



**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**Caracterização funcional da microalga extremófila *Coccomyxa* sp.**

**Pedro Emídio Brás**

Dissertação para a obtenção do grau de mestre em:

**Biologia Molecular e Microbiana**

Trabalho efetuado sob a orientação de:

**Professor Dr. Juan Fuentes**

**Professora Dr.<sup>a</sup> Filomena Fonseca**

**2015**

# **Caracterização funcional da microalga extremófila *Coccomyxa* sp.**

## **Declaração de Autoria do Trabalho**

**Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.**

**Pedro Emídio Brás**

.....

**(assinatura)**

## **Direitos de cópia ou Copyright**

**© Copyright: Pedro Emídio Brás. All Rights Reserved.**

**Após publicação do seu conteúdo em revistas da especialidade e de acordo com o ponto 4.2 do Anexo II a que se refere o ponto 2 do artigo 18º do Regulamento nº 287/2021 publicado em Diário da República, a 24 de Julho de 2012: “A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”**

## Agradecimentos

Em primeiro lugar agradecer aos meus pais por todo o apoio e por terem sempre acreditado em mim, sem eles nada disto seria possível.

Um muito obrigado à Rita pela ajuda, apoio e por ter estado sempre presente quando precisei.

Agradeço aos meus orientadores a Professora Doutora Filomena Fonseca e ao Professor Doutor Juan Fuentes pela paciência que sempre tiveram e pela disponibilidade em me auxiliar sempre que precisei.

Um agradecimento ao pessoal do lab. 1.73, em especial às minhas colegas Rita e Vilma, pela ajuda, pelo incentivo e pelos bons momentos que tornaram os dias menos bons em dias melhores.

Agradeço ao pessoal do lab 3.32 por estarem sempre dispostos a ajudar, deixando um muito obrigado à Sílvia pela disponibilidade para ajudar no que fosse preciso e ao Nacho pela ajuda e por ter tratado bem dos *Fundulus*.

Obrigado a todos os meus colegas e amigos, com quem passei bons momentos e que participaram nesta jornada.

Por último mas não menos importante, deixar um agradecimento a todos os meus professores que contribuíram para que conseguisse chegar a este momento.

O presente trabalho foi parcialmente financiado pelo projeto PTDC/MAR-BIO/3811/2012 da Fundação para a Ciência e a Tecnologia Portugal.

## Resumo

As microalgas têm sido alvo de grande estudo devido ao seu potencial como fonte de novos compostos de interesse para a biotecnologia e também para compreender a sua sobrevivência em locais extremos. A microalga *Coccomyxa* sp., estudada neste trabalho, é um poliextremófilo que foi isolado das águas ácidas da mina de S. Domingos. Este ambiente é caracterizado pelos valores baixos de pH (< 3) e a elevada concentração de íons metálicos, como o cobre e o ferro. Os principais objetivos deste trabalho foram: i) analisar as alterações metabólicas (tamanho e crescimento celulares e produção de pigmentos), ii) identificar e quantificar alterações de perfil de expressão genética em diferentes condições e iii) avaliar a potencial bioatividade num modelo animal *ex-vivo* de extratos celulares de culturas daquela microalga a diferentes pH, sem ou com exposição a cobre (0,6 mM). Quando expostas aos diferentes tratamentos as células de *Coccomyxa* sp. apresentaram três equilíbrios dinâmicos (pH 7, pH 7 exposto a cobre e pH 2,5). Pelos resultados do Real-Time PCR e pela produção de pigmentos (clorofila e carotenoides), o pH 7 demonstra ser o ambiente preferido da microalga. Os extratos de *Coccomyxa* sp., de culturas a pH 7 expostas a cobre, demonstram um grande potencial para serem utilizados como inibidores do NKCC presente no epitélio, revelando o seu potencial uso como diuréticos. *Coccomyxa* sp. apresenta ser uma fonte fiável de pigmentos e de extratos celulares com um grande potencial para serem usados na indústria biotecnológica e farmacêutica.

**Palavras-chave:** *Coccomyxa* sp., microalga, poliextremófilo, pigmentos, extratos

## **Abstract**

Microalgae have been studied because of their great potential as a source of new compounds with important value for biotechnology and to understand their survival in extreme environments. The microalgae *Coccomyxa* sp., studied in this work, is a polyextremophile which was isolated from the acid mine drainage of S. Domingo mine. This environment is characterized by low pH (< 3) and high concentrations of metals, such as copper and iron. The main goals of the present work were to: i) analyze the metabolic changes (cellular size, growth and pigment production), ii) identify and quantify changes in genetic expression profiles in response to different conditions and iii) evaluate the potential bioactivity in an *ex-vivo* animal model of cellular extracts obtained from cultures at different pH without or with exposure to copper (0,6 mM). When exposed to different treatments, *Coccomyxa* sp. cells show three dynamic balances (pH 7, pH 7 exposed to copper, pH 2,5). Real-Time PCR results and highest pigments production (chlorophyll and carotenoids) suggest that pH 7 is the favorite environment for this microalga. The extracts of *Coccomyxa* sp. when cultured at pH 7 and exposed to copper show a great potential to be used as epithelial NKCC inhibitors, revealing their potential use as diuretics. *Coccomyxa* sp. could be a good source of pigments and cellular extracts with a great potential to be used in pharmaceutical and biotechnology industries.

**Keywords:** *Coccomyxa* sp., microalgae, polyextremophile, pigments, extracts

## Índice geral

<b>Índice de Figuras</b>	<b>ix</b>
<b>Índice de Tabelas</b>	<b>xvii</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b>	<b>xix</b>
<b>Lista de significados</b>	<b>xxi</b>
<b>I. Introdução</b>	<b>1</b>
<b>1. Extremófilos</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Classificação</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Aplicação biotecnológica</b>	<b>1</b>
<b>2. Microalgas</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Adaptação a pH baixo e elevadas concentrações de metais</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Bioensaios</b>	<b>4</b>
<b>2.3. <i>Coccomyxa</i> sp.</b>	<b>4</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>5</b>
<b>II. Caracterização das alterações metabólicas provocadas por diferentes condições de cultivo</b>	<b>6</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>6</b>
<b>2. Metodologia</b>	<b>7</b>
<b>2.1. Culturas de <i>Coccomyxa</i> sp.</b>	<b>7</b>
<b>2.2. Concentrações celulares</b>	<b>9</b>
<b>2.3. Precipitação celular</b>	<b>10</b>
<b>2.4. Extração de pigmentos</b>	<b>10</b>
<b>2.5. Análise estatística</b>	<b>11</b>
<b>3. Resultados</b>	<b>11</b>
<b>3.1. Concentrações celulares</b>	<b>11</b>
<b>3.2. Tamanhos celulares</b>	<b>12</b>
<b>3.3. Clorofila</b>	<b>13</b>
<b>3.4. Carotenoides</b>	<b>14</b>
<b>3.5. Razão carotenoides/clorofila</b>	<b>15</b>
<b>4. Discussão</b>	<b>16</b>

<b>III. Identificação e quantificação das alterações do perfil de expressão genética provocadas pelas diferentes condições de cultivo</b>	<b>19</b>
1. Introdução	19
2. Metodologia	21
2.1. Extração de RNA	21
2.2. Quantificação de ácidos nucleicos	22
2.3. Detecção de genes diferencialmente expressos (DEGs)	22
2.3.1. Síntese de cDNA	22
2.3.2. Detecção de DEGs	22
2.3.3. Extração e purificação de bandas	23
2.4. Ligação e clonagem	23
2.4.1. PCR de colónias	23
2.4.2. Extração do pDNA	24
2.5. Sequenciação	25
2.6. Análise de Sequências	25
2.6.1. Análise comparativa	25
2.7. Desenho e teste de primers para quantificação por Real-Time PCR	25
2.7.1. Síntese de cDNA	26
2.7.2. PCR	26
2.7.3. Clonagem, extração de pDNA e sequenciação	27
2.8. Real-Time PCR	27
2.9. Análise estatística	28
3. Resultados	29
3.1. RNA	29
3.2. Genes diferencialmente expressos (DEGs)	30
3.3. Sequências dos DEGs	31
3.4. Real-Time PCR	36
3.4.1. Genes de referência	37
3.4.2. Genes de interesse	39
4. Discussão	42

<b>IV. Avaliação da potencial a atividade biológica de extratos celulares provenientes das diferentes condições de cultivo num modelo epitelial animal <i>ex-vivo</i></b>	<b>44</b>
1. Introdução	44
2. Metodologia	45
2.1. <i>Fundulus heteroclitus</i>	45
2.2. Câmaras de Ussing	45
2.3. Corrente de curto-circuito	46
2.4. Ensaio de bioatividade	47
2.5. Recolha e análise de dados	47
3. Resultados	48
3.1. Valores basais	48
3.2. Efeito de extratos celulares, em solução salina sem Cl <sup>-</sup> , no epitélio opercular de <i>Fundulus heteroclitus</i> (lado basolateral)	49
3.3. Efeito de extratos celulares, em solução salina com Cl <sup>-</sup> , no epitélio opercular de <i>Fundulus heteroclitus</i> (lado apical)	52
3.4. Efeito de extratos celulares, em solução salina com iões Cl <sup>-</sup> , no epitélio opercular de <i>Fundulus heteroclitus</i> (lado basolateral)	53
3.4.1. Efeito de extratos das culturas de <i>Coccomyxa</i> sp. a pH 7 e a pH 2,5	53
3.4.2. Efeito de extratos das culturas de <i>Coccomyxa</i> sp. a pH 7 e pH 2,5 expostas a cobre	58
3.4.3. Comparação entre os efeitos dos extratos dos diferentes tratamentos	63
3.5. Efeito de solução de cobre no epitélio opercular de <i>Fundulus heteroclitus</i>	65
3.6. Recuperação do epitélio opercular	66
4. Discussão	69
<b>V. Discussão geral</b>	<b>72</b>
<b>VI. Conclusões</b>	<b>74</b>
<b>VII. Referências Bibliográficas</b>	<b>75</b>

## Índice de figuras

**Ressalva:** Neste trabalho a vírgula (,) foi adotada como o separador de casa decimais, excetuando o caso de alguns eixos de gráficos em que o separador é o ponto (.), uma vez que o software utilizado não permite a alteração deste parâmetro.

Figura 1 – Esquema do ensaio. t(0) representa tempo inicial e t(7) representa tempo final de sete dias 8

Figura 2 – Representação de uma câmara de Burker. A câmara encontra-se dividida em 9 quadrados grandes (com 1 mm de largura cada) que por sua vez estão divididos em 16 quadrados mais pequenos (0,2 mm de largura cada um). Os quadrados grandes estão separados entre eles por 3 linhas com 0,025 mm de largura e os quadrados pequenos estão separados entre eles por duas linhas de 0,05 mm de largura. Para realizar as contagens utilizaram-se os quadrados assinalados a preto. Adaptado do website [www.rogosampaic.com/Cellule-a-numeration-Burker](http://www.rogosampaic.com/Cellule-a-numeration-Burker) (24/08/15). 9

Figura 3 – Fotografias de *Coccomyxa* sp. tiradas com a objetiva de 20x sem (A) e com (B) filtro de fluorescência (515 a 565 nm). 10

Figura 4 – Concentrações celulares – % em relação ao valor inicial em função do tempo (dias) e o respetivo teste estatístico two-way ANOVA. t(0) representa o tempo inicial da experiência; t(7) representa o tempo final da experiência (7 dias); - Cu<sup>2+</sup> representa tratamentos que não foram expostos a solução de cobre; +Cu<sup>2+</sup> representa tratamentos expostos a solução de cobre e n representa o número de replicados. No teste ANOVA os parâmetros representados são o pH, o cobre (Cu<sup>2+</sup>) e a interação entre pH e Cu<sup>2+</sup>. 12

Figura 5 – Frequência relativa (%) em função da classe de tamanho celular. O ponto médio de cada classe de tamanho foi obtido através dos seguintes parâmetros: “bin range” de 0,25 µm e “bin width” de 0,5 µm (Prism 5). 13

Figura 6 – Produção de clorofila ( $\mu\text{g}/10^6\text{células}$ ) nos diferentes tratamentos e o respectivo teste estatístico two-way ANOVA.  $-\text{Cu}^{2+}$  representa os tratamentos em que as células de *Coccomyxa* sp. não foram expostas a cobre,  $+\text{Cu}^{2+}$  representa os tratamentos em que as células da microalga foram expostas a cobre e n representa o número de replicados. No teste ANOVA os parâmetros representados são o pH, o cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e a interação entre pH e  $\text{Cu}^{2+}$ .

14

Figura 7 – Acumulação de carotenoides ( $\mu\text{g}/10^6\text{células}$ ) nos diferentes tratamentos e o respectivo teste estatístico two-way ANOVA. Em que  $-\text{Cu}^{2+}$  representa os tratamentos em que as células de *Coccomyxa* sp. não foram expostas a cobre,  $+\text{Cu}^{2+}$  representa os tratamentos em que as células da microalga foram expostas a cobre e n representa o número de replicados. No teste ANOVA os parâmetros representados são o pH, o cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e a interação entre pH e  $\text{Cu}^{2+}$ .

15

Figura 8 – Razão carotenoides/clorofila para os diferentes tratamentos e o respectivo teste estatístico two-way ANOVA.  $-\text{Cu}^{2+}$  representa os tratamentos em que as células de *Coccomyxa* sp. não foram expostas a cobre,  $+\text{Cu}^{2+}$  representa os tratamentos em que as células da microalga foram expostas a cobre e n representa o número de replicados. No teste ANOVA os parâmetros representados são o pH, o cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e a interação entre pH e  $\text{Cu}^{2+}$ .

16

Figura 9 – Esquema da tecnologia ACP. Para a síntese da primeira cadeia de cDNA pela retrotranscriptase (RT) é utilizado o dT-ACP 1 (1 e 2). A temperatura de annealing no primeiro passo de PCR é  $50^\circ\text{C}$ . Esta temperatura é alta o suficiente para prevenir a ligação do dT-ACP 2 (3a) e para permitir a ligação de 8 a 10 pares de base (pb) do ACP aleatório à primeira cadeia do cDNA (3b). A segunda cadeia do cDNA é sintetizada em apenas um ciclo (4). São realizados 35 a 40 ciclos de PCR à temperatura de  $65^\circ\text{C}$  para amplificar a segunda cadeia do cDNA. Este procedimento é restrito o suficiente para prevenir o annealing das sequências e para permitir a ligação das sequências universais entre si. Com a temperatura de annealing a  $65^\circ\text{C}$ , o ACP aleatório e o dT-ACP 2 não se conseguem ligar à primeira cadeia de cDNA (5a). A segunda cadeia de cDNA é amplificada pela ligação do ACP aleatório e do dT-ACP 2 à extremidade 3' e 5', respectivamente (5b). Apenas

20

os produtos de PCR específicos são amplificados (6). Esquema adaptado do protocolo de GeneFishing™ DEG Premix Kit da SeeGene (Ogeum-ro, Songpa-gu, Seul, Coreia).

Figura 10 – Qualidade e quantidade de RNA extraído para os quatro tratamentos (pH 7 e pH 2,5 com e sem  $\text{Cu}^{2+}$ ). Razão 260/280 (A) e concentração de RNA (B) em função dos tratamentos. - $\text{Cu}^{2+}$  representa os tratamentos em que as células de *Coccomyxa* sp. não foram expostas a cobre, + $\text{Cu}^{2+}$  representa os tratamentos em que as células da microalga foram expostas a cobre e n representa o número de replicados. 29

Figura 11 – Exemplo de bandas diferenciais (assinaladas na figura) visualizadas após eletroforese em gel de agarose. M representa o marcador (100bp Plus, Fermentas)  $\text{Cu}^{2+}$  indica culturas de *Coccomyxa* sp. expostas a cobre. 30

Figura 12 – Exemplo de eletroforese em gel de agarose de colónias (A) e de restrição de pDNA (B). M representa o marcador (100bp Plus, FERmentas), C indica o produto de amplificação obtido de cada colónia (1-7 no exemplo), ND representa o resultado da extração do pDNA de duas colónias e D inidca o resultado da restrição do pDNA, para verificação do fragmento digerido. 32

Figura 13 – Real-Time PCR (A) em que ■ representam os pontos da reta padrão e ■ representam os pontos do gene 18S2 para os diferentes tratamentos. Expressão do gene 18S2 (B) nos diferentes tratamentos, obtida através da regressão estabelecida entre os ciclos (Cts) e as concentrações das diluições das minipreps.  $\text{Cu}^{2+}$  representa os tratamentos em que as células foram expostas a cobre. 38

Figura 14 – Real-Time PCR (A) em que ■ representam os pontos da reta padrão e ■ representam os pontos do gene NAD5 para os diferentes tratamentos. Expressão do gene NAD5 (B) nos diferentes tratamentos obtida através da regressão estabelecida entre os ciclos (Cts) e as concentrações das diluições das minipreps.  $\text{Cu}^{2+}$  representa os tratamentos em que as células foram expostas a cobre. 39

Figura 15 – Expressão relativa dos genes 4-6-13BH (A) e 77B (B) nos diferentes tratamentos.  $\text{Cu}^{2+}$  representa os tratamentos em que as células foram expostas a cobre e ND representa os genes cuja expressão não foi detetada em Real-Time PCR. 40

Figura 16 – Expressão relativa dos genes 95BC (A) e 71A (B) nos vários tratamentos.  $\text{Cu}^{2+}$  representa os tratamentos em que as células foram expostas a cobre e ND representa os genes cuja expressão não foi detetada em Real-Time PCR. 41

Figura 17 – Exemplos de inserts (A) utilizados em câmaras de Ussing (B). Adaptado do website [www.warneronline.com/product\\_info.cfm?id=550](http://www.warneronline.com/product_info.cfm?id=550) (02/09/15). 46

Figura 18 – Variação na corrente de curto-circuito ( $\Delta\text{Isc}$ ,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) (A) e diferença de resistência epitelial ( $\Delta\text{Rt}$ ,  $\Omega.\text{cm}^2$ ) (B) em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. de pH 7 e pH 2,5 com  $10^6$  (pH 7/ $10^6$  e pH 2,5/ $10^6$ ) e  $10^7$  (pH 7/ $10^7$  e pH 2,5/ $10^7$ ) de células/ml aplicados no lado basolateral do epitélio em solução salina sem  $\text{Cl}^-$ . 50

Figura 19 – Variação na corrente de curto-circuito ( $\Delta\text{Isc}$ ,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) (A) e diferença de resistência epitelial ( $\Delta\text{Rt}$ ,  $\Omega.\text{cm}^2$ ) (B) em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. de pH 7 e pH 2,5, expostos a  $\text{Cu}^{2+}$  (0,6 mM), com  $10^6$  (pH 7/ $10^6$  e pH 2,5/ $10^6$ ) e  $10^7$  (pH 7/ $10^7$  e pH 2,5/ $10^7$ ) de células/ml aplicados no lado basolateral do epitélio em solução salina sem  $\text{Cl}^-$ . 50

Figura 20 – Variação na corrente de curto-circuito ( $\Delta\text{Isc}$ ,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) (A) e variação de resistência epitelial ( $\Delta\text{Rt}$ ,  $\Omega.\text{cm}^2$ ) (B) em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. de diferentes condições de cultivo aplicados no lado basolateral do epitélio opercular em solução salina sem  $\text{Cl}^-$ . Respetivas tabelas com os valores obtidos através do teste estatístico two-way ANOVA, considerando como fatores principais o pH de cultura, a presença de  $\text{Cu}^{2+}$  e a interação entre pH e  $\text{Cu}^{2+}$ . 51

Figura 21 – Registo original de corrente de curto-circuito ( $I_{sc}$ ,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. aplicados no lado apical do epitélio opercular: A- extrato de cultura a pH 7; B – extrato de cultura a pH 2,5. O diurético bumetanide (100  $\mu\text{M}$ ) foi aplicado posteriormente no lado basolateral para demonstrar a existência de corrente de  $\text{Cl}^-$  na direção basolateral para apical. As barras verticais de corrente em períodos regulares correspondem a pulsos de voltagem de 1 mV e são utilizados para o cálculo de resistência epitelial ( $R_t$ ,  $\Omega.\text{cm}^2$ ) usando a lei de Ohm. 52

Figura 22 – Variação na corrente de curto-circuito ( $\Delta I_{sc}$ ,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) (A) e na resistência epitelial ( $\Delta R_t$ ,  $\Omega.\text{cm}^2$ ) (B) em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. a pH 7 e pH 2,5 com  $10^7$  (pH 7/ $10^7$  e pH 2,5/ $10^7$ ) de células/ml aplicados no lado apical do epitélio. 53

Figura 23 – Registo original de corrente de curto-circuito ( $I_{sc}$ ,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. aplicados no lado basolateral do epitélio opercular: A – extrato de cultura a pH 7; B – extrato de cultura a pH 2,5. O diurético bumetanide (100  $\mu\text{M}$ ) foi aplicado posteriormente no lado basolateral para demonstrar a existência de corrente de  $\text{Cl}^-$  na direção basolateral para apical. As barras verticais de corrente em períodos regulares correspondem a pulsos de voltagem de 1 mV e são utilizados para o cálculo de resistência epitelial ( $R_t$ ,  $\Omega.\text{cm}^2$ ) usando a lei de Ohm. 54

Figura 24 – Variação na corrente de curto-circuito ( $\Delta I_{sc}$ ,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) (A) e na resistência epitelial ( $\Delta R_t$ ,  $\Omega.\text{cm}^2$ ) (B) em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. a pH 7 e pH 2,5 com  $10^6$  (pH 7/ $10^6$  e pH 2,5/ $10^6$ ) e  $10^7$  (pH 7/ $10^7$  e pH 2,5/ $10^7$ ) de células/ml aplicados no lado basolateral do epitélio. 55

Figura 25 – Variação percentual de corrente de curto-circuito em relação ao respectivo controlo em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. aplicados no lado basolateral do epitélio opercular: A – extrato de cultura a pH 7; B – extrato de cultura a pH 2,5; C – comparação da percentagem de corrente aos 95 minutos (t-test). 56

Figura 26 – Variação percentual de resistência epitelial em relação ao respectivo controlo em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. aplicados no lado basolateral do epitélio opercular: A- extrato de cultura a pH 7; B – extrato de cultura a pH 2,5; C – comparação da percentagem de resistência aos 95 minutos (t-test). 57

Figura 27 – Registo original de corrente de curto-circuito ( $I_{sc}$ ,  $\mu A/cm^2$ ) em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. aplicados no lado basolateral do epitélio opercular: A – extrato de cultura a pH 7 exposta a  $Cu^{2+}$  (0,6 mM); B – extrato de cultura a pH 2,5 exposta a  $Cu^{2+}$  (0,6 mM). O diurético bumetanide (100 $\mu M$ ) foi aplicado posteriormente no lado basolateral para demonstrar a existência de corrente de  $Cl^-$  na direção basolateral para apical. As barras verticais de corrente em períodos regulares correspondem a pulsos de voltagem de 1 mV e são utilizados para o cálculo de resistência epitelial ( $R_t$ ,  $\Omega.cm^2$ ) usando a lei de Ohm. 59

Figura 28 - Variação na corrente de curto-circuito ( $\Delta I_{sc}$ ,  $\mu A/cm^2$ ) (A) e na resistência epitelial ( $\Delta R_t$ ,  $\Omega.cm^2$ ) (B) em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. a pH 7 e pH 2,5, expostos a  $Cu^{2+}$  (0,6 mM), com  $10^6$  (pH 7/ $10^6$  e pH 2,5/ $10^6$ ) e  $10^7$  (pH 7/ $10^7$  e pH 2,5/ $10^7$ ) de células aplicados no lado basolateral do epitélio. 60

Figura 29 - Variação percentual de corrente de curto-circuito em relação ao 61  
respetivo controlo em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em  
câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de  
*Coccomyxa* sp. aplicados no lado basolateral do epitélio opercular: A – extratos de  
cultura a pH 7 exposta a  $\text{Cu}^{2+}$  (0,6 mM); B – extratos de cultura a pH 2,5 exposta a  
 $\text{Cu}^{2+}$  (0,6 mM); C – comparação da percentagem de corrente aos 95 minutos (t-test).

Figura 30 – Variação percentual de resistência epitelial em relação ao respetivo 62  
controlo em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de  
Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp.  
aplicados no lado basolateral do epitélio opercular: A – extratos de cultura a pH 7  
exposta a  $\text{Cu}^{2+}$  (0,6 mM); B – extratos de cultura a pH 2,5 exposta a  $\text{Cu}^{2+}$  (0,6 mM);  
C – comparação da percentagem de resistência aos 95 minutos (t-test).

Figura 31 – Percentagem do valor de corrente de curto-circuito (A) e de resistência 64  
epitelial (B) em relação ao inicial em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus*  
montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura  
de *Coccomyxa* sp. de diferentes condições de cultivo, aplicados no lado basolateral  
do epitélio opercular. Respetivas tabelas com os valores obtidos através do teste  
estatístico two-way ANOVA. Os valores utilizados para a análise estatística são os  
valores finais do ensaio (aos 95 minutos).

Figura 32 – Corrente de curto-circuito ( $I_{sc}$ ,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) em epitélio opercular de 65  
*Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”.  
Resposta à exposição a  $\text{Cu}^{2+}$  (0,2 e 2  $\mu\text{M}$ ) no lado basolateral do epitélio opercular.  
As barras verticais de corrente em períodos regulares correspondem a pulsos de  
65  
voltagem de 1 mV e são utilizados para o cálculo de resistência epitelial ( $R_t$ ,  $\Omega.\text{cm}^2$ )  
usando a lei de Ohm.

Figura 33 – Diferença de corrente de curto-circuito ( $\Delta I_{sc}$ ,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) em epitélio 65  
opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage  
clamp”. Resposta à exposição a  $\text{Cu}^{2+}$  0,2 e 2 $\mu\text{M}$  respetivamente no lado basolateral  
do epitélio.

Figura 34 – Percentagem do valor de corrente de curto-circuito (A) e de resistência epitelial (B) em relação ao inicial em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta à exposição a  $\text{Cu}^{2+}$  0,2 e 2  $\mu\text{M}$  no lado basolateral do epitélio opercular.

66

Figura 35 – Registo original de corrente de curto-circuito ( $I_{sc}$ ,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. a pH 7 (expostos a 0,6 mM de  $\text{Cu}^{2+}$ ) (A) e à exposição a 0,6 mM de  $\text{Cu}^{2+}$  (B) aplicados no lado basolateral do epitélio opercular. O diurético bumetanide (100  $\mu\text{M}$ ) foi aplicado posteriormente no lado basolateral para demonstrar a existência de corrente de  $\text{Cl}^-$  na direção basolateral para apical. As barras verticais de corrente em períodos regulares correspondem a pulsos de voltagem de 1 mV e são utilizados para o cálculo de resistência epitelial ( $R_t$ ,  $\Omega.\text{cm}^2$ ) usando a lei de Ohm. Ao fim de 40 minutos de experiencia, limpeza das câmaras de Ussing e respetiva recuperação do tecido epitelial.

67

Figura 36 – Percentagem do valor de corrente de curto-circuito (A) e de resistência epitelial (B) em relação ao inicial em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. ( $10^7$  células) e à exposição a  $\text{Cu}^{2+}$  (2  $\mu\text{M}$ ), aplicados no lado basolateral do epitélio opercular. No tempo inicial ( $t(0)$ ) os valores são 100% e ao fim de 40 minutos verificou-se o efeito máximo provocado pelo extrato e pela exposição a  $\text{Cu}^{2+}$ . Após os 40 minutos, lavagem das câmaras de Ussing e respetiva recuperação do tecido epitelial.

68

## Índice de Tabelas

Tabela I – Grupos de extremófilos e respetivos exemplos.	1
Tabela II – Alguns compostos isolados de extremófilos e a respetiva aplicação biotecnológica.	2
Tabela III – Constituintes do meio K9 modificado para o volume final de 1 l.	7
Tabela IV – Constituintes da solução de elementos para um volume final de 500 ml.	8
Tabela V – Constituintes da reação de PCR de colónias para um volume final de 50 $\mu$ l.	24
Tabela VI – Programa de PCR de colónias.	24
Tabela VII – Lista de primers para os genes de referência.	26
Tabela VIII – Lista de Primers para os genes de <i>Coccomyxa</i> sp. (DEGs).	26
Tabela IX – Constituintes da reação de PCR para um volume final de 25 $\mu$ l.	27
Tabela X – Programa de PCR.	27
Tabela XI – Constituintes da reação de Real-Time PCR para um volume final de 10 $\mu$ l.	28
Tabela XII – Programa de Real-Time PCR.	28
Tabela XIII – Lista de primers ACP utilizados para detetar os DEGs. + indica os primers ACP em que se obteve bandas diferenciais.	30

Tabela XIV – Primers com os quais se obteve bandas diferenciais e o respetivo tamanho dos fragmentos. * indica fragmentos que foram sequenciados.	31
Tabela XV – Identificação do gene da amostra P21-6 BH no JGI e no GenBank.	33
Tabela XVI – Identificação do gene da amostra 4-6-13BH no JGI e no GenBank.	33
Tabela XVII – Identificação do gene da amostra 71A no JGI e no GenBank.	34
Tabela XVIII – Identificação do gene da amostra 77B no JGI e no GenBank.	35
Tabela XIX – Identificação do gene da amostra 90B no JGI e no GenBank.	35
Tabela XX – Identificação do gene da amostra 95BC no JGI e no GenBank.	36
Tabela XXI – Parâmetros da reação de Real-Time PCR.	37
Tabela XXII – Constituintes da solução salina (pH 7,8) normal e sem iões Cl <sup>-</sup> .	47
Tabela XXIII – Valores basais (média ± erro padrão) dos parâmetros bioelétricos do epitélio opercular de <i>Fundulus heteroclitus</i> montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Solução salina com iões cloreto (n=46) e solução salina sem iões cloreto (n=6). Em que n corresponde ao número de epitélios usados; I <sub>sc</sub> corresponde à corrente de curto-circuito; R <sub>t</sub> corresponde à resistência epitelial; e V <sub>t</sub> corresponde à voltagem.	48

## Lista de Abreviaturas

aa – Aminoácidos  
AAM – Águas ácidas de mina  
ACP – Annealing control primer  
Ag/AgCl – Prata/cloreto de prata  
ANOVA – Analysis of variance  
AVC – Acidente vascular cerebral  
bp – Base pairs  
CCMAR – Centro de Ciências do Mar  
cDNA – DNA complementar  
CFTR – Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator  
Cl<sup>-</sup> – Ião cloro ou cloreto  
Cu<sup>2+</sup> – Ião cobre (II)  
CuSO<sub>4</sub> – Sulfato de cobre (II)  
DEGs – Differential expressed genes (genes diferencialmente expressos)  
DNA – Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)  
DNase – Desoxirribonuclease  
dNTPs – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados  
EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid  
FPI – Faixa Piritosa Ibérica  
GAPDH – Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase  
H<sup>+</sup> – Protão de hidrogénio  
HCl – Ácido clorídrico  
HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid  
IPTG – Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside  
Isc – Corrente de curto-circuito  
K – Potássio  
KCl – Cloreto de potássio  
LB - Lysogeny broth ou Luria Broth  
mRNA – RNA mensageiro  
Na – Sódio  
NaCl – Cloreto de sódio

NADH – Nicotinamide adenine dinucleotide  
NKCC – Cotransportador Na-K-Cl  
nt – Nucleótidos  
PBS – Phosphate buffered saline (Tampão fosfato salino)  
PCR – Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)  
pDNA – DNA plasmídico  
Real-Time PCR – PCR quantitativo em tempo real  
RNA – Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)  
RNase – Ribonuclease  
ROS – Reactive species of oxygen (espécies reativas de oxigênio)  
RPL19 – Ribosomal protein L19  
Rt – Resistência epitelial  
SDS – Sodium dodecyl sulfate  
SOC - Super optimal broth with catabolite repression  
TAE – Tris-acetate-EDTA  
TBE – Tris-Borate-EDTA  
UV – Luz ultravioleta  
Vt – Voltagem transepitelial  
X-Gal – 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

## **Lista de significados**

dTACP1 – Sequência complementar a região poli-A dos mRNA transcritos e que funciona como primer.

dTACP2 – Primer com sequência universal que reconhece a região 5' da segunda cadeia de cDNA.

