

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

Avaliação da toxicidade aguda e  
genotoxicidade de extrato de floração de  
*Microcystis* spp para peixes de água doce.

RICARDO ROCHA PAVAN DA SILVA

Brasília

2009

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

Avaliação da toxicidade aguda e genotoxicidade  
de extrato de floração de *Microcystis* spp para  
peixes de água doce.

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-graduação em Biologia Animal,  
como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Mestre em  
Biologia

Ricardo Rocha Pavan da Silva  
Orientador: Prof. Dr. Cesar Koppe Grisólia

Brasília  
2009

Dedico este trabalho a minha família e a todos que me apoiaram nesta fase de minha vida

*"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original."  
Albert Einstein*

## **Agradecimentos**

A Universidade de Brasília e ao Programa de Pós - Graduação em Biologia Animal por proporcionar condições para o desenvolvimento do trabalho.

A Deus todo poderoso fonte da vida.

A minha família. A minha mãe, sempre do meu lado, disposta a me oferecer qualquer tipo de ajuda e que pode me oferecer caminhos para chegar até aqui. Ao meu irmão, Rodrigo, sempre apoiando.

Agradeço ao meu orientador e amigo professor César Koppe Grisólia que com muita sabedoria e paciência conduziu o trabalho ensinando e dando conselhos.

Ao professor Osmino Rodrigues Pires Junior, do Departamento de Ciências Fisiológicas da UnB, que disponibilizou as toxinas para a realização do trabalho.

A colaboração da Estação de Piscicultura do Governo do Distrito Federal, em especial a Fernanda, disponibilizando os animais para a realização deste trabalho.

A todo o pessoal do laboratório, principalmente a Eliza sempre disposta a ajudar a todos no laboratório.

Aos meus amigos que sempre estiveram do meu lado mandando boas energias a todo tempo, tornando minha vida mais feliz e agradável.

E a todos aqueles que fizeram parte nesse período de minha vida, tanto no começo quanto no final.

## ÍNDICE GERAL

1	INTRODUÇÃO .....	1
1.1	ECOGENOTOXICOLOGIA .....	1
1.2	CIANOACTÉRIAS .....	6
1.2.1	Florações .....	6
1.2.2	Morfologia e Taxonomia .....	8
1.3	CIANOTOXINAS .....	9
1.3.1	Biotoxinas .....	12
1.3.2	Hepatotoxinas .....	12
1.3.3	Efeitos na Saúde Humana .....	13
1.3.4	Exposição aguda e subcrônica .....	14
1.3.5	Exposição Crônica .....	15
1.4	MICROCISTINAS.....	15
1.4.1	Estudos sobre a ação das microcistinas.....	20
1.4.2	Inibição das Proteínas Fosfatases 1 e 2A (PP1 e PP2A) .....	23
1.4.3	Microcistinas como Promotores de Tumor.....	24
1.5	A UTILIZAÇÃO DE PEIXES NO ESTUDO DA MICROCISTINA .....	25
1.6	TESTE DO MICRONÚCLEO .....	28
1.7	TESTE DO COMETA.....	30
1.8	APOPTOSE E NECROSE .....	35
2	OBJETIVOS.....	37
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA .....	38
3.1.1	Obtenção e manutenção de animais .....	38
3.1.2	Caracterização das toxinas do extrato de floração .....	40
3.1.3	Coleta de sangue.....	42
3.2	DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA EM <i>Oreochromis niloticus</i> ...43	
3.3	DETERMINAÇÃO DA GENOTOXICIDADE EM <i>Oreochromis niloticus</i> .....	43
3.3.1	Teste de micronúcleo:.....	44
3.3.2	Teste do Cometa: .....	45
3.3.3	Teste Necrose/Apoptose: .....	47
3.4	DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA EM <i>Astyanax bimaculatus</i> ...48	
3.5	DETERMINAÇÃO DA GENOTOXICIDADE EM <i>Astyanax bimaculatus</i> .....48	

3.5.1	Necrose Versus Apoptose: .....	49
4	RESULTADOS.....	50
4.1	TESTE DE CONCENTRAÇÃO LETAL (CL50) E DOSE LETAL (DL50).....	50
4.2	TESTE DO MICRONÚCLEO .....	50
4.3	TESTE DO COMETA.....	52
4.4	NECROSE VERSUS APOPTOSE .....	55
5	DISCUSSÃO .....	58
5.1	TOXICIDADE DA MICROCISTINA .....	58
5.2	AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DA MICROCISTINA .....	60
5.2.1	Teste do Micronúcleo.....	60
5.2.2	Teste do Cometa .....	61
5.2.3	Cometa versus Micronúcleo.....	63
5.2.4	Necrose e Apoptose .....	65
6	CONCLUSÕES .....	67
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
8	ANEXOS .....	90

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da microcistina-LR.....	16
Figura 2 – Estruturas moleculares de quatro tipos de microcistina. ....	19
Figura 3 – Formação de micronúcleos em eritroblasto. ....	29
Figura 4 – Cometa em linfócitos humanos saudáveis e expostos a pesticidas. ....	32
Figura 5 – Espécie <i>Oreochromis niloticus</i> , conhecida como Tilápia do Nilo (www.fishbase.org).....	38
Figura 6 – Espécie <i>Astyanax bimaculatus</i> , conhecida, como lambari (www.fishbase.org).....	39
Figura 7 – Curva de calibração de microcistina em sistema de HPLC.....	42
Figura 8– Eritrócitos de sangue periférico de carpa ( <i>C. carpio</i> ) corados com laranja de acridina.....	45
Figura 9- Classificação dos níveis de fragmentação do DNA segundo o grau de lesão.....	47
Figura 10 – Eritrócitos de <i>O. niloticus</i> corados com laranja de acridina. Seta: micronúcleo.....	51
Figura 11 – Cometa em eritrócitos de sangue periférico de <i>O. niloticus</i> tratados com extrato de floração de <i>Microcystis spp</i> contendo microcistina.....	54
Figura 12 - Cometa em eritrócitos de sangue periférico de <i>A. bimaculatus</i> tratados com extrato de floração de <i>Microcystis spp</i> contendo microcistina. ....	54
Figura 13 – Eritrócitos de <i>O. niloticus</i> viáveis e em necrose tratados com extrato de floração de <i>Microcystis spp</i> .....	56
Figura 14 - Eritrócitos de <i>O. niloticus</i> viáveis e em necrose tratados com extrato de floração de <i>Microcystis spp</i> . ....	56
Figura 15 – Eritróctio de <i>O. niloticus</i> em apoptose tratado com extrato de floração de <i>Microcystis spp</i> .....	57



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Toxicidade das toxinas produzidas por cianobactérias. ....	10
Tabela 2– Médias e desvios padrões dos micronúcleos (MN) encontrados em tilápia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) tratadas por dois tipos de exposição com quatro concentrações diferentes. ....	51
Tabela 3– Médias e desvios padrões dos índices de danos no DNA (I.D.) calculados nos eritrócitos de lambari ( <i>Astyanax bimaculatus</i> ) tratados por dois tipos de exposição com três concentrações diferentes.....	52
Tabela 4 – Médias e desvios padrões dos índices de danos no DNA (I.D.) calculados nos eritrócitos de tilápia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) tratadas por dois tipos de exposição com quatro concentrações diferentes. ....	53
Tabela 5– Médias e desvios padrões dos índices de danos no DNA (I.D.) calculados nos eritrócitos de lambari ( <i>Astyanax bimaculatus</i> ) tratados por dois tipos de exposição com três concentrações diferentes.....	53
Tabela 6 – Porcentagem de viabilidade, necrose e apoptose em eritrócitos de sangue periférico de <i>Oreochromis niloticus</i> .....	55
Tabela 7 – Porcentagem de viabilidade, necrose e apoptose em eritrócitos de sangue periférico de <i>Astyanax bimaculatus</i> . ....	56

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Adda - ácido 3-amino-9-oximetil-2,6,8-trimetil-10fenildeca-4,6-dienóico.

CL 50 - Concentração Letal

DL 50 - Dose Letal

DP – Desvio Padrão

GSH – Glutathiona Reduzida

GST – Glutathiona S Transferase

i.p. – Intra Peritoneal

ID – Índice de Danos

LMP – *low melting point*

Masp - ácido  $\beta$ -metilaspártico

Mdha - N-metildehidroalanina

MN – Micronúcleo

OMS - Organização Mundial da Saúde

PDA-HPLC – photo diode array high pressure liquid chromatography

pH – Potencial Hidrogeniônico

PP1 - Proteína Fosfatase 1

PP2A – Proteína Fosfatase 2A

## RESUMO

A preocupação dos efeitos de cianobactérias na saúde humana cresce em muitos países. Casos de florações de cianobactérias em reservatórios e lagos criam problemas para o abastecimento de água, além de envenenamento, tanto animal como humano, se tornando uma preocupação para a saúde pública. As toxinas das cianobactérias são um grupo de toxinas naturais do ponto de vista químico e toxicológico. Podem ser neurotoxinas, hepatotoxinas, citotoxinas, toxinas irritantes e gastrintestinais. *Microcystis aeruginosa* é a espécie mais comum em florações de água doce de cianobactérias nocivas. Este trabalho teve como objetivo a avaliação da toxicidade e da genotoxicidade do extrato de uma floração de *Microcystis spp* contendo microcistina em peixes. Utilizaram-se duas espécies de peixes, sendo uma exótica (*Oreochromis niloticus*) e outra nativa do Brasil (*Astyanax bimaculatus*). Para a determinação da toxicidade aguda, utilizou-se o método Trimed Spearman-Karber, e para a genotoxicidade aplicaram-se os testes de micronúcleo, do cometa e necrose versus apoptose com eritrócitos de sangue periférico coletados dos peixes. Estes foram expostos por duas vias (exposição corpórea e intraperitoneal) em diferentes concentrações. Verificou-se que em *O. niloticus* a CL50 (72 h) foi maior que 103,725 µg/L e a DL50 (72h) maior que 138 µg/100g de peso corpóreo. E para *A. bimaculatus* a CL50 (72h) calculada foi de 242,81 com intervalo de confiança de 152,74 a 386,00 µg/L e a DL50 (72h) igual a 491,9 com intervalo de confiança de 385,8 a 627,3 µg/100g de peso corpóreo. A maior média de micronúcleos observada em *O. niloticus* foi através de exposição corpórea à concentração de 103,725µg/L. Em *A. bimaculatus* a maior média foi na concentração 368,8µg/100g de peso expostos via i.p., seguida pela média da concentração 103,725µg/L e pela média da concentração 245,86µg/100g de peso via i.p. No teste do cometa os resultados demonstraram, tanto para *O. niloticus* como para *A. bimaculatus*, que em ambas as vias de exposição e concentrações mais elevadas, observaram-se valores significativos. No teste de necrose versus apoptose, observou-se, em *O. niloticus*, um maior índice de células em necrose com a maior dose e um maior índice de apoptoses na dose mais baixa. Em *A. bimaculatus* observaram-se células em necrose e em apoptose na dose mais alta e células em apoptoses com a dose mais baixa. O extrato da floração apresentou ação tóxica apenas para *A. bimaculatus* e ação genotóxica nas duas espécies de peixes. Em concentrações

maiores, o extrato provocou necrose e em doses baixas provocou apoptose.

## ABSTRACT

The concern with the effects of cyanobacteria in the human's health raise in many countries. Cases of cyanobacteria bloom in reservoir and lakes turn out to be a problem for the water supply besides poisoning animals as human being becoming a source of issue for the public health. The cyanotoxins are a group of natural toxins from the toxicological and chemist point of view. They can be neurotoxin, hepatotoxin, citotoxin, irritating and gastrointestinal toxin. *Microcystis aeruginosa* is the most ordinary specie in fresh water bloom of harmful *cyanobacteria*. The objective of this project was the valuation of toxicity and the genotoxicity in fishes of the extract of a bloom of *Microcystis spp* containing microcystin. Two species were used, one of them is exotic (*Oreochromis niloticus*) and the other is native from Brazil (*Astyanax bimaculatus*). To determine the toxicity the method Trimed Spearman-Kärber was used, and for the genotoxicity the micronucleus test, the comet assay and necrosis versus apoptosis test were applied using erythrocytes of peripheral blood from fishes. These were exposed by two ways (body exposure and via intraperitoneal (i.p.)) in different concentrations. One has checked that in *O. niloticus*. the LC50 (72 h) surpassed 103,725 µg/L and the LD50 (72h) surpassed 138 µg/100g of body weight. For *A. bimaculatus* the LC50 (72h) calculated was the 242,81 with confidence interval of 152,74 at 386,00 µg/L and the LD50 (72h) equal to 491,9 with confidence interval of 385,8 at 627,3 µg/100g of body weight. The largest average of the micronucleus observed in *O. niloticus* was given by the body exposition to the concentration of 103,725µg/L. In *A. bimaculatus* the largest average was in the concentration 368,8µg/100g of exposed weights via i.p., followed by the concentrated average 103,725µg/L and by the concentrated average 245,86µg/100g of weight via i.p. In the comet assay, for both *O. niloticus* and *A. bimaculatus*, the results show that in both ways of exposition and the highest concentrations, significant values were observed. In the necrosis versus apoptosis test one has observed a larger incidence of cells in necrosis with the highest dose and a higher incidence of apoptosis in the lowest dose in *O. niloticus*. And one has observed cells in necrosis and in apoptosis in the highest dose and cells in apoptosis with the lowest dose in *A. bimaculatus*. The extract of bloom has shown toxic action only for the *A. bimaculatus*. In higher concentrations the extract causing necrosis and in low doses the extract caused apoptosis.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ECOGENOTOXICOLOGIA

À medida que a humanidade aumenta sua capacidade tecnológica de intervir na natureza surgem os conflitos quanto ao uso do espaço, dos recursos e da disposição dos resíduos no ambiente. Os sinais da poluição tornam-se mais evidentes com o aumento populacional (Zagatto, 2006). A toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias químicas com o organismo e tem como objeto a intoxicação sob todos os seus aspectos e, na condução deste estudo, tangencia uma gama de outras ciências, com as quais, em algum momento, se relaciona de forma transdisciplinar (Chasin e Pedrozo, 2004).

São várias as definições dadas à ecotoxicologia. Pode ser definida como a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem em um contexto integrado. Em outras palavras, é a ciência que estuda os efeitos dos poluentes aos organismos e como esses interagem com seus habitats (Zagatto, 2006). A importância do conhecimento das propriedades físico-químicas das substâncias se expressa em dois aspectos importantes: entendimento das rotas de destino e transporte das substâncias entre os diversos meios, e inferência sobre os fenômenos toxicocinéticos e toxicodinâmicos nos organismos vivos (Chasin e Pedrozo, 2004).

A qualidade da água, definida como a aptidão da água de sustentar vários usos ou processos, é influenciada por uma gama de fatores naturais (biológicos, geológicos, hidrológicos, meteorológicos e topográficos). Esses fatores se interagem nas bacias de drenagem e captações de lagos, rios e estuários e podem variar sazonalmente de acordo com diferenças nas condições do tempo, volume de escoamento e níveis da água (Codd, 2000). A influência humana na qualidade da água pode alterar o regime hidrológico do corpo d'água via desvio de fluxo, captação de água, drenagem de áreas alagadas ou construção de represas, por exemplo. Porém, a descarga de esgotos doméstico, agrícola, industrial e urbano e o

escoamento de fertilizantes agrícolas e agrotóxicos para dentro do corpo d'água são influências mais óbvias da atividade humana na qualidade da água (Codd, 2000).

A Ecotoxicologia Aquática, assim como a Toxicologia Humana procura identificar as causas e os efeitos nocivos sobre o indivíduo, quantificar e conhecer seus efeitos, conhecer os mecanismos de ação e outros processos que implicam conhecimento do contaminante no organismo que influenciam no seu destino no ambiente (Zagatto, 2006).

Os agentes genotóxicos são aqueles que interagem com o DNA alterando sua estrutura ou função, e quando essas alterações se fixam de forma a poderem ser transmitidas, denominam-se mutações. As mutações podem causar doenças em indivíduos e seus descendentes e podem aumentar, em populações, a incidência de câncer, doenças hereditárias bem como ter efeitos negativos sobre a biodiversidade. Os compostos mutagênicos encontram-se distribuídos nos ecossistemas; são transferidos e acumulados através das cadeias tróficas, podendo causar efeitos genotóxicos nos indivíduos ou populações expostas (Umbuzeiro e Roubicek, 2006).

A Ecogenotoxicologia pode ser descrita como uma abordagem que aplica os princípios e técnicas da toxicologia genética para avaliar os efeitos potenciais da poluição ambiental, na forma de agentes genotóxicos, na saúde do ecossistema (Shugart e Theodorakis, 1994). As técnicas podem ser facilmente aplicadas em uma variedade de espécies do próprio ambiente natural.

Anderson et al (1994) definem a genética ecotoxicológica como o estudo das mudanças induzidas por químicos ou radiação no material genético da biota natural. Mudanças essas que podem ser alternâncias diretas no gene e na expressão gênica ou efeitos seletivos da frequência gênica. Mas a ecogenotoxicologia não evoluiu tanto assim, até agora, as pesquisas focaram somente no monitoramento de mutágenos ambientais na respectiva biota, e nas conseqüências diretas da exposição endógena causadas ao DNA.

Anderson et al. (1994) e Shugart e Theodorakis (1998) distinguiram “genética toxicológica” de “genética ecotoxicológica”. A primeira como sendo o estudo de danos genotóxicos individualmente, já a segunda como o entendimento dos efeitos genéticos toxicológicos em nível de ecossistema através do estudo de populações. Esse conceito pode também ser chamado de “ecogenotoxicologia” ou “toxicologia evolutiva”. (Belfiore e Anderson, 2001).

Durante as últimas três décadas, a comunidade científica e agências regulatórias tomaram consciência sobre os impactos ambientais sobre a saúde humana e a sustentabilidade dos ecossistemas (Bickham et al., 2000). No Brasil, os testes de ecogenotoxicidade são empregados desde a década de 80, para avaliações ambientais. Também nos últimos 20 anos, tem-se verificado que os testes de toxicidade com organismos aquáticos constituem uma ferramenta efetiva para avaliação de efeitos de poluentes sobre os seres vivos, para avaliação de risco/periculosidade de agentes químicos, no monitoramento da qualidade da água e no estabelecimento de limites permissíveis de lançamento de efluentes líquidos nos corpos hídricos (Bücker et al, 2006).

Vários autores salientam a importância de estudar as alterações genéticas de populações, pois podem refletir, a partir de fenômenos que são imprevisíveis, as respostas dos vários indivíduos observados. Essas categorias de efeitos são determinadas como efeitos indiretos, de alto nível e emergentes. Mudanças estas que podem ser o resultado do diferencial na sobrevivência, saúde ou estado reprodutivo que por sua vez resultam em diferenças na adaptabilidade individual ou na redução do tamanho da população (Bickham e Smolen, 1994; Hebert e Luiker, 1996).

J.W. Bickham *et al.* (2000) supuseram que a contaminação química pode afetar a genética de populações naturais de duas maneiras. A primeira pelo aumento da variabilidade genética causada pelo aparecimento de novas mutações, e segundo pela diminuição da variabilidade geral pela diminuição da população (*bottleneck* populacional). A exposição de um organismo a químicos genotóxicos pode induzir uma cascata de eventos: formação de alterações estruturais no DNA e subsequente expressão de produtos de genes mutantes e aparecimento de doenças, como o câncer, resultantes dos danos genéticos (Oost et al, 2003).

O desenvolvimento de testes para monitoramento de contaminantes perigosos no ambiente é fomentado pela contínua liberação de poluentes, muitos dos quais presentes em águas superficiais que causam não só perigo a sobrevivência dos organismos, mas também podem induzir alterações genéticas que podem levar a mutações e/ou carcinogênese (Fabacher et al., 1991; West, 1989; De Flora et al., 1991; Folmar et al., 1993)

Análises de genotoxicidade são executadas em bioindicadores de toxicidade, ou de efeitos adversos, que podem ser definidos como: “qualquer resposta biológica,



ao nível do indivíduo ou a um nível inferior, a um ambiente químico, que traduz a exposição a esse ambiente”; alterações bioquímicas, fisiológicas e comportamentais incluem-se nesta (W.H.O., 1993; Bückner et al, 2006). Vários biomarcadores são utilizados como ferramentas na detecção de exposições e nos efeitos da poluição causada por agentes genotóxicos. Estão incluídos: a presença de adutos de DNA, aberrações cromossômicas, quebra de DNA e a medição da frequência de micronúcleo e outras anomalias nucleares. O uso de biomarcadores como índices de efeitos da poluição é de grande importância e podem permitir uma detecção rápida de problemas ambientais (Bombail et al, 2001).

Há várias razões para entender a necessidade de se medir os danos causados ao DNA em espécies aquáticas provocadas por substâncias genotóxicas no meio ambiente. A mais óbvia pode estar relacionada à carcinogênese, porém há várias outras. Alguns químicos podem causar defeitos hereditários através de mutações nas células germinativas e defeitos teratogênicos. A interferência sobre a reprodução pode ser bem maior do que a carcinogênese em nível de população (Mitchelmore e Chipman, 1998).

As quebras de DNA em fitas simples ou duplas podem ocorrer de várias maneiras, como via sítios álcali-lábeis e surgindo através da remoção de enzimas reparadoras (Eastman e Barry, 1992; Speit e Hartmann, 1995). Outra possibilidade de ocorrer quebras é a digestão do DNA durante o processo de apoptose. Assim, os testes que analisam essas quebras oferecem um meio de medir a exposição a um agente, sendo mais sensíveis que muitos outros testes de clastogenicidade como o teste do micronúcleo (Pandurangi et al, 1995; Koppen e Verschaeve, 1996). Testes como o do cometa são capazes de estimar o aumento no nível de quebras acima do resultado da exposição a uma substância química. Esse método é bem adequado à rotina, ao monitoramento *in situ* de peixes, além de ser rápido e de baixo custo. A viabilidade da utilização dessa técnica em espécies em seu próprio ambiente está sendo verificada como um biomarcador geral para poluentes relacionados a genotoxicidade (Everaarts et al., 1994).

Habitats aquáticos como estuários e rios são alvos fáceis de depósitos de poluentes, e as formas de vida planctônica e de vertebrados são bioacumuladores naturais desses compostos. Os peixes vivem em estreito contato com o ambiente aquático, o que facilita o movimento de químicos através do muco, pele, brânquias e outra camada externa o que prejudica o animal quando tais perigos, como

poluentes, contaminantes e substâncias tóxicas entram no ecossistema aquático (Wester e Canton, 1991). Esses químicos podem ter efeitos adversos na fisiologia do peixe, incluindo mecanismos importantes como o sistema de defesa não específico e as respostas imunes específicas.

Espécies aquáticas são mais utilizadas na genética ecotoxicológica do que as terrestres e microbiológicas; poucos são os estudos que utilizaram organismos terrestres ou pássaros. Isso pode ser explicado pela própria natureza do agente químico, sendo a maioria dos compostos genotóxicos lipofílica, os quais, no ambiente aquático, se acumulam na fração biótica, facilitando o monitoramento de espécies aquáticas. Fato esse que mostra a contribuição dada pela ecogenotoxicologia na qualidade da avaliação do ecossistema e na elaboração de programas de política ambientais (Kleijnans e Schooten, 2002). Organismos aquáticos são muito usados no monitoramento ambiental. Em peixes, os eritrócitos são usados principalmente como marcadores sentinelas de exposição genotóxica (Gontijo et al, 2003).

A avaliação da exposição das espécies no ambiente aquático a compostos genotóxicos pode ser complicada, uma vez que ocorrem alterações sazonais nas condições ambientais, na dieta e na situação hormonal. Isso pode influenciar drasticamente na atividade enzimática dos organismos e, conseqüentemente, na ação de desintoxicação das substâncias genotóxicas. Com isso, a avaliação da genotoxicidade em peixes ou invertebrados aquáticos em situações laboratoriais ou em campo pode estar no nível molecular ou cromossômico (Mitchelmore e Chipman, 1998).

Os peixes são excelentes para o estudo de potencial mutagênico e carcinogênico de contaminantes presentes na água, pois podem metabolizar, concentrar e armazenar poluentes, além de estarem no topo da cadeia alimentar e tipicamente expostos aos poluentes (Al-Sabti, 1991). A alimentação é a principal rota de exposição do homem aos produtos químicos, e esses animais têm sido reconhecidos como os maiores vetores de transferência de contaminantes aos humanos (Shibata et al, 2004).

## 1.2 CIANOBACTÉRIAS

### 1.2.1 Florações

Uma consequência de atividades humanas como excessivas descargas de esgotos domésticos e industriais, abusiva utilização de adubos químicos, estrume e rejeitos de efluentes da agroindústria é a eutrofização, uma resposta biológica para o excesso de nutrientes em um corpo d'água. Isto é uma grande preocupação para a sociedade porque o crescimento de algas não só prejudica a qualidade da água, mas também, pela produção de toxinas, que aumenta o risco de toxicidade para animais e seres humanos. (Jochimsen et al., 1998; Falconer, 1999; Codd, 2000; Zimba et al., 2001).

Além de elevar a biomassa de algas, cianobactérias (cianotoxinas) e plantas, a eutrofização pode reduzir a diversidade de espécies em todos os níveis tróficos e aumentar a turbidez e o número de partículas em suspensão dando à água um gosto e sabor desagradáveis a água potável, diminuindo a qualidade da água (Codd, 2000). Entre as condições propícias para que ocorra um crescimento explosivo de algas estão temperaturas médias acima de 25 °C, pH do meio em torno de 7,5 (de neutro a levemente alcalino), exposição prolongada à radiação solar e principalmente a presença em excesso de compostos nitrogenados e fosfatados (Lemes e Yunes, 2006).

Primeiras notícias de florações e envenenamento em seres humanos e em gado apareceram por volta de 1878 na Austrália de uma floração tóxica do gênero *Nodularia* no Lago Alexandrina. Na China, um alto índice de câncer hepático foi atribuído a contaminações de água potável e no Brasil, na cidade de Caruaru, Pernambuco, um episódio trágico, provocou a morte de 60 pacientes renais crônicos devido à presença de toxinas de cianobactérias na água usada no procedimento de hemodiálise (Harada et al, 1996; Ueno et al, 1996; Jochimsen et al, 1998; Pouria et al, 1998).

O fato que chama a atenção é que as florações de cianobactérias, geralmente visíveis, causam danos aos organismos e ao ambiente. Elas alteram o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos, criam um biofilme superficial de cor verde, alterando a transparência da água e conduzindo a desoxigenação de lagos e rios. Além disso, liberam substâncias que produzem gosto e odor desagradáveis, e afetam a

potabilidade dos reservatórios de uso humano. Até mesmo em áreas recreacionais e de banho, a qualidade da água fica comprometida. (Lemes e Yunes, 2006).

A produção e liberação de toxinas de alto potencial tóxico é a característica mais marcante das florações de cianobactérias. Dados provindos de todo o mundo mostram evidências que as florações são responsáveis por envenenamento agudo e causadora de várias doenças em animais, selvagens e domésticos e em humanos (Carmichael, 1992; Vasconcelson et al, 1993; Carmichael, 2001). Como estão ocorrendo com mais freqüência, exposições a níveis cada vez mais altos a seres humanos estão ocorrendo aumento os casos de toxicidade aguda (Carmichael, 1992).

