



OBTENÇÃO DE VESÍCULAS DE GÁS ISOLADAS DE MICRORGANISMOS PARA ATUAREM COMO AGENTES DE CONTRASTE DE ULTRASSOM

Felipe Vianna Garrute

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção de título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: João Carlos Machado

Rio de Janeiro

Março de 2020

OBTENÇÃO DE VESÍCULAS DE GÁS ISOLADAS DE MICRORGANISMOS
PARA ATUAREM COMO AGENTES DE CONTRASTE DE ULTRASSOM

Felipe Vianna Garrute

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA BIOMÉDICA.

Orientador: João Carlos Machado

Aprovada por: Prof. João Carlos Machado

Prof. Roberto Macoto Ichinose

Profª. Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2020

Garrute, Felipe Vianna

Obtenção de vesículas de gás isoladas de microrganismos para atuarem como agentes de contraste de ultrassom/ Felipe Vianna Garrute. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2020.

IX, 45 p.:il.; 29,7 cm.

Orientador: João Carlos Machado.

Dissertação (mestrado) – UFRJ / COPPE / Programa de Engenharia Biomédica, 2020.

Referências Bibliográficas: p. 39-45.

1. Vesículas de gás; 2. *Halobacterium salinarum*; 3. *Microcystis aeruginosa*; 4. Ultrassom; 5. Agentes de Contraste de Ultrassom. I. Machado, João Carlos. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE. Programa de Engenharia Biomédica. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço por essa dissertação aos membros do Laboratório de Ultrassom em especial ao professor João e aos alunos Bianca, Gabriela, Pedro, Rodrigo, Flávia, Mario e Edgar pelo suporte e companheirismo. Ao Programa de Engenharia Biomédica que incluí professores, alunos e funcionários, especial a Ale e Vinícios. Agradeço ao Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias pelo auxílio, à minha aluna de iniciação científica, Isabel e às Instituições CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro.

Por fim, gostaria de agradecer a toda minha família, aos meus pais Raquel e Claudio e a minha irmã Mylena.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

OBTENÇÃO DE VESÍCULAS DE GÁS ISOLADAS DE MICRORGANISMOS
PARA ATUAREM COMO AGENTES DE CONTRASTE DE ULTRASSOM

Felipe Vianna Garrute

Março/2020

Orientador: João Carlos Machado

Programa: Engenharia Biomédica

Agentes de contraste de ultrassom (ACUs), utilizados para aumentar o contraste na ultrassonografia, consistem de microbolhas de gases inertes estabilizadas por um encapsulamento proteico, lipidico ou polimerico. Uma nova técnica de produção de ACUs, a partir de vesículas de gás (GVs) de microrganismos, tal como *Halobacterium salinarum* NRC-1 (HALO-NRC1), realiza-se com cultivos dos microrganismos e baseia-se em uma metodologia viável em laboratório de pesquisa. Nesta Dissertação implementou-se essa técnica, no Laboratório de Ultrassom (LUS), para recuperar GVs de *Microcystis aeruginosa* MC-22, (MYC-22), e foram analisadas suas propriedades de atuarem como ACUs, através da aquisição de imagens ultrassônicas, assim como suas morfologia, diâmetro e comprimento, juntamente com as GVs HALO-NRC-1 já existentes no LUS. Após os cultivos de MYC-22 e HALO-NRC1 e seu crescimento em condições favoráveis à produção de GVs, as células flutuantes contendo GVs foram separadas do meio para posterior lise celular com a adição de reagentes químicos. A solução lisada foi centrifugada, para isolar as GVs, onde cada espécie produziu diferentes concentrações de GVs. A microscopia eletrônica de transmissão constatou que GVs (n=15) de MYC-22 possuem morfologia elíptica com diâmetro médio de 0,171 (SD = 0,032) μm e comprimento médio de 0,201 (SD = 0,031) μm e GVs (n=15) de HALO-NRC1 possuem formato fusiforme-cilindrico, diâmetro médio de 0,241 (SD=0,041) μm , e comprimento médio de 0,376 (SD= 0,091) μm . Imagens de ultrassom no modo-B das soluções comprovaram a capacidade das GVs gerarem sinal de eco, confirmando assim a sua atuação como ACUs.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M,Sc).

OBTAINING GAS VESICLES ISOLATED FROM MICRO-ORGANISMS TO ACT AS ULTRASOUND CONTRAST AGENTS

Felipe Vianna Garrute

March/2020

Advisors: João Carlos Machado

Department: Biomedical Engineering

Ultrasound contrast agent (UCA), used to enhance the contrast in ultrasonography, consists of microbubbles filled with an inert gas and encapsulated with a protein- or lipidic-stabilize membrane. Recently, a technique to produce UCA from microorganisms, as *Halobacterium salinarum* NRC-1 (HALO-NRC1), was developed and it consists in lysing microorganism's cells to obtain gas vesicle (GVs) after cultivation in laboratory. This Dissertation implemented a technique to produce GVs from *Microcystis aeruginosa* MC-22 (MYC-22), at the Ultrasound Laboratory (LUS), and inspected their properties of acting as ACUs, analyzed through ultrasonic images, and morphology, diameter and length. The GVs from HALO-NRC1, already existent in LUS, were also inspected. After cultivation of MYC-22 and HALO-NRC1 and their grow in specific conditions the buoyant cells with GVs were separated from the culture medium and submitted to cells lysis with chemical treatment. Thereafter, the solution with lysed cells was centrifuged to isolate the GVs and each specie produced different GVs concentrations. Transmission electron microscopy inspection revealed the MYC-22-GVs (n=15) with elliptical morphology and a medium diameter 0.171 (SD = 0,032) μm and length 0.201 (SD = 0,031) μm . Meanwhile, the GVs from HALO-NRC1 (n=15) presented a spindle-cylindrical geometry and a medium diameter 0.241 (SD = 0,041) μm and length 0.376 (SD = 0,091) μm . B-mode ultrasound images of the solutions proved the GVs ability to generate an echo signal, thus confirming their performance as ACUs.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
4.	FUNDAMENTOS TEÓRICOS	12
4.1.	ULTRASSOM.....	12
4.2.	ULTRASSONOGRAFIA EM MODO-B E MODO-CONTRASTE	13
4.3.	AGENTES DE CONTRASTE DE ULTRASSOM	13
4.3.1.	PRINCÍPIOS FÍSICOS DA INTERAÇÃO DE UMA MICROBOLHA COM O ULTRASSOM.....	<u>15</u>
4.4.	MICROORGANISMOS	19
4.4.1.	<i>HALOBACTERIUM SALINARUM</i> (HALO).....	21
4.4.2.	<i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i> (MYC).....	22
4.5.	VESÍCULAS DE GÁS.....	24
5.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
5.1.	MICROORGANISMO UTILIZADO PARA ISOLAMENTO DE GVS	26
5.2.	MEIO DE CULTURA E CULTIVO DOS MICROORGANISMOS	26
5.2.1.	<i>HALOBACTERIUM SALINARUM</i> NRC-1	26
5.2.2.	<i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i> MC-22	26
5.3.	PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE GVS:.....	27
5.3.1.	<i>HALOBACTERIUM SALINARUM</i> NRC-1	27
5.3.2.	<i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i> MC-22	27
5.4.	OBTENÇÃO DE IMAGENS PELO ULTRASSOM E MEDIÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA (OD):	29
5.5.	IDENTIFICAÇÃO DA MORFOLOGIA, DIÂMETRO E COMPRIMENTO DAS GVS ATRAVÉS DE MET:	29

6.	RESULTADOS	31 <u>1</u>
6.1.	OBTENÇÃO DE GVS DE MYC-22	31 <u>1</u>
6.2.	OBTENÇÃO DE IMAGENS DE US DAS GVS IMERSAS EM MEIO LÍQUIDO 32 <u>2</u>	
6.3.	IDENTIFICAÇÃO DA MORFOLOGIA E O DIÂMETRO DAS GVS ATRAVÉS DA MET:	33 <u>3</u>
7.	DISCUSSÃO	34 <u>4</u>
8.	CONCLUSÃO	38
9.	REFERÊNCIAS	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ACU - Agentes de Contraste de Ultrassom

ANA - *Anabaena flos-aquae*

COPPE - Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia

FDA - Food and Drug Administration

GV - Vesícula de gás

HALO - *Halobacterium salinarum*

HALO-NRC1 - *Halobacterium salinarum* NRC-1

LETC - Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias

LUS - Laboratório de Ultrassom

MB - Microbolhas

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MYC - *Microcystis aeruginosa*

MYC-22 - *Microcystis aeruginosa* MC-22

NB - Nanobolhas

OD - Densidade Óptica

PBS - Tampão fosfato-salino

PFC - Perfluorocarbono

UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

US - Ultrassom

1. Introdução

O ultrassom (US) quando propaga em fluídos caracteriza-se por ondas mecânicas longitudinais, acima da faixa audível pelos seres humanos, que oscilam em frequência acima de 20 kHz. Já a ultrassonografia consiste em uma técnica que emprega a radiação ultrassônica que é bastante utilizada na área da saúde, sendo normalmente empregada para a obtenção de diagnóstico baseado na geração de imagens pelo método pulso-eco ou pelo efeito Doppler (FISH, 1990).

Ao longo de seu desenvolvimento, o emprego de US como um método de diagnóstico foi aprimorado para a identificação de estruturas anatômicas e do fluxo sanguíneo, como é o caso da utilização de agentes de contraste de ultrassom (ACUs) combinados com a modalidade de imagem no modo contraste (BORDEN, SONG, 2018). Os ACUs, microbolhas (MBs) de gases inertes estabilizadas por membranas proteicas, lipídicas ou poliméricas, com diâmetro variando de 1 a 10 μm (aproximadamente o diâmetro dos eritrócitos), são capazes de ressonar e gerar um sinal acústico de eco intenso (WHEATLEY, COCHRAN, 2013). Recentemente, grupos de pesquisas buscam obter ACU permeáveis a tecidos adjacentes aos vasos sanguíneos, sendo esses denominados de nanobolhas (NBs) (ACHMAD, YAMAGUCHI, *et al.*, 2018, GÜVENER, APPOLD, *et al.*, 2017, ODDO, CERRONI, *et al.*, 2017, VANOSDOL, EKTATE, *et al.*, 2017).

Shapiro *et al.*, (2014) desenvolveram uma nova técnica de produção de ACUs, a qual envolve a produção por microrganismos, tais como *Halobacterium salinarium* NRC-1 (HALO-NRC1) e *Anabaena flos-aquae* (ANA), que são produtores de vesículas de gás (GVs) capazes de atuarem como ACUs (SHAPIRO, GOODWILL, *et al.*, 2014). As GVs são produzidas, principalmente, por microrganismos aquáticos para auxiliar a flutuação vertical na coluna d'água (E. WALSBY, 1994).

As GVs são compostas por uma membrana proteica que envolve e armazena ar em seu interior (SHAPIRO, GOODWILL, *et al.*, 2014). Possuem um diâmetro entre 0,045-0,2 μm e comprimento entre 0,1-0,8 μm , o que as torna menores que as MBs anteriormente citadas, que variam entre 1 e 10 μm (WHEATLEY, COCHRAN, 2013). Entretanto, a diferença no tamanho não interfere no contraste obtido para as imagens ultrassônicas (SHAPIRO, GOODWILL, *et al.*, 2014).

No Laboratório de Ultrassom (LUS) do Programa de Engenharia Biomédica do Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (COPPE) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) são utilizados ACUs comerciais para a caracterização de perfusão sanguínea em modelos murinos de acidente vascular encefálico e tumor do cólon, juntamente com a biomicroscopia ultrassônica. Entretanto, considerando-se que a produção de GVs para atuarem como ACUs é mais econômica do que a aquisição de MBs convencionais e comerciais, o objetivo desta Dissertação consiste em produzir, no LUS, as GVs a partir de microrganismos para serem utilizadas em trabalhos futuros substituindo as GVs comerciais. Consiste ainda em obter GVs de *Microcystis aeruginosa* MC-22 (MYC-22), em adquirir imagens ultrassônicas a partir das GVs de MYC-22 e HALO-NRC1 e em analisar morfologia, diâmetro e comprimento das GVs.

2. Objetivos

Esta Dissertação tem como objetivo a implementação de uma metodologia de produção e de testes das GVs no LUS do Programa de Engenharia Biomédica do COPPE/UFRJ.

2.1. Objetivos específicos

- 2.1.1.** Obter vesículas de gás de MYC-22;
- 2.1.2.** Testar, por imagens do modo-B, a capacidade das GVs de MYC-22 e de GVs de HALO-NRC1, do estoque do LUS, de refletirem o ultrassom;
- 2.1.3.** Identificar a morfologia, diâmetro e comprimento de GVs de MYC-22 e HALO-NRC1 através da microscopia eletrônica de transmissão (MET).

3.Revisão Bibliográfica

A ultrassonografia é comumente utilizada em medicina para o diagnóstico por imagem, pelo fato de gerar imagens do paciente *in vivo*, ter baixo custo de utilização, ser portátil e não emitir radiação ionizante. Entretanto, as imagens de US possuem um baixo contraste entre regiões contendo tecidos e vasos sanguíneos o que pode dificultar na realização do diagnóstico. Neste caso, ACUs foram desenvolvidos (ODDO, CERRONI, *et al.*, 2017, STOUFFER, 2004) e são utilizados para a melhora na qualidade do contraste da imagem.

Em geral, os ACUs são injetados na circulação sanguínea venosa e permitem, por exemplo, a determinação de parâmetros de perfusão sanguínea, proporcionando uma melhor compreensão do tecido estudado. Os primeiros trabalhos relacionados com o emprego de ACUs surgiram na década de 70, quando Gramiak *et al.* (1969) observaram uma melhora na imagem de US do lúmen da aorta após a injeção de solução pré agitada de salina. Eles perceberam que bolhas de ar foram formadas e uma vez incididas pelo feixe de US produziam ecos que promovia uma melhora no contraste da imagem (GRAMIAK, SHAH, *et al.*, 1969). Posteriormente, Feinstein *et al.* (1984) mostraram que ao se usar um sonificador, bolhas de ar estáveis podem ser criadas dando início a produção de ACU (FEINSTEIN, TEN CATE, *et al.*, 1984). Desde então pesquisadores de todo o mundo têm trabalhado no desenvolvimento de novos agentes de contraste para sua utilização na ultrassonografia (ACHMAD, YAMAGUCHI, *et al.*, 2018, ANDERSON, HAMPTON, 1980, BORDEN, SONG, 2018, FERRARA, POLLARD, *et al.*, 2007, GAO, HERNANDEZ, *et al.*, 2017, GÜVENER, APPOLD, *et al.*, 2017, HUNT, ROMERO, 2017, PAEFGEN, DOLESCHER, *et al.*, 2015, PERERA, WU, *et al.*, 2017, VANOSDOL, EKTATE, *et al.*, 2017, WEI, MULVAGH, *et al.*, 2008).

