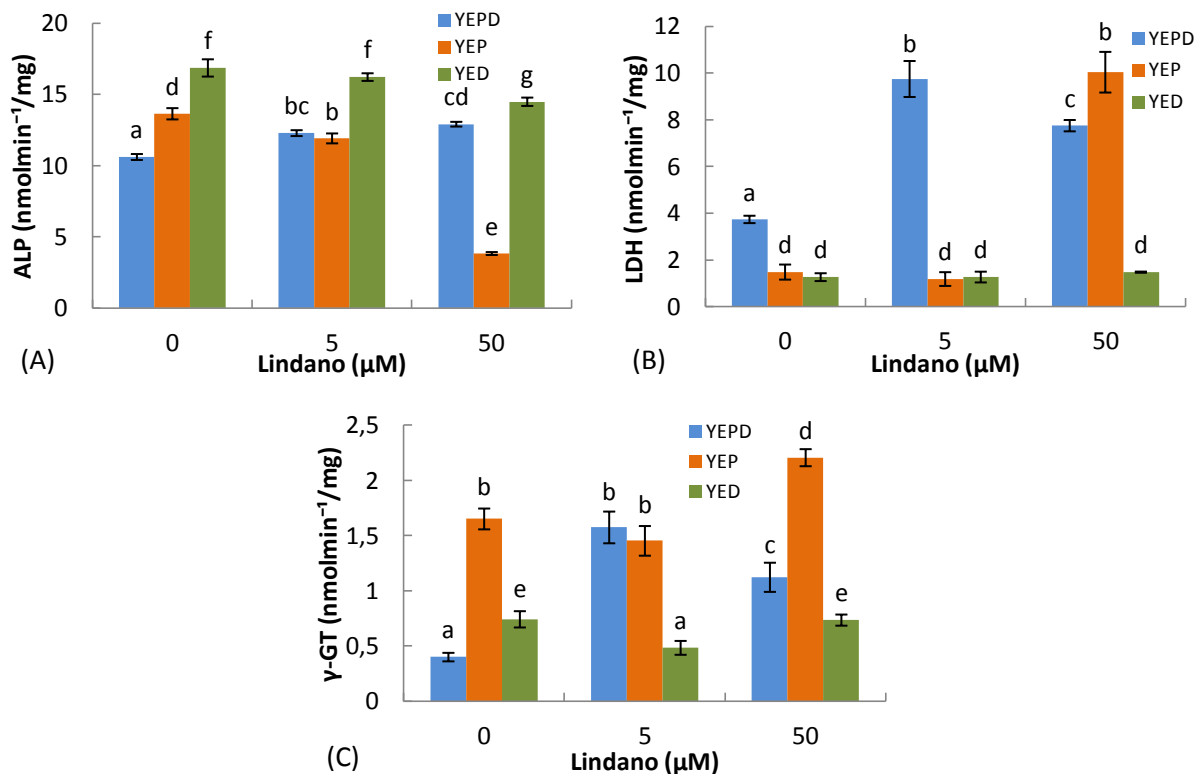


Figura 4.7 – Atividade enzimática ALP (A), LDH (B) e γ -GT (C) obtidas de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas na ausência e na presença de lindano nos distintos meios de cultura. Os resultados representam a média de cinco experiências independentes \pm desvio-padrão. Os pontos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

A fig. 4.7B mostra que a carência de glucose e peptona manteve os níveis de lactato desidrogenase muito inferiores (aproximadamente $\frac{1}{2}$) aos detetados em meio rico como expectável numa levedura vínica. Contudo a presença de lindano no meio de cultura provocou um aumento significativo desta atividade enzimática nas leveduras crescidas em meio rico em 2,5x e 2x para 5 e 50 μM , respetivamente ($p < 0,01$). Esta alteração caracterizada por uma eventual indução da fermentação láctica devido à exposição ao xenobiótico poderá ser interpretada como uma indução dos mecanismo de renovação de NAD^+ que parece

indispensável para garantir a sobrevivência de *S. cerevisiae* ao lindano. A referida figura mostra ainda que lindano (5 μM) não afetou a atividade LDH em *S. cerevisiae* crescidas em meio restritivos, exceto na presença de lindano (50 μM) onde provocou um aumento significativo (cerca de 6x superior) da LDH de leveduras crescidas em meio carente em glucose ($p < 0,01$). Este resultado que pode estar relacionado com alterações nos mecanismos de regeneração de NAD^+ discutidos para o meio rico é particularmente surpreendente, porque *S. cerevisiae* em carência de glucose assume um metabolismo preferencialmente respiratório, pelo que o aumento da LDH relaciona-se com uma transição respiratório-fermentativa do metabolismo energético. Esta resposta assemelha-se ao efeito Crabtree descrito em leveduras, um fenômeno que envolve transição respiratória-fermentativa do metabolismo energético quando se disponibiliza glucose no meio de cultura, facto que leva a admitir-se que o lindano poderá estar a ser utilizado como fonte de carbono, sendo por isso capaz de alterar o metabolismo energético. Os valores de atividade LDH obtidos são semelhantes aos encontrados na literatura (Fets, 2013; Muñoz-Pinedo, 2012; Diaz-Ruiz, 2011; Diaz-Ruiz, 2009; Yamada, 1975).

Por fim, a fig. 4.7C revela que a atividade γ -GT era significativamente inferior em *S. cerevisiae* crescidas em meio rico, tendo sido detetado o valor mais elevado em células crescidas em meio YEP ($p < 0,01$), resposta que permite inferir uma indução dos mecanismos de desintoxicação/excreção de xenobióticos para o vacúolo, pela carência de nutrientes. A presença de lindano provocou um aumento da atividade γ -GT ($p < 0,01$) em qualquer dos níveis de exposição testados nas células crescidas em meio YEPD. No entanto, no meio restritivo fermentativo observou-se apenas um decréscimo desta atividade catalítica em células expostas a lindano (5 μM). Além disso, células respiratórias expostas ao nível mais elevado de xenobiótico (50 μM) induziram a expressão funcional do enzima, uma resposta que permite inferir que a carência em glucose despoletou vias de biotransformação/desintoxicação/excreção do lindano. Este conjunto de resultados sugere que a biotransformação do lindano poderá ter facilitado a utilização de parte da sua estrutura química como fonte de carbono alternativa aos produtos da fermentação e justificar a transição respiratória-fermentativa discutida a propósito da fig. 4.7B. Provavelmente os produtos da degradação do composto organoclorado seguiram uma via de excreção que terá envolvido um passo de conjugação, um ponto a esclarecer em estudos futuros. Por outro lado, a ausência de resposta pelas leveduras crescidas em meio YED poderá estar relacionada com a carência de azoto indispensável à biossíntese endógena do glutathione, tripéptido que assiste à via de excreção para o vacúolo, onde o enzima γ -GT, localizado no tonoplasto desempenha

papel relevante, ou também com a taxa de expressão do próprio enzima. Os resultados obtidos de atividade γ -GT estão de acordo com a literatura (Wünschmann, 2010; Adamis, 2009; Mehdi, 2001).

5. Conclusões

1. A viabilidade celular de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em condições de carência em peptona ou glucose tornou-se inferior à de células crescidas em meio rico a partir das 12 h, seguindo um perfil de crescimento distinto do controlo até ao final da cultura.

2. A viabilidade celular de *S. cerevisiae* diminuiu em culturas de meio rico ou restritivo em glucose, na presença de lindano 50 e 5 µM, respetivamente, não sendo detetadas alterações do parâmetro na ausência de peptona.

3. A biomassa produzida por *S. cerevisiae* em condições restritivas foi inferior à obtida em meio rico, não sendo detetadas diferenças neste parâmetro entre culturas em presença de lindano e os respetivos controlos.

4. O conteúdo em tióis não-proteicos do sobrenadante pós 12000 g não foi perturbado pela carência de nutrientes dos meios restritivos. Contudo no sedimento dos meios restritivos esse conteúdo era inferior ao do meio rico.

5. A exposição ao lindano diminuiu o conteúdo em tióis não-proteicos do sobrenadante pós 12000 g de *S. cerevisiae* crescidas em meio rico ou em carência de glucose. Embora o perfil de resposta ao composto hexaclorado, do sedimento de leveduras crescidas em meio rico, seja idêntico ao do sobrenadante, nos meios restritivos o conteúdo aumentou, para os dois níveis de exposição em carência de peptona, e apenas para a concentração mais baixa em carência de glucose.

6. O conteúdo em glutatióno do sobrenadante pós 12000 g não foi perturbado pela composição nutritiva dos meios. Contudo no sedimento dos meios restritivos era inferior ao do meio rico.

7. O perfil de resposta ao lindano, em termos de nível de glutatióno do sobrenadante foi idêntico ao detetado para o nível de tióis totais da referida fração, com exceção do conteúdo em glutatióno do sobrenadante de células crescidas em meio com carência em peptona que neste caso também diminuiu na presença de lindano (50 µM).

8. O perfil relativo ao conteúdo em glutatióno do sedimento pós 12000 g mostrou-se semelhante ao observado em tióis totais. No entanto, no meio rico detetou-se um decréscimo significativo desse conteúdo para ambos os níveis de exposição ao lindano e no meio carente em glucose só se detetou um aumento significativo para o nível de exposição ao lindano de 50 µM.

9. O sobrenadante pós 12000 g de leveduras crescidas em carência de peptona exibiam conteúdo mais elevado em dissulfureto de glutationo do que o detetado para os meios rico ou carente em glucose, ao contrário do que ocorreu no sedimento onde o conteúdo mais elevado foi detetado no meio rico.

10. A exposição ao lindano provocou um decréscimo do conteúdo em dissulfureto de glutationo do sobrenadante pós 12000 g de células crescidas em meio rico ou em carência de glucose, um perfil correlacionado com o conteúdo em glutationo e em tióis não proteicos para a concentração de lindano (50 μM), inverso ao detetado em condições de carência de fonte de azoto.

11. A exposição ao lindano provocou ainda um aumento do conteúdo em dissulfureto de glutationo do sedimento pós 12000 g de células crescidas em carência de peptona, resposta apenas detetada para células crescidas em carência de glucose e em presença de lindano 5 μM .

12. A composição nutritiva dos meios de cultura (rico e restritivos) não perturbou a capacidade antioxidante estimada pelo par redox GSH/GSSG do sobrenadante pós 12000 g.

13. O lindano induziu stress oxidativo provocando decréscimo significativo da capacidade antioxidante mediada pelo glutationo no citoplasma.