Diversos estudos demonstram os efeitos tóxicos de cianobactérias sobre organismos zooplanctônicos, principalmente em microcústáceos (DeMott 1991, Campbell *et al.* 1994). O uso de *Artemia* sp. no monitoramento de florações nocivas de cianobactérias aponta boa correlação entre a quantidade de toxinas, com a mortalidade de organismos expostos (Campbell *et al.* 1994), como também a relativa facilidade do procedimento dos testes e os baixos custos operacionais gerados (Minillo et al, 2000).

O primeiro passo a ser dado em caso de suspeita da ocorrência de uma floração tóxica é o monitoramento. Esse é um passo importante, visto que através dele se comprova se é realmente uma floração de cianobactérias ou de algas. E, no caso de floração de cianobactérias, quais gêneros estão envolvidos e em quais concentração estão ocorrendo por mililitro (ml) de água. O método mais tradicional de se monitorar cianobactérias é a microscopia de luz (Codd et al, 2005).

O passo seguinte, após a verificação da ocorrência de cianobactéria potencialmente tóxica, é a constatação da toxicidade e a verificação do tipo de cianotoxina presente no meio aquático do manancial. Existem poucos laboratórios no Brasil que fazem monitoramento e análise de toxinas de cianobactérias. Esses laboratórios utilizam-se de bioensaios (aceitos e recomendados pela OMS) para comprovação da toxicidade das cianotoxinas produzidas durante as florações tóxicas. A seguir colocam-se em prática processos físico-químicos ou medidas de biodegradação e bio-remediação para a tentativa de remoção das toxinas. Diante dos resultados obtidos com os processos empregados, devem-se tomar medidas, que podem variar desde interditar uma área recreacional até impedir o uso como água potável de um ambiente impactado por cianotoxinas (Lemes e Yunes, 2006).

No Brasil, a eutrofização dos ecossistemas aquáticos tem favorecido a dominância destes organismos e grande parte das cepas de cianobactérias isoladas de corpos d'água brasileiros mostrou-se produtora de toxinas. Como muitos desses mananciais abastecem a rede pública, a liberação dessas toxinas na água representa um risco relevante para a saúde pública (Carvalho et al, 2008). Os testes de toxicidade realizados por Minillo e colaboradores (2000) com náuplios de *Artemia* sp. demonstraram que as florações de cianobactérias ocorridas no verão de 1998 no Estuário da Lagoa dos Patos no Rio Grande do Sul apresentaram média e alta toxicidade, o que reforça os riscos do potencial tóxico dessas florações a biota e populações humanas que utilizam estas águas para a pesca e lazer.

### **1.2.2 Morfologia e Taxonomia**

As cianobactérias são um dos mais diversos grupos de procariotos fotossintéticos gram-negativos em termos de sua morfologia, fisiologia e metabolismo (Codd, 1995). As espécies de cianobactérias são estudadas primeiramente por sua morfologia, seu mecanismo de fotossíntese, fixação de nitrogênio, além de certos aspectos de sua estrutura e da produção de uma variedade de metabólitos secundários (Charmichael, 1992).

Calcula-se que seu surgimento na Terra tenha ocorrido há 3,5 bilhões de anos. São organismos amplamente difundidos, existem em ambiente de condições extremas como fontes termais, regiões geladas ou até mesmo em regiões desérticas, onde aparecem em relações simbióticas com fungos. Normalmente são organismos encontrados nos ambientes aquáticos (fitoplâncton) e que "geralmente" não causam problemas devido à dinâmica dos ecossistemas, que regula a permanência dos organismos, através de vários fatores, entre os quais reprodução e predação (Lemes e Yunes, 2006).

De acordo com a recente taxonomia, há 150 gêneros com aproximadamente 2000 espécies e que pelo menos 40 destas são conhecidas por serem tóxicas. As cianobactérias crescem como células simples, em colônias, como a *Microcystis* sp., ou em filamentos e algumas espécies são fixadoras de nitrogênio. Muitas cianobactérias possuem vacúolos gasosos que permitem a regulação de suas posições na coluna de água dando a elas uma vantagem ecológica sobre espécies de plâncton (Hitzfeld et al, 2000).

Formas coloniais são geralmente encaradas como espécies r-estrategistas, com rápidas taxas de crescimento usadas para explorar as melhores condições, estão associadas com colonizações precoces do hábitat e formação de florações na superfície da água. Espécies filamentosas são caracterizadas como k-estrategistas, com taxa de crescimento lento e estratégias adaptativas que incluem vacúolos gasosos usados na flutuação e, em alguns casos, na capacidade de fixação de nitrogênio (Zimba et al, 2001).

Devido à capacidade de realizarem fotossíntese aeróbica e anaeróbica, as cianobactérias conseguem ter rápidos crescimentos em diferentes habitats, terrestres e aquáticos, principalmente em águas eutrofizadas formando florações intensas. Em ambientes aquáticos, com exceção da cilindrospermopsina, as cianotoxinas estão geralmente dentro das células das cianobactérias, mas podem ser liberadas em altas concentrações durante a lise celular (Sivonen e Jones, 1999).

### **1.3 CIANOTOXINAS**

Muitos gêneros de cianobactérias são capazes de produzir metabólitos secundários que atuam como biotoxinas (Carmichael, 1992). Essas toxinas podem ser classificadas dentro de duas categorias distintas baseadas em seus modos de toxicidade. Elas são neurotoxinas (alcalóides) e hepatotoxinas (peptídeos), conhecidas como microcistinas (Carmichael, 1992; Rudolph-Bohner et al., 1994).

Metabólitos secundários referem-se a componentes que não são usados pelo organismo para suas funções primárias, como a divisão celular ou metabolismo, essas substâncias incluem componentes que atuam como hormônios, antibióticos, aleloquímicos e toxinas, que são componentes secundários com efeitos nocivos sobre células, tecidos ou organismos. Enquanto não se sabe a razão da produção de toxinas pode-se cogitar que elas funcionam como substâncias protetoras (DeMott et al. 1991).

As cianotoxinas podem ser classificadas funcionalmente dentro de hepato-, neuro- e citotoxinas. Elas, estruturalmente, são classificadas como: peptídeos cíclicos (microcistinas e nodularinas), alcalóides (neurotoxinas) e lipopolissacarídeos, que possuem um potencial no uso farmacológico (Tabela 1). As espécies mais relacionadas com toxicidade são *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix*

(= *Oscillatoria*) *rubescens*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena flosaquae*, *Planktothrix agardhii* e *Lyngbia* spp (Hitzfeld et al, 2000).

Tabela 1 - Toxicidade das toxinas produzidas por cianobactérias (Hitzfeld, et al, 2000).

Toxina	DL50 (µg/kg, i.p. camundongo)	Organismo
Microcistina-LR	50	<i>M. aeruginosa</i> , <i>Aph. flos-aquae</i> , <i>M. viridis</i>
Microcistina-LA	50	<i>M. aeruginosa</i> , <i>M. viridis</i>
Microcistina-YR	70	<i>M. aeruginosa</i> , <i>M. viridis</i>
Microcistina-RR	600	<i>M. aeruginosa</i> , <i>Anabaena</i> sp., <i>M. viridis</i>
(D-Asp3) microcistina-LR	50-300	<i>M. aeruginosa</i> , <i>Aph. flos-aquae</i> , <i>M. viridis</i> , <i>O. agardhii</i>
(D-Asp3) microcistina-RR	250	<i>O. agardhii</i> , <i>M. aeruginosa</i> , <i>Anabaena</i> sp.
(Dha7) microcistina-LR	250	<i>M. aeruginosa</i> , <i>Anabaena</i> sp., <i>O. agardhii</i>
[(6Z)-Adda] microcistina-LR	> 1200	<i>M. viridis</i>
[(6Z)-Adda] microcistina-RR	> 1200	<i>M. viridis</i>
Nodularina	50	<i>N. spumigena</i>
(D-Asp1) nodularina	75	<i>N. spumigena</i>
[(6Z)-Adda3] nodularina	> 2000	<i>N. spumigena</i>
Anatoxina-a	200-250	<i>Aph. flos-aquae</i> , <i>Anabaena</i> spp., <i>Oscillatoria</i> , sp., <i>Aphanizomenon</i> sp., <i>Cylindrospermum</i> sp.
Anatoxina-a(s)	20	<i>Aph. flos-aquae</i>
Saxitoxina	10	<i>Aph. flos-aquae</i> , <i>A. circinalis</i> , <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , <i>Lyngbya wollei</i>
Cilindrospermopsina	2000	<i>C. raciborskii</i> , <i>Umezakia natans</i> , <i>Aph. ovalisporum</i>

Apesar do motivo da produção de toxinas pelas cianobactérias, no caso a microcistina, não ser conhecido, o mecanismo de síntese está se tornando cada vez mais claro. Seu pequeno tamanho, estrutura cíclica, e conteúdo de aminoácidos incomuns indicam que esses peptídeos são sintetizados mais por mecanismo não ribossomal do que por ribossomos. As enzimas envolvidas na síntese desses

peptídeos não ribossomais, peptídeos sintetases, possuem estruturas altamente conservadas (Hitzfeld, et al, 2000).

Há uma variabilidade espaço - temporal na presença e quantidade de toxinas (microcistinas) produzidas por florações de *Microcystis*, normalmente formas coloniais planctônicas de *Microcystis* são propensas a concentrarem maiores quantidades de toxinas (microcistinas) intracelulares, do que aquelas sob estágio senescente ou estacionário de seu ciclo de crescimento (Watanabe *et al.* 1989).

As toxinas produzidas pelas cianobactérias, especialmente as microcistinas, podem ser encontradas por todo o mundo e exposições de humanos e animais acabam em intoxicação aguda e morte. Há poucos estudos de exposições crônicas a baixas doses, entretanto, demonstrou-se que podem causar apoptose em hepatócitos, além de degeneração crônica do fígado (Mcdermott, 1998). Apesar da apoptose ser benéfica quando é um evento programado, apoptoses prematuras e excessivas estão implicadas em uma variedade de doenças degenerativas (Flament *et al.*, 1990).

As toxinas podem penetrar no corpo via gástrica ou dérmica, por inalação ou, em alguns casos, durante a hemodiálise. O consumo prolongado de água contaminada com baixas concentrações pode causar danos hepáticos crônicos, os quais podem levar a um carcinoma hepático primário (Falconer, 1994; Humpage e Falconer, 1999), hemorragia e necrose dos hepatócitos. O efeito letal da microcistina associado com os danos hepáticos foi notado principalmente em animais (Palus *et al.*, 2007).

A eficiência dos processos de tratamento de água na eliminação das cianotoxinas usando-se métodos convencionais é baixa, causando, conseqüentemente, um grande risco para a população que se abastece com água de reservatórios eutrofizados (Tarczynska, 1997). Muitas toxinas produzidas por cianobactérias continuam sendo identificadas e as ocorrências por envenenamento estão sendo demonstradas com mais confiança, auxiliada por melhorias nos processos de relatos e investigações, nos métodos analíticos e nas extrações e identificações de toxinas por material clínico. Apesar de muitos países pesquisarem sobre cianobactérias ainda não se tem o conhecimento da gama de metabólitos que podem apresentar certo perigo à saúde humana (Codd, 2000).

Os metabólitos produzidos por cianobactérias não são essenciais para nenhuma via bioquímica e são acumulados nas células durante a fase de



crescimento exponencial (Zimba et al. 1999). Componentes nocivos podem se combinar com o sedimento e dar sabor azedo à água e aos peixes, além de causar irritações dermatológicas. Dois mecanismos de ação das toxinas de cianobactérias apresentam toxicidade: bloquear os canais de sódio no tecido nervoso ou alterar a função hepática. Exposições a essas toxinas podem matar organismos diretamente ou enfraquecer o animal e diminuir sua resistência a infecções bacterianas ou virais (Zimba et al, 2001).

A habilidade de uma estirpe de produzir toxinas pode depender primariamente da posse de genes que possuem a informação necessária para a produção de peptídeos com características tóxicas e, além disso, da expressão desses genes sob certas condições ambientais (Hitzfeld, et al, 2000).

As cianotoxinas são agrupadas em duas categorias baseadas em bioensaios usados para descrever suas atividades. Citotoxinas, devido aos efeitos sobre as células de mamíferos, e como biotoxinas, porque são testadas em pequenos animais (camundongos ou invertebrados aquáticos) para sua caracterização (Carmichael, 1992).

### **1.3.1 Biotoxinas**

As toxinas das cianobactérias constituem uma fonte importante de toxinas produzidas naturalmente, que são encontradas na superfície da água utilizada para abastecimento. Espécies e linhagens que produzem biotoxinas encontradas em todos os gêneros comuns de cianobactérias incluem *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc* e *Oscillatoria*, além desses, outros gêneros são conhecidos por produzirem biotoxinas, porém não há estudos que caracterizaram tais toxinas (Scott 1991; Skulberg *et al.* 1992).

### **1.3.2 Hepatotoxinas**

Essas toxinas são produzidas por linhagens de espécies dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria* e *Nostoc*. Além desses gêneros, outros como *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Gloeotrichia* e *Coelosphaerium* estão sendo estudados. Produzem sinais clínicos de hepatotoxicidade que são observados em envenenamentos envolvendo gado, ovelha, cavalos, porcos, patos e outros animais domésticos e selvagens. Coletivamente, os sinais de envenenamento

nestes animais incluem enfraquecimento, anorexia, palidez das mucosas, vômitos, extremidades frias e diarreia. Mortes ocorrerem dentro de poucas horas a poucos dias depois da exposição inicial e podem ser precedidas de coma, tremores musculares e respiração forçada (Beasley *et al.* 1989). A morte que resulta de hemorragia intra-hepática é baseada no aumento do peso do fígado e na concentração de hemoglobina e ferro hepáticos que são responsáveis pela perda de sangue suficiente para induzir choque irreversível (Carmichael, 1992).

O mecanismo de ação dessas hepatotoxinas é o assunto de várias pesquisas, e pode ser feito um esboço para tentar explicar tal fato. Primeiro, as toxinas podem ser absorvidas para a corrente sanguínea no íleo. O aumento nessa área do intestino pode refletir a atividade dos carreadores de ácido biliar como transportador dos peptídeos das toxinas através da mucosa. Segundo, há evidências que mostram que a toxina é transportada preferencialmente para o interior dos hepatócitos (Runnegar *et al.*, 1981; Dabholkar e Carmichael 1987; Meriluoto *et al.* 1990), que ocorre via transportadores do ácido biliar. Terceiro, mudanças ocorridas pelas toxinas nos microfilamentos de actina, que compõem parte do citoesqueleto celular, levam a densa agregação de microfilamentos perto do centro da célula (Runnegar e Falconer 1986; Eriksson *et al.* 1989; Hooser *et al.* 1991). Isso é geralmente aceito como um resultado da perda de suporte celular que leva a destruição das células endoteliais. Com a destruição das células parenquimáticas e dos sinusóides hepáticos ocorre hemorragia letal intra-hepática (dentro de horas) e/ou insuficiência hepática (Carmichael, 1992).

### **1.3.3 Efeitos na Saúde Humana**

Efeitos da toxicidade das cianotoxinas em seres humanos são diversos, entre eles estão: gastroenterites, náuseas, vômitos, febres, sintomas de gripe, dor de garganta, irritação nos ouvidos e olhos, erupções, mialgias, dores abdominais incluindo dores causados por hepatomegalia, consolidação pulmonar, distúrbios visuais, danos renais e hepáticos (Codd, 2000; Duy, 2000).

Evidências de envenenamentos em humanos por toxinas de cianobactérias variam de efeitos ocorridos por exposição recreacional a envenenamentos seguidos por consumo de água contaminada. Tais algas verdes-azuis tóxicas têm sido negligenciadas ou até mesmo tratadas a nível local e seus metabólitos ficam

acumulados ao longo das margens de lagos e lagoas levando perigo à vida de animais selvagens e domésticos. Por causa disto, o consumo de água potável é uma das questões mais importantes na saúde pública e vem ganhando importância cada vez maior (Hitzfeld et al, 2000)

A presença de cianotoxinas no suprimento de água potável aparece como um sério problema às instalações de tratamento de água, uma vez que nem todo procedimento técnico é capaz de remover essas toxinas a níveis aceitáveis, com isso, envenenamentos podem ocorrer por causa do consumo de água contaminada (Hitzfeld et al, 2000).

#### **1.3.4 Exposição aguda e subcrônica**

Gastrenterites ocasionadas por cianobactérias foram reportadas em vários locais, porém no Brasil ocorreram dois casos graves de envenenamento atribuídos a cianobactéria (Hitzfeld, et al, 2000). Primeiro, uma floração de *Anabaena* e *Microcystis* ocorrida na Represa de Itaparica foi responsável por 2000 gastrenterites resultando em 88 mortes, a maioria de criança (Teixeira et al, 1993). Segundo, um caso ocorrido em Caruaru (Jochimsen et al, 1998; Pouria et al, 1998), em 1996, resultou em mortes de pacientes de hemodiálise. A água usada na unidade de diálise, retirada de um reservatório, sempre foi anteriormente tratada. Porém, durante um período de seca, o centro de diálise recebeu água ineficientemente tratada de uma instalação municipal. Em fevereiro de 1996, a maioria dos pacientes desenvolveu doenças de severidade variada, com uma vasta gama de sintomas neurológicos e injúrias hepáticas. Vinte e três pacientes morreram nas duas primeiras semanas. Após cinco semanas 37 pacientes morreram por efeitos hepatotóxicos ou por complicações como septicemia, hemorragia gastrointestinal ou efeitos cardiovasculares (Hitzfeld, et al, 2000).

Os pacientes apresentaram icterícia com altas concentrações de bilirrubina e fosfatase alcalina e aumento das enzimas hepáticas. A patologia do fígado mostrou a presença de um tipo de hepatite tóxica aguda similar a hepatites vistas em animais expostos a microcistina (Pouria et al, 1998). A histopatologia mostrou também necrose panlobular (massiva) dos hepatócitos, junto com o rompimento e apoptoses de células, porém, não foi observada hemorragia intra-hepática. As concentrações de microcistina foram determinadas no soro (1 a 10 ng/ml), nos tecidos hepáticos

(0,6 mg/kg) e na coluna de água filtrada, esta com fragmentos intactos de células de cianobactérias e de microcistina-LR (Hitzfeld, et al, 2000).

### **1.3.5 Exposição Crônica**

Efeitos crônicos causados por longas exposições à água contaminada por cianobactérias foram observados em estudos feitos na China com altas incidências de câncer hepático primário, onde lagoas e valas de água são usadas como suprimentos de água potável, que, em algumas regiões, mostraram concentrações médias de microcistina de 160 pg/ml (60% das amostras analisadas deram positivas) (Ueno et al, 1996). Os dados apresentaram uma incidência de 4,28 por 100.000 indivíduos que utilizaram água tratada e 100,13 por 100.000 indivíduos que utilizaram água de lagoas/valas e que as pessoas que moram nessas áreas de alta incidência consomem, por dia, 0,19 pg de microcistina durante quatro meses (Ueno et al, 1996).

Pouco se sabe ainda sobre exposições crônicas de baixo nível, uma vez que riscos associados a exposições em longo prazo não são bem descritos. Fornecedores de água e pesquisadores são confrontados com uma variedade de questionamentos sobre o que realmente ocorre em fontes de água potável e há pouco conhecimento sobre os efeitos agudos e crônicos e sobre tecnologias eficazes de tratamento de água para a remoção de toxinas (Hitzfeld et al, 2000).

## **1.4 MICROCISTINAS**

Membros do gênero do *Microcistis*, *Oscillatoria* e *Anabaena* produzem peptídeos cíclicos, chamados microcistinas, que são potentes hepatotoxinas. Essas substâncias são responsáveis por mortes de peixes, aves, animais selvagens e domésticos em muitos países, onde a água doce contém florações de cianobactérias, além disso, já foi reconhecido que essas toxinas possuem efeitos sobre a saúde humana. Microcistinas são heptapeptídeos cíclicos com a estrutura básica cíclica (D-Ala-**L-X**-eritro- $\beta$ metil-D-iso-Asp-**L-Y**-Adda-D-iso-Glu-N-metil-dehidro-Ala), onde L-X e L-Y representam resíduos variáveis de aminoácido L. Adda é o  $\beta$  aminoácido: 3 – amino – 9 – óximetil - 2, 6, 8 – trimetil – 10 – fenildeca - 4, 6, - dienólico. A microcistina-LR (Figura 1), na qual os dois aminoácidos variáveis são

leucina e arginina, é a variante mais comumente encontrada das microcistinas reconhecidas até hoje (Carmichael et al, 1985; Codd, et al, 1989; Falconer, 1989).

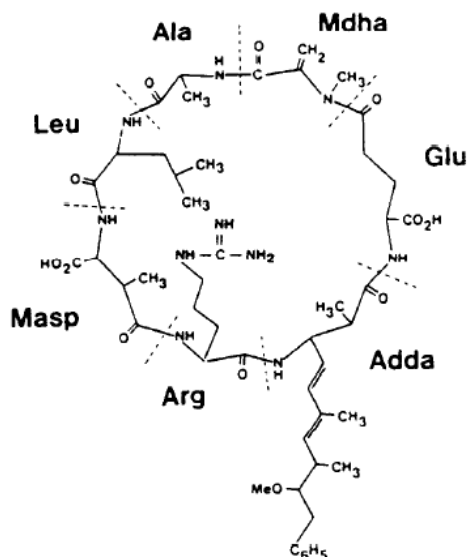


Figura 1 – Estrutura da microcistina-LR. Abreviações: Masp, ácido  $\beta$ -metilaspártico, Mdha, N-metildehidroalanina; Adda, ácido 3-amino-9-oximetil-2,6,8-trimetil-10fenildeca-4,6-dienóico. (Mackintosh, et al, 1990)

A primeira notícia desta hepatotoxina foram peptídeos isolados por Bishop e colaboradores em 1959 extraídos de estirpes de *Microcystis aeruginosa*. Isolamentos posteriores de microcistinas foram realizados da mesma estirpe e de florações da África do Sul e Austrália. Apesar dos vários extratos terem propriedades tóxicas semelhantes algumas microcistinas parcialmente hidrolisadas possuíam diferentes composições de aminoácidos (Carmichael, 1992).

Após a descoberta, pelo menos 65 isoformas de microcistinas já são conhecidas e podem variar pelo grau de metilação, hidroxilação, epimerização, pela seqüência de peptídeos e toxicidade. A microcistina - LR e a microcistina - RR são os tipos mais freqüentes produzidos pelo gênero *Microcystis* (Codd et al, 1999).

Crescimentos maciços e periódicos de cianobactérias, que produzem microcistina, ocorrem em todo o mundo em águas doces e salobras sujeitas a eutrofização. A exposição à água contaminada é, na maioria das vezes, o principal motivo dos casos de doenças humanas (Chorus, 1992), enfermidade ou morte em animais domésticos e selvagens (Codd et al, 1989). A presença de *Microcystis aeruginosa* não significa que ocorrerão condições tóxicas no ecossistema aquático,

porém, a dominância desse táxon no ambiente pode ser responsável pela produção de toxinas, principalmente em canais de sistemas eutrofizados. Um pigmento carotenóide conhecido como mixoxantofila é encontrado nesse taxa e pode ser utilizado como um biomarcador para a ocorrência desse gênero (Zimba et al, 2001).

Estudos da produção de microcistinas e sua relação com parâmetros ambientais fornecem pistas sobre a regulação e funcionamento dessas toxinas. Algumas cianobactérias são conhecidas em exibir alta e baixa toxicidade sob diferentes condições em laboratórios. Fatores ambientais como intensidade luminosa, temperatura, nutrientes, elementos traço e o status nutricional das células são investigados no que diz respeito ao efeito na produção de microcistina (Sivonen e Jones, 1999). Um aumento na produção da toxina pode também ser usado como um dispositivo de defesa contra a predação do zooplâncton (DeMott, 1999).

Jang et al (2004) verificaram que estirpes de *Microcystis aeruginosa*, quando expostas a determinadas espécies de peixes, tiveram um aumento na produção de microcistina, sendo a resposta maior a uma espécie planctívora em comparação a uma espécie onívora, suportando a hipótese de que há um tipo de resposta contra a predação. Junto com o aumento da toxina, os autores observaram perda de peso e taxa de crescimento negativa, sugerindo que peixes evitam o consumo de cianobactérias ou há uma pobre assimilação da comida ingerida.

Zimba et al (2001) verificaram mortalidade de peixes em tanques de criação resultantes do consumo de microcistina, e observaram lesões hepáticas ocorridas por doses de microcistina produzidas por algas não identificadas encontradas nos tanques e lesões mais severas em doses concentradas de microcistina-LR sob condições laboratoriais injetadas via intraperitoneal (i.p.).

Após ingestão elas são facilmente capturadas por proteínas transportadoras do ácido biliar e transportadas para o fígado, o que aumenta a seletividade para o fígado (Eriksson et al., 1990; Runnegar et al., 1995). As microcistinas funcionam como inibidoras de proteínas fosfatases (Rudolph-Bohner et al., 1994; Runnegar et al., 1993; Honkanen et al., 1990) e sua presença no fígado resulta na hiperfosforilação das proteínas hepáticas, causando deformações no citoesqueleto, colapso da arquitetura do fígado, hemorragia no parênquima hepático, e necrose (Carmichael, 1992). Animais com exposição aguda de grandes quantidades de microcistina morrem dentro de poucas horas após a ingestão (Jackson et al., 1993).

Um trabalho realizado por Mackintosh e colaboradores (1990) mostrou que a microcistina-LR é um forte inibidor específico das proteínas fosfatases 1 e 2A (PP1 e PP2A, respectivamente) e que inibe essas enzimas de maneira parecida a do ácido ocadáico. A cianotoxina inibe mais fortemente a PP2A em relação a PP1 em células de mamíferos e de plantas, o que pode ser explicada pela conservação estrutural de subunidades catalíticas da fosfatase.

Nos hepatócitos, as microcistinas, além de inibirem proteínas fosfatases, ativam fosfolipase A2 e cicloxigenase, que participam da via metabólica do ácido araquidônico, induzindo a produção dos mediadores inflamatórios como o tromboxano A2 e a prostaglandina I2 (Carvalho et al, 2008).

A administração oral ou intraperitoneal da microcistina em mamíferos causa perda extensiva da arquitetura lobular e sinusoidal do fígado com necrose e hemorragia hepática. Para camundongos, a dose letal via intraperitoneal varia entre 1 e 2 µg de microcistina, com a maior acumulação da toxina ocorrendo no fígado (75% da toxina injetada) e a morte se dá por volta de 60 minutos de choque hemodinâmico e falência do coração. (Carmichael et al, 1985; Falconer, et al, 1981; Brooks e Codd, 1987; Dabholkar e Carmichael, 1987).

Em nível celular a microcistina-LR causa deformações características como formação de bolhas na membrana plasmática de hepatócitos e perda de microvilosidades, com uma grande reorganização dos microfilamentos (Mackintosh et al, 1990). Os hepatócitos são os mais atingidos pela microcistina-LR, sendo necessária uma concentração 100 vezes menor, em relação a outros tipos de células, para induzir mudanças morfológicas celulares (Mcdermott, 1998). Isso ocorre devido à microcistina ser transportada para o fígado via proteínas carreadoras do ácido biliar (Eriksson et al., 1990; Runnegar et al., 1995).

Tencalla e Dietrich (1997) observaram que após tratamento de peixes com microcistina há um aumento na atividade enzimática, porém os danos continuam e o fígado gradualmente se torna necrosado. Como a ligação microcistina-fosfatase é irreversível (Takai *et al.*, 1995), o aumento na atividade pode ser explicada por nova síntese de enzimas pelos hepatócitos funcionais, em uma tentativa de conter o desequilíbrio. Porém, essa reação é ineficaz para interromper a progressão dos danos hepáticos, sugerindo que a inibição das fosfatases desencadeia uma cascata irreversível de reações levando à necrose hepática.

A troca da parte L-Leu hidrofóbica na primeira posição variável com outra parte hidrofóbica de L-aminoácido, como alanina, fenilalanina ou triptofano, mantém a toxicidade da microcistina, mas a substituição com um aminoácido hidrofílico, como a arginina, reduz dramaticamente a toxicidade. Assim, as microcistinas possuem substituições em ambas as posições variáveis de aminoácidos. (Zurawell et al., 2005).

Três das mais de 60 variantes de microcistinas conhecidas são mais importantes comercialmente – LR, YR e RR (Figura 2), sendo a microcistina – LR a mais tóxica identificada (Sivonen e Jones 1999). Gupta et al. (2003) relatou que DL50 (via i.p.) em 24 horas de MC-LR, RR e YR em camundongos são 43, 235,4 e 110,6 µg/kg de peso corpóreo, respectivamente. Assim a toxicidade de microcistina-RR e microcistina-YR em camundongos é aproximadamente igual a um quinto e um terço da toxicidade da microcistina-LR, respectivamente.

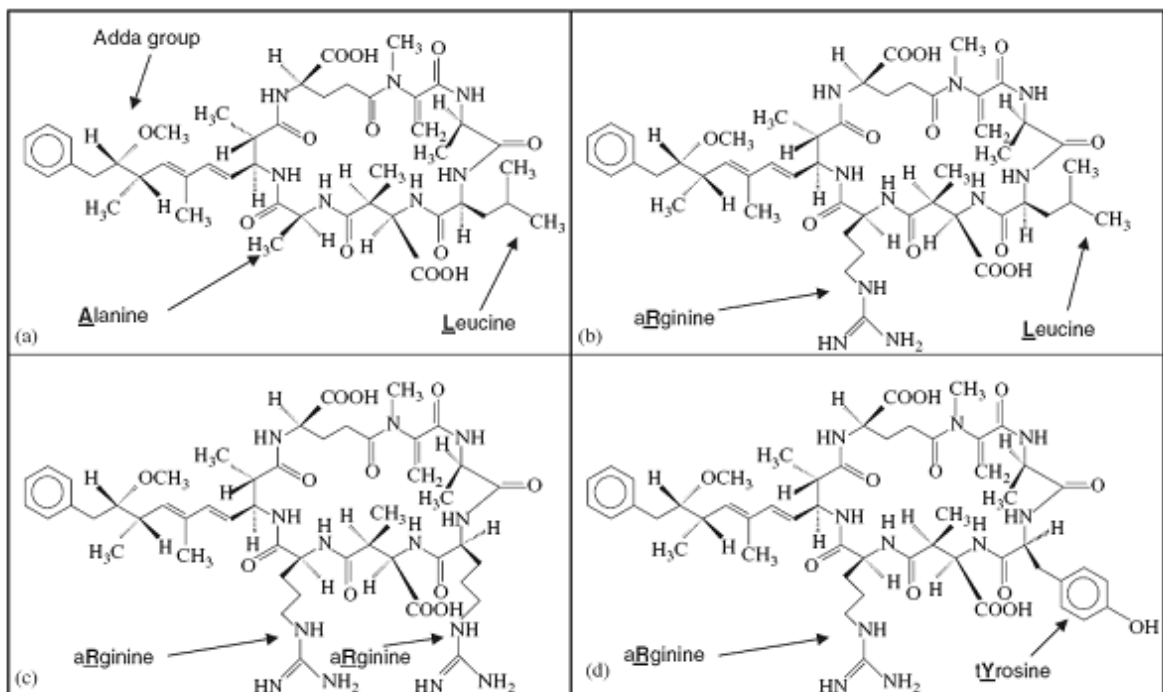


Figura 2 – Estruturas moleculares de quatro tipos de microcistina: (a) microcistina-LA; (b) microcistina-LR; (c) microcistina-RR; (d) microcistina-YR (Sivonen e Jones 1999).

Efeitos bioquímicos e histopatológicos da microcistina são bem estudados, mas informações a cerca da genotoxicidade, assim como o mecanismo molecular



pelo qual as toxinas induzem o desenvolvimento do câncer não é bem compreendido (Lankoff et al, 2004). A atividade genotóxica das microcistinas parece ser mais elevada do que a observada para o benzeno. O decréscimo da homeostase e o aumento de processos carcinogênicos ou morte celular são efeitos que demonstram a possibilidade da microcistina presente na água em induzir aberrações cromossômicas (Palus et al, 2007).

#### **1.4.1 Estudos sobre a ação das microcistinas**

Estudos realizados na Polônia mostraram que após uma exposição a extratos de cianobactérias houve um aumento nas aberrações cromossômicas em linfócitos humanos (Tarczynska et al, 1997). Em outro trabalho realizado na Polônia nos anos de 1998 e 1999, Mankiewicz e colaboradores (2002) mostraram uma correlação entre a concentração de microcistinas em culturas de bactérias e a ação genotóxica em *Escherichia coli* PQ37. Os autores verificaram os efeitos genotóxicos em linfócitos humanos induzidos por extratos de cianobactérias, com um decréscimo nos níveis de danos no DNA após 18 e 24 horas de exposição.

Avaliou-se o potencial mutagênico das cianotoxinas através do teste de mutagenicidade em *Salmonella typhimurium* (estirpes TA 98, 100 e 102 com e sem extrato S9 de microsomo hepático de camundongo), do teste de esporulação multigênico em *Bacillus subtilis* e do teste de quebra cromossômica usando-se linfócitos humanos. Testes realizados em bactérias sugerem que estas toxinas não foram mutagênicas, porém doses elevadas relacionadas à quebra cromossômica indicam que as toxinas produzidas por cianobactérias podem ser clastogênicas (Repavich et al., 1990).

Resultados de pesquisas com microcistina apresentam resultados contraditórios em relação à indução de mutações gênicas. Ding et al (1999); Mankiewicz et al (2002), observaram efeitos genotóxicos em bactérias. Rao e Bhattacharya (1996), Rao et al. (1998) verificaram indução de quebra de DNA em fibroblastos de embriões de camundongos e em linhagens celulares BHK-21. Já Runnegar e Falconer (1982), Repavich et al. (1990) e Grabow et al. (1982) relataram que microcistinas, com e sem ativação metabólica, não possuíram propriedades mutagênicas.

Uma forte citotoxicidade de extrato de *Microcystis* e microcistina-LR em culturas celulares é demonstrada pela liberação de enzimas intracelulares e está fortemente relacionada com a fragmentação do DNA, sendo a microcistina-LR mais intensa na citotoxicidade e na fragmentação do DNA em relação ao extrato de células (Lakshmana Rao et al, 1998).

Vários peptídeos e moléculas pequenas de defesa podem se ligar ao DNA através de ligações eletrostáticas não específicas ou através de ligações covalentes. Não há literatura previamente descrita que relaciona a ligação DNA e microcistina com efeitos genotóxicos (Zegura et al., 2004; Gaudin et al., 2008). Vela e colaboradores (2008) estudaram a interação DNA-microcistina e através de dois testes observaram que a cianotoxina não interage com o ácido nucléico diretamente.

A microcistina pode se ligar a uma variedade de proteínas de forma não específica e isso pode ter um interesse prático significativo, pois pode afetar a determinação da toxina e sua toxicidade, uma vez que extraída das células ou de outra amostra biológica, uma parte da toxina pode ser perdida quando se descarta frações de proteínas (Juttner e Luthi ,2008; Vela et al, 2008).

Segundo alguns autores, a amplitude de lesões no fígado de camundongos observada após uma única dose sub-letal de microcistina-LR (i.p.) inclui hipertrofia hepatocelular, inclusões eosinofílicas intracitoplasmáticas e apoptose. Doses repetidas induzem hepatocitomegalia e cariomegalia, com desarranjo e perda da arquitetura hepatocelular, além de apoptose e perda de vacuolização citosólica. As condições que levam à apoptose no fígado intoxicado com microcistina ainda não foram completamente elucidadas, entretanto, alguns estudos mostraram que a apoptose está diretamente associada à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzida por microcistinas. Espécies reativas de oxigênio, tais como radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila estão relacionadas à toxicidade de vários xenobióticos e ao desenvolvimento de diversas doenças degenerativas, incluindo o câncer (Carvalho et al, 2008).

O estresse oxidativo em células ocorre quando as forças pró-oxidantes conseguem superar as defesas antioxidantes, que incluem mecanismos enzimáticos (superoxidismutase, catalase e a glutationala peroxidase e redutase) e não-enzimáticos (vitaminas E, C e A, carotenos e outros). Esses sistemas podem prevenir a formação de oxirradicais ou interceptar as reações de propagação oxidativa promovidas pelos oxirradicais formados (Bainy et al., 1996). Além disso,

eles protegem as células contra quebras no DNA, oxidação protéica, e peroxidação lipídica.

Existem alguns mecanismos de metabolização e detoxificação que ocorrem nos organismos. No fígado ocorre através da glutatona reduzida (GSH). Esta reage com uma grande variedade de xenobióticos formando conjugados de GSH. Muitos desses conjugados podem ser convertidos em ácidos mecaptúricos para posteriormente serem excretados. Até certa concentração, as microcistinas podem ser biotransformadas através de ligação não-enzimática com GSH ou através da ação da glutatona S-transferase (GST). Esta enzima é membro do grupo de enzimas de detoxificação de fase II e age conjugando substâncias eletrofílicas à glutatona, tornando-as mais hidrossolúveis e facilitando, deste modo, o processo de excreção (Carvalho et al, 2008).

O conjugado microcistina-GSH além de ser facilmente excretável, também fica impossibilitado de estabelecer a ligação com as fosfatases. A GST solúvel catalisa a conjugação enzimática da microcistina-LR a glutatona e seu sistema está presente em vários organismos aquáticos incluindo plantas (*Ceratophyllum demersum*), invertebrados (*Dreissena polymorpha*, *Daphnia magna*) e peixes (*Danio rerio*) (Pflugmacher et al., 1998).

As microcistinas, sendo um peptídeo cíclico, são extremamente estáveis e resistentes a hidrólises químicas ou a oxidação perto de pH neutro. Harada et al (1996) mostrou que a altas temperaturas (40°C) e a alto ou baixo pH, a hidrólise é lenta tendo 90% de desagregação em, aproximadamente, 10 semanas em pH 1 e em mais de 12 semanas em pH 9 (Moreno et al, 2004).

Sabe-se muito pouco sobre a hidrólise enzimática da microcistina em organismos expostos a tal toxina. É de vital importância saber a resistência ou degradação de tóxicos ou substâncias químicas sob condições no organismo, pois essas substâncias podem se hidrolisar e formar novos compostos cuja toxicidade pode ser completamente diferente daquela apresentada pela original (Moreno et al, 2004).

Níveis típicos de microcistina encontrados em águas com cianobactérias podem variar de menos de 1µg/L até mais de 8µg/L. Estudos sobre tratamento de água e compostos de microcistina derivados de florações de cianobactérias revelaram que essas toxinas são destruídas pelo ozônio (Rositano et al., 1998, 2001, Brookea et al, 2006).

Watanabe et al (1985) verificaram que a toxicidade da espécie *Microcystis aeruginosa* pode alterar dependendo de alguns fatores ambientais ou de mudanças na própria população, seja na toxicidade de uma estirpe ou na composição de linhagens tóxicas ou não tóxicas dentro da população. Mudanças na toxicidade sob diferentes temperaturas - pequeno aumento em baixa temperatura e ligeiro decréscimo em alta temperatura - não foram tão grandes como sob intensidade luminosa, com mudanças acentuadas (a produção foi suprimida sob baixa intensidade luminosa). Em deficiência de fósforo foi estimada uma baixa toxicidade, mas não ocorreram diferenças no crescimento celular. O mesmo autor verificou que a toxicidade da microcistina aumentou durante fase exponencial e depois diminuiu e que a toxicidade caiu mais de 50% por dia a partir do início da fase estacionária.

#### **1.4.2 Inibição das Proteínas Fosfatases 1 e 2A (PP1 e PP2A)**

PP1 e PP2A estão envolvidas na desfosforilação de proteínas regulatórias que controlam várias funções celulares, e sua inativação pode ser letal. Essa inativação realizada pela microcistina da PP1 e PP2A pode explicar, em parte, o motivo da redução da diversidade de plantas e animais em águas contaminadas por cianotoxinas produzidas em florações (Mackintosh, et al, 1990).

Ao nível molecular, os principais alvos das microcistinas são as proteínas fosfatases (PP) da família serina/treonina, dentre estas: PP1, PP2A, PP4 e PP5. A ligação microcistina-PPase ocorre em duas etapas: inicialmente o aminoácido hidrofóbico Adda das microcistinas ocupa o sítio ativo das proteínas fosfatases através da ligação não-covalente, o que produz o efeito inibitório da toxina. Em seguida, o aminoácido Mdha se liga covalentemente ao resíduo de cisteína 273 das fosfatases. Esta ligação é irreversível e prolonga o efeito deletério causado ao tecido. A relevância do efeito inibitório de microcistinas se deve ao fato de que o “status” de fosforilação de qualquer proteína é um processo dinâmico que reflete a ação combinada de proteínas quinases e fosfatases. Nas células eucarióticas, a maior parte da fosforilação protéica ocorre em resíduos de serina e treonina. Portanto, o papel das fosfatases do grupo PP1 e PP2 é crucial, uma vez que essas enzimas são responsáveis por grande parte da atividade fosfatásica celular (Carvalho et al, 2008).

Tencalla e Dietrich (1997) verificaram que a aplicação da microcistina-LR em peixes promove alterações nas atividades das PP1 e PP2A hepáticas ocasionando danos no fígado dos animais, enquanto a concentração da toxina no fígado aumentava a atividade das PP1 e PP2A progressivamente diminuía, aparecendo mudanças na estrutura hepática. Vale lembrar que PP1 e PP2A possuem um amplo espectro *in vivo* e são conhecidos por desempenhar um papel essencial não só na integridade do citoesqueleto, mas no transporte intracelular. Todavia, se PP1 e PP2A são importantes para a toxicidade da microcistina, a ligação entre a inibição dessas enzimas com a mortalidade ainda tem de ser explicada.

Em mamíferos, as microcistinas atuam especificamente no fígado, onde são levados para os hepatócitos por um sistema de transporte multiespecífico do ácido biliar (Eriksson et al., 1990). Em doses tóxicas agudas, a microcistina causa inchaço dos hepatócitos e perda de sua estrutura normal. Essa desorganização tecidual leva a uma hemorragia intra-hepática, seguida de morte de animais por choque hipovolêmico ou insuficiência hepática (Carmichael, 1992). Esse quadro parece ser desencadeado quando as microcistinas se ligam e inibem enzimas regulatórias importantes, como as PP 1 e PP2A no citosol dos hepatócitos (Eriksson *et al.*, 1992).

#### **1.4.3 Microcistinas como Promotores de Tumor**

Pesquisas envolvendo a promoção de tumores são realizadas e mostraram que há o aumento de tumores de pele em camundongos expostos por via oral à microcistina (Falconer, 1991) e tumores hepáticos em ratos expostos à microcistina – LR purificada (Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992). Esses resultados indicam que as hepatotoxinas devem ser investigadas mais profundamente por seu papel como possível promotor ambiental de tumores, o que sugere a monitoração e a regulação nos suprimentos de água para o abastecimento humano (Carmichael, 1992).

A microcistina possui atividade promotora de tumor por um caminho independente. Extratos de cianobactérias ou microcistina-LR em água potável induzem tumores de pele em ratos e camundongos (Falconer, 1991; Fujiki et al, 1989). Dois testes de carcinogênese realizados com microcistina demonstraram sua capacidade de promover tumores em ratos (Nishikawa-Matsushima et al, 1992). Apesar de estudos com camundongos que receberam extratos de células de cianobactérias por curtos e longos períodos desenvolveram lesões hepáticas agudas

e crônicas, pouco se sabe sobre a toxicidade crônica dessas toxinas, particularmente sobre a carcinogenicidade da microcistina (Ueno et al, 1996).

A microcistina-LR induz a expressão do fator- $\alpha$  de necrose tumoral e respostas gênicas precoces em fígado e hepatócitos de ratos (Sueoka et al, 1997). Além disso, mutações no códon 12 K-*ras* na linhagem celular RSA e fragmentações do DNA têm sido reportadas por estudos após a aplicação de extratos de cianobactérias ou microcistina-LR em camundongos (Rao e Bhattacharya, 1996; Rao et al, 1998). Observações ocorridas na China verificaram que o consumo de água contaminada com microcistina foi associado com uma alta incidência de câncer hepático primário.

Tal estudo feito na China verificou que a alta incidência de câncer hepático primário em regiões do país esteve associada com microcistina. Presumiram que a principal fonte dessa toxina era a água encontrada, possivelmente, em lagos, valas e rios. Essa água era usada no consumo das pessoas todos os dias por um longo tempo. Porém outras possíveis fontes foram levantadas como os tecidos comestíveis de peixes, mariscos e patos (Ueno et al, 1996).

### **1.5 A UTILIZAÇÃO DE PEIXES NO ESTUDO DA MICROCISTINA**

Várias espécies de peixes expostas ambientalmente a compostos mutagênicos são utilizadas em análises de respostas genotóxicas, como frequência de aberrações cromossômicas, teste do micronúcleo e teste do cometa (Kleinjans e Schooten, 2002). Comparadas às células de mamíferos, o reparo no DNA em organismos aquáticos é lento, o que pode ser vantajoso para a medição de quebras diretamente induzidas, mas pode diminuir a sensibilidade do teste por componentes que causam danos via incisão de aductos (Mitchelmore e Chipman, 1998). Várias observações de estudos em laboratórios mostraram que exposições *in vivo* levam ao aumento de quebras do DNA e isso tem encorajado o uso desse parâmetro como parte de estratégias de biomonitoramento (Kennedy e Walsh, 1994; Cravedi et al, 1995; Huuskonen et al, 1995).

O monitoramento dos efeitos clastogênicos de poluentes é de grande interesse na mutagênese em ambientes aquáticos para se determinar o estresse resultante de poluentes em organismos vivos. O teste de troca de cromátides irmãs

e o teste de aberrações cromossômicas são utilizados para se detectar danos no DNA, porém, como esses testes foram originalmente desenvolvidos para se avaliar a genotoxicidade em células de mamíferos, encontram-se dificuldades em estudos de clastogenicidade em organismos aquáticos (Al-Sabti e Metcalfe, 1995). As técnicas de troca de cromátides irmãs e aberrações cromossômicas que passam por metáfase não são práticas para muitas espécies de peixes por causa da limitação do cariótipo dos

peixes e a dificuldade de encontrar um número suficiente de metáfases por aberrações cromossômicas (Hooftman and Raat, 1982). O teste de micronúcleo detecta quebras cromossômicas durante a divisão celular ou a perda de cromossomos por danos ocorridos na anáfase (Kirsch-Volders et al., 2003). O teste de micronúcleo com peixes se mostrou bem útil em técnicas *in vivo* para testes de genotoxicidade e possui um potencial para ser utilizado no monitoramento da qualidade da água *in situ* (Al-Sabti and Metcalfe, 1995; Bolognesi et al., 1999; Grisolia e Starling, 2001).

Segundo Sánchez-Galán *et al.* (1998), os peixes são considerados bons indicadores para a detecção de contaminação de recursos hídricos por substâncias genotóxicas. Eritrócitos de sangue periférico são muito comumente usados para a aplicação do ensaio do cometa em conjunto com o teste do micronúcleo, utilizando peixes como bioindicadores para avaliação ambiental de contaminação genotoxicológica (Da Silva *et al.* 2002; Russo *et al.* 2004).

Peixes expostos a microcistina por diferentes vias (dermatológica, por inalação, oral e intravenosa) podem iniciar mecanismos de desintoxicação que os ajuda a sobreviver sob stress tóxico das cianobactérias. Esse processo parece ser iniciado pela formação de um conjugado da microcistina – LR/glutathione formado enzimaticamente via GST solúvel (citoplasmática), o que ajuda não só na desintoxicação da microcistina, mas também de outros inúmeros compostos (Pflugmacher et al., 1998; Best et al., 2002).

Nos últimos anos, evidências apontam que não só os mamíferos são suscetíveis a cianotoxinas, peixes também têm demonstrado tal susceptibilidade. Em florações de cianobactérias, observavam-se mortes de peixes envolvendo espécies planctívoras, como as carpas (*Cyprinus carpio*) bem como espécies onívoras e carnívoras (Rodger *et al.*, 1994). Sabe-se que espécies como a carpa e a tilápia (*Oreochromis niloticus*), que são planctívoras, se alimentam de grupos de

*Microcystis aeruginosa* não tóxicas no ambiente e quando há um aumento da porcentagem de algas tóxicas os peixes evitam a ingestão de cianobactérias e há um decréscimo na atividade predatória sobre as espécies tóxicas (Tencalla e Dietrich, 1997; Beveridge et al., 1993; Keshavanath et al., 1994).

Os principais órgãos afetados pela microcistina são o fígado e rins com sintomas similares aos descritos para mamíferos. Ademais, as células epiteliais das brânquias sofrem degeneração e necrose, mesmo após aplicação intraperitoneal (Carbis et al., 1996; Wiegand e Pflugmacher, 2005; Anderson et al, 1993).

Além de causar danos fisiológicos, as cianotoxinas causam mudanças no comportamento de peixes. Concentrações ambientais relevantes de micorcistina-LR (0,5 – 50 µg/L) influenciaram o ritmo diurno da espécie *Danio rerio* levando imparidade na alimentação e no sucesso de desova (Baganz et al, 1998). E o ritmo diurno de *Leucaspus delineatus* alterou para um ritmo noturno sob tratamento de microcistina-LR a 50 µg/L (Baganz et al., 2004). Efeitos subletais resultantes de exposições de microcistinas incluem danos hepáticos em carpas na Nova Zelândia (Carbis et al, 1997) e diminuição da movimentação opercular em tilápias (Keshavanath et al, 1994).

Tanto em mamíferos quanto em peixes, ocorre uma rápida acumulação da microcistina no fígado e uma lenta eliminação/degradação da toxina (Tencalla e Dietrich, 1997). É surpreendente como as carpas podem ser afetadas por toxinas das florações de cianobactérias. A dinâmica temporal das microcistinas no fígado sugere que a carpa cabeça gorda talvez tenha um mecanismo para degradar ou se ligar microcistina-LR ativamente depois que entra no sistema sanguíneo (Li et al, 2005).

Além da microcistina, testes de toxicidade com extrato de células mostram que frações lipídicas/hidrofóbicas podem contribuir para a toxicidade dos produtos das cianobactérias em peixes (Rodger et al., 1994). Extratos de *Microcystis* sem microcistina inibem o transporte de íons nas brânquias de tilápias (Bury et al., 1996), e a atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>-</sup>-ATPase nas brânquias dessa espécie é inibida por ácidos graxos originários de *Microcystis* (Bury et al., 1998). Lipídios de *Aphanizomenon* impede o desenvolvimento larval do embrião de peixes da espécie *Danio rerio* (Papendorf et al., 1997).

Na aquicultura intensiva, com condições de confinamento ou durante florações extensas de cianobactérias tóxicas em pequenos lagos e lagoas, o



decréscimo da predação talvez não seja suficiente para proteger essas espécies planctívoras e outros peixes de uma intoxicação aguda por toxinas. Assim, a aqüicultura, que é uma atividade importante na obtenção de proteínas para a população mundial, pode ser comprometida por florações de cianobactérias as quais necessitam de mais compreensão dos fatores envolvendo a indução dessas florações e dos efeitos das toxinas nas espécies de peixes (Tencalla e Dietrich, 1997).

## **1.6   TESTE DO MICRONÚCLEO**

Os efeitos das mutações podem ser silenciosos por muitas gerações ou terem um impacto significativo no patrimônio genético de uma população, por isso, há um crescente interesse no uso de biomarcadores para se estudar os efeitos de poluentes aquáticos a nível genético utilizando peixes, principalmente teleósteos, pois são organismos bioconcentradores e respondem a mutágenos (até em baixas concentrações) e poluentes ambientais (Russo et al, 2004).

O teste de micronúcleo é usado desde a década de 80 e é utilizado para se estimar o nível de exposição a contaminantes genotóxicos. Esse teste mede danos cromossomais estruturais ou numéricos sendo muito utilizado, e recomendado como um bioindicador em estudos ambientais sob condições laboratoriais e no campo (Al-Sabti et al, 1995; Fenech, 1997; Kirsch-Volders et al, 1997).

Micronúcleos são cromossomos inteiros ou parciais que não foram incorporados no interior do núcleo das células filhas durante a divisão celular (Figura 3) e que aparecem como uma pequena estrutura redonda parecida com o núcleo celular (Bombail et al, 2001).

Hayashi *et al.* 1998, avaliando sistemas de monitoramento usando organismos aquáticos para detecção genotóxica, sugerem que a sensibilidade do teste do micronúcleo em detectar baixos níveis de contaminação deve ser melhorada. Para isso, uma de suas propostas é de substituir o método de coloração com GEMSA por Laranja de Acridina, e analisar as células na pesquisa de micronúcleos em microscopia de fluorescência. Essa metodologia dá mais acurácia na obtenção dos resultados.

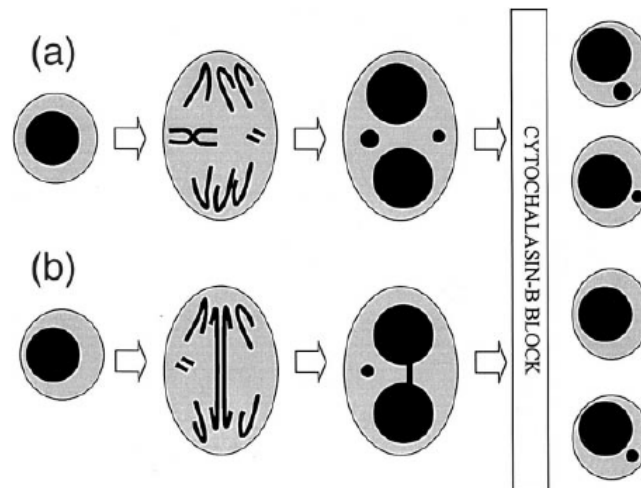


Figura 3 – Formação de micronúcleos em eritroblasto. (a) quebra cromossômica por ação de agente clastogênico. (b) ação do agente no fuso mitótico. (Fenech, 2000).

Buschini *et al* (2004) constataram que o teste de micronúcleo é viável mesmo que a frequência de micronúcleos seja baixa e utilize uma amostra grande de sangue. Além disso, perceberam que há uma variação entre os organismos da mesma espécie estudados, onde cada um responde diferentemente ao agente genotóxico quando diferentes indivíduos são expostos a diferentes tempos.

Como as frequências de micronúcleos dentro de uma população de células são muito dependentes da cinética da proliferação celular, a qual varia amplamente dependendo do organismo e do tecido-alvo, não é tão fácil estabelecer um tempo para que se obtenha um rendimento ótimo de micronúcleos depois de uma exposição a agentes genotóxicos (Al-Sabti e Metcalfe, 1995).

O teste de micronúcleo é usado em estudos citogenéticos para detectar mudanças cromossomais como fragmentos de cromossomos/cromátides acêntricos induzidos por agentes clastogênicos (quebras cromossomais) ou atraso na migração cromossomal na anáfase induzido por substâncias aneugênicas (perda de cromossomos inteiros). É uma técnica sensível e válida que utiliza a metodologia do bloqueio citocinético para restringir a análise nas células que tiveram passado através de sua primeira divisão. A relação entre quebras de DNA em células interfásicas, as quais ocorrem durante a exposição à mutágenos, e a expressão de micronúcleos nas seguidas interfases é dependente de diferentes fatores, como o estágio do ciclo celular, capacidade de reparo, tipo de mutágeno, etc (Goethem *et al*, 1997; Tafazoli e Volders, 1996).

O teste de micronúcleo é um método citogenético vastamente utilizado para células, e uma das vantagens desse teste é que ele pode ser aplicado em qualquer população de células em proliferação independentemente do cariótipo do animal utilizado. Em peixes, alguns testes que utilizam cromossomos podem ser complicados. Porém, o teste de micronúcleo pode ser facilmente utilizado em organismos aquáticos, pois o tamanho e o número de cromossomos não afetam seu desempenho (Hayashi et al, 1998).

Uma abordagem útil que vem sendo utilizado há bastante tempo na detecção de mutagenicidade em ambientes aquáticos é o tratamento *in vivo* e/ou exposição *in situ* de vários tipos de organismos como plantas, *Zea mays* (De Marini et al, 1982), *Vicia faba* (Rizzoni et al, 1995), *Allium cepa* (Rank e Nielsen, 1994) e *Tradescantia* spp. (Monarca et al, 1998) ou animais aquáticos como salamandras (Jaylet et al, 1986), poliquetos (Hutchinson et al, 1998) ou moluscos (Scarpato et al, 1990; Mersch e Beauvais, 1997; Bolognesi et al, 1999).

O teste de micronúcleo em eritrócitos periféricos de peixes é amplamente empregado em estudos com exposição *in situ* em ambientes aquáticos e em tratamentos *in vivo* em laboratórios. O teste de micronúcleo é uma ferramenta promissora no monitoramento de ambientes aquáticos, como reservatórios para destinados ao consumo humano (Buschini et al, 2004).

Apesar dos eritrócitos periféricos de peixes serem comumente utilizados em testes de micronúcleo para se avaliar a genotoxicidade de uma substância Hayashi e colaboradores (1998) verificaram que células da guelra apresentaram um resultado mais consistente em relação aos eritrócitos. O mesmo encontrado por Manna e Sadhukhan (1986) em tilápia (*Oreochromis mossambicus*).

A ocorrência mundial de florações de cianobactérias torna necessárias realizações de procedimentos para se avaliar o risco ambiental para monitorar os efeitos das microcistinas em peixes (Prieto et al, 2006).

## **1.7   TESTE DO COMETA**

Um teste de avaliação genotóxica utilizado é o ensaio do cometa (eletroforese em gel de células individuais), com uma ampla utilização para testar agentes genotóxicos de dejetos industriais, domésticos e agrícolas, indução de danos e

reparo no DNA, biomonitoramento de populações expostas, bem como em aplicações clínicas (White e Rasmussen, 1998; Hartmann *et al.*, 2003). As vantagens do ensaio do cometa incluem a sua simplicidade, rápida performance e sua alta sensibilidade para vários tipos de danos no DNA (Bücker *et al.*, 2003).

O teste do cometa (“alkaline single-cell gel electrophoresis assay”) é um sensível indicador de danos genéticos que pode detectar quebras no DNA. Esse teste tem sido aplicado em ambientes aquáticos utilizando organismos vertebrados ou invertebrados. Agências de países europeus propuseram o teste do cometa como um teste útil para ser utilizado na detecção da genotoxicidade de águas superficiais (Buschini *et al.*, 2004).

Ao contrário do teste de micronúcleo, o teste do cometa não é utilizado em pesquisas de campo até recentemente (Klobucar *et al.*, 2003). O teste do cometa possui vantagens pela aplicação em qualquer tecido de interesse, detecção de múltiplas classes de danos no DNA, e geração de dados a nível celular (Hartmann *et al.*, 2003). Porém a maior parte das aplicações foi feita em células de mamíferos, mas possui um potencial para a análise de danos no DNA em organismos aquáticos (Mitchelmore e Chipman, 1998 ; Cotelle e Ferard, 1999; Lee e Steinert, 2003).

O teste do cometa é um método visual simples para se detectar danos no DNA em células interfásicas (Figura 4). Essa técnica é especialmente sensível na detecção de quebras de fita simples de DNA, de sítios ácali lábeis e sítios de reparo de excisão em células individuais (Tafazoli e Volders, 1996). O teste do cometa é amplamente aplicado em vários campos: biologia radiológica, danos oxidativos, ligações cruzadas em fitas de DNA, genética toxicológica e apoptoses (Fairbairn *et al.*, 1995; Tafazoli e Volders, 1996).

Muitos pesquisadores mostraram que o teste do cometa é um método que pode ser utilizado para o monitoramento dos efeitos de agentes que causam danos no DNA em organismos de águas marinhas e doce (Pandurangi *et al.*, 1995; Nacci *et al.*, 1996; Mitchelmore e Chipman, 1998; Belpaeme *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1998; Frenzilli *et al.*, 2001).

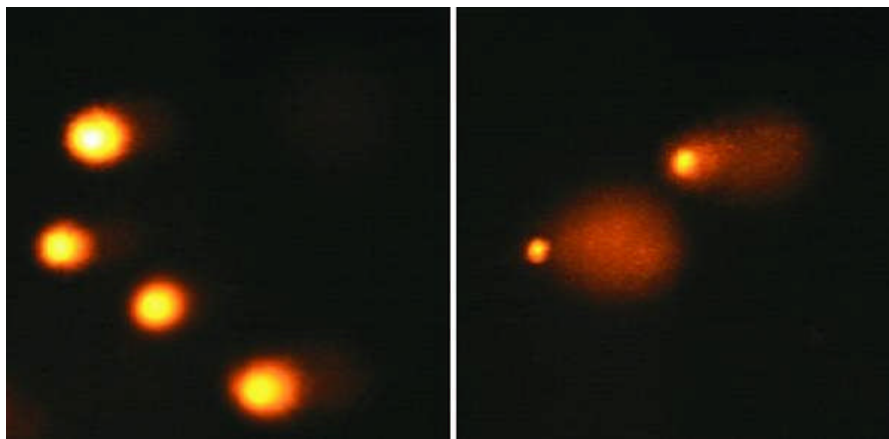


Figura 4 – Cometa em linfócitos humanos saudáveis (foto da esquerda) e expostos a pesticidas (foto da direita). ([http://www.kpk.gov.pl/centra\\_doskonalosci/coe/midi/data/471.html](http://www.kpk.gov.pl/centra_doskonalosci/coe/midi/data/471.html)).

Há algumas investigações comparativas entre o teste do cometa e o do micronúcleo para se determinar qual é o mais adequado para o monitoramento em organismos aquáticos (Belpaeme et al., 1996; Bombail et al., 2001; Dixon et al., 2002; Klobucar et al., 2003). Porém, esses estudos foram feitos sob condições com um determinado organismo, um tecido, um agente mutagênico e, por isso, foi específico para cada caso. Considerando-se que a adoção de um procedimento de teste padrão, levando a uma abordagem em futuros testes de ecogenotoxicidade, seriam recomendadas avaliações mais abrangentes e comparativas do teste do cometa (Kim e Hyun, 2006).

Alguns estudos utilizando a técnica do cometa como biomarcador em peixe demonstram efeitos genotóxicos, como danos no DNA em eritrócitos de *bullheads* (*Ameiurus nebulosus*) e carpa (*Cyprinus carpio*) que estão relacionados com níveis de contaminantes nos sedimentos de um lago na América do Norte (Pandurangi et al., 1995). Em outro estudo Devaux e colaboradores (1998) demonstraram que níveis de danos no DNA foram altos em eritrócitos de uma espécie de peixe (*Leuciscus cephalus*) amostrados em sítios poluídos de um rio francês (contaminado com PAHs, PCBs e metais pesados) quando comparados a uma área de referência.

A simplicidade e sensibilidade do ensaio do cometa fazem dele um sistema adequado de teste para biomonitoramento a níveis crônicos de exposição, podendo ser utilizado em inúmeras análises onde se podem avaliar células viáveis. Além das vantagens citadas e do relativo baixo custo, o teste do cometa difere de outros ensaios que detectam danos no DNA por requerer células viáveis, mas não em

divisão, permitindo, assim, sua aplicação a qualquer tipo de tecido dos quais células vivas possam ser obtidas (Bücker et al, 2006; Ribeiro *et al.*, 2003).

Porém, alguns estudos mostraram que o teste do cometa, quando utilizado como um *endpoint* às populações de campo para se medir efeitos genotóxicos, obteve resultados inconsistentes (Black et al, 1996; Bombail et al, 2001). Exposições laboratoriais a agentes genotóxicos aumentam as quebras no DNA, enquanto que em amostras de campo de organismos de áreas contaminadas não mostraram aumento no dano de DNA. Isso pode ocorrer devido aos rápidos processos de reparo dos danos no DNA, os quais não são revelados no teste (Thomas et al, 1999).

Em contraste, a quebra ou dano cromossomal, que é manifestado como uma alteração na morfologia nuclear, é uma mudança importante que não pode ser reparada pela célula, a qual só é removida do sangue ao final de sua vida celular, ou seja, o dano causado permanece por mais tempo, sendo mais fácil de ser detectado (Bombail et al, 2001).

As vantagens encontradas no teste do cometa são: a informação fornecida sobre os danos causados é encontrada em uma simples célula e os resultados não necessitam de divisão celular. Isso faz do teste do cometa uma técnica sensível e adequada para estudos ecotoxicológicos (Pandurangi et al., 1995). Apesar das vantagens do teste do cometa, ele apresenta certas desvantagens como: incapacidade de detectar danos genéticos como mutação gênica, dificuldade de estimar efeitos em longo prazo, apresenta uma variabilidade entre indivíduos tornando a interpretação não muito clara e a quantificação do número de quebras não é possível (Belpaeme et al, 1998).

Há uma série de estudos utilizando tecidos de guelra e fígado de espécies de peixes e tecidos da guelra e glândulas digestivas de espécies de molusco para verificar a ação genotóxica de compostos químicos com o teste do cometa, uma vez que o sangue ou hemolinfa demonstraram uma menor sensibilidade no cometa em relação a outros tecidos (Kim e Hyun, 2006; Jin et al., 2004; Coughlan et al, 2002).

O atual consenso geral do meio científico é que o teste do cometa é simples, rápido, sensível e efetivo em relação a custos. Porém, uma das maiores críticas dessa técnica é a que a ocorrência de quebras no DNA não pode ser relacionada com uma exposição específica, quando comparado, por exemplo, a formação de adutos de DNA que indica uma poluição específica. Todavia, a relativa simplicidade

da técnica do cometa, comparada a determinações de adutos de DNA que requerem técnicas de detecção mais sofisticadas, fazem desse teste uma ferramenta interessante para se determinar danos no DNA (Belpaeme et al, 1998).

Com o desenvolvimento do teste do cometa muitos protocolos foram desenvolvidos, principalmente, de modificações feitas a partir de dois métodos Singh et al. (1988) e Tice (1995). Conseqüentemente, as comparações feitas entre os estudos que utilizam podem ser comprometidos pela falta de uma padronização (Belpaeme et al, 1998). O teste do cometa é geralmente aplicado em eritrócitos periféricos de peixes, anfíbios e répteis, e em linfócitos do sangue periférico de mamíferos por serem facilmente amostrados e a dissociação celular não é necessária, entretanto há estudos que utilizaram brânquias e fígado. (Deventer, 1996 e Nacci et al, 1996).

Klaude et al (1996) argumentaram que para se atingir o objetivo no teste do cometa a pesquisa deve focar na influência de fatores naturais e considerar fatores artificiais na formulação de um protocolo padronizado. Não há nenhuma padronização no protocolo do cometa até o momento. Por isso, os controles devem ser padronizados previamente em cada experimento. Condições de lise, desnaturação, tempo e condições de eletroforese variam consideravelmente entre os artigos publicados e os laboratórios, o que resulta em vários protocolos diferentes (Belpaeme et al, 1998).

O teste do cometa possui um grande potencial na estimativa de danos no DNA em peixes, estes caracterizados por terem um cariótipo constituído de numerosos e pequenos cromossomos, porque o conhecimento do número de cromossomos e do ciclo celular não é necessário. A maioria dos estudos é feita em peixes de água doce como bullheads (*Ameiurus nebulosus*), carpas (*Cyprinus carpio*), truta marrom (*Salmo trutta fario*), zebra danio (*Brachydanio rerio*), truta arco-íris (*Onchorynchus mykiss*) e peixe zebra (*Danio rerio*) (Balpaeme et al, 1996; Pandrangi et al, 1995 e Devaux et al, 1997)

Buschini et al (2004) verificaram que o teste do cometa realizado em peixes de duas lagoas na Alemanha pode sofrer uma influência sazonal, sendo menos sensível em exposições longas (20 dias) e mais sensível em exposições de curta duração (3 horas). Em peixes, enzimas que metabolizam xenobióticos são conhecidas por serem fortemente moduladas em resposta a condições ambientais

como temperatura, stress, dieta, atividade reprodutiva e presença de poluentes (Huuskonen *et al*, 1995; Mitchelmore e Chipman, 1998).

Células do sangue isoladas de organismos tratados, utilizadas no teste do cometa, possuem grande efetividade em análises de laboratório o que apresenta um potencial para o monitoramento. Isso é interessante porque essas células proporcionam uma fonte não invasiva de material para o biomonitoramento. Em peixes, 97% das células sanguíneas são eritrócitos com 3% apenas de leucócitos (Mitchelmore e Chipman, 1998).

Pandrangi *et al.* (1995) demonstrou um aumento nos danos do DNA de células de bullhead (*A. nebulosus*) e de carpa (*C. carpio*) depois de uma exposição a ciclofosfamida. Devaux *et al.* (1997) também mediram o aumento das caudas de DNA com o cometa depois de exposições *in vitro* de hepatócitos a B[a]P e peróxido de hidrogênio. Tais estudos provam que o teste do cometa é, de fato, capaz de detectar danos no DNA causados por diferentes classes de mutágenos em peixes. A resposta, é claro, dependerá das condições experimentais, da espécie e do tipo celular utilizados, da substância testada e da duração da exposição (Belpaeme *et al*, 1998)

Recentemente, foi relatado que o aparecimento de apoptose pode fornecer imagens de células com caudas de mesmo tamanho como as das células com danos moderados. Assim, os resultados do teste do cometa não podem ser interpretados como indicador de genotoxicidade quando há um risco de apoptose (Choucroun *et al.* 2001)

## **1.8 APOPTOSE E NECROSE**

A apoptose foi primeiramente descrita por Kerr *et al.* (1972), como uma deleção controlada de células de uma população que pode ocorrer espontaneamente ou pode ser iniciada por estímulos externos. Essa forma de morte celular ocorre durante a embriogênese, em homeostase tecidual normal, e na maturação de células-T (Kerr *et al.*, 1972). Irradiação ultravioleta, choque térmico, retirada de fatores de crescimento, actinomicina D, e dexametazone podem induzir apoptose. As mudanças nas características morfológicas da apoptose são o condensamento do citoplasma e organelas, alterações na membrana celular,



hiperconvulsão das membranas nucleares, condensação da cromatina em diferentes partes completamente distintas entre si formadas por massas e fragmentos de DNA (McDermott et al, 1998)

Essas mudanças morfológicas são distintas das observadas na necrose, que podem ser caracterizadas por edema celular que é uma manifestação inicial e quase universal. As organelas se tornam distintas, especialmente o retículo endoplasmático e a mitocôndria que podem se romper. Mais tarde no processo os lisossomos incham e se rompem, a membrana celular torna-se permeável a moléculas grandes, ocorre a fragmentação da cromatina, a membrana nuclear e seu conteúdo dissolvem e a célula finalmente aparece como uma massa amórfica (McDermott et al, 1998).

Apoptose e necrose em células *in vivo* expostas a microcistina têm sido observadas em mamíferos (Dabholkar et al., 1987; Miura et al., 1989; Ito et al., 1997) e em peixes (Kotak et al., 1996; Tencalla e Dietrich, 1997; Fischer et al., 2000; Li et al., 2004). *In vitro*, hepatócitos isolados de ratos desenvolveram apoptose quando expostas a baixas concentrações de microcistina-LR (0,8-2 $\mu$ M) e necrose quando expostas a altas concentrações de microcistina-LR (25-50  $\mu$ M) (McDermott et al., 1998). Os resultados deste estudo e de anteriores sugerem que exposições *in vivo* e *in vitro* a microcistinas causam danos em hepatócitos de mamíferos e peixes com uma tendência de provocar apoptose em baixas concentrações de microcistina e necrose em altas concentrações.

Boe et al (1991) mostraram que a microcistina-LR, numa dose de 0,8  $\mu$ M por 3 horas, induziu fragmentação e corpos apoptóticos em culturas de hepatócitos de ratos, esses corpos apoptóticos foram caracterizados em parte por uma membrana nuclear convoluta, cromatina condensada e fragmentação nuclear. Mudanças nucleares compatíveis com apoptose também foram observadas por Khan et al. (1995) em células renais e fibroblastos tratadas com microcistina-LR em doses e tempos variados (10, 100, 200  $\mu$ M de 6 a 18 horas).

A exposição intraperitoneal com microcistina em peixes causa alterações histopatológicas, observadas em algumas espécies como carpa (Rabergh et al., 1991; Carbis et al., 1997), truta (Kotak et al., 1996) e tilápia (Molina et al., 2005). Alterações estas como necrose e degeneração epitelial no fígado, rim e brânquias.

## 2 OBJETIVOS

1. Determinar a concentração letal (CL50) e a dose letal (DL50) do extrato de floração de *Microcystis* spp contendo microcistina para *Oreochromis niloticus* e *Astianax bimaculatus*, através do teste de toxicidade.
2. Avaliar a genotoxicidade do extrato de floração de *Microcystis* spp contendo microcistina em eritrócitos de sangue periférico de *Oreochromis niloticus* e *Astianax bimaculatus*, através das análises das diferenças nas frequências de micronúcleos e através das avaliações dos índices de danos no DNA, estudados através do teste de eletroforese celular (ensaio do cometa).
3. Avaliar a toxicidade e genotoxicidade do extrato de floração de *Microcystis* spp contendo microcistina em eritrócitos de sangue periférico de *Oreochromis niloticus* e *Astianax bimaculatus*, através da contagem de células em necrose ou apoptose.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

#### 3.1.1 Obtenção e manutenção de animais

Os peixes das espécies *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo, Perciformes, Cichlidae, Figura 5) e *Astyanax bimaculatus* (Lambari, Lambari do Rabo Amarelo, Characiformes, Characidae, Figura 6) foram utilizados nos estudos e são de origem e histórico conhecidos, sendo fornecidos pela Estação de Piscicultura do Governo do Distrito Federal, onde várias espécies são cultivadas. Antes de serem entregues, os peixes passam por uma seleção de tamanho e são higienizados, para retirar possíveis parasitas ou doenças que possam prejudicar o andamento dos experimentos. É coletado um número suficiente para a realização do estudo, evitando-se um uso excessivo de indivíduos.



Figura 5 – Espécie *Oreochromis niloticus*, conhecida como Tilápia do Nilo ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)).

Primeiramente, os peixes provenientes da Estação de Piscicultura do GDF foram transferidos para o laboratório de Genética da Universidade de Brasília onde foram aclimatados durante uma semana em tanques de 400 litros, em água filtrada, desclorofilada com aeração e temperatura constante de 25° C. Os animais foram alimentados com ração própria para peixes. Foram feitas higienização dos tanques e renovação total ou parcial da água, após verificação dos níveis de amônia na água.



Figura 6 – Espécie *Astyanax bimaculatus*, conhecida, como lambari (www.fishbase.org).

A água de manutenção dos peixes no Laboratório de Genética provém da rede pública de abastecimento, porém ao entrar no laboratório é filtrada. Nos tanques essa água é desclorificada e aerada constantemente, a temperatura é controlada através de aquecedores, mantendo-se estável a  $25 \pm 2$  °C. O pH é avaliado constantemente, mantendo-se ao redor de 7,0, bem como os níveis de amônia.

Após o período de aclimação os peixes foram submetidos aleatoriamente a concentrações diferentes de microcistinas com o mesmo tempo de exposição de 72 horas.

Os testes com exposição *in vivo* foram realizados no próprio laboratório de Genética da Universidade de Brasília. Os animais foram mantidos em aquários de 40L cada, com dez a oito indivíduos por recipiente, com água filtrada, desclorofilada e com aeração constante, em temperatura de 24 a 27° C. Como os experimentos foram feitos até 72 horas, a água de cada recipiente não foi trocada, sendo os aquários vistoriados constantemente para que indivíduos mortos fossem retirados dos aquários para evitar a contaminação da água dos mesmos.

*Oreochromis* sp., originário da África, é um importante grupo comercial de peixe na América do Sul e está começando a ser introduzido na Europa. Além disso, eles são geralmente achados em áreas salobras em estuários em todo o mundo e responde rapidamente a alterações ambientais (Almeida et al., 2002).

O gênero *Astyanax* sp. possui uma ampla distribuição geográfica na América tropical e subtropical e pode até ser encontrado nos EUA e representa uma fonte significativa de comida para peixes em um nível maior na cadeia trófica, como *Hoplias malabaricus* (traíra) e *Salminus maxillosus* (dourado), entre outros peixes piscívoros que estão incluídos na dieta do ser humano (Godoy, 1975). A espécie utilizada no estudo pode ser considerada uma espécie forrageira de hábito alimentar onívora que se alimenta predominantemente de insetos (Esteves and Galetti, Jr., 1995), podendo atingir um tamanho de 10,9 cm e 42 g. Oliveira Ribeiro et al. (2000) utilizou a espécie *Astyanax bimaculatus* para verificar efeitos subcrônicos da tributirina, um biocida utilizado em tintas antivegetativas. É utilizada como isca na pesca esportiva, como petisco, como peixes ornamentais e como larvófagos no combate às larvas de mosquitos (Sato et al, 2006).

### **3.1.2 Caracterização das toxinas do extrato de floração**

O extrato foi cedido pelo laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília. O extrato foi obtido de uma floração no Lago Paranoá-DF ocorrida no dia 25 de junho de 2006. O material provindo da floração foi submetido a liofilização e depois a ultra-sonicação, rompendo as células das cianobactérias e, conseqüentemente, a eliminação das toxinas. Logo após, uma pequena alíquota foi retirada da amostra para ser submetida à HPLC (cromatografia líquida) para a caracterização da amostra. Depois da caracterização, o extrato foi mantido em geladeira ao abrigo da luz, para evitar a degradação das toxinas até o momento de seu uso nos testes.

Para a análise da toxina por cromatografia líquida, foi utilizado um sistema de alta eficiência com detecção por foto-iodo (PDA-HPLC) (Shimadzu série LC-10A), a amostra foi filtrada em filtro de polietileno GV Millex com 0,22 micra de poro e diâmetro de 3mm (Millipore) e coluna de fase reversa C<sub>18</sub> coluna Synergi 4µ Fusion-RP 80 (150 x 4,60mm; Phenomenex). A cromatografia foi realizada sob condições isocráticas com fase móvel de 20mM formiato de amônio, pH 5,0 e acetonitrila (7:3, v:v) por 20 minutos. O volume de injeção foi de 20 µl, fluxo de 1mL/min, detecção a 238 nm e o espectro de absorção de cada pico foi analisado entre 200-300nm.

O sal formiato de amônio foi escolhido em detrimento ao acetato de amônio devido ao primeiro ser mais volátil, o que facilitou as análises realizadas por meio de

espectrometria de massa, além de aquele ter apresentado uma melhor separação das microcistinas presentes no extrato bruto.

A identificação das toxinas produzidas pela floração de *Microcystis spp* foi realizada por comparação da fração cromatográfica com o padrão de microcistina-LR (SIGMA, CO), observando o tempo de retenção no sistema de cromatografia e ao índice de similaridade dos espectrogramas de microcistina na faixa de absorvância de 200 a 300nm.

As duas frações referentes as variantes de microcistina produzidas pela floração de *Microcystis spp* identificadas na análise por PDA-HPLC foram fragmentadas em sistema de espectrometria de massa – MALDI TOF/TOF.

Uma massa equivalente a 100 mg de cada amostra liofilizada foi dissolvida em água nanopura e misturada em uma solução saturada de uma matriz constituída por ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico na proporção de 1:3. Essa mistura foi depositada em uma placa do tipo Anchorchip com 600 mm e deixada secar a temperatura ambiente.

As fragmentações tiveram suas massas moleculares exatas determinadas utilizando um espectrômetro de massa MALDI TOF/TOF UltraFlex II (Bruker Daltonics, Alemanha) utilizando calibração externa sob modo de operação refletido e positivo. Os espectrogramas foram obtidos a uma freqüência de 50 Hz sendo resultado do acúmulo de 200 disparos de laser a uma intensidade de até 30% da configuração padrão.

A partir dos valores obtidos por meio das análises cromatográficas foi elaborada uma curva de calibração para microcistina. Os dados obtidos possibilitaram a montagem da equação da reta, bem como o valor de significância ( $r^2$ ). (Figura 7)

Com base nos valores adotados para a confecção da curva, tomou-se como limite de quantificação do método de análise o valor referente à metade do menor ponto da equação da reta, ou seja, o valor equivalente a 0,0624  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ .

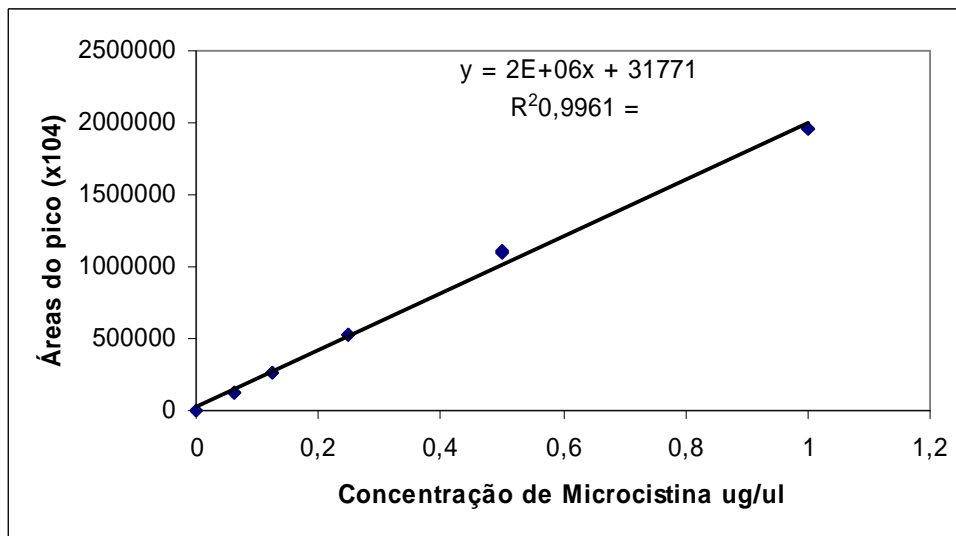


Figura 7 – Curva de calibração de microcistina em sistema de HPLC, relacionando a área do pico predominante e concentrações predefinidas. Equação de reta igual a  $y = 2E+06x + 31771$ , e  $r^2 = 0,9961$ . O eixo X representa os valores das concentrações, enquanto que o Y apresenta os valores das áreas dos picos obtidos por meio de PDA-HPLC.

A presença de microcistina-LR e -LA foi detectada pelo sistema HPLC em 300mL de extrato de floração de *Microcystis spp.* Com base na curva padrão construída, foi calculada a concentração de 29190µg de microcistina-LA e 12300µg de microcistina-LR. Com isso, um total de 138,3 µg/mL de microcistina no extrato utilizado. Vale ressaltar que pode ocorrer a presença de outras substâncias no extrato, uma vez que a metodologia apresentada é capaz de detectar apenas a microcistina e não outros tipos de compostos químicos.

### 3.1.3 Coleta de sangue

Para uma melhor utilização dos animais, evitando-se o uso excessivo de indivíduos, os experimentos foram realizados concomitantemente, isto é, as mesmas amostras de sangue de todos os peixes foram subdivididas para todos os testes. Os animais foram amostrados nos respectivos tempos de exposição e em seguida foram coletadas amostras de sangue periférico do plexo sanguíneo branquial, utilizando seringas tipo insulina (1 ml) descartáveis previamente heparinizadas.

### **3.2 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA EM *Oreochromis niloticus***

No primeiro experimento, dez peixes foram colocados em um aquário de vidro (40L) contendo uma alíquota do extrato de floração de *Microcystis spp* (concentração de 200µg/30ml de microcistina) totalizando uma concentração de 5 µg/L de microcistina, e um grupo controle, com dez animais, foram expostos apenas à água dos tanques. Este grupo foi utilizado como controle para os outros experimentos, visto que os animais foram tratados da mesma maneira e vieram do mesmo lote e do mesmo local. O segundo experimento seguiu a mesma metodologia do primeiro, porém com concentração maior (103,725 µg/L de microcistina).

Para verificar se há alteração na toxicidade por outra via de exposição da microcistina, no terceiro e quarto experimentos o extrato da floração de *Microcystis spp* foi introduzido nos animais via injeção intra-peritoneal com doses de 1,0ml (total de 138µg/100g de peso corpóreo de microcistina) e 0,5 ml (total de 69µg/100g de peso corpóreo de microcistina), respectivamente. Foram usados dez animais por grupo de tratamento, em aquários de 40L com tempo de exposição de 72 horas cada um.

Os cálculos da CL50 e da DL50 foram feitos através do método Trimed Spearman-Karber (Hamilton, 1977).

### **3.3 DETERMINAÇÃO DA GENOTOXICIDADE EM *Oreochromis niloticus***

Para a determinação da genotoxicidade três testes foram realizados utilizando-se o mesmo lote de sangue periférico coletado de cada indivíduo após tratamento com diferentes concentrações e via de exposição ao extrato de floração de *Microcystis spp*.

No primeiro experimento, dez peixes foram colocados em um aquário de vidro (40L) contendo uma alíquota do extrato (concentração de aproximadamente 200µg/30ml) totalizando uma concentração de 5 µg/L de microcistina, e um grupo controle, com dez animais, foram expostos apenas à água dos tanques. Este grupo foi utilizado como controle para os outros experimentos, visto que os animais foram tratados da mesma maneira e vieram do mesmo lote e do mesmo local. O segundo



experimento seguiu a mesma metodologia do primeiro, porém com concentração maior (103,725 µg/L de microcistina).

Para verificar se há alteração na genotoxicidade por outra via de exposição da microcistina, no terceiro e quarto experimentos o extrato foi introduzido nos animais via injeção intra-peritoneal com doses de 1,0 ml (total de 138µg/100g de peso corpóreo de microcistina) e 0,5 ml (69µg/100g de peso corpóreo de microcistina), respectivamente. Foram usados oito animais por grupo de tratamento, em aquários de 40L com tempo de exposição de 72 horas cada um.

Para se determinar a significância dos resultados obtidos nos métodos de avaliação da genotoxicidade, utilizou-se o método Mann-Whitney's U-teste ( $\alpha=0,05$ ).

### **3.3.1 Teste de micronúcleo:**

O teste de micronúcleo é um teste citogenético e revela as conseqüências de anomalias no fuso e quebras cromossomais e vem sendo aplicado em peixes (Oost et al, 2003).

O teste do micronúcleo em peixes é similar ao teste em mamíferos e foi adaptado para as características do organismo-teste baseado em protocolos descritos em outros experimentos realizados com peixes. O sangue periférico foi coletado com seringas heparinizadas em duas espécies diferentes *Oreochromis niloticus* e *Astianax bimaculatus*.

As lâminas de esfregaço foram feitas com, aproximadamente, uma gota de sangue (50 µL) de cada espécime e, por 24 horas, secaram em temperatura ambiente. Após secagem, foram fixadas em metanol por 15 minutos e coradas com laranja de acridina para serem analisadas em microscópio óptico de fluorescência (Axioskop 2 – Zeiss), na objetiva de 100x, onde foram contadas 3.000 células por animal.

O corante laranja de acridina identifica claramente o micronúcleo (Figura 8) e também distingue eritrócitos com RNA (imaturado) e eritrócitos não fluorescentes (maduro). Baseado no conhecimento que se tem sobre a cinética de formação de micronúcleos, efeitos agudos de substâncias tóxicas podem ser mais sensivelmente detectados em eritrócitos imaturos do que em maduros. Já para efeitos crônicos não é necessário distinguir os eritrócitos.

Segundo Fenech (2000) existe uma classificação a ser considerada para a realização da análise do micronúcleo. Desta maneira, o critério utilizado para identificar os eritrócitos micronucleados foi o seguinte:

1. O micronúcleo deve ser um terço menor que o núcleo principal;
2. Um micronúcleo não deve tocar no núcleo principal e;
3. Um micronúcleo não deve refringir, deve ter a mesma coloração e intensidade do núcleo principal.

As médias de micronúcleos obtidas em cada espécie foram comparadas entre si e analisadas estatisticamente pelo método não paramétrico Mann-Whitney's U-test ( $\alpha=0,05$ ).

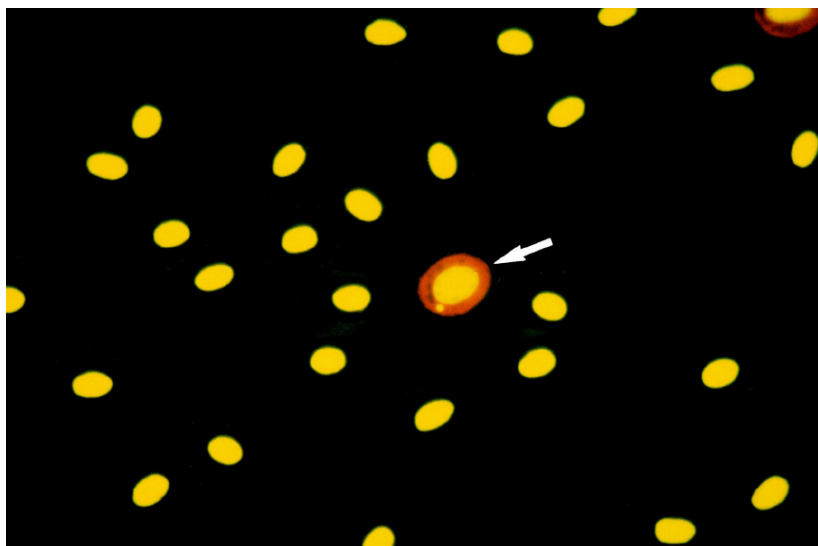


Figura 8– Eritrócitos de sangue periférico de carpa (*C. carpio*) corados com laranja de acridina. Seta: eritrócito micronucleado (Hayashi et al, 1998).

### 3.3.2 Teste do Cometa:

O teste foi realizado segundo a técnica descrita por Singh *et al.* (1988), com algumas modificações para adaptar a técnica para peixes.

A coleta de sangue periférico foi feita com seringas e agulhas heparinizadas e após a retirada do sangue, 2 gotas ou 100  $\mu\text{L}$  de sangue, aproximadamente, de cada peixe são transferidos para um ependorf contendo 500  $\mu\text{L}$  de soro bovino. Logo depois se tratou o sangue para que fosse feita uma eletroforese para se calcular os danos no DNA.

O protocolo com as adaptações da técnica para peixes segue abaixo:

1. lâminas de 26 x 76 mm serão imersas em um recipiente contendo agarose tipo II diluída em tampão PBS (NaCl 1,5 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1M; NaN<sub>3</sub> 0,02%, pH 7,2) a 1,5% e depois serão mantidas à temperatura ambiente, pelo período de 12 horas para secagem da agarose.

2. 120 µL de *Low melting point agarose* (LMP) a 0,5%, diluída em tampão PBS e aquecida a 37°C em banho-maria, serão rapidamente misturados a 10 µL da amostra de sangue (50 µL) diluído em um ependorf contendo 500 µL de soro HAM – F10. Imediatamente após este procedimento, 120 µL dessa mistura irão ser gotejados em uma lâmina preparada de acordo com o item anterior. Uma lamínula vai ser acoplada e o conjunto levado à geladeira. A partir dessa etapa, as lâminas devem ficar sempre protegidas da luz, a fim de prevenir novas quebras no DNA;

3. após 5 minutos na geladeira, a lamínula irá ser removida e as lâminas mergulhadas em um Koplín coberto com papel alumínio, contendo solução de lise final gelada (2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 1X de Triton X-100);

4. depois de pelo menos uma hora no tampão de lise a 4°C, as lâminas vão ser colocadas em uma cuba de eletroforese contendo tampão de eletroforese (300 mM NaOH, 1mM EDTA) fresco, pH 13. Após 30 minutos em repouso, proceder-se-á a eletroforese a 25 V e 300 mA por um período de 30 minutos;

5. após a eletroforese, lavar as lâminas com solução neutralizadora (0,4M Tris, pH 7,5). Esse processo se repetirá por três vezes em intervalos de 5 minutos;

6. o material neutralizado irá ser fixado em etanol 100% por 5 minutos e em seguida, deixado para secar em temperatura ambiente.

7. a coloração dos núcleos vai ser feita gotejando-se sobre as lâminas 30 µL de solução aquosa de Brometo de Etídio.

Efetou-se a contagem de 100 células por animal em teste cego com microscópio óptico de fluorescência Axioskop-II Carl Zeiss, filtro de 510-560 nm, barreira de filtro de 590 nm e aumento total de 400x .

Desta maneira, foi feita a caracterização do tamanho e integridade da cauda do cometa que representa os níveis de lesões no DNA, de acordo com o critério descrito por Singh *et al.*, 1988, que ocorrem nos eritrócitos do sangue periférico coletado das espécies utilizadas no estudo. Deste modo, classificaram-se as células em estágios de 0 a 4 conforme figura 9.

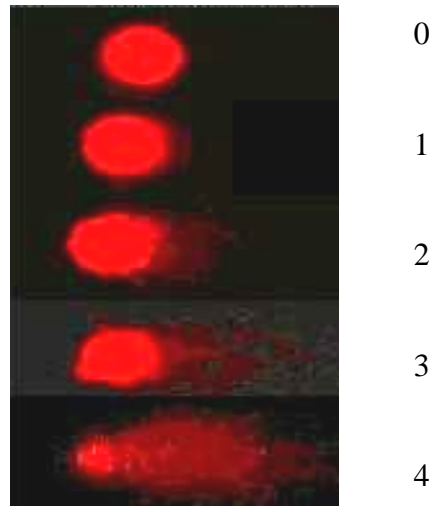


Figura 9- Classificação dos níveis de fragmentação do DNA segundo o grau de lesão.

Após a classificação dos níveis de fragmentação do DNA utilizou-se uma fórmula para quantificar o dano no DNA. Tal fórmula é dada por:

$$ID \text{ (ua)} = \frac{N1 + 2.N2 + 3.N3 + 4.N4}{S/100}$$

Onde,

ID = índice de danos no DNA;

ua = unidade arbitrária;

N1 – N4 = nucleóides nas classes 1 a 4 e

S = número de nucleóides analisados, incluindo os de classe 0.

Os índices de dano obtidos em cada espécie foram comparadas entre si e analisadas estatisticamente pelo método não paramétrico Mann-Whitney U- test ( $\alpha=0,05$ ).

### 3.3.3 Teste Necrose/Apoptose:

Após o período de exposição, com introdução do extrato de floração de *Microcystis spp* via intra-peritoneal, coletou-se sangue periférico com seringas heparinizadas, o qual foi transferido para um microtubo de 2 ml com soro fetal bovino a temperatura de 23°C. Uma alíquota de 15µl de suspensão celular foi transferida para uma lâmina e corada com 1µl de Laranja de Acridina e Brometo de Etídio (1:1). Após a coloração cobriu-se com uma lamínula para a identificação de células viáveis (coloração verde), em apoptose e em necrose (coloração vermelha).

A contagem foi realizada em microscópio óptico de fluorescência Axioskop 2 Zeiss com objetiva de 100x, onde foram contabilizadas, quando possível, 500 células por animal. Para verificar a significância dos resultados, utilizou-se o teste t ( $p < 0,05$ ) comparando-se o controle negativo com os tratamentos realizados.

### **3.4 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA EM *Astyanax bimaculatus***

No primeiro e segundo experimentos, dez peixes foram colocados em um aquário de vidro (40L) contendo o extrato de floração de *Microcystis spp* com concentração de 103,725  $\mu\text{g/L}$  de microcistina e um grupo controle, com dez animais que foram expostos apenas à água dos tanques. Este grupo foi utilizado como controle para os outros experimentos, visto que os animais foram tratados da mesma maneira e vieram do mesmo lote e do mesmo local. O segundo experimento seguiu a mesma metodologia do primeiro, com 10 peixes e um tempo de exposição de 72 horas a uma concentração de 414,9 $\mu\text{g/L}$  de microcistina.

Para verificar se há alteração na toxicidade por outra via de exposição da microcistina, no terceiro, quarto e quinto experimentos o extrato foi introduzido nos animais via injeção intra-peritoneal com doses de 0,5 ml (542 $\mu\text{g}/100\text{g}$  de peso corpóreo de microcistina), 0,3 ml (368,8 $\mu\text{g}/100\text{g}$  de peso corpóreo de microcistina) e 0,2 ml (245,86 $\mu\text{g}/100\text{g}$  de peso corpóreo de microcistina), respectivamente. Foram usados dez animais por grupo de tratamento, em aquários de 40L com tempo de exposição de 72 horas cada um.

Os cálculos da CL50 e da DL50 foram feitos através do método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton, 1977).

### **3.5 DETERMINAÇÃO DA GENOTOXICIDADE EM *Astyanax bimaculatus***

Para a determinação da genotoxicidade três testes foram realizados utilizando-se o mesmo lote de sangue periférico coletado de cada indivíduo após tratamento com diferentes concentrações e via de exposição ao extrato de floração de *Microcystis spp*.

No primeiro experimento, dez peixes foram colocados em um aquário de vidro (40L) contendo uma alíquota do extrato com concentração de 103,725  $\mu\text{g/L}$  de

microcistina, e um grupo controle, com dez animais, foram expostos apenas à água dos tanques. Este grupo foi utilizado como controle para os outros experimentos, visto que os animais foram tratados da mesma maneira e vieram do mesmo lote e do mesmo local. O segundo experimento seguiu a mesma metodologia do primeiro, porém com um 8 peixes e um tempo de exposição de 96 horas a uma concentração de 414,9 µg/L de microcistina.

Para verificar se há alteração na genotoxicidade por outra via de exposição da microcistina, no terceiro, quarto e quinto experimentos o extrato foi introduzido nos animais via injeção intra-peritoneal com doses de 0,3 ml (368,8µg/100g de peso corpóreo de microcistina) e 0,2 ml (245,86µg/100g de peso corpóreo de microcistina), respectivamente. Foram usados oito animais por grupo de tratamento, em aquários de 40L com tempo de exposição de 72 horas cada um.

Os métodos de avaliação de genotoxicidade com sangue periférico de *A. bimaculatus* foram os mesmos utilizados para *O. niloticus* sem nenhuma modificação na metodologia.

### **3.5.1 Necrose Versus Apoptose:**

Após o período de exposição, com introdução do extrato de floração de *Microcystis spp* via intra-peritoneal, coletou-se sangue periférico com seringas heparinizadas, o qual foi transferido para um microtubo de 2 ml com soro fetal bovino a temperatura de 23°C. Uma alíquota de 15µl de suspensão celular foi transferida para uma lâmina e corada com 1µl de Laranja de Acridina e Brometo de Etídio (1:1). Após a coloração cobriu-se com uma lamínula para a identificação de células viáveis (coloração verde), em apoptose e em necrose (coloração vermelha).

A contagem foi realizada em microscópio óptico de fluorescência Axioskop 2 Zeiss com objetiva de 100x, onde foram contabilizadas, quando possível, 500 células por animal. Para verificar a significância dos resultados, utilizou-se o teste t ( $p < 0,05$ ) comparando-se o controle negativo com os tratamentos realizados.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 TESTE DE CONCENTRAÇÃO LETAL (CL50) E DOSE LETAL (DL50)

Nos testes realizados com *O. niloticus* nenhuma morte foi observada nas duas vias de exposição. Já com *A. bimaculatus* 6 peixes de um total de 10 morreram em 24 horas quando o extrato contendo microcistina foi introduzido via i.p. com uma dose de 542µg/100g de microcistina. Além disso, nas doses de 368,8µg/100g de microcistina e 245,86µg/100g de microcistina via i.p. duas mortes em dez peixes foram observadas em cada teste.

O cálculo da toxicidade foi feito através do método Trimed Spearman-Kärber (Hamilton, 1977) sendo a CL50 (72h) maior que 103,725 µg/L de microcistina, uma vez que para todas as concentrações testadas não houve mortalidade de *O. niloticus*. O mesmo pode-se dizer para a DL50 (72h) sendo maior que 138 µg/100g de microcistina.

Para *A. bimaculatus* a CL50 (72h) calculada foi de 242,81 com intervalo de confiança de 152,74 a 386,00 µg/L de microcistina e a DL50 (72h) igual a 491,9 com intervalo de confiança de 385,8 a 627,3 µg/100g de microcistina.

### 4.2 TESTE DO MICRONÚCLEO

A maior média de micronúcleos observada em *O. niloticus* foi através de exposição corpórea à concentração de 103,725µg/L de microcistina com média de micronúcleo de  $7,1 \pm 6,19$ . Tal média apresentou uma grande disparidade em relação às outras concentrações que foram de  $2,3 \pm 1,89$  de micronúcleo para 5 µg/L de microcistina via exposição corpórea e de  $3 \pm 2,93$  e  $2,5 \pm 1,77$  para 138µg/100g e 69µg/100g de microcistina, respectivamente. Sendo a primeira e a terceira com valores próximos ao do controle (Tabela 2). Um eritrócito contendo micronúcleo pode ser observado na figura 10.

Em *A. bimaculatus* a maior média notada foi na concentração 368,8µg/100g de microcistina expostos via i.p. com valor de  $3,5 \pm 2,62$ , seguida pela média da concentração 103,725µg/L de microcistina com  $2,9 \pm 1,85$  e pela média da concentração 245,86µg/100g de microcistina via i.p. com  $2,5 \pm 1,41$  (Tabela 3).

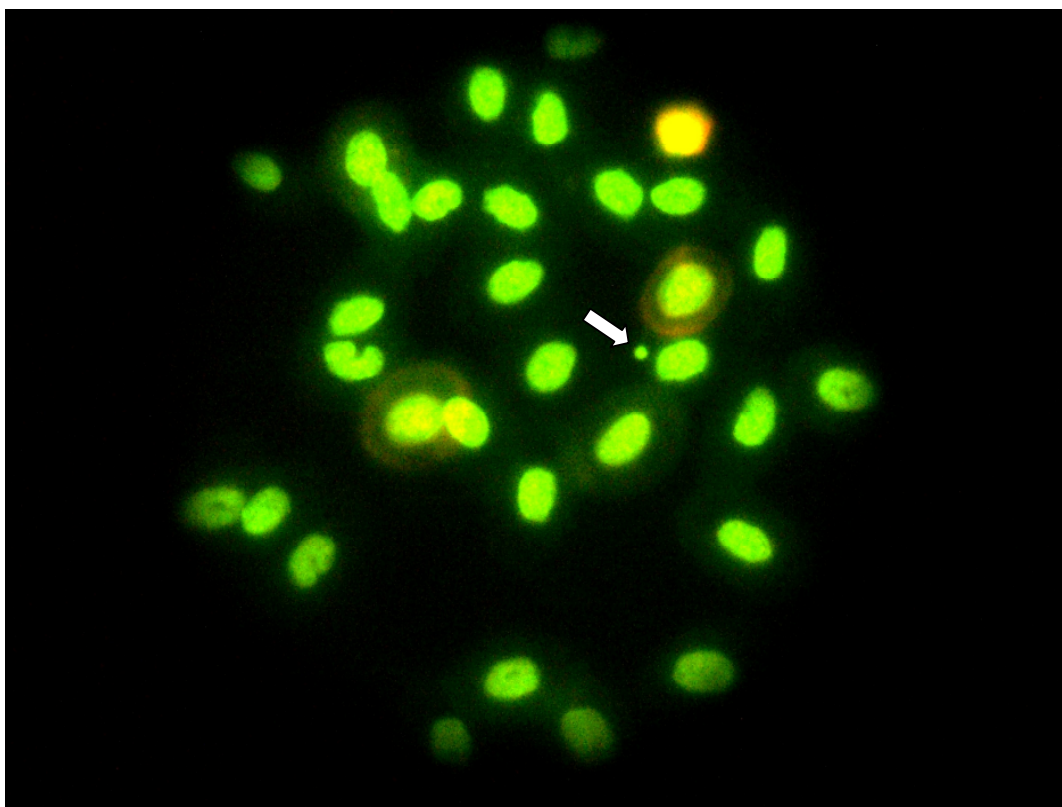


Figura 10 – Eritrócitos de *O. niloticus* corados com laranja de acridina. Seta: micronúcleo.

Tabela 2– Médias e desvios padrões dos micronúcleos (MN) encontrados em tilápia (*Oreochromis niloticus*) tratadas por dois tipos de exposição com quatro concentrações diferentes.

Tratamento	Via de Exposição	MN (Média ± D.P.)	P Mann-Whitney U test
Controle	X	2,5±2,72	
5 µg/L	Exposição Corpórea	2,3±1,89	0,788
103,725 µg/L	Exposição Corpórea	7,1±6,19	0,040*
138µg/100g de peso	i.p.	3±2,93	0,620
69µg/100g de peso	i.p.	2,5±1,77	0,652

\* P < 0,05, significativo



Tabela 3– Médias e desvios padrões dos índices de danos no DNA (I.D.) calculados nos eritrócitos de lambari (*Astyanax bimaculatus*) tratados por dois tipos de exposição com três concentrações diferentes.

Tratamento	Via de Exposição	MN (Média ± D.P.)	P Mann-Whitney U test
Controle	X	0,6±0,7	
103,725 µg/L	Exposição Corpórea	2,9±1,85	0,002*
368,8µg/100g de peso	i.p.	3,5±2,62	0,024*
245,86µg/100g de peso	i.p.	2,5±1,41	0,008*

\*P < 0,05, significativo

Os resultados do teste de micronúcleo mostraram que há diferenças estatisticamente significativas, a nível de 5%, entre as concentrações utilizadas nos experimentos via exposição corpórea, bem como nos experimentos com administração do extrato via i.p.

Em *O. niloticus* o teste de micronúcleo mostrou resultado significativo entre as médias de micronúcleos apenas na concentração de 103,725µg/L de microcistina via exposição corpórea quando relacionado ao controle ( $p < 0,05$ ). Na concentração de 5 µg/L de microcistina, pela mesma via de exposição, o resultado não foi significativo ( $p > 0,05$ ) em relação ao controle. E na via i.p. as duas concentrações não apresentaram diferenças significativas quando comparadas com o controle ( $p > 0,05$ ).

Em *A. bimaculatus* as médias dos micronúcleos nas três concentrações usadas com tal espécie obtiveram resultados significativos ( $p < 0,05$ ) quando comparadas ao controle, sendo a concentração 103,725µg/L de microcistina via exposição corpórea mais significativa ( $p = 0,002$ ). Em relação à via de exposição i.p., a dose com maior média foi a dose de concentração mais elevada ( $p = 0,024$ ), porém a de dose 245,86µg/100g de microcistina, menor, foi a mais significativa em relação ao controle ( $p = 0,008$ ).

#### 4.3 TESTE DO COMETA

Os resultados das análises com sangue periférico das espécies *Oreochromis niloticus* e *Astyanax bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de

microcistina e seus controles estão demonstrados nas tabelas do anexo 2. Nas tabelas 4 e 5, estão representados as médias e desvios padrões dos índices de danos encontrados no teste do cometa. Nas figuras 11 e 12 podem-se observar os eritrócitos de *O. niloticus* e *A. bimaculatus*.

Tabela 4 – Médias e desvios padrões dos índices de danos no DNA (I.D.) calculados nos eritrócitos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) tratadas por dois tipos de exposição com quatro concentrações diferentes.

<b>Tratamento</b>	<b>Via de Exposição</b>	<b>I.D. (Média ± D.P.)</b>	<b>P Mann-Whitney U test</b>
Controle	--	18,26± 6,23	
5 µg/L	Exposição Corpórea	32,56±17,68	0,0500
103,725 µg/L	Exposição Corpórea	59,20 ± 22,76	0,0002*
138µg/100g de peso	i.p.	149,23 ± 30,45	0,0004*
69µg/100g de peso	i.p.	190,59 ± 13,41	0,0004*

\* P < 0,05, significativo

Tabela 5– Médias e desvios padrões dos índices de danos no DNA (I.D.) calculados nos eritrócitos de lambari (*Astyanax bimaculatus*) tratados por dois tipos de exposição com três concentrações diferentes.

<b>Tratamento</b>	<b>Via de Exposição</b>	<b>I.D. (Média ± D.P.)</b>	<b>P Mann-Whitney U test</b>
Controle		30,57 ± 16,03	
103,725µg/L	Exposição Corpórea	205,30 ± 38,41	0,0004*
368,8µg/100g de peso	i.p.	122,27 ± 26,16	0,0012*
245,86µg/100g de peso	i.p.	70,13 ± 29,29	0,0046*

\* P < 0,05, significativo

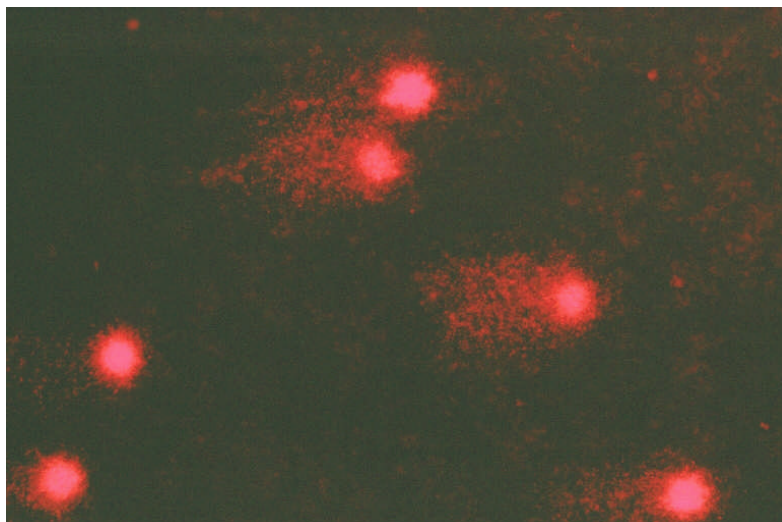


Figura 11 – Cometa em eritrócitos de sangue periférico de *O. niloticus* tratados com extrato de floração de *Microcystis spp* contendo microcistina.

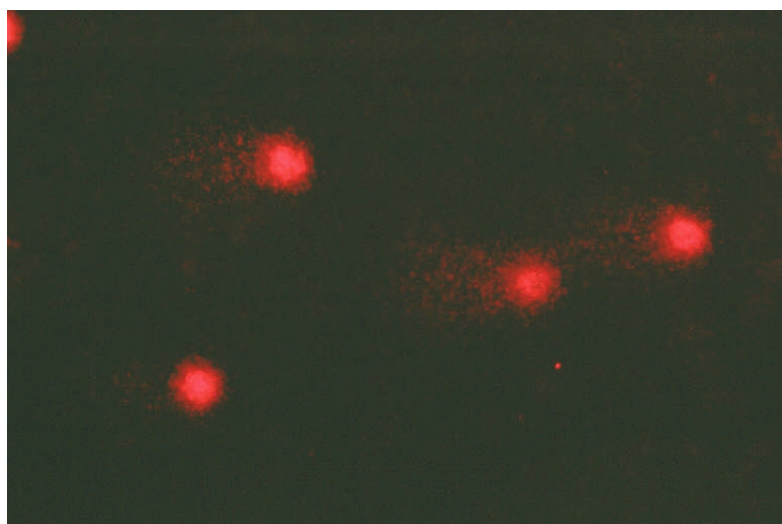


Figura 12 - Cometa em eritrócitos de sangue periférico de *A. bimaculatus* tratados com extrato de floração de *Microcystis spp* contendo microcistina.

Através dos índices de danos, utilizou-se o método Mann-Whitney's U-test considerando o nível de significância de 5%, para verificar a diferença entre os danos no DNA para as duas espécies estudadas. Os resultados demonstraram, tanto para *O. niloticus* como para *A. bimaculatus*, que em ambas as vias de exposição e concentrações mais elevadas, observaram-se valores significativos ( $p < 0,05$ ) quando relacionados aos respectivos controles.

Em *O. niloticus*, pode-se observar um aumento na média do índice de danos a partir do aumento na concentração na via de exposição corpórea de  $32,56 \pm 17,68$

para  $59,20 \pm 22,76$ , estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ). Já na via i.p. a média de dano maior foi na concentração mais baixa com um valor de  $190,59 \pm 13,41$ , estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

Em *A. bimaculatus* a média na exposição corpórea foi maior quando comparada em relação às outras concentrações via i.p. com valor de  $205,30 \pm 38,41$  ( $p < 0,05$ ). Na via i.p. observou-se uma relação dose-efeito, isto é, na dose maior a média de dano foi maior com valor de  $122,27 \pm 26,16$ , e na dose menor a média foi de  $70,13 \pm 29,2$ , ambos estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4 NECROSE VERSUS APOPTOSE

No teste de necrose versus apoptose um aumento na frequência de células em necrose foi observado no tratamento de 1,0 ml via i.p. ( $138\mu\text{g}/100\text{g}$  de microcistina), enquanto que a frequência maior de células em apoptose foi no tratamento de 0,5 ml via i.p. ( $69\mu\text{g}/100\text{g}$  de microcistina) (Tabela 6, teste-t  $P < 0,05$ ). As células em necrose e apoptose podem ser observadas nas figuras 13, 14 e 15.

Tabela 6 – Porcentagem de viabilidade, necrose e apoptose em eritrócitos de sangue periférico de *Oreochromis niloticus*.

Dose	Viáveis	Necrose	Apoptose	% Viabilidade	% Necrose	% Apoptose
Controle	$473 \pm 38,2$	$20,75 \pm 34$	$4,625 \pm 3,7$	94,9	4,2	0,9
0,5 ml	$441,4 \pm 88,5$	$58,75 \pm 88,8$	$12,5 \pm 6,0$	86,1	11,5	2,4*
1,0 ml	$312,5 \pm 123,5$	$175 \pm 135,7$	$5,625 \pm 2,8$	63,4	35,5*	1,1

\* $P < 0,05$ , significativo

Para *A. bimaculatus* um aumento na frequência de células em necrose foi observado no tratamento de 0,3 ml via i.p. ( $368,8\mu\text{g}/100\text{g}$  de microcistina), enquanto que a frequência maior de células apoptóticas foi em ambos tratamentos ( $368,8\mu\text{g}/100\text{g}$  e  $245,86\mu\text{g}/100\text{g}$  de microcistina) (Tabela 7, teste-t  $P < 0,05$ ).

Tabela 7 – Porcentagem de viabilidade, necrose e apoptose em eritrócitos de sangue periférico de *Astyanax bimaculatus*.

Dose	Viáveis	Necrose	Apoptose	% Viabilidade	% Necrose	% Apoptose
Controle	473,9 ± 29,3	20,9 ± 28,9	5,3 ± 3,6	94,8	4,2	1,1
0,2 ml	266,1 ± 155	18,4 ± 15,6	16,6 ± 9,9	87,4	6,0	5,5*
0,3 ml	79,1 ± 10	15,6 ± 9,1	5,4 ± 1,6	79,1	15,6*	5,4*

\*P<0,05, significativo

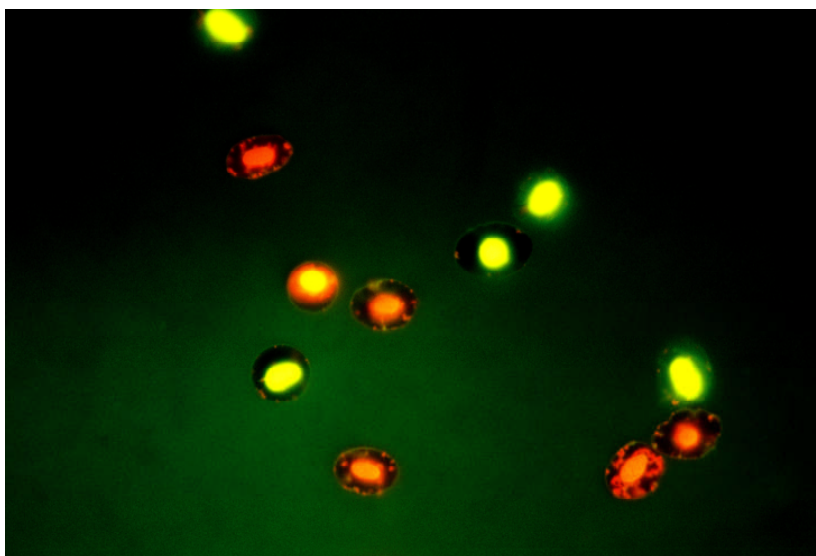


Figura 13 – Eritrócitos de *O. niloticus* viáveis (coloração verde) e em necrose (coloração vermelha) tratados com extrato de floração de *Microcystis spp*

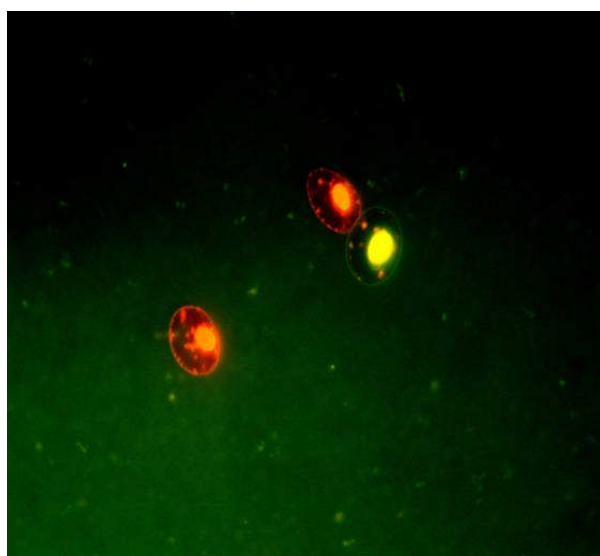


Figura 14 - Eritrócitos de *O. niloticus* viáveis (coloração verde) e em necrose (coloração vermelha) tratados com extrato de floração de *Microcystis spp*.

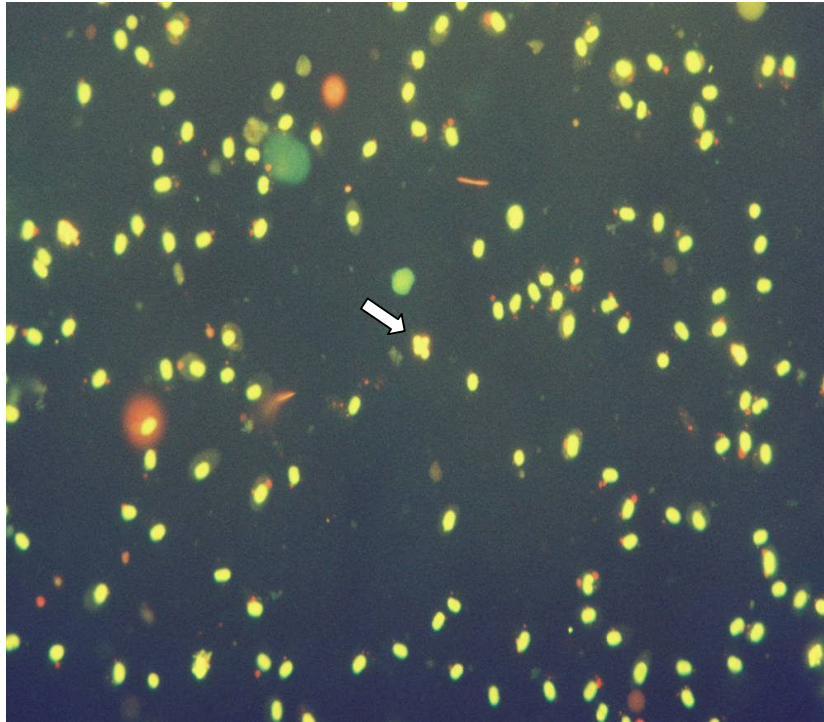


Figura 15 – Eritrócio de *O. niloticus* em apoptose (seta) tratado com extrato de floração de *Microcystis spp.*

## 5 DISCUSSÃO

As microcistinas, assim como as nodularinas, possuem grande variação e podem ser encontradas em florações que ocorrem em água doce e em água salgada, sendo produzidas por espécies dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Nostoc* e *Anabaenopsis* (Carmichael et al, 1988; Namikoshi et al, 1992; Namikoshi et al, 1990; Meriluoto et al, 1989).

A necessidade do estabelecimento de uma estratégia de gestão de risco para mitigar problemas relacionados às cianotoxinas em águas potáveis e de recreação é preocupação de muitos governos. O que torna lento o desenvolvimento dessa estratégia é a falta de reconhecimento dos riscos apresentados à saúde. Em países como o Brasil, a falta de conhecimento científico e técnico e de instalações adequadas agrava a situação. Já em outros países, estratégias de gestão de risco para populações e toxinas de cianobactérias só foram concebidas e aplicadas após incidentes associados com tais fatos, afetando animais e humanos, terem ocorrido. Experiências de vários países como Brasil, Austrália, Reino Unido e Estados Unidos têm demonstrado a importância de planos de prontidão e contingência para incluir medidas reativas e pró-ativas (Codd et al, 2005).

Mas a gestão de risco efetiva para o controle de cianobactérias requer a participação de peritos de diferentes áreas como biologia, química, toxicologia, medicina, saúde pública, engenharia, e das partes interessadas, por exemplo, donos de corpos d'água, fornecedores de água, agências ambientais e administradores de terras, bem como a sociedade (Codd et al, 2005).

### 5.1 TOXICIDADE DA MICROCISTINA

A CL 50 e DL50 para a *O. niloticus* não foram encontradas, com isso seus valores foram estimados como sendo maiores aos limites testados. Assim como ocorreu no estudo feito por Prieto et al (2006) nenhuma morte em tilápias (*Oreochromis* sp.) foi observada com doses de 500 µg/kg via i.p. de microcistina-LR e -RR, porém Rabergh et al (1991) acharam valores de DL50 de microcistina-LR em carpa (*Cyprinus carpio*) entre 300 e 550 µg/kg depois de 7 dias.

Andersen et al (1993) também relataram algumas mortalidades em salmões (*Salmo salar*) injetados i.p. três vezes com microcistina-LR a 555 µg/kg/injeção. Em truta arco-íris a DL50 sugerida de microcistina-LR está entre 400 e 1000 µg/kg (Kotak et al., 1996). Em nosso estudo a CL50 e a DL50 sugeridas para *A. bimaculatus* são de 242,81 com intervalo de confiança de 152,74 a 386,00 µg/L e 491,9 com intervalo de confiança de 385,8 a 627,3 µg/100g de peso corpóreo, respectivamente. Portanto, podem ocorrer diferenças consideráveis na susceptibilidade à microcistina-LR entre espécies de peixes (Kotak et al., 1996; Fisher e Dietrich, 2000). Além disso, o estado nutricional e fisiológico do peixe pode influenciar a toxicidade das cianotoxinas (Rabergh et al., 1991).

Outros estudos evidenciaram que a toxicidade de florações de cianobactérias, em especial de *M. aeruginosa*, na Lagoa dos Patos nas últimas 2 décadas, registraram doses letais (DL50 - 24h) que variaram entre 22 e 250 mg/kg em testes com camundongos (Yunes et al. 1996b), enquanto que em bioensaios com juvenis do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*), um dos recursos econômicos mais valiosos da pesca na região, a concentração letal (CL50-24h) foi de 2,96 mg/mL (Minillo et al, 2000).

A maioria das pesquisas relacionadas às microcistinas foca na toxicidade aguda em mamíferos, particularmente com a microcistina-LR. Apesar dos peixes poderem ser expostos a cianotoxina por imersão ou oralmente – na verdade as cianobactérias são importantes na dieta de muitos ciclídeos e ciprinídeos – eles parecem ter uma menor sensibilidade em relação aos mamíferos. Os valores de DL50 aguda são, tipicamente, maiores que 500 µg/kg para peixes e para mamíferos por volta de 50 µg/kg. (Zurawell et al., 2005). Porém para *A. bimaculatus*, os resultados ficaram mais próximos aos de camundongos do que os apresentados para peixes pelo autor.

Normalmente, os efeitos da administração oral são aproximadamente 10 vezes menores que os da aplicação i.p. (Carbis et al., 1996). Zao et al (2006) verificaram um consumo de microcistina pela tilápia de 1500-6000µg/kg de peso corpóreo, o equivalente a 150-600µg /kg de peso corpóreo injetado via i.p., o que não afetou o crescimento nem a taxa de alimentação dessa espécie, corroborando os resultados obtidos em nossos estudos, pois não ocorreu nenhuma morte durante o experimento. Já em uma espécie de carpa (*Carassius auratus gibelio*) uma alta mortalidade ocorreu quando os peixes foram alimentados com ração contendo



baixas doses de microcistina (1.02–10.76 µg/kg de peso corpóreo) (Zhao et al., 2005), sendo o resultado parecido com o encontrado no estudo para *A. bimaculatus* (385,8 a 627,3 µg/100g).

Xie e colaboradores (2004) verificaram que as diferentes espécies de peixes podem responder diferentemente às microcistinas. Tais diferenças podem estar relacionadas à desintoxicações diferenciadas entre as espécies de peixes, sendo as fitoplanctívoras, como as carpas prateadas, mais tolerantes a doses mais altas que outros peixes a partir de um ponto de vista evolucionário. Tais resultados podem sugerir que a tilápia do Nilo é mais tolerante a microcistinas que algumas espécies, como o lambari. Sendo assim, espécies de peixes como as tilápias e carpas podem ser utilizadas no controle de florações de cianobactérias.

Por outro lado, estudos verificaram que a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), um peixe predador, é menos sensível do que a carpa comum (*Cyprinus carpio*), um peixe onívoro, quando células de *Microcystis* foram administradas oralmente. Comparada à truta, o processo de digestão mais longo e intenso da carpa pode ter levado a uma absorção, pelas células epiteliais do intestino, de uma maior quantidade de microcistina (Fischer e Dietrich, 2000; Fischer et al., 2000). Os resultados obtidos e dados encontrados na literatura indicam que o *A. bimaculatus* é sensível ao extrato de floração de *Microcystis* spp, podendo ser utilizada como bioindicador de sistemas aquáticos sujeitos a florações de cianobactérias.

## **5.2 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DA MICROCISTINA**

É interessante se avaliar a correlação entre a extensão da quebra do DNA mensurada em células individuais pelo teste do cometa e pela frequência de micronúcleos em uma mesma condição experimental; esta comparação permitirá estimar uma quantidade de quebras no DNA expressas dentro de mutações cromossômicas ou genômicas (He et al, 2000). Alguns estudos desse tipo já foram realizados (Goethem et al, 1997; Tafazoli e Volders, 1996).

### **5.2.1 Teste do Micronúcleo**

Entre as técnicas para se detectar efeitos genéticos e genotóxicos, o teste de micronúcleo é muitas vezes usado pela conveniência e facilidade na sua aplicação,

em particular nos estudos genotoxicológicos utilizando peixes como bioindicadores. O teste de micronúcleo é muitas vezes aplicado em conjunto com o teste do cometa, que é capaz de detectar danos no DNA, como quebra simples, sítios álcali lábeis e eventos incompletos de reparo de excisão (Gedik et al., 1992).

Os resultados mostraram que em *O. niloticus* apenas a exposição via corpórea apresentou resultados significativos em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ). Já em *A. bimaculatus* todas as exposições apresentaram diferença estatística, sendo a corpórea a mais significativa ( $p = 0,002$ ). Isso ocorre pela diferença entre as espécies em relação à genotoxicidade, tais diferenças podem estar relacionadas à desintoxicações diferenciadas entre as espécies de peixes (Xie et al, 2004).

Um ponto interessante observado no estudo é que a menor dose aplicada em *A. bimaculatus* se mostrou mais significativa em relação à dose maior. Provavelmente, a dose mais alta foi, por demais, citotóxica comprometendo as divisões celulares, que evidenciam os micronúcleos.

Matsumoto e Cólus (2000) utilizaram o lambari e o teste do micronúcleo para verificar a genotoxicidade da ciclofosfamida e do sulfato de vinblastina, para serem utilizadas como controles positivos. A ciclofosfamida mostrou ser melhor agente mutagênico para ser usado como um controle positivo para *A. bimaculatus*. Tal resultado é interessante, pois mostra, assim como nosso estudo, que a espécie nativa *A. bimaculatus* pode ser utilizada em estudos toxicológicos.

### **5.2.2 Teste do Cometa**

O teste do cometa revelou que a microcistina causou danos ao DNA para as duas espécies. Todas as concentrações mostraram diferenças significativas em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ). Peixes expostos a microcistina por diferentes vias (dermatológica, por inalação, oral e intravenosa) podem iniciar mecanismos de desintoxicação que os ajuda a sobreviver sob stress tóxico das cianobactérias (Pflugmacher et al., 1998; Best et al., 2002).

Os resultados obtidos vão de encontro ao estudo realizado por Lakshmana Rao et al (1998) que concluíram que a microcistina induz danos ao DNA tanto qualitativamente quanto quantitativamente e sugerem que danos causados por microcistina podem ser uma consequência de degradação endonucleótica do DNA

associada com a citotoxicidade, e não por uma interação direta com componentes do DNA.

Em *O. niloticus* a concentração mais significativa estatisticamente foi a de 103,725µg/L ( $p=0,0002$ ) via exposição corpórea. Tal fato não condiz com os relatados por outros estudos onde a via i.p. é mais genotóxica em relação à oral (Carbis et al., 1996). Em relação à via de exposição i.p. a média maior de índice de danos no DNA ocorreu na menor concentração, isso porque em menores doses a microcistina pode causar apoptose e células apoptóticas tardias são prontamente identificadas no teste do cometa como células com caudas difusas e cabeças pequenas. A microcistina-LR é um potente indutor de apoptose e independentemente da iniciação do evento, a fragmentação do DNA genômico é um dos *end points* de todos os percursos apoptóticos. Essa clivagem dupla do DNA poderia assemelhar-se às quebras no DNA induzidas por compostos genotóxicos (Nagata et al, 2003).

Tal fato também pode ser explicado pela diferença entre os próprios indivíduos utilizados no estudo. Os principais fatores envolvidos nas diferenças entre subgrupos de uma mesma espécie são características genéticas, idade, sexo e raça (Chasin e Azevedo, 2004). Apesar de todos os indivíduos terem sido selecionados de forma a reduzir tais fatores.

Em *A. bimaculatus* as médias dos índices de danos apresentaram uma relação com a concentração administrada. A exposição corpórea foi a mais significativa ( $p=0,0004$ ) em relação com o controle negativo, contrariando o resultado achado por Carbis e colaboradores (1996), acima citado. Já na exposição via i.p. ocorreu uma relação entre a dose administrada e a média de danos. A dose maior foi mais significativa que a dose menor.

Um resultado parecido foi o de Lankoff et al (2004) que utilizaram o teste do cometa em linfócitos humanos. Eles concluíram que a microcistina-LR induz danos ao DNA em linfócitos humanos, porém esses danos podem estar relacionados ao estágio inicial de apoptose devido à citotoxicidade e não à genotoxicidade. É importante salientar que o teste do cometa pode ser superestimado ou produzir falsos positivos em relação à genotoxicidade de mutágenos (Choucroun et al. 2001).

Lakshmana Rao e Bhattacharya observaram danos no DNA induzidos pela microcistina-LR *in vivo* em fígados de camundongos. Observaram também quebras no DNA dose e tempo dependentes, além de induzir fragmentação e degradação do

DNA. Os resultados obtidos no presente estudo mostram que a microcistina-LR pode induzir danos ao DNA em eritrócitos de sangue periférico de *O. niloticus* e *A. bimaculatus*.

Mitchelmore e Chipman (1998) concluíram em sua revisão que o teste do cometa é uma técnica rápida, sensível e econômica para se detectar quebras no DNA, o que é ideal como um biomarcador não específico de genotoxicidade em peixes ou outra espécie aquática. Tal técnica é utilizada com sucesso em exposições *in vivo* em várias espécies. Mas o teste do cometa merece maior exploração para a avaliação da variabilidade entre indivíduos e entre células na resposta aos poluentes e a estímulos genotóxicos que ocorrem naturalmente e para a avaliação da persistência desses efeitos.

### 5.2.3 Cometa versus Micronúcleo

Segundo Sánchez-Galán *et al.* (1998), os peixes são considerados bons indicadores para a detecção de contaminação de recursos hídricos por substâncias genotóxicas. Eritrócitos de sangue periférico são muito comumente usados para a aplicação do ensaio do cometa em conjunto com o teste do micronúcleo, utilizando peixes como bioindicadores para avaliação ambiental de contaminação genotoxicológica (Belpaeme, *et al.* 1996; Da Silva *et al.* 2002; Russo *et al.* 2004; Buschini, *et al.*; 2004).

Muitos estudos mostram que o teste do cometa é aplicado em conjunto com o teste do micronúcleo para a avaliação de efeitos clastogênicos em estudos genotoxicológicos com peixes como bioindicadores (Belpaeme *et al.*, 1996).

Quando comparados, o teste do cometa se mostrou mais sensível do que o teste do micronúcleo para se verificar a genotoxicidade da microcistina em nosso estudo. Bucker *et al.* (2006) obtiveram o mesmo tipo de respostas. No estudo, o teste do micronúcleo demonstrou que não houve efeito mutagênico significativo sobre os eritrócitos de *Eingenmannia virescens*, expostos à concentração de 50ppm de benzeno. Já o ensaio do cometa foi eficiente para detectar efeitos genotóxicos de benzeno nos eritrócitos de *Eingenmannia virescens*.

Além disso, enquanto que o teste do cometa detecta quebras no DNA diretamente no sangue circulante de peixes, micronúcleos revelam quebras cromossômicas ou anomalias mitóticas que ocorrem em células estaminais no rim

cefálico, do qual circulam eritrócitos, eventualmente com micronúcleo, liberados muito lentamente. Isso pode ser explicado em função do tempo necessário para as células sanguíneas percorrerem o corpo do peixe. A falta de variação entre freqüências de micronúcleo no início da exposição e a regularização das mudanças ao longo do tempo sugerem que eles dependem mais da presença de agentes genotóxicos do que de outros fatores ambientais (Buschini et al, 2004).

Em trabalho de avaliação comparada entre as duas técnicas de micronúcleo e o teste do cometa para detectar efeitos genotóxicos da radiação de raios-X, He *et al.* (2000), encontraram maior sensibilidade para avaliação de dano no DNA para o ensaio do cometa que para o teste do micronúcleo. Isto acarreta uma classificação de diferentes “*endpoints*” de avaliação genotoxicológica, ressaltando a importância de manter uma combinação de testes para melhor discernimento da mutagenicidade dos agentes e avaliação de baixas doses de efeitos (Bücker et al, 2006).

Carcinógenos e mutágenos ambientais podem induzir danos no DNA e em cromossomos. A avaliação da genotoxicidade pode ser feita de várias maneiras observando a interação e os efeitos do mutágeno com o DNA. A capacidade de quebrar o DNA diretamente pode ser estimada pelo teste do cometa (*alkaline single cell gel electrophoresis*), sendo este bem sensível (Fairbairn et al, 1995). Dependendo do estágio do ciclo celular, da capacidade de reparação e do *background* genético celular e do tipo de mutágeno considerado, somente uma pequena quantidade de danos no DNA será corrigida. Essas mutações nos cromossomos e/ou no genoma podem ser quantificadas pela freqüência de micronúcleos em células interfásicas. Ambos os testes têm sido utilizados para se detectar mutágenos físicos e químicos (He et al, 2000).

Palus e colaboradores (2007) verificaram que extratos de *Microcystis aeruginosa* coletados de florações em um reservatório na Polônia produzem efeitos genotóxicos e citotóxicos em bactérias *Escherichia coli* PQ37. No mesmo estudo, ligeiros efeitos genotóxicos em linfócitos humanos foram relatados através do teste do cometa e do micronúcleo. No teste do cometa os danos no DNA que ocorreram após 3 e 6 horas de incubação com o extrato de cianobactérias foram significativamente maiores quando comparados aos respectivos níveis de incubação após 12 horas, isso pode ser causado pela progressiva degradação do DNA, e pela perda de pequenos fragmentos de DNA durante a eletroforese. Já em relação ao

teste de micronúcleo, observou-se que houve um pequeno aumento na frequência de micronúcleos, porém em concentrações mais altas de microcistinas.

Kim e Hyun (2006) fizeram uma comparação da sensibilidade entre o teste do micronúcleo e do cometa e verificaram que o segundo é mais sensível que o primeiro para monitoramento genotóxico utilizando-se duas espécies de peixes de água doce. Apesar dessa diferença, a combinação destes dois testes pode obter um sólido resultado da ação genotóxica de certas substâncias. Porém, deve-se ter uma padronização das condições do teste do cometa como a padronização do tipo de tecido e organismo para um específico agente mutagênico e do protocolo de isolamento celular, tudo isso para se obter uma correta avaliação da ação genotóxica.

#### **5.2.4 Necrose e Apoptose**

Através de dados da literatura e dos nossos resultados de genotoxicidade, verifica-se que a microcistina apresenta genotoxicidade. Nos resultados dos experimentos de apoptose/necrose observou-se em *O. niloticus* um maior índice de células em necrose com a maior dose e um maior índice de apoptoses na dose mais baixa.

Em *A. bimaculatus* observaram-se índices estatisticamente significativos de células em necrose e em apoptose na dose mais alta e apenas valores significativos de apoptoses com a dose mais baixa.

Com isso podemos depreender que, em doses baixas, a microcistina não exerce toxicidade, possibilitando a sua ação genotóxica. A morte celular por apoptose pode significar resultado de lesão genômica, induzido por agentes externos. A morte celular por necrose, pode ser resultante de citotoxicidade, onde o agente externo provoca rupturas na membrana celular, com a entrada de água e consequentemente vacuolização do citoplasma (Grisólia et al, 2009).

A toxicidade das microcistinas pode variar, mas as mais tóxicas são potentes hepatotoxinas, que parece inibir a atividade da PP1 e PP2A. Essa inibição causa fosforilação protéica em toda a célula e ativa a cascata de caspases, o que resulta em necrose apoptótica dos hepatócitos, por serem proteases essenciais no processo de apoptose (Yoshida et al, 1997; Yoshida et al, 1998; Hooser, 2000).

Brokmann et al (2006) demonstrou que apoptoses podem ser induzidas por agentes alquilantes do DNA em doses muito mais baixas que as doses que provocam citotoxicidade e necrose. McDermott e colaboradores (1998) mostraram que, em concentrações baixas, a microcistina provoca apoptose, enquanto que em concentrações altas causa necrose em hepatócitos de mamíferos e peixes.

Observou-se o mesmo mecanismo com a microcistina em peixes, isto é, prevaleceu a ocorrência de apoptoses em doses baixas e a prevalência de necrose em doses altas.

Vale ressaltar que Gehringer (2004) afirma que doses mais altas de microcistina levam a apoptose e doses mais baixas promovem proliferação celular. Portanto, a exposição prolongada a doses baixas de microcistinas através do consumo de água contaminada, pode favorecer o surgimento de câncer.

Os resultados obtidos nesse estudo podem ser atribuídos não somente à microcistina, mas às outras substâncias uma vez que, no extrato obtido da floração de *Microcystis* spp, encontram-se muitos outros compostos químicos que poderiam também causar efeitos tóxicos e genotóxicos. Além disso, poder-se-iam, também, atribuir tais efeitos às interações das diferentes substâncias químicas presentes no extrato.

## 6 CONCLUSÕES

- *Astyanax bimaculatus* apresentou sensibilidade ao extrato contendo microcistina em ambas exposições, sendo essa espécie útil em estudos ecogenotoxicológicos.
- O extrato da floração de *Microcystis* spp apresentou efeitos genotóxicos para ambas as espécies *O. niloticus* e *A. bimaculatus*.
- Em *O. niloticus* apenas a exposição corpórea (103,725µg/L de microcistina) aumentou o número de micronúcleos em eritrócitos de sangue periférico.
- Em concentrações maiores, o extrato da floração de *Microcystis* spp demonstrou um efeito tóxico, provocando necrose. Em doses baixas o extrato contendo microcistina provocou apoptose.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.A., DINIZ, Y.S., MARQUES, S.F.G., FAINE, L.A., RIBAS, B.O., BURNEIKO, R.C., NOVELLI, E.L.B. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. **Environ. Int.** vol: 27:673–679. 2002.

AL-SABIT, K. Clastogenic effects of Five carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Comparative Biochemistry and Physiology**. Vol. 85C: 5-9. 1986.

AL-SABTI, K. Micronuclei induced by selenium, mercury, methylmercury and their mixtures in binucleated blocked fish erythrocyte cells. **Mutat. Res.**, vol: 320:157-163. 1991.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**. Vol: 343:121–135. 1995.

ANDERSON, R.J., LUU, H.A., HOLMES, C.F.B., KENT, M.L., LEBLANC, L., TAYLOR, F.J.R.; WILLIAMS D.E. Chemical and biological evidence links microcystins to salmon “netpen liver disease”. **Toxicol.** Vol: 31, 1315-1323. 1993.

AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. Ed. RIMA. São Paulo. 2004. 322p.

BEASLEY, V .R., COOK, W .O., DAHLEM, A .M., HOOSER, S.B., LOVELL, R.A. e VALENTINE, W. M. Intoxication in livestock and water fowl. Clinical Toxicology-Veterinary Clinics of North America. **Food Animal Practice**. Vol: 5, 345-361. 1989.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research**. Vol: 415:167–184. 1998.

BELPAEME, K.; DELBEKE, K.; ZHU, L.; KIRSCH-VOLDERS, M. Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. **Mutagenesis**. Vol. 11: 485-492. 1996.

BEST, J.H., PFLUGMACHER, S., WIEGAND, C., EDDY, F.B., METCALF, J.S., CODD, G.A., Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR, on glutathione S-transferase activities in Zebra fish (*Danio rerio*). **Aquat. Toxicol.** Vol. 60: 223–231. 2002.

BLACK, M.C.; FERRELL, J.R.; HORNING, R.C.; MARTIN, L.K. DNA strand breakage in freshwater mussels (*Anodonta grandis*) exposed to lead in the laboratory and field. **Environmental Toxicology and Chemistry**. Vol. 15: 802-808. 1996.

BOE, R., GJERTSEN, B.T., VINTEMYR, O.L., HOUGE, G., LANOTLE, M., DOSKELAND, S.O. The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces morphological changes typical of apoptosis in mammalian cells. **Exp. Cell Res.** Vol: 195, 237. 1991.

BOLOGNESI, C.; LANDINI, E.; ROGGIERI, P.; FABBRI R. Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies. **Environ. Mol. Mutagen.** Vol. 33: 287–292. 1999.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**. Vol. 44:383-392. 2001.

BROOKEA, S.; NEWCOMBEA, G.; NICHOLSON, B.; KLASSA G. Decrease in toxicity of microcystins LA and LR in drinking water by ozonation. **Toxicol.** Vol: 48:1054–1059. 2006.

BROOKS, W.P.; CODD, G.A. Distribution of Microcystis aeruginosa peptide toxin and interactions with hepatic microsomes in mice. **Pharmacol. Toxicol.** Vol: 60, 187-191. 1987.

BROCKMANN, W.G., KOSTORYZ, E.L. EICK, J.D. Correlation of apoptotic potencial of simple oxiranes with citotoxicity. **Toxicol In Vitro**. Vol: 20:729-735. 2006.

BÜCKER A., CARVALHO W., ALVES-GOMES J. A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzenovol. **Acta Amazônica**. Vol 36: 357 – 364. 2006.

BURY, N.R., CODD, G.A., WENDELAAR BONGA, S.E., FLIK, G. Fatty acids from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* with potent inhibitory effects on fish gill Na<sup>+</sup>/K<sup>-</sup>-ATPase activity. **J. Exp. Biol**. Vol: 201:81–89. 1998.

BURY, N.R., EDDY, F.B., CODD, G.A. Stress responses of brown trout *Salmo trutta* L. to the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Environ. Toxicol. Water Qual**. Vol:11:187–194. 1996.

BUSCHINI, A.; MARTINO, A.; GUSTAVINO, B.; MONFRINOTTI, M.; POLI, P.; ROSSI, C.; SANTORO, M.; DÖRR, A.J.M.; RIZZONI, M. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. **Mutation Research**. Vol. 557: 119–129. 2004.

CARBIS, C.R. RAWLIN, G.T. MITCHELL, G.F. ANDERSON, J.W. MCCAULEY, I. The histopatology of carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to microcystins by gavage, immersion and intraperitoneal administration. **J. Fish Dis**. Vol: 19:199–207. 1996.

CARBIS, C.R., RAWLIN, G.T., GRANT, P., MITCHELL, G.F., ANDERSON, J.W.; MCCAULEY, I. A study of feral carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to *Microcystis aeruginosa* at Lake Mokoan, Australia, and possible implications for fish health. **Journal of Fish Diseases**. Vol: 20, 81-91. 1997.

CARBIS, C.R., RAWLIN, G.T., GRANT, P., MITCHELL, G.F., ANDERSON, J.W., MCCAULEY, I. A study of feral carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to *Microcystis aeruginosa* at Lake Mokoan, Australia, and possible implications for fish health. **J. Fish Dis**. Vol:20:81–91. 1997.

CARMICHAEL WW, ESCHEDOR JT, PATTERSON GML, MOORE RE. Toxicity and partial structure of a hepatotoxic peptide produced by the cyanobacterium *Nodularia spumigena* Mertens emend. L 575 from New Zealand. **Appl Environmental Microbiology**. Vol: 54:2257-2263 1988.

CARMICHAEL, W.W. Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. A Review. **Journal of Applied Bacteriology**. Vol: 72, 445-459. 1992.

CARMICHAEL, W.W. The cyanotoxins. **Advances in Botanical Research**. Vol: 27, 211-256. 1997.

CARMICHAEL, W.W., JONES, C.L.A., MAHMOOD, N.A.; THEISS, W.C. Algal toxins and water-based diseases. **CRC Critical Reviews in Environmental Control**. Vol:15, 275-313. 1985.

CHASIN, A.A.M.; AZEVEDO, F.A. Intoxicação e Avaliação da Toxicidade. In: AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. Ed. RIMA. São Paulo. 127-165. 2004.

CHOUCROUN, P.; GILLET, D.; DORANGE, G.; SAWICKI, B.; DEWITTE, J.D. Comet assay and early apoptosis. **Mutation Research**. Vol: 478: 89–96. 2001.

CODD, G.A. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. **Ecological Engineering**. Vol: 16:51–60. 2000.

CODD, G.A., BELL, S.G.; BROOKS, W.P. Cyanobacterial toxins in water. **Water Sci. Technol**. Vol: 21, 1-13. 1989.

CODD, G.A.; MORRISON, L.F.; METCALF, J.S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. **Toxicology and Applied Pharmacology**. Vol: 203: 264-272. 2005.

COOK, D., NEWCOMBE, G. Removal of microcystin analogues with powdered activated carbon. **Water Science and Technology: Water Supply**. Vol:2:201–207. 2002.

COTELLE, S., FERARD, J.F. Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. Vol: 34, 246–255. 1999.

COUGHLAN, B.M., HARTL, M.G.J., O'RELLY, S.J., SHEEHAN, D., MORTHERSILL, C., VAN PELT, F.N.A.M., O'HALLORAN, J., O'BRIEN, N.M., 2002. **Mar. Pollut. Bull.** 44, 1359–1365.

CRAVEDI, J.P. PERDU-DURAND, E. PARIS, A. PRUNET, P. Growth hormone effect on xenobiotic-metabolizing activities of rainbow trout. **Mar. Environ. Res.** Vol: 39:89–92. 1995.

DABHOLKAR, A. S., CARMICHAEL, W. W. Ultrastructural changes in the mouse liver induced by hepatotoxins from the freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* strain 7820. **Toxicol.** Vol: 25, 285-292. 1987.

DE FLORA, S., BAGNASCO, M., ZANACCHI, P. Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazard in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. **Mutat. Res.** Vol. 320:285. 1991.

DE MARINI, D.M.; PLEWA, M.J.; BROCKMAN; H.E. Use of four short-term tests to evaluate the mutagenicity of municipal water. **J. Toxicol. Environ. Health.** Vol. 9: 127–140. 1982

DEMOTT, W.R., ZHANG, Q. X.; CARMICHAEL, W. W. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. **Limnology and Oceanography.** Vol: 36, 1346-1357. 1991.

DEVAUX, A.; FLAMMARION, P.; BERNARDON, V.; GARRIC, J.; MONOD, G. Monitoring of the chemical pollution of the river Rhone through measurement of DNA damage and cytochrome P450 1A induction in chub (*Leuciscus cephalus*). **Marine Environmental Research.** Vol. 46: 257-262. 1998.

DEVAUX, A.; PESONEN, M.; MONOD, G. Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes, **Toxicology In Vitro**. Vol: 11:71–78. 1997.

DEVENTER, K. Detection of genotoxic effects on cells of liver and gills of *B. rerio* by means of single cell gel electrophoresis. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** Vol: 56:911–918. 1996.

DING, W.X.; SHEN, H.M.; ZHU, H.G.; LEE, B.L.; ONG, C.N. Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China. **Mutation Research**. Vol: 442:69–74. 1999.

DIXON, D.R., PRUSKI, A.M., DIXON, L.R., JHA, A.N. Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. **Mutagenesis**. Vol: 17, 495–507. 2002.

DUY, T.N., LAM, P.K.S., SHAW, G.R., CONNELL, D.W. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.** Vol: 163, 113–186. 2000.

EASTMAN, A.; BARRY, M.A. The origins of DNA breaks: a consequence of DNA damage, DNA repair or apoptosis? **Cancer Invest**. Vol: 10:229–240. 1992.

ERIKSSON JE, GOLMAN RD. Protein phosphatase inhibitors alter cytoskeletal structure and cellular morphology. **Adv Prot Phosphatases**. Vol: 7:335-357. 1993.

ERIKSSON JE, TOIVOLA D, MERILUOTO JAO, KARAKI H, HAN Y-G, HARTSHORNE D. Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. **Biochem Biophys Res Commun**. Vol: 173:1347-1353. 1990.

ERIKSSON, J.E., PAATERO, G. I. L., MERILUOTO, J.A.O., CODD, G .A., KASS, G.E.N., NICOTERA, P.; ORRENIUS, S. Rapid microfilament reorganization induced in isolated rat hepatocytes by microcystin-LR, a cyclic peptide toxin. **Experimental Cell Research**. Vol: 185, 86-100. 1989.

FABACHER, D.L., BESSER, J.M., SCHMITT, C.J., HARAHBARGAR, J.C., PETERMAN, P.H., LEBO, J.A. Contaminated sediments from tributaries of the Great Lakes: chemical characterization and carcinogenic effects in Medaka (*Oryzias latipes*). **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** Vol. 20: 17–34. 1991.

FALCONER, I.R. Effects on human health of some toxic cyanobacteria (blue-green algae) in reservoirs, lakes and rivers. **Toxicity Assessment.** Vol: 4, 175-184. 1989.

FALCONER, I.R. Tumour promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. **Environmental Toxicology of Water Quality.** Vol: 6, 177-184. 1991.

FALCONER, I.R., JACKSON, A.R.B., LANGLEY, J.; RUNNEGAR, M.T.C. Liver pathology in mice in poisoning by the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Aust. J. Biol. Sci.** vol: 34, 179-187. 1981.

FALCONER, I.R., RUNNEGAR, M.T.C., Effect of peptide toxin from *M. aeruginosa* on intracellular calcium, pH and membrane integrity in mammalian cells. **Chem.-Biol. Interact.** Vol: 63 : 215. 1987.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method, **Mutation Research.** Vol: 392:11–18. 1997.

FISHER, W.J., DIETRICH, D.R. Pathological and biochemical characterization of Microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). **Toxicol. Appl. Pharmacol.** Vol: 164:73–81. 2000.

FOLMAR, L.C., GARDNER, G.R., HICKEY, J., BONOMELLI, S., MOODY, T. Serum chemistry and histopathological evaluations of brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) from Buffalo and Niagara Rivers, New York. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** Vol. 25: 298–303. 1993.

FRENZILLI, G., NIGRO, M., SCARCELLI, V., GORBI, S., REGOLI, F. DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, *Mytilus*

*galloprovincialis*: a field study in a highly eutrophicated coastal lagoon. **Aquatic Toxicology**. Vol: 53, 19–32. 2001.

FUJIKI H, SUGANUMA M, YOSHIZAWA S, KANAZAWA H, SUGIMURA T, MANAM S, KAHN SM, JIANG W, HOSHINA S, WEINSTEIN IB. Codon 61 mutations in the c-Harvey-ras gene in mouse skin tumors induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene plus okadaic acid class tumor promoters. **Mol Carcinog**. Vol: 2:184-187. 1989.

GEDIK, C.M., EWEN, S.W.B., COLLINS, A.R. Single cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cell. **Int. J. Radiat. Biol.** Vol. 62: 313–320. 1992.

GOETHEM, F.V.; LISON, D.; VOLDERS, M.K. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agent: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. **Mutation Research**. Vol. 392 : 31–43. 1997.

GONTIJO *et al.* Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. **Mutation Research**. Vol. 534: 165–172. 2003.

GRABOW, W.O.K.; DU RANDT, W.C.; PROZESKY, O.W.; SCOTT, W.E. *Microcystis aeruginosa* toxins: cell culturotoxicity, hemolysis and mutagenicity assays. **Appl. Environ. Microbiol.** Vol: 43:1425–1433. 1982.

GRISOLIA, C.K., CORDEIRO, C.M.T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genet. Mol. Biol.** Vol. 23: 235–239. 2000.

GRISOLIA, C.K., OLIVEIRA-FILHO, E.C.; RAMOS, F.R., LOPES, M.C., MUNIS, D.H.F., MONNERAT, R.G. Acute toxicity and citotoxicity of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* strains on fish and mouse bone marrow. **Ecotoxicology**. In press. 2009.



GRISOLIA, C.K., STARLING, F.L.R.M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. **Mutation Research**. Vol: 491, 39–44. 2001.

HAMILTON, M.A., RUSSO, R.C., THURSTON, R.V. Trimed Spearman-Karber method for estimation median lethal concentration in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol.** Vol: 11(7):714-719. 1977.

HARADA K, OSHIKATA M, UCHIDA H, SUZUKI M, KONDO F, SATO K, UENO Y, YU SZ, CHEN G, CHEN GC. Detection and identification of microcystins in the drinking water of Haimen City, China. **Nat Toxins**. Vol: 4:277-283. 1996.

HARADA, K.; TSUJI, K.; WATANABE, M. F. Stability of microcystins from cyanobacteria III. Effect of pH and temperature. **Phycologia**. Vol: 35, 83-88. 1996.

HARGREAVES J. Nitrogen chemistry in catfish ponds. **Aquaculture**. Vol: 166, 181-212. 1998.

HARTMANN, A., ELHAJOUJI, A., KISKINIS, E., POETTER, F., MARTUS, H.-J., FJALLMAN, A., FRIEAUFF, W., SUTER, W. Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening comparative investigation with the micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**. vol: 39, 843–858. 2001.

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K.; WADA, K.; KINAE, N.; SAOTOME, K.; TANAKA, N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y.F.; ASANO, N.; SOFUNI, T.; OJIMA, Y. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutation Research**. Vol: 399:125–133. 1998.

HE, J.L.; CHEN, W.L.; JIN, L.F.; Jin, H.Y. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. **Mutation Research**. Vol. 469:223-231. 2000.

HIMBERG, K., KEIJOLA, A.-M., HIISVIRTA, L., PYYSAALO, H., SIVONEN, K. The effect of water treatment processes on the removal of hepatotoxins from Microcystis

and Oscillatoria cyanobacteria: a laboratory study. **Water Research**. Vol: 23: 979–984. 1989.

HITZFELD, B. C.; HOGER, S. J.; DIETRICH, D. R. Cyanobacterial Toxins: Removal during Drinking Water Treatment, and Human Risk Assessment. **Environmental Health Perspectives** Vol: 108:113-122. 2000.

HO, L.; ONSTADB, G.; VON GUNTENB, U.; RINCK-PFEIFFER, S.; CRAIGD, K.; NEWCOMBEA, G. Differences in the chlorine reactivity of four microcystin analogues. **Water Research**. Vol:40:1200 – 1209. 2006.

HOFFMAN, J.R.H. Removal of Microcystis toxins in water purification processes. **Water SA**. Vol:2, 58–60. 1976.

HOOFTMAN, R.N., RAAT, W.K., Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**. Vol: 104, 147–152. 1982.

HOOSER, S. B. Fulminant hepatocyte apoptosis in vivo following Microcystin-LR administration to rats. *Toxicol. Pathol.* Vol: 28, 726-733. 2000.

HOOSER, S. B., BEASLEY, V. R., WAITE, L. L., KUKLENSCHMIDT, M. S., CARMICHAEL, W W.; HASCHEK, W. M. Actin filament alterations in rat hepatocytes induced in vivo and in vitro by microcystin-LR, a hepatotoxina from the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. **Veterinary Pathology**. vol: 28, 259-266. 1991.

HOSE, J.E.;CROSS, J.N.; SMITH, S.G.; DIELL D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes form contaminated sites off southern California. **Marine Environmental Research**. Vol. 22: 167-176. 1987.

HUGHES, J.B.; HEBERT, A.T. Erythrocyte micronuclei in winter flounder (*Pesudopleuronectes americanus*) results of field surveys during 1980-1988 from Virginia to Nova Scotia in Long Island Sound. **Archive of Environmental Contamination and Toxicology**. Vol. 20: 474-479. 1991.

HUTCHINSON, T.H.; JHA, A.N.; MACKAY, J.M.; ELLIOT, B.M.; DIXON, D.R. Assessment of developmental effects, cytotoxicity and genotoxicity in the marine polychaete (*Platinereis dumerilii*) exposed to disinfected municipal sewage effluents. **Mutat. Res.** Vol. 399: 97–108. 1998.

HUUSKONEN, S.; RASANEN, T.; KOPONEN, K.; LINDSTROM-SEPPEA, P. Time-course studies of the biotransformation enzymes in control rainbow trout when adjusting to new habitats, **Mar. Environ. Res.** vol: 39:79–83. 1995.

JANG, M.; HAA, K.; LUCAS, M.C.; JOO, G.; TAKAMURA, N. Changes in microcystin production by *Microcystis aeruginosa* exposed to phytoplanktivorous and omnivorous fish. **Aquatic Toxicology.** Vol. 68: 51–59. 2004.

JAYLET, A.; DEPARIS, P.; FERRIER, V.; GRINFELD, S.; SIBOULET, R. A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles waltl* to detect mutagens in fresh-water pollution. **Mutat. Res.** Vol. 164: 245–257. 1986.

JOCHIMSEN EM, CARMICHAEL WW, AN JS, CARDO DM, COOKSON ST, HOLMES CE, ANTUNES MB, DE MELO FILHO DA, LYRA TM, BARRETO VS, ET AL. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **New England Journal Med.** Vol: 339(2):139. 1998.

KENNEDY, C.J.; WALSH, P.J. The effects of temperature on the uptake and metabolism of benzowaxpyrene in isolated gill cells of the gulf toadfish, *Opsanus beta*. **Fish Physiol. Biochem.** Vol: 13:93–103. 1994.

KESHAVANATH, P., BEVERIDGE, M.C.M., BAIRD, D.J., LAWTON, L.A., NIMMO, A.; CODD, G.A. The functional grazing response of a phytoplanktivorous fish *Oreochromis niloticus* to mixtures of toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Fish Biology.** Vol:45, 123-129. 1994.

KHAN, S.A., GHOSH, S., WICKSTROM, M., MILLER, L.U., HESS, R., HASCHEK, W.M., BEASLEY, V.R. Comparative pathology of microcystin-LR in cultured hepatocytes, fibroblasts, and renal epithelial cells. **Nat. Toxins**. Vol: 3: 119. 1995.

KIM, I.; HYUN, C. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Vol: 64 : 288–297. 2006.

KIRSCH-VOLDERS, M., SOFUNI, T., AARDEMA, M., ALBERTINI, S., EASTMOND, D., FENECH, M., ISHIDATE JR., M., KIRCHNER, S., LORGE, E., MORITA, T., NORPPA, H., SURRALLES, J., VANHAUWAERT, A., WAKATA, A. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutation Research**. Vol: 540 : 153–163. 2003.

KIRSCH-VOLDERS, M.; ELHAJOUJI, A.; CUNDARI, E.; VAN HUMMELEN, P. The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction, **Mutation Research**. Vol: 392:19–30. 1997.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖM, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research**. Vol: 363:89–96. 1996.

KLOBUCAR, G.I.V., PAVLICA, M., ERBEN, R., PAPES, D. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. **Aquatic Toxicology**. Vol: 64, 15–23. 2003.

KOPPEN, G.; VERSCHAEVE, L. The alkaline comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. **Mutation Research**. Vol: 360:193–200. 1996.

KOTAK, B.J., SEMALULU, S., FRIYTZ, D.L., PREPAS, E.E., HRUDEY, S.E., COPPOCK, R.W. Hepatic and renal pathology of intraperitoneally administered

microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicon**. Vol:34:517–525. 1996.

LAKSHMANA RAO, P.V.; BHATTACHARYA, R.; PARIDA, M.M., JANA, A.M., BHASKAR, A.S.B. Freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UTEX 2385) induced DNA damage in vivo and in vitro. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. Vol: 5:1–6. 1998.

LANKOFF, A.; KRZOWSKI, Ł.; GŁAB, J.; BANASIK, A.; LISOWSKAA, H.; KUSZEWSKI, T.; GÓZDZ, S.; WÓJCIK, A. DNA damage and repair in human peripheral blood lymphocytes following treatment with microcystin-LR. **Mutation Research**. Vol: 559:131–142. 2004.

LEE, R.F., STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**. Vol: 544, 43–64. 2003.

LEMES G. A. F.; YUNES J. S. O ambiente e as cianobactérias. **Ecos. Unidade de Pesquisas em Cianobactérias UPC/FURG**. Agosto: 9 -11. 2006.

LI L., XIE P., CHEN J. In vivo studies on toxin accumulation in liver and ultrastructural changes of hepatocytes of the phytoplanktivorous bighead carp i.p.-injected with extracted microcystins. **Toxicon**, v. 46: 533-545. 2005.

MACKINTOSH RW, DALBY KN, CAMPBELL DG, COHEN PT, COHEN P, MACKINTOSH C. The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. **FEBS Lett**. Vol: 371:236-240. 1995.

MACKINTOSH, C., BEATTI, K. A., KLUMPP, S., COHEN, P., CODD, G. A. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. **FEBS Letter**. Vol: 264, nº:2, 187-192. 1990.

MANKIEWICZ, J.; WALTER, Z.; TARCZYNSKA, M.; PALYVODA, O.; WOJTYSIAK-STANIASZCZYK, M.; ZALEWSKI, M. Genotoxicity of cyanobacterial extracts containing microcystins from Polish Water Reservoirs as determined by SOS chromotest and comet assay. **Environmental Toxicology**. Vol: 17:341–350. 2002.

MANNA, G.K.; SADHUKHAN, A. Use of cells of gill and kidney of tilapia fish in micronucleus test (MNT). **Curr. Sci.** vol: 55:498–501. 1986.

MATSUMOTO, F.E.; CÓLUS, I.M.S. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide and vinblastine sulfate. *Genetic Molecular Biology*. Vol: 23: 489–492. 2000.

McDERMOTT C. M., NHO C. W., HOWARD W., HOLTON B. The cyanobacterial toxin, microcystin-LR, can induce apoptosis in a variety of cell types. **Toxicon**. v. 36: 1981-1996. 1998.

MERILUOTO JAO, SANDSTROM A, ERIKSSON JE, REMAUD G, CRAIG AG, CHATTOPADHYAYA J. Structure and toxicity of a peptide hepatotoxina from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. **Toxicon**. Vol: 27:1021-1034. 1989.

MERILUOTO, J.A.O., NYGARD, S.E., DAHLEMA, .M. e ERIKSSON, J.E. Synthesis, organotropism and hepatocellular uptake of two tritium-labeled epimers of dihydromicrocystin-LR, a cyanobacterial peptide toxin analog. **Toxicon**. Vol: 28, 1439-1446. 1990.

MERSCH, J.; BEAUVAIS, M.N. The micronucleus assay in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to in situ monitor genotoxicity in freshwater environments. **Mutat. Res.** Vol. 393 141–149. 1997.

MINILLO, A.; FERREIRA, A.H.F., YOGUI, G.T.; YUNES, J.S. Concentrações de Microcistinas e Toxicidade nas Formas Coloniais de *Microcystis Aeruginosa* de Florações no Estuário da Lagoa dos Patos, RS. In: ESPÍNDOLA, E.L.G.; BOTTA-PASCHOAL, C.M.R.; ROCHA, O.; BOHRER, M.B.C.; OLIVEIRA-NETO, A. L. de. **Ecotoxicologia: Perspectivas para o Século XXI**. São Carlos. RiMa. pp 564. 2000.

MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**. Vol: 399: 135–147. 1998.

MOLINA, R., MORENO, I., PICHARDO, S., JOS, A., MOYANO, R., MONTERDE, J.G., CAMEÁN, A. Acid and alkaline phosphatases activities and pathological changes induced in Tilapia fish (*Oreochromis* sp.) exposed subchronically to microcystins from toxic cyanobacterial blooms under laboratory conditions. **Toxicol.** Vol: 46:725–735. 2005.

MONARCA, S.; ZANARDINI, A.; FERETTI, D.; DALMIGLIO, A.; FALISTOCCO, E.; MANICA, P.; NARDI, G. Mutagenicity of extracts of lake drinking water treated with different disinfectants in bacterial and plant tests. **Water Res.** Vol. 32: 2689–2695. 1998.

MORENO, I.M., MARAVER, J., AGUETE, E.C., LEO, M., GAGO-MARTIÁNEZ, A., CAMEÁN, A.M. Decomposition of Microcystin-LR, Microcystin-RR, and Microcystin-YR in Water Samples Submitted to in Vitro Dissolution Tests. **J. Agric. Food Chem.** Vol: 52: 5933-5938. 2004.

NACCI, D.E., CAYULA, S.; JACKIM, E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. **Aquatic Toxicology**. Vol: 35:197–210. 1996.

NAGATA, S.; NAGASE, H.; KAWANE, K.; MUKAE, N.; FUKUYAMA, H. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. **Cell Death Differ.** Vol: 10: 108–116. 2003.

NAMIKOSHI M, RINEHART KL, SAKAI R, SIVONEN K, CARMICHAEL WW. Structures of three new cyclic heptapeptide hepatotoxins produced by the cyanobacterium (blue-green alga) *Nostoc* sp. strain 152. **Journal Org Chemistry**. Vol: 55:6135-6139. 1990.

NAMIKOSHI M, SIVONEN K, EVANS WR, CARMICHAEL WW, SUN F, ROUHIAINEN L, LUUKKAINEN R, RINEHART KL. Two new L-serine variants of microcystins-LR and -RR from *Anabaena* sp. Strains 202 A1 and 202 A2. **Toxicon**. Vol: 30:1457-1464.1992.

NEUMANN, U.; WECKESSER J. Elimination of microcystin peptide toxins from water by reverse osmosis. **Environmental Toxicology and Water Quality**. Vol:13:143-148. 1998.

NISHIKAWA-MATSUSHIMA, R., OHTA, T., NISHIWAKI, S., SUGANUMA, M., KOHYAMA, K., ISHIKAWA, J., CARMICHAEL, W.W., FUJIKI.H. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. **J. Cancer Res. Clin. Oncol**, Vol:118, 420-424. 1992.

NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R., OHTA ,T., NISHIWAKI, S., SUGAWAMA, M. KOHYAMA, K., ISHIKAWA, T., CARMICHAEL, W. W. FUJIKI, H. Liver cancer promoted by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. 1992.

PAERL, H.W.; MILLIE D.F. Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. **Phycologia**. vol: 35, 160-167. 1995.

PALUS, J. *et al*. Biomonitoring of cyanobacterial blooms in polish water reservoir and the cytotoxicity and genotoxicity of selected cyanobacterial extracts. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**. vol. 20(1):48 – 65. 2007.

PAN, H., SONG, L.R., LIU, Y.D., BORNER, T. Detection of hepatotoxic *Microcystis* strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples. **Arch. Microbiol**. Vol:178, 421–427. 2002.

PANDRANGI, R., PETRAS, M., RALPH, S., VRZOC, M. Alkaline single cell gel (Comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. **Environ. Mol. Mutagen**. Vol. 26: 345–356. 1995.



PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline single cell gel (Comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. **Environ. Mol. Mutag.** Vol: 26:345–356. 1995.

PAPENDORF, O., KÖNIG, G.M., WRIGHT, A.D., CHORUS, I., OBEREMM, A. Mueggelone, a novel inhibitor of fish development from the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. *J. Nat. Products* 60, 1298–1300. 1997.

PFLUGMACHER, S., WIEGAND, C., OBEREMM, A., BEATTIE, K.A., KRAUSE, E., CODD, G.A., STEINBERG, C.E.W., Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. **Biochim. Biophys. Acta.** Vol.1425: 527–533. 1998.

POURIA S, DE ANDRADE A, BARBOSA J, CAVALCANTI R, BARRETO V, WARD C, PREISER W, POON G, NEILD G, CODD G. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **Lancet** . vol: 352:21-26. 1998.

PRIETO, A. I.; JOS, A.; PICHARDO, S.; MORENO, I.; CAMEÁN, A. M. Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.). **Aquatic Toxicology.** Vol: 77:314–321. 2006.

RABERGH, C.M.I., BYLUND, G., ERIKSSON, J.E. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (bluegreen algae) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Toxicology.* Vol: 20:131–146. 1991.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Evaluation of the Allium anaphase– telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutat. Res.** Vol. 312: 17–24. 1994

RAO P, BHATTACHARYA R, PARIDA MM, JANA AM, BHASKAR A. Freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UTEX 2385) induced DNA damage in vivo and in vitro. **Environ Toxicol Pharmacol.** Vol: 5:1-6.1998.

RAO, P.V.L.; BHATTACHARYA, R. The cyanobacterial toxin microcystin-LR induced DNA damage in mouse liver in vivo. **Toxicology**. Vol: 114:29–36. 1996.

RAO, P.V.L.; BHATTACHARYA, R.; PARIDA, M.M.; JANA, A.M.; BHASKAR, A.S.B. Freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UTEX 2385) induced DNA damage in vivo and in vitro. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** Vol: 5:1–6. 1998.

RAPALA J., SIVONEN K., LYRA C.; NIEMELA S.I. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins in *Anabaena* sp. as a function of growth stimuli. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol: 63, 2206-2212. 1997.

REPAVICH, W.M.; SONZOGONI, W.C.; STANDRIDGE, J.H.; WEDEPOHL, R.E.; MEISNER, L.F.N. Cyanobacteria (blue-green algae) in Wisconsin waters: acute and chronic toxicity. **Water Research**. Vol: 24:225–231. 1990.

RIZZONI, M.; GUSTAVINO, B.; FERRARI, C.; GATTI, L.G.; FANO, E.A. An integrated approach to the assessment of the environmental quality of the Tiber river in the urban area of Rome: a mutagenesis assay (micronucleus test) and a analysis of macrobenthic community structure. **Sci. Tot. Environ.** Vol. 162: 127–137. 1995.

ROSITANO, J., NEWCOMBE, G., NICHOLSON, B., SZTAJNBOK, P. Ozonation of NOM and algal toxins in four treated waters. **Water Res.** Vol: 35 (1), 23–32. 2001.

ROSITANO, J., NICHOLSON, B.C., PIERONNE, P. Destruction of cyanobacterial toxins by ozone. **Ozone-Sci. Eng.** Vol: 20 (3), 223–238. 1998.

RUNNEGAR M, BERNDT N, KONG SM, LEE EY, ZHANG L. In vivo and in vitro binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A. **Biochem Biophys Res Commun**. Vol: 216:162-169. 1995.

RUNNEGAR, M.T.C., FALCONER, I.R. Effect of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. **Toxicon**. Vol: 24, 109-115. 1986.

RUNNEGAR, M.T.C., FALCONER, I.R., SILVER, J. Deformation of isolated rat hepatocytes by a peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Archives of Pharmacology**. Vol: 317, 268-272. 1981.

RUNNEGAR, M.T.C.; FALCONER, J.R. The in vivo and in vitro biological effects of the peptide hepatotoxin from the bluegreen alga *Microcystis aeruginosa*. **South African J. Sci.** Vol: 78:363–366. 1982.

RUSSO, C.; ROCCO, L.; MORESCALCHI, M.A.; STINGO, V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Vol. 57: 168-174. 2004.

SATO, Y.S.; SAMPAIO, E.V.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J.R. Biologia reprodutiva de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Reista Brasileira de Zoologia**. Vol. 23: 267-273. 2006.

SCARPATO, R.; MIGLIORE, L.; BARALE, R. The micronucleus assay in *Anodonta cygnea* for the detection of drinking water mutageniity. **Mutat. Res.** Vol. 245: 231–237. 1990.

SCOTT, W.E. Occurrence and significance of toxic cyanobacteria in southern Africa. **Water Science Technology**. vol: 23, 175-180. 1991.

SHIBATA, T.; SOLO-GABRIELE, H. M.; FLEMING L. E.; ELMIR. S. Monitoring marine recreational water quality using multiple microbial indicators in an urban tropical environment. **Water Research**. Vol: 38: 3119-3131. 2004.

SIVONEN K.; JONES G. Cyanobacterial toxins. In: Toxic Cyanobacteria in Water (ed. por Chorus I.; Bartram J.), pp. 41-111. E.FN Spon, London. 1999.

SKULBERG, O. M., CARMICHAEL, W W., ANDERSON, R. A., MATSUNAGA, S., MOORE, R.E., SKULBERG, R. Investigations of a neurotoxic oscillatorean strain (cyanophyceae) and its toxin. Isolation and characterization of homoanatoxin-a. **Environmental Toxicology and Chemistry**. Vol: 11, 321-329. 1992.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). **Mutagenesis**. Vol: 10 : 555–559. 1995.

studies of the biotransformation enzymes in control rainbow trout when adjusting to new habitats. **Marine Environ. Res.** Vol. 39:79–83. 1995.

SUEOKA E, SUEOKA N, OKABE S, KOZU T, KOMORI A, OHTA T, SUGANUMA M, KIM SJ, LIM IK, FUJIKI H. Expression of the tumor necrosis factor alpha gene and early response genes by nodularin, a liver tumor promoter, in primary cultured rat hepatocytes. **J Cancer Res Clin Oncol**. Vol: 123:413-419. 1997.

TAFAZOLI, M.; VOLDERS, M.K. In vitro mutagenicity and genotoxicity study of 1,2-dichloroethylene, 1,1,2-trichloroethylene, 1,3-dichloropropane, 1,2,3-trichloropropane and 1,1,3-trichloropropane, using the micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (comet assay) in human lymphocytes. **Mutation Research**. Vol: 371:185–202. 1996.

TAKENAKA, S. Formation of 3-amino-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca- 4E, 6E-dienoic acid from Microcystin-LR by the treatment with various proteases and its detection in mouse liver. **Chemosphere**. Vol: 36, 2277-2282. 1998.

TEIXERA M, COSTA M, CARVALHO V, PEREIRA M, HAGE E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. **Bull Pan Am Health Org**. vol: 27:244-253. 1993.

TENCALLA F., DIETRICH D. Biochemical characterization of microcystin toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicon**. Vol. 35: 583-595. 1997.

THEODORAKIS, C.W.; D'SURNEY, S.J.; SHUGART, L.R. Detection of genotoxic insult as DNA strand breaks in fish blood cells by agarose gel electrophoresis, **Environ. Toxicol. Chem.** Vol: 13:1023–1031. 1994.

THOMAS, R.E.; BRODERSEN, C.; CARLS, M.G.; BABCOCK, M.; RICE, S.C.; Lack of physiological responses to hydrocarbon accumulation by *Mytilus trossulus* after 3-4 years chronic exposure to spilled Exxon Valdez crude oil in Prince William Sound. **Computational Biochemistry and Physiology.** Vol. 122C: 153-163. 1999.

TURKER, H., EVERSOLE A.G., BRUNE, D.E. Filtration of green algae and cyanobacteria by Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in the partitioned aquaculture system, **Aquaculture.** Vol: 215:93–101. 2003.

UENO Y, NAGATA S, TSUTSUMI T, HASEGAWA A, WATANABE MF, PARK H-D, CHEN G-C, CHEN G, YU S-Z. Detection of microcystins, a bluegreen algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. **Carcinogenesis.** Vol: 17:1317-1321. 1996.

WATANABE M.F.; OISHI S. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. **Applied and Environmental Microbiology.** Vol: 49, 1342-1344. 1985.

WEST, M.L. Isolation and detection of genotoxic components in a Black River sediment. **Environ. Sci. Technol.** Vol. 22: 224–228. 1989.

WILSON, J.T., PASCOE, P.L., PARRY, J.M., DIXON, D.R., Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda) **Mutation Research.** Vol: 399, 87–95. 1998.

XIE, P., LIU, J.K. Practical success of biomanipulation using filter-feeding fish to control cyanobacteria blooms: a synthesis of decades of research and application in a subtropical hypereutrophic lake. **The Scientific World.** Vol: 1, 337–356. 2001.

YOSHIDA, T.; MAKITA, Y.; NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; YOSHIDA, F.; SEKIJIMA, M.; TAMURA, S.; UENO, Y. Acute oral toxicity of microcystin-LR, a cyanobacterial hepatotoxin in mice. **Nat. Toxins**. Vol: 5, 91-95. 1997.

YOSHIDA, T.; MAKITA, Y.; TSUTSUMI, T.; NAGATA, S.; TASHIRO, F.; YOSHIDA, F.; SEKIJIMA, M.; TAMURA, S.; HARADA, T.; MAITA, K.; UENO, Y. Immunohistochemical localization of microcystin-LR in the liver of mice: A study on the pathogenesis of microcystin-LR-induced hepatotoxicity. **Toxicol. Pathol.** Vol: 26, 411-418. 1998.

YUAN, B.; QU, J.; FU, M. Removal of cyanobacterial microcystin-LR by ferrate oxidation-coagulation. **Toxicon**. Vol: 40:1129-1134. 2002.

ZHAO, M., XIE, S., ZHU, X., YANG, Y., GAN N., SONG, L. Effect of inclusion of blue-green algae meal on growth and accumulation of microcystins in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). **J. Appl. Ichthyol.** Vol:22: 72–78. 2005.

ZHAO, M., XIE, S., ZHU, X., YANG, Y., GAN, N., SONG L. Effect of dietary cyanobacteria on growth and accumulation of microcystins in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**. Vol: 261:960–966. 2006.

ZIMBA, P V; KHOO, L; GAUNT, P S; BRITAIN, S; CARMICHAEL. W W. Confirmation of catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), mortality from Microcystis toxins. **Journal of Fish Diseases**. Vol: 24 : 41-47. 2001.

ZIMBA, P.V., DIONIGI, C.P.; MILLIE, D.F. Evaluating the relationship between photopigments and secondary metabolite accumulation in cyanobacteria. **Journal of Phycology**. Vol: 35, 1422-1429. 1999.

ZURAWELL, R.W., CHEN, H., BURKE, J.M., PREPAS, E.E. Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. **J. Toxicol. Environ. Health**. Vol: 8:1–37. 2005.

## 8 ANEXOS

**Anexo 1** – Tabelas com os resultados estatísticos do micronúcleo realizados através do programa de estatística básica Mann Whitney U-test, onde em azul estão representados os resultados significantes e em vermelho os não-significantes para *O. niloticus*.

Mann-Whitney U Test  
(projeto.sta)  
By variable VAR1  
**controle X  
103,725µg/L**

	Rank Sum Group	Rank Sum Group	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Group	Valid N Group	2*1sided exact p
	1	2						1	2	
MN	78	132	23	-2,04101	0,04126	-2,0549	0,03989	10	10	0,04325

Mann-Whitney U Test  
(projeto.sta)  
By variable VAR1  
**controle X 5µg/L**

	Rank Sum Group	Rank Sum Group	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Group	Valid N Group	2*1sided exact p
	1	2						1	2	
MN	101,5	108,5	46,5	-0,26458	0,79134	-0,2691	0,78780	10	10	0,79593

Mann-Whitney U Test  
(projeto.sta)  
By variable VAR1  
**controle X  
138µg/100g de peso**

	Rank Sum Group	Rank Sum Group	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Group	Valid N Group	2*1sided exact p
	1	2						1	2	
MN	89,5	81,5	34,5	-0,48869	0,62507	-0,49564	0,62015	10	8	0,63343

Mann-Whitney U Test  
(projeto.sta)  
By variable VAR1  
**controle X 69µg/100g  
de peso**

	Rank Sum Group	Rank Sum Group	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Group	Valid N Group	2*1sided exact p
	1	2						1	2	
MN	90	81	35	-0,44426	0,65686	-0,4510	0,65194	10	8	0,69646

**Anexo 2** – Tabelas com os resultados estatísticos do micronúcleo realizados através do programa de estatística básica Mann Whitney U-test, onde em azul estão representados os resultados significantes e em vermelho os não-significantes para *A. bimaculatus*.

Mann-Whitney U Test  
(projeto.sta)  
By variable VAR1  
**grupo controle X  
103,725µg/L**

	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
MN	65	145	10	-3,0237	0,00250	3,12147	<b>0,001801</b>	10	10	0,001505

Mann-Whitney U Test  
(projeto.sta)  
By variable VAR1  
**grupo controle X  
368,8µg/100g de peso**

	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
MN	70,5	100,5	15,5	2,17688	0,029496651	2,25753	<b>0,023981</b>	10	8	0,026647

Mann-Whitney U Test  
(projeto.sta)  
By variable VAR1  
**grupo controle X  
245,86µg/100g de peso**

	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
MN	66	105	11	2,57672	0,009978778	2,66186	<b>0,007775</b>	10	8	0,008547



**Anexo 3** – Tabelas com os resultados estatísticos do teste do cometa realizados através do programa de estatística básica Mann Whitney U-test, onde em azul estão representados os resultados significantes e em vermelho os não-significantes para *O. niloticus*.

Mann-Whitney U Test  
(projeto.sta)  
By variable VAR1  
**controle X 5µg/L**

ID	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
	73	98	18	-1,95475	0,050621	-1,95981	0,050026	10	8	0,054527

Mann-Whitney U Test  
(projeto.sta)  
By variable VAR1  
**controle x 103,725µg/L**

ID	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
	55	155	0	-3,77964	0,000157	-3,78391	0,000155	10	10	1,08E-05

Mann-Whitney U Test  
(projeto.sta)  
By variable VAR1  
**controle x 138µg/100g de peso**

ID	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
	55	116	0	-3,55409	0,00038	-3,55777	0,00037	10	8	4,57E-05

Mann-Whitney U Test  
(projeto.sta)  
By variable VAR1  
**controle x 69µg/100g de peso**

ID	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
	55	116	0	-3,55409	0,00038	-3,55777	0,000375	10	8	4,57E-05

**Anexo 4** – Tabelas com os resultados estatísticos do teste do cometa realizados através do programa de estatística básica Mann Whitney U-test, onde em azul estão representados os resultados significantes e em vermelho os não-significantes para *A. bimaculatus*

Mann-Whitney U Test  
(projeto.sta)  
By variable VAR1  
**controle x 103,725µg/L**

ID	Rank Sum	Rank Sum	U	Z	p-level	Z	adjusted	p-level	Valid N	Valid N	2*1sided
	Group 1	Group 2							Group 1	Group 2	exact p
	36	135	0	-3,55409	0,00038	-3,55409	0,00038	8	10	4,57E-05	

Mann-Whitney U Test (projeto.sta)  
By variable VAR1  
**Controle X 368,8µg/100g de peso**

ID	Rank Sum	Rank Sum	U	Z	p-level	Z	adjusted	p-level	Valid N	Valid N	2*1sided
	Group 1	Group 2							Group 1	Group 2	exact p
	36	84	0	-3,24037	0,001195	-3,24037	0,001195	8	7	0,000311	

Mann-Whitney U Test (projeto.sta)  
By variable VAR1  
**Controle X 245,86µg/100g de peso**

ID	Rank Sum	Rank Sum	U	Z	p-level	Z	adjusted	p-level	Valid N	Valid N	2*1sided
	Group 1	Group 2							Group 1	Group 2	exact p
	41	95	5	-2,83557	0,004577	-2,83557	0,004577	8	8	0,002953	

**Anexo 5** - Tabelas com os resultados estatísticos do teste necrose versus apoptose realizados através do teste-t, onde em azul estão representados os resultados significantes e em vermelho os não-significantes para *O. niloticus*.

test-t  
viabilidade: cont X 1,0 ml de MC

	Mean	Mean	t-			Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
	G_1:1	G_2:2	value	df	p	G_1:1	G_2:2	G_1:1	G_2:2	variancs	variancs
VAR2	473	312,5	3,511	14	0,003457	8	8	38,191	123,521	10,4605	0,00614

test-t  
viabilidade: cont X 0,5 MC

	Mean	Mean	t-			Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
	G_1:1	G_2:3	value	df	p	G_1:1	G_2:3	G_1:1	G_2:3	variancs	variancs
VAR2	473	441,4	0,928	14	0,369167	8	8	38,191	88,5082	5,3708	0,0413

test-t  
necroses: cont. X 1,0 ml MC

	Mean	Mean	t-			Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
	G_1:1	G_2:2	value	df	p	G_1:1	G_2:2	G_1:1	G_2:2	variancs	variancs
VAR3	20,8	175	-3,12	14	0,007547	8	8	33,982	135,703	15,9471	0,00165

test-t  
necroses: cont. X 0,5 ml MC

	Mean	Mean	t-			Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
	G_1:1	G_2:3	value	df	p	G_1:1	G_2:3	G_1:1	G_2:3	variancs	variancs
VAR3	20,8	58,75	-1,13	14	0,277388	8	8	33,982	88,8204	6,83163	0,02136

test-t  
apoptoses: cont. X 1,0 ml MC

	Mean	Mean	t-			Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
	G_1:1	G_2:2	value	df	p	G_1:1	G_2:2	G_1:1	G_2:2	variancs	variancs
VAR4	4,63	5,625	-0,61	14	0,550657	8	8	3,7009	2,77424	1,77958	0,46478

test-t

apoptose: cont. X 0,5 ml MC

	Mean	Mean	t-			Valid	Valid	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
	G_1:1	G_2:3	value	df	p	G_1:1	G_2:3	G_1:1	G_2:3	variancs	variancs
VAR4	4,63	12,5	-3,17	14	0,006832	8	8	3,7009	5,97614	2,60756	0,22933

**Anexo 6** - Tabelas com os resultados estatísticos do teste necrose versus apoptose realizados através do teste-t, onde em azul estão representados os resultados significantes e em vermelho os não-significantes para *A. bimaculatus*.

teste-t  
viabilidade: controle X 0,3 ml  
MC

	Mean G_1:1	Mean G_2:2	t-value	df	p	Valid N G_1:1	Valid N G_2:2	Std.Dev. G_1:1	Std.Dev. G_2:2	F-ratio variances	p variances
VAR2	94,775	79,125	3,8243	14	0,0019	8	8	5,86655	9,97765	2,89262	0,18447

test-t  
viabilidade: controle X 0,2 ml  
MC

	Mean G_1:1	Mean G_2:3	t-value	df	p	Valid N G_1:1	Valid N G_2:3	Std.Dev. G_1:1	Std.Dev. G_2:3	F-ratio variances	p variances
VAR2	94,775	86,047	2,9638	14	0,0103	8	8	5,86655	5,91319	1,01596	0,98387

teste-t  
necroses: controle X 0,3 ml  
MC

	Mean G_1:1	Mean G_2:2	t-value	df	p	Valid N G_1:1	Valid N G_2:2	Std.Dev. G_1:1	Std.Dev. G_2:2	F-ratio variances	p variances
VAR3	4,175	15,625	3,0086	14	0,0094	8	8	5,72257	9,11729	2,53833	0,24223

teste-t  
necroses: controle X 0,2 ml  
MC

	Mean G_1:1	Mean G_2:3	t-value	df	p	Valid N G_1:1	Valid N G_2:3	Std.Dev. G_1:1	Std.Dev. G_2:3	F-ratio variances	p variances
VAR3	4,175	6,0274	0,7943	14	0,4403	8	8	5,72257	3,2811	3,04189	0,16537

teste-t  
apoptose: controle X 0,3 ml  
MC

	Mean G_1:1	Mean G_2:2	t-value	df	p	Valid N G_1:1	Valid N G_2:2	Std.Dev. G_1:1	Std.Dev. G_2:2	F-ratio variances	p variances
VAR4	1,4	5,375	-6,542	14	1E-05	8	8	0,63246	1,59799	6,38393	0,02582

teste-t  
 apoptose: controle X 0,2 ml  
 MC

	Mean G_1:1	Mean G_2:3	t-value	df	p	Valid N G_1:1	Valid N G_2:3	Std.Dev. G_1:1	Std.Dev. G_2:3	F-ratio variances	p variances
VAR4	1,05	6,6436	2,9894	14	0,0098	8	8	0,71514	5,24385	53,767	3E-05