Os ACUs são constituídos de microbolhas de gás inerte revestidas por um encapsulamento, e são capazes de entrarem em ressonância de oscilação quando incididas por feixe de US (CHOMAS, DAYTON, *et al.*, 2001). A Figura 1 fornece uma representação de diferentes ACUs, de acordo com a estrutura das MBs e NBs. As MBs, com diâmetros que variam entre 1 e 10 μm (aproximadamente o tamanho das hemácias), são visualizadas na macro e microvasculatura. Normalmente, seus encapsulamentos são constituídos por proteínas, lipídios ou polímeros (HERNOT, KLIBANOV, 2008, HUNT, ROMERO, 2017, WHEATLEY, COCHRAN, 2013). As primeiras MBs comercialmente produzidas e aprovadas pela FDA (Food and Drug

Administration) foram a *Albumex*[®] e a *Optisom*[™], com encapsulamentos formados pela proteína albumina e contendo ar o interior. Entretanto, devido à alta difusão do gás e à fina camada do encapsulamento, a destruição da MB ocorre em poucos segundos (HERNOT, KLIBANOV, 2008, HUNT, ROMERO, 2017).

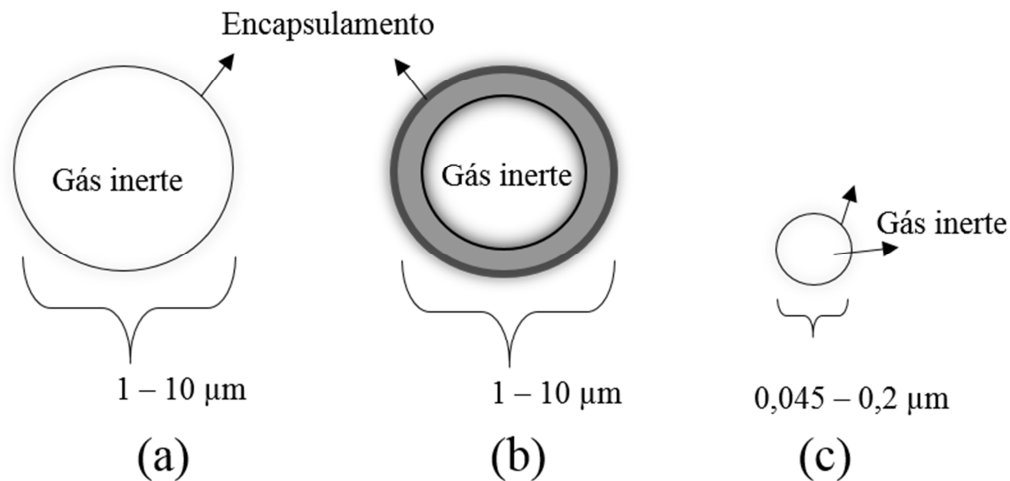


FIGURA 1: Representação de ACUs. (a) uma MB da primeira geração de ACU contendo gás inerte e revestida por uma fina camada. (b) MB da segunda geração contendo gás inerte e um encapsulamento mais espesso e resistente. (c) uma NB contendo também o gás inerte e recoberta por um encapsulamento.

As segunda e terceira gerações de MBs utilizam gases inertes de alto peso molecular e um encapsulamento capaz de reduzir a difusão do gás para aumentarem suas estabilidades (HUNT, ROMERO, 2017, WHEATLEY, COCHRAN, 2013). Adicionalmente, as MBs podem ser produzidas com a utilização de surfactantes para diminuir a tensão superficial (LEE, KIM, *et al.*, 2001). A Tabela 1 apresenta exemplos de microbolhas comerciais, do material do encapsulamento e a composição do gás no interior das mesmas.

As MBs têm como características uma ressonância na vibração quando expostas ao ultrassom na faixa de frequências tipicamente usada em ultrassonografia, e com isso geram um sinal de eco de US intenso, devido à diferença de impedância acústico entre o gás e o tecido em volta da MB, em comparação com o sinal de eco tipicamente gerado nos tecidos biológicos (DE JONG, TEN CATE, *et al.*, 1991, WHEATLEY, COCHRAN, 2013). A pressão parcial entre o interior da microbolha e o meio limita a maioria das microbolhas comerciais a tamanhos maiores que 1 µm (FERRARA, POLLARD, *et al.*, 2007). Por outro lado, o tamanho superior fica limitado pela

capacidade dos ACUs passarem pelos capilares, de forma a não causarem embolia pulmonar. Ao aumentar o diâmetro da MBs aumenta-se, também, a intensidade do sinal de espalhamento gerado por elas.

TABELA 1 Exemplos de ACUs comerciais.

Nome comercial	Encapsulamento	Gás	Diâmetro médio (µm)
<i>Sonazoid</i>	Fosfolipídio	Perfluorobutano	2 -3
<i>Lumason/SonoVue</i>	Fosfolipídio	Sulfurhexafluoride	2,5
<i>Definity/Luminity</i>	Fosfolipídio	Octafluoropropano	1,1-3,3
<i>Optison</i>	Albumina	Octafluoropropano	3.0-4.5
<i>Levoist</i>	Galactose	Ar	2-3
<i>Albunex</i>	Albumina	Ar	3,8
<i>Echovist</i>	Galactose	Ar	2

Normalmente, as MBs são utilizadas na ecocardiografia para a visualização do ventrículo esquerdo (GÜVENER, APPOLD, *et al.*, 2017), e aliadas à ultrassonografia para o diagnóstico de lesões da mama e dos rins, através da visualização da macro e microvasculatura (CHUNG, KIM, 2014, SENIOR, BECHER, *et al.*, 2008), e para a medição da perfusão nos rins, no cérebro e em tecidos tumorais (GÜVENER, APPOLD, *et al.*, 2017, RIM, LEONG-POI, *et al.*, 2001, WEI, LE, *et al.*, 2001). Entretanto, devido as suas características físicas, como expandir e contrair, gerar fragmentos quando destruídas que são deslocados pelo corpo humano, a segurança da utilização das MBs deve ser sempre investigada.

Além de sua utilização no aprimoramento de imagens ultrassônicas e na determinação da perfusão, as MBs podem atuar na terapia direcionada. Nesta técnica, as MBs são direcionadas e aderidas em regiões específicas e vascularizadas do corpo humano, quando associadas a marcadores celulares, o que permite o acúmulo na região, ou o carreamento de fármacos (DESHPANDE, REN, *et al.*, 2011).

Recentemente, grupos de pesquisa têm desenvolvido um novo modelo com a utilização de nanopartículas, sendo chamadas de nanobolhas (NBs), para o US de

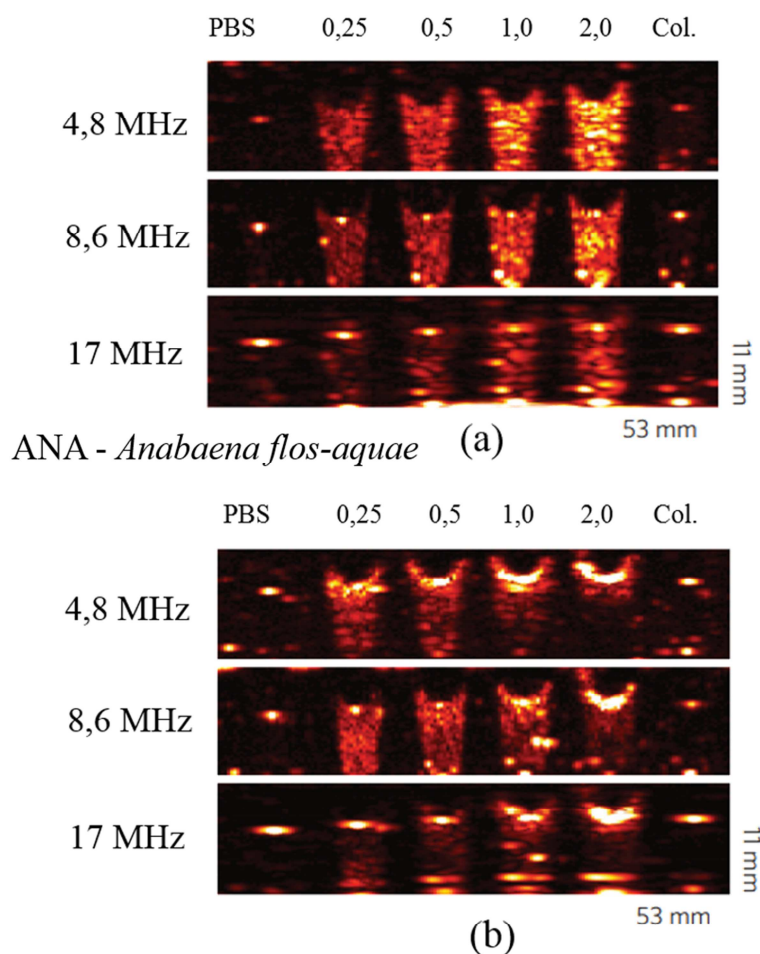
imagem (ACHMAD, YAMAGUCHI, *et al.*, 2018, GÜVENER, APPOLD, *et al.*, 2017, ODDO, CERRONI, *et al.*, 2017, VANOSDOL, EKTATE, *et al.*, 2017). As NBs possuem um diâmetro aproximado de 0,2 μm e uma estrutura similar a MBs (Figura 1).

As NBs podem ser compostas por proteínas, lipídeos, e polímeros e com gás inerte internalizado, podendo possuir ou não um encapsulamento (PERERA, WU, *et al.*, 2017, WU, ROGNIN, *et al.*, 2013). Para a fabricação é necessário a centrifugação e a utilização de surfactantes como emulsificador, o que possibilita a estabilização das NBs e auxilia na redução de seu tamanho (HWANG, LIN, *et al.*, 2009, KRUPKA, SOLORIO, *et al.*, 2010). Entretanto, por ser tratar de reagentes químicos a toxicidade destes compostos deve ser mais estudada (ASTAFYEVA, SOMAGLINO, *et al.*, 2015, MOUSNIER, HUANG, *et al.*, 2014, PISANI, FATTAL, *et al.*, 2008).

As aplicações das NBs baseiam-se na oportunidade de se visualizarem eventos celulares e moleculares *in vivo* (LIU, CHEN, *et al.*, 2015, MIN, MIN, *et al.*, 2015). Em tecidos normais, a permeabilidade de moléculas entre o vaso sanguíneo e o tecido adjacente é menor do que 0,012 μm , enquanto que em células tumorais a permeabilidade pode chegar a 0,8 μm (HASHIZUME, BALUK, *et al.*, 2000, YUAN, DELLIAN, *et al.*, 1995). Sendo assim e devido ao tamanho manométrico, as NBs são capazes de atravessar os vasos sanguíneos em processos inflamatórios e tumorais e chegar aos tecidos adjacentes (FANG, HUNG, *et al.*, 2007, GAO, HERNANDEZ, *et al.*, 2017, UNGER, PORTER, *et al.*, 2004).

Além da permeabilidade passiva, as NBs podem ser associadas a ligantes covalentes (anticorpos e peptídeos) ou a ligantes não-covalentes (proteínas, lipídeos e fosfolipídios) nos seus envoltórios e com isso serem utilizadas na terapia direcionada ou no carreamento de fármacos (HU, LIU, *et al.*, 2012, LINDNER, SONG, *et al.*, 2000). Por outro lado, já foi demonstrado que NBs podem participar do aprimoramento do contraste em imagens de US, provavelmente devido à agregação de partículas e coalescência (DANHIER, FERON, *et al.*, 2010).

Em 2014, Shapiro e colaboradores, mostraram que nanoestruturas de gás biogênico podem ser usadas como ACUs. Essas estruturas, chamadas de vesículas de gás (GVs), consistem de micelas com encapsulamento proteico contendo ar em seu interior. A Figura 2 apresenta imagens de ultrassom em *phantoms* de gel contendo GVs de diferentes microrganismos. São produzidas, principalmente, por microrganismos aquáticos e tem como função auxiliar no movimento vertical dos microrganismos no corpo d'água (E. WALSBY, 1994).



HALO-NRC1 - *Halobacterium salinarum*

FIGURA 2: Imagem de ultrassom em *phantoms* de gel contendo GVs de diferentes microrganismos. Na horizontal é possível ver um controle contendo PBS (tampão fosfato-salino), densidades ópticas diferentes das GVs e depois da ocorrência de colapso (Col). A vertical corresponde a diferentes frequências de ultrassom. Em (a) o sinal de eco produzido por *Anabaena flos-aquae* (ANA) e em (b) o sinal produzido por *Halobacterium salinarum* NRC-1 (HALO-NRC1). Adaptada pela permissão de Springer Nature: Nature Nanotechnology, Biogenic gás nanostructures as ultrasonic molecular reporters, Mikhail G Shapiro *et al.*, Copyright Clearance Center. 2014

As GVs são formadas, exclusivamente, por proteínas hidrofóbicas capazes de manter um gradiente dinâmico de pressão ente o interior e exterior das vesículas, excluindo água e permitindo a difusão de ar para seu interior (E. WALSBY, 1994). Devido a sua composição, as GVs são resistentes a pressão externa e com isso são incapazes de serem infladas sem se comprimir o gás dentro delas até o ponto crítico, quando então colapsam irreversivelmente (E. WALSBY, 1994, STOECKENIUS, LOZIER, *et al.*, 1979).

As proteínas que definem a morfologia das GVs foram descritas como GvpA e GvpC responsáveis, respectivamente, pela formação da estrutura da vesícula e pela estabilização da GVs. Entre 8 e 14 genes, *gvp*, foram descritos como responsáveis pela transcrição das Gvps (E. WALSBY, 1994). A formação das GVs ocorre quando fatores ambientais (ausência de luz e nutrientes) promovem a ativação dos genes *gvp* que por sua vez transcreve as proteínas Gvps, formando novas vesículas ou aumentando as dimensões das GVs existentes (PFEIFER, 2012).

As morfologias das GVs variam de acordo com o ambiente que os microrganismos estão inseridos, com as condições do meio e quais microrganismos as produzem. Geralmente, são fusiformes ou cilíndricas com diâmetro que varia entre 0,045 e 0,25 μm , com comprimento entre 0,1 e 0,8 μm . Espessura aproximada de 0,002 μm e com peso molecular entre 7-8 kDa como é o caso da GvpA (PFEIFER, 2012, SHAPIRO, GOODWILL, *et al.*, 2014). À medida que seu comprimento aumenta, a quantidade de ar armazenado também aumenta. A Figura 3 apresenta ilustrações de GVs no interior da célula e isolada.

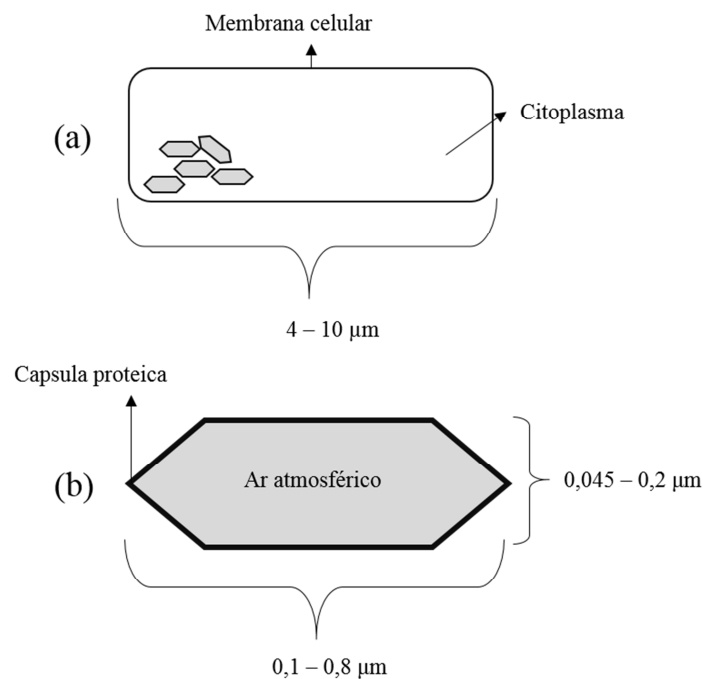


FIGURA 3: Ilustrações de GVs. (a) vesículas fusiforme no interior de uma célula. (b) a GV isolada, podendo-se notar o encapsulamento proteico, a presença de ar atmosférico em seu interior, seu diâmetro variando de 0,045 - 0,2 μm e seu comprimento entre 0,1- 0,8 μm .

Diversos microrganismos já foram descritos como produtores das vesículas, sendo contabilizadas mais de 150 espécies, dentre elas bactérias fotossintetizantes, bactérias heterotróficas e haloarceas (E. WALSBY, 1994). Os primeiros estudos reportando a presença de GVs foram realizados em cianobactérias (E. WALSBY, 1994). A Tabela 2 apresenta alguns exemplos de microrganismos produtores de GVs.

TABELA 2: Exemplos de microrganismos produtores de GVs (adaptado de PFEIFER, 2012).

Microrganismos		
Haloarchaea	Bactérias fotossintéticas	Bactérias heterotróficas
<i>Halobacterium salinarum</i> PHH1 e PHH4	<i>Calothrix sp.</i> PCC 7601	<i>Desulfotomaculum acetoxidans</i>
<i>Halobacterium salinarum</i> NRC-1	<i>Anabaena flos-aquae</i>	<i>Sporohalobacter lortetii</i>
<i>Haloferax mediterranei</i>	<i>Planktothrix rubescens</i>	<i>Serratia sp.</i> ATCC 39006
<i>Halorubrum vacuolatum</i>	<i>Microcystis sp.</i> BC 84/1	<i>Ancylobacter aquaticus</i>
<i>Haloquadratum walsbyi</i>	<i>Pelodictyon phaeoclathratiforme</i>	<i>Desulforhopalus vacuolatus</i>

Estudos recentes apontam que os microrganismos, ANA e HALO-NRC1, respectivamente uma cianobactéria e uma halobacteria, produzem GVs que podem ser utilizadas como ACUs (LAKSHMANAN, LU, *et al.*, 2017). Esses microrganismos foram capazes de gerar contraste ultrassônico (Figura 3) nas frequências entre 4,8 e 17 MHz. Também foi verificado que as GVs produzidas por ANA possuem mais resistência a maiores pressões e que as GVs produzidas por HALO-NRC1 são capazes de ressonar na emissão de harmônicos (SHAPIRO, GOODWILL, *et al.*, 2014).

As GVs usadas como ACUs suportam uma pressão hidrostática entre 40 e 700 kPa, onde pressões maiores geram o colapso irreversível das vesículas e a perda de sinal recebido pelo equipamento de US (E. WALSBY, 1994, SHAPIRO, GOODWILL, *et al.*,

2014), resultando em limitações para seu uso. Entretanto, a bioengenharia pode ser uma solução para aumentar a resistência das GVs à pressão. Neste caso, consiste em obter de microrganismos genes de GVs (*gvp*) e inocular em outros microrganismos a fim de aumentar a produção e a resistência a pressão de colapso (BOURDEAU, LEE-GOSSELIN, *et al.*, 2018).

Por se tratar de material biológico produzido por microrganismos, é preciso analisar a sua toxicidade para a aplicação. De acordo com o trabalho de Yang *et al.* (2017), as GVs produzidas por ANA não apresentam toxicidade aparente. Adicionalmente, Shapiro *et al.* (2014) indicam em seu trabalho que GVs de HALO-NRC1 e ANA não provocaram efeitos colaterais visíveis quando injetadas em camundongos.

4. Fundamentos Teóricos

4.1. Ultrassom

O ultrassom consiste em ondas mecânicas longitudinais (no caso de propagação em fluidos), não audíveis aos seres humanos, as quais oscilam em frequência acima de 20 kHz (na medicina o US é usado, tipicamente, em frequências entre 1000 e 20000 kHz para o diagnóstico por imagem). Sua propagação introduz perturbações do meio, como por exemplo, provocando alterações periódicas na pressão, na densidade e no deslocamento de partículas do meio em relação à posição de equilíbrio (FISH, 1990, HEDRICK, HYKES, *et al.*, 1995). Além disso, como outras formas de onda progressiva, o ultrassom é capaz de transportar energia ao longo de seu trajeto, podendo gerar efeitos térmicos e mecânicos nos tecidos biológicos (AZHARI, 2010).

A ultrassonografia, ou ecografia, é um exame de diagnóstico médico que permite visualizar órgãos ou tecidos biológicos em tempo real. Durante o exame, a emissão da onda de ultrassom é gerada por transdutores de US constituídos de materiais piezoelétricos, que uma vez estimulados eletricamente vibram e com isso emitem a onda de US. Por outro lado, quando uma onda de ultrassom incide nos transdutores, os mesmos geram sinais elétricos em seus terminais que estão relacionados com a forma de onda do sinal de US incidente (FISH, 1990, HEDRICK, HYKES, *et al.*, 1995).

Algumas das características da onda ultrassônica são a amplitude, o comprimento de onda e a frequência, que variam de acordo com o modo de vibração do transdutor. A amplitude consiste no descolamento máximo da partícula em relação à sua posição de equilíbrio, devido à propagação do US no meio. O comprimento de onda é a menor distância entre dois pontos de um ciclo de onda. Por fim, a frequência é definida como o número de ciclos de onda por segundo e tem como unidade o hertz (Hz) (FISH, 1990).

Outras características da onda de ultrassom estão relacionadas com a interação da mesma com o meio, como a reflexão, a refração, a frequência de ressonância dos ACUs e os fenômenos de atenuação (espalhamento e absorção). Por fim, há a velocidade de propagação da onda de US no meio e a impedância acústica do meio de propagação que são propriedades exclusivas do meio de propagação e que se relacionam com a propagação da onda de US no meio.

4.2. Ultrassonografia em Modo-B e Modo-Contraste

Na ultrassonografia em Modo-B (B vem de brilho) um pulso de ultrassom emitido pelo transdutor propaga-se, na forma de um feixe, ao longo do meio biológico e os sinais de eco gerado nas interfaces, onde há descontinuidades de impedância acústica, e nas partículas, onde não há homogeneidade do meio, são coletados pelo transdutor de US. Esses sinais de eco possuem amplitudes que variam de acordo com os descasamentos de impedância acústica nas interfaces de separação de dois meios distintos e com o coeficiente de retroespalhamento das partículas, de modo que na formação da imagem as amplitudes desses sinais de eco são codificadas numa escala de cinza, onde os sinais de eco com baixas amplitudes são representados por um brilho próximo do preto e os de maiores amplitudes por um brilho próximo do branco (FISH, 1990).

O modo B possui uma variação, chamada de Modo contraste, onde são processados os sinais de eco relacionados com efeitos não-lineares da propagação da onda de US, o que permite, por exemplo, o realce na captação do sinal de eco de um ACU em comparação do sinal de eco de uma interface de descontinuidade de impedância acústica. O modo contraste é muito apropriado para ser utilizado na detecção de ACUs contidos em diversos órgãos (LINDNER, 2002).

A técnica de biomicroscopia ultrassônica (BMU) é outra variação do modo-B que utiliza frequências na faixa de 20 MHz a 100 MHz e com isso gera imagens cujas resoluções espaciais situam-se na faixa de 30-70 μm (FOSTER, PAVLIN, *et al.*, 2000, GRECO, MANCINI, *et al.*, 2012).

4.3. Agentes de Contraste de Ultrassom

Os ACUs empregados em exames médicos são classificados como fármacos e a primeira utilização foi realizado por Gramiak *et al.* (1969) quando utilizaram solução salina no interior da aorta e conseguiram, devido a formação de bolhas de ar, aumentar o contraste na imagem de US do vaso sanguíneo (GRAMIAK, SHAH, *et al.*, 1969). Desde então, novas pesquisas têm sido feitas para desenvolver ACUs que permitam uma melhora na qualidade da imagem. Agentes de contraste precisam ser atóxicos e capazes de serem injetados intravenosamente, ter uma vida útil suficiente para chegar ao alvo através da circulação sanguínea, serem absorvidos com o tempo, ter um diâmetro

menor que 10 µm para não provocar embolia pulmonar e possuir ecogenicidade forte e controlada.

Hoje em dia, MBs são aprovadas e utilizadas como agente de contraste por permitir informações da estrutura e função o órgão alvo. Consistem em pequenas microesferas, produzidas com encapsulamento de lipídios, galactose, polímeros ou proteínas, que armazenam em seu interior um tipo de gás inerte. O ideal para as MBs é ter uma camada que limita a difusão do gás e um gás com alto peso molecular para também reduzir a sua difusão. Inicialmente, o gás era ar atmosférico ou nitrogênio, entretanto, hoje em dia é mais comum o uso de gases capazes aumentarem o tempo de vida útil do agente de contraste (HUNT, ROMERO, 2017, WHEATLEY, COCHRAN, 2013). Os ACUs mais comercializados e comumente utilizados em clínicas médicas são *Optison*, *Definity*, *SonoVue* e *Sonazoid* (Tabela 1).

O *Optison* é produzido pela GE Healthcare (AS; Oslo, Noruega) e são fabricadas com proteínas albuminas que produzem um encapsulamento com espessura de 0,015 µm que armazena o gás octafluoropropano. São utilizados para melhorar a visualização do ventrículo esquerdo e do fígado e têm permissão de uso nos Estados Unidos e Europa. São usados com uma dose recomendada por paciente entre 0,5 a 3,0 mL que circula pelo corpo durante 2,5 a 4,5 minutos (FORBES, O'BRIEN, 2012, PORTER, MULVAGH, *et al.*, 2018). *Definity*, produzido pela Lantheus Medical Imaging Inc, (North Billerica; MA, USA), é fabricado com fosfolipídios e com o gás octafluoropropano. É utilizado para a visualização do ventrículo esquerdo, com permissão nos Estados Unidos e na Europa, assim como para a visualização dos rins e fígado, com permissão no Canadá e na Austrália. Uma vez injetado na circulação sanguínea, possui poucos segundos de duração devido à alta difusão do gás (FRINKING, SEGERS, *et al.*, 2020).

Já o *SonoVue*, produzido pela Bracco Imaging S.p.A. (Colleretto Giacosa, Itália), tem seu encapsulamento é de fosfolipídio que retém o gás sulfúrxhexafluoride. É aprovado o seu uso na China, Europa, Brasil e Estados Unidos para a obtenção de imagens do ventrículo esquerdo e de lesões do fígado e mama. A dose é de 34 mL/kg (FRINKING, SEGERS, *et al.*, 2020, HYVELIN, GAUD, *et al.*, 2017). Por fim, *Sonazoid*, composto por fosfolipídios e pelo gás perfluorobutano, é fabricado pela GE Healthcare (Buckinghamshire, UK; Daiichi Sankyo, Tóquio, Japão). Sua dose recomendada é de 0,12 mL/Kg e seu principal uso é para a obtenção de imagens de

lesões hepáticas. O *Sonazoid* é aprovado para uso em países asiáticos (SONTUM, 2008).

O encapsulamento das MBs pode ser rígido ou mole, dependendo de sua utilização. As MBs com encapsulamento rígido são usadas para ultrassom de alta intensidade, sendo produzidas com polímeros sintéticos e gases como o perfluorocarbono (PFC) ou ar devido a sua maior resistência a compressão (PAEFGEN, DOLESCHER, *et al.*, 2015). As MBs de encapsulamento mole possuem melhores propriedades ressonantes, sendo produzidas com fosfolipídios e surfactantes (HERNOT, KLIBANOV, 2008). Microbolhas com encapsulamento de proteínas são menos resistentes que as de polímeros sintéticos, mas apresentam um diâmetro menor e uma boa qualidade para a geração de contraste.

Poucas informações existem sobre acidentes com óbito causados com a utilização de agentes de contraste. Em 2007, o FDA divulgou algumas contraindicações do uso de ACUs e possíveis complicações relacionadas ao seu uso (como exemplo, o infarto agudo do miocárdio ou a síndrome coronariana aguda) baseadas no óbito de quatro pessoas com doenças cardiopulmonares. Entretanto, estudos de Wei *et al.*, (2008) e Kusnetzky *et al.* (2008) não mostraram relação significativa entre a morte de pacientes com o uso de ACUs, fazendo com que a FDA removesse as contraindicações do uso de ACU intravenoso para a obtenção de imagens de ultrassom de pessoas com doenças cardíacas.

Recentemente, grupos de pesquisa tem estudado a utilização de NBs como ACU, tendo as mesmas diâmetros menores que 1 μm e havendo relatos de NBs com diâmetro entre 0,04 μm e 0,2 μm . Elas podem ser produzidas utilizando proteínas, lipídeos, surfactantes ou polímeros como emulsificadores e, um gás com alto peso molecular (ACHMAD, YAMAGUCHI, *et al.*, 2018, GAO, HERNANDEZ, *et al.*, 2017, GÜVENER, APPOLD, *et al.*, 2017, VANOSDOL, EKTATE, *et al.*, 2017).

O desenvolvimento de NBs têm como principal objetivo a sua permeabilidade a tecidos adjacentes, devido ao seu diâmetro em escala nanométrica, podendo ser utilizadas no aprimoramento das imagens de tecidos, na obtenção de imagens moleculares ou no transporte de fármacos e outras moléculas (ASTAFYEVA, SOMAGLINO, *et al.*, 2015). O uso comercial de NBs ainda não foi aprovado por órgãos especializados.

Apesar do avanço na tecnologia dos ACUs, a busca por melhorias ou novas tecnologias ainda continua. Shapiro *et al.*, (2014), apresentaram uma nova classe de ACUs, sendo eles as vesículas de gases produzidos por microrganismos.

4.3.1. Princípios físicos da interação de uma microbolha com o ultrassom

Quando um pulso de uma onda de US incide numa interface de separação entre dois tecidos com impedâncias acústicas diferentes é gerado um sinal de eco que é utilizado para a geração de imagem de US. A impedância acústica de um meio resulta do produto ρc , sendo ρ e c a densidade e a velocidade de propagação no meio, respectivamente. A amplitude do sinal de eco aumenta com o descasamento de impedâncias e ao se utilizar as MBs como ACU é possível aumentar o eco por elas gerado uma vez que a MB possui um elevado descasamento de impedância acústica quando comparado com a impedância do meio (em geral o sangue) no qual ela está imersa. Quando numa MB incide uma onda US, com comprimento de onda muito maior do que o tamanho da MB, nela ocorre uma oscilação de compressão e expansão que resulta no espalhamento da onda incidente pela MB. Em geral, quanto maior o raio da MB maior seu espalhamento, entretanto MB maiores de 10 μm podem provocar embolia pulmonar e por essa razão não são usadas na prática.

O aumento do eco com auxílio das MBs é baseado na compressibilidade e no efeito não-linear. Quando o comprimento de onda do feixe de ultrassom é maior que a MB ocorre nela a compressão e expansão que resulta no aumento do espalhamento do feixe pela MB.

Em termos práticos, somente a onda retroespalhada pela MB é recebido pelo transdutor de US e a amplitude do sinal de eco varia com a espessura, a compressibilidade e a viscosidade do material de encapsulamento da MB, sendo que aquelas com encapsulamento mais rígido, apesar de mais estáveis e de maior duração, tendem a possuir menor compressibilidade e assim como MBs com encapsulamento com maior viscosidade geram sinais de eco menos intenso (DE JONG, CORNET, *et al.*, 1994, DE JONG, TEN CATE, *et al.*, 1991, FERRARA, POLLARD, *et al.*, 2007).

Uma forma de se descrever a interação de uma microbolha com a onda de ultrassom nela incidente se faz pela análise da dinâmica da oscilação radial da MB. Para uma MB sem revestimento e imersa em um meio em condições de espaço livre a

equação que rege seu comportamento é dada pela equação de Rayleigh-Plesset (PARADOSSI, TRUCCO, 2010, cap. 7):

$$\rho \left(\ddot{R}R + \frac{3}{2} \dot{R}^2 \right) = \left(P_0 + \frac{2\sigma_\omega}{R_0} \right) \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3\kappa} \left(1 - \frac{3\kappa \dot{R}}{c} \right) - P_0 - P_a(t) - 4\nu\rho \frac{\dot{R}}{R} - \frac{2\sigma_\omega}{R}, \quad (1)$$

onde ρ é a densidade do meio que envolve a MB, ν a viscosidade cinemática do meio, c a velocidade da onda de US no meio, σ_ω a tensão superficial do sistema gás-líquido, κ o expoente politrópico do gás dentro da MB, R_0 o raio inicial da MB, R o raio em função do tempo, \dot{R} e \ddot{R} representando as derivadas primeira e segunda no tempo do raio, P_0 a pressão ambiente e $P_a(t)$ a pressão acústica aplicada.

Considerando-se $R(t) = R_0[1 + x(t)]$, com $|x(t)| \ll 1$, uma aproximação de baseada na linearização da equação (1) e tendo-se por base um regime harmônico resulta, para a descrição da oscilação relativa da MB, em:

$$\ddot{x} + \omega_0 \delta \dot{x} + \omega_0^2 x = F(t), \quad (2)$$

sendo:

$$\omega_0 = \sqrt{\frac{1}{\rho R_0^2} \left(3\kappa P_0 + (3\kappa - 1) \frac{2\sigma_\omega}{R_0} \right)} \quad (3)$$

$$\delta = \delta_{rad} + \delta_{vis} = \left(\frac{\frac{3\kappa}{\rho c R_0} \left(P_0 + \frac{2\sigma_\omega}{R_0} \right)}{\omega_0} \approx \frac{\omega_0 R_0}{c} = \delta_{rad} \right) + \left(\frac{4\nu}{\omega_0 R_0^2} = \delta_{vis} \right) \quad (4)$$

Os termos δ , δ_{rad} e δ_{vis} representam o coeficiente de amortecimento total (adimensional), a contribuição devido à radiação pela MB e a contribuição devido à viscosidade, respectivamente. Adicionalmente, a frequência de ressonância, f_{res} , de oscilação da MB é dada por:

$$f_{res} = f_0 \sqrt{1 - \left(\frac{\delta}{2} \right)^2}, \text{ com } f_0 = \frac{\omega_0}{2\pi} \quad (5)$$

$$f_r = \frac{1}{2\pi R} \sqrt{\frac{3\gamma P_0}{\rho}}$$

A solução de (2) para uma resposta em regime permanente resulta na amplitude de oscilação, $|x_0|$, da MB dada por:

$$|x_0| = \frac{F_0}{\sqrt{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + (\delta\omega\omega_0)^2}} \quad (6)$$

Como se pode observar em (6), a amplitude da oscilação da MB passa por um máximo em $\omega = \omega_0$.

Uma medida da ação da MB ao ser incidida pela onda de US pode ser determinada através da seção de choque de espalhamento, σ_s , que de acordo com Church (1995) é representada por (CHURCH, 1995):

$$\sigma_s \propto R_0^6 \omega^4 |x_0|^2, \quad (7)$$

ou seja, a potência acústica espalhada pela MB varia com a sexta potência do raio, com a quarta potência da frequência da onda acústica e com o quadrado da amplitude de oscilação da MB. As MBs com tamanhos entre 2 e 10 μm possuem frequências de ressonância próximas das frequências utilizadas na ultrassonografia.

As equações (2-7) são válidas quando a MB vibra com uma variação máxima de seu raio sendo muito menor do que o seu raio em condições de repouso e nesse caso, o sinal de espalhamento gerado possui a mesma frequência da onda de US incidente, em geral usada na frequência de ressonância da MB. Entretanto, ao se aumentar a intensidade da onda de US que incide numa MB e em uma frequência muito próxima de sua ressonância, a mesma passa a vibrar de forma não-linear e isso gera sinais de espalhamento contendo a frequência da onda incidente como também harmônicos (DE JONG, CORNET, *et al.*, 1994). Esta é outra característica das MBs, explorada na obtenção de contraste nas imagens usando o efeito não-linear.

Em geral, os componentes harmônicos dos sinais de espalhamento gerados por MBs possuem amplitudes maiores do que aquelas dos componentes harmônicos dos tecidos biológicos que são gerados por efeitos de propagação não-linear da onda de US

nos tecidos. Desta forma, quando são processados apenas os sinais de espalhamento dos componentes harmônicos gerados pelas MBs resulta um expressivo aumento de contraste na imagem de US para as regiões contendo ACUs, e este modo de geração e imagem é denominado imagem no modo-contraste. A Figura 4 esquematiza a atuação do 2º harmônico para a obtenção de imagem das MBs baseada no modo-contraste (COBBOLD, 2007).

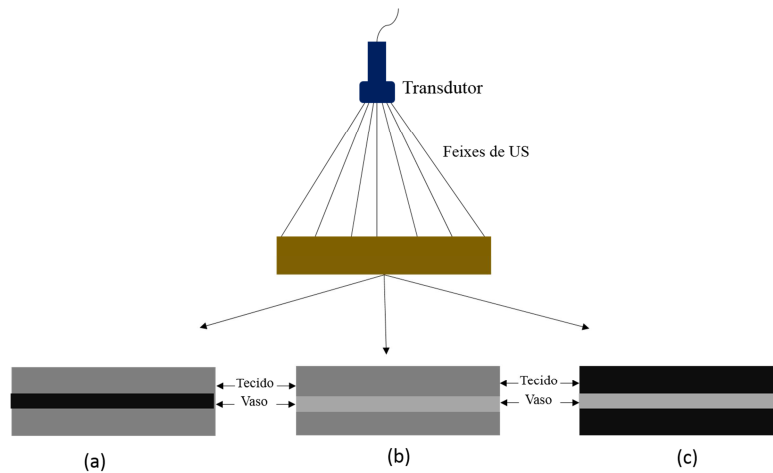


FIGURA 4: Diferentes formas de obtenção de contrastes em imagens do Modo-B, para uma região contendo tecido mole e um vaso sanguíneo (marrom). Em (a) a imagem de US é produzida na forma convencional do modo-B, na frequência fundamental e sem o emprego de ACUs, sendo o tecido visualizado (cinza) e o vaso sanguíneo não (preto). Em (b), a imagem é produzida ao utilizar a frequência harmônica fundamental e empregando ACUs e se nota que tanto o tecido quanto os vasos são visualizados. Em (c) a imagem é produzida ao utilizar o segundo harmônico e o emprego de ACUs, onde se observa que somente a região (vaso sanguíneo) contendo ACUs é visualizada na imagem.

4.4. Microrganismos

Atualmente, os organismos são divididos em três domínios, Bacteria, Archaea e Eukarya, que levam em consideração as comparações genéticas de sequências de nucleotídeos de RNA mensageiro e suas características morfológicas exclusivas. Acredita-se que os três domínios descendem de um ancestral comum dos primórdios da Terra e por isso guardam informações genéticas semelhantes (TORTORA, FUNKE, *et al.*, 2012). Na Figura 5 apresenta a árvore filogenética dos três domínios.

Do ponto de vista evolutivo, as Archaeas se assemelham com os outros dois domínios, já que os genes responsáveis pelo controle das vias metabólicas têm maior

relação com os dos procariotos, enquanto os genes que controlam a expressão de proteínas se assemelham com os dos eucariotos (TORTORA, FUNKE, *et al.*, 2012).

Os organismos são agrupados em subdivisões que criam uma hierarquia taxonômica dentro dos domínios de organismos com características próximas ou semelhantes. As subdivisões são Reino, Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie (TORTORA, FUNKE, *et al.*, 2012). A Tabela 3 apresenta as subdivisões de *Halobacterium salinarum* e *Microcystis aeruginosa*.

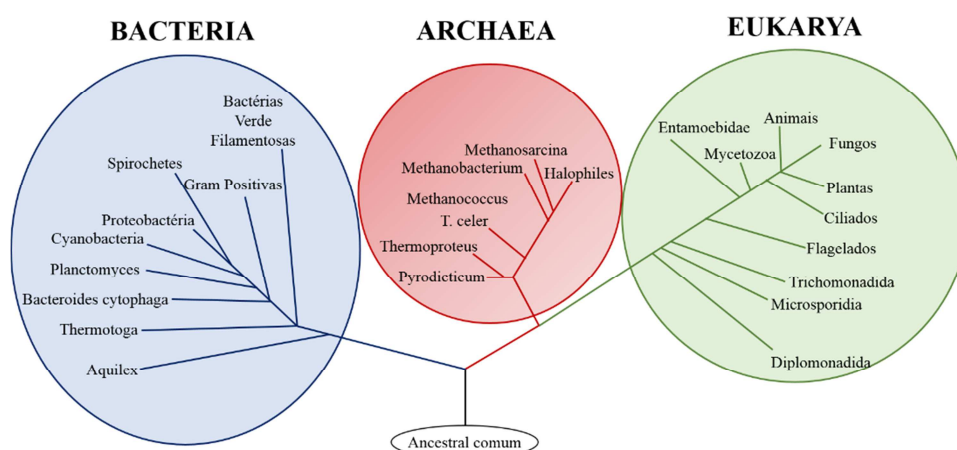


FIGURA 5: Árvore Filogenética da Vida representando os três domínios. Bactéria em azul, Archaea em vermelho e Eukarya em verde.

Tabela 3: Taxinomia da *H. salinarum* e *M. aeruginosa*.

Domínio	Archaea	Bacteria
Reino	Euryarchaeota	Bacteria
Filo	Euryarchaeota	Cyanobacteria
Classe	Halobacteria	Cyanophyceae
Ordem	Halobacteriales	Chroococcales
Família	Halobacteriaceae	Microcystaceae
Genero	Halobacterium	Microcystis
Espécie	Salinarum	aeruginosa

É possível encontrar microrganismos ou organismos micrométricos nos três domínios. Presentes em todos ambientes da biosfera, com papel fundamental no ciclo biogeoquímico, esses microrganismos representam mais da metade da biomassa global e estão adaptados a diversos ambientes (TORTORA, FUNKE, *et al.*, 2012). Vários microrganismos que vivem em ambientes aquáticos possuem em sua composição

aerótopos (ou vesículas gasosas) que auxiliam na flutuação dos mesmos durante fases do dia. As GVs são mais frequentemente encontradas em bactérias fotossintéticas e em haloarchaeas, entretanto outras bactérias foram descritas como produtoras de GVs (E. WALSBY, 1994, LAKSHMANAN, LU, *et al.*, 2017, TORTORA, FUNKE, *et al.*, 2012).

4.4.1. *Halobacterium salinarum* (HALO)

As halobactérias, pertencentes ao domínio Archaea, são consideradas halófilas por sobreviverem em ambientes com extrema concentração de cloreto de sódio (>2M). São encontradas, principalmente, em lagos salinos e salinas sendo inicialmente isoladas de peixes de água salgada. São anaeróbicas e necessitam, para seu crescimento, de fonte de carbono (heterotrófica ou autotrófica) e de temperatura ambiente de 39° C. Possuem diâmetros próximos de 0,5 µm e comprimento entre 4-10 µm. Algumas cepas possuem flagelos polares e móveis e sua morfologia varia, normalmente, entre cocos e bacilos (SALLOTO, PINTO, *et al.*, 2012). A Figura 6 apresenta a microscopia eletrônica de células de HALO.

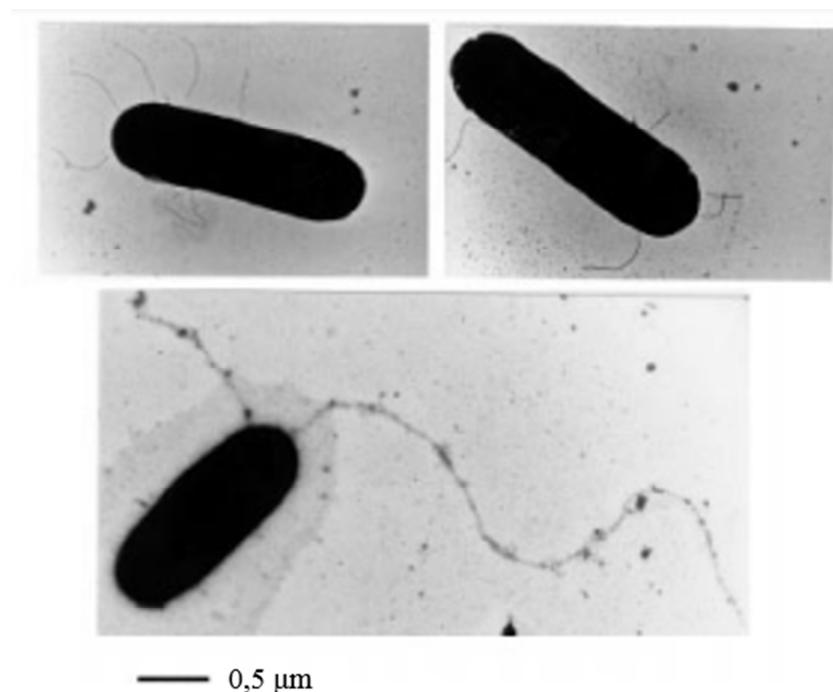


FIGURA 6: Microscopia eletrônica de *Halobacterium salinarum* coradas negativamente com acetato de uranil. Nesta figura é possível observar o formato cilíndrico da célula e a presença de flagelos. Adaptada pela permissão de John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center, Role of flagellins

from A and B loci flagella formation of *Halobacterium salinarum*, Valery Y. Tarasov, Michael G. Pyatibratov, Sen-Lin Tang, *et al* 2002.

Sua parede celular consiste em uma única membrana de bicamada lipídica circundada por proteínas e glicoproteínas que proporcionam maior resistência à lise celular, permeabilidade seletiva e um reforço estrutural. A parede contém entre 10-12% de carbono hidratado e apresenta lipídios e proteínas diferentes de outros procariotos, que auxiliam em sua resistência a forças iônicas (STOECKENIUS, LOZIER, *et al.*, 1979, TORTORA, FUNKE, *et al.*, 2012) .

As HALOs possuem em sua membrana a bacteriorodopsina responsável pela absorção de energia luminosa e sua conversão em energia química via bomba de prótons. Em cultura e no ambiente é possível observar uma coloração avermelhada característica devido à presença de carotenoides C-50, um pigmento que atua na proteção contra processos foto-oxidativos (JOO, KIM, 2005).

Além disso, produzem vesículas de gás que atuam na flutuabilidade da célula em ambientes aquáticos, em resposta a fatores ambientais extremos, o que permite a otimização na absorção de luz. Quando as células encontram-se nas condições ideais, a produção e o crescimento da GVs aumentam isso permite que haja vesículas de diferentes diâmetros e comprimentos (E. WALSBY, 1994, STOECKENIUS, LOZIER, *et al.*, 1979). Do contrário, grânulos densos de carboidratos são produzidos, há a parada da produção de GVs e a destruição das GVs anteriormente produzidas (MOORE, CHURNSIDE, *et al.*, 2019).

4.4.2. *Microcystis aeruginosa* (MYC)

Microcystis aeruginosa (MYC) é uma cianobactéria pertencentes ao domínio Bacteria (Tabela 3). Cianobactérias são microrganismos procariotos fotossintetizantes que necessitam para seu crescimento de fonte de luz, carbono, nitrogênio e fósforo (AZEVEDO, 1998), podendo apresentar formas unicelulares ou filamentosas dependendo da espécie. A Figura 7 apresenta célula unicelulares de *Microcystis aeruginosa*.

As cianobactérias são consideradas bactérias pela ausência de núcleos verdadeiros, formas sexuadas, mitocôndria, complexo de Golgi e retículo endoplasmático, entretanto possuem clorofila a e pigmentos hidrossolúveis como as algas (eucariotos) (E. WALSBY, 1994). As clorofilas são responsáveis pela conversão

de luz solar em energia (E. WALSBY, 1994). As cianobactérias que vivem em habitats com alta irradiação solar possuem pigmentos que as protegem das radiações solares e da oxidação, sendo a proteína ficocianina o mais comum pigmento da MYC. Essa proteína é também é, junto com a clorofila a, pela coloração esverdeada da MYC (Y. TABANE; H. YAMAGUCHI, 2018; P. ROBERTSON *et al.*, 1999).

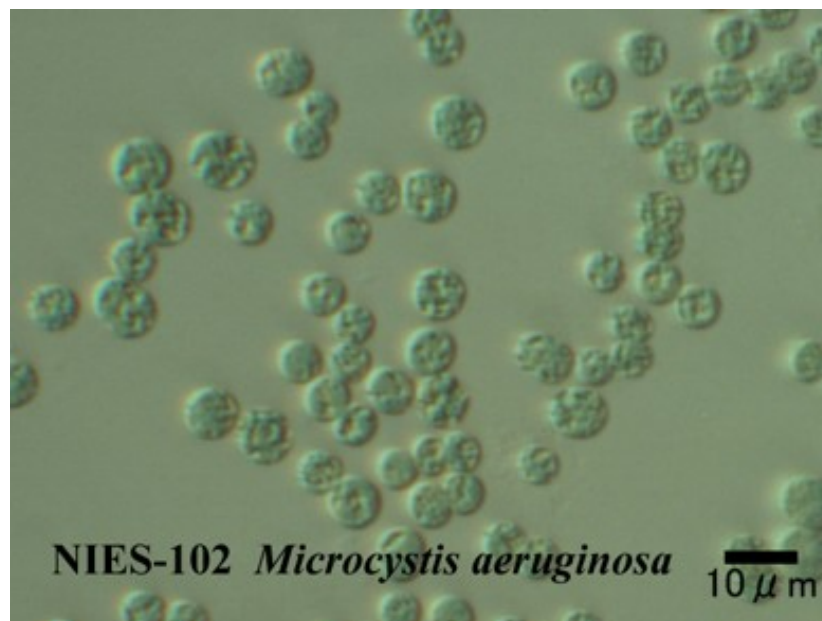


FIGURA 7: Células de *Microcystis aeruginosa*. Na figura é possível observar células unicelulares e cocoides. Imagem retirada de: <http://www.nies.go.jp/biology/mcc/home.htm>

São amplamente distribuídas pelo globo terrestre com diferentes estratégias de adaptação, capazes de sobreviver em ambientes desérticos, com baixa concentração de oxigênio, altas e baixas temperaturas, entre outras condições (WHITTON, POTTS, 2000). Algumas linhagens desses microrganismos são produtores de metabólitos secundários (cianotoxinas) que quando ingeridos podem ocasionar alterações em órgãos e tecidos (FERRÃO-FILHO, KOZLOWSKY-SUZUKI, 2011, LEFLAIVE, TENHAGE, 2007).

As MYC são exclusivamente planctônicas e assim como outras cianobactérias são encontradas em água salobra e doce podendo formar grandes colônias. São unicelulares e cocoides, com diâmetro entre 1 e 9 μm. As MYC são produtoras de vesículas de gás que as permitem realizar o movimento vertical no corpo d'água em função da presença ou ausência de luz e nutrientes (CHORUS, BARTRAM, 1999, TORTORA, FUNKE, *et al.*, 2012, VISSER, PASSARGE, *et al.*, 1997).

4.5. Vesículas de gás

Os aerótopos ou GVs, são organelas fusiformes (0,045–0,2 μm) ou cilíndricas (0,1–2 μm) ocas, compostas por um envoltório de proteínas e com seu interior composto de ar (JONES, JOST, 1971, PFEIFER, 2012). A estrutura proteica de uma GV é composta, quase exclusivamente, de pequenas proteínas hidrofóbicas na região interna e na região externa podem ser compostas por sequências de aminoácidos responsáveis pela sua estabilização (Figura 2) (ENGLERT, PFEIFER, 1993, WALSBY, HAYES, 1988).

Essas proteínas foram descritas como GvpA e GvpC, respectivamente. A GvpA se organiza em forma de anéis, dando forma cilíndrica com extremidades cônicas, e a GvpC adere ao exterior dos anéis estabilizando a estrutura (E. WALSBY, 1994, ENGLERT, PFEIFER, 1993). Foram descritos entre 8 e 14 genes que codificam as proteínas Gvp em diferentes organismos (PFEIFER, 2012).

Foi visto que as GVs são permeáveis, por meio da difusão, a diferentes gases como oxigênio, nitrogênio, hidrogênio, monóxido de carbono, dióxido de carbono, metano e perfluorociclobutano. Entretanto, não é conhecida a razão de tão alta permeabilidade a estes gases (E. WALSBY, 1994, PFEIFER, 2012, WALSBY, 1982).

Devido a sua composição e maior rigidez, quando comparadas a membranas lipídicas, as GVs não modificam seu volume de acordo com a pressão do gás contido em seu interior. Assim, quando a diferença de pressão interna e externa ultrapassa o limite crítico a GV colapsa irreversivelmente. (E. WALSBY, 1994, PFEIFER, 2012).

A principal função das vesículas é garantir a flutuabilidade das células, ou seja, são dependentes da densidade, calculada como a razão entre a massa total e o volume total da vesícula. Para garantir uma baixa densidade, é preciso que as GVs tenham uma baixa razão entre esses elementos. Como o diâmetro das vesículas são limitados devido a rigidez, a célula criou dois mecanismos para aumentar sua flutuabilidade. O primeiro foi o de aumentar o comprimento da vesícula e o segundo foi o de aumentar o número de GV produzidas (E. WALSBY, 1994). Quando isoladas, as GVs possuem uma coloração esbranquiçada, devido ao espalhamento da luz provocado, principalmente, pela refração do gás em seu interior. Entretanto, a coloração dentro da célula pode ser diferente devido à presença de líquidos entre os aglomerados de GVs.

Devido às suas características físico-químicas, as GVs apresentam um grande potencial biotecnológico na ultrassonografia. Já foi descrito que as imagens de regiões

contendo GVs possuem um robusto contraste, para frequências entre 4,8 e 17 MHz, e quando se utiliza o modo contraste (detecção de harmônicos). Quando nas GVs incidem ondas de US com pressão acústica maior, as mesmas correm o risco de colapsarem (CHERIN, MELIS, *et al.*, 2017, SHAPIRO, GOODWILL, *et al.*, 2014). As GVs possuem um grande potencial biotecnológico que deve ser mais explorado nos próximos anos, principalmente com o auxílio da bioengenharia. Desta forma, uma possibilidade seria a de relacionar genes *gvp*, de diferentes espécies, a fim de criar uma vesícula com maior resistência a pressões acústicas e maior capaz de gerar um sinal de espalhamento com maior amplitude, para com isso proporcionar mais contraste na imagem (BOURDEAU, LEE-GOSSELIN, *et al.*, 2018).

5. Materiais e Métodos

5.1. Microrganismo utilizado para isolamento de GVs

Foram utilizadas neste trabalho GVs de *Microcystis aeruginosa* MC-22 e de *Halobacterium salinarium* NRC-1. A linhagem de MYC foi cedida pelo Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC), do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

5.2. Meio de cultura e cultivo dos microrganismos

5.2.1. *Halobacterium salinarum* NRC-1

O meio de cultura para HALO-NRC1 consiste na adição em vidrarias esterilizadas de 4.278M de NaCl, 81mM de MgSO₄.7H₂O, 10mM de Trisodium Citrato Desidratado, 27mM de KCl, 5g/L de Caseína Hidrolisada, 3g/L de Extrato de Levedura em 1L de água destilada, sendo eles mantidos em pH de 7.2. Após a adição deve-se autoclovar o meio a 121°C a 18 psi por 30 min para sua utilização. A HALO-NRC1 foi cultivada em agitação constante (100 rpm) na temperatura de 42°C em uma mesa agitadora com incubadora (LAKSHMANAN, LU, *et al.*, 2017).

5.2.2. *Microcystis aeruginosa* MC-22

A MYC-22 foi cultivada no LETC, em um recipiente de vidro de 2 litros contendo meio ASM-1 em pH 8,0 (GORHAM, MCLACHLAN, *et al.*, 1964). Essa cultura ficou em uma sala com temperatura e luminosidade controladas (24°C; fotoperíodo de 12h, 100 μmoles fótons (m⁻².s⁻¹) por 7 dias, sob aeração constante, até o crescimento da cultura. Em seguida, o frasco de 2l ficou recoberto sob privação de luz, com auxílio de papel alumínio e sem aeração, por 7 dias, para a mimetização de um ambiente favorável a produção de GVs. A Figura 8 apresenta as etapas do cultivo de MYC-22.

5.3. Produção e purificação de GVs:

5.3.1. *Halobacterium salinarum* NRC-1

Após o crescimento das linhagens, elas devem passar (cuidadosamente) por um funil de separação, previamente esterelizado, por aproximadamente 1 semana, até o aparecimento de um anel na superfície do funil. Em seguida, abre-se a torneira do funil de separação para permitir a saída do meio e a manutenção das células que flutuantes. A coluna contendo as células flutuantes é de 10 a 20 ml (LAKSHMANAN, LU, *et al.*, 2017).

Na parede do funil costumam ficar bactérias presas, que podem ser liberadas usando-se um tampão de lise TCM (pH 7.5, 10 mM de (hidroximetil)aminometano - Tris-HCl, 2.5 mM MgCl₂, filtrado em filtro 0,22 µm) para lavar a parede do funil (lembrando que quanto mais solução tampão for utilizada na lavagem, mais amostras serão produzidas para a próxima etapa (LAKSHMANAN, LU, *et al.*, 2017).

Em seguida é realizado o isolamento das GVs, com a adição de 1,6 ml do cultivo com a solução tampão de lise TMC em tubos de 2 ml, por meio de uma centrifugação a 300 g por 4 h em uma temperatura de 4-8° C. Após a centrifugação, o sobrenadante, formado por uma mistura de células não lisadas e GVs, é retirado, com auxílio de uma pipeta, e adicionado a em um novo tubo de 2 ml onde se acrescenta PBS até o volume de 1,6 ml. Esse procedimento deve ser repetido até o desaparecimento de células rosa e o aparecimento de uma solução branca (correspondente as GVs) (LAKSHMANAN, LU, *et al.*, 2017). Em seguida, usando PBS, a solução de GVs será ressuspensa e então armazenada em novos tubos, com cuidado para evitar o colapso das GVs, na temperatura de 4 °C (LAKSHMANAN, LU, *et al.*, 2017).

5.3.2. *Microcystis aeruginosa* MC-22

Após o crescimento das linhagens (Figura 8-a), elas foram transferidas (cuidadosamente) para um funil de separação, previamente esterelizado e recoberto com papel alumínio, por aproximadamente 24h quando surge o aparecimento de duas camadas, uma de células flutuantes e outra do meio, no funil (Figura 8-b). Em seguida, abre-se a torneira do funil de separação permitindo a saída do meio e mantendo as células que flutuantes (LAKSHMANAN, LU, *et al.*, 2017).

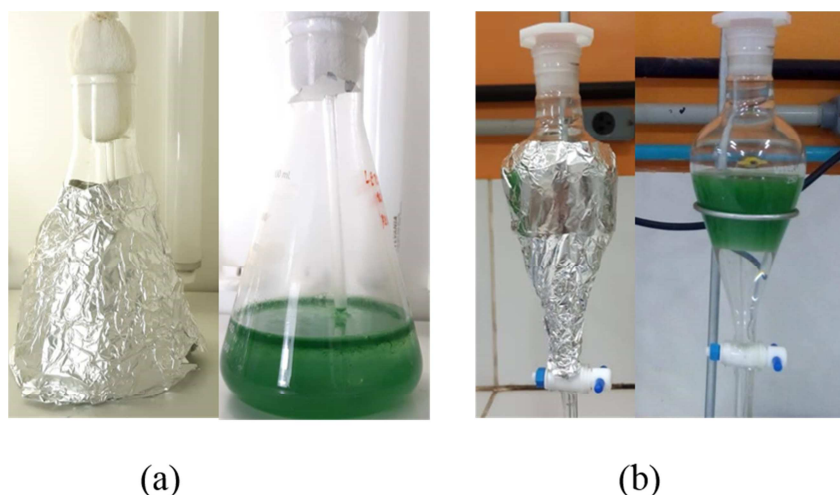


FIGURA 8: Etapas do cultivo e purificação de MYC-22. Em (a) o cultivo de MYC-22 com e sem privação de luz em frasco de vidro de 2 L e em (b) o cultivo de MYC-22 em funil de vidro de 250 mL. É possível notar a flutuação das células (em verde) e sua separação de parte do meio de cultivo (transparente).

Após a separação, o cultivo é coletado em tubos de 50 mL sendo avolumados até 40mL, para em seguida ser adicionado a uma solução de lise celular composta por lisozima na concentração de 4 mg.ml^{-1} , 0,05 M de (hidroximetil)aminometano corrigido para o pH 8 com ácido clorídrico (Tris-HCL) e 0,1 M de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), para então serem encubados em estufa bacteriológica a 37°C por 12h (GRIFFITHS, WALSBY, *et al.*, 1992).

Após a incubação, a amostra é centrifugada a 300 g por 8 h em uma temperatura de $4-8^\circ \text{C}$ nos próprios tubos de 50 mL e finda esta etapa de centrifugação, o sobrenadante, uma mistura de células não lisadas e GVs, deve ser retirado com auxílio de uma pipeta e adicionado a um novo tubo de 50 mL que passa por uma nova centrifugação (300 g por 4 h em uma temperatura de $4-8^\circ \text{C}$). Esse procedimento deve ser repetido até o desaparecimento de células e o aparecimento de uma solução branca, correspondente às GVs (GRIFFITHS, WALSBY, *et al.*, 1992, WALSBY, HAYES, 1988).

Em seguida, usando PBS, a solução de GVs é ressuspensa e então armazenada em novos frascos, os quais devem ficar armazenados em uma geladeira para evitar o colapso das GVs (LAKSHMANAN, LU, *et al.*, 2017).

5.4. Obtenção de imagens pelo ultrassom e medição da densidade óptica (OD):

O produto final obtido pela centrifugação dos microrganismos, contendo as GVs, foi testado no equipamento de ultrassom operando em modo-B (Vevo 2100, VisualSonics, Toronto, Canadá) com transdutor de 40 MHz (MS-550D, VisualSonics, Toronto, Canadá). Para isso, a amostra foi inserida em um reservatório cilíndrico com 1,5 cm de altura e 3,5 cm de diâmetro, para posterior contato com o transdutor. Também foi realizado um teste para o controle negativo com água ultrapura. A Figura 9 apresenta o equipamento de ultrassom, junto com o transdutor, e o reservatório cilíndrico citado.

Para a medição da OD foi utilizado o espectrofotômetro UVmini 1240 da SHIMADZU (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) operando no comprimento de onda (λ) de 500 nm. O padrão utilizado como absorbância zero foi a água ultrapura.

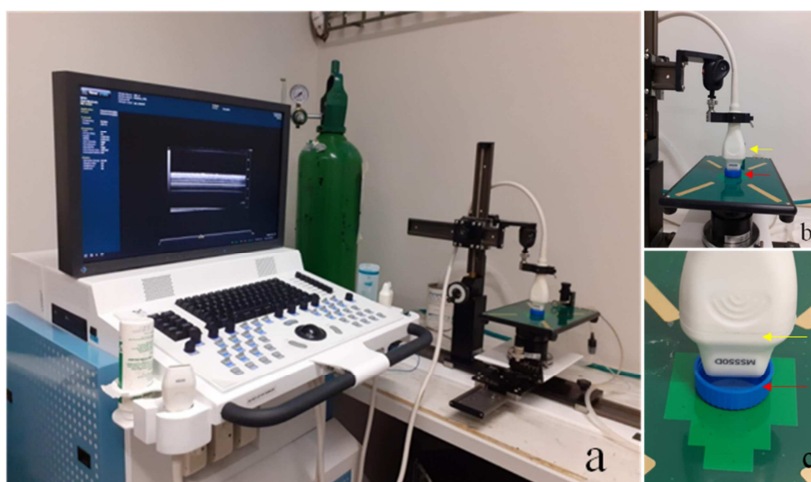


FIGURA 9: Sistema de aquisição de imagens do US. Em (a) o sistema completo com o ultrassom operando em modo-B (Vevo 2100, VisualSonics, Toronto, Canadá) e a amostra de GVs dentro de um reservatório cilíndrico. Em (b) o transdutor (seta amarela) em contato com a amostra de GVs dentro de um reservatório cilíndrico (seta vermelha). Em (c) um zoom de (b) com o transdutor (seta amarela) em contato com a amostra de GVs dentro do reservatório cilíndrico (seta vermelha).

5.5. Identificação da morfologia, diâmetro e comprimento das GVs através de MET:

A primeira etapa consistiu em diluir em água ultrapura as GVs isoladas para uma OD de 0,5 no comprimento de onda de 500 nm. Em seguida preparou-se uma solução de 2,5% de acetato de uranila com a eliminação, prévia, de qualquer precipitação dela

com o auxílio de uma centrífuga de bancada (aproximadamente 14.000 g em temperatura ambiente por 5 min).

Logo após foram preparadas as grades de 300 *mesh* forradas com Formvar do MET (15 mA de corrente a 1 min) e colocadas 10 µl da solução de GVs (OD 0,5; $\lambda=$ 500 nm) no lado do carbono da grade de 300 mesh. Após 30 segundos adicionou-se 10 µl de acetato de uranila a 2,5 % à solução de GVs na grade e aguardou-se 30 segundos. Com auxílio de papel filtro, a solução foi suavemente secada na borda da grade. Por fim utilizou-se o MET (FEI Tecnai™ Spirit) para obter as imagens.

6. Resultados

6.1. Obtenção de GVs de MYC-22

A Figura 10 exibe três tubos de 50 ml em diferentes etapas do isolamento de GVs da MYC-22. Em (a) é visto o tubo de 50 ml contendo o cultivo após a separação no funil de separação e antes da adição dos reagentes para a lise da membrana celular. Em (b) apresenta-se a amostra separada após a adição da solução de lise celular e 12h na estufa a 42 °C. Nesta etapa é possível observar redução de células na coluna do tubo de 50 ml e a sedimentação da maior parcela destas células, assim como a mudança da coloração esverdeada para azulada, confirmando a ação do reagente sob a amostra. Em (c) está a mesma amostra após a centrifugação a 300 g por 8h na temperatura de 4 °C. Nesta etapa nota-se o acúmulo dos resíduos celulares no fundo do tubo e a permanência da coloração observada em (b). Em (d) há uma amostra isolada de MYC-22 após três centrifugações a 300g por 8h a 4° C, onde se nota a manutenção da coloração azulada e a ausência da coloração branca. Essa amostra encontra-se na OD de 0,6 ($\lambda=500$ nm). Por fim, em (e) tem-se a amostra isolada de HALO-NRC1 presente no estoque do LUS na OD de 1500 ($\lambda=500$ nm). Nota-se a coloração branca distinta da observada na amostra de MYC-22.

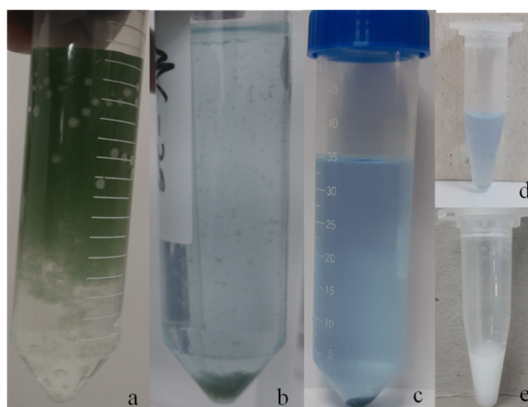


FIGURA 10: Etapas do isolamento de GVs de MYC-22. Em (a) o tubo de 50 ml contendo MYC-22 antes da adição dos reagentes para lise celular, mantendo as características do cultivo. Em (b) a mesma amostra após a adição dos reagentes e incubação na estufa no período de 12h à 42° C, onde é visto a mudança de coloração da amostra e o aparecimento de células no fundo do tubo. E em (c) a amostra após a centrifugação a 300g por 8h a 4°-8° C. Nota-se a manutenção da coloração azulada de (b) para (c). Em (d) e (e), respectivamente, a amostra de MYC-22 de (c) após a concentração em tubo de 2 ml na OD de 0,6 ($\lambda=500$ nm) e a amostra de HALO-NRC1 do estoque do LUS, OD de 1500 ($\lambda=500$ nm).

6.2. Obtenção de imagens de US das GVs imersas em meio líquido

A Figura 11 exibe a imagem de US no modo-B das amostras isoladas de MYC-22 (OD 0,6) e HALO-NRC1 (OD 1500), respectivamente em (a) e (b). E em (c) está a imagem do controle negativo, onde o meio contém apenas água ultrapura. Nas três imagens, a região delimitada pelo retângulo vermelho representa a coluna da solução contendo as amostras de GVs isoladas e a região na parte inferior da imagem e não delimitada pelo retângulo vermelho representa os ecos do sinal provenientes da parede de fundo do recipiente contendo a solução de GVs. Na Figura 11 (a) nota-se a presença de estruturas que ao serem incididas pelo ultrassom emitem sinais de retroespalhamento, entretanto em uma baixa concentração. Na Figura 11 (b) observa-se o sinal de estruturas em maior concentração quando comparado com (a), enquanto na Figura 10 (c), é visto a ausência de sinal.

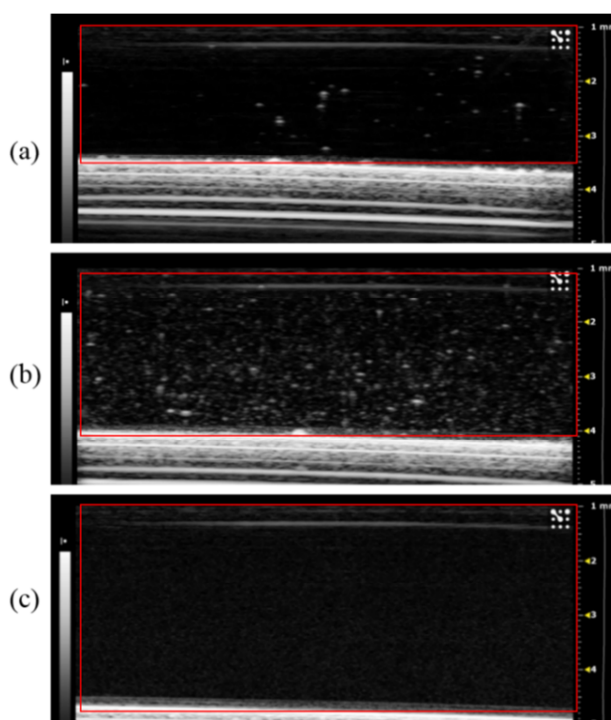


FIGURA 11: Imagens congeladas de US no modo-B de um meio contendo imersas as amostras isoladas de MYC-22 (a) e HALO-NRC1 (b). E em (c) o controle negativo contendo água ultrapura. Nas três imagens o retângulo vermelho delimita a região onde se encontra a amostra. Após o retângulo vermelho, na parte inferior da figura, encontra-se o sinal de eco da parede de fundo do recipiente contendo a solução com as GVs. A OD das amostras de MYC-22 e HALO-NRC1 são respectivamente 0,6 e 1500 (ambas medidas no $\lambda=500$ nm).

6.3. Identificação da morfologia e o diâmetro das GVs através da MET:

Na Figura 12 encontram-se as imagens de MET das amostras isoladas de MYC-22 em (a) e (b) e de HALO-NRC1 em (c) e (d). Em (a), está a imagem de uma única GV com o formato elipsoide. Em (b), está a imagem da amostra isolada de MYC-22, em um aumento diferente do microscópio, evidenciando a presença de um conjunto de GVs (setas vermelhas) e a presença de outros componentes celulares (setas amarelas). A média da dimensão das GVs de MYC-22 revelou um diâmetro de 0,171 (SD = 0,032) μm e um comprimento de 0,201 (SD = 0,031) μm . Observa-se também a semelhança na forma e dimensões das GVs. Em (c) e (d) está a imagem de GVs de HALO-NRC1 com formato fusiforme-cilíndrica e diferentes. A média da dimensão das GVs de HALO-NRC1 revelou um diâmetro de 0,241 (SD = 0,041) μm e um comprimento de 0,376 (SD = 0,091) μm . Para a medição das dimensões e cálculo da média e desvio padrão foram utilizadas quinze amostras (n=15).

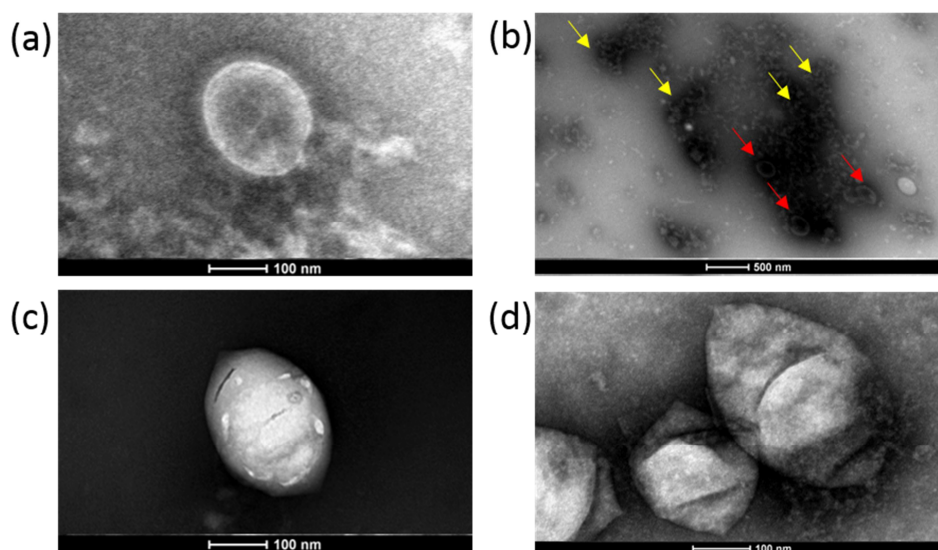


FIGURA 12: Imagens de MET das amostras isoladas de MYC-22 (a - b) e de HALO-NRC1 (c - d). Em (a) uma GV de MYC-22 e em (b), o material isolado de MYC-22 evidenciando as GVs (setas vermelhas) e a presença de outros componentes celulares na amostra (setas amarelas). Observam-se as GVs com um diâmetro médio de 0,171 (SD = 0,032) μm e um comprimento médio de 0,201 (SD = 0,031) μm . Em (c) e (d) há a GVs fusiforme-cilíndrica de HALO-NRC1, em diferentes dimensões com diâmetro médio de 0,241 (SD = 0,041) μm e comprimento médio de 0,376 (SD = 0,091) μm . n=15 para ambos microrganismos.

7. Discussão

Com relação ao que se conseguiu nesta Dissertação relativo ao isolamento das GVs provenientes da MYC-22, as informações contidas na Figura 10 indicam que a centrifugação na velocidade de 300g por 8h não foi suficiente para o isolamento das GVs como também provocou a sedimentação parcial dos componentes celulares. A manutenção da coloração azulada após a centrifugação (Figura 10c) pode estar relacionada com a presença da proteína ficocianina nas células de MYCs. Além de participar da proteção da microrganismos contra raios solares e de processos oxidativos, essa proteína é também responsável pela coloração esverdeada vista em cianobactérias (Y. TANABE; H. YAMAGUCHI, 2018; P. ROBERTSON *et al.*, 1999). Desta forma, acredita-se que a ficocianina seja o principal responsável pela coloração azulada e a manutenção da coloração, após a incubação com os reagentes de lise (Figura 10b) e após a centrifugação (Figura 10c), indica que nas condições em que foi submetida, esta proteína é capaz de suportar a ação dos reagentes químicos. Entretanto, nenhum teste físico-químico foi realizado para a confirmação desta hipótese. Outra informação contida na Figura 10 refere-se ao fato de que a centrifugação, nas condições programadas, não foi suficiente para o isolamento das GVs e a sedimentação de outros componentes celulares, como a ficocianina, sendo que as GVs suportam uma pressão, que varia com as condições que encontram e o tipo de microrganismos que as produziram, entre 40 e 700 kPa (E. WALSBY, 1994). Ocorre que o aumento da velocidade da centrifugação pode romper as estruturas das GVs devido ao aumento da pressão hidrostática exercida sob a amostra (E. WALSBY, 1994, SHAPIRO, GOODWILL, *et al.*, 2014). Em trabalhos utilizando GVs de ANA, o protocolo de isolamento envolve a centrifugação pelo período de 24h (LAKSHMANAN, LU, *et al.*, 2017, SHAPIRO, GOODWILL, *et al.*, 2014) e desta forma, o aumento da duração da centrifugação no protocolo de isolamento pode aumentar a eficiência da separação dos componentes celulares com pesos moleculares próximos em diferentes camadas, auxiliando no isolamento das GVs.

A variação da velocidade de centrifugação pode auxiliar na separação dos componentes celulares e redução da coloração azulada observada na Figura 10 (b, c e d), entretanto, não explica a ausência de uma camada branca na superfície das amostras (Figura 10c e d), formada nessa região pelos microrganismos devido à alta produção de GVs, observada quando há um acúmulo de vesículas na superfície de amostras isoladas

de HALO-NRC1 e ANA (LAKSHMANAN et al., 2017). Ambos os microrganismos tendem a formar essa região devido à alta produção de GVs (LAKSHMANAN, LU, et al., 2017). Como na Figura 8 fica evidente a presença de GVs no interior das células de MYC-22, devido a flutuabilidade apresentada, então a ausência da região branca na superfície do meio das amostras nas Figuras 10b e c pode estar relacionada com a metodologia de isolamento, especificamente com os reagentes utilizados para a lise celular. De acordo com relatos da literatura, foram utilizadas para a lise duas soluções que atuam como tampões (Tris-HCl e EDTA) e uma enzima (lisozima) que atua diretamente na quebra da parede e membrana celular (GORBENKO, IOFFE, et al., 2007, MEHTA, EVITT, et al., 2015). Todavia, a lisozima também é capaz de interagir com proteínas (GORBENKO, IOFFE, et al., 2007) e pode provocar a destruição das GVs, reduzindo a concentração de GVs isoladas. Outra possibilidade é a resistência da linhagem MYC-22 quanto à ação da lisozima, uma vez que o cultivo desse material apresenta mucilagem. A mucilagem é uma camada polissacarídica que as cianobactérias coloniais produzem para sua proteção contra estresse celular e condições adversas do meio em que se encontram (WANG, W. et al., 2015). Desta forma, a mucilagem cria uma barreira que impede a ação efetiva da enzima sobre a membrana plasmática da MYC-22, impedindo a sua lise celular e extravasamento de GVs. É possível que nesta etapa seja necessário modificar a concentração da enzima, o que tende a permitir maior ação sobre a membrana plasmática das MYC-22 ou então modificar a metodologia para a lise celular.

Já com relação à obtenção de sinais de eco de US das GVs, a Figura 11 confirma que nas amostras isoladas há estruturas que podem atuar como ACUs. Sabendo que as GVs são compostas por proteínas e preenchidas por ar atmosférico e que essa estrutura se assemelha às MBs proteicas (E. WALSBY, 1994, PFEIFER, 2012, WALSBY, HAYES, 1988), acredita-se que o sinal obtido nas amostras de MYC-22 e HALO-NRC1, na Figura 10, seja oriundo das GVs.

As amostras de isoladas de HALO-NRC1 e MYC-22 apresentaram concentrações diferentes de GVs após o processo de isolamento (Figura 10d-e) o que resultou na diferença nas imagens de ultrassom observadas entre as amostras da Figura 11a e b. Enquanto a MYC-22 apresenta OD 0,6 ($\lambda=500$ nm), a HALO-NRC1 apresenta OD 1500 ($\lambda=500$ nm) (Figura 10d-e). Esse resultado vai ao encontro da ausência da camada superficial branca observada na Figura 10. Essa grande diferença na concentração indica que o protocolo de isolamento de GVs, a partir de HALO-NRC1

(LAKSHMANAN, LU, *et al.*, 2017), é mais eficiente do que o protocolo de isolamento das GVs a partir de MYC-22 (GRIFFITHS, WALSBY, *et al.*, 1992).

Como dito anteriormente, a ação da lisozima pode não ter ficado restrita aos envoltórios celulares e com isso pode ter provocado a destruição das GVs ou então, a enzima pode ter ficado restrita à mucilagem criada pelas colônias de MYC-22, o que explicaria a ausência da camada branca na superfície do material centrifugado e a baixa concentração de sinais de US retroespalhados pela amostra de MYC-22.

A imagem de MET confirma a presença de GVs no material isolado de ambos os microrganismos e a diferença nas dimensões das GVs de diferentes espécies. Os formatos elipsoide, da GVs de MYC-22 (E. WALSBY, 1994), e fusiforme, das GVs de HALO-NRC1 (PFEIFER, 2012, SHAPIRO, GOODWILL, *et al.*, 2014), estão de acordo com o que é visto na literatura. O diâmetro e comprimento das GVs também se encontram na faixa esperada para os microrganismos, apesar de não terem atingido o máximo das suas dimensões físicas (LEHMANN, JOST, 1971).

As maiores dimensões das GVs de HALO-NRC1 em comparação às GVs de MYC-22, observadas na Figura 12, podem alterar o sinal retroespalhado pelas GVs. Como dito anteriormente o retroespalhamento provocado pelas GVs segue os mesmos princípios físicos das MBs, quando realizada aproximações nas equações 5 e 7 (DE JONG, CORNET, *et al.*, 1994, DE JONG, TEN CATE, *et al.*, 1991, FERRARA, POLLARD, *et al.*, 2007). Assim, GVs com menor diâmetro e comprimento possuem menor seção de choque de retroespalhamento e por consequência menor sinal detectável pelo US.

Na microscopia foi ainda observada a presença de outros componentes celulares, além das GVs (Figura 12b). A presença destes componentes ficou mais evidente na amostra de MYC-22, o que vai ao encontro com os achados das Figuras 10 e Figura 11, confirmando que a metodologia de extração e isolamento não foi eficiente para a obtenção de amostras puras. Por sua vez, as amostras de HALO-NRC1 apresentaram baixa concentração de outros componentes celulares na MET, alta concentração de sinal no ultrassom (Figura 11b) e a coloração branca uniforme no material isolado (Figura 10e) confirmando que a metodologia de extração e isolamento foi mais eficiente. É possível que os outros componentes celulares dos microrganismos tenham participado na produção do sinal observado na Figura 11, entretanto em uma escala menor devido às aproximações das propriedades físicas de GVs com MBs e NBs

Numa investigação realizada em 2014, Shapiro e colaboradores não encontraram nenhum efeito citotóxico pela administração de GVs de HALO-NRC1 em fígado de murinos (SHAPIRO, GOODWILL, *et al.*, 2014). Porém, devido à presença de outros componentes celulares em amostras de MYC-22 e HALO-NRC1 então os possíveis efeitos toxicológicos agudos e crônicos devem ser melhor estudados para a futura utilização de GVs como ACUs. Principalmente para os componentes celulares de cianobactérias, uma vez que algumas linhagens são produtoras de cianotoxinas (CHORUS, BARTRAM, 1999).

Não há relatos de estudos com a utilização de MYC para futura aplicação como ACUs, mas é possível confirmar que esses microrganismos possuem uma boa produção de GVs (Figura 10) e que as mesmas possuem considerável ecogenicidade (Figura 11). Em contrapartida, o sinal eco de US obtido neste trabalho para a HALO-NRC1 vai de acordo com os relatos da literatura (BOURDEAU, LEE-GOSSELIN, *et al.*, 2018, SHAPIRO, GOODWILL, *et al.*, 2014) e confirma o grande potencial biotecnológico em relação às GVs, apesar de necessária análise toxicológica dos componentes celulares do material isolado.

8. Conclusão

Conclui-se que as amostras de GVs de *Halobacterium salinarum*-NRC1 tem maior potencial de atuar como ACU quando comparadas as amostras obtidas de *Microcystis aeruginosa*-MC22. Há pouca informação na literatura a respeito do isolamento de GVs de MYC-22 (GRIFFITHS, WALSBY, *et al.*, 1992) e não foram encontrados relatos sobre seu uso como ACU na literatura. Entretanto, novos testes devem ser realizados para esclarecer a interação de GVs com a enzima lisozima e a utilização de novos reagentes para a lise celular de MYC-22 e a definição de protocolo para a obtenção de maiores concentrações das GVs e com menor obtenção de componentes celulares.

A partir dos resultados obtidos conclui-se que as GVs de MYC-22 e de HALO-NRC1 são capazes de produzir sinal retroespalhado de US e, portanto, de atuarem como ACUs. Por fim, há a importância da realização de mais testes toxicológicos da amostra isolada de GVs, devido a presença de componentes celulares.

9. Referências

- ACHMAD, A., YAMAGUCHI, A., HANAOKA, H., *et al.* "Thin-Shelled PEGylated Perfluorooctyl Bromide Nanocapsules for Tumor-Targeted Ultrasound Contrast Agent", **Contrast Media & Molecular Imaging**, v. 2018, p. 1–11, 1 nov. 2018. DOI: 10.1155/2018/1725323. .
- ANDERSON, A. L., HAMPTON, L. D. "Acoustics of gas-bearing sediments I. Background", **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 67, n. 6, p. 1865–1889, jun. 1980. DOI: 10.1121/1.384453. .
- ASTAFYEVA, K., SOMAGLINO, L., DESGRANGES, S., *et al.* "Perfluorocarbon nanodroplets stabilized by fluorinated surfactants: characterization and potentiality as theranostic agents", **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 14, p. 2892–2907, 2015. DOI: 10.1039/C4TB01578A. .
- AZEVEDO, S. M. F. O. "Toxinas de Cianobactérias: Causas e consequências para a Saúde Pública.", **AZEVEDO, S.M.F.O. Toxinas de Cianobactérias: Causas e consequências para a Saúde Pública. Revista Virtual de Medicina Vol. 1- Número 3 - Ano I, 1998.**, v. 1, n. 3, 1998. .
- AZHARI, H. **Basics of biomedical ultrasound for engineers.** Hoboken, N.J., Wiley, 2010.
- BORDEN, M. A., SONG, K.-H. "Reverse engineering the ultrasound contrast agent", **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 262, p. 39–49, dez. 2018. DOI: 10.1016/j.cis.2018.10.004. .
- BOURDEAU, R. W., LEE-GOSSELIN, A., LAKSHMANAN, A., *et al.* "Acoustic reporter genes for noninvasive imaging of microorganisms in mammalian hosts", **Nature**, v. 553, n. 7686, p. 86–90, 3 jan. 2018. DOI: 10.1038/nature25021. .
- CHERIN, E., MELIS, J. M., BOURDEAU, R. W., *et al.* "Acoustic Behavior of Halobacterium salinarum Gas Vesicles in the High-Frequency Range: Experiments and Modeling", **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 43, n. 5, p. 1016–1030, maio 2017. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2016.12.020. .
- CHOMAS, J. E., DAYTON, P., MAY, D., *et al.* "Threshold of fragmentation for ultrasonic contrast agents", **Journal of Biomedical Optics**, v. 6, n. 2, p. 141, 2001. DOI: 10.1117/1.1352752. .
- CHORUS, I., BARTRAM, J. (Org.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring, and management.** London ; New York, E & FN Spon, 1999.
- CHUNG, Y. E., KIM, K. W. "Contrast-enhanced ultrasonography: advance and current status in abdominal imaging", **Ultrasonography**, v. 34, n. 1, p. 3–18, 12 set. 2014. DOI: 10.14366/usg.14034. .

CHURCH, C. C. "The effects of an elastic solid surface layer on the radial pulsations of gas bubbles", **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 97, n. 3, p. 1510–1521, mar. 1995. DOI: 10.1121/1.412091. .

COBBOLD, R. **Foundations of Biomedical Ultrasound**. Oxford, 2007.

DANHIER, F., FERON, O., PRÉAT, V. "To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery", **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 2, p. 135–146, dez. 2010. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.08.027. .

DE JONG, N., CORNET, R., LANCÉE, C. T. "Higher harmonics of vibrating gas-filled microspheres. Part one: simulations", **Ultrasonics**, v. 32, n. 6, p. 447–453, nov. 1994. DOI: 10.1016/0041-624X(94)90064-7. .

DE JONG, N., TEN CATE, F. J., LANCÉE, C. T., *et al.* "Principles and recent developments in ultrasound contrast agents", **Ultrasonics**, v. 29, n. 4, p. 324–330, jul. 1991. DOI: 10.1016/0041-624X(91)90030-C. .

DESHPANDE, N., REN, Y., FOYGEL, K., *et al.* "Tumor Angiogenic Marker Expression Levels during Tumor Growth: Longitudinal Assessment with Molecularly Targeted Microbubbles and US Imaging", **Radiology**, v. 258, n. 3, p. 804–811, mar. 2011. DOI: 10.1148/radiol.10101079. .

E. WALSBY, A. "Gas Vesicles, MICROBIOLOGICAL REVIEWS, American Society for Microbiology", v. 58, No. 1, p. 94–144, mar. 1994. DOI: 0146-0749/94/\$04.00+0. .

ENGLERT, C., PFEIFER, F. "Analysis of gas vesicle gene expression in *Haloferax mediterranei* reveals that GvpA and GvpC are both gas vesicle structural proteins.", v. 268, p. 9329–9336, 1993. .

FANG, J.-Y., HUNG, C.-F., LIAO, M.-H., *et al.* "A study of the formulation design of acoustically active lipospheres as carriers for drug delivery", **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 1, p. 67–75, ago. 2007. DOI: 10.1016/j.ejpb.2007.01.008. .

FEINSTEIN, S. B., TEN CATE, F. J., ZWEHL, W., *et al.* "Two-dimensional contrast echocardiography. I. In vitro development and quantitative analysis of echo contrast agents", **Journal of the American College of Cardiology**, v. 3, n. 1, p. 14–20, jan. 1984. DOI: 10.1016/S0735-1097(84)80424-6. .

FERRÃO-FILHO, A. da S., KOZLOWSKY-SUZUKI, B. "Cyanotoxins: Bioaccumulation and Effects on Aquatic Animals", **Marine Drugs**, v. 9, n. 12, p. 2729–2772, 16 dez. 2011. DOI: 10.3390/md9122729. .

FERRARA, K., POLLARD, R., BORDEN, M. "Ultrasound Microbubble Contrast Agents: Fundamentals and Application to Gene and Drug Delivery", **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 9, n. 1, p. 415–447, 15 ago. 2007. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095852. .

FISH, P. **Physics and instrumentation of diagnostic medical ultrasound**. WILEY, 1990.

FORBES, M. M., O'BRIEN, W. D. "Development of a theoretical model describing sonoporation activity of cells exposed to ultrasound in the presence of contrast agents", **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 131, n. 4, p. 2723–2729, abr. 2012. DOI: 10.1121/1.3687535. .

FOSTER, F. S., PAVLIN, C. J., HARASIEWICZ, K. A., *et al.* "Advances in ultrasound biomicroscopy", **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 26, n. 1, p. 1–27, jan. 2000. DOI: 10.1016/S0301-5629(99)00096-4. .

FRINKING, P., SEGERS, T., LUAN, Y., *et al.* "Three Decades of Ultrasound Contrast Agents: A Review of the Past, Present and Future Improvements", **Ultrasound in Medicine & Biology**, p. S030156291931628X, jan. 2020. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2019.12.008. .

GAO, Y., HERNANDEZ, C., YUAN, H.-X., *et al.* "Ultrasound molecular imaging of ovarian cancer with CA-125 targeted nanobubble contrast agents", **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 13, n. 7, p. 2159–2168, out. 2017. DOI: 10.1016/j.nano.2017.06.001. .

GORBENKO, G. P., IOFFE, V. M., KINNUNEN, P. K. J. "Binding of Lysozyme to Phospholipid Bilayers: Evidence for Protein Aggregation upon Membrane Association", **Biophysical Journal**, v. 93, n. 1, p. 140–153, jul. 2007. DOI: 10.1529/biophysj.106.102749. .

GORHAM, P. R., MCLACHLAN, J., HAMMER, U. T., *et al.* "Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb: With Plate 7, 1 figure and 3 tables in the text", **SIL Proceedings, 1922-2010**, v. 15, n. 2, p. 796–804, fev. 1964. DOI: 10.1080/03680770.1962.11895606. .

GRAMIAK, R., SHAH, P. M., KRAMER, D. H. "Ultrasound Cardiography: Contrast Studies in Anatomy and Function", **Radiology**, v. 92, n. 5, p. 939–948, abr. 1969. DOI: 10.1148/92.5.939. .

GRECO, A., MANCINI, M., GARGIULO, S., *et al.* "Ultrasound Biomicroscopy in Small Animal Research: Applications in Molecular and Preclinical Imaging", **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–14, 2012. DOI: 10.1155/2012/519238. .

GRIFFITHS, A. E., WALSBY, A. E., HAYES, P. K. "The homologies of gas vesicle proteins", **Journal of General Microbiology**, v. 138, n. 6, p. 1243–1250, 1 jun. 1992. DOI: 10.1099/00221287-138-6-1243. .

GÜVENER, N., APPOLD, L., DE LORENZI, F., *et al.* "Recent advances in ultrasound-based diagnosis and therapy with micro- and nanometer-sized formulations", **Methods**, v. 130, p. 4–13, nov. 2017. DOI: 10.1016/j.ymeth.2017.05.018. .

HASHIZUME, H., BALUK, P., MORIKAWA, S., *et al.* "Openings between Defective Endothelial Cells Explain Tumor Vessel Leakiness", **The American Journal of Pathology**, v. 156, n. 4, p. 1363–1380, abr. 2000. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65006-7. .

HEDRICK, W. R., HYKES, D. L., STARCHMAN, D. E. **Ultrasound physics and instrumentation**. [S.l.], CV Mosby, 1995.

HERNOT, S., KLIBANOV, A. L. "Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery", **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 10, p. 1153–1166, jun. 2008. DOI: 10.1016/j.addr.2008.03.005. .

HU, G., LIU, C., LIAO, Y., *et al.* "Ultrasound molecular imaging of arterial thrombi with novel microbubbles modified by cyclic RGD in vitro and in vivo", **Thrombosis and Haemostasis**, v. 107, n. 01, p. 172–183, 2012. DOI: 10.1160/TH10-11-0701. .

HUNT, D., ROMERO, J. "Contrast-Enhanced Ultrasound", **Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America**, v. 25, n. 4, p. 725–736, nov. 2017. DOI: 10.1016/j.mric.2017.06.004. .

HWANG, T.-L., LIN, Y.-K., CHI, C.-H., *et al.* "Development and Evaluation of Perfluorocarbon Nanobubbles for Apomorphine Delivery", **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 10, p. 3735–3747, out. 2009. DOI: 10.1002/jps.21687. .

HYVELIN, J.-M., GAUD, E., COSTA, M., *et al.* "Characteristics and Echogenicity of Clinical Ultrasound Contrast Agents: An In Vitro and In Vivo Comparison Study: Comparison of Clinical Ultrasound Contrast Agents", **Journal of Ultrasound in Medicine**, v. 36, n. 5, p. 941–953, maio 2017. DOI: 10.7863/ultra.16.04059. .

JONES, D. D., JOST, M. "Characterization of the protein from gas-vacuole membranes of the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*", **Planta**, v. 100, n. 4, p. 277–287, 1971. DOI: 10.1007/BF00385192. .

JOO, W.-A., KIM, C.-W. "Proteomics of Halophilic archaea", **Journal of Chromatography B**, v. 815, n. 1–2, p. 237–250, 5 fev. 2005. DOI: 10.1016/j.jchromb.2004.10.041. .

KRUPKA, T. M., SOLORIO, L., WILSON, R. E., *et al.* "Formulation and Characterization of Echogenic Lipid–Pluronic Nanobubbles", **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 1, p. 49–59, fev. 2010. DOI: 10.1021/mp9001816. .

LAKSHMANAN, A., LU, G. J., FARHADI, A., *et al.* "Preparation of biogenic gas vesicle nanostructures for use as contrast agents for ultrasound and MRI", **Nature Protocols**, v. 12, n. 10, p. 2050–2080, 7 set. 2017. DOI: 10.1038/nprot.2017.081. .

LEE, S., KIM, D. H., NEEDHAM, D. "Equilibrium and Dynamic Interfacial Tension Measurements at Microscopic Interfaces Using a Micropipet Technique. 2. Dynamics of Phospholipid Monolayer Formation and Equilibrium Tensions at the Water–Air Interface", **Langmuir**, v. 17, n. 18, p. 5544–5550, set. 2001. DOI: 10.1021/la0103261. .

LEFLAIVE, J., TEN-HAGE, L. "Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins", **Freshwater Biology**, v. 52, n. 2, p. 199–214, fev. 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2427.2006.01689.x. .

LEHMANN, H., JOST, M. "Kinetics of the assembly of gas vacuoles in the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* Kuetz. emend. Elekin.", **Archiv for Mikrobiologie**, v. 79, n. 1, p. 59–68, 1971. DOI: 10.1007/BF00412041. .

- LINDNER, J. R. "Contrast echocardiography", **Current Problems in Cardiology**, v. 27, n. 11, p. 454–519, nov. 2002. DOI: 10.1067/mcd.2002.129364. .
- LINDNER, J. R., SONG, J., XU, F., *et al.* "Noninvasive Ultrasound Imaging of Inflammation Using Microbubbles Targeted to Activated Leukocytes", **Circulation**, v. 102, n. 22, p. 2745–2750, 28 nov. 2000. DOI: 10.1161/01.CIR.102.22.2745. .
- LIU, H., CHEN, Y., YAN, F., *et al.* "Ultrasound Molecular Imaging of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Expression for Endometrial Receptivity Evaluation", **Theranostics**, v. 5, n. 2, p. 206–217, 2015. DOI: 10.7150/thno.9847. .
- MEHTA, K. K., EVITT, N. H., SWARTZ, J. R. "Chemical lysis of cyanobacteria", **Journal of Biological Engineering**, v. 9, n. 1, p. 10, dez. 2015. DOI: 10.1186/s13036-015-0007-y. .
- MIN, K. H., MIN, H. S., LEE, H. J., *et al.* "pH-Controlled Gas-Generating Mineralized Nanoparticles: A Theranostic Agent for Ultrasound Imaging and Therapy of Cancers", **ACS Nano**, v. 9, n. 1, p. 134–145, 27 jan. 2015. DOI: 10.1021/nn506210a. .
- MOORE, T. S., CHURNSIDE, J. H., SULLIVAN, J. M., *et al.* "Vertical distributions of blooming cyanobacteria populations in a freshwater lake from LIDAR observations", **Remote Sensing of Environment**, v. 225, p. 347–367, maio 2019. DOI: 10.1016/j.rse.2019.02.025. .
- MOUSNIER, L., HUANG, N., MORVAN, E., *et al.* "Influence of polymer end-chemistry on the morphology of perfluorohexane polymeric microcapsules intended as ultrasound contrast agents", **International Journal of Pharmaceutics**, v. 471, n. 1–2, p. 10–17, ago. 2014. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.05.012. .
- ODDO, L., CERRONI, B., DOMENICI, F., *et al.* "Next generation ultrasound platforms for theranostics", **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 491, p. 151–160, abr. 2017. DOI: 10.1016/j.jcis.2016.12.030. .
- PAEFGEN, V., DOLESCHER, D., KIESSLING, F. "Evolution of contrast agents for ultrasound imaging and ultrasound-mediated drug delivery", **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, 15 set. 2015. DOI: 10.3389/fphar.2015.00197. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fphar.2015.00197/abstract>. Acesso em: 26 nov. 2018.
- PARADOSSI, G., TRUCCO, P. P. A. **Ultrasound Contrast Agents**. Springer, 2010.
- PERERA, R. H., WU, H., PEIRIS, P., *et al.* "Improving performance of nanoscale ultrasound contrast agents using N,N-diethylacrylamide stabilization", **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 13, n. 1, p. 59–67, jan. 2017. DOI: 10.1016/j.nano.2016.08.020.
- PFEIFER, F. "Distribution, formation and regulation of gas vesicles", **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 705–715, out. 2012. DOI: 10.1038/nrmicro2834. .
- PISANI, E., FATTAL, E., PARIS, J., *et al.* "Surfactant dependent morphology of polymeric capsules of perfluorooctyl bromide: Influence of polymer adsorption at the

dichloromethane–water interface", **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 326, n. 1, p. 66–71, out. 2008. DOI: 10.1016/j.jcis.2008.07.013. .

PORTER, T. R., MULVAGH, S. L., ABDELMONEIM, S. S., *et al.* "Clinical Applications of Ultrasonic Enhancing Agents in Echocardiography: 2018 American Society of Echocardiography Guidelines Update", **Journal of the American Society of Echocardiography**, v. 31, n. 3, p. 241–274, mar. 2018. DOI: 10.1016/j.echo.2017.11.013. .

RIM, S.-J., LEONG-POI, H., LINDNER, J. R., *et al.* "Quantification of Cerebral Perfusion With “Real-Time” Contrast-Enhanced Ultrasound", **Circulation**, v. 104, n. 21, p. 2582–2587, 20 nov. 2001. DOI: 10.1161/hc4601.099400. .

ROBERTSON, P. K. J., LAWTON, L. A., CORNISH, B. J. P. A. "The Involvement of Phycocyanin Pigment in the Photodecomposition of the Cyanobacterial Toxin, Microcystin-LR", **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 03, n. 07, p. 544–551, out. 1999. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1409(199908/10)3:6/7<544::AID-JPP173>3.0.CO;2-7. .

SALLOTO, G. R. B., PINTO, L. H., LIMA, J. L., *et al.* "A biologia das arqueias halofílicas e seu potencial biotecnológico", v. 10, n. 2, p. 9, 2012. .

SENIOR, R., BECHER, H., MONAGHAN, M., *et al.* "Contrast echocardiography: evidence-based recommendations by European Association of Echocardiography", **European Journal of Echocardiography**, v. 10, n. 2, p. 194–212, 4 ago. 2008. DOI: 10.1093/ejehocard/jep005. .

SHAPIRO, M. G., GOODWILL, P. W., NEOGY, A., *et al.* "Biogenic gas nanostructures as ultrasonic molecular reporters", **Nature Nanotechnology**, v. 9, n. 4, p. 311–316, abr. 2014. DOI: 10.1038/nnano.2014.32. .

SONTUM, P. C. "Physicochemical Characteristics of Sonazoid™, A New Contrast Agent for Ultrasound Imaging", **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 34, n. 5, p. 824–833, maio 2008. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2007.11.006. .

STOECKENIUS, W., LOZIER, R. H., BOGOMOLNI, R. A. "Bacteriorhodopsin and the purple membrane of halobacteria", **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics**, v. 505, n. 3–4, p. 215–278, mar. 1979. DOI: 10.1016/0304-4173(79)90006-5. .

STOUFFER, J. R. "History of Ultrasound in Animal Science", **Journal of Ultrasound in Medicine**, v. 23, n. 5, p. 577–584, maio 2004. DOI: 10.7863/jum.2004.23.5.577. .

TANABE, Y., YAMAGUCHI, H. **Evolutionary history of phycoerythrin pigmentation in the water bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa***. preprint. [S.l.], Microbiology, 4 dez. 2018. Disponível em: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/485508>. Acesso em: 2 abr. 2020.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiology: An Introduction**. 10^o ed. Artmed Editora SA, Copyright ©, 2012.

UNGER, E. C., PORTER, T., CULP, W., *et al.* "Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles", **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 9, p. 1291–1314, maio 2004. DOI: 10.1016/j.addr.2003.12.006. .

VANOSDOL, J., EKTATE, K., RAMASAMY, S., *et al.* "Sequential HIFU heating and nanobubble encapsulation provide efficient drug penetration from stealth and temperature sensitive liposomes in colon cancer", **Journal of Controlled Release**, v. 247, p. 55–63, fev. 2017. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.12.033. .

VISSER, P. M., PASSARGE, J., MUR, L. R. "Modelling vertical migration of the cyanobacterium *Microcystis*", **Hydrobiologia**, v. 349, n. 1/3, p. 99–109, 1997. DOI: 10.1023/A:1003001713560. .

WALSBY, A. E. "Permeability of gas vesicles to perfluorocyclobutane.", v. 128, p. 1679–1684, 1982. .

WALSBY, A. E., HAYES, P. K. "The Minor Cyanobacterial Gas Vesicle Protein, GVPc, Is Attached to the Outer Surface of the Gas Vesicle", **Microbiology**, v. 134, n. 10, p. 2647–2657, 1 out. 1988. DOI: 10.1099/00221287-134-10-2647. .

WANG, W., SHEN, H., SHI, P., *et al.* "Experimental evidence for the role of heterotrophic bacteria in the formation of *Microcystis* colonies", **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 2, p. 1111–1123, abr. 2016. DOI: 10.1007/s10811-015-0659-5. .

WEI, K., LE, E., BIN, J.-P., *et al.* "Quantification of renal blood flow with contrast-enhanced ultrasound", **Journal of the American College of Cardiology**, v. 37, n. 4, p. 1135–1140, mar. 2001. DOI: 10.1016/S0735-1097(00)01210-9. .

WEI, K., MULVAGH, S. L., CARSON, L., *et al.* "The Safety of Definity and Optison for Ultrasound Image Enhancement: A Retrospective Analysis of 78,383 Administered Contrast Doses", **Journal of the American Society of Echocardiography**, v. 21, n. 11, p. 1202–1206, nov. 2008. DOI: 10.1016/j.echo.2008.07.019. .

WHEATLEY, M. A., COCHRAN, M. "Ultrasound contrast agents", **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 23, n. 1, p. 57–72, 2013. DOI: 10.1016/S1773-2247(13)50007-4. .

WHITTON, B. A., POTTS, M. **The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space.** 2000. (699).

WU, H., ROGNIN, N. G., KRUPKA, T. M., *et al.* "Acoustic Characterization and Pharmacokinetic Analyses of New Nanobubble Ultrasound Contrast Agents", **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 39, n. 11, p. 2137–2146, nov. 2013. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2013.05.007..

YANG, Y., QIU, Z., HOU, X., *et al.* "Ultrasonic Characteristics and Cellular Properties of *Anabaena* Gas Vesicles", **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 43, n. 12, p. 2862–2870, dez. 2017. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2017.08.004. .

YUAN, F., DELLIAN, M., FUKUMURA, D., *et al.* "Vascular Permeability in a Human Tumor Xenograft: Molecular Size Dependence and Cutoff Size", p. 6, 1995.