14. O aumento da capacidade antioxidante mitocondrial estimada pelo par redox GSH/GSSG no sedimento pós 12000 g de células crescidas em carência de glucose (YEP), despoletada pelo lindano, poderá ser devida a uma transição fermentativo-respiratória.

15. Os níveis de ROS (H_2O_2) detetados no sobrenadante e sedimento pós 12000 g de células respiratórias (meio YEP) foram inferiores aos de células fermentativas (meios YEPD, YED).

16. A exposição ao lindano (50 μM) induziu um aumento do conteúdo em ROS do sobrenadante de células crescidas em meio carente em glucose (YEP).

17. A exposição ao lindano (5 e 50 μM) induziu um decréscimo do conteúdo em ROS no sedimento de células crescidas em meio carente em peptona (YED),

18. A ocorrência de transição do metabolismo energético fermentativo-respiratória parece despoletar mecanismos antioxidantes associados à prevenção de danos em sistemas membranares, uma vez que os níveis de malonodialdeído (MDA) do sobrenadante e sedimento pós 12000 g de células crescidas em meios fermentativos YEPD e YED eram superiores aos detetados em células crescidas no meio respiratório YEP.

19. A exposição ao lindano não perturbou o conteúdo em MDA do sobrenadante e do sedimento pós 12000 g de células respiratórias (meio YEP), mas afetou negativamente o nível

desse marcador de danos celulares do sobrenadante de células fermentativas (meio YEPD e YED), bem como do sedimento de células respiratórias (meio YEP).

20. Os níveis de atividade catalítica SOD1 eram mais elevados em células crescidas em meios restritivos, particularmente em meio carente em glucose (YEP) onde as células se encontram maioritariamente respiratórias.

21. A exposição ao lindano (5 μ M) causou um decréscimo da atividade catalítica SOD1 em células crescidas em meio YEPD e YEP, embora a exposição ao nível mais elevado de lindano tenha induzido a referida atividade catalítica de células respiratórias (crescidas em meio YEP), facto que pode justificar em parte a boa sobrevivência desta população de células ao lindano.

22. As células respiratórias exibiam níveis mais elevados de catalase citoplasmática (CTT1).

23. O lindano pode ter sido utilizado como fonte de carbono uma vez que a exposição ao inseticida (5 e 50 μ M) provocou um decréscimo acentuado da atividade CTT1 de células respiratórias, não afetou a referida atividade de células fermentativas crescidas em meio rico (YEPD) e apenas afetou negativamente células fermentativas crescidas em carência de peptona (meio YED) para o nível mais baixo.

24. A remoção do peróxido de hidrogénio peroxissomal via CTA1 foi mais elevada em *S. cerevisiae* respiratórias (meio YEP) e fermentativas crescidas em carência de peptona (YED).

25. O perfil de resposta ao inseticida em termos de atividade CTA1 conservou-se idêntico ao descrito na ausência do xenobiótico. Em qualquer dos casos (meios YEPD, YED e YEP) a exposição ao lindano provocou um aumento da referida atividade enzimática.

26. A taxa elevada de CTA1 de células respiratórias expostas ao lindano (YEP) permite inferir uma eventual indução da β -oxidação ao nível do peroxissoma em resposta ao xenobiótico.

27. A atividade PHGPx2, medida com os substratos peróxido de hidrogénio e t-butil peróxido de células crescidas em meios restritivos exibiam níveis mais elevados do que a de células crescidas em meio rico, uma marca de stress oxidativo.

28. Assim, a sobrevivência de células crescidas em carência de glucose ou peptona parece depender da expressão funcional da atividade PHGPX2, uma vez que a presença do inseticida em meios restritivos (YEP, YED) causou um decréscimo significativo dessa atividade enzimática para ambos os substratos, exceto no sobrenadante de células crescidas em meio YED e lindano 5 μ M para o peróxido de hidrogénio.

29. Níveis mais elevados de enzimas antioxidantes SOD1 e PHGPx2 de leveduras crescidas em meios restritivos sugerem que a carência de nutrientes despoletou mecanismos de resposta ao stress que se encontram maioritariamente envolvidos na desintoxicação do radical anião superóxido e consequente redução do peróxido de hidrogénio e/ou de produtos da peroxidação lipídica.

30. A hipótese anterior parece ser confirmada pelos níveis de atividade oxidante LOX que exhibe valores mais elevados em células crescidas em meios restritivos na ausência e na presença de lindano 5 µM. Na presença de lindano 50 µM apenas se observou este efeito em células crescidas em meio YED.

31. Os valores mais baixos da atividade GR foram detetados em *S. cerevisiae* crescidas em meio rico (YEED), ocorrendo um aumento dessa atividade enzimática na presença de lindano (5 e 50 µM).

32. Observou-se um decréscimo da atividade GR em *S. cerevisiae* crescidas em meio carente em peptona (YED) e carente em glucose (YEP) exceto, neste caso, para o nível de exposição 5 µM onde não se detetaram alterações.

33. A disponibilização de equivalentes redutores sob a forma de NADPH utilizáveis na reposição do GSH no meio celular e na resposta a xenobióticos, parece ser superior em leveduras crescidas no meio rico, uma vez que a atividade G6PD expressou-se funcionalmente em níveis mais elevados em células crescidas nesse meio e aumentou na presença do inseticida.

34. A presença de lindano em meios restritivos em peptona e glucose não perturbou a atividade G6PD de *S. cerevisiae*, exceto em células respiratórias (meio YEP) que aumentou na presença do nível mais elevado do inseticida perfil de resposta correlacionável com a atenuação do ciclo do glutathione e com o decréscimo da atividade lipoxigenase descritos anteriormente.

35. A disponibilização do potencial químico de ligações fosfato poderá ter aumentado em leveduras crescidas em meios restritivos uma vez que a carência de glucose (meio YEP) ou de peptona (meio YED) manteve os níveis de atividade ALP mais elevados do que aqueles que foram detetados em meio rico (YEED). A presença de lindano no meio rico, em qualquer dos níveis de exposição, despoletou um aumento desta atividade enzimática, uma resposta metabólica relevante para a sua sobrevivência celular.

36. A exposição de *S. cerevisiae* ao lindano em meios com carência nutritiva (YEP e YED) provocou um decréscimo significativo da atividade ALP, percentualmente mais

acentuado (72 %) em células respiratórias expostas ao inseticida na concentração de 50 μM , facto que poderá explicar, em parte, a perda de viabilidade celular referida anteriormente

37. A carência de glucose e peptona manteve os níveis de LDH muito inferiores (aproximadamente $\frac{1}{2}$) aos detetados em meio rico (YEPD) como expectável numa levedura vínica.

38. A indução da fermentação láctica pelo inseticida para renovação de NAD^+ , poderá ter sido despoletada pela presença de lindano (5 e 50 μM) no meio de cultura YEPD, onde ocorreu um aumento da atividade LDH, uma resposta que poderá ter sido crucial para garantir a sobrevivência de *S. cerevisiae* ao lindano.

39. O lindano poderá ter sido utilizado como fonte de carbono por *S. cerevisiae*, crescidas em carência de glucose, usualmente respiratórias, uma vez que o nível de exposição 50 μM despoletou uma via fermentativa de regeneração de NAD^+ com aumento da atividade LDH, transição respiratório-fermentativa idêntica ao efeito Crabtree.

40. A carência em glucose ou peptona induziu mecanismos de desintoxicação/excreção de xenobióticos para o vacúolo, uma vez que a atividade γ -GT era significativamente inferior em *S. cerevisiae* crescidas em meio rico.

41. A biotransformação/excreção do lindano poderá ter facilitado a sua utilização como fonte de carbono alternativa aos produtos da fermentação e justificar a transição respiratória-fermentativa anteriormente descrita, uma vez que o inseticida provocou um aumento da atividade γ -GT para qualquer dos níveis de exposição de células crescidas em meio rico, bem como para o nível 50 μM de células respiratórias.

6. Referências bibliográficas

- Abdelwahid, E.; Rolland, S.; Teng, X.; Conradt, B.; Hardwick, J. M.; White, K. (2011) – Mitochondrial involvement in cell death of non-mammalian eukaryotes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813, 597-607;
- Abuja, P. M.; Albertini, R. (2001) – Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins, *Clinica Chimica Acta*, 306, 1-17;
- Adamis, P. D. B.; Mannarino, S. C.; Eleutherio, E. C. A. (2009) – Glutathione and gamma-glutamyl transferases are involved in the formation of cadmium-glutathione complex, *FEBS Letters*, 583, 1489-1492;
- Al-Gubory, K. H. (2014) – Environmental pollutants and lifestyle factors induce oxidative stress and poor prenatal development, *Reproductive BioMedicine Online*, 29, 17-31;
- Ali, A. T.; Penny, C. B.; Paiker, J. E.; Niekerk, C.; Smit, A.; Ferris, W. F.; Crowther, N. J. (2005) - Alkaline phosphatase is involved in the control of adipogenesis in the murine preadipocyte cell line, 3T3-L1, *Clinica Chimica Acta*, 354, 101–109;
- Asensio, C.; Levoin, N.; Guillaume, C.; Guerquin, M-J.; Rouguieg, K.; Chrétien, F.; Chapleur, Y.; Netter, P.; Minn, A.; Lopicque, F. (2007) – Irreversible inhibition of glucose-6-phosphatase dehydrogenase by the coenzyme A conjugate of ketoprofen: A key to oxidative stress induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs?, *Biochemical Pharmacology*, 73, 405-416;
- Avery, A. M.; Avery, S. V. (2001) – *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases, *Journal of Biological Chemistry*, 276, 33780-22785;
- Avery, A. M.; Willetts, S. A.; Avery, S. V. (2004) – Genetic dissection of the phospholipid hydroperoxidase activity of yeast GPx3 reveals its functional importance, *Journal of Biological Chemistry*, 279, 46652-46658;
- Beers, R. F.; Jr.; Sizer, I. W. (1952) - A Spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, *Journal of Biological Chemistry*, 195, 133-140.
- Bergmeyer, H.; Grabl, M. (1983) – Method of Enzymatic Analysis, Volume II, Samples, Reagents, assessments of Results, 3rd ed., *Verlag Chemie*, Florida;
- Bernabia, M. A.; Macherel, D.; Faure, S.; Jacques, C.; Andriantsitohaina, R.; Malthièry, Y. (2013) – Plasmatic concentration of organochlorine lindane acts as metabolic disruptors in HepG2 liver cell line by inducing mitochondrial disorder, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272, 325-334;
- Betoulle, S.; Duchiron, C.; Deschaux, P. (2000) - Lindane increases in vitro respiratory burst activity and intracellular calcium levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) head kidney phagocytes, *Aquatic Toxicology*, 48, 211–221;
- Biswas, S. K.; Rahman, I. (2009) – Environmental toxicology, redox signaling and lung inflammation: The role of glutathione, *Molecular Aspects of Medicine*, 30, 60-76
- Boender, L. G. M.; Almering, M. J. H.; Dijk, M.; Maris, A. J. A.; Winde, J. H.; Pronk, J. T., Daran-Lapujade, P. (2011) – Extreme calorie restriction and energy source starvation in *Saccharomyces cerevisiae* represent distinct physiological states, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813, 2133-2144

Brethaudiere, J. P.; Spillman, T. (1984) - Bergmeyer methods of enzymatic analysis, vol. II, 3rd ed., *Verlag Chemie*, Florida

Chen, S.-R.; Dunigan, D. D.; Dickman, M. B. (2003) – Bcl-2 family members inhibit oxidative stress-induced programmed cell death in *Saccharomyces cerevisiae*, *Free Radical Biology & Medicine*, 34, 1315-1325;

Choudhary, A. K.; Devi, R. S. (2014) – Serum biochemical responses under oxidative stress of aspartame in wistar albino rats, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, 405-410;

Cipak, A.; Hasslacher, M.; Tehlivets, O.; Collinson, E. J.; Zivkovic, M.; Matijevic, T.; Wonisch, W.; Waeg, G.; Dawes, I. W.; Zarkovic, N.; Kohlwein, S. D. (2006) – *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing a plant fatty acid desaturase produces polyunsaturated fatty acids and is susceptible to oxidative stress induced by lipid peroxidation, *Free Radical Biology and Medicine*, 40, 897-906;

Cipak, A.; Jaganjac, M.; Tehlivets, O.; Kohlwein, S. D.; Zarkovic, N. (2008) – Adaptation to oxidative stress induced by polyunsaturated fatty acids in yeast, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1781, 283-287;

Costa, V. M. V.; Amorim, M. A.; Quintanilha, A.; Moradas-Ferreira, P. (2002) – Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: The involvement of the oxidative stress response regulators Yap1 and Skn7, *Free Radical Biology & Medicine*, 33, 1507-1515;

Costa, V.; Moradas-Ferreira, P. (2001) – Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases, *Molecular Aspects of Medicine*, 22, 217-246;

Dardalhon, M.; Kumar, C.; Iraqui, I.; Vernis, L.; Kienda, G.; Banach-Latapy, A.; He, T.; Chanet, R.; Faye, G.; Outten, C. E.; Huang, M.-E. (2012) – Redox-sensitive YFP sensors monitor dynamic nuclear and cytosolic glutathione redox changes, *Free Radical Biology and Medicine*, 52, 2254-2265;

Decreto-Lei n° 68/2003 (2003) - Diário da República n° 83/2003, série I-A;

Diaz-Ruiz, R.; Uribe-Carvajal, S.; Devin, A.; Rigoulet, M. (2009) – Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1796, 252-265;

Doudican, N.; Song, B.; Shadel, G.; Doetsch, P. (2005) – Oxidative DNA damage causes mitochondrial genomic instability in *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular and Cellular Biology*, 25, 5196–5204;

Duchiron, C.; Betoulle, S.; Reynaud, S.; Deschauxa, P. (2002) - Lindane increases macrophage-activating factor production and intracellular calcium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocytes, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53, 388–396;

Ďurfinová, M.; Brechtlová, M.; Líška B.; Barošková, Ž. (2007) – Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determination of lipid peroxidation products in rat brain tissues, *Chemical Papers*, 61, 321-325;

Espindola, A.; Gomes, D.; Panek, A.; Eleutherio, E. (2003) – The role of glutathione in yeast dehydration tolerance, *Cryobiology*, 47, 236-241;

Felix, K.; Rockwood, L. D.; Pretsch, W.; Nair, J.; Bartsch, H.; Bornkamm, G-W.; Janz, S. (2002) – Moderate G6PD deficient increases mutation rates in the brain of mice, *Free Radical Biology & Medicine*, 32, 663-673;

Fets, L.; Anastasiou, D. (2013) – p73 keeps metabolic control in the family, *Nature Cell Biology*, 15, 891-893;

Flohé, L.; Gunzler, W. A. (1984) – Assays of glutathione peroxidase, *Methods in Enzymology*, 105, 114-121

Forman, H. J.; Zhang, H.; Rinna, A. (2009) - Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis, *Molecular Aspects of Medicine*, 30, 1–12;

Franco, R.; Li, S.; Rodriguez-Rocha, H.; Burns, M.; Panayiotidis, M. I. (2010) – Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson’s disease, *Chemico-Biological Interactions*, 188, 289-300;

Fransen, M.; Nordgren, M.; Wang, B.; Apanasets, O. (2012) - Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822, 1363-1373;

Gata, J.; Pinto, M.; Macías, P. (1996) – Lipoxygenase Activity in Pig Muscle: Purification and Partial Characterization, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2573–2577;

Goldberg, D.; Spooner, R. (1987) – Glutathione reductase, in *Methods of enzymatic analysis*, 3rd ed., 258-265, Bergmayer, VCH, New York;

Gray, J. V.; Petsko, G. A.; Johnston, G. C.; Ringe, D.; Singer, R. A.; Werner-Washburne, M. (2004) – “Sleeping Beauty”: Quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 187-206;

Griboff, J.; Morales, D.; Bertrand, L.; Bonansea, R. I.; Monferrán, V.; Asis, R.; Wunderlin, D. A.; Amé, M. V. (2014) – Oxidative stress response induced by atrazine in *Palaemonetes argentinus*: The protective effects of vitamin E, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 108, 1-8;

Hector, R. E.; Mertens, J. A.; Bowman, M. J.; Nichols, N. N.; Cotta, M. A.; Hughes, S. R. (2011) – *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism requires gluconeogenesis and the oxidative branch of the pentose phosphate pathway for aerobic xylose assimilation, *Yeast*, 28, 645-660;

Heink, A. E.; Parrish, A. N.; Thorgaard, G. H.; Carter, P. A. (2013) – Oxidative stress among SOD-1 genotypes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquatic Toxicology*, 144, 75-82;

Held, P. (2010) - Monitoring Growth of Beer Brewing Strains of *Saccharomyces Cerevisiae*, Application Note, 111710-18, *BioTek*;

Heppel, L. A.; Harkness, D. R.; Hilmoe, R. J. (1962) – A study of the substrate specificity and other properties of the alkaline phosphatase of *Escherichia coli*, *Journal of Biological Chemistry*, 237, 841-846;

Herrero, E.; Ros, J.; Bellí, G.; Cabisco, E. (2008) – Redox control and oxidative stress in yeast cells, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780, 1217-1235;

Herskowitz, I. (1988) – Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 52, 536-553

Hfaiedh, N.; Murat, J.; Elfeki, A. (2011) – Protective effects of garlic (*Allium sativum*) extract upon lindane-induced oxidative stress and related damages in testes and brain of male rats, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100, 187-192;

Hfaiedh, N.; Murat, J.; Elfeki, A. (2012) – A combination of ascorbic acid and α -tocopherol or a combination of Mg and Zn are both able to reduce the adverse effects of lindane-poisoning of rat brain and liver, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 26, 273-278;

Hill, S.; Hirano, K.; Shmanai, V. V.; Marbois, B. N.; Vidovic, D.; Bekish, A. V.; Kay, B.; Tse, V.; Fine, J.; Clarke, C. F.; Shchepinov, M. S. (2011) – Isotope-reinforced polyunsaturated fatty acids protect yeast cells from oxidative stress, *Free Radical Biology & Medicine*, 50, 130-138;

Hissin, P. J.; Hilf, R. (1976) – A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues, *Analytical Biochemistry*, 74, 214-226;

Ho, H-Y.; Cheng, M-L.; Shiao, M-S.; Chiu, D. T-Y. (2013) – Characterization of global metabolic responses of glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient hepatoma cells to diamide-induced oxidative stress, *Free Radical Biology and Medicine*, 54, 71-84;

Imai, H.; Nakagawa, Y. (2003) – Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells, *Free Radical Biology and Medicine*, 34, 145-169;

Izawa, S.; Inoue, Y.; Kimura, A. (1996) – Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 320, 61–67;

Johri, A.; Yadav, S.; Dhawan, A.; Parmar, D. (2007) – Overexpression of cerebral and hepatic cytochrome P450s alters behavioral activity of rat offspring following prenatal exposure to lindane, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 225, 278-292;

Johri, A.; Yadav, S.; Dhawan, A.; Parmar, D. (2008) – Responsiveness of cerebral and hepatic cytochrome P450s in rat offspring prenatally exposed to lindane, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 231, 10-16;

Joo, Y-C.; Oh, D-K. (2012) – Lipoxygenases: Potential starting biocatalysts for the synthesis of signaling compounds, *Biotechnology Advances*, 30, 1524-1532;

Khoury, C. M.; Greenwood, M. T. (2008) – The pleiotropic effects of heterologous Bax expression in yeast, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783, 1449-1465;

Klionsky, D. J.; Emr, S. D. (1989) – Membrane protein sorting: biosynthesis, transport and processing of yeast vacuolar alkaline phosphatase, *The EMBO Journal*, 8, 2241-2250;

Lake, B. G. (1987) – Preparation and characterisation of microsomal fractions for studies of xenobiotic metabolism. In: Snell, K., Mullock, B. (Eds.), *Biochemical Toxicology: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp. 183–215;

LeBel, P. C.; Ischiropoulos, H.; Bondys, C. S. (1990) – Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress, *Chemical Research in Toxicology*, 5, 227-23;

Lee, P. Y.; Bae, K-H.; Jeong, D. G.; Chi, S-W.; Moon, J. H.; Kang, S.; Cho, S.; Lee, S. C.; Park B. C.; Park, S. G. (2011) – The S-nitrosylation of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase 2 is reduced by interaction with glutathione peroxidase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecules and Cells*, 31, 255-259;

- Linder, C. H.; Englund, U. H.; Narisawa, S.; Millán, J. L.; Magnusson, P. (2013) – Isozyme profile and tissue-origin of alkaline phosphatases in mouse serum, *Bone*, 53, 399-408;
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. (1951) – Protein measurement with the Folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275;
- Lushchak, V. I. (2011) – Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals, *Aquatic Toxicology*, 101, 13-30;
- Lushchak, V. I.; Gospodaryov, D. V. (2005) – Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in *Saccharomyces cerevisiae*, *Cell Biology International*, 29, 187-192;
- MacDonald, P. N. (2001) – Methods in Molecular Biology, Vol 177, Two-Hybrid Systems: Methods and Protocols, Growth and Maintenance of Yeast, *Human Press Inc.*, Totowa, NJ
- Mailloux, R. J.; McBride, S. L.; Harper, M-E. (2013) – Unearthing the secrets of mitochondrial ROS and glutathione in bioenergetics, *Trends in Biochemical Sciences*, 38, 592-602;
- Martínez-Reyes, I.; Cuezva, J. M. (2014) – The H⁺-ATP synthase: A gate to ROS mediated cell death or cell survival, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1837, 1099-1112;
- Martins, V.; Manfredini, V.; Benfato, M. S. (2005) – High levels of catalase in SOD mutants of *Saccharomyces cerevisiae* in high aeration conditions, *Brazilian Journal of Microbiology*, 36, 347-351;
- Matés, J. M. (2000) – Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology, *Toxicology*, 153, 83-104;
- Mehdi, K.; Thierie, J.; Penninckx, M. J. (2001) – γ -Glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its role in the vacuolar transport and metabolism of glutathione, *Biochemical Journal*, 359, 631-637;
- Meister, A. (1950) – Reduction of α,γ -diketo and α -keto acids catalyzed by muscle preparations and by crystalline lactic dehydrogenase, *Journal of Biological Chemistry*, 184, 117;
- Michalowicz, J.; Mokra, K.; Rosiak, K.; Sicinska, P.; Bukowska, B. (2013) – Chlorobenzenes, lindane and dieldrin induce apoptotic alterations in human peripheral blood lymphocytes (in vitro study), *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36, 979-988;
- Miyoshi, N.; Kawano, T.; Tanaka, M.; Kadono, T.; Kosaka, T.; Kunimoto, M.; Takahashi; Hosoya, H. (2003) – Use of paramecium species in bioassays for environmental risk management: Determination of IC₅₀ values for water pollutants, *Journal of Health Science*, 49, 429-435;
- Morano, K. A.; Grant, C. M.; Moye-Rowley, W. S. (2012) – The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, 190, 1157-1195;
- Moss, R. (1955) – Methods in Enzymology, vol.II, Academic Press, New York;
- Muñoz-Pinedo, C.; Mjiyad, N. E.; Ricci, J-E. (2012) – Cancer metabolism: current perspectives and future directions, *Cell Death and Disease*, 248, 1-10;
- Muthukumar, K.; Rajakumar, S.; Sarkar, M. N.; Nachiappan, V. (2011) – Glutathione peroxidase3 of *Saccharomyces cerevisiae* protects phospholipids during cadmium-induced oxidative stress, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99, 761-771;

- Neiman, A. M. (2005) – Ascospore formation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69, 565-584
- Niki, E. (2009) – Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects, *Free Radical Biology & Medicine*, 47, 469-484;
- Oberley, L. W.; Spitz, D. R. (1984) – Assay of SOD activity in tumor tissue, *Methods in Enzymology*, 105, 457-464;
- Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. (1979) – Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Analytical Biochemistry*, 95, 351-358;
- Pacitti, D.; Wang, T.; Page, M. M.; Martin, S. A. M.; Sweetman, J.; Feldmann, J.; Secombes, C. J. (2013) – Characterization of cytosolic glutathione peroxidase and phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their modulation by *in vitro* selenium exposure, *Aquatic Toxicology*, 130-131, 97-111;
- Padma, V. V.; Sowmya, P.; Felix, T. A.; Baskaran, R.; Poornima, P. (2011) – Protective effects of gallic acid against lindane induced toxicity in experimental rats, *Food and Chemical Toxicology*, 49, 991-998;
- Parveen, M.; Momose, Y.; Kitagawa, E.; Kurita, S.; Kodama, O.; Iwahashi, H. (2003) – Bioassay of pesticide lindane using yeast-DNA microarray technology, *Chem-Bio Informatics Journal*, 3, 12-29;
- Patra, K. C.; Hay, N. (2014) – The pentose phosphate pathway and cancer, *Trends in Biochemical Sciences*, 39, 347-354;
- Perrone, G. G.; Tan, S-X.; Dawes, I. W. (2008) – Reactive oxygen species and yeast apoptosis, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783, 1354-1368;
- Postma, E.; Verduyn, C.; Scheffers, W. A.; Dijken, J. P. V. (1989) – Enzymic analysis of the Crabtree Effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 468-477;
- Ramsdale, M. (2012) – Programmed cell death in the cellular differentiation of microbial eukaryotes, *Current Opinion in Microbiology*, 15, 646-652;
- Renvoisé, M.; Bonhomme, L.; Davanture, M.; Valot, B.; Zivy, M.; Lemaire, C. (2014) – Quantitative variations of the mitochondrial proteome and phosphoproteome during fermentative and respiratory growth in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Proteomics*, 106, 140-150;
- Romano, M.; Cerra, M. (1969) – The action of crystalline lactate dehydrogenase from rabbit muscle on glyoxylate, *Biochimica et Biophysica Acta*, 177, 421;
- Rui-Yan, F.; Jian, C.; Yin, L. (2007) – The function of the glutathione/glutathione peroxidase system in the oxidative stress resistance systems of microbial cells, *Chinese Journal of Biotechnology*, 23, 770-775;
- Saradha, B.; Mathur, P.P. (2006) - Induction of oxidative stress by lindane in epididymis of adult male rats, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22, 90-96;
- Saradha, B.; Vaithinathan, S.; Mathur, P.P. (2009) - Lindane induces testicular apoptosis in adult Wistar rats through the involvement of Fas-FasL and mitochondria-dependent pathways, *Toxicology*, 255, 131-139;

Saradha, B.; Vaithinathan, S; Mathur, P. P. (2008) – Single exposure to low dose of lindane causes transient decrease in testicular steroidogenesis in adult male Wistar rats, *Toxicology*, 244, 190-197;

Saravanan, M.; Kumar, K. P.; Ramesh, M. (2011) – Haematological and biochemical responses of freshwater teleost fish *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes) during acute and chronic sublethal exposure to lindane, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100, 206-211;

Sauviat, M.; Godeau, G.; Pages, N. (2007) – Alterations of offspring heart muscle electrical activity transferred by rat male genitors chronically treated with lindane (γ -hexachlorocyclohexane) trace concentrations, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87, 131-137;

Sebollela, A.; Louzada, P. R.; Sola-Penna; M.; Sarone-Williams, V.; Coelho-Sampaio, T.; Ferreira, S. T. (2004) – Inhibition of yeast glutathione reductase by trehalose: possible implications in yeast survival and recovery from stress, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36, 900-908;

Sharma, H.; Zhang, P.; Barber, D. S.; Liu, B. (2010) - Organochlorine pesticides dieldrin and lindane induce cooperative toxicity in dopaminergic neurons: Role of oxidative stress, *NeuroToxicology*, 31, 215–222;

Silva, A.; Nunes, C.; Martins, J.; Dinis, T. C. P.; Lopes, C.; Neves, B.; Cruz, T. (2014) – Respiratory sensitizer hexamethylene diisocyanate inhibits SOD1 and induces ERK-dependent detoxifying and maturation pathways in dendritic-like cells, *Free Radical Biology and Medicine*, 72, 238-246;

Singh, M.; Gupta, S.; Singhal, U.; Pandey, R.; Aggarwal, S. K. (2013) – Evaluation of the oxidative stress in chronic alcoholics, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7, 1568-1571;

Song, J.; Cha, J.; Lee, J.; Roe, J. (2006) – Glutathione Reductase and a Mitochondrial Thioredoxin Play Overlapping Roles in Maintaining Iron-Sulfur Enzymes in Fission Yeast, *Eukaryotic Cell*, 5, 1857–1865;

Szasz, G. (1976) – Reaction-rate method for γ -glutamyl transferase activity in serum, *Clinical Chemistry*, 22, 2051–2055;

Tanaka, T.; Izawa, S.; Inoue, Y. (2005) – *GPX2*, encoding a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homologue, codes for a atypical 2-cys peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Biological Chemistry*, 280, 42078-42087;

Toppo, S.; Flohé, L.; Ursini, F.; Vanin, S.; Maiorino, M. (2009) – Catalytic mechanism and specificities of glutathione peroxidases: Variations of a basic scheme, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790, 1486-1500;

Tuleva, B.; Vasileva-Tonkova, E.; Galabova, D. (1998) – A specific alkaline phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* with protein phosphatase activity, *FEMS Microbiology Letters*, 161, 139-144;

Turton, H. E.; Dawes, I. W.; Grant, C. M. (1997) – *Saccharomyces cerevisiae* exhibits a yAP-1-mediated adaptive response to malondialdehyde, *Journal of Bacteriology*, 179, 1096-1101;

Videla, L. A.; Arisi, A. C. M.; Fuzaro, A. P.; Koch, O. R.; Junqueira, V. B. C. (2000) – prolonged phenobarbital pretreatment abolishes the early oxidative stress component induced in the liver by acute lindane intoxication, *Toxicology Letters*, 115, 45-51;

Vurusaner, B.; Poli, G.; Basaga, H. (2012) – Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions, *Free Radical Biology and Medicine*, 52, 7-18;

Walker, G. M. (1998) – Yeast: Physiology and Biotechnology, 1^a ed., John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, *West Sussex*, England

Walsh, M. E.; Shi, Y.; Remmen, H. V. (2014) – The effects of dietary restriction on oxidative stress in rodents, *Free Radical Biology and Medicine*, 66, 88-99;

WHO (2004) - Lindane in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality, Geneva, *World Health Organization*;

WHO (2004) - The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2004, *World Health Organization*;

Wünschmann, J.; Krajewski, M.; Letzel, T.; Huber, E. M.; Ehrmann, A.; Grill, E. Lenzian, K. J. (2010) – Dissection of glutathione conjugate turnover in yeast, *Phytochemistry*, 71, 54-61;

Zucchini-Pascal, N.; Sousa, G.; Pizzol, J.; Rahmani, R. (2011) – Molecular investigation of the effects of lindane in rat hepatocytes: Microarray and mechanistic studies, *Food and Chemical Toxicology*, 49, 3128-3135;

Zucchini-Pascal, N.; Sousa, G.; Rahmani, R. (2009) - Lindane and cell death: At the crossroads between apoptosis, necrosis and autophagy, *Toxicology*, 256, 32–41.

Anexos

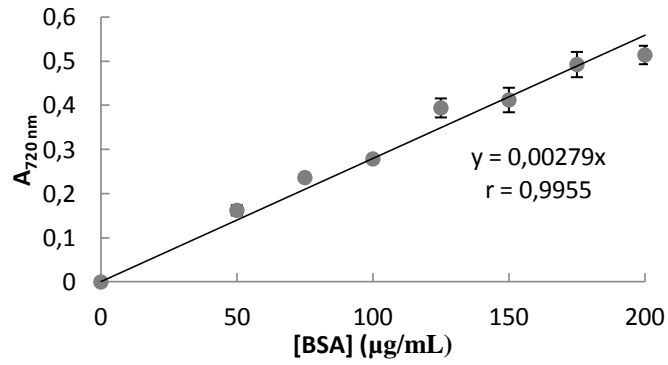


Figura A1 - Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de proteínas, pelo método de Lowry, construída a partir da leitura por absorção molecular de solução padrão (50-200 µg/mL).

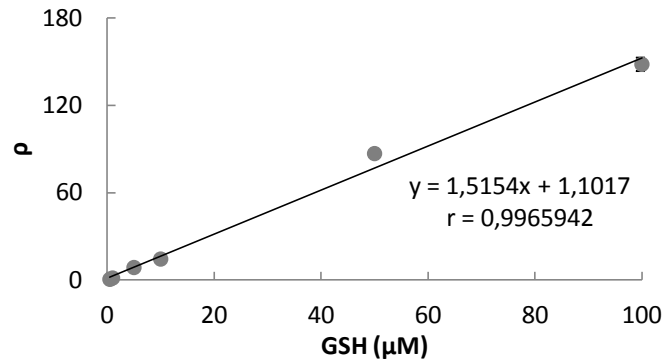


Figura A2 - Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSH, construída a partir da leitura fluorimétrica de solução padrão (1-100 µM).

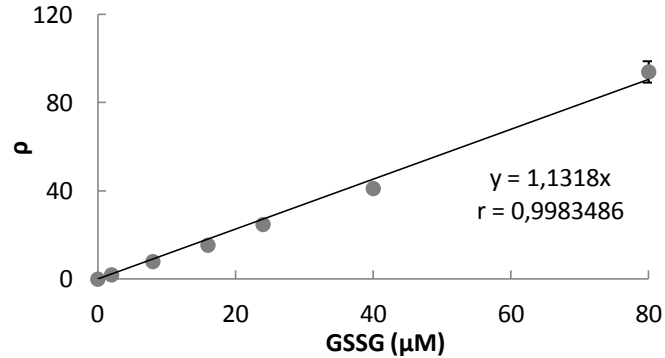


Figura A3 - Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSSG, construída a partir da leitura fluorimétrica de solução padrão (2-80 µM).

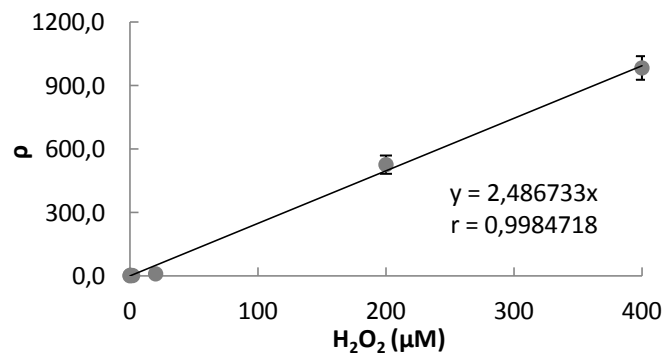


Figura A4 - Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de ROS, construída a partir da leitura fluorimétrica de solução padrão (20-400 µM).

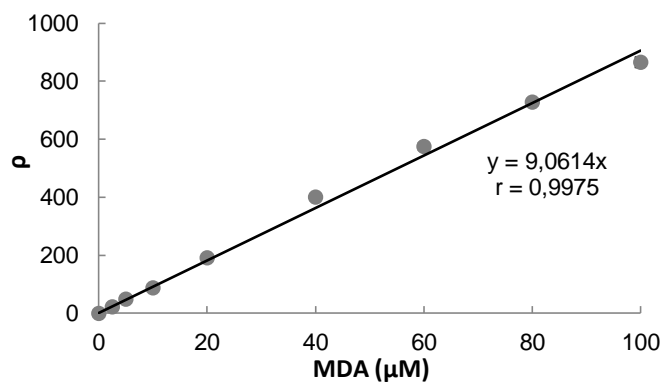


Figura A5 - Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de MDA, construída a partir da leitura fluorimétrica de solução padrão (2,5-100 μM).

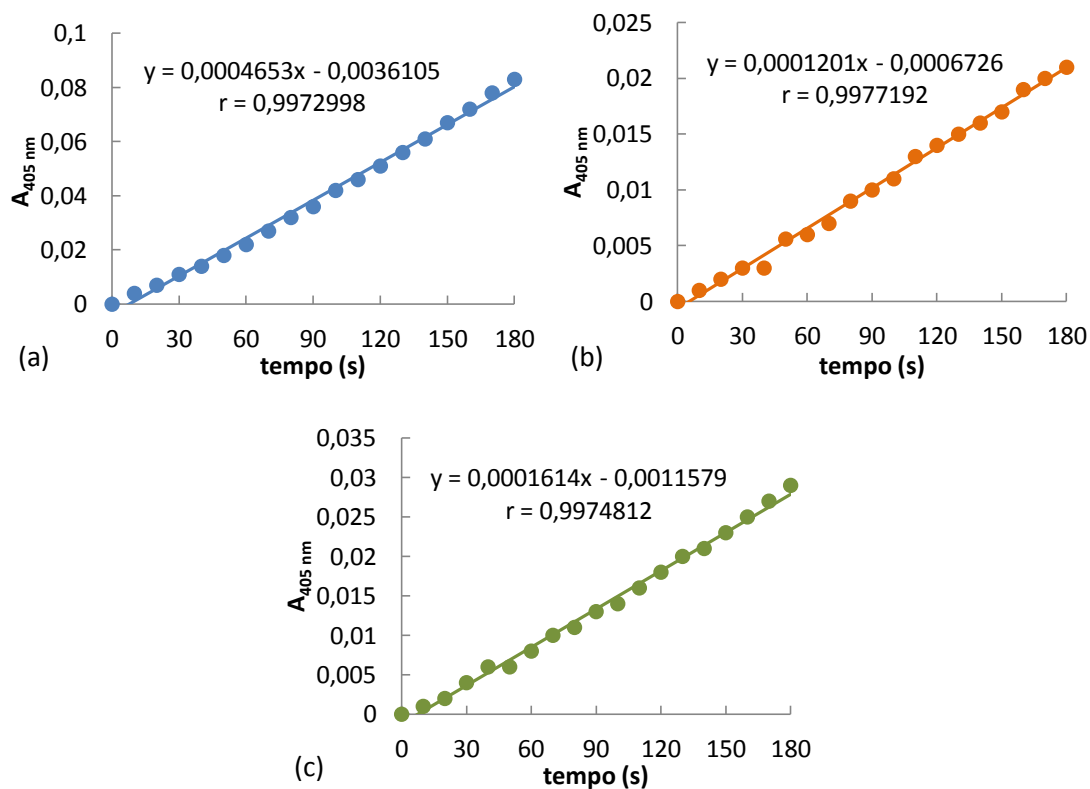


Figura A6 - Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática ALP de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD sem exposição ao lindano (a) e em meio YEP (b) e YED (c) na presença de lindano (5 e 50 μM, respetivamente).

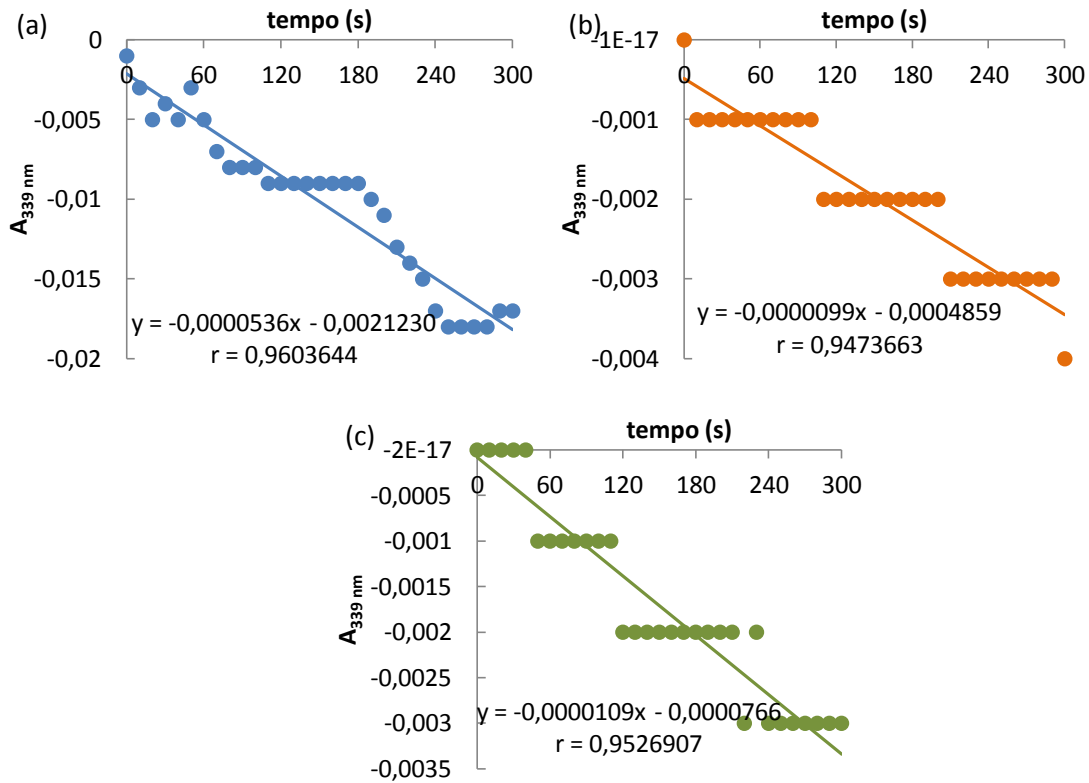


Figura A7 - Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática LDH de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD sem exposição ao lindano (a) e em meio YEP (b) e YED (c) na presença de lindano (5 e 50 µM, respetivamente).

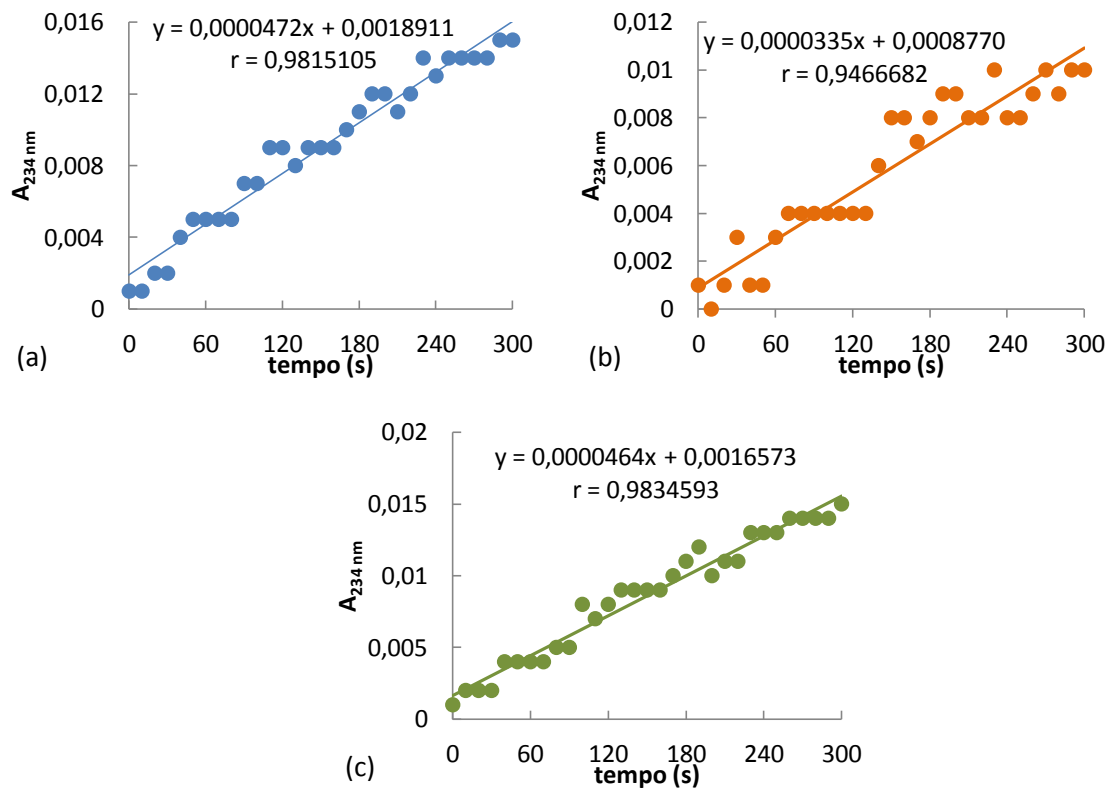


Figura A8 - Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática LOX de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD sem exposição ao lindano (a) e em meio YEP (b) e YED (c) na presença de lindano (5 e 50 µM, respetivamente).

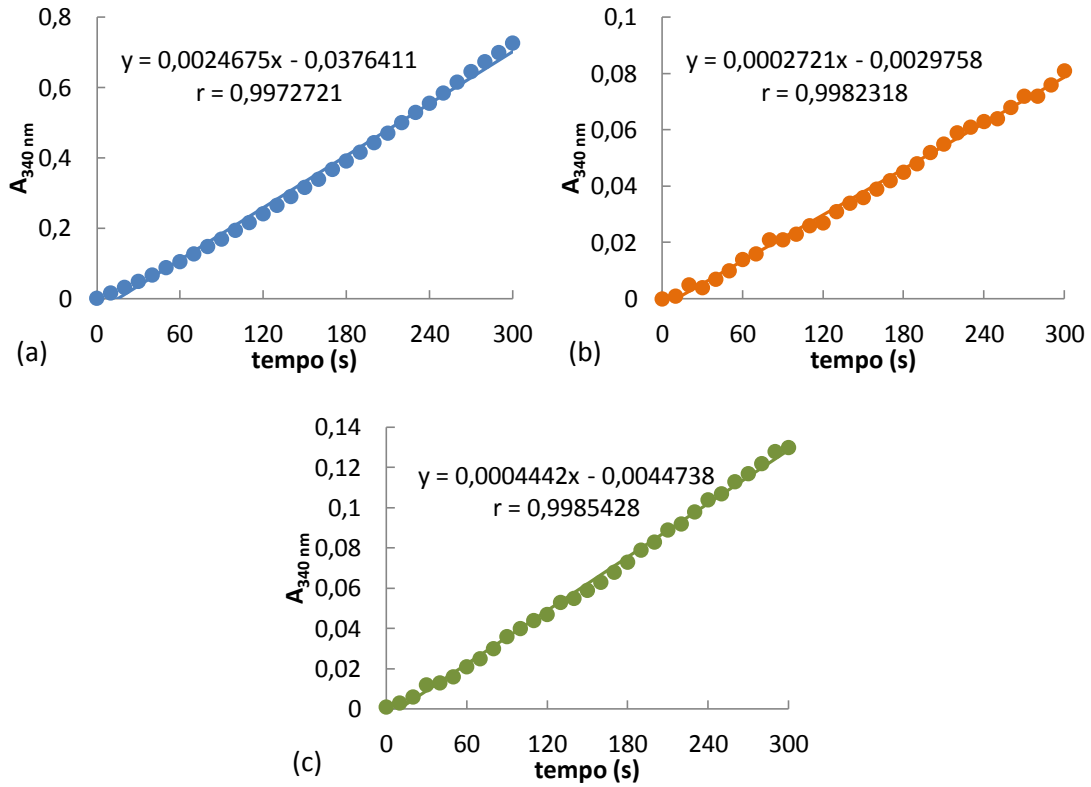


Figura A9 - Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática G6PD de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD sem exposição ao lindano (a) e em meio YEP (b) e YED (c) na presença de lindano (5 e 50 μM, respetivamente).

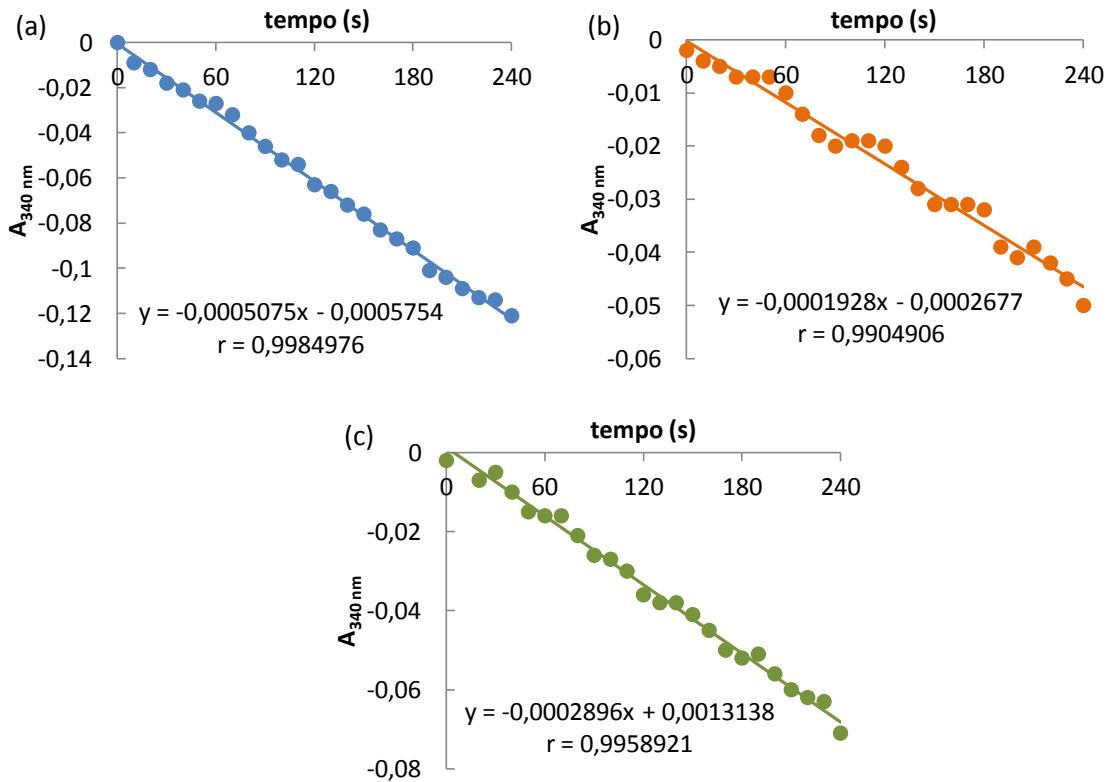


Figura A10 - Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática GR de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD sem exposição ao lindano (a) e em meio YEP (b) e YED (c) na presença de lindano (5 e 50 μM, respetivamente).

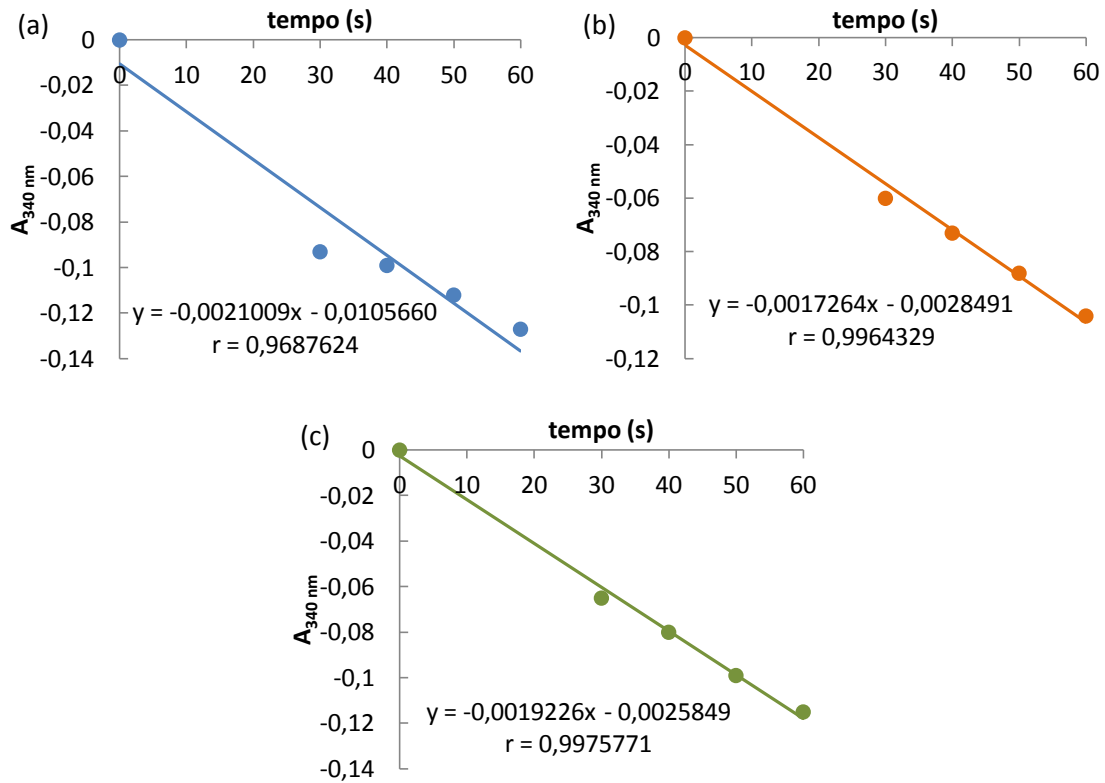


Figura A11 - Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática PHGPx2 (H_2O_2) de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD sem exposição ao lindano (a) e em meio YEP (b) e YED (c) na presença de lindano (5 e 50 μ M, respetivamente).

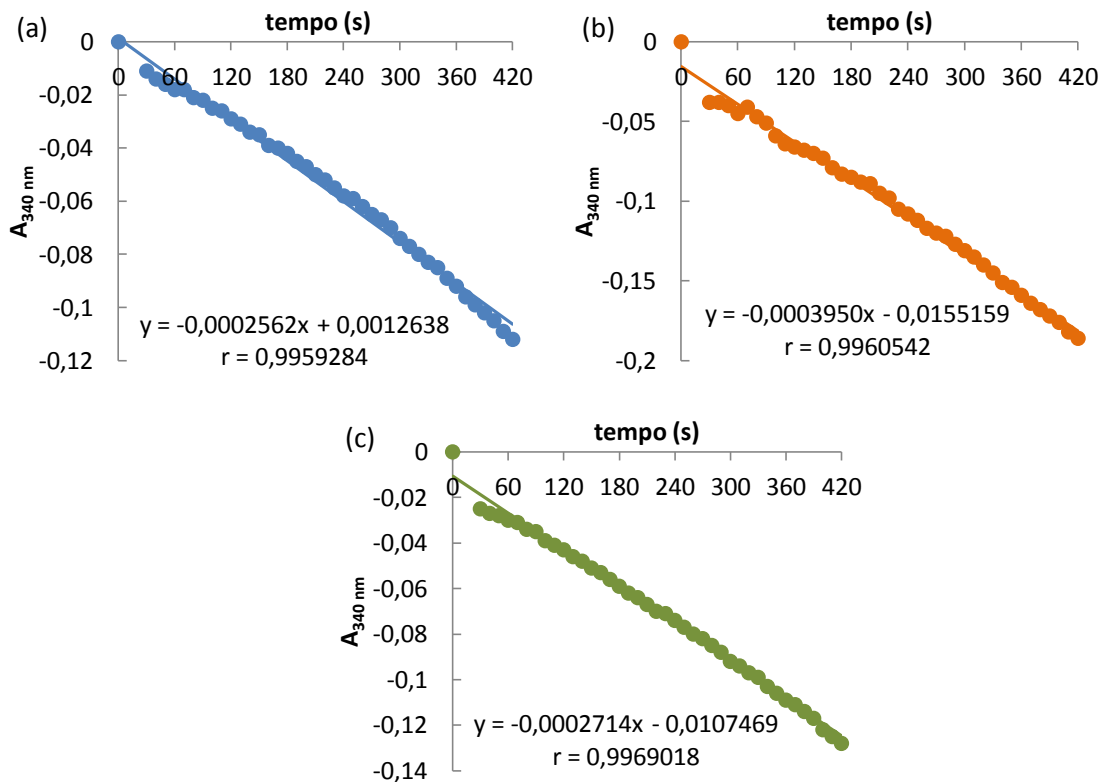


Figura A12 - Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática PHGPx2 (t-BHP) de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD sem exposição ao lindano (a) e em meio YEP (b) e YED (c) na presença de lindano (5 e 50 μ M, respetivamente).

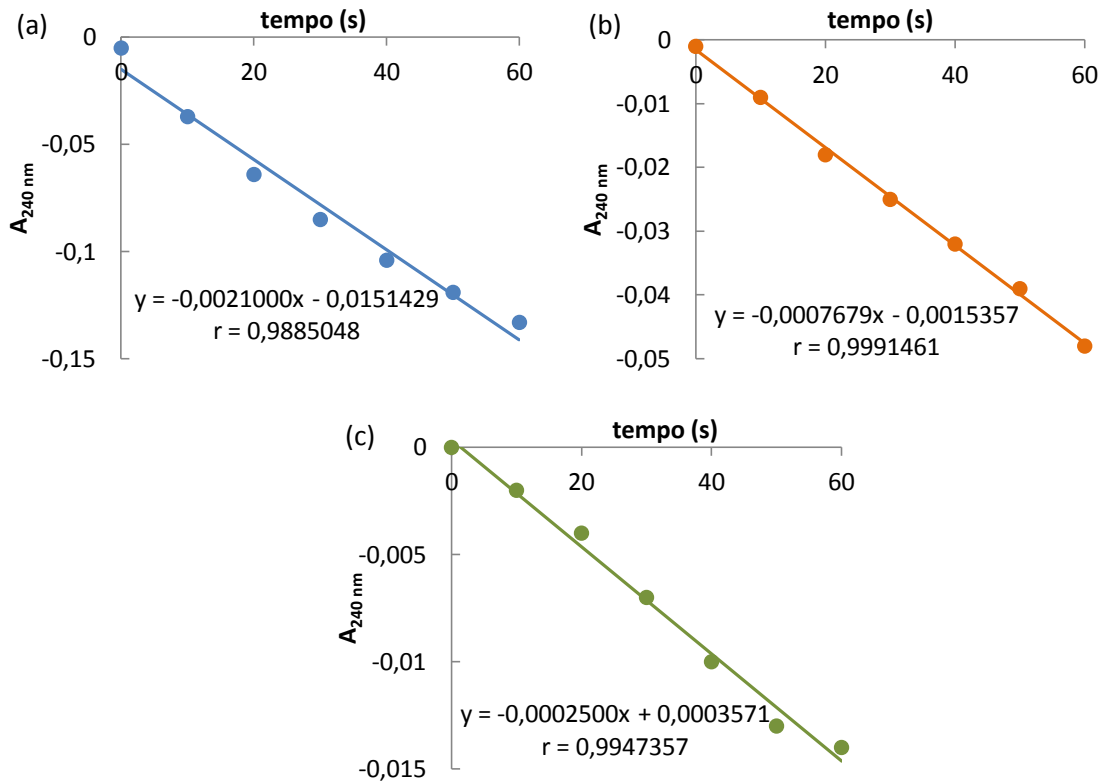


Figura A13 - Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática CTT1 de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD sem exposição ao lindano (a) e em meio YEP (b) e YED (c) na presença de lindano (5 e 50 μM, respetivamente).

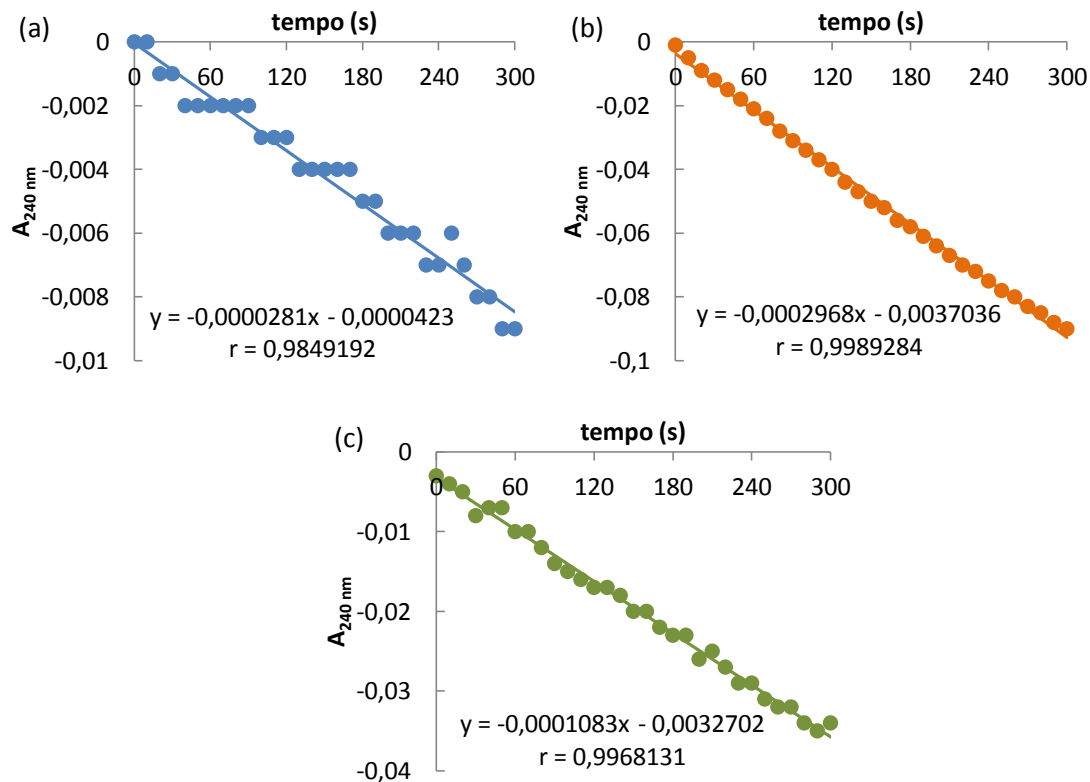


Figura A14 - Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática CTA1 de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD sem exposição ao lindano (a) e em meio YEP (b) e YED (c) na presença de lindano (5 e 50 μM, respetivamente).

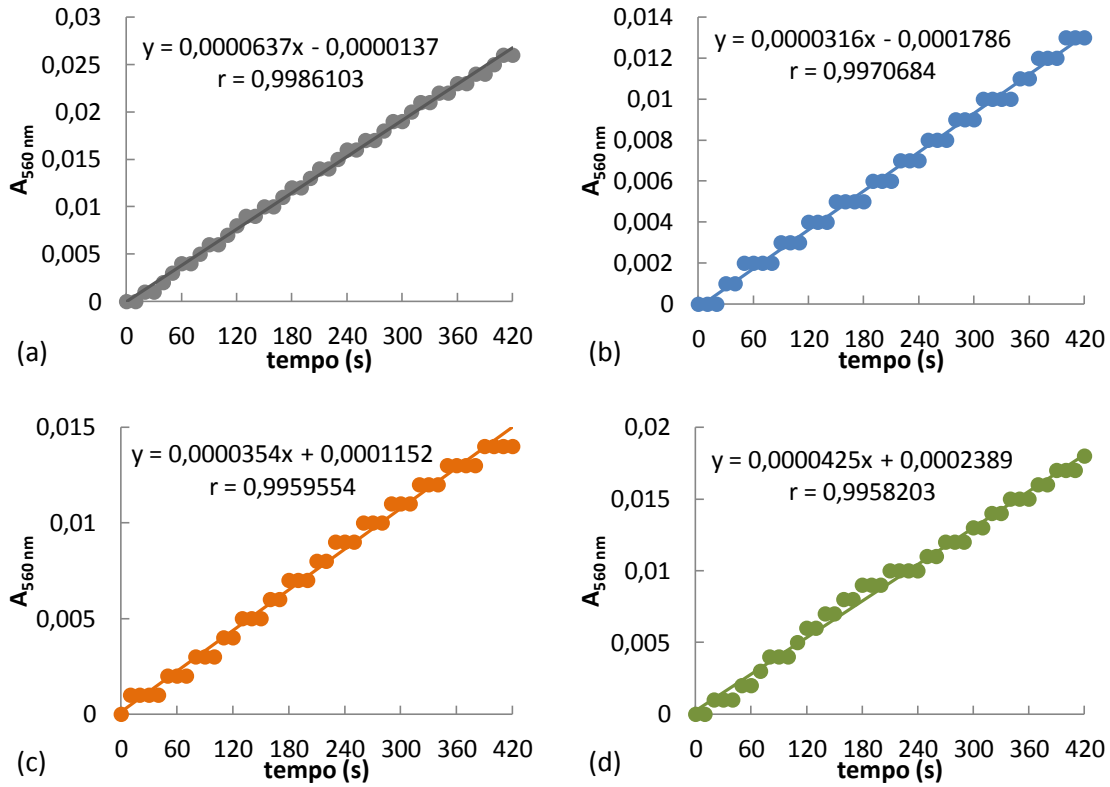


Figura A15 - Representação gráfica da curva de reação do branco (a) e da atividade enzimática SOD de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD sem exposição ao lindano (b) e em meio YEP (c) e YED (d) na presença de lindano (5 e 50 μ M, respetivamente).

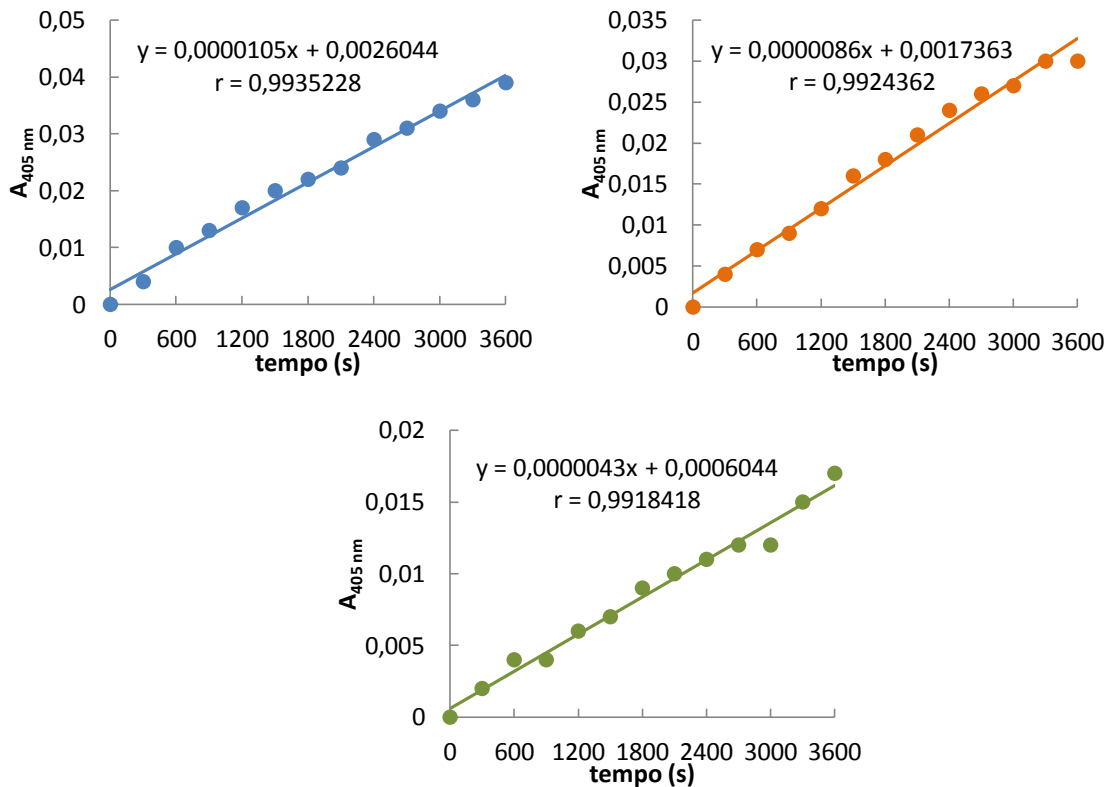


Figura A16 - Representação gráfica da curva de reação da atividade enzimática γ -GT de células de *S. cerevisiae* UE-ME₃ crescidas em meio YEPD sem exposição ao lindano (a) e em meio YEP (b) e YED (c) na presença de lindano (5 e 50 μ M, respetivamente).

Quadro A1 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”)

Conteúdos ou atividade enzimática	Origem de variância	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (99%)
CFUs 72h-0h	Entre grupos	1,824E18	8	2,280E17	288,288	,000
	No interior dos grupos	2,847E16	36	7,907E14		
	Total	1,852E18	44			
Peso Seco	Entre grupos	3143,889	8	392,986	1183,50	,000
	No interior dos grupos	11,953	36	,332		
	Total	3155,842	44			
GSH sobrenadante	Entre grupos	19883,237	8	2485,405	39,484	,000
	No interior dos grupos	2266,071	36	62,946		
	Total	22149,308	44			
GSH sedimento	Entre grupos	8,651	8	1,081	78,391	,000
	No interior dos grupos	,497	36	,014		
	Total	9,148	44			
GSSG sobrenadante	Entre grupos	14883,627	8	1860,453	307,628	,000
	No interior dos grupos	217,718	36	6,048		
	Total	15101,345	44			
GSSG sedimento	Entre grupos	68,331,	8	8,541	457,314	,000
	No interior dos grupos	,672	36	,019		
	Total	69,003	44			
GSH+GSSG sobrenadante	Entre grupos	56962,180	8	7120,272	34,674	,000
	No interior dos grupos	7392,480	36	205,347		
	Total	64354,660	44			
GSH+GSSG sedimento	Entre grupos	115,528	8	14,441	197,080	,000
	No interior dos grupos	2,638	36	,073		
	Total	118,166	44			
GSH/GSSG sobrenadante	Entre grupos	,466	8	,058	27,695	,000
	No interior dos grupos	,076	36	,002		
	Total	,541	44			
GSH/GSSG sedimento	Entre grupos	,367	8	,046	95,785	,000
	No interior dos grupos	,017	36	,000		
	Total	,384	44			
ROS sobrenadante	Entre grupos	912019,091	8	114002,386	1095,825	,000
	No interior dos grupos	3745,202	36	104,033		
	Total	915764,293	44			
ROS sedimento	Entre grupos	224,869	8	28,109	90,934	,000
	No interior dos grupos	11,128	36	,309		
	Total	235,997	44			
MDA sobrenadante	Entre grupos	67,185	8	8,398	98,570	,000
	No interior dos grupos	3,067	36	,085		
	Total	70,252	44			
MDA sedimento	Entre grupos	116,931	8	14,616	261,766	,000
	No interior dos grupos	2,010	36	,056		
	Total	118,941	44			
ALP	Entre grupos	586,680	8	73,335	336,499	,000
	No interior dos grupos	7,846	36	,218		
	Total	594,526	44			
LDH	Entre grupos	593,411	8	74,176	289,781	,000
	No interior dos grupos	9,215	36	,256		
	Total	602,626	44			
LOX	Entre grupos	64,928	8	8,116	252,959	,000
	No interior dos grupos	1,155	36	,032		
	Total	66,083	44			
G6PD	Entre grupos	499909,966	8	62488,746	233,487	,000
	No interior dos grupos	9634,789	36	267,633		
	Total	509544,755	44			
GR	Entre grupos	15303,880	8	1912,985	461,299	,000
	No interior dos grupos	149,290	36	4,147		
	Total	15453,170	44			
PHGPx2 (H ₂ O ₂)	Entre grupos	11722042,46	8	1465255,308	946,025	,000
	No interior dos grupos	55758,749	36	1548,854		
	Total	11777801,211	44			
PHGPx2 (t-BHP)	Entre grupos	643595,381	8	80449,423	238,876	,000
	No interior dos grupos	12124,191	36	336,783		
	Total	655719,572	44			
CTT1	Entre grupos	100473,866	8	12559,233	717,990	,000
	No interior dos grupos	629,720	36	17,492		
	Total	101103,586	44			
CTA1	Entre grupos	26538,590	8	3317,324	769,476	,000
	No interior dos grupos	115,201	36	4,311		
	Total	26693,792	44			
SOD1	Entre grupos	3637,771	8	454,721	214,785	,000
	No interior dos grupos	76,216	36	2,117		
	Total	3713,987	44			
γ-GT	Entre grupos	14,923	8	1,865	133,472	,000
	No interior dos grupos	,503	36	,014		
	Total	15,426	44			