

Detecção de atividades citotóxicas de *Leptolyngbya* sp sobre culturas de células Vero

Büchli, F. ; Martins, S. S. ; Yano, T.

Depto. de Microbiologia e Imunologia - Laboratório de Agentes de Virulência em Bactérias - Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP - 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

Palavras-Chave: Cianotoxinas, *Leptolyngbya* sp. , culturas celulares

Introdução

Cianobactérias são eubactérias autotróficas, fotossintetizantes, que produzem grande diversidade de metabólitos secundários, entre eles cianotoxinas, as quais colocam em risco a saúde ambiental, animal e humana. Foi estudada a atividade citotóxica do gênero *Leptolyngbya* coletado na Mata Atlântica, na foz do rio Perequê-Açú (Paraty, RJ), sem floração.

Materiais e Métodos

1- Isolamento e Identificação:

A amostra coletada no rio Perequê-Açú foi cultivada em meio BG11 à temperatura ambiente, sob estresse luminoso e isolada pela técnica de pescaria com auxílio de microscopia óptica. A identificação do isolado foi realizada através de observações com auxílio de microscopia óptica e de epifluorescência.



Fig.1: *Leptolyngbya* sp crescida em meio BG11.

2- Preparo das frações toxigênicas de *Leptolyngbya*:

1º Lise celular com ultra-som (3 ciclos de 20 s a 45%).

2º Centrifugação (12000 xg) para obtenção do SN.

3º Separação dos compostos por ultra-filtração em membranas com corte em pesos moleculares de 300 kDa, 50 kDa, 10 kDa, 5 kDa.

3- Teste de Citotoxicidade :

As atividades citotóxicas das frações obtidas na ultra-filtração foram analisadas em células Vero, em triplicatas, com diluições seriadas de razão 2 até a recíproca de 2048.

4- Teste de hemaglutinação:

Foram analisadas atividades hemaglutinantes das frações obtidas através da ultra-filtração. O teste foi realizado em placa de 96 poços, incubadas a 37°C por uma hora e posteriormente mantidas por 18 h a 4°C.

Resultados

1- O gênero do isolado foi confirmado como *Leptolyngbya* (Fig. 2)

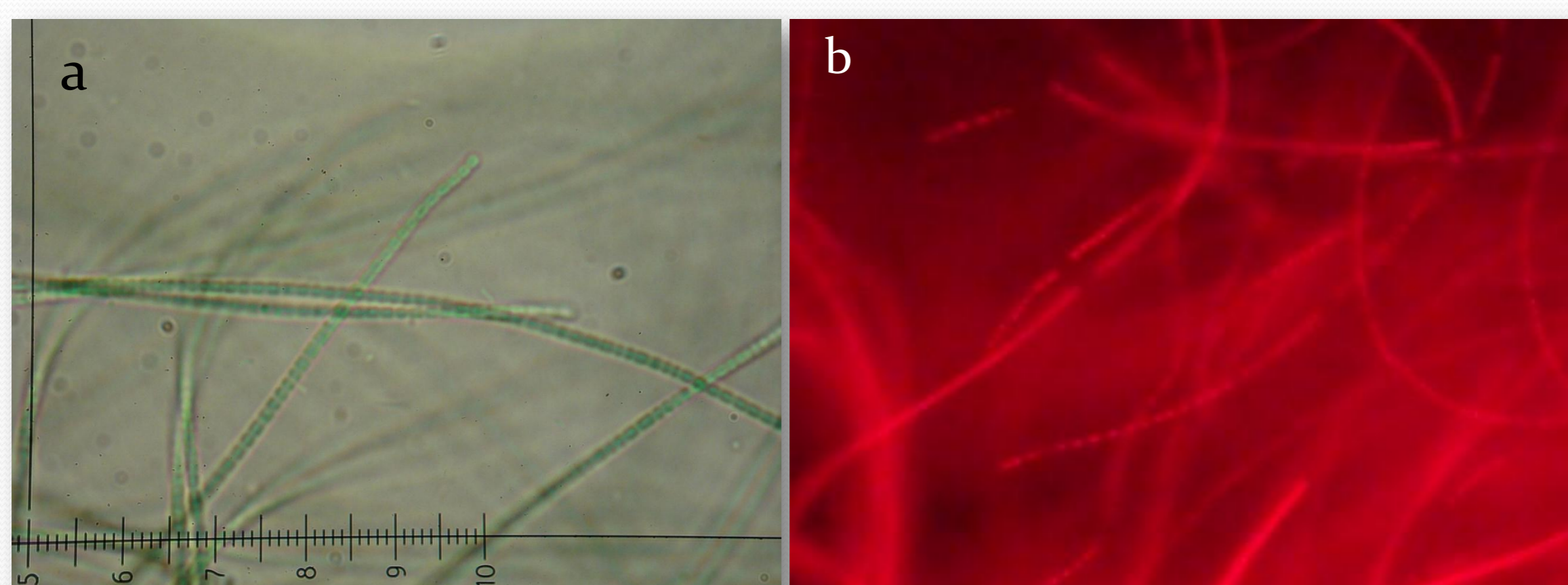


Fig.2.:Microscopia óptica do isolado de cianobactéria filamentososa do gênero *Leptolyngbya*. a- Tricomas observados por microscopia óptica; b-Tricomas observados através de microscopia de epifluorescência.