Housekeeping gene – Gene constitutivo que apresenta expressão constante numa determinada célula e normalmente é fundamental para a sua sobrevivência.

Primer – Pequena sequência nucleotídica que disponibiliza a sua região 3' para ponto de partida da síntese de DNA pela DNA polimerase.

Taq polimerase – Polimerase termoestável utilizada na amplificação de fragmentos através de PCR.

# **I. Introdução**

## **1. Extremófilos**

Os seres vivos apresentam uma grande variedade morfológica e fisiológica e podem habitar os mais diversos locais do planeta, desde o fundo dos oceanos até aos cumes das montanhas, passando por desertos e florestas. Por vezes, esses locais apresentam condições extremas, tais como, baixa ou alta temperatura e pressão atmosférica. Os organismos capazes de sobreviver nestas condições são denominados extremófilos.

### **1.1. Classificação:**

Os extremófilos unicelulares podem ser classificados em vários grupos de acordo com a condição do meio ambiente (Madigan e Oren, 1999; Satyanarayana *et al.*, 2005, tabela I).

Tabela I – Grupos de extremófilos e respetivos exemplos.

<b>Grupo de extremófilos</b>	<b>Condição do meio ambiente</b>	<b>Exemplo</b>
<b>Psicrófilos</b>	Baixas temperaturas (-20°C a 10 °C)	<i>Arthrobacter</i> sp.
<b>Termófilos</b>	Altas temperaturas (41°C a 121 °C)	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>Acidófilos</b>	pH ácido (< 3)	<i>Coccomyxa</i> sp.
<b>Alcalófilos</b>	pH básico (8,5 e 11)	<i>Natronobacterium pharaonis</i>
<b>Barófilos</b>	Elevada pressão atmosférica (> 38 MPa)	<i>Halomonas salaria</i>
<b>Halófilos</b>	Elevada salinidade (1-3,5 M de NaCl)	<i>Dunaliella acidophila</i>
<b>Oligotróficos</b>	Baixa quantidade de carbono dissolvida (0,2-16,8 mg/l)	<i>Sphingomonas</i> sp.
<b>Metal-tolerantes</b>	Elevadas concentrações de metais dissolvidos	<i>Coccomyxa</i> sp.

### **1.2. Aplicação biotecnológica:**

Os extremófilos, devido à sua plasticidade fisiológica e genética, têm sido alvo de diversos estudos. Vários compostos têm sido isolados destes organismos, tais como,

pigmentos, enzimas e lípidos, com importância para aplicação biotecnológica (Madigan e Oren, 1999; Satyanarayana *et al.*, 2005; Herbert, 1992; Schiraldi e de Rosa, 2002; Pulz e Gross, 2004, tabela II).

Tabela II – Alguns compostos isolados de extremófilos e a respectiva aplicação biotecnológica.

<b>Organismos/Compostos</b>	<b>Aplicação Biotecnológica</b>
<b>Psicrófilos:</b>	
<b>β-Galactosidase</b>	Hidrólise da lactose nos produtos lácteos
<b>Ácidos gordos polinsaturados</b>	Aditivos e suplementos alimentares
<b>Proteases e lipases</b>	Detergentes
<b>Termófilos:</b>	
<b>DNA polimerase</b>	Biologia Molecular
<b>α-Amilases</b>	Adoçantes
<b>Antibióticos</b>	Indústria farmacêutica
<b>Acidófilos:</b>	
<b>Microrganismos que oxidam o enxofre</b>	Dessulfuração do carvão
<b>Alcalófilos:</b>	
<b>Celulases e xilases</b>	Detergentes
<b>Pectinases</b>	Indústria do papel
<b>Barófilos:</b>	
<b>Microrganismos</b>	Processo de recuperação do petróleo
<b>Halófilos:</b>	
<b>Lípidos</b>	Indústria Farmacêutica
<b>Solutos compatíveis</b>	Preservantes para a indústria alimentar
<b>Metal-tolerantes:</b>	
<b>Luteína</b>	Indústria Farmacêutica

## **2. Microalgas**

Os procariontes são os organismos extremófilos mais estudados (Madigan e Oren, 1999; Satyanarayana *et al.*, 2005), no entanto os seres eucariotas unicelulares, por exemplo as microalgas, têm sido reportados como habitando ambientes extremos (Chong *et al.*, 2011; Vaquero *et al.*, 2012; Gross, 2004). As microalgas têm um papel importante em vários ecossistemas, por exemplo, são responsáveis por 30 a 50% da produtividade fotossintética do planeta (Field, 1998). Recentemente, as microalgas têm sido alvo de grande estudo, pois são capazes de aproveitar a luz solar e o dióxido de carbono para produzir

compostos energéticos (lípidos e hidratos de carbono) que podem ser convertidos em biocombustível (Hu *et al.*, 2008; Rodolfi *et al.*, 2009) e suplementos proteicos (Becker, 2007). Para além disso, têm sido efetuados estudos para compreender a sua sobrevivência em locais extremos e para descobrir novos compostos de interesse com potencial biotecnológico (Pulz e Gross, 2004; Vaquero *et al.*, 2012).

### **2.1. Adaptação a pH baixo e elevadas concentrações de metais**

As microalgas que habitam ambientes ácidos tiveram que se adaptar a essa condição extrema. Um dos principais fatores que têm que superar é o pH com valores baixos devido à alta concentração de prótons ( $H^+$ ). A membrana plasmática das microalgas é pouco permeável à passagem dos  $H^+$  do meio exterior e por isso o efluxo dos mesmos consome pouca energia por parte da célula. A impermeabilidade da membrana pode ser devida à incorporação de esteróis, proteína e ácidos gordos saturados (Gross, 2000; Brake e Hasiotis, 2010). As microalgas também têm a capacidade de regular o pH do meio intracelular através de transportadores iónicos eficientes nas membranas celulares, como por exemplo, cotransportadores de  $H^+$  (Messerli *et al.*, 2005).

As águas ácidas de mina possuem concentrações baixas de fosfatos solúveis devido a precipitação pelo alumínio. Uma vez que o fosfato é essencial para o funcionamento de alguns tipos de microalgas, estas desenvolveram a capacidade de produzir fosfatases extracelular resistentes ao meio ácido (Gross, 2000).

Outro fator importante que as microalgas têm de superar é a presença de metais (cobre, chumbo, zinco, alumínio). Esses metais induzem a oxidação da membrana plasmática e a sua possível rutura, assim como, a desnaturação de proteínas, que inclui o bloqueamento de grupos funcionais ou decomposição de metabolitos essenciais (Brake e Hasiotis, 2010). De modo a tolerar a elevada concentração dos metais presentes, as microalgas adotaram diversas estratégias, tais como: i) incorporação de antioxidantes lipofílicos na membrana (Gross, 2000), ii) redução da entrada de metais ou aumento do fluxo dos mesmos, iii) mecanismos de complexação dos metais, levando a sua precipitação no lado extracelular e iv) agrupamento em biofilmes essenciais (Brake e Hasiotis, 2010).

No planeta Terra existem inúmeros ambientes ácidos originados por atividade geológicas ou antropogénicas, nomeadamente por escorrência de águas ácidas de mina (AAM) que conjugam pH baixo e elevadas concentrações de metais. A mina de S. Domingos, agora abandonada, situa-se na Faixa Piritosa Ibérica (FPI), uma das maiores reservas mundiais

de maciços de sulfuretos, com mais de 1700 quilómetros. Apesar da maior parte das minas da FPI estarem atualmente desativadas, a oxidação de sulfuretos, promovida pelo contacto das escombrelas e escórias com a água da chuva, é contínua, alimentando processos biogeoquímicos naturais que geram um sistema de águas ácidas de mina (Oliveira e Oliveira, 2002; Pérez-López *et al.*, 2010). Este ambiente é caracterizado por valores baixos de pH (< 3) e por conter uma alta concentração de metais ditos pesados (cobre, chumbo, zinco) que para o caso do cobre pode atingir valores de teor máximo de 1468 mg/Kg (Pinho *et al.*, 2014).

## **2.2. Bioensaios:**

Para além, da capacidade de produzirem compostos energéticos e suplementos proteicos, as microalgas extremófilas têm sido alvo de estudo a nível de extratos celulares. Esses extratos têm sido testados maioritariamente *in vitro*, como por exemplo, na regulação ou no combate viral (Lin *et al.*, 2014; Komatsu *et al.*, 2013) e utilizados na indústria dermatológica (Buono *et al.*, 2012). Devido às limitações com a experimentação animal apenas alguns estudos com extratos de microalgas foram realizados *in vivo*, por exemplo, para testar o efeito neuroprotetivo no acidente vascular cerebral (AVC) isquémico (Sun *et al.*, 2013).

## **2.3. *Coccomyxa* sp.:**

A microalga *Coccomyxa* sp., da família *Coccomyxaceae* (*Eukaryota*; *Viridiplantae*; *Chlorophyta*; *Trebouxiophyceae*) estudada neste trabalho, é um poliextremófilo isolado das águas ácidas da mina de S. Domingos (Valente *et al.*, 2013). As características de interesse no trabalho com espécies de microalgas extremófilas, nomeadamente *Coccomyxa* sp., são a taxa de crescimento relativamente elevada em diferentes condições de cultivo, a capacidade de, em condições favoráveis, acumular pigmentos e outros metabolitos bioativos e ainda, devido às condições extremas em que pode ser mantida, a fácil obtenção de culturas axénicas em laboratório, sem que os inóculos sejam contaminados por outros organismos invasores (Vaquero *et al.*, 2012; Casal *et al.*, 2011; Valente *et al.*, 2013).

### **3. Objetivos**

O principal objetivo deste trabalho foi analisar a capacidade e flexibilidade adaptativa da microalga *Coccomyxa* sp. e explorar o seu potencial biotecnológico. O trabalho divide-se em três capítulos:

1. Caracterização das alterações metabólicas provocadas por diferentes condições de cultivo (capítulo II);
2. Identificação e quantificação das alterações do perfil de expressão genética provocadas pelas diferentes condições de cultivo (capítulo III);
3. Avaliação da potencial a atividade biológica de extratos celulares provenientes das diferentes condições de cultivo num modelo epitelial animal *ex-vivo* (capítulo IV).

## **II. Caracterização das alterações metabólicas provocadas por diferentes condições de cultivo**

### **1. Introdução**

A sobrevivência de eucariotas unicelulares em ambientes caracterizados por valores baixos de pH (< 3) e por uma alta concentração de metais ditos pesados (cobre, chumbo, zinco), tem sido atribuída à sua capacidade de regular o pH do meio intracelular através de transportadores iônicos eficientes nas membranas celulares (Messerli *et al.*, 2005) e à capacidade de produzir compostos antioxidantes (Garbayo *et al.*, 2012). Os metais ditos pesados, como o cobre, são responsáveis por desencadear uma série de processos intracelulares que levam à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Os ROS são constantemente produzidos pelo metabolismo celular mais concretamente pela mitocôndria durante o processo de fosforilação oxidativa e podem interagir com diversos constituintes celulares como, aminoácidos, lípidos e ácidos nucleicos. A resposta celular à presença de ROS pode envolver mecanismos enzimáticos antioxidantes potencialmente capazes de reduzir os efeitos tóxicos, nomeadamente através da ação concertada da superóxido dismutase e de peroxidases, ou envolver pequenas moléculas com capacidade antioxidante como o ácido ascórbico (citoplasmático) e carotenoides (associados a membranas celulares e lipoproteínas, Bouayed e Bohn, 2012; Alscher *et al.*, 1997; Mallick, 2004).

Os carotenoides são pigmentos com grande potencial antioxidante que se localizam no cloroplasto de frutas, vegetais e algas. Todos os carotenoides são tetraterpenos e dividem-se em duas classes: xantofilas, que contêm oxigênio na sua estrutura e carotenos, sem oxigênio na sua estrutura (Bouayed e Bohn, 2012). Alguns destes pigmentos apresentam um potencial para prevenir várias doenças associadas ao stress oxidativo (Mortensen, 2001). Vaquero *et al.* documentaram que na presença de determinadas concentrações de cobre (0,2 a 2 mM), o extremófilo *Coccomyxa onubensis* produz grandes quantidades de luteína (carotenoide do grupo das xantofilas) (Vaquero *et al.*, 2012).

Para além da produção de carotenoides, as microalgas extremófilas podem também ser uma importante fonte de clorofila para a indústria farmacêutica. A clorofila é um pigmento essencial na fotossíntese, que se localiza no cloroplasto de plantas e algas e

pode ser utilizado como uma medida indireta da quantidade de biomassa. Estruturalmente, este pigmento possui uma clorina com um ião magnésio no centro e divide-se em clorofila a, b, c, d, sendo que as microalgas só possuem as três primeiras (Blankenship, 2002). Este pigmento e os seus derivados naturais têm sido explorados pelo papel que desempenham na modulação de biomarcadores de risco de cancro (Ferruzzi e Blakeslee, 2007).

Este capítulo tem como objetivo determinar as diferenças de tamanho e crescimento celular e a produção de clorofila e carotenoides em diferentes condições de cultivo (pH 7 e pH 2,5 com ou sem a adição de cobre).

## **2. Metodologia**

### **2.1. Culturas de *Coccomyxa* sp.:**

As culturas de *Coccomyxa* sp., provenientes das águas residuais da mina de São Domingos, foram isoladas por Valente *et al.* (2013) e armazenadas em frascos de cultura de 1l com tampas com filtro (para permitir as trocas gasosas) em meio K9 modificado (tabela III e IV, Vaquero *et al.*, 2012). As culturas foram mantidas a pH 2,5 e a pH 7 num ambiente exposto a luz artificial com intensidade luminosa de 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  num fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas sem luz e a temperatura constante (24 °C).

Tabela III – Constituintes do meio K9 modificado para o volume final de 1 l.

<b>Constituintes do meio K9 modificado</b>
Sulfato de potássio 20 mM
Cloreto de potássio 1 mM
Fosfato de dipotássio 2 mM
Cloreto de magnésio hexahidratado 2 mM
Nitrato de potássio 20 mM
Cloreto de cálcio dihidratado 0,1 mM
Solução de elementos (tabela IV) 5 ml/l

Tabela IV – Constituintes da solução de elementos para um volume final de 500 ml.

Constituintes da solução de elementos
Ácido Bórico 70 mM
Sulfato de zinco pentahidratado 30 mM
Cloreto de Manganês tetra hidratado 10 mM
Sulfato de ferro heptahidratado 10 mM
Cloreto de cobalto hexahidratado 3 mM
Sulfato cobre pentahidratado 3 mM
Molibdato de amônia tetra hidratado 0,4 mM
Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 30 mM

No início deste trabalho, o meio de cultura foi substituído e as culturas respectivamente a pH 7 e pH 2,5 foram transferidas para frascos de 50 ml (20 replicados cada) e mantidas durante 4 dias até ao ensaio de exposição ao cobre. A 10 replicados de cada cultura de *Coccomyxa* sp. a pH 7 e a pH 2,5 adicionaram-se 250 µl de uma solução de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) a 120 mM. Deste modo cada replicado ficou exposto a 0,6 mM de cobre (figura 1). Após sete dias de exposição ao cobre, foram recolhidas amostras de todos os replicados: 250 µl para contagens e para a análise comparativa de crescimento e tamanhos celulares; 2 ml para a análise de pigmentos produzidos; 10 ml para preparar extratos celulares; e 37 ml para a análise de perfil de expressão genética.

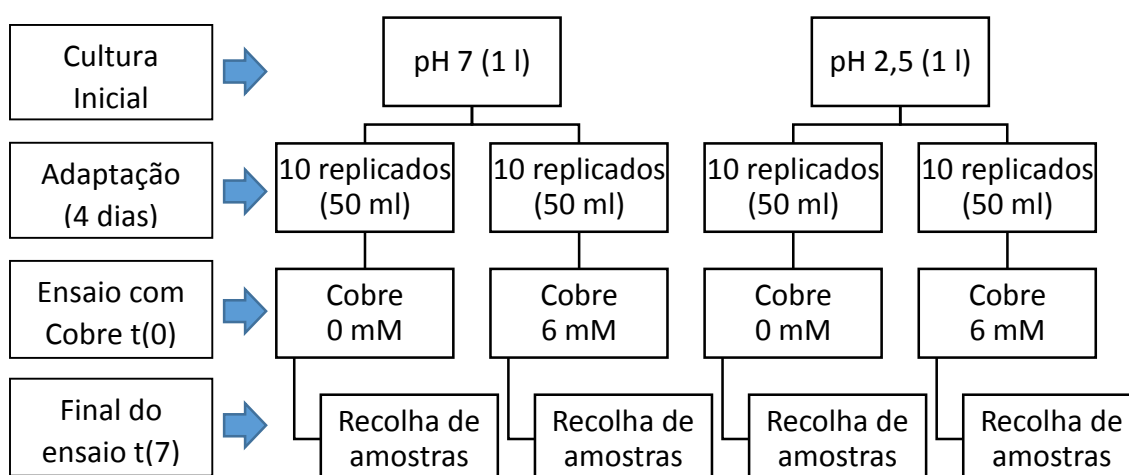


Figura 1 – Esquema do ensaio. t(0) representa tempo inicial e t(7) representa tempo final de sete dias

## 2.2. Concentrações celulares:

A densidade celular foi determinada através da utilização de uma câmara de Bürker (figura 2) e com o auxílio de um microscópio óptico com câmara fotográfica incorporada (Leica DFC 480, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

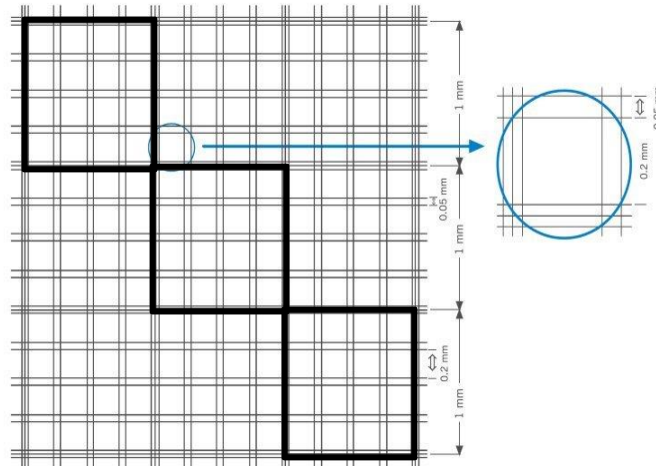


Figura 2 – Representação de uma câmara de Burker. A câmara encontra-se dividida em 9 quadrados grandes (com 1mm de largura cada) que por sua vez estão divididos em 16 quadrados mais pequenos (0,2 mm de largura cada um). Os quadrados grandes estão separados entre eles por 3 linhas com 0,025 mm de largura e os quadrados pequenos estão separados entre eles por duas linhas de 0,05 mm de largura. Para realizar as contagens utilizaram-se os quadrados assinalados a preto. Adaptado do website [www.rogosampaic.com/Cellule-a-numeration-Burker](http://www.rogosampaic.com/Cellule-a-numeration-Burker) (24/08/15).

Todas as amostras retiradas dos replicados para as contagens foram diluídas 10x. Da diluição adicionaram-se 10 µl na câmara de Burker. Este procedimento foi realizado em duplicado para cada replicado. As amostras foram fotografadas com a objetiva de 20x sem e com filtro de fluorescência (figura 3 A e B) através da utilização do software IM50 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Foi utilizado o filtro de emissão de 515 a 560 nm que permitiu excitar os pigmentos cloroplastidiais e fazer a contagem das células viáveis, com base na fluorescência desses pigmentos.

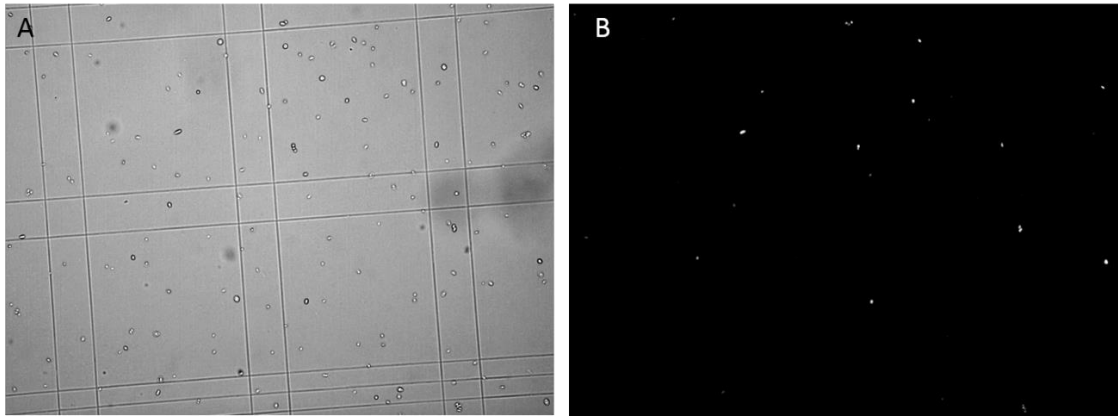


Figura 3 – Fotografias de *Coccomyxa* sp. tiradas com a objetiva de 20x sem (A) e com (B) filtro de fluorescência (515 a 565 nm).

A análise das imagens obtidas foi realizada no software ImageJ 1.48v (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA). O tamanho das células foi obtido diretamente a partir software ImageJ e o número de células por ml foi determinado pela fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ células/ml} = \left( \frac{n^{\circ} \text{ células}}{\text{Profundidade } (\mu\text{m}) \times \text{Área } (\mu\text{m}^2) \times n^{\circ} \text{ quadrados}} \right) \times \text{diluição} \times 10^{12}$$

(Equação 1)

### **2.3. Precipitação celular:**

A precipitação das células das amostras para quantificação de pigmentos, extratos celulares e análise de perfil de expressão genética foi feita através de centrifugação (5 minutos a 8000 rpm), de modo a descartar o meio de cultura, seguida de lavagem com tampão fosfato salino (PBS). As amostras foram novamente precipitadas por centrifugação (5 minutos a 10000 rpm) e o PBS descartado. Os precipitados foram congelados em azoto líquido e armazenados a -80 °C.

### **2.4. Extração de pigmentos:**

Para a extração de pigmentos, a cada tubo adicionaram-se 150 µl de H<sub>2</sub>O estéril (DNase e RNase free, Sigma-Aldrich, USA) e o conteúdo foi ressuspendido no vortex. As amostras foram incubadas a 95 °C durante 15 minutos e de seguida foram colocadas em gelo. Por fim, adicionaram-se 1350 µl de metanol e as amostras foram mantidas no frigorífico (4 °C) durante 8 dias, de modo a extrair o máximo possível de pigmentos. Findo este período mediu-se a absorvância para cada amostra. A absorvância medida no

espectrofotômetro foi registrada para os comprimentos de onda de 666; 665,2; 652,4 e 470 nm. Para determinar a concentração de pigmentos presentes na amostra utilizaram-se as seguintes fórmulas:

a) Mackinney (Henriques *et al.*, 2007; Mackinney, 1941) para clorofila total:

$$\text{Clorofila total } (\mu\text{g/ml}) = \frac{13,43 \times A_{665} \times v}{l \times V} \text{ (Equação 2);}$$

b) Lichtenthaler (Henriques *et al.*, 2007; Lichtenthaler e Wellburn, 1983) para

$$\text{carotenoides totais: Carotenoides totais } (\mu\text{g/ml}) = \frac{(1000 \times A_{470}) - (44,76 \times A_{666})}{221} \text{ (Equação 3);}$$

c) Porra *et al* (Henriques *et al.*, 2007; Porra *et al.*, 1989) para clorofila

$$\text{total: Clorofila total } (\mu\text{g/ml}) = \frac{(16,29 \times A_{665} - 8,54 \times A_{652}) \times v}{l \times V} \text{ (Equação 4) e}$$

$$\text{Clorofila total } (\mu\text{g/ml}) = 15,65 \times A_{666} \text{ (Equação 5).}$$

Onde “v” corresponde ao volume do solvente (ml), “V” corresponde ao volume da amostra (ml), “l” corresponde ao comprimento da célula ótica (cm) e “A” corresponde à absorvância. Para determinar a quantidade de pigmentos produzida por milhão de células utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Pigmentos/milhão de células } (\mu\text{g}/10^6) = \frac{\text{Concentração de pigmentos } (\mu\text{g/ml})}{\text{Milhão de células} \times 2 \text{ (ml)}} \text{ (Equação 6)}$$

## **2.5. Análise estatística:**

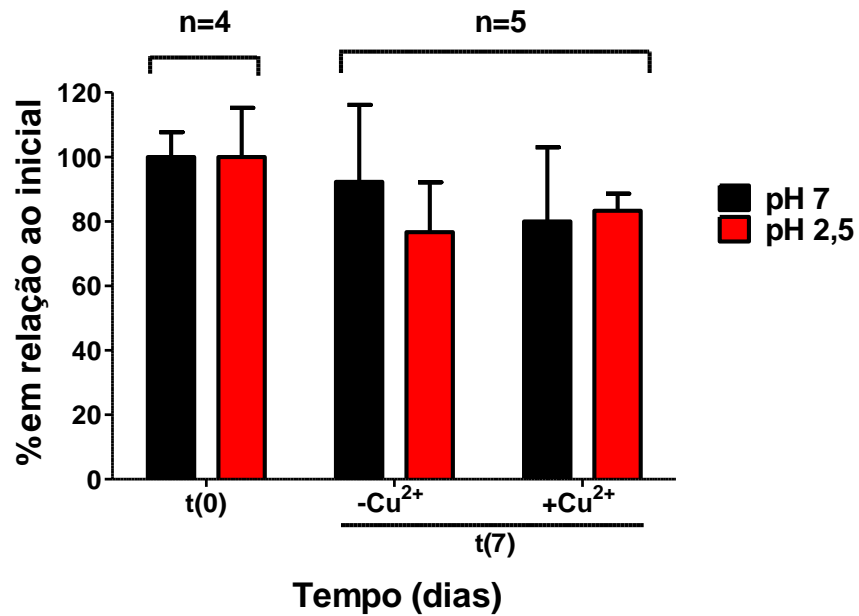
Todos os dados obtidos foram analisados e tratados através do software Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA). A significância estatística foi determinada através do teste two-way ANOVA. Considerou-se os valores de  $p < 0,05$  como amostras significativamente diferentes.

## **3. Resultados**

### **3.1 Concentrações celulares:**

O primeiro passo deste trabalho foi determinar a concentração celular e verificar se existiam diferenças entre os 4 tratamentos (pH 7 e pH 2,5 na presença e na ausência de cobre 0,6 mM). Verificou-se que em todos os tratamentos não existiam alterações

significativas entre os tratamentos. Este facto é comprovado pelo teste estatístico two-way ANOVA, no qual se verifica que nenhum dos parâmetros utilizados (pH,  $\text{Cu}^{2+}$  e a sua interação) apresenta um valor de p abaixo de 0,05 (figura 4).



Two-way ANOVA	Fonte de Variação	Variação total (%)	Valor de p
	pH	0,35	0,7756
	$\text{Cu}^{2+}$	5,06	0,5581
	Interação	1,52	0,8364

Figura 4 – Concentrações celulares – % em relação ao valor inicial em função do tempo (dias) e o respetivo teste estatístico two-way ANOVA. t(0) representa o tempo inicial da experiência; t(7) representa o tempo final da experiência (7 dias);  $-\text{Cu}^{2+}$  representa tratamentos que não foram expostos a solução de cobre;  $+\text{Cu}^{2+}$  representa tratamentos expostos a solução de cobre e n representa o número de replicados. No teste ANOVA os parâmetros representados são o pH, o cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e a interação entre pH e  $\text{Cu}^{2+}$ .

### 3.2. Tamanhos celulares:

Outro aspeto analisado foi o tamanho celular de *Coccomyxa* sp. em resposta aos tratamentos experimentais e observou-se que a adição do cobre ao meio parece não influenciar o tamanho celular. Só é visível um efeito no tamanho celular quando há alteração do pH. Verifica-se a existência de uma maior frequência de células pequenas da microalga nos tratamentos de pH 7 em relação aos tratamentos de pH 2,5 (figura 5).

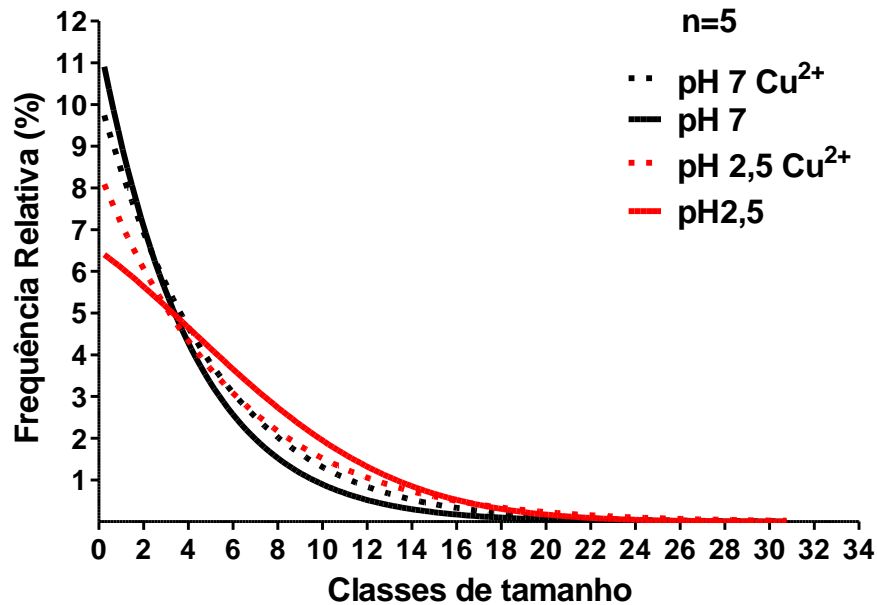
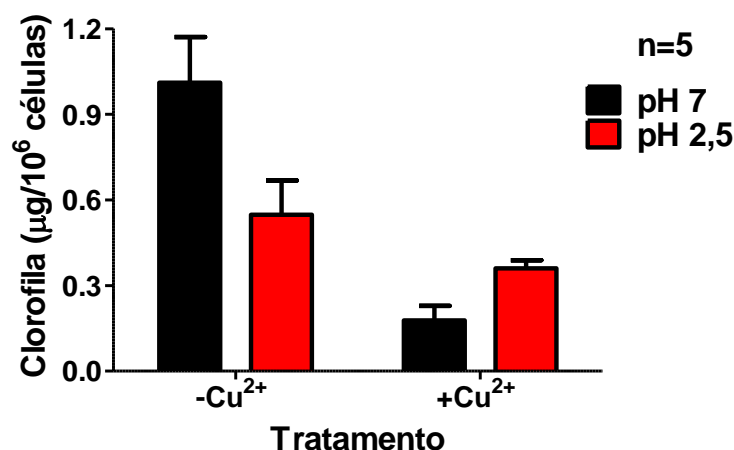


Figura 5 – Frequência relativa (%) em função da classe de tamanho celular. O ponto médio de cada classe de tamanho foi obtido através dos seguintes parâmetros: “bin range” de 0,25  $\mu\text{m}$  e “bin width” de 0,5  $\mu\text{m}$  (Prism 5).

### 3.3. Clorofila:

A partir da absorvância medida para cada amostra calculou-se a concentração de clorofila total produzida pela microalga nos diferentes tratamentos (equações 2, 4, 5 e 6 em metodologia). As células de *Coccomyxa* sp. mantidas a pH 7 produziram 1,01  $\mu\text{g}$  de clorofila/ $10^6$  células, enquanto que as que foram mantidas a pH 2,5 produziram cerca de metade, 0,55  $\mu\text{g}$  de clorofila/ $10^6$  células. Após a adição de solução de cobre as células a pH 7 e a pH 2,5 produziram 0,18 e 0,36  $\mu\text{g}$  de clorofila/ $10^6$  células, respectivamente. Verifica-se, assim, que adição de cobre provocou um efeito na produção de clorofila tanto nas células a pH 7 como nas células a pH 2,5. Esse efeito consistiu na diminuição da produção de clorofila, em cerca de 82,18% para as células a pH 7 e de 34,55% para as células a pH 2,5. Através do teste estatístico two-way ANOVA, em que são comparados o efeito do pH, do cobre e a interação entre estes dois, verifica-se que o principal fator que influenciou a produção de clorofila foi a presença de cobre (figura 6).

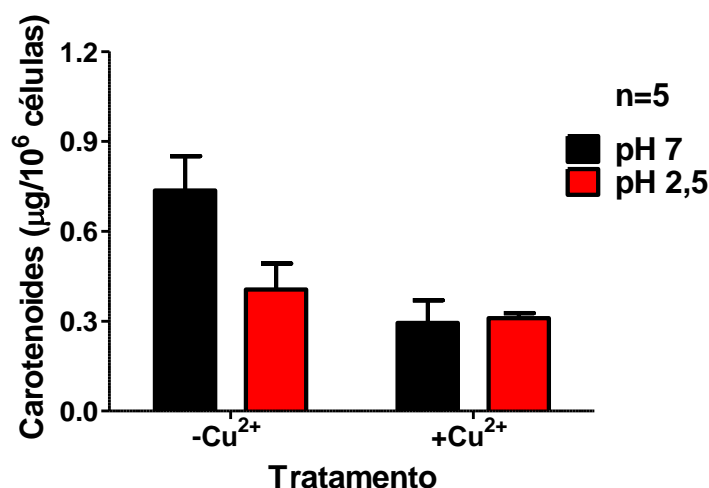


Fonte de Variação	Varição total (%)	Valor de p
pH	3,51	0,1988
Cu <sup>2+</sup>	46,66	0,0002
Interação	18,60	0,0071

Figura 6 – Produção de clorofila ( $\mu\text{g}/10^6$  células) nos diferentes tratamentos e o respetivo teste estatístico two-way ANOVA.  $-\text{Cu}^{2+}$  representa os tratamentos em que as células de *Coccomyxa* sp. não foram expostas a cobre,  $+\text{Cu}^{2+}$  representa os tratamentos em que as células da microalga foram expostas a cobre e n representa o número de replicados. No teste ANOVA os parâmetros representados são o pH, o cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e a interação entre pH e  $\text{Cu}^{2+}$ .

### 3.4. Carotenoides:

A partir da absorvância medida para cada amostra calculou-se a quantidade de carotenoides total produzida pela microalga (equação 3 e 6 em metodologia). Verificou-se que a acumulação de carotenoides é superior nas células a pH 7 ( $0,74 \mu\text{g}$  de carotenoides/ $10^6$  células) em relação aos restantes tratamentos a que correspondem a  $0,41 \mu\text{g}$  de carotenoides/ $10^6$  células (pH 2,5),  $0,29 \mu\text{g}$  de carotenoides/ $10^6$  células (pH 7 na presença de cobre) e  $0,31 \mu\text{g}$  de carotenoides/ $10^6$  células (pH 2,5 na presença de cobre). O efeito da adição do cobre reflete-se na diminuição da produção de carotenoides tanto a pH 7 (descida de 60,81%) como a pH 2,5 (descida de 24,39%). Pelo teste estatístico two-way ANOVA, considerando isoladamente o efeito do pH, do cobre e da interação entre eles, conclui-se que o principal fator que levou à diminuição da produção de carotenoides foi o cobre (figura 7).



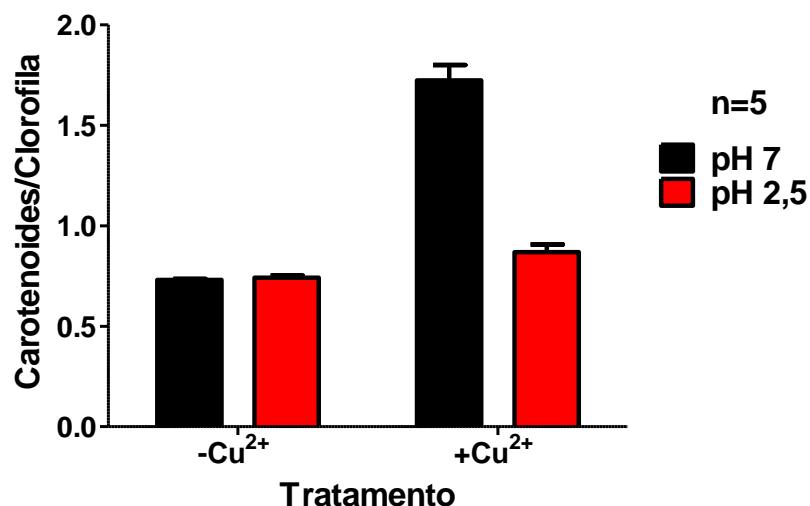
**Two-way ANOVA**

Fonte de Variação	Variação total (%)	Valor de p
pH	10,55	0,0730
Cu <sup>2+</sup>	30,8	0,0047
Interação	12,81	0,0506

Figura 7 – Acumulação de carotenoides ( $\mu\text{g}/10^6$  células) nos diferentes tratamentos e o respetivo teste estatístico two-way ANOVA. Em que  $-\text{Cu}^{2+}$  representa os tratamentos em que as células de *Coccomyxa* sp. não foram expostas a cobre,  $+\text{Cu}^{2+}$  representa os tratamentos em que as células da microalga foram expostos a cobre e n representa o número de replicados. No teste ANOVA os parâmetros representados são o pH, o cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e a interação entre pH e  $\text{Cu}^{2+}$ .

### 3.5. Razão carotenoides/clorofila:

A razão carotenoides/clorofila calculada é aproximadamente de 0,74 para os tratamentos de pH 7 e pH 2,5. Quando foi adicionada a solução de cobre a razão aumentou para 1,72 nas células a pH 7 e 0,87 nas células a pH 2,5. Tendo por base a análise do teste estatístico two-way ANOVA conclui-se que os três fatores (pH, cobre e interação entre eles) contribuem para a diferença de valores observada, no entanto o cobre parece ser o maior responsável por essa alteração (figura 8).



Two-way ANOVA	Fonte de Variação	Variação total (%)	Valor de p
	pH	25,10	< 0,0001
	Cu <sup>2+</sup>	44,33	< 0,0001
	Interação	26,40	< 0,0001

Figura 8 – Razão carotenoides/clorofila para os diferentes tratamentos e o respetivo teste estatístico two-way ANOVA. -Cu<sup>2+</sup> representa os tratamentos em que as células de *Coccomyxa* sp. não foram expostas a cobre, +Cu<sup>2+</sup> representa os tratamentos em que as células da microalga foram expostas a cobre e n representa o número de replicados. No teste ANOVA os parâmetros representados são o pH, o cobre (Cu<sup>2+</sup>) e a interação entre pH e Cu<sup>2+</sup>.

#### 4. Discussão

O objetivo deste capítulo foi caracterizar diferenças metabólicas provocadas pela alteração do pH e pela presença ou ausência de cobre.

A microalga *Coccomyxa* sp. é um poliextremófilo que habita ambientes ácidos capaz de suportar a presença de grandes concentrações de iões metálicos. As culturas da microalga *Coccomyxa* foram mantidas em quatro condições diferentes (pH 7 e pH 2,5 com ou sem a adição de cobre). Pretendeu-se analisar a resposta fisiológica por parte das células da microalga nas condições descritas. A resposta fisiológica investigada, no caso deste trabalho, consistiu na análise do tamanho e do crescimento celular e na quantidade de pigmentos fotossintéticos produzida. As culturas foram mantidas a pH 2,5, que é o pH do ambiente natural destes microrganismos e o pH 7 que representa o pH neutro. A utilização do pH 7 permitiu observar a plasticidade fisiológica das células de *Coccomyxa* sp.. Para além da utilização de diferentes pH as culturas também foram expostas a 0,6 mM de cobre

(Cu<sup>2+</sup>). Este metal foi escolhido por ser um dos metais mais abundantes no habitat destas microalgas (Pinho *et al.*, 2014) e por ter sido descrito por Vaquero *et al.* (2012) como um fator para o aumento de produção de carotenoides (Vaquero *et al.*, 2012). A exposição ao Cu<sup>2+</sup> durou sete dias, no fim dos quais foram retiradas as amostras para análise.

As células de *Coccomyxa* sp. não apresentaram uma resposta fisiológica diferente no crescimento celular comparativamente entre tratamentos. O que indica que as células da microalga nestas condições têm um crescimento viável em qualquer um dos tratamentos. Outro parâmetro analisado foi o tamanho celular onde se verifica uma resposta diferente aos tratamentos por parte das células de *Coccomyxa* sp.. A presença de Cu<sup>2+</sup> parece não influenciar o tamanho celular, pois as células expostas a cobre possuem uma frequência relativa de distribuição semelhante. No entanto o pH assume o papel como o fator principal para a alteração de tamanho, onde se observa que as células mantidas a pH 2,5 têm uma distribuição de tamanhos diferentes das células mantidas a pH 7. Essa diferença refletiu-se numa maior frequência de células pequenas a pH 7 em relação a pH 2,5. Esta diminuição de tamanho poderá ser uma resposta fisiológica por parte das células à mudança de pH.

Para além de densidade e tamanho celulares foi também analisada a produção de pigmentos (clorofila e carotenoides). A clorofila é um indicador de viabilidade celular porque é essencial à fotossíntese e os carotenoides são utilizados pelas células para combater as espécies reativas de oxigénio (ROS, Bouayed e Bohn, 2012; Alscher *et al.*, 1997; Mallick, 2004). Quanto maior o valor da razão carotenoides/clorofila maior é o stress celular (Netto *et al.*, 2005; Hendry e Price, 1993) . A produção de clorofila e carotenoides foi afetada pelos tratamentos em que as células foram mantidas. A maior quantidade de clorofila produzida foi nas células a pH 7 enquanto a menor foi nas células a pH 7 expostas a cobre. A exposição ao cobre das células da microalga foi o principal fator que influenciou a produção de clorofila. O Cu<sup>2+</sup> pode desencadear processos de formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) que interagem com vários constituintes celulares (Alscher *et al.*, 1997; Bouayed e Bohn, 2012). Neste caso, o Cu<sup>2+</sup> poderá ter afetado o cloroplasto das células da microalga causando as diferenças observadas na produção de clorofila. Os tratamentos que induziram uma produção maior e menor quantidade carotenoides, respetivamente foram o de pH 7 e de pH 7 Cu<sup>2+</sup>. O Cu<sup>2+</sup> foi novamente o fator que influenciou a produção, o que demonstra uma resposta das células de *Coccomyxa* ao Cu<sup>2+</sup> idêntica em comparação com a produção de clorofila. Pela razão carotenoides/clorofila verifica-se que as células do tratamento pH 7 Cu<sup>2+</sup> foram as que

estavam em maior stress celular com um valor de 1,72, que foi mais do dobro relativamente às células dos outros tratamentos. Vaquero *et al.* (2012) testou várias concentrações de cobre (0,04 a 4 mM) em culturas de *Coccomyxa onubensis* a pH 2,5 e analisou a quantidade de carotenoides produzida, mais concretamente luteína e  $\beta$ -caroteno. Concluiu que a maior produção de carotenoides foi observada quando as células da microalga foram expostas a 0,4 mM de  $\text{Cu}^{2+}$  em pH 2,5 e que o cobre era essencial para essa produção (Vaquero *et al.*, 2012). No presente trabalho não se verificou um efeito significativo da adição de 0,6 mM de cobre no aumento da concentração de carotenoides em células cultivadas a pH 2,5. Tendo-se no entanto observado que nestas células a razão carotenoides/clorofila é ligeiramente superior mas tal é devido à diminuição da produção de clorofila total naquelas condições. No presente estudo a maior produção de carotenoides foi observada nas células provenientes das culturas a pH 7. De facto nas condições semelhantes às de Vaquero *et al.* (2012), ou seja, células mantidas a pH 2,5 e expostas a 0,6 mM de  $\text{Cu}^{2+}$ , a concentração de carotenoides é cerca de metade da observada nas células de pH 7.

As diferenças encontradas, entre o presente estudo e o trabalho de Vaquero *et al.* (2012) para células cultivadas a pH 2,5 com adição de cobre, poderá dever-se às diferentes condições de cultivo. Naquele estudo a microalga *C. onubensis* foi cultivada em reatores descontínuos e semi-descontínuos, a 28 °C e 5% de  $\text{CO}_2$ , mantendo uma densidade ótica de 690 nm (Vaquero *et al.*, 2012). No caso presente a temperatura de cultivo foi mais baixa (24°C) e não foi feita adição de  $\text{CO}_2$ . Além disso, *C. onubensis* foi mantida em fotoperíodo contínuo com uma intensidade luminosa  $160\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , isto é, em condições de fornecimento de fluxo fotónico que visava estimular a produção de carotenoides.

Os resultados do presente estudo sugerem que as culturas de *Coccomyxa* sp. a pH 7 poderão ser uma fonte futura de produção de pigmentos com o objetivo de serem utilizados na indústria biotecnológica mesmo em condições basais de cultura, sem ser necessário a adição de cobre.

### **III. Identificação e quantificação das alterações do perfil de expressão genética provocadas pelas diferentes condições de cultivo;**

#### **1. Introdução**

Um dos axiomas da Biologia é que todas as células de um organismo possuem genoma idêntico, no entanto apenas uma percentagem dos genes são expressos em cada tipo celular. Os genes expressos num determinado tipo celular ou, no caso dos organismos unicelulares, consoante as necessidades o exigem são denominados genes diferencialmente expressos (DEGs). A sua regulação pode ocorrer em diferentes fases: a) Na transcrição, regulando quais os genes que são transcritos em RNA; b) No processamento do RNA, regulando quais dos RNAs transcritos se tornam RNAs mensageiros (mRNA); c) Na seletividade do mRNA, regulando quais os mRNA que são traduzidos em proteínas; e d) Na modificação proteica, regulando quais proteínas deverão ser funcionais (Gilbert, 2003).

Ao longo dos anos foram desenvolvidos métodos capazes de caracterizar perfis diferenciais de expressão genética. A transcriptómica tem sido uma área que se tem desenvolvido rapidamente através das tecnologias de sequenciação de “next-generation”, gerando uma grande quantidade de dados bioinformáticos. Se por um lado uma análise transcriptómica permite uma descrição detalhada de alterações de expressão por outro lado a análise subjacente é demorada e requer genomas de referência e anotação correta dos mesmos (McGettigan, 2013). Existem outros métodos capazes de fazer uma deteção menos morosa de DEGs, embora não tão detalhada. Um desses métodos consiste na tecnologia GeneFishing (Kim *et al.*, 2004), disponível em kit comercial, que se baseia no uso de um sistema de primers [annealing control primer (ACP) system] em sequência (figura 9). Qualquer que seja a aproximação tecnológica à deteção de DEGs, a validação por Real-Time PCR é sempre necessária.

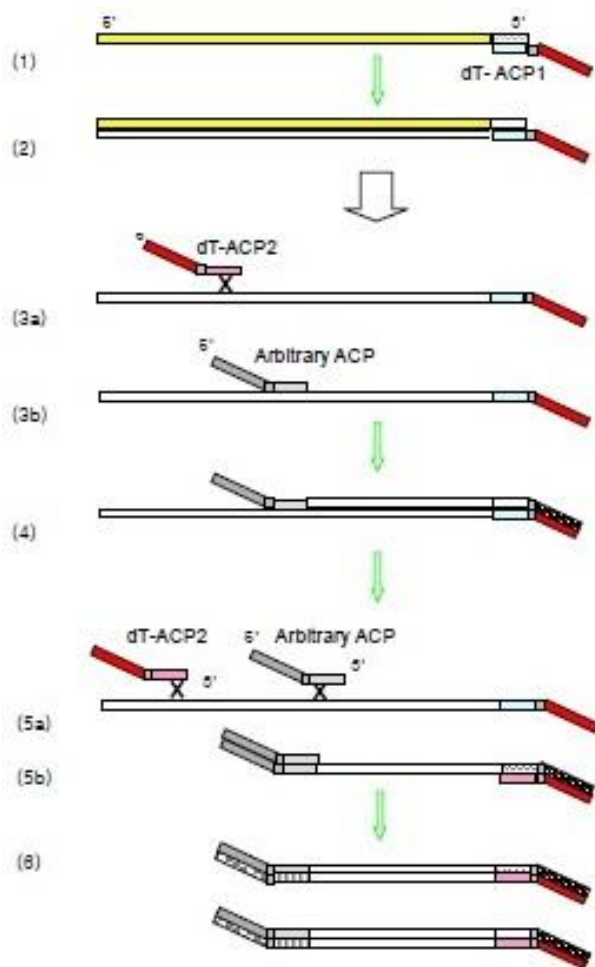


Figura 9 – Esquema da tecnologia ACP. Para a síntese da primeira cadeia de cDNA pela retrotranscriptase (RT) é utilizado o dT-ACP 1 (1 e 2). A temperatura de annealing no primeiro passo de PCR é 50°C. Esta temperatura é alta o suficiente para prevenir a ligação do dT-ACP 2 (3a) e para permitir a ligação de 8 a 10 pares de base (pb) do ACP aleatório à primeira cadeia do cDNA (3b). A segunda cadeia do cDNA é sintetizada em apenas um ciclo (4). São realizados 35 a 40 ciclos de PCR à temperatura de 65°C para amplificar a segunda cadeia do cDNA. Este procedimento é restrito o suficiente para prevenir o annealing das sequências e para permitir a ligação das sequências universais entre si. Com a temperatura de annealing a 65°C, o ACP aleatório e o dT-ACP 2 não se conseguem ligar à primeira cadeia de cDNA (5a). A segunda cadeia de cDNA é amplificada pela ligação do ACP aleatório e do dT-ACP 2 à extremidade 3' e 5', respectivamente (5b). Apenas os produtos de PCR específicos são amplificados (6). Esquema adaptado do protocolo de GeneFishing™ DEG Premix Kit da SeeGene (Ogeum-ro, Songpa-gu, Seul, Coreia).

O método de Real-Time PCR consiste basicamente numa reação de PCR em tempo real. Este método é robusto por ser preciso a quantificar as alterações da expressão de genes e por poder ser usado em situações em que a quantidade de RNA é limitada. No entanto, é fundamental a seleção de um método de normalização para que os resultados da quantificação da expressão genómica sejam fiáveis. O método de normalização mais utilizado é a quantificação relativa, onde o gene de interesse é normalizado com um gene de referência, ou seja, um gene cuja expressão não é alterada em condições fisiologicamente diferentes (housekeeping, Brunner *et al.*, 2004).

Os genes de referência mais utilizados para microalgas são o gene ribossomal 18S, o gene da proteína Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), o gene da proteína ribossomal L19 (RPL19) e o gene da subunidade 5 da proteína NADH desidrogenase (NAD5). Estes genes são usados largamente na literatura como típicos genes de referência para normalização da expressão em quantificação por Real-Time PCR de transcritos de genes de plantas (Liu *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015).

O 18S é um componente da subunidade pequena (40S) do ribossoma de células eucariotas, que participa na tradução (Brimacombe e Stiege, 1985). A GAPDH é uma proteína intermediária do processo de glicólise (Sirover, 1997). A RPL19 é uma proteína ribossomal da subunidade maior (60S) de células eucariotas, que participa na tradução (Davies e Fried, 1995). A NAD5 é uma subunidade da proteína NADH desidrogenase, que está presente na mitocôndria e participa na cadeia transportadora de elétrons (Brandt, 2006).

O objetivo deste capítulo é a identificação e quantificação de genes diferencialmente expressos em culturas de *Coccomyxa* sp. a pH 7 e pH 2,5 na presença ou na ausência de cobre.

## **2. Metodologia**

### **2.1. Extração de RNA:**

O RNA foi extraído de amostras de culturas de *Coccomyxa* sp. de pH 7 e pH 2,5 na presença e na ausência de cobre. Para se realizar a extração de RNA cada amostra foi ressuspendida em 1300 µl de tampão (Tris HCl, NaCl, SDS) e transferida para dois tubos de 2 ml com tampa de rosca com esferas de zircônico. As amostras foram homogeneizadas a 6800 rpm, em três ciclos de 30 segundos com uma pausa de 30 segundos entre cada ciclo (Precellys 24, Rockville, Maryland, USA). Após homogeneização as amostras foram transferidas para tubos Eppendorf de 2 ml com 650 µl de mistura de fenol e clorofórmio (1:1; v/v) e centrifugadas a 2000g durante 10 minutos a 4 °C. A fase aquosa resultante foi transferida para tubos Eppendorf de 2 ml com 325 µl de mistura de fenol e clorofórmio (1:1; v/v) e centrifugada novamente (2000 g, 10 minutos, 4 °C). Retirou-se a fase aquosa para um tubo Eppendorf de 2ml com 650 µl de clorofórmio e centrifugou-se (2000 g, 10 minutos, 4 °C). A fase aquosa foi transferida para um tubo Eppendorf de 1,5 ml e adicionou-se 1:10 volumes de acetato de sódio (3 M a pH 5,2) e 2,2 volumes de etanol (biology molecular grade). As amostras ficaram a precipitar durante a noite a -20 °C. Na manhã seguinte, as amostras foram centrifugadas a 16000 g durante 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e adicionado 1 ml de etanol a 70%. De seguida procedeu-se a centrifugação das amostras a 16000 g durante 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 25 µl de H<sub>2</sub>O

estéril (DNase e RNase free, Sigma-Aldrich, USA). As amostras foram armazenadas a -80°C até à sua utilização. Antes de se proceder à síntese da cadeia simples de DNA (DNA complementar, cDNA), as amostras foram submetidas a um tratamento com DNase. Utilizou-se o kit comercial TURBO DNA-free da Ambion (Foster City, Califórnia, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O tratamento com DNase serviu para remover eventuais restos de DNA presentes na amostra.

## **2.2. Quantificação de ácidos nucleicos:**

Todas as quantificações de RNA, cDNA e DNA plasmídico (pDNA) necessárias foram realizadas através do Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

## **2.3. Detecção de genes diferencialmente expressos (DEGs):**

### **2.3.1. Síntese de cDNA:**

Após a quantificação individual das amostras de RNA (4 replicados por tratamento) foram realizadas diluições quando necessárias para que todas as amostras ficassem à mesma concentração. Seguidamente foram feitas misturas (“pools”) das amostras agrupadas por tratamento. O cDNA foi sintetizado a partir de 1400 ng de RNA, dos “pools” de amostras dos tratamentos pH 7 e pH 2,5 com ou sem cobre, e de acordo com o protocolo do ki comercial GeneFishing™ DEG Premix Kit da SeeGene (Ogeum-ro, Songpa-gu, Seul, Coreia). Com o primer dT-ACP1 o cDNA sintetizado foi posteriormente diluído 10x para ser usado na deteção de DEGs.

### **2.3.2. Detecção de DEGs:**

Para detetar os genes diferencialmente expressos em *Coccomyxa* sp., foi utilizado o kit comercial GeneFishing™ DEG Premix Kit da SeeGene (Ogeum-ro, Songpa-gu, Seul, Coreia) de acordo com as instruções do fabricante. Foi utilizado o cDNA diluído 10x para a reação em cadeia da polimerase (Polimerase Chain Reaction, PCR), na qual se testaram 39 primers arbitrários (ACP 3, 7-11, 64-96) em conjunto com o primer reverse dT-ACP2. Os produtos de PCR foram sujeitos a eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v) em tampão

Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X com adição de brometo de etídio. A visualização dos fragmentos obtidos foi feita sob luz ultravioleta (UV). Os produtos de PCR de diferentes tamanhos e intensidades entre tratamentos foram excisados do gel para purificar.

### **2.3.3. Extração e purificação de bandas:**

Os fragmentos de DNA retirados do gel foram purificados através do kit comercial GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro da Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

### **2.4. Ligação e clonagem:**

Ligou-se 5 µl de cada produto de purificação ao plasmídeo pGEM através da utilização do kit pGEM®-T Easy Vector System I da Promega (Madison, Wisconsin, USA) seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, utilizou-se a ligação para a transformação de células competentes da estirpe XL-1 Blue de *E. coli*. Adicionou-se 5 µl da ligação a cada tubo Eppendorf contendo 100 µl de células competentes e incubou-se no gelo durante 30 minutos. Ao fim desse tempo, aplicou-se um choque térmico a 42°C durante 90 segundos e colocou-se as amostras novamente no gelo durante 90 segundos. A cada tubo Eppendorf foi adicionado 250 µl de SOC (LB + Glucose 20 mM) pré-aquecido a 37 °C. Posteriormente, as amostras foram incubadas a 37°C durante 45 minutos com agitação a 200 rpm (Inkubator 1000 e Unimax 1010, Heidolph Instruments, Alemanha). Ao fim dos 45 minutos, adicionou-se 5 µl de Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, 1M) e foi plaqueado 150 µl de cada transformação em placas de Petri com LB-agar sólido, Ampicilina (50 µg/ml) e X-Gal (20 mg/ml). As placas ficaram a incubar a 37 °C durante aproximadamente 16 horas. As colónias de interesse (brancas) foram selecionadas.

#### **2.4.1. PCR de colónias:**

A verificação que as colónias escolhidas possuam o fragmento de interesse foi realizada através de PCR. Em que os constituintes foram H<sub>2</sub>O estéril (DNase e RNase free, Sigma-Aldrich, USA), DreamTaq™ DNA Polimerase (Thermo Fisher Scientific, Inc., EUA) e o respetivo tampão, mistura de dNTPs, e os primers universais pUC/M13 forward e

pUC/M13 reverse (pGEM), cujo o local de hibridar no plasmídeo usado se situa perto do local de inserção do fragmento clonado (tabelas V e VI). Os produtos de amplificação foram verificados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1x com GreensSafe, após visualização sob luz UV.

Tabela V – Constituintes da reação de PCR de colónias para um volume final de 50 µl.

<b>Constituintes da reação de PCR</b>
H <sub>2</sub> O estéril (DNase e RNase free, Sigma-Aldrich, USA)
Tampão Dream Taq 1x
Mix de dNTPs 0,4 mM
Primer Forward 0,4 mM
Primer Reverse 0,4 mM
DreamTaq™ DNA Polimerase 1U

Tabela VI – Programa de PCR de colónias.

<b>Programa de PCR</b>	
95°C	3 min
94°C	30 s
50°C	30 s
72°C	1 min
72°C	10 min

} x30

#### **2.4.2 Extração do pDNA:**

O DNA plasmídico (pDNA) das colónias selecionadas foi extraído através do kit NZY Miniprep (NZYTech genes & enzymes, Lisboa, Portugal) seguindo as instruções do fornecedor. O produto foi digerido com FastDigest EcoRI da Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) de acordo com as instruções do fabricante, para verificação do tamanho do fragmento inserido após eletroforese nas condições descritas em 2.4.1.

## **2.5. Sequencição:**

Os clones obtidos (minipreps) foram sequenciados comercialmente (CCMAR-UAIG, Portugal).

## **2.6. Análise de Sequências:**

A análise e o tratamento das sequências obtidas dos genes de *Coccomyxa* sp. foram realizados através do software BioEdit Sequence Alignment Editor v7.2.5 (Carlsband, Califórnia, USA).

### **2.6.1. Análise comparativa:**

Os genes foram identificados através de uma análise comparativa das sequências obtidas com sequências já anotadas nos websites JGI e GenBank. O JGI é uma base de dados específica para *Coccomyxa*, em que foi inserida a sequência nucleotídica (nt). Para confirmar a identificação do gene foi inserida a sequência de aminoácidos (aa) no GenBank, que é uma base de dados geral que contém informação sobre vários organismos.

## **2.7. Desenho e teste de primers para quantificação por Real-Time PCR:**

Os primers específicos para os genes de referência (tabela VII) e para os DEG selecionados (tabela VIII) foram desenhados através do software Oligo v5.0 da Primer Analysis Software (Plymouth, Minnesota, USA). Os primers dos genes de referência foram desenhados a partir de sequências conhecidas de *Coccomyxa* sp.. No caso dos genes de interesse os primers foram desenhados com base nas sequências obtidas neste trabalho.

Tabela VII – Lista de primers para os genes de referência.

Gene de referência	Primer	Sequência (5'→3')	Produto (nt)
<b>RPL19</b>	RPL224U19	TTTTTGTGATCCATTCACC	106
	RPL311L19	GTTCCCTTGCCAATCCTAT	
<b>18S1</b>	18S148U19	GATTGGTGGGTGTTATTTG	164
	18S293L19	AAGTTTCCCCGTGTTGAGT	
<b>18S2</b>	18S394U20	TGGTGGAGTGATTTGTCTGG	109
	18S480L23	ACCGAAAGTCCCTCTAAGAAGTA	
<b>NAD5</b>	5NAD1456U17	ATGATAGGGCTGGGCAC	118
	5NAD1557L17	TGGAGACAAGGGGGAGA	
<b>GAPDH</b>	GAP1044U17	GACGCTGACCTGGACCT	140
	GAP1167L17	ACGCCCTTCTTGACCTT	

Tabela VIII – Lista de Primers para os genes de *Coccomyxa* sp. (DEGs).

Genes de <i>Coccomyxa</i>	Primer	Sequência (5'→3')	Produto (nt)
<b>90B C1-1</b>	90B152U17	TGTGTTGCCAGAGAGGA	120
	90B255L17	TTGAGAAGTTGCGTTGA	
<b>95BC C1-1</b>	95BC35U18	GTTGAGGAGATGGGCATT	125
	95BC141L19	CCTTTTACCTTACGCTGAT	
<b>4-6-13-BH</b>	BH61325U20	GGACAAGGAACAAAGAACAA	139
	BH613147L17	CTACTGGACCACGCTGC	
<b>P21-6-BH</b>	P21BH14U18	CTACATGGAGTTCCCCGA	132
	P21BH129L17	AAGCCCGCACAAACAGT	
<b>77B C8-2</b>	77B95U18	AGCGGAAAGAGGAATGGG	117
	77B195L17	GCAAACAGTCTGGTGGG	
<b>71A C12-1</b>	71A66U22	TCCTGAAGCAGAAGAAGTAGAA	153
	71A199L20	TGACAAGATACAACCGTACC	

### **2.7.1. Síntese de cDNA:**

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 500 ng de RNA de cada “pool” de amostras de cada tratamento e através da utilização do kit comercial RevertAid First Strand cDNA Synthesis da Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA obtido foi quantificado e diluído 10x à concentração de 100 ng/μl antes de ser utilizado.

### **2.7.2 PCR:**

Os primers desenhados, para os genes de interesse e de referência, foram testados através da reação de PCR de acordo com as tabelas IX. Os primers foram testados a três

temperaturas (50°C, 54°C e 60°C) diferentes de modo a determinar a temperatura ótima de amplificação (tabela X). Os produtos de amplificação foram visualizados após eletroforese (como em 2.4.1).

Tabela IX – Constituintes da reação de PCR para um volume final de 25 µl.

<b>Constituintes da reação de PCR</b>
H <sub>2</sub> O estéril (DNase e RNase free, Sigma-Aldrich, USA)
Tampão Dream Taq 1x
Mix de dNTPs 0,4 mM
Primer Forward 0,4 mM
Primer Reverse 0,4 mM
DreamTaq™ DNA Polimerase 1U
cDNA (100 ng)

Tabela X – Programa de PCR.

<b>Programa de PCR</b>	
94°C	3 min
94°C	30 s
50°C, 54°C ou 60°C	30 s
72°C	30 s
72°C	3 min

} x30

### **2.7.3. Clonagem, extração de pDNA e sequenciação:**

Cada fragmento de interesse foi sujeito aos processos de clonagem, extração de pDNA e sequenciação, tal como já foi descrito de 2.4 a 2.6. A verificação das amostras das sequências obtidas foi realizada através da ferramenta bioinformática BLAST de GenBank.

### **2.8. Real-Time PCR:**

Para validar a indicação de expressão diferencial obtida através do kit GeneFishing™ DEG Premix Kit da SeeGene (Ogeum-ro, Songpa-gu, Seul, Coreia) foi realizado a

quantificação da expressão dos DEGs através de Real-Time PCR. Os quatro “pools” de cDNA anteriormente preparados (pH 7, pH 2,5, pH 7 Cu<sup>2+</sup> e pH 2,5 Cu<sup>2+</sup>) foram utilizados para Real-Time PCR em triplicado para quantificar a expressão dos genes de referência e de interesse.

Das minipreps obtidas dos genes de interesse e de referência foi realizada uma diluição seriada (0,1 a 10<sup>-5</sup> ng/μl com um fator de diluição de 10x). Esta diluição foi utilizada para a elaboração da respetiva reta padrão.

Os genes de interesse testados foram o 95BC, o 4-6-13-BH, o 77B e o 71A enquanto que os de referência foram o GAPDH, o NAD5 e o 18S2. Para a reação de Real-Time PCR foi utilizada SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad, USA) de acordo com as instruções do fabricante, primers específicos para cada gene e H<sub>2</sub>O estéril (DNase e RNase free, Sigma-Aldrich, USA, tabelas XI e XII).

Tabela XI – Constituintes da reação de Real-Time PCR para um volume final de 10 μl.

<b>Constituintes da reação de Real-Time PCR</b>
SsoFast™ EvaGreen® Supermix 1x (Bio-Rad, USA)
Primer Forward 0,5 mM
Primer Reverse 0,5 mM
H <sub>2</sub> O estéril (DNase e RNase free, Sigma-Aldrich, USA)

Tabela XII – Programa de Real-Time PCR.

<b>Programa de Real-Time PCR</b>		
95°C	5 min	
95°C	10 s	} X40
50°C	30 s	
95°C	15 s	} Melt Curve
50°C (+5) a 95°C	15 s	

## **2.9. Análise estatística:**

Os resultados obtidos foram analisados e tratados através do software Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, USA).

### 3. Resultados

#### 3.1. RNA:

O RNA foi extraído das culturas de *Coccomyxa* sp. a pH 7 e pH 2,5 expostas ou não a cobre. O RNA foi quantificado após o tratamento com DNase e verificou-se os índices de quantidade (ng/μl) e qualidade (razão 260/280). Para a detecção de DEGs é necessário que o RNA extraído seja de boa qualidade e em grande quantidade. A razão 260/280 representa a pureza dos ácidos nucleicos e quanto mais próximo de 2 for o valor maior o grau de pureza do RNA. A razão 260/280 (figura 10A) é de 1,7 para os tratamentos de pH 7, pH 2,5 e pH 2,5 Cu<sup>2+</sup> e de 1,6 para pH 7 Cu<sup>2+</sup>. Por outro lado, a quantidade de RNA (figura 10B) extraído é semelhante para os dois tratamentos de pH 2,5 (aproximadamente 100 ng/μl) mas diferente nos tratamentos de pH 7. A quantidade de RNA extraído das culturas a pH 7 foi de aproximadamente de 150 ng/μl e de 300 ng/μl para pH 7 Cu<sup>2+</sup>.

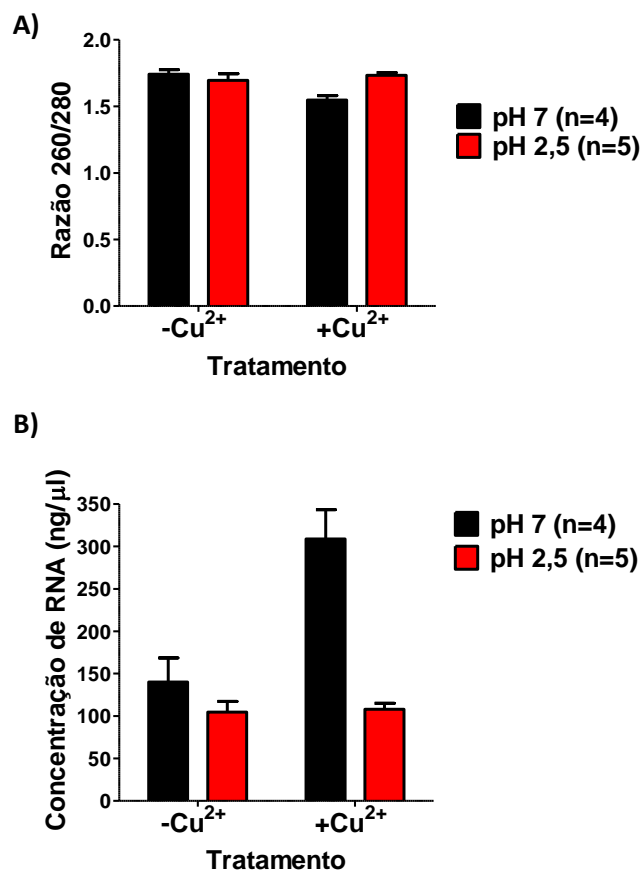


Figura 10 – Qualidade e quantidade de RNA extraído para os quatro tratamentos (pH 7 e pH 2,5 com e sem Cu<sup>2+</sup>). Razão 260/280 (A) e concentração de RNA (B) em função dos tratamentos. -Cu<sup>2+</sup> representa os tratamentos em que as células de *Coccomyxa* sp. não foram expostas a cobre, +Cu<sup>2+</sup> representa os tratamentos em que as células da microalga foram expostas a cobre e n representa o número de replicados.

### 3.2. Genes diferencialmente expressos (DEGs):

Dos 39 primers ACP testados, 21 possibilitaram a detecção de genes diferencialmente expressos (tabela XIII).

Tabela XIII – Lista de primers ACP utilizados para detetar os DEGs. + indica os primers ACP em que se obteve bandas diferenciais.

Primers	DEGs	Primers	DEGs	Primers	DEGs
ACP 3	+	ACP 71	+	ACP 84	
ACP 7	+	ACP 72		ACP 85	+
ACP 8		ACP 73	+	ACP 86	+
ACP 9		ACP 74	+	ACP 87	+
ACP 10		ACP 75	+	ACP 88	
ACP 11		ACP 76	+	ACP 89	+
ACP 64		ACP 77	+	ACP 90	+
ACP 65		ACP 78		ACP 91	
ACP 66		ACP 79	+	ACP 92	
ACP 67	+	ACP 80	+	ACP 93	+
ACP 68		ACP 81	+	ACP 94	
ACP 69		ACP 82		ACP 95	+
ACP 70		ACP 83	+	ACP 96	+

Os DEGs foram selecionados a partir das bandas diferenciais visualizadas após eletroforese em gel de agarose (figura 11). Foi possível retirar 33 fragmentos, cujo tamanho variou entre 200 e 1000 pares de base (bp, tabela XIV).

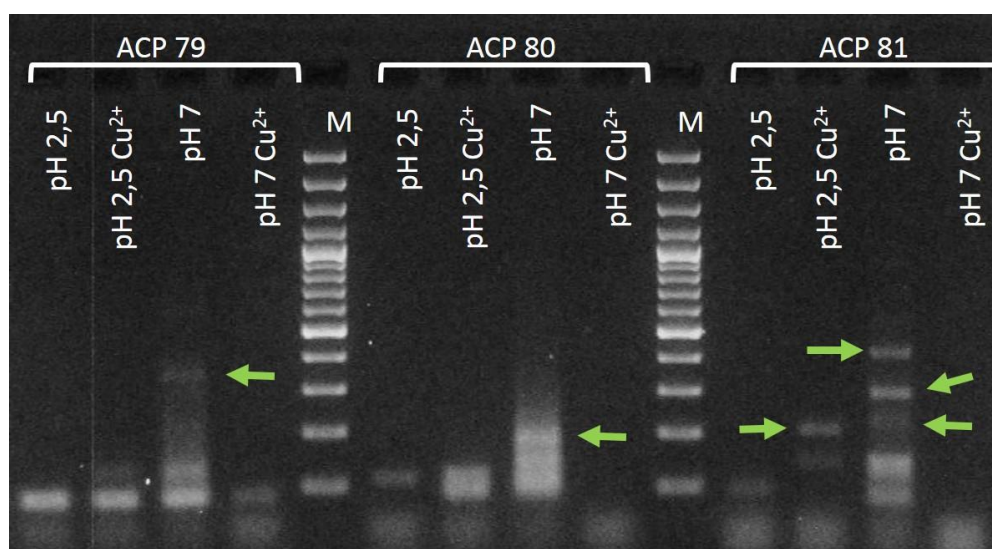


Figura 11 – Exemplo de bandas diferenciais (assinaladas na figura) visualizadas após eletroforese em gel de agarose. M representa o marcador (100bp Plus, Fermentas) Cu<sup>2+</sup> indica culturas de *Coccomyxa* sp. expostas a cobre.

Tabela XIV – Primers com os quais se obteve bandas diferenciais e o respetivo tamanho dos fragmentos. \* indica fragmentos que foram sequenciados.

Nome da amostra	Primer	Tamanho (bp)	Nome da amostra	Primer	Tamanho (bp)
<b>3B</b>	ACP 3	350	<b>83B</b>	ACP 83	350
<b>7B</b>	ACP 7	400*	<b>85B1</b>	ACP 85	250*
<b>67A</b>	ACP 67	550	<b>85B2</b>		350
<b>67AC</b>		400	<b>86B1</b>	ACP 86	300
<b>67B</b>		250	<b>86B2</b>		450
<b>71A</b>	ACP 71	300*	<b>87A</b>	ACP 87	250
<b>73B1</b>	ACP 73	250	<b>87B1</b>		300*
<b>73B2</b>		400*	<b>87B2</b>		400
<b>74B1</b>	ACP 74	300	<b>89BC</b>	ACP 89	210
<b>74B2</b>		350	<b>90B</b>	ACP 90	400*
<b>74B3</b>		550	<b>93B1</b>	ACP 93	250
<b>75B</b>	ACP 75	400*	<b>93B2</b>		300*
<b>76B</b>	ACP 76	280	<b>93B3</b>		400
<b>77B</b>	ACP 77	350*	<b>93B4</b>		500
<b>79B</b>	ACP 79	350*	<b>95BC</b>	ACP 95	1000*
<b>80B</b>	ACP 80	200	<b>96BC</b>	ACP 96	250
<b>81AC</b>	ACP 81	200*			
<b>81B1</b>		300*			
<b>81B2</b>		450*			

### **3.3. Sequências dos DEGs:**

Os fragmentos das amostras 7B, 71A, 73B2, 75B, 77B, 79B, 81AC, 81B1, 81B2, 85B1, 87B1, 90B, 93B2 e 95BC foram ligadas, clonadas e sequenciadas. A figura 12A mostra um exemplo de amplificação de colónias de interesse com o fragmento clonado e a figura 12B mostra um exemplo da restrição do pDNA para verificação do tamanho do fragmento clonado.

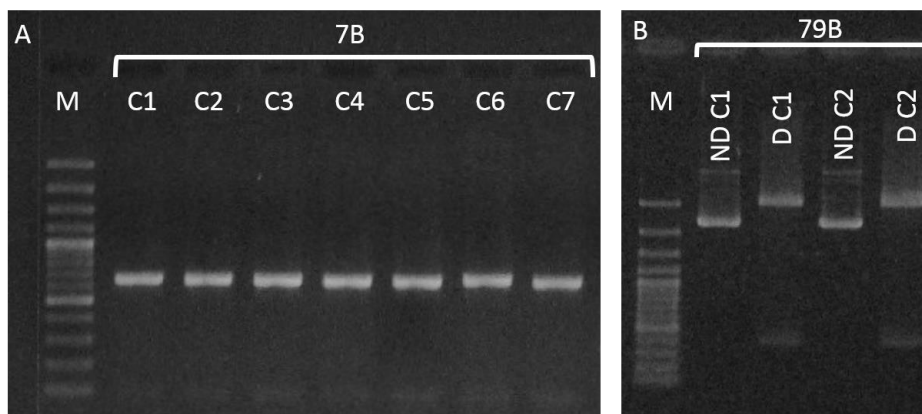


Figura 12 – Exemplo de eletroforese em gel de agarose de colônias (A) e de restrição de pDNA (B). M representa o marcador (100bp Plus, FERmentas), C indica o produto de amplificação obtido de cada colônia (1-7 no exemplo), ND representa o resultado da extração do pDNA de duas colônias e D indica o resultado da restrição do pDNA, para verificação do fragmento digerido.

Dos 14 fragmentos sequenciados, foi possível identificar o gene codificado em 6 dos fragmentos (tabelas XV-XX). Os genes foram identificados através dos websites online JGI Genome Portal Identification, em que foi inserida a sequência nucleotídica; e da ferramenta bioinformática BLAST de GenBank, onde foi inserida a sequência de aminoácidos proveniente da análise no JGI.

A sequência de nucleótidos (nt) homóloga da amostra P21-6 BH codifica no JGI para uma proteína com atividade catalítica, com função de oxireductase e de ligação ao NAD(P), no entanto não se conhece qual a sua localização celular. A respectiva sequência de aminoácidos (aa) no GenBank não tem correspondência com nenhuma proteína com atividade conhecida, apenas se sabe que é expressa em *Chlorella variabilis* (tabela XV). A sequência homóloga da amostra 4-6-13BH, no portal JGI codifica para uma proteína ribossomal (S13). Essa proteína localiza-se nos ribossomas e participa na biossíntese proteica. No GenBank a sequência de aa corresponde à mesma proteína do JGI, a proteína ribossomal S13 (tabela XVI).

No JGI a sequência de nt homóloga da 71A-C12-1 codifica para um fator que atua na etapa de terminação da tradução e localiza-se no citoplasma. No GenBank a sequência proteica corresponde a um péptido com atividade de hidrólise que atua na tradução (tabela XVII).

Tabela XV – Identificação do gene da amostra P21-6 BH no JGI e no GenBank.

<b>P21-6 BH</b>			
<b><u>JGI Genome Portal Identification</u></b>			
<b>Query Length</b>	226	<b>Aminoacid sequence</b>	QGVRYMEFPEAVPRSFQSGA
<b>E-value</b>	1.0E-01	<b>Molecular function</b>	Catalitic activity
<b>% of Identity</b>	54		NAD(P)-binding
<b>Protein ID</b>	64113		Oxidoreductase N-terminal
<b>Frame</b>	3	<b>Biological Process</b>	Metabolism
<b>Start</b>	3	<b>Cell Localization</b>	Unknown
<b>End</b>	62		
<b><u>GenBank</u></b>			
<b>Query Length</b>	20	<b>Start</b>	248
<b>E-value</b>	5.0E-04	<b>End</b>	265
<b>% of Identity</b>	83	<b>Aminoacid sequence</b>	GVMRYMEFPEAVPRSFQSG
<b>Score</b>	45.6	<b>Protein function</b>	Expressed protein [Chlorella variabilis]
<b>Sequence ID</b>	XP_005842956.1		

Tabela XVI – Identificação do gene da amostra 4-6-13BH no JGI e no GenBank.

<b>4-6-13BH</b>			
<b><u>JGI Genome Portal Identification</u></b>			
<b>Query Length</b>	233	<b>Aminoacid sequence</b>	HIAGLPVRGQGTKNNARTR
<b>E-value</b>	1.0.E-04	<b>Molecular function</b>	Ribosomal protein S13
<b>% of Identity</b>	81		Ribosomal protein S13-like
<b>Protein ID</b>	36279		H2TH
<b>Frame</b>	1	<b>Biological Process</b>	Protein biosynthesis
<b>Start</b>	1	<b>Cell Localization</b>	Ribosome
<b>End</b>	57		
<b><u>GenBank</u></b>			
<b>Query Length</b>	19	<b>Start</b>	92
<b>E-value</b>	5.6E-07	<b>End</b>	110
<b>% of Identity</b>	79	<b>Aminoacid sequence</b>	HIAGLPVRGQGTKNNARTR
<b>Score</b>	40.1	<b>Protein function</b>	30S ribosomal protein S13
<b>Protein ID</b>	PRK05179		

Tabela XVII – Identificação do gene da amostra 71A no JGI e no GenBank.

<b>71A</b>			
<b><u>JGI Genome Portal Identification</u></b>			
<b>Query Length</b>	252	<b>Aminoacid sequence</b>	KDIRVDTFTSSGPGGQSVNTTM SAVRLTHLPTGTVVSCQ
<b>E-value</b>	5.0.E-14	<b>Molecular function</b>	Translation release factor activity: Class I peptide chain release factor
<b>% of Identity</b>	57		
<b>Protein ID</b>	15083		
<b>Frame</b>	1	<b>Biological Process</b>	Translational termination
<b>Start</b>	103	<b>Cell Localization</b>	Cytoplasm
<b>End</b>	219		
<b><u>GenBank</u></b>			
<b>Query Length</b>	39	<b>start</b>	7
<b>E-value</b>	9.2E-22	<b>end</b>	51
<b>% of Identity</b>	69	<b>Aminoacid sequence</b>	RIHTSTKDIRVDTFTSSGPGGQS VNTTMSAVRLTHLPTGTVVSC Q
<b>Score</b>	81.5	<b>Protein function</b>	Peptide chain release factors
<b>Protein ID</b>	pfam00472		Peptidyl-tRNA hydrolase activity

No JGI a sequência de nt homóloga de 77B codifica para a proteína ribossomal S14, que se localiza nos ribossomas e participa na biossíntese de proteínas. A sequência de aa corresponde no GenBank a uma proteína do ribossoma só que esta anotada como sendo a proteína S29 (tabela XVIII).

A sequência de nt homóloga da amostra 90B no JGI codifica para uma proteína com atividade de hidrolase, D-tirosil-tRNA decilase. Esta proteína participa no catabolismo dos D-aminoácidos e localiza-se no citoplasma. A sequência de aa no GenBank corresponde a mesma proteína obtida no JGI, D-tirosil-tRNA decilase (tabela XIX).

Por último, a sequência de nt homóloga da amostra 95BC codifica para um enzima do tipo aldose 1-epimerase. Estes enzimas participam no metabolismo dos hidratos de carbono e a sua localização não está completamente determinada. No GenBank a sequência de aa corresponde a uma galactose 1-epimerase (tabela XX).

Tabela XVIII – Identificação do gene da amostra 77B no JGI e no GenBank.

<b>77B</b>			
<b><u>JGI Genome Portal Identification</u></b>			
<b>Query Length</b>	279	<b>Aminoacid sequence</b>	CRQCFREYAKDIGFIKYR
<b>E-value</b>	3.4.E-07	<b>Molecular function</b>	Structural constituent of ribosome: Ribosomal protein S14
<b>% of Identity</b>	70		
<b>Protein ID</b>	24741		
<b>Frame</b>	1	<b>Biological Process</b>	Protein biosynthesis
<b>Start</b>	1	<b>Cell Localization</b>	Ribosome
<b>End</b>	54		
<b><u>GenBank</u></b>			
<b>Query Length</b>	18	<b>Start</b>	37
<b>E-value</b>	1.1E-03	<b>End</b>	54
<b>% of Identity</b>	78	<b>Aminoacid sequence</b>	CRQCFREYAKDIGFIKYR
<b>Score</b>	30.4	<b>Protein function</b>	40S ribosomal protein S29
<b>Protein ID</b>	PTZ00218		

Tabela XIX – Identificação do gene da amostra 90B no JGI e no GenBank.

<b>90B</b>			
<b><u>JGI Genome Portal Identification</u></b>			
<b>Query Length</b>	344	<b>Aminoacid sequence</b>	SLVNDGPVTLQFDSQNPTAK
<b>E-value</b>	2.6.E-04	<b>Molecular function</b>	Hydrolase activity, acting on ester bonds: D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase
<b>% of Identity</b>	64		
<b>Protein ID</b>	14221		
<b>Frame</b>	1	<b>Biological Process</b>	D-amino acid catabolism
<b>Start</b>	7	<b>Cell Localization</b>	Cytoplasm
<b>End</b>	66		
<b><u>GenBank</u></b>			
<b>Query Length</b>	20	<b>Start</b>	132
<b>E-value</b>	1.1E-03	<b>End</b>	146
<b>% of Identity</b>	73	<b>Aminoacid sequence</b>	SLVNDGPVTLQFDSQ
<b>Score</b>	31.6	<b>Protein function</b>	D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase
<b>Protein ID</b>	PRK05273		

Tabela XX – Identificação do gene da amostra 95BC no JGI e no GenBank.

<b>95BC</b>			
<b><u>JGI Genome Portal Identification</u></b>			
<b>Query Length</b>	1044	<b>Aminoacid sequence</b>	AAQVWSADEKLQMTVYTTAP ALQFYSGNYLGGTTAREHDEY SDWQGLALESEFLPDSPNH
<b>E-value</b>	2.9.E-14	<b>Molecular function</b>	Glycoside hydrolase-type carbohydrate-binding
<b>% of Identity</b>	51		Catalytic activity
<b>Protein ID</b>	36007		Aldose 1-epimerase
<b>Frame</b>	2		
<b>Start</b>	209	<b>Biological Process</b>	Carbohydrate metabolism
<b>End</b>	400	<b>Cell Localization</b>	Unknown
<b><u>GenBank</u></b>			
<b>Query Length</b>	60	<b>Start</b>	268
<b>E-value</b>	4.7E-33	<b>End</b>	319
<b>% of Identity</b>	75	<b>Aminoacid sequence</b>	MKVYTTAPALQFYSGNFLAGT PSRGGGPYADYAGLALESQFLP DSPNHPEWP
<b>Score</b>	115.8	<b>Protein function</b>	Galactose-1-epimerase
<b>Protein ID</b>	PRK11055		

### **3.4. Real-Time PCR:**

A validação dos DEGs foi feita através do Real-Time PCR. Os primers específicos para cada DEG e para os genes de referência (GAPDH, NAD5, 18S1, 18S2 e RPL19) foram testados através de PCR e posteriormente confirmadas por eletroforese em gel de agarose. As amostras que se pretendia utilizar para a validação de genes eram a 95BC, a 4-6-13BH, a 77B, a 71A, a 90B e a P21-6 BH, por serem das quais se conseguiu identificar o gene. No entanto 90B e P21-6 BH foram excluídas por não amplificarem com os primers específicos. Os genes de referência testados em Real-time PCR foram o GAPDH, o NAD5, o 18S1 e o 18S2. O gene da RPL19 foi excluído pois também não se obteve amplificação com os primers específicos.

Realizaram-se inicialmente duas etapas de Real-Time PCR. Na primeira testou-se os genes de referência e na segunda os genes de interesse. Para analisar a expressão de cada gene em Real-Time PCR foi necessário a elaboração de uma reta padrão com as diluições

seriadas das respectivas minipreps e a utilização dos pools de cDNA. Os pools permitiram observar a expressão de cada gene nos diferentes tratamentos.

As reações de Real-Time PCR foram de boa qualidade pois apresentaram os valores de declive,  $R^2$  e de eficiência perto dos esperados, -3,3, 1 e 100%, respetivamente (tabela XXI) e a curva de melting só mostrou um pico. Os genes de referência 18S1 e GAPDH foram excluídos por terem uma eficiência muito baixa (68,81 e 68.59 repetivamente). Embora o gene 77B tem um declive sub-ótimo e uma eficiência demasiado alta foi incluído na análise por se tratar de um DEG.

Tabela XXI – Parâmetros da reação de Real-Time PCR.

Gene	Declive	$R^2$	Eficiência (%)
<b>18S2</b>	-3,283	0,999	101,63
<b>NAD5</b>	-3,250	0,996	103,08
<b>95BC</b>	-3,486	0,998	93,57
<b>4-6-13BH</b>	-3,370	0,992	98,03
<b>77B</b>	-2,660	0,996	137,62

#### **3.4.1. Genes de referência:**

Da análise dos resultados do Real-Time verificou-se que os genes de referência (18S2 e NAD5) eram amplificados em ciclos diferentes e muito distantes uns dos outros entre diferentes tratamentos (figuras 13A e 14A) embora as concentrações nominais de ácidos nucleicos na reação fossem iguais. Com base na regressão estabelecida entre os respetivos ciclos, Cts (ciclo a partir do qual a fluorescência do produto de amplificação acumulado excede a fluorescência de fundo da amostra e que depende da quantidade inicial de cDNA do transcrito) e as concentrações das diluições das minipreps foi possível obter a quantidade expressa dos genes 18S2 e NAD5 (figuras 13B e 14B) nos quatro tratamentos. Em ambos os casos a expressão nas amostras de pH 7 é muito maior do que nas restantes. Verificou-se assim não ser possível a utilização destes genes como genes de referência para normalizar a expressão dos genes de interesse a um padrão interno que é estável independentemente do tratamento, o que é essencial para permitir a comparação entre tratamentos. Caso estes genes (18S2 e NAD5) tivessem mostrado um nível de expressão estável entre tratamentos ter-se-ia aplicado o método Relative Standard Curve (RSC) para quantificação dos níveis de expressão de cada gene de interesse. Este método requer que, em cada amostra, sejam quantificados quer a expressão dos genes de referência quer a

expressão dos genes de interesse. A normalização e o cálculo da taxa de expressão relativa a um dos tratamentos ou a um controlo requerem os seguintes cálculos:

Passo 1 – Situação do Ct da amostra na curva padrão:

$$\text{Amostra (ng)} = 10^{\frac{\text{Ct amostra- interação}}{\text{declive da reta}}} \text{ (Equação 9)}$$

Passo 2 – Normalização ao controlo interno (ex: NAD5, se mais de um gene de referência é usado, usa-se a média geométrica):

$$\text{Amostra (NAD5}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Amostra (ng)}}{\text{NAD5 (ng)}} \text{ (Equação 8)}$$

Passo 3 – Cálculo da taxa de expressão (fold change):

$$\text{Fold change} = \frac{\text{Amostra (ng)}}{\text{Controlo (ng)}} \text{ (Equação 10)}$$

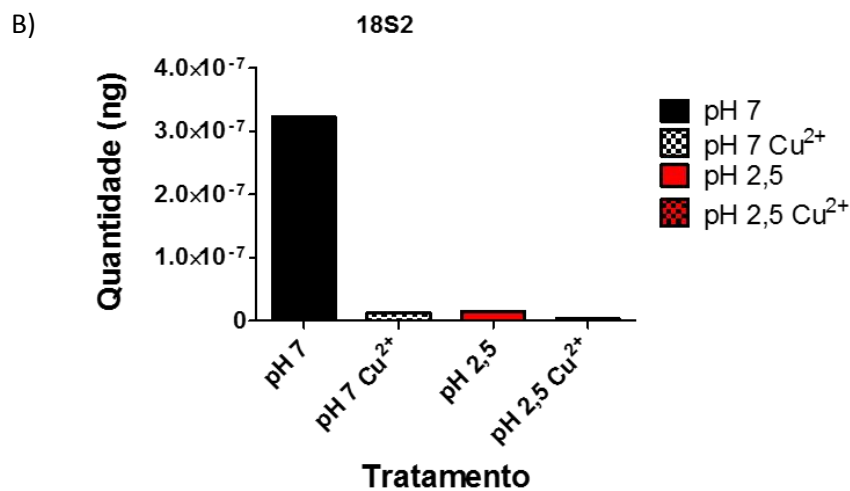
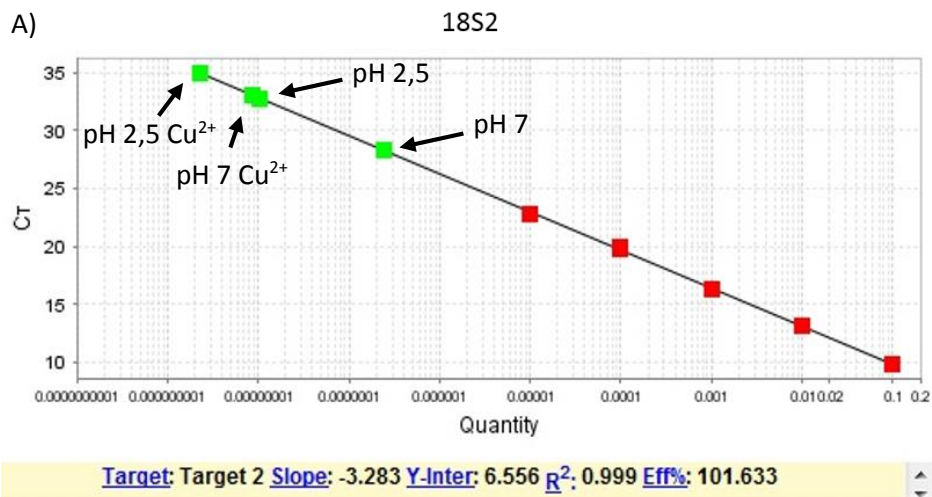


Figura 13 – Real-Time PCR (A) em que ■ representam os pontos da reta padrão e ■ representam os pontos do gene 18S2 para os diferentes tratamentos. Expressão do gene 18S2 (B) nos diferentes tratamentos, obtida através da regressão estabelecida entre os ciclos (Cts) e as concentrações das diluições das minipreps. Cu<sup>2+</sup> representa os tratamentos em que as células foram expostas a cobre.

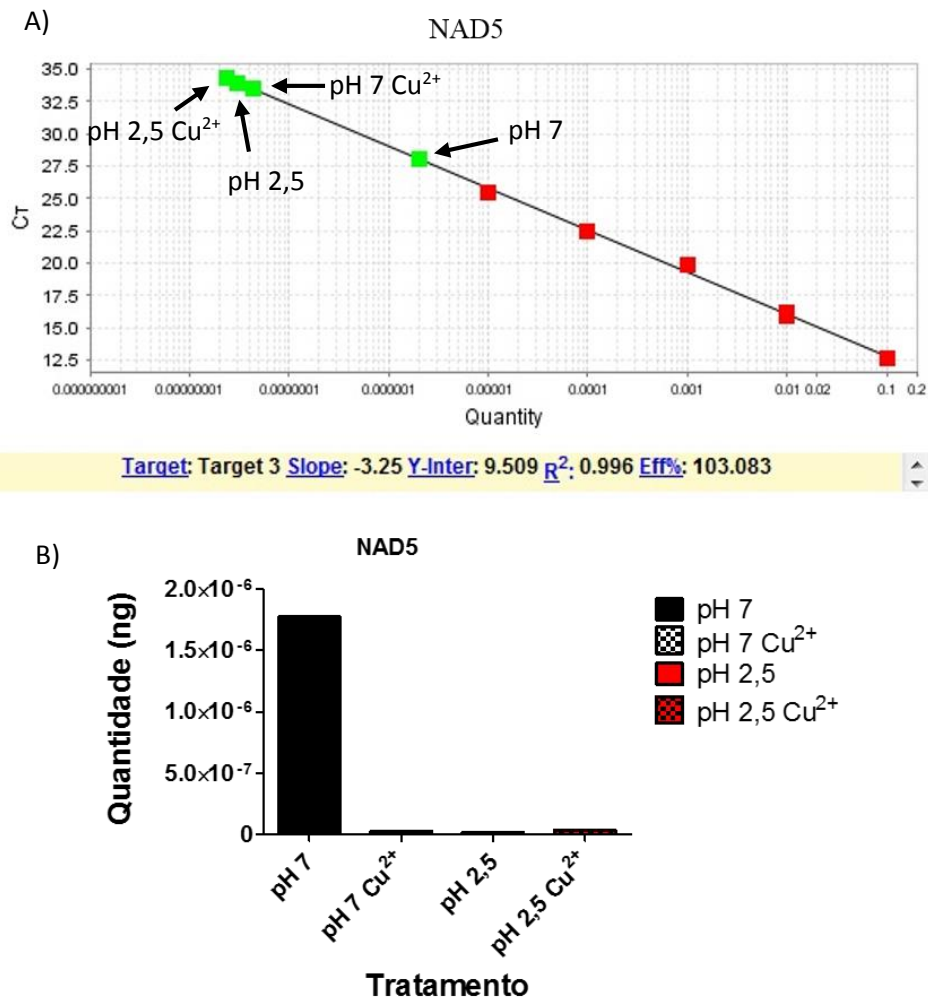


Figura 14 – Real-Time PCR (A) em que ■ representam os pontos da reta padrão e ■ representam os pontos do gene NAD5 para os diferentes tratamentos. Expressão do gene NAD5 (B) nos diferentes tratamentos obtida através da regressão estabelecida entre os ciclos (Cts) e as concentrações das diluições das minipreps. Cu<sup>2+</sup> representa os tratamentos em que as células foram expostas a cobre.

### 3.4.2. Genes de interesse:

Não tendo sido identificados genes de referência, a expressão relativa dos genes de interesse 95BC, 71A, 4-6-13BH e 77B foi calculada, nomeadamente em cada tratamento, como uma razão gene de interesse/gene de referência. Assim, o gene de interesse foi normalizado tendo em conta a expressão do respetivo padrão interno. O valor de razão foi obtido ao dividir a expressão dos genes em cada tratamento pela média geométrica dos genes de referência. A expressão dos genes de interesse foi obtida através da regressão estabelecida entre os ciclos (Cts) e as concentrações das diluições das minipreps.

A pH 7, a expressão dos genes 4-6-13BH (Proteína S13) e 77B (Proteína S14) em relação à expressão dos respetivos genes de referência, considerados como padrões internos, foi

maior com valores de 5,09 e 2,74 respectivamente (figuras 15A e B). Nos tratamentos de pH 7  $\text{Cu}^{2+}$  verifica-se que a expressão dos mesmos genes é menor comparativamente com a dos seus padrões internos (0,09 e 0,05 respectivamente). Nos genes 95BC (Aldose 1-Epimerase) e 71A (Translation release factor) observa-se o efeito oposto ao dos genes 4-6-13BH e 77B. Em que a sua expressão, apesar de ser menor quando comparada com os padrões internos, é maior a pH 7  $\text{Cu}^{2+}$  (0,159 e 0,034 respectivamente) e menor a pH 7 (aproximadamente 0,002 para ambos os casos, figuras 16A e B).

No pH 2,5 não se detetou expressão do gene 71A e no pH 2,5  $\text{Cu}^{2+}$  não se detetou expressão dos genes 71A e 4-6-13BH. Os genes 95BC e 77B são menos expressos que os seus respetivos padrões internos no tratamento de pH 2,5 com valores de razão de 0,046 e 0,014 e de 0,035 e 0,005 a pH 2,5  $\text{Cu}^{2+}$  respectivamente.

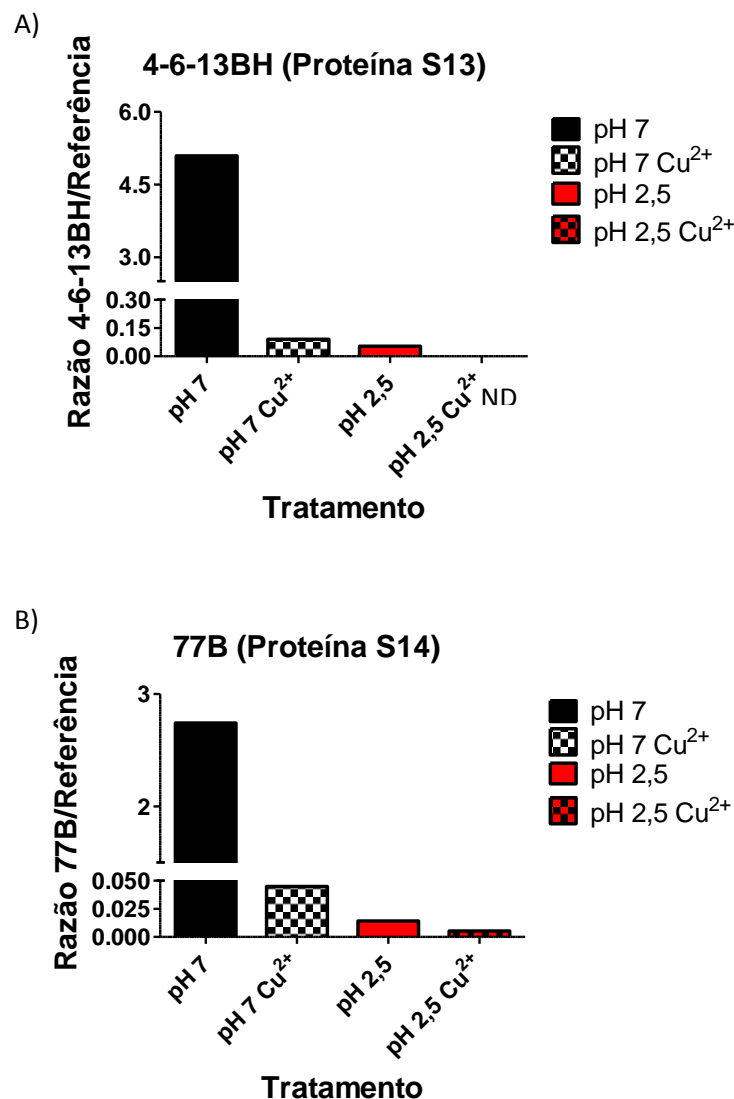


Figura 15 – Expressão relativa dos genes 4-6-13BH (A) e 77B (B) nos diferentes tratamentos.  $\text{Cu}^{2+}$  representa os tratamentos em que as células foram expostas a cobre e ND representa os genes cuja expressão não foi detetada em Real-Time PCR.

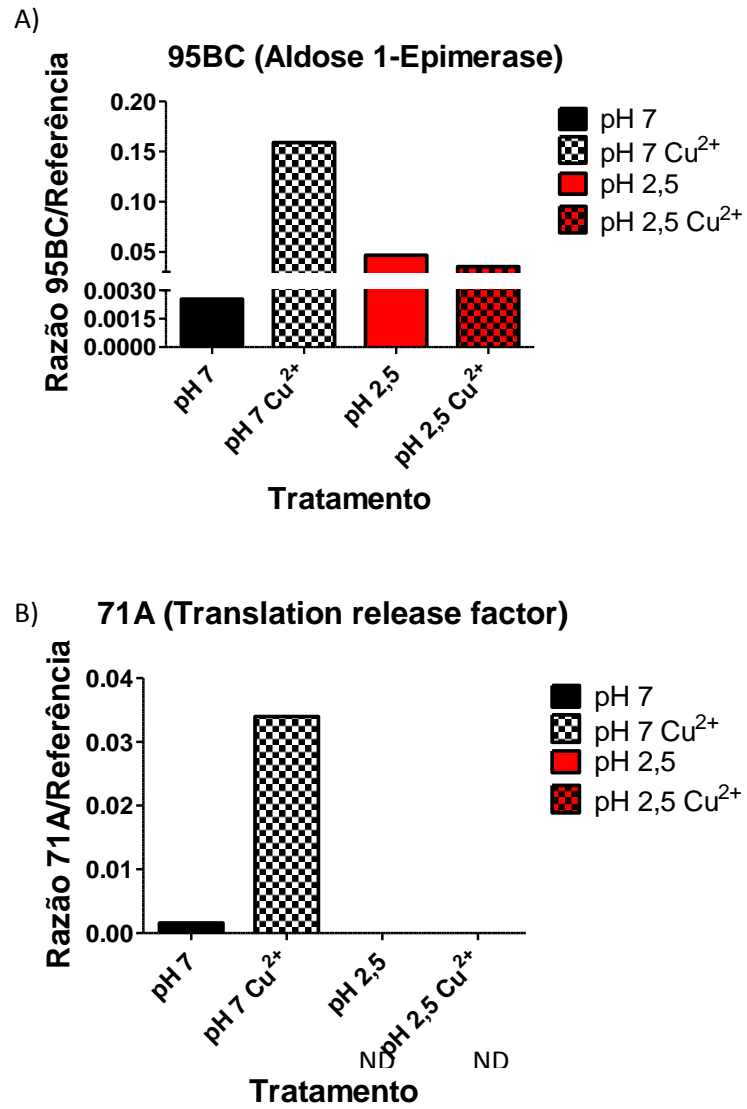


Figura 16 – Expressão relativa dos genes 95BC (A) e 71A (B) nos vários tratamentos. Cu<sup>2+</sup> representa os tratamentos em que as células foram expostas a cobre e ND representa os genes cuja expressão não foi detetada em Real-Time PCR.

#### **4. Discussão:**

O objetivo deste capítulo foi a identificação e quantificação de genes diferencialmente expressos (DEGs) de culturas da microalga *Coccomyxa* sp. mantidas a pH 7 e pH 2,5 expostas ou não a cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ).

Neste trabalho pretendia-se a detecção de DEGs de uma forma rápida e precisa (sem falsos positivos) e para isso foi utilizado o kit comercial GeneFishing™ DEG Premix Kit da SeeGene (Ogeum-ro, Songpa-gu, Seul, Coreia). Este kit foi reportado em estudos para detectar genes diferenciais em *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella* UMACC 234 provocados pela exposição a ferro e em resposta a temperaturas baixas, respectivamente (Wan *et al.*, 2014; Chong *et al.*, 2011).

Das catorze amostras sequenciadas apenas de seis (95BC, 4-6-13BH, 77B, 71A, 90B e P21-6 BH) se conseguiu identificar os genes que codificam. Para a validação dos genes obtidos realizou-se a reação de Real-Time PCR. Este método é preciso a quantificar as alterações da expressão de genes e pode ser usado em situações em que a quantidade de RNA é limitada. Tem a desvantagem de ser fundamental a seleção de um método de normalização, de modo a que os resultados da quantificação da expressão genômica sejam fiáveis (Brunner *et al.*, 2004). Os genes de referência escolhidos foram o 18S (18S1 e 18S2), o NAD5, o GAPDH e o RPL19 por serem genes cuja expressão teoricamente não é alterada (housekeeping) e por serem reportados como os mais utilizados para microalgas (Liu *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015). O 18S2 e o NAD5 amplificaram em ciclos diferentes e muito distantes uns dos outros entre diferentes tratamentos, recordando que cada ciclo de diferença representa uma variação de  $2^n$  de expressão a partir do mesmo material, por exemplo, 5 ciclos de diferença correspondem a  $2^5$  de diferença da quantidade de expressa entre eles. Verificou-se assim não ser possível a utilização destes genes como referência para normalizar a expressão dos genes de interesse a um padrão interno. Uma vez que o RNA e o cDNA, dos diferentes tratamentos, foram obtidos e utilizados da mesma forma e na mesma concentração, demonstra que as diferenças de expressão observadas indicam uma drástica alteração genética das células da microalga em resposta aos tratamentos. Portanto estes genes, para este trabalho, não puderam ser usados como genes de referência. No entanto foi calculada a razão gene de interesse/gene de referência, que é considerada como expressão relativa, no entanto a comparação entre tratamentos não é possível.

Nas células de *Coccomyxa* sp. mantidas a pH 7, os genes 4-6-13BH e 77B codificam para proteínas ribossomais, nomeadamente a proteína S13 e S14 respetivamente. O facto de a sua expressão ser maior do que a expressão dos seus padrões internos demonstra que, para este trabalho, o 18S não é um bom gene de referência. Para além disso, estes genes são indicadores que as células da microalga, nesse pH, não estariam em condições ótimas, pois os genes 4-6-13BH e 77B são fundamentais no processo de tradução (Bernstein *et al.*, 2004; Vladtmirov *et al.*, 1996). No tratamento de pH 7 Cu<sup>2+</sup> verifica-se que a expressão dos genes 95BC (Aldose 1-Epimerase) e 71A (Translation release factor), apesar de ser em menor quantidade quando comparada com os padrões internos, é maior por parte das células da microalga. Neste tratamento *Coccomyxa* sp., tem o metabolismo do carbono e os mecanismos de tradução alterados. O “Translation release factor”, identificado neste trabalho, é necessário na fase de terminação da tradução (Tuite e Stansfield, 1994), a sua expressão indica que as células, nesse tratamento, têm a necessidade de traduzirem rapidamente para que os ribossomas ficassem de novo disponíveis. A aldose-1-epimerase é um enzima que participa no metabolismo do carbono, mais precisamente no processo de glicólise, ao transformar  $\alpha$ -glucose em  $\beta$ -glucose (Timson e Reece, 2003) A sua expressão indica a necessidade das células da microalga nesse tratamento em produzir e disponibilizar energia. As células dos dois tratamentos de pH 2,5 tinham comportamentos semelhantes, em que a expressão dos genes de interesse em relação à expressão dos padrões é menor para todos os genes. Este efeito mostra que o pH ácido afetou o metabolismo celular e o equilíbrio dinâmico das células da microalga. Contudo, a exposição ao cobre só teve influência quando adicionado às culturas a pH 7.

O estudo de genes de microalgas poderá ser útil na descoberta de novas vias metabólicas e novos enzimas que estes microrganismos utilizam na sua adaptação a ambientes extremos. No entanto, em vista dos resultados deste estudo, será preciso estabelecer novos genes de referência que permitam normalizar a expressão e assim poder comparar os efeitos dos tratamentos experimentais de uma forma robusta.

## **IV. Avaliação da potencial a atividade biológica de extratos celulares provenientes das diferentes condições de cultivo num modelo epitelial animal ex-vivo**

### **1. Introdução**

Os extratos celulares de espécies de *Coccomyxa* têm sido descritos como possuindo metabolitos com grande interesse farmacológico e com potencial na prevenção e no tratamento de várias patologias. Por exemplo, extratos de *Coccomyxa gloeobotrydiformis* revelam um potencial efeito neuroprotetivo (Sun *et al.*, 2013) e uma ação antiviral no “combate” à infecção pelo vírus *influenza A* humano (Komatsu *et al.*, 2013). Para testar a potencial atividade de extratos de *Coccomyxa* sp., obtidos de diferentes tratamentos (pH 7 e pH 2,5 com e sem cobre), utilizou-se o epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus*. Os epitélios têm como características principais a polaridade e a seletividade. As “tight junctions” separam a membrana apical da membrana basolateral e a sua formação e permeabilidade determinam a resistência e integridade do tecido que é eletricamente reportada pela resistência do tecido (Rt). A distribuição assimétrica de proteínas (transportadores de membrana) no lado apical e basolateral determina a polaridade. Essa assimetria provoca uma voltagem transepitelial (Vt) denominada potencial de transporte ativo. O movimento de cargas entre o lado basolateral e apical (e vice-versa) gera uma voltagem que é igual à diferença de voltagens entre os dois lados da membrana. A corrente é uma medida diretamente proporcional ao transporte iônico, bem como, da absorvidade e da secreção do tecido (Li *et al.*, 2004; Clarke, 2009).

A espécie *Fundulus heteroclitus*, pertencente à família Fundulidae do filo Chordata, tem como principal característica possuir um epitélio opercular rico em células secretoras de cloro (Cl<sup>-</sup>, Karnaky, 1977; Karnaky e Kinter, 1977). O fluxo de Cl<sup>-</sup> que atravessa o epitélio é controlado pelo Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) e pelo cotransportador Na, K, Cl (NKCC). O CFTR tem um papel fundamental na absorção e secreção trans-epitelial de íons cloreto (Cl<sup>-</sup>). A deficiência ou o mau funcionamento destes canais no epitélio membranar de algumas células secretoras pode levar a patologias associadas à fibrose cística. Por outro lado, a estimulação excessiva destes canais provocada por toxinas bacterianas causa graves diarreias (Reddy e Quinton, 1999). O

NKCC tem um papel importante na regulação do volume celular e da concentração de  $\text{Cl}^-$  celular (Insering *et al.*, 1998, Haas e Forbush III, 2000). A deficiência no seu funcionamento leva à desregulação do equilíbrio iónico e de água nas células (Haas e Forbush III, 2000). O CFTR e o NKCC permitem o fluxo trans-epitelial de iões  $\text{Cl}^-$  e têm como inibidores específicos os diuréticos de ansa, tais como, o Bumetanide ou a Furosemida (Haas e Forbush III, 2000 e Ju *et al.*, 2013). Estes diuréticos são muito utilizados para tratar edemas e hipertensão devidos à insuficiência cardíaca congestiva (Qavi *et al.*, 2015) e aguda e à insuficiência renal (Palazzuoli *et al.*, 2015).

Este capítulo tem como objetivo testar a potencial atividade dos extratos, das culturas de *Coccomyxa* sp. a pH 7 e pH 2,5 exposta ou não a cobre, no epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing.

## **2. Metodologia**

### **2.1. *Fundulus heteroclitus*:**

Os indivíduos da espécie *Fundulus heteroclitus* ( $4,67 \pm 0,15$  g) foram capturados com redes de pesca no Estero La Leocadia (Baía de Cádiz, Espanha) e mantidos em aquários de vidro com filtro biológico e com salinidade de 35 ppt, à temperatura de 21°C e num fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de sem luz. Os peixes foram anestesiados com 2-fenoxietanol (1:2000), sacrificados por decapitação e a cabeça transferida para uma solução salina (99,7:0,3  $\text{O}_2/\text{CO}_2$ ). Todas as manipulações animais estiveram de acordo com a diretiva do Conselho da União Europeia (86/609/EU) e com a legislação portuguesa e espanhola para o uso de animais no laboratório. Todos os protocolos animais foram efetuados sob a licença de Grupo-C da Direcção-Geral de Veterinária, Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas (Portugal).

### **2.2. Câmaras de Ussing:**

Os epitélios retirados dos opérculos de *Fundulus heteroclitus* foram colocados num “insert” com  $0,2 \text{ cm}^2$  (figura 17A) que posteriormente foi colocado nas câmaras de Ussing (figura 17B, Ussing e Zerahn, 1950). As câmaras de Ussing possuem dois compartimentos que representam os dois lados da membrana epitelial (basolateral e

apical), um orifício grande onde é colocado o insert e orifícios mais pequenos onde são colocados os dois elétrodos de voltagem e dois de injeção de corrente. Após se introduzir o insert com o epitélio opercular na câmara, os compartimentos da mesma foram preenchidos com solução salina (tabela XXII).

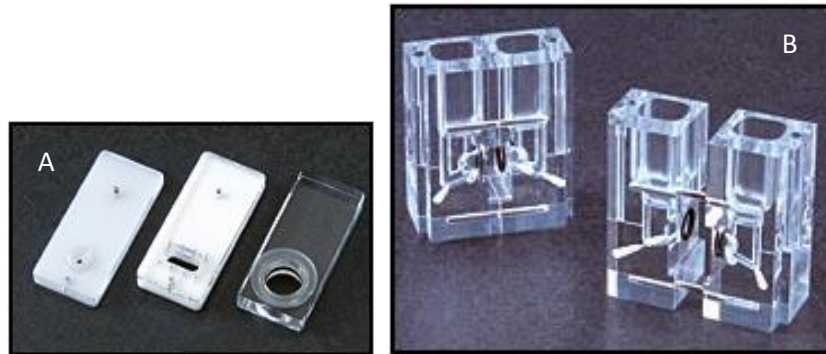


Figura 17 – Exemplos de “inserts” (A) utilizados em câmaras de Üssing (B). Adaptado de [www.warneronline.com/product\\_info.cfm?id=550](http://www.warneronline.com/product_info.cfm?id=550) (02/09/15)

A medição da voltagem e da corrente foi detetada por elétrodos de Ag/AgCl ligados à câmara de Ussing por pontes de agar de 3 mm (KCl 3 M em 3% de agar, Fuentes *et al.*, 2006).

### **2.3. Corrente de curto-circuito:**

O processo de secreção de  $\text{Cl}^-$  é importante para manter a osmolaridade do meio intracelular. O transporte de  $\text{Cl}^-$  desde o lado basal até ao lado apical pode ser medido através do método de “voltage clamp” a 0 mV, sob a forma de corrente “short circuit current” ( $I_{sc}$ , Hoffmann *et al.*, 2002). O método de “voltage clamp” tem como base a lei de Ohm ( $R = V/I$ , em que R representa a resistência, V representa a voltagem e I representa a Intensidade) considerando o valor de resistência constante. Deste modo, foi obtido o valor de corrente necessária a injetar para que a voltagem fosse anulada. A  $I_{sc}$  é uma medida diretamente proporcional ao transporte iónico, assim como, da absortividade e da secreção do tecido. O “clamping” do epitélio para 0 mV e as injeções de corrente foram geradas por um amplificador DVC-1000 (World Precision Instruments, Sarasota, USA) de “voltage current clamp” com correção automática para a resistência do fluido e para a assimetria da voltagem.

#### **2.4. Ensaio de bioatividade:**

Para o ensaio de bioatividade foram utilizadas amostras de *Coccomyxa* sp. provenientes das diferentes condições de cultivo, pH 7 e pH 2,5 com e sem cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Com base nas concentrações celulares, foi adicionada solução salina normal ou sem íons cloreto ( $\text{Cl}^-$ , tabela XXII, Martos-Sitcha *et al.*, 2015) de modo a que cada amostra apresentasse a mesma concentração celular ( $10^6$  células/ml).

Tabela XXII – Constituintes da solução salina (pH 7,8) normal e sem íons  $\text{Cl}^-$ .

<b>Constituintes</b>	<b>Normal (mM)</b>	<b>Sem <math>\text{Cl}^-</math> (mM)</b>
<b>Cloreto de sódio</b>	160	-
<b>Gluconato de sódio</b>	-	160
<b>Sulfato de magnésio</b>	0.93	0.93
<b>Fosfato de sódio</b>	3	3
<b>Cloreto de cálcio</b>	1.5	-
<b>Gluconato de cálcio</b>	-	5
<b>Bicarbonato de sódio</b>	17.85	17.85
<b>Cloreto de potássio</b>	3	-
<b>Gluconato de potássio</b>	-	3
<b>Glicose</b>	5.5	5.5
<b>HEPES</b>	5	5

As amostras foram ressuspensas, transferidas para tubos de 2 ml com tampa de rosca e homogeneizadas a 6800 rpm, em três ciclos de 30 segundos com uma pausa de 30 segundos entre cada ciclo (Precellys 24, Rockville, Maryland, USA). Cada extrato obtido foi adicionado a um dos compartimentos, basolateral ou apical conforme a experiência, das câmaras de Ussing a duas concentrações ( $10^6$  e  $10^7$  células/ml).

#### **2.5. Recolha e análise de dados:**

Os registos de parâmetros bioelétricos foram recolhidos e guardados em um computador através de um sistema de aquisição de dados Lab-Trax-4 (World Precision Instruments, Sarasota, USA). Todos os dados obtidos foram submetidos a uma análise estatística através do software Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, USA). A

significância estatística foi determinada através dos testes two-way ANOVA e t-test. Considerou-se os valores de  $p < 0,05$  como amostras significativamente diferentes.

### **3. Resultados**

#### **3.1. Valores basais:**

Antes da adição dos extratos celulares às câmaras de Ussing, registaram-se os parâmetros bioelétricos basais (média e respectivos erros padrão) para a solução salina normal e sem íons cloreto (tabelas XXIII). Verificou-se que nos ensaios com solução normal (na presença de  $\text{Cl}^-$ ), a média dos valores de  $I_{sc}$  e  $V_t$  estava acima dos valores pré-estabelecidos ( $I_{sc} > 60 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  e  $V_t > 3.6 \text{ mV}$ ), o que significa que existiu passagem de  $\text{Cl}^-$  através do epitélio opercular. No caso dos ensaios com a solução salina sem  $\text{Cl}^-$ ,  $I_{sc}$  e  $V_t$  tinham valores próximos de zero. Esta diferença demonstra a dependência da existência de corrente e da presença de  $\text{Cl}^-$ . A média dos valores de  $R_t$  estava acima do esperado ( $R_t > 60 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) para ambas as soluções. Uma vez que  $R_t$  representa a integridade do epitélio, toda a corrente medida foi devido à passagem dos íons pelo mesmo.

Tabela XXIII – Valores basais (média  $\pm$  erro padrão) dos parâmetros bioelétricos do epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Solução salina com íons cloreto ( $n=46$ ) e solução salina sem íons cloreto ( $n=6$ ). Em que  $n$  corresponde ao número de epitélios usados;  $I_{sc}$  corresponde à corrente de curto-circuito;  $R_t$  corresponde à resistência epitelial; e  $V_t$  corresponde à voltagem.

<b>Parâmetros</b>	<b>Solução salina com íons cloreto</b>	<b>Solução salina sem íons cloreto</b>
<b><math>I_{sc}</math> (<math>\mu\text{A}/\text{cm}^2</math>)</b>	$81,9 \pm 7,2$	$3,4 \pm 2,6$
<b><math>R_t</math> (<math>\Omega \cdot \text{cm}^2</math>)</b>	$68,5 \pm 5,5$	$62,4 \pm 16,5$
<b><math>V_t^*</math> (mV)</b>	$5,14 \pm 0,55$	$0,09 \pm 0,05$

\*Medido em circuito aberto prévio ao “voltage clamp”.

### **3.2. Efeito de extratos celulares, em solução salina sem Cl<sup>-</sup>, no epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* (lado basolateral):**

Os resultados apresentados na tabela XXIII confirmam que nestas condições experimentais a  $I_{sc}$  é uma medida direta do fluxo de iões Cl<sup>-</sup>. Para isso, utilizou-se a solução salina sem iões Cl<sup>-</sup> nos compartimentos das câmaras de Ussing. Os extratos celulares dos 4 tratamentos (pH 7 e pH 2,5 com e sem Cu<sup>2+</sup>) foram ressuspensos numa solução salina sem iões Cl<sup>-</sup> e adicionados no lado basolateral do epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado na câmara de Ussing a duas concentrações (10<sup>6</sup> e 10<sup>7</sup> células/ml). Deste modo, verificou-se se os extratos poderiam ter alguma influência nos valores de  $I_{sc}$  medidos. Observou-se que não existiam efeitos na  $I_{sc}$ , uma vez que os valores são zero ou próximos de zero, quer entre as duas concentrações testadas para cada tratamento quer entre os diferentes tratamentos (figura 18A e 19A). Em relação à resistência, verificou-se que a variação dos valores para as duas concentrações e para cada tratamento foi aproximadamente zero, o que significa que a resistência foi constante durante toda a experiência (figura 18B e 19B). Quando se compara os valores de  $I_{sc}$  dos diferentes extratos verificou-se que as diferenças observadas não foram significativas (interação: p=0,18; pH: p=0,49; e Cu<sup>2+</sup>: p=0,18) e que o mesmo se verifica para os valores de  $R_t$  (interação: p=42,16; pH: p=42,16; e Cu<sup>2+</sup>: p=1,39) (figura 20A e B).

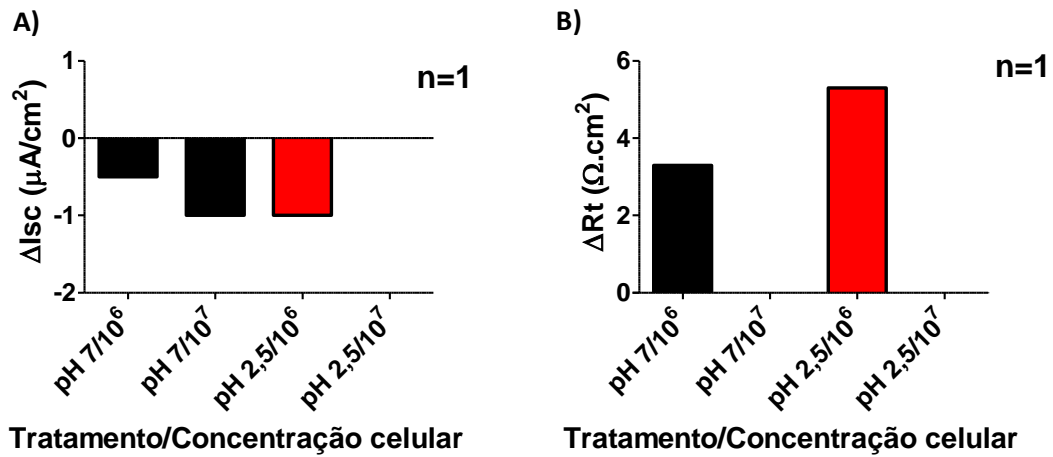


Figura 18 – Variação na corrente de curto-circuito ( $\Delta I_{sc}$ ,  $\mu A/cm^2$ ) (A) e diferença de resistência epitelial ( $\Delta R_t$ ,  $\Omega \cdot cm^2$ ) (B) em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. de pH 7 e pH 2,5 com 10<sup>6</sup> (pH 7/10<sup>6</sup> e pH 2,5/10<sup>6</sup>) e 10<sup>7</sup> (pH 7/10<sup>7</sup> e pH 2,5/10<sup>7</sup>) de células/ml aplicados no lado basolateral do epitélio em solução salina sem Cl<sup>-</sup>.

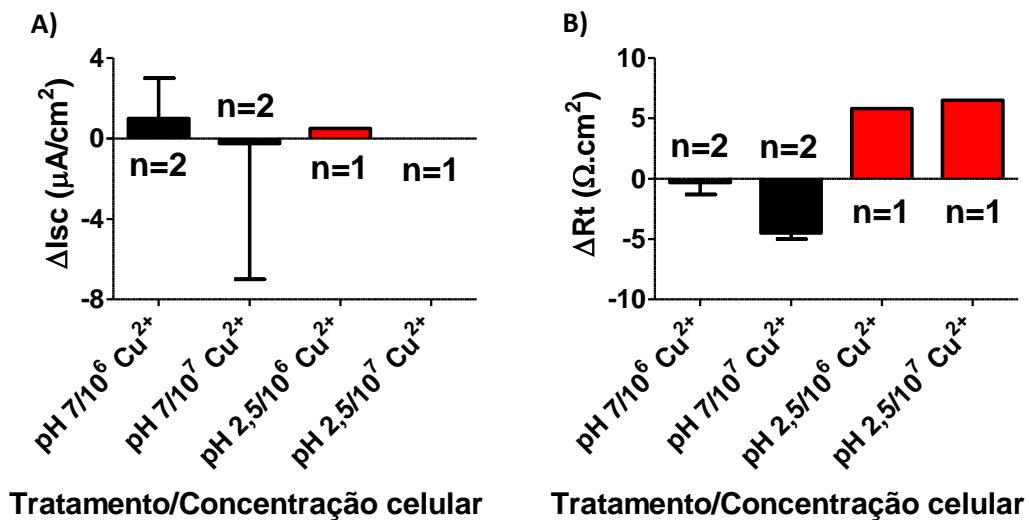
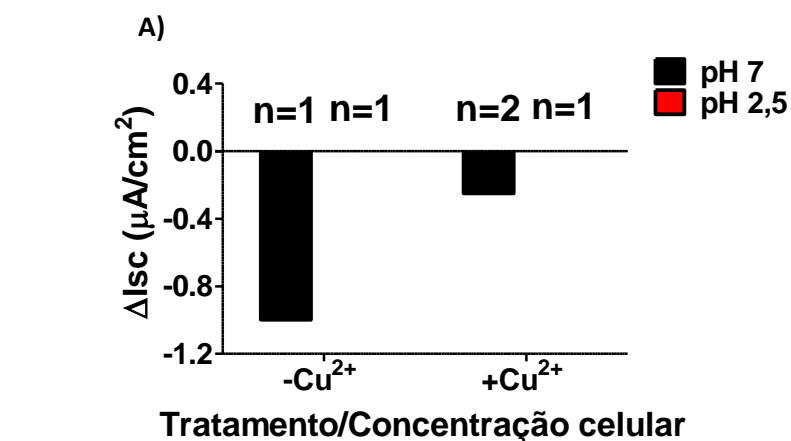
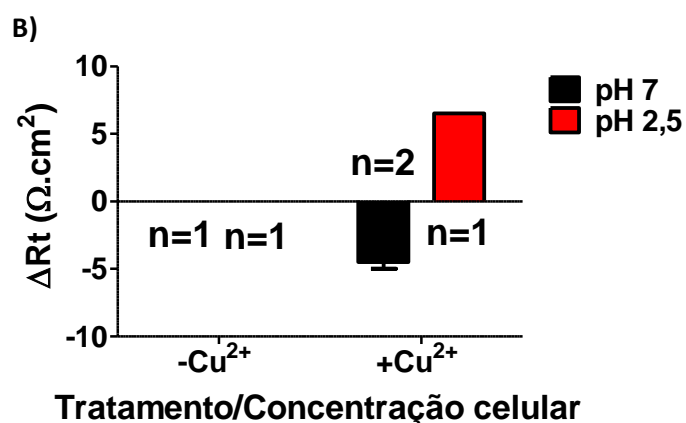


Figura 19 – Variação na corrente de curto-circuito ( $\Delta I_{sc}$ ,  $\mu A/cm^2$ ) (A) e diferença de resistência epitelial ( $\Delta R_t$ ,  $\Omega \cdot cm^2$ ) (B) em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. de pH 7 e pH 2,5, expostos a Cu<sup>2+</sup> (0,6 mM), com 10<sup>6</sup> (pH 7/10<sup>6</sup> e pH 2,5/10<sup>6</sup>) e 10<sup>7</sup> (pH 7/10<sup>7</sup> e pH 2,5/10<sup>7</sup>) de células/ml aplicados no lado basolateral do epitélio em solução salina sem Cl<sup>-</sup>.



Two-way ANOVA

Fonte de Variação	Varição total (%)	Valor de p
pH	0,49	0,9555
$Cu^{2+}$	0,18	0,9733
Interação	0,18	0,9733



Two-way ANOVA

Fonte de Variação	Varição total (%)	Valor de p
pH	42,16	0,0762
$Cu^{2+}$	1,39	0,3720
Interação	42,16	0,0762

Figura 20 – Variação na corrente de curto-circuito ( $\Delta I_{sc}$ ,  $\mu A/cm^2$ ) (A) e variação de resistência epitelial ( $\Delta R_t$ ,  $\Omega.cm^2$ ) (B) em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. de diferentes condições de cultivo aplicados no lado basolateral do epitélio opercular em solução salina sem íons  $Cl^-$ . Respetivas tabelas com os valores obtidos através do teste estatístico two-way ANOVA, considerando como fatores principais o pH de cultura, a presença de  $Cu^{2+}$  e a interação entre pH e  $Cu^{2+}$ .

### 3.3. Efeito de extratos celulares, em solução salina com Cl<sup>-</sup>, no epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* (lado apical):

De seguida, testou-se o efeito dos extratos celulares de *Coccomyxa* sp., em solução salina com iões Cl<sup>-</sup> (normal), no lado apical do epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus*. Os extratos celulares dos tratamentos de pH 7 e pH 2,5 foram ressuspensos numa solução salina normal. Estes extratos foram aplicados no lado apical do epitélio com a concentração de 10<sup>7</sup> células/ml. O que se verificou é que não existe quase nenhuma resposta epitelial à ação por parte dos extratos dos dois tratamentos, pois os valores de I<sub>sc</sub> permaneceram quase constantes (figura 21A e B).

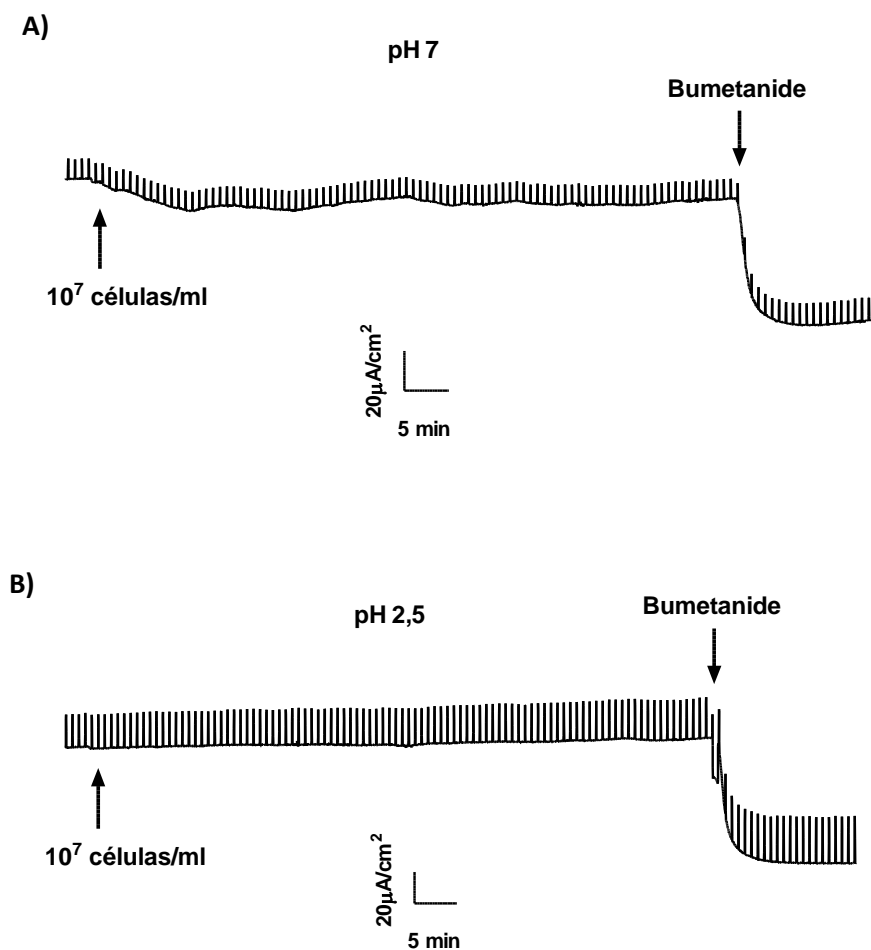


Figura 21 – Registo original de corrente de curto-circuito (I<sub>sc</sub>,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. aplicados no lado apical do epitélio opercular: A- extrato de cultura a pH 7; B – extrato de cultura a pH 2,5. O diurético bumetanide (100  $\mu\text{M}$ ) foi aplicado posteriormente no lado basolateral para demonstrar a existência de corrente de Cl<sup>-</sup> na direção basolateral para apical. As barras verticais de corrente em períodos regulares correspondem a pulsos de voltagem de 1 mV e são utilizados para o cálculo de resistência epitelial (R<sub>t</sub>,  $\Omega.\text{cm}^2$ ) usando a lei de Ohm.

Os valores de  $\Delta I_{sc}$  obtidos foram próximos de zero para ambos os tratamentos (pH 7 e pH 2,5), ou seja, o fluxo de  $Cl^-$  através do epitélio não sofreu alterações (figura 22A). Os extratos não demonstraram ter efeito fisiológico sobre o fluxo de  $Cl^-$  através do epitélio opercular, quando aplicados no lado apical. Em relação a  $\Delta R_t$  (figura 22B) apresentou valores próximos de zero, ou seja, a resistência foi constante ao longo de toda a experiência, o que comprovou que a  $I_{sc}$  medida foi devido ao fluxo iônico através do epitélio.

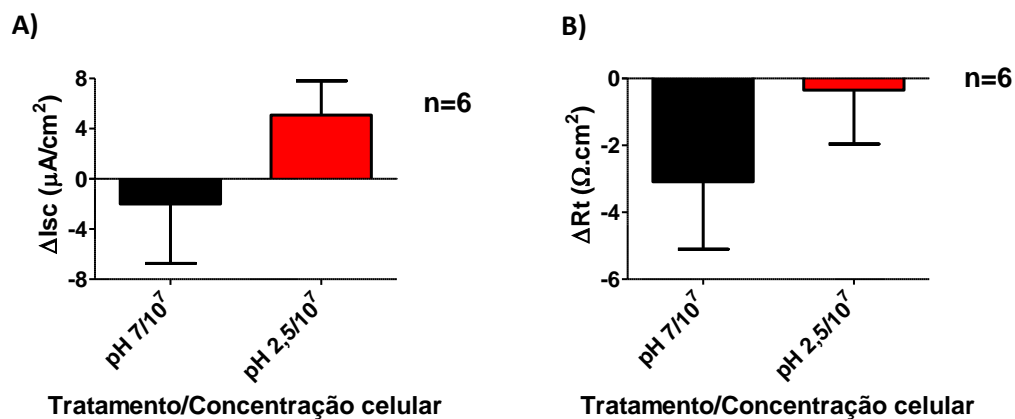


Figura 22 – Variação na corrente de curto-circuito ( $\Delta I_{sc}$ ,  $\mu A/cm^2$ ) (A) e na resistência epitelial ( $\Delta R_t$ ,  $\Omega.cm^2$ ) (B) em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. a pH 7 e pH 2,5 com  $10^7$  (pH 7/ $10^7$  e pH 2,5/ $10^7$ ) de células/ml aplicados no lado apical do epitélio.

### **3.4. Efeito de extratos celulares, em solução salina com iões $Cl^-$ , no epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* (lado basolateral):**

#### **3.4.1 Efeito de extratos das culturas de *Coccomyxa* sp. a pH 7 e a pH 2,5:**

Após se ter testado o efeito dos extratos no lado apical do epitélio, pretendeu-se observar o efeito dos mesmos no lado basolateral. Os extratos da microalga a pH 7 e pH 2,5, ressuspendidos em solução salina normal, foram aplicados no lado basolateral a duas concentrações ( $10^6$  e  $10^7$  células/ml) (figura 23A e B). Em primeiro lugar foram aplicados os extratos com  $10^6$  células/ml, após os valores de  $I_{sc}$  estabilizarem aplicou-se os extratos com  $10^7$  células/ml do respetivo tratamento. Em ambos os tratamentos, a concentração mais baixa provocou uma pequena descida dos valores de  $I_{sc}$ . Quando se aplicou os

extratos mais concentrados ( $10^7$  células/ml) verificou-se uma maior resposta fisiológica por parte do epitélio em relação aos extratos menos concentrados.

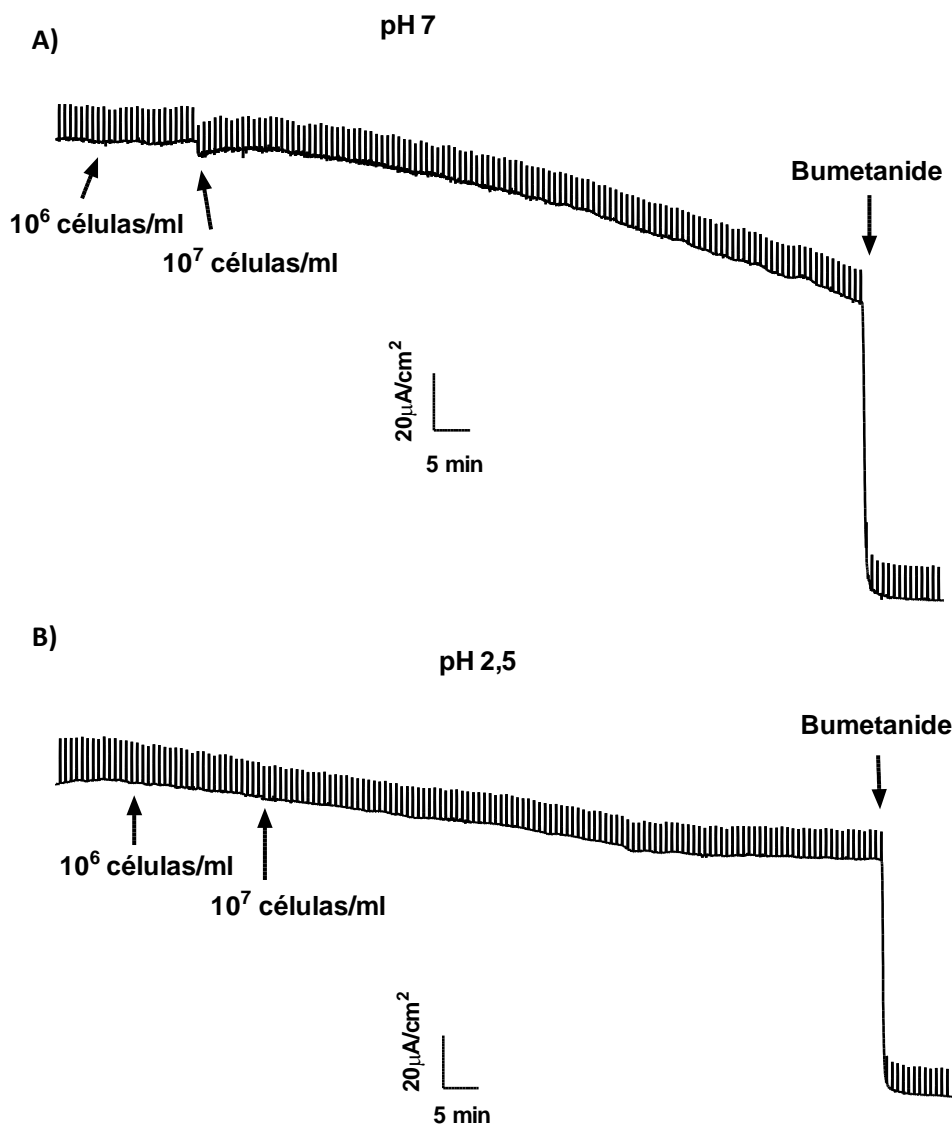


Figura 23 – Registo original de corrente de curto-circuito ( $I_{sc}$ ,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. aplicados no lado basolateral do epitélio opercular: A – extrato de cultura a pH 7; B – extrato de cultura a pH 2,5. O diurético bumetanide (100  $\mu\text{M}$ ) foi aplicado posteriormente no lado basolateral para demonstrar a existência de corrente de  $\text{Cl}^-$  na direção basolateral para apical. As barras verticais de corrente em períodos regulares correspondem a pulsos de voltagem de 1 mV e são utilizados para o cálculo de resistência epitelial ( $R_t$ ,  $\Omega.\text{cm}^2$ ) usando a lei de Ohm.

Quando comparados os valores de  $\Delta I_{sc}$  (figura 24A) observou-se que os extratos a pH 2,5 ( $10^6$  células/ml) provocaram uma diferença de  $-11 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  enquanto que a diferença dos de pH 7 à mesma concentração foi de  $-2,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Ao adicionar-se os extratos mais concentrados ( $10^7$  células/ml) os valores  $\Delta I_{sc}$  apenas diminuíram para  $-13$  e  $-19 \mu\text{A}/\text{cm}^2$

para o pH 7 e pH 2,5 respetivamente. Os extratos em ambos os casos provocaram um efeito fisiológico semelhante (tanto para  $10^6$  como para  $10^7$  células) no lado basolateral do epitélio opercular, que resultou na diminuição do fluxo de  $\text{Cl}^-$ . Em relação à resistência (figura 24B), observou-se que os valores de  $\Delta R_t$  foram relativamente constantes para os extratos a pH 7 nas duas concentrações. No entanto existiu uma pequena oscilação nos valores de  $\Delta R_t$  quando foram aplicados os extratos de pH 2,5. Essa oscilação refletiu-se no aumento dos valores de  $R_t$ , que não é significativa estatisticamente.

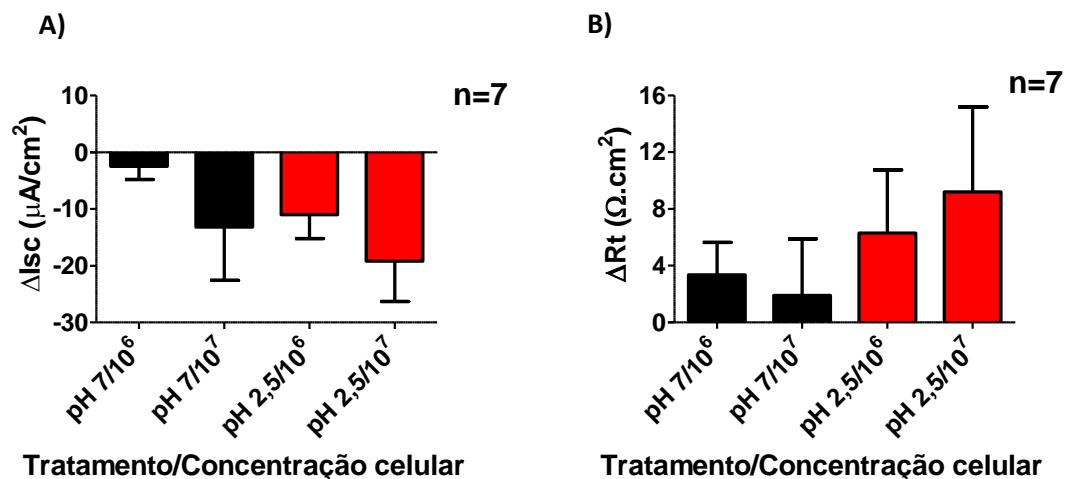


Figura 24 – Variação na corrente de curto-circuito ( $\Delta I_{sc}$ ,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) (A) e na resistência epitelial ( $\Delta R_t$ ,  $\Omega.\text{cm}^2$ ) (B) em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. a pH 7 e pH 2,5 com  $10^6$  (pH 7/ $10^6$  e pH 2,5/ $10^6$ ) e  $10^7$  (pH 7/ $10^7$  e pH 2,5/ $10^7$ ) de células/ml aplicados no lado basolateral do epitélio.

Os extratos da microalga na concentração mais baixa ( $10^6$  células) levaram à diminuição dos valores de  $I_{sc}$  (figura 25A e B) em cerca de 3% (pH 7) e 9% (pH 2,5). Quando aplicados os extratos com  $10^7$  células/ml a percentagem de  $I_{sc}$  diminuiu até aos 90% (pH 7) e 81% (pH 2,5) dos valores dos respetivos controlos. Tendo por base o teste estatístico t-test, em que foram comparados os valores finais de  $I_{sc}$  de cada um dos tratamentos, as diferenças observadas não foram significativas ( $p=0,2343$ ) (figura 25C). Os valores de  $R_t$  são constantes ao longo do ensaio para ambos os tratamentos (figura 26A e B), este facto foi confirmado pelo t-test ( $p=0,5508$ , foram analisados os últimos valores de cada tratamento, figura 26C).

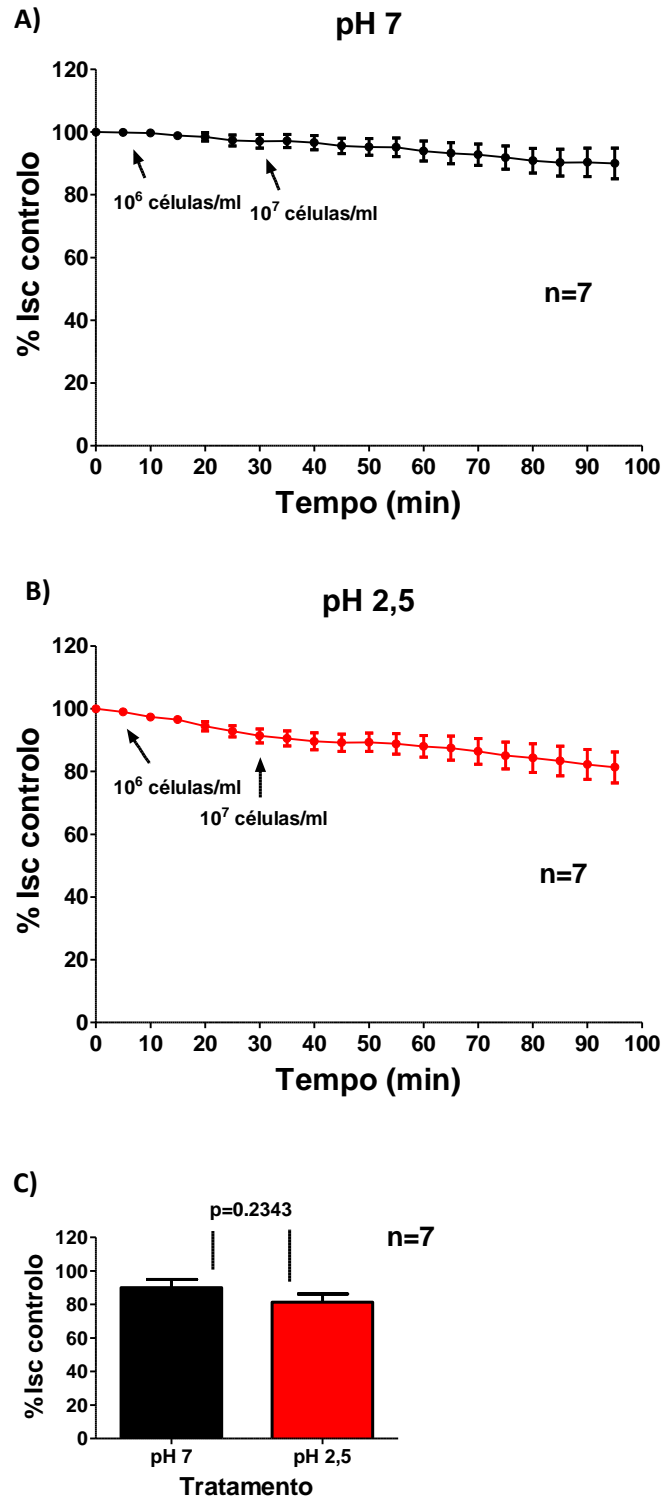


Figura 25 – Variação percentual de corrente de curto-circuito em relação ao respetivo controlo em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. aplicados no lado basolateral do epitélio opercular: A – extrato de cultura a pH 7; B – extrato de cultura a pH 2,5; C – comparação da percentagem de corrente aos 95 minutos (t-test).

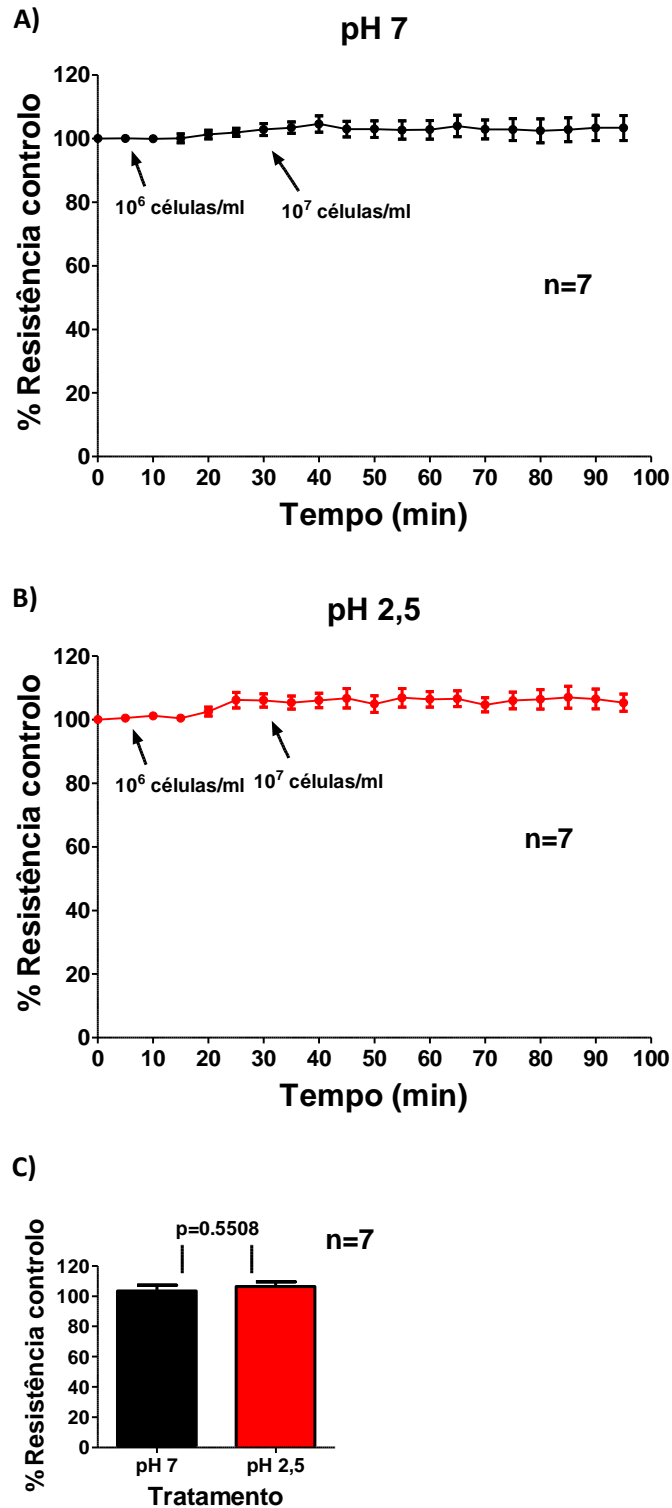


Figura 26 – Variação percentual de resistência epitelial em relação ao respetivo controlo em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. aplicados no lado basolateral do epitélio opercular: A- extrato de cultura a pH 7; B – extrato de cultura a pH 2,5; C – comparação da percentagem de resistência aos 95 minutos (t-test).

### **3.4.2. Efeito de extratos das culturas de *Coccomyxa* sp. a pH 7 e pH 2,5 expostas a cobre:**

Uma vez testados os efeitos dos extratos a pH 7 e a pH 2,5, testou-se também os de pH 7 e de pH 2,5 expostos a solução de  $\text{Cu}^{2+}$ . Ambos foram ressuspensos em solução salina normal e aplicados em duas concentrações ( $10^6$  e  $10^7$  células/ml) no lado basolateral do epitélio opercular (figura 27A e B). Para ambos os tratamentos, em primeiro lugar foi adicionada a concentração mais baixa. Após os valores de *Isc* estabilizarem foi aplicada a concentração mais alta do respectivo tratamento. Os valores de *Isc* na presença dos extratos a pH 2,5  $\text{Cu}^{2+}$  na concentração mais baixa não sofreram quaisquer alterações, enquanto que a pH 7  $\text{Cu}^{2+}$  na mesma concentração existiu uma descida de *Isc*. Quando foram adicionados os extratos de pH 2,5  $\text{Cu}^{2+}$  na concentração mais alta verificou-se uma pequena diminuição de *Isc*. Ao adicionar-se os extratos a pH 7  $\text{Cu}^{2+}$  houve um grande decréscimo da *Isc* quase alcançando o valor zero.

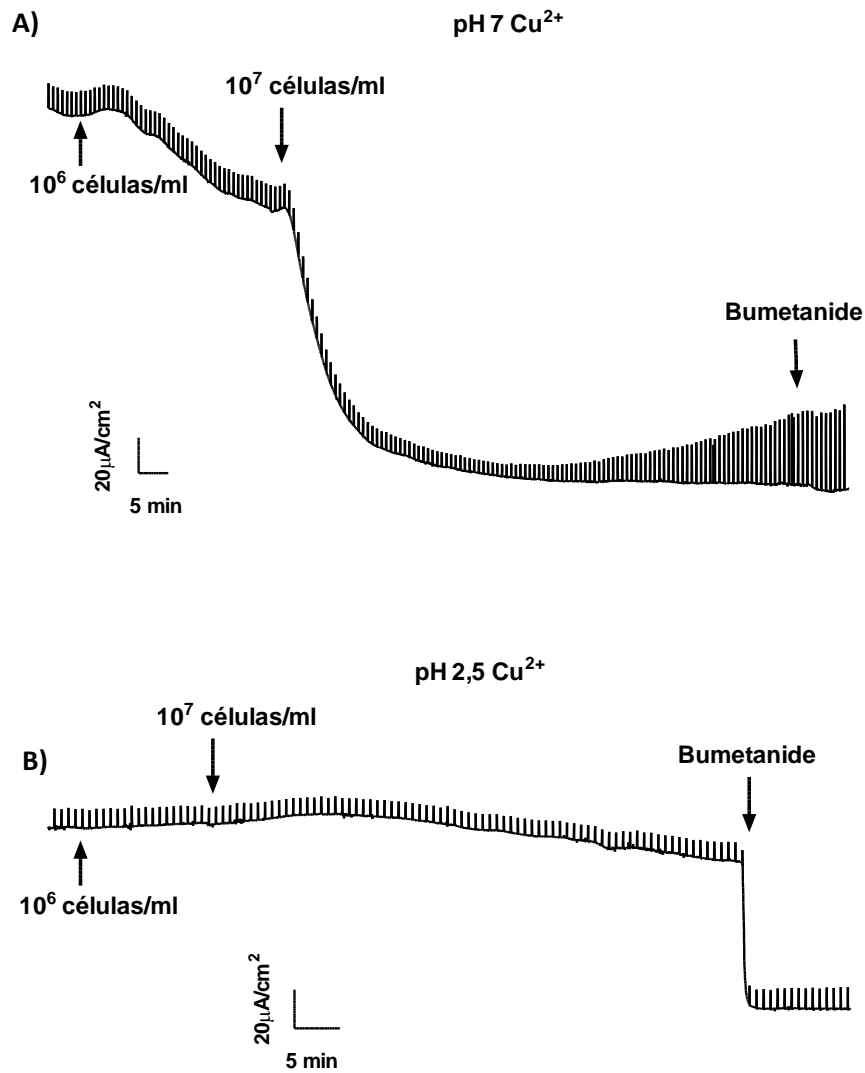


Figura 27 – Registro original de corrente de curto-circuito ( $I_{sc}$ ,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. aplicados no lado basolateral do epitélio opercular: A – extrato de cultura a pH 7 exposta a  $\text{Cu}^{2+}$  (0,6 mM); B – extrato de cultura a pH 2,5 exposta a  $\text{Cu}^{2+}$  (0,6 mM). O diurético bumetanide (100  $\mu\text{M}$ ) foi aplicado posteriormente no lado basolateral para demonstrar a existência de corrente de  $\text{Cl}^-$  na direção basolateral para apical. As barras verticais de corrente em períodos regulares correspondem a pulsos de voltagem de 1 mV e são utilizados para o cálculo de resistência epitelial ( $R_t$ ,  $\Omega.\text{cm}^2$ ) usando a lei de Ohm.

Os extratos a pH 7  $\text{Cu}^{2+}$  foram os que provocaram uma maior resposta no epitélio opercular, nas duas concentrações, comparativamente com os de pH 2,5  $\text{Cu}^{2+}$  (figura 28A). Essa resposta correspondeu à diminuição dos valores de  $I_{sc}$  e consequentemente os valores de  $\Delta I_{sc}$ . A  $R_t$  foi constante para os extratos de pH 2,5  $\text{Cu}^{2+}$  nas duas concentrações. No caso dos extratos de pH 7  $\text{Cu}^{2+}$  apenas na concentração mais baixa, os

valores de  $R_t$  foram constantes (figura 28B). A concentração mais alta danificou o epitélio e isso refletiu-se na diminuição dos valores de  $R_t$  e consequentemente de  $\Delta R_t$ .

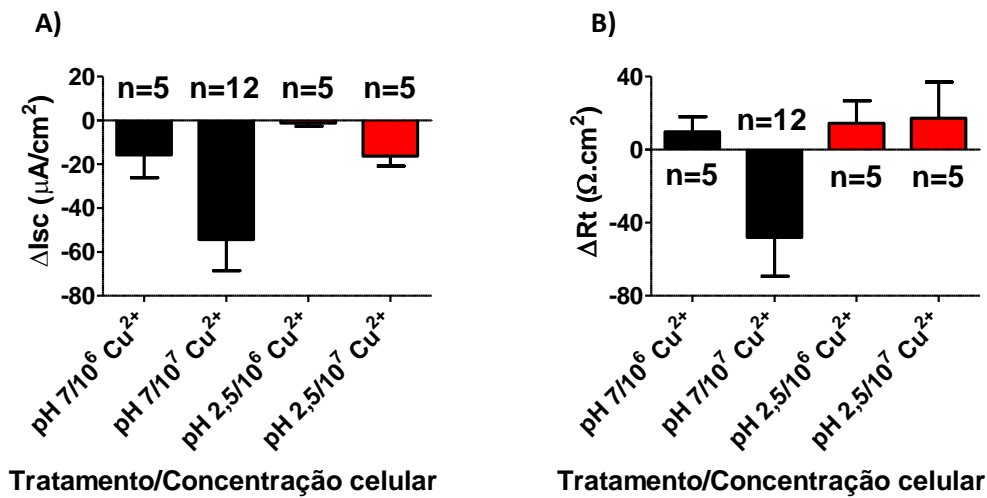


Figura 28 - Variação na corrente de curto-circuito ( $\Delta I_{sc}$ ,  $\mu A/cm^2$ ) (A) e na resistência epitelial ( $\Delta R_t$ ,  $\Omega.cm^2$ ) (B) em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. a pH 7 e pH 2,5, expostos a  $Cu^{2+}$  (0,6 mM), com  $10^6$  (pH 7/10<sup>6</sup> e pH 2,5/10<sup>6</sup>) e  $10^7$  (pH 7/10<sup>7</sup> e pH 2,5/10<sup>7</sup>) de células aplicados no lado basolateral do epitélio.

Os extratos a pH 7  $Cu^{2+}$  com  $10^6$  células/ml provocaram uma inibição da  $I_{sc}$  de 20%, enquanto que nos de pH 2,5  $Cu^{2+}$  essa inibição foi apenas de 5%. Quando aplicados os extratos de  $10^7$  células/ml a inibição da  $I_{sc}$  foi de 82% (pH 7  $Cu^{2+}$ ) e de 15% (pH 2,5  $Cu^{2+}$ , figura 29A e B). Tendo por base o t-test (comparação dos últimos valores dos dois tratamentos), verificou-se que a diferença da resposta do epitélio aos extratos dos dois tratamentos foi significativa ( $p=0,0003$ , figura 29C). Quando aplicados os extratos de pH 2,5  $Cu^{2+}$  a  $R_t$  foi constante ao longo da experiência para as duas concentrações (figura 30B). No entanto, o mesmo não se verificou para os extratos de pH 7  $Cu^{2+}$ , uma vez que a partir dos oitenta minutos existiu um decréscimo da percentagem da  $R_t$  de 24% (figura 30A). As diferenças observadas nos valores da  $R_t$  não foram significativas ( $p=0,4512$ , figura 30C).

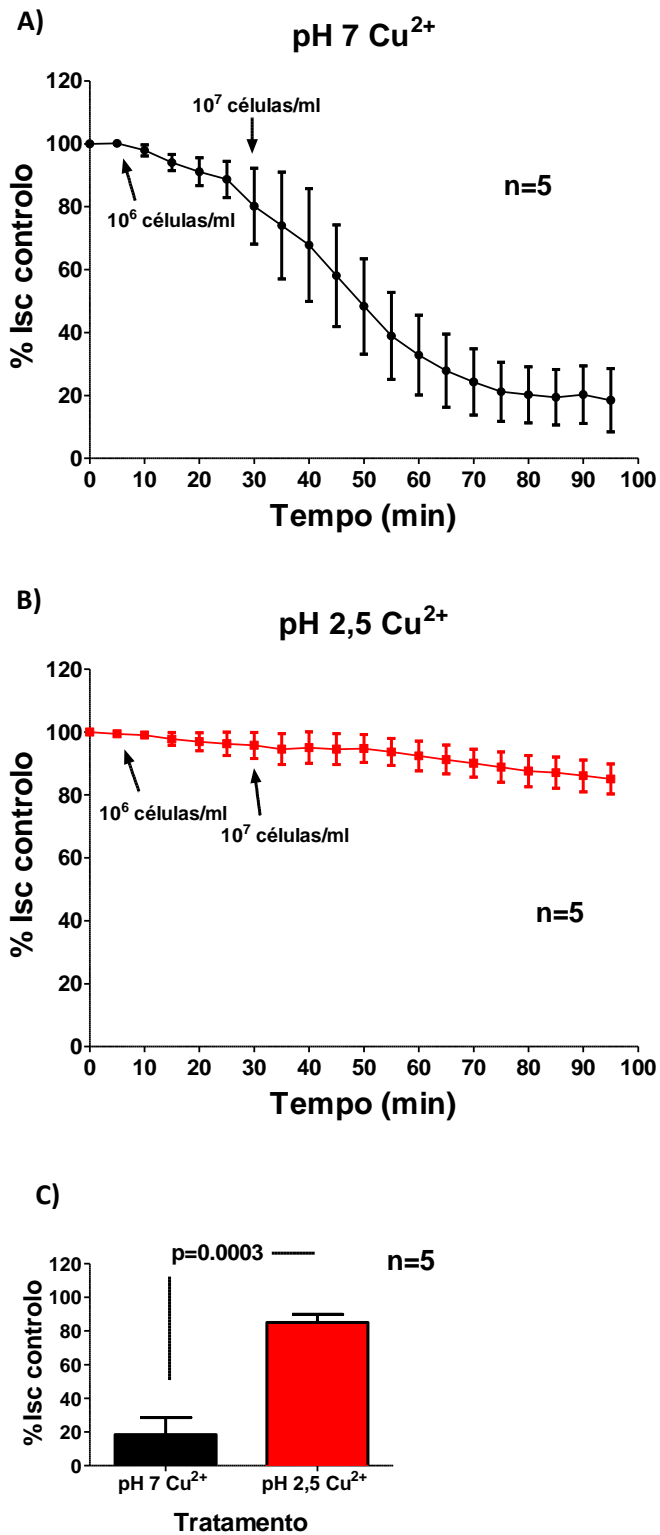


Figura 29 – Variação percentual de corrente de curto-circuito em relação ao respectivo controle em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. aplicados no lado basolateral do epitélio opercular: A – extratos de cultura a pH 7 exposta a Cu<sup>2+</sup> (0,6mM); B – extratos de cultura a pH 2,5 exposta a Cu<sup>2+</sup> (0,6mM); C – comparação da percentagem de corrente aos 95 minutos (t-test).

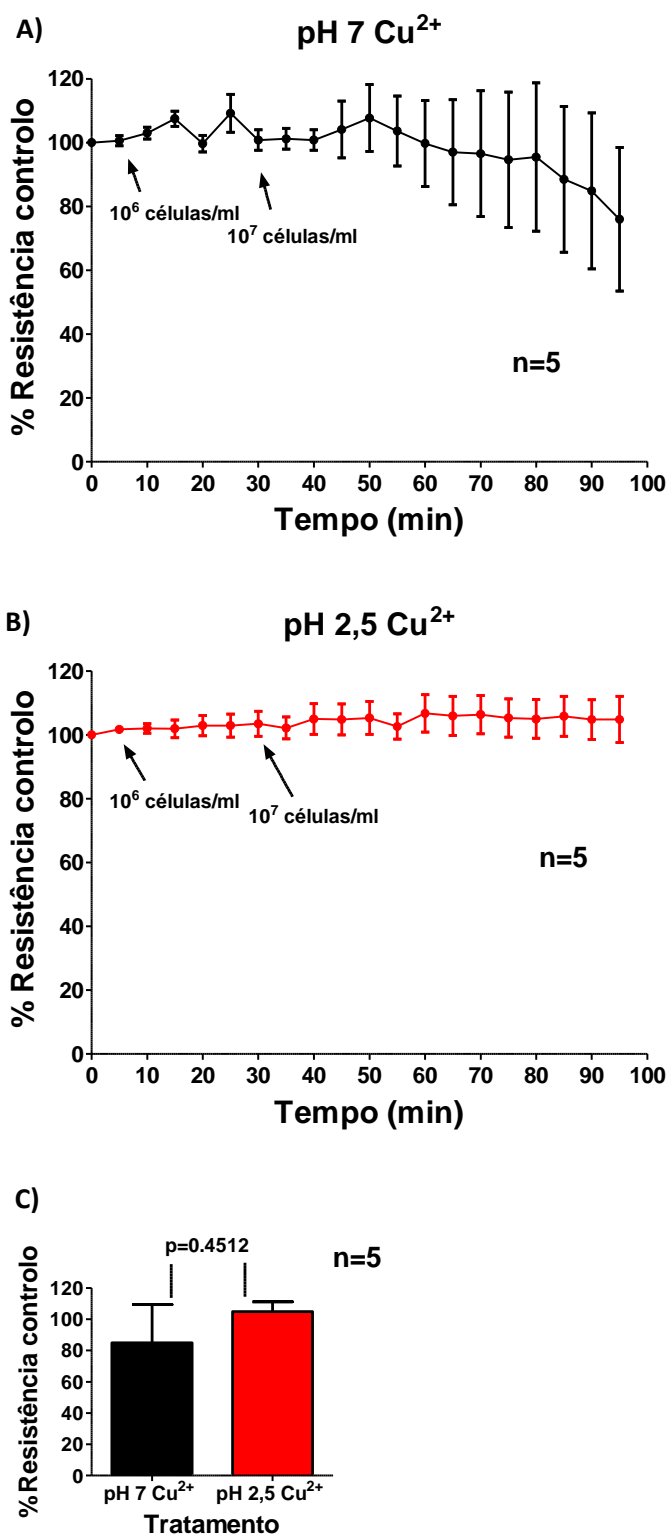
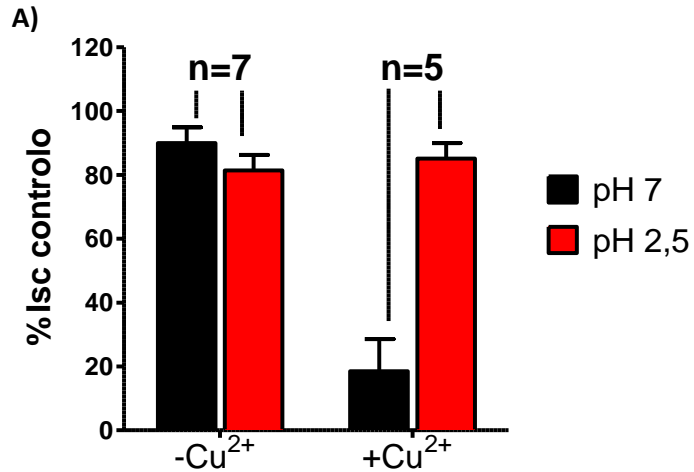


Figura 30 – Variação percentual de resistência epitelial em relação ao respetivo controlo em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. aplicados no lado basolateral do epitélio opercular: A – extratos de cultura a pH 7 exposta a Cu<sup>2+</sup> (0,6 mM); B – extratos de cultura a pH 2,5 exposta a Cu<sup>2+</sup> (0,6 mM); C – comparação da percentagem de resistência aos 95 minutos (t-test).

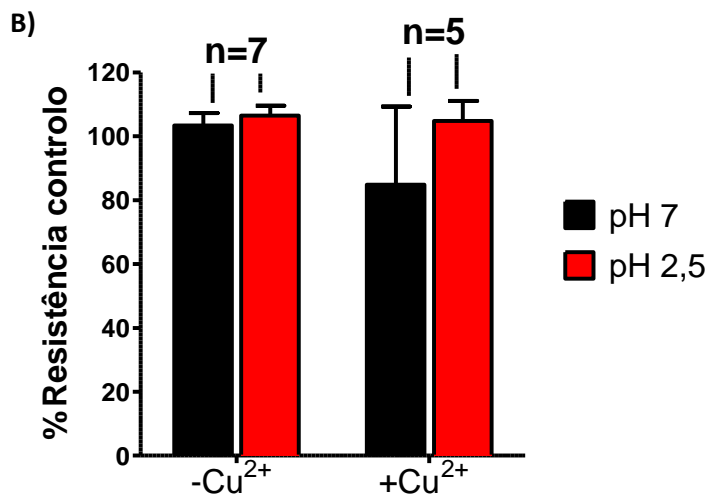
### **3.4.3. Comparação entre os efeitos dos extratos dos diferentes tratamentos:**

Depois de se observar os efeitos dos extratos, dos vários tratamentos, em ambos os lados do epitélio opercular, fez-se uma comparação dos valores de  $I_{sc}$  (figura 31A) e  $R_t$  (figura 31B). Verificou-se que os extratos de *Coccoomyxa* sp. a pH 7 e pH 2,5 apresentaram uma descida da percentagem de  $I_{sc}$  10% e 19% respetivamente. Comparativamente com os extratos expostos a  $Cu^{2+}$ , verificou-se que os de pH 2,5  $Cu^{2+}$  provocaram uma alteração da  $I_{sc}$  de 15% que foi semelhante aos extratos não exposto a  $Cu^{2+}$ . No entanto os de pH 7  $Cu^{2+}$  provocaram uma descida de 82% da  $I_{sc}$ . Este efeito foi devido ao condicionamento conjunto do pH e do  $Cu^{2+}$ , que foi confirmado pelo teste estatístico two-way ANOVA ( $p=0,0001$ , tendo como parâmetros pH, cobre e interação entre eles). Relativamente aos valores de  $R_t$  observou-se que eram semelhantes entre os extratos. Apesar de se ter verificado uma pequena descida na resistência nos epitélios em contacto com os extratos a pH 7  $Cu^{2+}$ , essa diferença não foi significativa, tendo em conta os parâmetros analisados (interação:  $p=0,4462$ ; pH:  $p=0,3014$ ; e  $Cu^{2+}$ :  $p=0,3652$ ).



Two-way ANOVA

Fonte de variação	Varição total (%)	Valor de p
pH	21,74	0,0001
Cu <sup>2+</sup>	29,70	< 0,0001
Interação	36,66	< 0,0001



Two-way ANOVA

Fonte de variação	Varição total (%)	Valor de p
pH	5.03	0.3014
Cu <sup>2+</sup>	3.84	0.3652
Interação	2.7	0.4462

Figura 31 – Percentagem do valor de corrente de curto-circuito (A) e de resistência epitelial (B) em relação ao inicial em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. de diferentes condições de cultivo, aplicados no lado basolateral do epitélio opercular. Respetivas tabelas com os valores obtidos através do teste estatístico two-way ANOVA. Os valores utilizados para a análise estatística são os valores finais do ensaio (aos 95 minutos).

### 3.5. Efeito de solução de cobre no epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus*:

Depois de se testar o efeito dos extratos no lado basolateral e apical do epitélio verificou-se o efeito do  $\text{Cu}^{2+}$  sobre o fluxo de iões através do epitélio opercular. A solução de  $\text{Cu}^{2+}$  foi adicionada no lado basolateral do epitélio em duas concentrações (0,2 e 2  $\mu\text{M}$ ) (figura 32). A concentração mais baixa foi aplicada e após a estabilização dos valores de  $I_{sc}$  foi adicionada a concentração mais alta. A exposição ao  $\text{Cu}^{2+}$ , na concentração mais baixa, provocou a inibição quase total do fluxo de  $\text{Cl}^-$ .

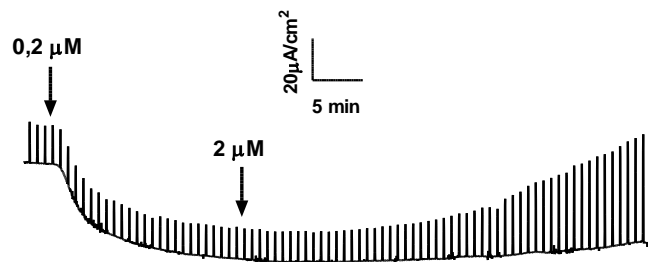


Figura 32 – Corrente de curto-circuito ( $I_{sc}$ ,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta à exposição a  $\text{Cu}^{2+}$  (0,2 e 2  $\mu\text{M}$ ) no lado basolateral do epitélio opercular. As barras verticais de corrente em períodos regulares correspondem a pulsos de voltagem de 1 mV e são utilizados para o cálculo de resistência epitelial ( $R_t$ ,  $\Omega.\text{cm}^2$ ) usando a lei de Ohm.

O  $\text{Cu}^{2+}$  provocou uma redução dos valores de  $\Delta I_{sc}$  nas duas concentrações no entanto o maior efeito foi observado à concentração mais baixa (figura 33A). A diferença entre as duas concentrações foi explicada pela quase total inibição provocada pela primeira concentração na altura em que foi adicionada a segunda. Em relação a  $\Delta R_t$  (figura 33B) verifica-se uma alteração dos seus valores que corresponde a um decréscimo dos valores de  $R_t$ .

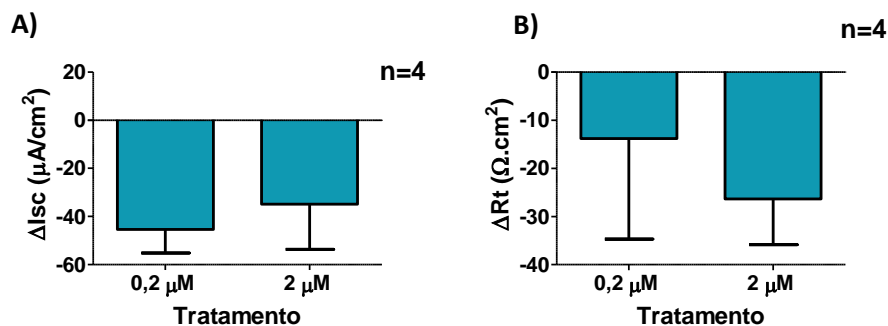


Figura 33 – Diferença de corrente de curto-circuito ( $\Delta I_{sc}$ ,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta à exposição a  $\text{Cu}^{2+}$  0,2 e 2  $\mu\text{M}$  respetivamente no lado basolateral do epitélio.

A Isc após a adição de  $\text{Cu}^{2+}$  diminuiu 65% ( $0,2 \mu\text{M}$ ) e 20% adicional ( $2 \mu\text{M}$ ) (figura 34A) e de forma mais rápida do que a provocada pelos extratos a pH 7 expostos a  $\text{Cu}^{2+}$ . O valor de percentagem de Rt aumentou 10% após aplicação de  $0,2 \mu\text{M}$  de solução de cobre e diminuiu 80% quando aplicada a concentração mais alta ( $2 \mu\text{M}$ , figura 34B). Esta diminuição dos valores de Rt podem ser explicados pelo facto de o  $\text{Cu}^{2+}$  ( $2 \mu\text{M}$ ) possivelmente danificar a estrutura do epitélio opercular.

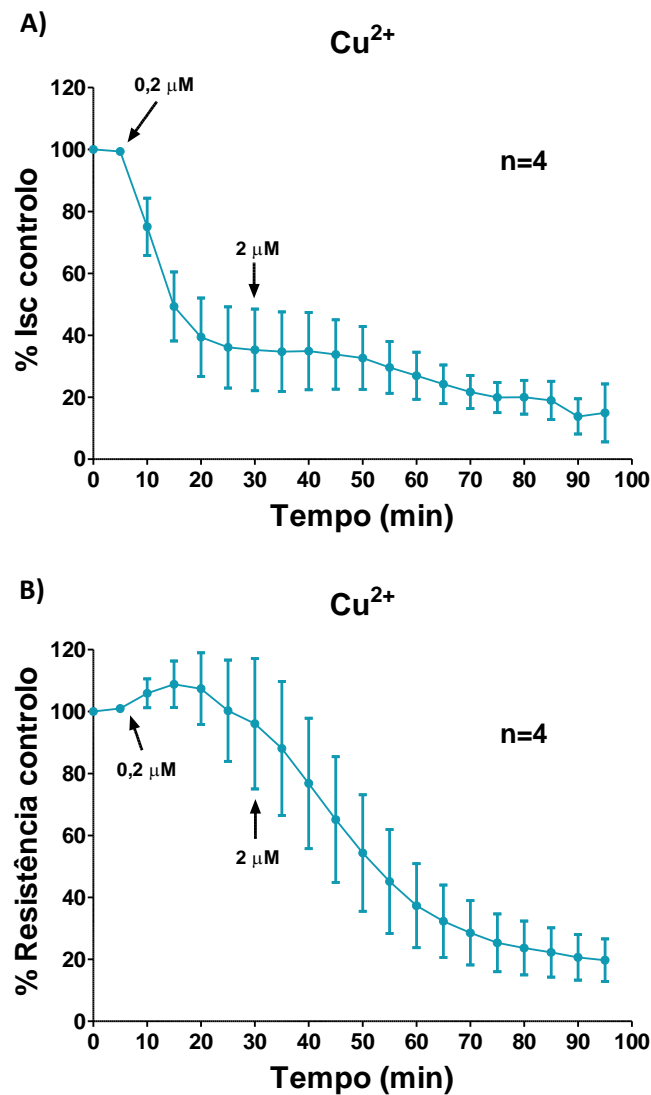


Figura 34 – Percentagem do valor de corrente de curto-circuito (A) e de resistência epitelial (B) em relação ao inicial em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta à exposição a  $\text{Cu}^{2+}$   $0,2$  e  $2 \mu\text{M}$  no lado basolateral do epitélio opercular.

### **3.6. Recuperação do epitélio opercular:**

De modo a verificar a recuperação do epitélio opercular foram utilizados os extratos a pH 7  $\text{Cu}^{2+}$  e a solução de  $\text{Cu}^{2+}$ . Os extratos e o cobre foram aplicados no lado basolateral do

epitélio em ensaios independentes com a concentração de  $10^7$  células/ml e  $2 \mu\text{M}$ , respectivamente (figura 35A e B). Após a adição dos tratamentos verificou-se, em ambos os casos, uma descida dos valores de  $I_{sc}$ . Quando os valores de  $I_{sc}$  estabilizaram, procedeu-se à lavagem das câmaras de Ussing. Após a lavagem apenas os epitélios expostos aos extratos conseguiram recuperar para valores semelhantes aos iniciais, mostrando efeitos reversíveis que não aparecem na exposição ao cobre.

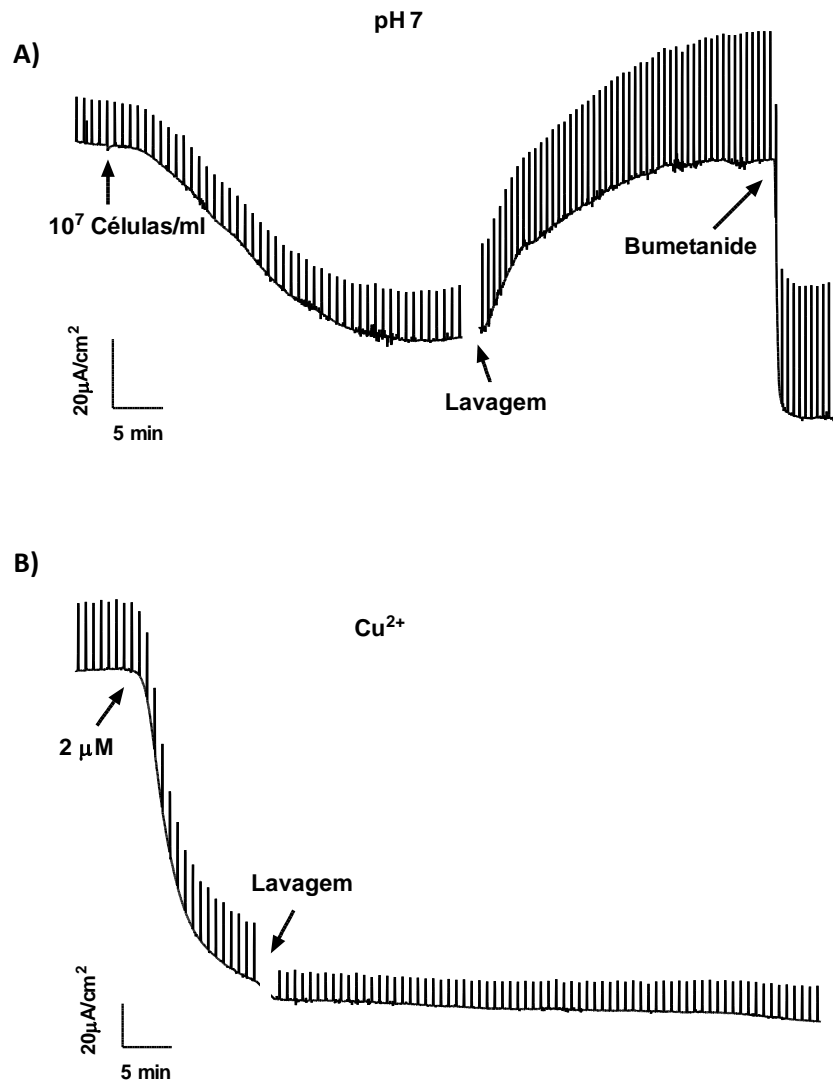


Figura 35 – Registo original de corrente de curto-circuito ( $I_{sc}$ ,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos de cultura de *Coccomyxa* sp. a pH 7 (expostos a  $0,6 \text{ mM}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ ) (A) e à exposição a  $0,6 \text{ mM}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  (B) aplicados no lado basolateral do epitélio opercular. O diurético bumetanide ( $100 \mu\text{M}$ ) foi aplicado posteriormente no lado basolateral para demonstrar a existência de corrente de  $\text{Cl}^-$  na direção basolateral para apical. As barras verticais de corrente em períodos regulares correspondem a pulsos de voltagem de  $1 \text{ mV}$  e são utilizados para o cálculo de resistência epitelial ( $R_t$ ,  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) usando a lei de Ohm. Ao fim de 40 minutos de experiência, lavagem dos compartimentos das câmaras de Ussing e respetiva recuperação do tecido epitelial.

Os extratos da microalga e o  $\text{Cu}^{2+}$  provocaram uma descida expectável de Isc de 70% e de 89%, respetivamente (figura 36A). Após os 40 minutos de ensaio os valores de Isc estabilizaram e as diferenças observadas não eram significativas em ambos os casos ( $p=0,3791$ ). De seguida procedeu-se à lavagem das câmaras e verificou-se que os epitélios onde foram aplicados os extrato de pH 7  $\text{Cu}^{2+}$  foram os únicos que conseguiram recuperar. A diferença entre os valores de recuperação de pH 7  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  foi significativa ( $p=0,0310$ ). Verifica-se algumas diferenças nos valores de percentagem de Rt (figura 36B) no entanto não são significativas ( $p < 0,05$ ).

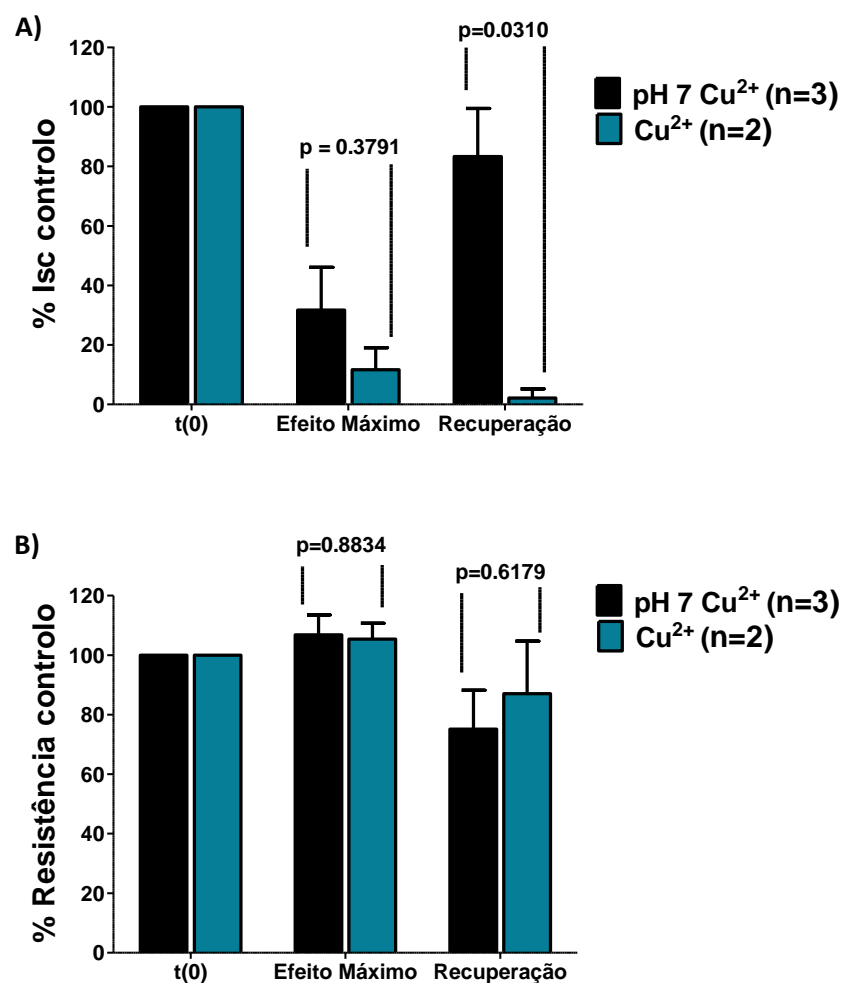


Figura 36 – Percentagem do valor de corrente de curto-circuito (A) e de resistência epitelial (B) em relação ao inicial em epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing em “voltage clamp”. Resposta a extratos ( $10^7$  células/ml) da cultura de *Coccomyxa* sp. a pH 7 exposta a cobre, e à exposição a  $\text{Cu}^{2+}$  ( $2 \mu\text{M}$ ), aplicados no lado basolateral do epitélio opercular. No tempo inicial (t(0)) os valores são 100% e ao fim de 40 minutos verificou-se o efeito máximo provocado pelo extrato e pela exposição a  $\text{Cu}^{2+}$ . Após os 40 minutos, lavagem das câmaras de Ussing e respetiva recuperação do tecido epitelial.

## **4. Discussão**

O objetivo deste capítulo foi testar a potencialidade dos extratos de *Coccomyxa* sp., provenientes de culturas a pH 7 e pH 2,5 expostas ou não a cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), num modelo animal *ex-vivo* (*Fundulus heteroclitus*).

As microalgas usadas neste trabalho foram isoladas de um ambiente ácido, em que é fundamental possuírem transportadores eficientes ou biomoléculas capazes de permitir a sua sobrevivência (Gross, 2000; Brake e Hasiotis, 2010, Messerli *et al.*, 2005). Tendo por base esta informação, utilizou-se *Fundulus heteroclitus*, que é caracterizado por possuir um epitélio opercular rico em células secretoras de iões cloro ( $\text{Cl}^-$ , Karnaky, 1977; Karnaky e Kinter, 1977) como modelo do bioensaio. Deste modo, pretendeu-se testar potenciais moléculas presentes nos extratos de *Coccomyxa* que afetem o transporte iónico mais concretamente os transportadores CFTR e NKCC. O CFTR e o NKCC localizam-se na membrana apical e basolateral do epitélio, respetivamente, e são fundamentais para a regulação do fluxo basolateral/apical de  $\text{Cl}^-$  que atravessa o epitélio (Reddy e Quinton, 1999; Insering *et al.*, 1998 e Haas e Forbush III, 2000).

A utilização de *Fundulus* é mais vantajosa em relação, por exemplo, à cultura de células, uma vez que é uma espécie invasora (a sua captura não influencia o funcionamento o equilíbrio do sistema biológico), não é necessário manter uma cultura celular, menores custos de materiais e meios e menor disponibilidade e tempo despendido pelo utilizador. Para além destas vantagens, o epitélio de *Fundulus* pode ser utilizado em câmaras de Ussing. As câmaras de Ussing (Ussing e Zerahn, 1950) permitem de um modo simples e rápido analisar as variações de corrente de curto-circuito (Isc) dos possíveis efeitos de compostos no lado basolateral e apical do epitélio (Karnaky *et al.*, 1977; Crespo e Karnaky, 1983; Martos-Sitcha *et al.*, 2015).

Em primeiro lugar, pretendeu-se mostrar que, neste trabalho, toda a Isc medida era devido ao fluxo de iões cloreto através do epitélio. Karnaky *et al.* (1977) demonstrou que ao usar uma solução sem  $\text{Cl}^-$  o valor de Isc é aproximadamente zero, demonstrando que as condições deste trabalho estão de acordo com um controlo de qualidade pré-estabelecido. Neste trabalho, esse facto também ficou demonstrado através da comparação entre as soluções normal e sem iões  $\text{Cl}^-$ . Onde se observa que com a utilização da solução sem iões  $\text{Cl}^-$  os valores de Isc são próximos de zero ( $3,4 \pm 2,6$ ) em comparação com a solução normal ( $81,9 \pm 7,2$ ).

Os extratos celulares da microalga de quatro tratamentos diferentes (pH 7 e pH 2,5 na presença e ausência de  $\text{Cu}^{2+}$ ) foram testados no lado basolateral ou apical do epitélio opercular montado em câmaras de Ussing, o lado é importante dada a polarização do epitélio. Deste modo, foi possível verificar se existia algum composto capaz de provocar um efeito no funcionamento do CFTR (apical) e do NKCC (basolateral). Quando aplicados os extratos no lado apical verifica-se que os valores de  $I_{sc}$  não são alterados, o que significa que não efeito dos extratos no CFTR. No lado basolateral, os extratos celulares, provenientes da cultura de *Coccomyxa* sp a pH 7 exposta a cobre, foram os que provocaram um maior efeito no NKCC em comparação com os extratos dos outros tratamentos. Esse efeito correspondeu à inibição de 82% da  $I_{sc}$  em relação ao respetivo controlo.

Uma vez que o maior efeito no NKCC foi dos extratos da cultura a pH 7 exposta a  $\text{Cu}^{2+}$ , analisou-se o efeito do  $\text{Cu}^{2+}$ . Assim, verificou-se se o efeito observado era devido a alguma molécula presente no extrato ou se era devido a  $\text{Cu}^{2+}$  absorvido pelas células da microalga. As duas concentrações de  $\text{Cu}^{2+}$  usadas (0,2 e 2  $\mu\text{M}$ ) foram calculadas ao considerar que as células da microalga tinham absorvido todo o  $\text{Cu}^{2+}$  na cultura. Crespo e Karnaky (1983) demonstram que ao aplicar uma solução de  $\text{Cu}^{2+}$  (40 $\mu\text{M}$ ) aos dois lados da membrana epitelial provocava um decréscimo dos valores de  $I_{sc}$  de 45,6% e que a resistência epitelial ( $R_t$ ) não seria afetada (Crespo e Karanaky 1983). No caso deste trabalho, verifica-se que o epitélio era muito mais sensível porque bastou uma concentração muito mais baixa de  $\text{Cu}^{2+}$  (2 $\mu\text{M}$ ) para se obter quase o dobro da inibição de  $I_{sc}$  (85%). Para além disso também a  $R_t$  foi afetada, registando uma descida de 80%. O efeito do  $\text{Cu}^{2+}$  foi diferente em relação ao dos extratos de pH 7  $\text{Cu}^{2+}$ . Apesar dos efeitos terem sido no mesmo sentido, a descida de  $I_{sc}$  provocada pela exposição ao  $\text{Cu}^{2+}$  é muito mais abrupta. Também existiram diferenças na  $R_t$  em que os epitélios expostos a  $\text{Cu}^{2+}$  registaram uma descida de 80%, o que indica que uma exposição prolongada a cobre leva ao dano do epitélio opercular. A recuperabilidade do epitélio opercular foi testada para se confirmar que o efeito provocado pela adição dos extratos a pH 7  $\text{Cu}^{2+}$  e do  $\text{Cu}^{2+}$  era realmente diferente. Assim, foi possível observar que apenas os epitélios operculares expostos aos extratos celulares conseguiram uma recuperação de aproximadamente 100%. Isto significa que o efeito dos extratos é reversível e diferente do efeito inibitório do  $\text{Cu}^{2+}$ .

O efeito dos extratos a pH 7  $\text{Cu}^{2+}$  é muito semelhante ao provocado pelo Bumetanide, que é um diurético e inibidor específico do canal NKCC (Haas e Forbush III, 2000 e Ju

*et al.*, 2013). As células de *Coccomyxa* sp. a pH 7 e expostas a  $\text{Cu}^{2+}$  possuem um ou vários compostos com grande potencial para, por exemplo, serem utilizados como diuréticos. Porém é necessário realizar mais estudos para se determinar o tipo de moléculas e o seu modo de atuação.

## **V. Discussão geral**

As culturas da microalga *Coccomyxa* sp. foram mantidas a pH 7 e a pH 2,5 expostas e não expostas a um metal, que no caso deste trabalho foi o cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ). A partir de amostras das culturas determinou-se as diferenças de tamanho e crescimento celular e a produção de pigmentos; identificou-se e quantificou-se a expressão de genes diferenciais; e testou-se a potencial atividade de extratos celulares.

As duas condições testadas (pH e presença/ausência de  $\text{Cu}^{2+}$ ) provocaram efeitos fisiológicos e moleculares nas células da microalga. A mudança de pH é o fator que provoca uma alteração de tamanho celular, em que existe uma maior frequência de células pequenas a pH 7 do que a pH 2,5. Por outro lado, o  $\text{Cu}^{2+}$  é o fator que influencia a produção de pigmentos (clorofila e carotenoides), pois provoca stress celular, possivelmente, ao induzir ROS que danificam os organelos celulares, tais como, os cloroplastos (Alscher *et al.*, 1997; Bouayed e Bohn, 2012). Este facto é verificado pela maior produção de pigmentos pelas células dos tratamentos sem  $\text{Cu}^{2+}$ , sendo as de pH 7 que produziram uma maior quantidade.

Os genes diferencialmente expressos (DEGs) foram identificados através GeneFishing™ DEG Premix Kit da SeeGene (Ogeum-ro, Songpa-gu, Seul, Coreia) e posteriormente validados por Real-Time PCR. Verificou-se que os genes de referência eram amplificados em ciclos diferentes e muito distantes uns dos outros entre diferentes tratamentos. No pool de pH 7 foi onde ocorreu a maior expressão dos genes de referência. O facto de os genes 4-6-13BH e 77B codificam para proteínas ribossomais e a sua expressão ser maior do que a expressão dos seus padrões internos a pH 7 demonstra que, para este trabalho, o 18S não era um bom gene de referência. Através dos dados obtidos neste trabalho, relativamente à produção de clorofila e carotenoides e ao resultados do Real-Time PCR, observa-se que as células de *Coccomyxa* sp. têm preferência pelo pH 7 sem a presença de  $\text{Cu}^{2+}$ . O que é um facto interessante uma vez que no seu ambiente natural encontram-se a pH 2,5 e na presença de metais pesados. Estes resultados indicam que as diferenças de expressão observadas são devidas a uma drástica alteração genética das células da microalga. Pode-se afirmar que as células de *Coccomyxa* sp. apresentam três equilíbrios dinâmicos. O primeiro é a pH 7, que indica ser o meio preferido desta microalga, onde a produção de pigmentos e a expressão relativa dos genes 4-6-13BH e 77B, fundamentais para o funcionamento das células, é maior. Outro dos equilíbrios aconteceu no tratamento

de pH 7  $\text{Cu}^{2+}$ , em que a adição do metal cobre influenciou a produção de pigmentos e a alteração do metabolismo do carbono e dos mecanismos de tradução. Sendo também o tratamento em que as células estavam em maior stress celular. Por fim o terceiro equilíbrio aconteceu nos tratamentos de pH 2,5. Os resultados obtidos ao longo do trabalho indicam que a alteração de pH provocou mudanças fisiológicas e genéticas, que levaram a stress celular. A pH 2,5, a exposição a cobre demonstra não acrescentar stress celular.

A potencialidade dos extratos celulares de *Coccomyxa* foi testada no epitélio opercular de *Fundulus heteroclitus* montado em câmaras de Ussing. *Fundulus* é caracterizado por possuir um epitélio opercular rico em células secretoras de iões cloro ( $\text{Cl}^-$ , Karnaky, 1977; Karnaky e Kinter, 1977). Pretendeu-se testar potenciais compostos presentes nos extratos que afetem o transporte iónico mais concretamente os transportadores CFTR e NKCC que são fundamentais para a regulação do fluxo basolateral/apical de  $\text{Cl}^-$  que atravessa o epitélio (Reddy e Quinton, 1999; Insering *et al.*, 1998 e Haas e Forbush III, 2000). Quando aplicados os extratos no lado apical verifica-se que os valores de  $I_{sc}$  não são alterados e por isso não tem efeito no CFTR. O mesmo não se verifica no lado basolateral (NKCC), em que os extratos celulares provocam uma pequena diminuição dos valores de  $I_{sc}$ . Os extratos, das culturas a pH 7 expostas a cobre, foram os que provocaram um maior efeito, que é refletido na descida dos valores de  $I_{sc}$ . O seu efeito é diferente do provocado pelo  $\text{Cu}^{2+}$  e não danifica o epitélio. A alteração dos valores é muito semelhante à provocada pelo Bumetanide, que é um diurético e inibidor específico do cotransportador NKCC (Haas e Forbush III, 2000 e Ju *et al.*, 2013). A resposta das células da microalga, do tratamento de pH 7  $\text{Cu}^{2+}$ , ao stress celular pode consistir na produção de uma ou várias moléculas que possivelmente também tenham efeito no NKCC. No entanto, mais estudos serão necessários para determinar a ou as moléculas presentes nos extratos de *Coccomyxa* sp. capazes de interagir com o NKCC.

A microalga *Coccomyxa* sp. poderá ter uma grande importância na indústria biotecnológica como fonte de pigmentos e na indústria farmacêutica para o estudo de compostos, capazes de interagir com o NKCC, com potencial para serem diuréticos eficazes.

## **VI. Conclusões**

Das culturas de *Coccomyxa* sp., mantidas a pH 7 e pH 2,5 e expostas ou não a cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), foram analisados três parâmetros fisiológicos (tamanho e crescimento celular e produção de pigmentos) dos quais apenas o crescimento não foi alterado. O pH foi o principal fator que influenciou os tamanhos celulares, onde existiu uma maior frequência de células pequenas a pH 7 comparativamente com os outros tratamentos. O  $\text{Cu}^{2+}$  por sua vez foi o principal fator que influenciou a produção de clorofila e carotenoides, sendo essa produção maior no tratamento de pH 7. Pela razão carotenoides/clorofila concluiu-se que as células do tratamento pH 7  $\text{Cu}^{2+}$  estavam em stress celular, provocado pela ação conjunta do pH e do  $\text{Cu}^{2+}$ .

Relativamente a expressão de genes diferenciais (DEGs), de 14 amostras sequenciadas conseguiu-se identificar os DEGs de 6 (95BC, a 4-6-13BH, a 77B, a 71A, a 90B e a P21-6 BH). Pelos resultados de Real-Time PCR verificou-se que os genes de referência 18S2 e NAD5 amplificaram em ciclos diferentes nos diferentes tratamentos, sendo no pool de pH 7 onde a maior expressão foi observada. Por isso, estes genes não puderam ser usados como referência para este trabalho.

As células de *Coccomyxa* sp., apesar de terem sido isoladas de um ambiente ácido e com concentração elevada de metais pesados, apresentam uma preferência pelo pH 7. Este facto é observado pela maior produção de pigmentos e pela maior quantidade expressa dos genes de referência. Para além disso encontram-se em três equilíbrios dinâmicos diferentes fruto da alteração de pH e da adição de cobre ao meio de pH 7.

Os extratos celulares desta microalga, provenientes dos quatro tratamentos, não afetaram o CFTR que se encontra no lado apical da membrana epitelial do opérculo de *Fundulus heteroclitus*. No lado basolateral, os extratos celulares das culturas a pH 7  $\text{Cu}^{2+}$  provocam um efeito no NKCC que é refletido na inibição do fluxo de  $\text{Cl}^-$ . Como resposta ao stress celular a que as células do tratamento de pH 7  $\text{Cu}^{2+}$  estavam sujeitas, estas produziram alguma ou algumas moléculas que possivelmente as ajudaram a “combater” essa adversidade. Essas moléculas apresentam um grande potencial para serem usados, por exemplo, como diuréticos uma vez que inibem o canal NKCC. No entanto serão necessários mais estudos futuros para comprovarem o seu verdadeiro potencial.

## **VII. Referências**

- Alscher R. G., Donahue J. L., Cramer C. L. (1997) Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiologia Plantarum*, 100, 224–233.
- Becker E. W. (2007) Microalgae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25, 207–210.
- Bernstein K. A., Gallagher J. E. G., Mitchell B. M., Granneman S., Baserga S. J. (2004) The Small-Subunit Processome Is a Ribosome Assembly Intermediate. *Eukaryotic cell*, 3, 1619–1626.
- Blankenship R. E. (2002) *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. Blackwell Science.
- Bouayed J., Bohn T. (2012) Dietary Derived Antioxidants: Implications on Health, Nutrition, Well-Being and Health, Dr. Jaouad Bouayed, Chapter 1, 1-22.
- Brake S. S., Hasiotis S. T. (2010) Eukaryote-Dominated Biofilms and Their Significance in Acidic Environments. *Geomicrobiology Journal*, 27:6-7, 534-558.
- Brandt U. (2006) Energy Converting NADH: Quinone Oxidoreductase (Complex I). *Annu. Rev. Biochem*, 75, 69–92.
- Brimacombe R., Stiege W. (1985) Structure and function of ribosomal RNA. *Biochemical Journal*, 229, 1-17.
- Brunner A. M., Yakovlev I. A., Strauss S. H. (2004) Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biology*, 4-14.
- Buono S., Langellotti A. L., Martello A., Bimonte M., Tito A., Carola A., Apone F., Colucci G., Fogliano V. (2012) Biological activities of dermatological interest by the water extract of the microalga *Botryococcus braunii*. *Archives of Dermatological Research*, 304, 755–764.
- Casal C., Cuaresma M., Vega J. M., Vilchez C. (2011) Enhanced productivity of a lutein enriched novel acidophile microalga grown on urea. *Marine Drugs*, 9, 29–42.
- Chong G. L., Chu W. L., Othman R. Y., Phang S. M. (2011) Differential gene expression of an Antarctic *Chlorella* in response to temperature stress. *Polar Biology*, 34, 637–645.
- Clarke L. L. (2009) A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. *American Journal of Physiology, Gastrointest Liver Physiology*, 296, 1151–1166.
- Crespo S., Karnaky Jr K. J. (1983) Copper and zinc inhibit chloride transport across the opercular epithelium of sea water-adapted killifish *Fundulus heteroclitus*. *The Journal of Experimental Biology*, 102, 337-341.
- Davies B., Fried M. (1995) The L19 Ribosomal Protein Gene (RPL19): Gene Organization, Chromosomal Mapping, and Novel Promoter Region. *Genomics*, 25, 372-380.
- Ferruzzi M. G., Blakesleeb J. (2007) Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Science Direct*, 27, 1-12.

- Field C. B., Behrenfeld M. J., Randerson J. T., Falkowski P. (1998) Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science*, 281, 237-240.
- Fuentes J., Figueiredo J., Power D. M., Canário A. V. M.. (2006) Parathyroid hormone-related protein regulates intestinal calcium transport in sea bream (*Sparus auratus*). *American Journal Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology*, 291, 1499–1506.
- Garbayo I., Torronteras R., Forján E., Cuaresma M., Casal C., Fuentes-Cordero J., Fuentes R., González-del-Valle M., Vílchez C.. (2012) Identification and physiological aspects of a novel carotenoid-enriched, metal-resistant microalga isolated from an acidic river in Huelva. *Journal of Phycology*, 48, 607–614.
- Gilbert S. F. (2003) *Developmental biology*, 7th edition, Sinauer Associates.
- Gross W. (2000) Ecophysiology of algae living in highly acidic environments. *Hydrobiologia*, 433: 31–37.
- Haas M., Forbush III B. (2000) THE Na-K-Cl cotransporter of Secretory epithelia. *Annual Review of Physiology*, 62:515–34.
- Hendry G. A. F., Price A. H. (1993) Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. *Methods in Comparative Plant Ecology*, 148–152.
- Henriques M., Silva A., Rocha J.. (2007) Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 1, 586-593.
- Herbert R. A. (1992) A perspective on the biotechnological potential of extremophiles. *Trends Biotechnology*, 10, 395–401.
- Hoffmann E. K., Hoffmann E., Lang F., Zadunaisky J. A.. (2002) Control of Cl<sup>-</sup> transport in the operculum epithelium of *Fundulus heteroclitus*: long- and short-term salinity adaptation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1566, 129– 139.
- Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M., Darzins A. (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal*, 54, 621–639.
- Isenring P., Jacoby S. C., Payne J. A., Forbush III B. (1998) Comparison of Na-K-Cl Cotransporters. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 273, No. 18, 11295–11301.
- Ju M., Scott-Ward T. S., Liu J., Khuituan P., Li H., Cai Z., Husbands S. M., Sheppard D. N. (2013) Loop diuretics are open-channel blockers of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with distinct kinetics. *British Journal of Pharmacology*, 171, 265–278.
- Karnaky K. J. Jr, Degnan K. J., Zadunaisky J. A. (1977) Chloride transport across isolated opercular epithelium of killifish: a membrane rich in chloride cells. *Science*, 195, 203-205.
- Karnaky K. J. Jr, Kinter W. B. (1977) Killifish opercular skin: a flat epithelium with a high density of chloride cells. *Journal of Experimental Zoology*, 199, 355-364.

- Kim Y. J., Kwak C. I., Gu Y. Y., Hwang I. T., Chun J. Y. (2004) Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. *BioTechniques*, 36, 424-434.
- Komatsu T., Kido N., Sugiyama T., Yokochi T. (2013) Antiviral activity of acidic polysaccharides from *Coccomyxa gloeobotrydiformis*, a green alga, against an in vitro human influenza A virus infection. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 35, 1-7.
- Li H., Sheppard D. N., Hug M. J. (2004) Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber. *Journal of Cystic Fibrosis*, 3, 123-126.
- Lichtenthaler H. K., Wellburn A. R. (1983) Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11, 591-592.
- Lin H. W., Chen Y. C., Liu C. W., Yang D. J., Chen S. Y., Chang T. J., Chang Y. Y. (2014) Regulation of virus-induced inflammatory response by *Dunaliella salina* alga extract in macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 71, 159-165.
- Liu C., Wu G., Huang X., Liu S., Cong B. (2012) Validation of housekeeping genes for gene expression studies in an ice alga *Chlamydomonas* during freezing acclimation. *Extremophiles*, 16, 419-425.
- Liu N., Li F., Ge F., Tao N., Zhou Q., Wong M. (2015) Mechanisms of ammonium assimilation by *Chlorella vulgaris* F1068: isotope fractionation and proteomic approaches. *Bioresource Technology*.
- Mackinney G. (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. *The Journal of Biological Chemistry*, 140, 315-322.
- Madigan M. T., Oren A. (1999) Thermophilic and halophilic extremophiles. *Ecology and industrial microbiology*, 2, 265-269.
- Mallick N. (2004) Copper-induced oxidative stress in the chlorophycean microalga *Chlorella vulgaris*: response of the antioxidant system. *Journal of Plant Physiology*, 161, 591-597.
- Martos-Sitcha J. A., Rodríguez G. M., Mancera J. M., Fuentes J. (2015) AVT and IT regulate ion transport across the opercular epithelium of killifish (*Fundulus heteroclitus*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 182, 93-101.
- McGettigan P. A. (2013) Transcriptomics in the RNA-seq era. *Current Opinion in Chemical Biology*, 17, 4-11.
- Messerli M. A., Amaral-Zettler L. A., Zettler E., Jung S. K., Smith P. J. S., Sogin M. L. (2005) Life at acidic pH imposes an increased energetic cost for a eukaryotic acidophile. *The Journal of Experimental Biology* 208, 2569-2579.
- Mortensen A., Skibsted L. H., Truscott T. G. (2001) The Interaction of Dietary Carotenoids with Radical Species. *Archives of Biochemistry and Biophysics* Vol. 385, No. 1.

- Netto A. T., Campostrini E., Oliveira J. G., Bressan-Smith R. E. (2005) Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. *Scientia Horticulturae*, 104, 199–209.
- Oliveira J. T., Oliveira V. (2002) Síntese da Geologia da Faixa Piritosa em Portugal e das Principais Mineralizações Associadas. *Mineração do Baixo Alentejo*, de Câmara Municipal de Castro Verde, 1, 8-27.
- Palazzuoli A., Ruocco G., Ronco C., McCullough P. A. (2015) Loop diuretics in acute heart failure: beyond the decongestive relief for the kidney. *Critical Care*, 19:296.
- Pérez-López R., Delgado J., Nieto J. M., Márquez-García B. (2010) Rare earth element geochemistry of sulphide weathering in the São Domingos mine area (Iberian Pyrite Belt): A proxy for fluid–rock interaction and ancient mining pollution. *Chemical Geology*, 276, 29–40.
- Pinho C., Fonseca R., Martins L., Dias N. (2014) Avaliação geoquímica de ambientes contaminados pela extração mineira em duas distintas regiões geológicas e climáticas. *Comunicações Geológicas*, 101, Especial II, 1043-1046.
- Porra R., Thompson W., Kriedemann P. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 975, 384-394.
- Pulz O., Gross W. (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 635–648.
- Qavi A. H., Kamal R., Schrier R. W. (2015) Clinical Use of Diuretics in Heart Failure, Cirrhosis, and Nephrotic Syndrome. *International Journal of Nephrology*.
- Reddy M. M., Quinton P. M. (1999) Bumetanide blocks CFTR  $G_{Cl}$  in the native sweat duct. *American Physiological Society*, 231-237.
- Rodolfi L., Zittelli G. C., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Tredici M. R. (2009) Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioengineering*, 102, 100–112.
- Satyanarayana T., Raghukumar C., Shivaji S. (2005) Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Special Section: Microbial Diversity*, 89, 78-90
- Schiraldi C., de Rosa M. (2002) The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *Trends in Biotechnology*, 20, 515–521.
- Sirover M. A. (1997) Role of the Glycolytic Protein, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, in Normal Cell Function and in Cell Pathology. *Journal of Cellular Biochemistry*, 66, 133–140.
- Sun L., Jin Y., Dong L., Sumi R., Jahan R., Li Z. (2013) The Neuroprotective Effects of *Coccomyxa gloeobotrydiformis* on the Ischemic Stroke in a Rat Model. *International Journal of Biological Sciences*, 9, 811-817.
- Timson D. J., Reece R. J. (2003) Identification and characterisation of human aldose 1-epimerase. *FEBS Letters*, 543, 21-24.
- Tuite M. F., Stansfield I. (1994) Termination of protein synthesis. *Molecular Biology Reports* 19, 171-181.

- Ussing H. H., Zerahn K. (1950) Active Transport of Sodium as the Source of Electric Current in the Short-circuited Isolated Frog Skin. *Acta Physiologica Scandinavica*, 23, 110-127.
- Valente T., Hill B., Raposo A., Esteves F., Reis M. P., Fonseca F.. (2013) Functional characterization of the polyextremophile *Coccomyxa* sp. isolated from the acid mine drainage of S. Domingos (Portugal). PRIMO 17, Faro, Portugal, 5-8 May. MIX-PT031, pp318.
- Vaquero I., Ruiz-Domínguez M. C., Márquez M., Vílchez C.. (2012) Cu-mediated biomass productivity enhancement and lutein enrichment of the novel microalga *Coccomyxa onubensis*. *Process Biochemistry*, 47, 694-700.
- Vladimirov S. N., Ivanov A. V., Karpova G. G., Musolyamov A. K., Egorov T. A., Thiede B., Wittmann-Liebold B., Otto A. (1996) Characterization of the human small-ribosomal-subunit proteins by N-terminal and internal sequencing, and mass spectrometry. *European Journal of Biochemistry*, 239, 144-149
- Wan M., Jin X., Xia J., Rosenberg J. N., Yu G., Nie Z., Oyler G. A., Betenbaugh M. J. (2014) The effect of iron on growth, lipid accumulation, and gene expression profile of the freshwater microalga *Chlorella sorokiniana*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 98, 9473–9481.
- Wu X., Huang A., Xu M., Wang C., Jia Z., Wang G., Niu J. (2013) Variation of Expression Levels of Seven Housekeeping Genes at Different Life-History Stages in *Porphyra yezoensis*. *PLoS ONE*, 8.
- Zhang J., Hao Q., Bai L., Xu J., Yin W., Song L., Xu L., Guo X., Fan C., Chen Y., Ruan J., Hao S., Li Y., Wang R. R. C., Hu Z. (2014) Overexpression of the soybean transcription factor GmDof4 significantly enhances the lipid content of *Chlorella ellipsoidea*. *Biotechnology for Biofuels*, 7.