2- O efeito citotóxico foi detectado na fração entre 50 e 300 kDa, obtida pela ultra-filtração (AMICON).

3- Após 5 horas de ensaio, as células Vero mostraram alterações morfológicas que evoluíram para a morte em 22 horas.

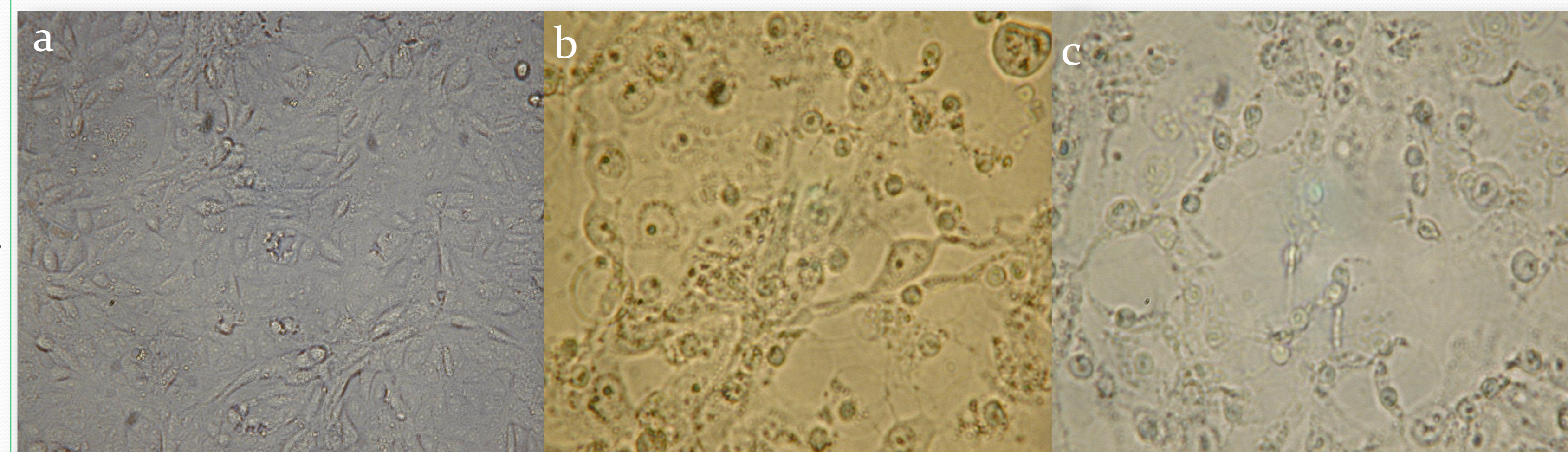


Fig.3: Teste de citotoxicidade em células Vero. a- Controle negativo; b- Efeitos observados após 5 horas de aplicação dos lisados, evidenciando prolongamentos, vacúolos, condensação nuclear e desprendimento da monocamada celular na recíproca de diluição 2; c- alterações celulares observados em recíproca de diluição 4. Magnificação 400x

4- A fração com atividade citotóxica não mostrou a capacidade hemaglutinante de eritrócitos humanos, o que descarta o potencial trombogênico deste isolado.

Discussão e Conclusão

Os resultados confirmam a produção de agentes toxigênicos pelo gênero *Leptolyngbya*, não descritos na literatura. E além disso as cianotoxinas descritas em geral são alcalóides ou peptídeos cíclicos, de baixo peso molecular, diferentes do nosso material, o que sugere uma nova toxina. Os resultados indicam possível patogenicidade desta bactéria prejudicando a saúde ambiental e humana. O uso de células como modelo para o teste de toxicidade é comum para a grande maioria das bactérias sendo as células Vero um padrão para teste em *E. coli*. Porém o uso de células para teste de toxicidade de cianobactérias ainda não é reconhecido internacionalmente. O teste de atividade citotóxica de cianotoxinas em células Vero pode ser uma alternativa ao uso de camundongos, que permite uma rápida detecção de toxinas.

Agradecimentos: