



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

ANA PAULA MILLET EVANGELISTA DOS SANTOS

**HEPATOTOXICIDADE EM TILÁPIA DO NILO
(OREOCHROMIS NILOTICUS) ASSOCIADA À
MICROCISTINA**

**Londrina
2007**

ANA PAULA MILLET EVANGELISTA DOS SANTOS TRAD

HEPATOTOXICIDADE EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) ASSOCIADA À MICROCISTINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal – Área de Concentração: Sanidade Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense

Londrina
2007

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S237h Santos, Ana Paula Millet Evangelista dos.
Hepatotoxicidade em tilápia do nilo (*Oreochromis Niloticus*) associada à microcistina / Ana Paula Millet Evangelista dos Santos. – Londrina, 2007.
89f. : il.

Orientador: Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense.
Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2007.
Inclui bibliografia.

1. Tilápia (Peixe) – Doenças – Teses. 2. Cianobactéria – Teses. 3. Toxicologia veterinária – Teses. I. Bracarense, Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:597.583.4

ANA PAULA MILLET EVANGELISTA DOS SANTOS TRAD

HEPATOTOXICIDADE EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) ASSOCIADA À MICROCISTINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Paula Frederico Rodrigues
Loureiro Bracarense
Universidade Estadual de Londrina – PR

Prof. Dr. Antônio Carlos Faria dos Reis
Universidade Estadual de Londrina – PR

Profa. Dra. Cláudia Martinez Bueno
Universidade Estadual de Londrina – PR

Profa. Dra. Daisy Pontes Netto
Universidade Estadual de Londrina – PR

Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka
Universidade Estadual de Londrina – PR

Londrina, 28 de junho de 2007.

*Aos meus pais e irmãos pelo amor, credibilidade e
incentivo durante todos estes anos
A meu esposo Bakos, pelo amor, unicidade
e pela imensa compreensão durante mais esta jornada
À minha filha Izadora,
pela falta de dedicação exclusiva
nestes primeiros meses de vida*

AGRADECIMENTOS

À DEUS pelo dom da vida, pelo cuidado e pela feliz condução de todas as etapas de minha vida.

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense pelo carinho, pela amizade, paciência e pelo encantamento científico transmitidos, durante a execução de mais este trabalho.

À profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka pela grata oportunidade de trabalhar em equipe e pela otimização do material científico estudado.

À Elisabete Hiromi Hashimoto e Aniê Ieda Francabandiera, do Programa de Pós-Graduação do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos – UEL, pela parceria nesta pesquisa.

Aos professores do Curso de Medicina Veterinária – UEL, em especial aos professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, pela contribuição na minha formação acadêmica, pela amizade e carinho sempre manifestos.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva - UEL que, direta ou indiretamente, colaboraram na execução das atividades inerentes ao trabalho.

À Fundação Faculdades Luiz Meneghel - Bandeirantes – PR, pela liberação concedida para a realização desta pós-graduação.

A todos os amigos e colegas da Fundação Faculdades Luiz Meneghel, com quem compartilhei ansiedade, alegria e alguns sonhos.

À profa. Maria Aparecida Valério, da Fundação Faculdades Luiz Meneghel, pela colaboração na análise estatística.

Aos amigos Cláudia Boselli, Luciana Takemura, Kleber, Lucienne Giordano, Kerlei Médici, Reginaldo Luís de Oliveira e estagiários do Laboratório de Anatomia Patológica - DMVP-UEL que contribuíram em muitas das atividades laboratoriais e também, pelos momentos descontraídos.

À minha família que, em meio à minha ausência ou ansiedade, torceu pelo início e também pelo fim de mais esta trajetória profissional.

A todos que, com boa intenção, colaboraram para a realização deste trabalho.

*“Ando devagar, porque já tive pressa
E levo esse sorriso, porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte
Mais feliz quem sabe
Só levo a certeza, de que muito pouco eu sei
ou nada sei...”*

*Conhecer a manhas e as manhãs
O sabor das massas e das maçãs*

*É preciso amor pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso a chuva para florir....*

*Penso que cumprir a vida
Seja simplesmente, compreender a marcha, ir tocando em frente...*

*Como um velho boiadeiro
Levando a boiada
Eu vou tocando os dias,
pela longa estrada eu vou
estrada eu sou...*

*Conhecer a manhas e as manhãs
O sabor das massas e das maçãs...*

*É preciso amor pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso a chuva para florir....*

*Todo mundo ama um dia
Todo mundo chora,
Um dia a gente chega, no outro vai embora...
Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
e ser feliz....*

*Conhecer a manhas e as manhãs
O sabor das massas e das maçãs...*

*É preciso amor pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso a chuva para florir....*

*Ando devagar, porque já tive pressa
E levo esse sorriso, porque já chorei demais...*

*Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz e ser feliz...”*

SANTOS, Ana Paula Millet Evangelista dos. **Hepatotoxicidade em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) associada à microcistina**. 2007. 103f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

Falhas zootécnicas na aquicultura podem favorecer a eutrofização da água e a floração de cianobactérias, dentre as quais a *Microcystis aeruginosa*, responsável pela produção de microcistinas (MCs). O efeito citotóxico da microcistina (MC) tem sido descrito no fígado de diversos animais. A MC inibe as proteínas fosfatases 1 e 2A, o que acarreta a destruição do citoesqueleto celular, o descontrole na divisão celular e promoção tumoral. A presença da MC na cadeia alimentar e em fontes de água destinadas ao consumo representa risco à saúde humana e animal, podendo muitas vezes levar à morte. O objetivo deste trabalho foi avaliar os achados histológicos empregando-se as colorações hematoxilina e eosina, Mallory e o ácido periódico de Shiff no fígado de tilápias expostas ao extrato celular de *Microcystis aeruginosa* da linhagem BCCUSP 262 por imersão e por inoculação intraperitoneal (ip), contendo várias concentrações de MCs. Objetivou-se também avaliar a proliferação dos hepatócitos desses animais, pelos métodos histoquímico (AgNOR) e imunoistoquímico (PCNA). Tilápias foram expostas, durante 72 horas, por imersão em água contendo 30,1, 60,2 e 150,5 µg/L de 7-desmetil MC-LR e 0,25, 0,5 e 1,25 µg/L de MC-LW e inoculadas ip em dose única com 0,602, 1,204 e 3,01 µg/Kg de 7-desmetil MC-LR e 0,005, 0,01 e 0,025 µg de MC-LW/Kg de peixe vivo e avaliadas após 72 horas. Outro grupo de tilápias foi também exposto por inoculação ip em dose única com $2,845 \times 10^{-4}$ µg MC-LR, $1,131 \times 10^{-4}$ µg MC-LW e $1,707 \times 10^{-4}$ µg MC-LF/Kg de peixe vivo e avaliadas após 15 dias. A análise histológica revelou megalocitose nos animais inoculados ip com a *Microcystis* BCCUSP 262 e necrose mais intensa também nestes animais. Figuras sugestivas de apoptose foram observadas nos animais imersos na maior concentração desse extrato, bem como nos inoculados ip (exceto com maior dose). A depleção de glicogênio hepático variou de moderada à intensa nos animais expostos à BCCUSP 262. Em alguns dos animais inoculados ip com este extrato e avaliados após 15 dias, a coloração histológica de Mallory confirmou a hipertrofia da parede de artéria hepática, evidenciada pela hematoxilina e eosina. Não houve diferença significativa na área e perímetro nuclear dos hepatócitos mensurados pelo AgNOR, entre os peixes controles e os expostos à BCCUSP 262, mas nestes houve uma tendência ao aumento no número de nucléolos e de pequenas AgNORs, distribuídas principalmente periféricamente na região nuclear. A marcação IHQ-PCNA nos animais expostos à BCCUSP 262 foi discreta e multi-focal nos grupos imersos e discreta e focal nos inoculados ip (72 horas) e foi moderada e multi-focal nos animais avaliados após 15 dias da inoculação ip. Não houve lesão e marcação imunoistoquímica nos fragmentos hepáticos do grupo controle. Os resultados do presente estudo demonstraram alterações histológicas e aumento na proliferação de hepatócitos de tilápias expostas à *Microcystis aeruginosa* da linhagem BCCUSP 262.

Palavras-chave: Tilápia. Microcistina. Hepatotoxicidade. Apoptose. PCNA. AgNOR.

SANTOS, Ana Paula Millet Evangelista dos. **Hepatotoxicidade em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) associada à microcistina**. 2007. 103f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

Incorrect management in fisheries could induce water eutrophication, leading to cyanobacteria bloom. The occurrence of these blooms induces a severe problem, as *Microcystis aeruginosa*, the most widespread distributed cyanobacteria, can produce microcystins (MC). Toxic effects of MC have been described in liver. Microcystin is taken up specifically into the liver by bile acid transporters and, after entering the cytoplasm, inhibit protein phosphatases 1 and 2A, which leads to the increase in protein phosphorylation. This reaction has two main consequences: the destruction of cytoskeleton directly causing cytotoxic effects, and deregulation of cell division, leading to tumor-promoting activity. It has been also documented that MC hepatotoxicity is closely associated with intracellular reactive oxygen species formation. The persistence of MC in freshwater food chain or water sources is therefore a hazard to human and animal health, leading to death many times. The aim of this study is to evaluate histological findings and cell proliferation in the liver of tilapias exposed to *Microcystis aeruginosa* (BCCUSP 262) cell extracts containing various concentrations of microcystins for 72 h or 15 days. Tilapias exposed for 72 h were immersed in water containing 30.1, 60.2 and 150 µg/L of MC-LR and 0.25, 0.5 and 1.25 µg/L of MC-LW or inoculated intraperitoneally (ip) with 0.6, 1.2 and 3.01 µg/Kg body weight of MC-LR and 0.005, 0.01 and 0.025 µg/Kg body weight of MC-LW. Tilapias exposed for 15 days were inoculated ip with 2.84×10^{-4} µg MC-LR, 1.13×10^{-4} µg MC-LW and 1.71×10^{-4} µg MC-LF/Kg body weight. Histological analysis revealed figures suggestive of apoptosis, necrosis, megalocytosis, and glycogen depletion of hepatocytes, mainly in intraperitoneally inoculated fish. AgNOR morphometry showed no significant difference in exposed and control fish, although exposed fish showed more nucleolus and small AgNORs distributed in the nucleus periphery. Liver immunohistochemistry with PCNA stained positive in exposed fish. No lesions or immunohistochemical staining were observed in control group. Results of the present study indicated that tilapias exposed by immersion or intraperitoneally with different doses of cell extracts of *Microcystis aeruginosa* (BCCUSP 262) showed histological lesions and an increase in hepatocyte proliferation.

Keywords: Tilapia. Microcystin. Hepatotoxicity. Apoptosis. PCNA. AgNOR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1. ARTIGO 1

- Figura 1** – Fotomicrografia de fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à 7-desmetil MC-LR e MC-LW, por imersão com extrato de *Microcystis aeruginosa* (5×10^4 células), evidenciando hepatócito normal; hepatócito com núcleo sugestivo de apoptose e vesículas intracitoplasmáticas. H.E (Barra de 10 μm) 68
- Figura 2** – Fotomicrografia de fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à 7-desmetil MC-LR e MC-LW, por inoculação intraperitoneal com extrato de *Microcystis aeruginosa* (2×10^5 células), evidenciando hepatócito em megalocitose e hepatócito normal. H.E. (Barra de 10 μm)..... 68
- Figura 3** – Fotomicrografia de fígado de tilápia (*O. niloticus*) evidenciando hepatócitos normais repletos de glicogênio - grupo controle. PAS (Barra de 10 μm) 69
- Figura 4** – Fotomicrografia de fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à 7-desmetil MC-LR e MC-LW, por imersão com extrato de *Microcystis aeruginosa* (1×10^4 células), evidenciando depleção moderada de glicogênio: hepatócito repleto de glicogênio e hepatócito com depleção glicogênio. PAS (Barra de 10 μm) 69
- Figura 5** – Morfometria de regiões organizadoras de nucléolos marcadas pela prata (AgNORs) em fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à 7-desmetil MC-LR e MC-LW, por imersão com extrato de *Microcystis aeruginosa* (5×10^4 células). AgNOR (Barra de 10 μm)..... 70
- Figura 6** – Morfometria de hepatócito de tilápia (*O. niloticus*) exposta à 7-desmetil MC-LR e MC-LW, por inoculação intraperitoneal com extrato de *Microcystis aeruginosa* (2×10^5 células), evidenciando hepatócito em megalocitose com AgNORs dispersas periféricamente. AgNOR (Barra de 10 μm) 70
- Figura 7** – Fotomicrografia de fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à 7-desmetil MC-LR e MC-LW, por imersão com extrato de *Microcystis aeruginosa* (5×10^4 células), evidenciando marcação positiva com anticorpo anti-PCNA em hepatócitos. IHQ (Barra de 10 μm)..... 71

Figura 8 – Fotomicrografia de fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à 7-desmetil MC-LR e MC-LW, por inoculação intraperitoneal com extrato de *Microcystis aeruginosa* (2×10^5 células), evidenciando marcação positiva com anticorpo anti-PCNA em hepatócitos. IHQ (Barra de 10 μ m)71

2. ARTIGO 2

Figura 1 – Fotomicrografia de fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à MC-LR, MC-LF e MC-LW, por inoculação intraperitoneal com extrato de *Microcystis aeruginosa* (1×10^5 células), evidenciando hipertrofia de parede da artéria hepática. Mallory (Barra de 10 μ m)95

Figura 2 – Fotomicrografia de fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à MC-LR, MC-LF e MC-LW, por inoculação intraperitoneal com extrato de *Microcystis aeruginosa* (1×10^5 células), evidenciando vesícula intracitoplasmática e hepatócito em apoptose. H.E. (Barra de 10 μ m)95

Figura 3 – Fotomicrografia de fígado de tilápia (*O. niloticus*) evidenciando hepatócitos normais repletos de glicogênio – grupo controle. PAS (Barra de 10 μ m)96

Figura 4 – Fotomicrografia de fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à 7-desmetil MC-LR e MC-LW, por inoculação ip com extrato de *Microcystis aeruginosa* (1×10^5 células), evidenciando núcleo celular e intensa depleção de glicogênio hepático. PAS (Barra de 10 μ m)96

Figura 5 – Morfometria de regiões organizadoras de nucléolos marcadas pela prata (AgNORs) em fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à MC-LR, MC-LF e MC-LW, por inoculação intraperitoneal com extrato de *Microcystis aeruginosa* (1×10^5 células). AgNOR (Barra de 10 μ m)97

Figura 6 – Morfometria de regiões organizadoras de nucléolos marcadas pela prata (AgNORs) em fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à MC-LR, MC-LF e MC-LW, por inoculação intraperitoneal com extrato de *Microcystis aeruginosa* (1×10^5 células), evidenciando hepatócito em megalocitose com AgNORs dispersas periféricamente. AgNOR (Barra de 10 μ m)97

- Figura 7** – Fotomicrografia de fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à MC-LR, MC-LF e MC-LW, por inoculação intraperitoneal com extrato de *Microcystis aeruginosa* (1×10^5 células), evidenciando marcação positiva com anticorpo anti-PCNA em hepatócitos. IHQ (Barra de 10 μm)98
- Figura 8** – Fotomicrografia de fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à MC-LR, MC-LF e MC-LW, por inoculação intraperitoneal com extrato de *Microcystis aeruginosa* (1×10^5 células), evidenciando marcação positiva com anticorpo anti-PCNA em hepatócitos. IHQ (Barra de 10 μm)98

LISTA DE TABELA

1. ARTIGO 1

- Tabela 1** – Alterações histológicas hepáticas induzidas pelas microcistinas 7-desmetil MC-LR e MC-LW em tilápias (*O. niloticus*) expostas à *Microcystis aeruginosa*, por imersão (im) e por inoculação intraperitoneal (ip), por 72 horas65
- Tabela 2a** – Morfometria nuclear e de AgNORs, pelo método histoquímico AgNOR, em hepatócitos de tilápias (*O. niloticus*) expostas por imersão (im), por 72 horas, a diferentes concentrações de *Microcystis aeruginosa*, contendo 7-desmetil MC-LR e MC-LW66
- Tabela 2b** – Morfometria nuclear e de AgNORs, pelo método histoquímico AgNOR, em hepatócitos de tilápias (*O. niloticus*) expostas por inoculação intraperitoneal (ip), por 72 horas, a diferentes concentrações de *Microcystis aeruginosa*, contendo 7-desmetil MC-LR e MC-LW66
- Tabela 3** – Freqüência média e número de AgNORs por célula, pelo método histoquímico AgNOR, em hepatócitos de tilápias (*O. niloticus*) expostas ao extrato de *Microcystis aeruginosa*, contendo 7-desmetil MC-LR e MC-LW, por imersão (im) e por inoculação intraperitoneal (ip), por 72 horas67

2. ARTIGO 2

- Tabela 1** – Alterações histológicas em fígado de tilápias (*Oreochromis niloticus*), expostas à MC-LR, MC-LF e MC-LW, por inoculação intraperitoneal com extrato de *Microcystis aeruginosa* (1x10⁵ células), avaliadas 15 dias93
- Tabela 2** – Morfometria nuclear e número médio de AgNORs por célula, pelo método histoquímico AgNOR, em hepatócitos de tilápias (*O. niloticus*) expostas ao extrato de *Microcystis aeruginosa*, contendo MC-LR, MC-LW e MC-LF, por inoculação intraperitoneal (ip), avaliadas 15 dias após.....94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MC – Microcistina

MCs – Microcistinas

HE – Hematoxilina e Eosina

PAS – Ácido periódico de Schiff

IHQ – Imunoistoquímica

PCNA – Antígeno Nuclear de Proliferação Celular

AgNOR – Regiões Organizadoras de Nucléolos marcadas pela prata

NORs – Regiões Organizadoras de Nucléolos

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

IM / Im – imersão

IP / ip – intraperitoneal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 HEPATOTOXICIDADE ASSOCIADA À MICROCISTINA	18
2.2 REFERÊNCIAS.....	39
3 OBJETIVOS	46
3.1 OBJETIVO GERAL.....	46
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
4 ARTIGOS	47
ARTIGO 1 – “ACHADOS HISTOLÓGICOS E PROLIFERAÇÃO CELULAR EM FÍGADO DE TILÁPIAS (<i>Oreochromis niloticus</i>) ASSOCIADOS À MICROCISTINA – ENSAIO EXPERIMENTAL AGUDO”	48
RESUMO.....	48
ABSTRACT	49
INTRODUÇÃO	49
MATERIAL E MÉTODOS.....	52
ANIMAIS	52
INÓCULO - <i>Microcystis aeruginosa</i> E MICROCISTINAS.....	53
EXTRAÇÃO DE MICROCISTINAS	53
DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROCISTINAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO ELECTRON- SPRAY (IES-CL-EM).....	54
PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	54
GRUPO 1 - IMERSÃO EM <i>Microcystis aeruginosa</i>	54
GRUPO 2 – INOCULAÇÃO (ip) COM <i>Microcystis aeruginosa</i>	55
PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	55
PROCESSAMENTO HISTOQUÍMICO.....	56
PROCESSAMENTO IMUNOISTOQUÍMICO	56
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57

RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
AGRADECIMENTOS	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

ARTIGO 2 – “ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS E AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR EM FÍGADO DE TILÁPIAS (<i>Oreochromis niloticus</i>) ASSOCIADAS À MICROCISTINA – ENSAIO EXPERIMENTAL SUBCRÔNICO”	78
RESUMO.....	78
ABSTRACT	79
INTRODUÇÃO	79
MATERIAL E MÉTODOS.....	82
ANIMAIS	82
INÓCULO - <i>Microcystis aeruginosa</i> E MICROCISTINAS.....	82
EXTRAÇÃO DE MICROCISTINAS	83
DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROCISTINAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO ELECTRON- SPRAY (IES-CL-EM).....	83
PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	84
GRUPO – INOCULAÇÃO (ip) COM <i>Microcystis aeruginosa</i>	84
PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	84
PROCESSAMENTO HISTOQUÍMICO	85
PROCESSAMENTO IMUNOISTOQUÍMICO	85
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	86
RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
AGRADECIMENTOS	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
5 CONCLUSÕES	103

1 INTRODUÇÃO

A expansão industrial, urbana e agrícola de forma não sustentável e falhas zootécnicas têm impactado diversos ecossistemas e contribuído para a eutrofização de águas destinadas ao consumo público ou às atividades de lazer (pesque-pague, pesque-solte).

A eutrofização das águas associada ao excesso de matéria orgânica além de alterar a capacidade de sobrevivência dos peixes favorece também o crescimento acelerado de organismos fitoplanctônicos, dentre os quais as microalgas e as cianobactérias. As cianobactérias são organismos procariontes e fotoautotróficos.

Vários fatores podem influenciar a floração de cianobactérias dentre os quais a estratificação, o excesso de nutrientes (principalmente, nitrogênio e fósforo), o tempo de retenção da água e a luminosidade e temperatura aumentadas.

Diversos gêneros e espécies de cianobactérias podem produzir substâncias tóxicas chamadas de cianotoxinas. Embora não esteja completamente esclarecido, acredita-se que a produção e a liberação das cianotoxinas estejam relacionadas com a competição entre os organismos fitoplanctônicos e que possam também inibir a predação por consumidores primários (larvas de peixes, moluscos, dentre outros). As cianotoxinas podem ser neurotóxicas, hepatotóxicas ou podem ser também irritantes ao contato, devido à presença de lipopolissacarídeos (endotoxinas pirogênicas).

Dentre as principais espécies de cianobactérias toxigênicas, destaca-se a *Microcystis aeruginosa* produtora de microcistina, toxina esta caracterizada como heptapeptídeo cíclico, sendo extremamente hepatotóxica ao homem e aos animais. Existem mais de 60 variantes de microcistinas, sendo a microcistina-LR (MC-LR) a mais frequentemente produzida e por isso, mais estudada.

A exposição à microcistina pode ocorrer diretamente por ingestão, inalação, contato, inoculação intravenosa ou indiretamente, pelo consumo de animais (peixes e moluscos) que podem ingerir as cianobactérias e suas toxinas.

Uma vez absorvida, a microcistina interage com os hepatócitos por meio dos receptores dos ácidos biliares, promovendo a destruição do citoesqueleto

e a perda da adesão intercelular dos hepatócitos. Nos mamíferos a destruição da arquitetura hepática e a alteração do endotélio sinusoidal podem promover o óbito, devido à grave hemorragia intra-hepática e ao choque hipovolêmico. Em peixes a morte tem sido atribuída à extensa necrose de hepatócitos e, conseqüentemente, ao mau funcionamento hepático.

Em doses subletais crônicas, a microcistina inibe as proteínas fosfatases (1 e 2A) celulares, importantes também no controle da divisão celular, favorecendo, portanto, a proliferação celular e a promoção tumoral. Por isso, a microcistina tem sido considerada importante promotor de neoplasia hepática.

A bioacumulação de microcistina tem sido relatada em invertebrados e vertebrados aquáticos, incluindo os peixes, que participam da cadeia alimentar humana. As conseqüências à saúde pública podem depender do nível de toxicidade da floração de cianobactérias, na área de coleta dos peixes.

Empregando-se técnicas histológicas convencionais, esta pesquisa visou identificar as principais alterações histológicas no fígado de tilápias (*O. niloticus*), expostas experimentalmente à microcistina, bem como observar pelos métodos histoquímico (AgNOR) e imunoistoquímico (IHQ-PCNA) a atividade proliferativa dos hepatócitos desses animais, uma vez que a microcistina é promotora tumoral e que as tilápias são economicamente importantes, no Estado do Paraná, mas também no âmbito nacional e mundial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Hepatotoxicidade associada à microcistina*

Hepatotoxicity associated with microcystin

Ana Paula Millet Evangelista dos Santos^{1**}; Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense²

Palavras-chave: *Microcystis aeruginosa*, microcistina, cianotoxinas, hepatotoxina, saúde pública.

Keywords: *Microcystis aeruginosa*, microcystin, cyanobacterial toxins, hepatotoxin, public health.

Categoria do trabalho: Revisão de literatura

Área de publicação da Semina: Ciências Agrárias

Área /sub-área do CNPq/CAPES: Medicina Veterinária / Patologia Animal

* Trabalho realizado com apoio da PROPPG-UEL .

¹Profa. Ass., Depto. Medicina Veterinária e Produção Animal - Fundação Faculdades Luiz Meneghel (FFALM), Bandeirantes-PR. Aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - Universidade Estadual de Londrina - PR (UEL-PR).

²Profa. Assoc., Depto. Medicina Veterinária Preventiva - UEL-PR. Bolsa Produtividade em Pesquisa, CNPq. anapaula@uel.br

**Endereço: Fundação Faculdades Luiz Meneghel, BR 369, Km 54, Cx. Postal 261. Bandeirantes – PR, CEP 86360-000, Fone: (43)-3542-8040, Fax: (43)-3542-8008, Departamento de Med.Veterinária e Produção Animal. e-mail: ap_millet@hotmail.com

RESUMO

Efluentes industriais e urbanos e a intensa exploração agrícola e de pescado têm levado à eutrofização de muitos mananciais de água, destinados ao consumo e às atividades recreacionais. A eutrofização das águas, freqüentemente, tem como consequência o desenvolvimento expressivo de cianobactérias. Estas florações induzem a sérios problemas, visto que a ocorrência de *Microcystis aeruginosa*, uma das cianobactérias mais difundidas, pode produzir microcistinas (MCs). O efeito citotóxico da microcistina (MC) tem sido descrito no fígado, pulmões, estômago e intestino. Mortes humanas, de animais silvestres e domésticos têm sido associadas à exposição a MC. Esta pode ocorrer diretamente por ingestão, inalação, contato, inoculação intravenosa ou indiretamente, pelo consumo de animais, dentre os quais os peixes e moluscos, que podem ingerir as cianobactérias e suas toxinas. A mais tóxica e também mais comum das MCs é a microcistina-LR (MC-LR), cujo órgão alvo é o fígado. A MC chega ao fígado especificamente por transporte dos ácidos biliares e, uma vez no citoplasma, inibe as proteínas fosfatases 1 e 2A, induzindo ao aumento da fosforilação protéica. Esta reação é reponsável pela destruição do citoesqueleto, pelos efeitos citotóxicos, pelo descontrole na divisão celular e, por isso, também responsável pela atividade de promoção tumoral. A exposição aguda à MC induz severa hemorragia intra-hepática, necrose e apoptose, enquanto a exposição crônica pode causar neoplasia hepática. Também tem sido relatado que a hepatotoxicidade da MC está intimamente associada à formação intracelular de espécies reativas de oxigênio. A MC pode ser naturalmente degradada por bactérias ou pela radiação solar. Contudo, se não houver eficiente degradação, a MC poderá persistir na cadeia alimentar aquática. A contaminação de águas pela MC representa, portanto, perigo à saúde humana e de animais. Assim, esforços para evitar a eutrofização de fontes de águas são essenciais para minimizar perigos à saúde pública.

ABSTRACT

Urban and industrial discharges, intense agricultural exploitation and fisheries have been causing the eutrophication in both drinking and recreational waters. A frequent consequence of eutrophication in waters is the massive development of cyanobacteria. The occurrence of these blooms induces a severe problem, as *Microcystis aeruginosa*, the most widespread distributed cyanobacteria, can produce microcystins (MC). Toxic effects of MC have been described in liver, lungs, stomach, and intestine. Deaths in wildlife, livestock and human beings were also associated with MC exposition. MC exposition can occur directly by ingestion, inhalation, contact, intravenous inoculation of contaminated water or indirectly, by the consumption of animals, as fish and mollusks, the major ingestors of cyanobacteria and its toxins. The most toxic MC, and also the most common is microcystin-LR (MC-LR), that has the liver as the main target organ. Microcystin is taken up specifically into the liver by bile acid transporters and, after entering the cytoplasm, inhibits protein phosphatases 1 and 2A, which leads to the increase in protein phosphorylation. This effect has two main consequences: the destruction of cytoskeleton directly causing cytotoxic effects, and deregulation of cell division, leading to tumor-promoting activity. Acute exposition to MC induces severe intrahepatic hemorrhage, necrosis and apoptosis, while chronic exposure can cause hepatic or intestinal neoplasia. It has been documented that MC hepatotoxicity is closely associated with intracellular reactive oxygen species formation. Natural degradation of microcystins depends on the solar radiation and bacteria. If degradation is insufficient, MC will persist in the freshwater food chain. Microcystin contamination of waters is therefore a hazard to human and animal health, so efforts to avoid eutrophication of water sources are essential, in order to minimize the risks to public health.

1 INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS DA AQUICULTURA MUNDIAL E BRASILEIRA

A aquicultura mundial tem crescido intensamente nos últimos 50 anos. Houve um aumento médio de 8% ao ano nesta atividade, especialmente entre 1950 e 2004. A produção que era menor que um milhão de toneladas até 1950 passou a 59,4 milhões de toneladas no ano de 2004, movimentando 70,3 bilhões de dólares. Neste panorama, a China foi responsável por 69,6% (41,3 milhões de toneladas) da produção aquícola. Outras regiões da Ásia e do Pacífico responderam por 21,9% e algumas regiões da Europa ocidental contribuíram com 3,5%. A América do Sul e o Caribe e a América do Norte contribuíram, respectivamente, por 2,3% e 1,3%. Na América do Sul, entre 1950 e 2004, a aquicultura cresceu em média 21,3% ao ano, principalmente no Equador, no Chile e no Brasil (FAO, 2006).

A produção comercial de organismos aquáticos mais representativos inclui o cultivo de 98 espécies de peixes, 18 de crustáceos, 10 de moluscos e 20 de plantas. Da produção total, 52% correspondem ao cultivo de peixes, 24,4% de plantas aquáticas, 18,6% de moluscos e 5% de crustáceos (CAMARGO & POUHEY, 2005). Dentre os peixes mais cultivados destacam-se algumas espécies de carpas (*Cyprinus carpio*, *Aristichthys nobilis*, *Ctenopharyngodon idella*, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Cirrhina mrigala*), bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), tilápia (*Oreochromis niloticus*), truta (*Salmo trutta*), salmão (*Salmo salar*), “milkfish” (*Chanos chanos*) e alguns peixes ornamentais (CAMARGO & POUHEY, 2005). Destas, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a segunda espécie de peixe mais importante no mundo, sendo somente menos cultivadas que as carpas (SCHMITTOU et al., 1997).

Segundo Camargo e Pouey (2005), a partir de 1950, três fatores contribuíram para a expansão da aqüicultura brasileira: a modernização dos meios de comunicação e de transporte, o aperfeiçoamento da reprodução artificial e o progresso na área da nutrição, que possibilitou o desenvolvimento de alimentos balanceados. Ainda segundo estes autores, os avanços na área da genética poderão, em pouco tempo, possibilitar o aumento do número de espécies aquáticas domesticadas.

Em 2002, a produção aqüícola brasileira correspondeu ao total de 251.827 toneladas, das quais 71,7% foram cultivadas em águas continentais e 28,3% em águas marinhas. Do montante produzido, 85% foi relativo ao cultivo de peixes de água doce (principalmente tilápias, carpas e bagres) e 15% ao cultivo de camarões e moluscos. A região sul foi a mais produtiva (75.916 toneladas), representando 35,1% da produção nacional (CAMARGO & POUHEY, 2005). De acordo com Kubitzka (2000), o Estado do Paraná tem se destacado nacionalmente na produção de tilápias. Em 2004, no âmbito mundial a produção total de tilápias foi de 1.694.998 toneladas, tendo sido o Brasil o sétimo maior produtor (4,07%) (FAO, 2006).

De forma geral, a contaminação ambiental intencional ou acidentalmente de fontes naturais tem aumentado vertiginosamente, devido à crescente carga de efluentes lançados em toda a biosfera e também, devido ao aprimoramento e à intensificação dos sistemas de cultivo animal. O desenvolvimento agrícola ou zootécnico associado a manejos incorretos por pessoas pouco experientes ou conscientes, também tem modificado diversos ecossistemas e impactado, negativamente, diferentes coleções de água (HASHIMOTO, 2002; SILVA, 2002; FIGUEIREDO et al., 2004). Deste modo, prosseguir com o desenvolvimento

industrial e tecnológico e ainda, preservar os diversos ecossistemas e recuperar o equilíbrio ecológico é talvez um dos maiores desafios do homem neste século XXI.

2. CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS

A deterioração ou a alteração dos parâmetros físico-químicos da água predispõem ao crescimento acelerado de plantas superiores e de microalgas, também conhecidas como cianofíceas, algas azuis ou cianobactérias (GOWEN, 1994), muitas das quais são utilizadas como fonte de alimento por várias espécies de peixes (MOHAMED & HUSSEIN, 2006).

As cianobactérias são organismos fotoautotróficos e procariontes, estruturalmente semelhantes às bactérias. Esses organismos fitoplanctônicos dependem basicamente de água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e de luz, obtendo energia, principalmente, por meio da fotossíntese (BEASLEY et al., 1989).

A floração algal, também conhecida como florescimento algal ou “bloom algal” (KAMOGAE et al, 2006; LI et al., 2007; XIE et al., 2007), ocorre preferencialmente em água doce, com pH entre 6 e 9, contendo elevada concentração de nutrientes (principalmente, nitrogênio e fósforo) e com temperatura entre 15° e 30°C. Além de alterar a biodiversidade aquática e as qualidades cênicas locais, a floração de cianobactérias predispõe à morte de organismos aquáticos devido ao decréscimo ainda maior nos níveis de oxigênio dissolvido e devido à liberação de substâncias tóxicas chamadas cianotoxinas (BEASLEY et al., 1989; MOHAMED & HUSSEIN, 2006).

A floração das cianobactérias é influenciada por fatores químicos, físicos e biológicos. Em condições ambientais desfavoráveis, como alterações bruscas na temperatura, pode haver a morte de cianobactérias e a liberação das cianotoxinas. Os fatores que levam à formação da toxina não são conhecidos. Contudo, há fortes indícios de correlação entre a formação desta e a sazonalidade, radiação solar, temperatura da superfície da água, pH e porcentagem de saturação de oxigênio (BEASLEY et al., 1989; CARMICHAEL, 1992; HAIDER et al., 2003). Acredita-se ainda que, a produção e a liberação das cianotoxinas estejam relacionadas com a competição entre os organismos fitoplanctônicos e que possam também inibir a predação por consumidores primários (larvas de peixes, moluscos, microcrustáceos, dentre outros) (FUNASA - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Considerando-se as propriedades toxicológicas, as cianotoxinas podem ser classificadas em neurotóxicas (anatoxina-a, saxitoxina), hepatotóxicas (microcistina, nodularina, cilindrospermopsina) ou irritantes ao contato, devido à presença de lipopolissacarídeos, menos patogênicos que os lipopolissacarídeos de bactéria Gram negativas (FUNASA - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003; MSAGATI et al., 2006). As cianotoxinas são também consideradas citotóxicas, imunotóxicas, embriotóxicas e genotóxicas (VAJCOVÁ et al., 1998). Em relação à estrutura química as cianotoxinas podem ser incluídas no grupo dos peptídeos cíclicos (microcistina, nodularina), no grupo dos alcalóides (neurotoxinas, cilindrospermopsina) e no grupo dos lipopolissacarídeos (MSAGATI et al., 2006).

Várias espécies de cianobactérias podem produzir toxinas potentes em ambientes aquáticos. Dentro de uma mesma espécie podem existir cepas produtoras de toxinas ou não. As toxinas são metabólitos secundários à formação dos fotopigmentos e podem permanecer acumuladas no citoplasma das

cianobactérias (CARMICHAEL, 1992; PAER & MILLIE, 1996). No Brasil 82% das cepas de cianobactérias isoladas são toxigênicas (SOARES et al., 2004). Já foram registradas em diferentes ambientes aquáticos brasileiros pelo menos 20 espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas, incluídas em 14 gêneros (SANT'ANNA & AZEVEDO, 2000).

Segundo Vieira et al. (2005) pesquisas têm demonstrado a ocorrência de florações algais, potencialmente tóxicas, em diferentes regiões do país como Rio Grande do Sul, Distrito Federal, Pernambuco, Alagoas, Pará e no Rio de Janeiro. Concentrações de microcistinas entre 0,5 e 100 µg/L foram detectadas em reservatórios de água destinados ao consumo público no Estado de São Paulo e entre 0,5 e 1,11 µg/L, no Estado de Minas Gerais.

No Estado do Paraná pesquisas também demonstraram a ocorrência natural das cianotoxinas em mananciais e na piscicultura regional, atividade que está em ampla expansão (HIROOKA et al., 1999; HASHIMOTO, 2002 e 2003; KAMOGAE et al, 2006). Neste Estado, Hirooka et al. (1999) detectaram a *Microcystis aeruginosa* em amostras de água destinadas ao consumo público, à recreação, à aqüicultura e ao consumo de animais. No monitoramento realizado por estes autores, entre 1995 e 1996, foram observadas concentrações de microcistinas entre 0,2 e 6,6 µg/L em águas na região do lago Itaipu, destinadas ao consumo público e entre 6,38 e 10 µg/L em águas destinadas à recreação. Ainda, entre 1999 e 2001, Kamogae et al. (2006) relataram concentrações de microcistinas variando entre 0,134 e 240 µg/L e também de florações tóxicas, em rios desse mesmo Estado.

3. MICROCISTINA

Existem 150 gêneros com aproximadamente 2000 espécies de cianobactérias, das quais 40 são conhecidamente toxigênicas (HAIDER et al., 2003). As espécies identificadas como produtoras de hepatotoxinas estão incluídas nos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc* e *Cylindrospermopsis*, dos quais se destaca a *Microcystis aeruginosa* (CARMICHAEL, 1992).

A estrutura química das microcistinas, heptapeptídeos cíclicos, é D-Ala X D MeAsp Z ADDA D GLU Mdha, onde “X” e “Z” correspondem aos dois L-aminoácidos variáveis, D MeAsp é D eritro ácido metilaspártico, Mdha é N-metildeidroalanina e ADDA é o ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8,trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienóico, ao qual se atribui a hepatotoxicidade da microcistina (CHORUS & BARTRAM, 1999). Existem mais de 60 variantes de microcistinas diferenciadas pela constituição dos L-aminoácidos, nas posições “2” (ou “X”) e “4” (ou “Z”) (Figura 1). Dentre as variantes mais importantes e, por isso, mais estudadas, destaca-se a microcistina-LR, constituída dos aminoácidos leucina (L) e arginina (R), seguida das microcistina-RR (arginina; arginina) e microcistina-YR (tirosina; arginina) (FIGUEIREDO et al., 2004).

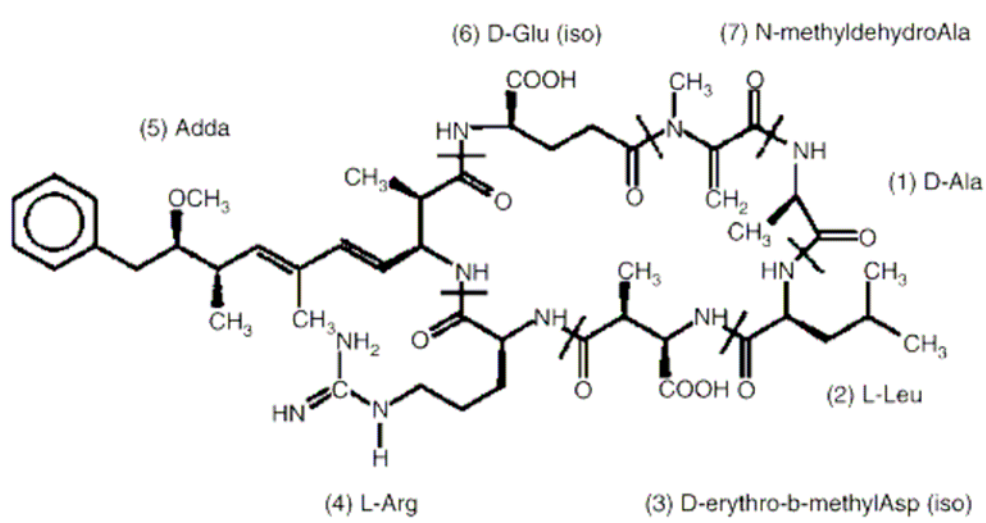


Figura 1- Estrutura química da microcistina-LR (CHEN et al., 2006).

4. PATOGENIA E HISTOPATOLOGIA RELACIONADA À MICROCISTINA

O fígado é o órgão alvo da microcistina, uma vez que demonstra ser mais citotóxica aos hepatócitos do que a outros tipos celulares (McDERMOTT et al., 1998; ZHAN et al., 2004). Contudo, necrose e/ou apoptose podem ocorrer não somente nestas células. Estudos *in vitro* demonstraram os efeitos citotóxicos da microcistina-LR em células humanas como eritrócitos, linfócitos, células endoteliais, epiteliais e fibroblastos (McDERMOTT et al., 1998; LANKOFF et al., 2004; SICINSKA et al., 2006), bem como em promielócitos de ratos (McDERMOTT et al., 1998) e em linfócitos de galinha e de carpas (LANKOFF et al., 2004; ZHANG et al., 2006). Estudos *in vivo* relataram também efeitos nefrotóxicos em ratos (MILUTINOVIC et al., 2003), em carpas (RABERGH et al., 1991; FISCHER & DIETRICH, 2000) e em trutas (KOTAK et al., 1996) e ainda, efeitos citotóxicos gastrintestinais em camundongos (BOTHHA et al., 2004) e em ratos (NOBRE et al., 2004).

Quando há ingestão de cianobactérias, a microcistina é liberada no estômago ou, preferencialmente, no íleo. Uma vez absorvida, a microcistina rapidamente chega ao fígado pela circulação sangüínea (portal) e por meio de receptores dos ácidos biliares, interage com os hepatócitos, provocando alterações no citoesqueleto celular (microfilamentos de actina e filamentos intermediários) (BEASLEY et al., 1989). A perda da adesão intercelular e a retração dos hepatócitos são responsáveis também pela perda de contato destes com os capilares sinusóides. A destruição da arquitetura hepática ocasiona, em minutos ou horas, choque hipovolêmico devido ao seqüestro de sangue pelo fígado (hemorragia intra-hepática) (BEASLEY et al., 1989; LeCLAIRE et al., 1995) ou insuficiência hepática, em algumas horas ou dias (BEASLEY et al., 1989). Devido à perda de adesão intercelular, hepatócitos de animais de laboratório inoculados com microcistina-LR já foram observados,

eventualmente, em vasos sangüíneos pulmonares e renais (BEASLEY et al., 1989; HOOSER et al., 1990).

Weng et al. (2007) salientaram que a microcistina (MC-LR) é responsável pela indução de apoptose de hepatócitos e pela destruição da arquitetura hepática, embora os mecanismos envolvidos não estejam completamente esclarecidos. Segundo estes autores, em camundongos inoculados intraperitonealmente com MC-LR, em dose única (60 µg/Kg de peso corporal, por 12 horas), a microcistina levou ao estresse oxidativo, à diminuição do potencial da membrana mitocondrial e à expressão das proteínas Bax e Bid, ativando assim os sinais desencadeadores da apoptose, como por exemplo a ativação das caspases.

McDermott et al. (1998) relataram que a apoptose pode estar relacionada com a hiperfosforilação de proteínas do citoesqueleto (citoqueratina 8 e 18), bem como com a hiperfosforilação de proteínas mais diretamente envolvidas com este tipo de morte celular (p53, Bcl-2). Segundo estes autores, no estudo *in vitro*, baixas doses de microcistina (0,8 µM) induziram a apoptose em hepatócitos de ratos, 30 minutos após a exposição, enquanto que em outros cultivos celulares (fibroblasto humano, células endoteliais humanas, promielócitos de ratos) a apoptose foi observada na exposição à dose de 100 µM. Fu et al. (2005) relataram que a apoptose induzida pela microcistina-LR está associada à alteração na expressão das proteínas p53, Bcl-2 e Bax, tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

Fischer et al. (2000) realizaram ensaio experimental com trutas (*Oncorhynchus mykiss*) e observaram que a necrose pode estar associada à inibição reversível ou irreversível das proteínas fosfatases-1 (PP-1) pela microcistina, enquanto que a apoptose, pode estar associada à inibição irreversível das proteínas fosfatases-2 (PP-2). Esta hipótese justificaria porque, em exposições subcrônicas,

ocorrem áreas de necrose de hepatócitos, próximas a áreas com hepatócitos normais ou em apoptose. Zhang et al. (2006) demonstraram *in vitro* que em linfócitos de carpas a microcistina-LR (MC-LR) e a microcistina-RR (MC-RR) induzem à apoptose. Os autores sugerem que ensaios que detectem a ocorrência de apoptose poderiam ser utilizados como biomarcadores da floração de cianobactérias toxigênicas.

A PP-1 desempenha importante papel em vários processos celulares (genéticos, bioquímicos). Mutações nesta proteína seriam responsáveis por defeitos na mitose, meiose, na integridade celular e no metabolismo do glicogênio. A PP-2 também está associada com a integridade do citoesqueleto e assim como a PP-1, participa na modulação da motilidade celular, diferenciação e citocinese. Ambas as proteínas regulam a proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (LIN et al., 1999 e SONTAG, 2001 apud AOYAMA et al., 2003; XING et al., 2006).

Além de alterar o citoesqueleto celular, em doses subletais crônicas, a microcistina inibe as proteínas fosfatases (PP-1 e PP-2A), que em conjunto com as quinases protéicas regulam o mecanismo de fosforilação e desfosforilação das proteínas, desempenhando um importante papel no processo de divisão celular. Deste modo, a exposição contínua a doses não letais estimulam a proliferação celular, sendo por isso, consideradas promotoras de carcinogênese (NISHIWAKI-MATSUSHIMA et al., 1992). Vale ressaltar que diversos carcinógenos genotóxicos ou não genotóxicos, direta ou indiretamente, podem iniciar células neoplásicas ou gerar células pré-iniciadas, suscetíveis à ação dos diversos agentes promotores, conhecidos ou não (ELLINGER-ZIEGELBAUER et al., 2005).

Em ensaio experimental agudo (72 horas) com tilápias (*O. niloticus*), Santos et al. (2007) relataram a marcação imunoistoquímica positiva do antígeno nuclear de

proliferação celular (PCNA) nos hepatócitos destes peixes expostos à microcistina, por imersão e por inoculação intraperitoneal. Segundo os autores, os resultados demonstram ter havido estímulo à proliferação de hepatócitos nos animais expostos à microcistina, que é considerada promotora tumoral.

Além da destruição do citoesqueleto celular, relacionado aos efeitos citotóxicos, da perda do controle de divisão celular e da capacidade de promoção tumoral, recentemente, foi também atribuído às microcistinas o aumento do estresse oxidativo e da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), bem como das respostas antioxidantes, mecanismos estes considerados compensadores e/ou protetores (JOS et al., 2005; PRIETO et al., 2006). Estes autores observaram que o estresse oxidativo provocado pelas microcistinas (LR e RR) leva à intensa peroxidação lipídica do fígado, rim e brânquias de tilápias (*Oreochromis sp.*), sendo ainda responsável pelo aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT). Sicinska et al. (2006) também observaram danos na membrana celular de eritrócitos humanos, na exposição *in vitro* principalmente na dose de 100 nM de microcistina-LR. As alterações celulares observadas por estes autores poderiam decorrer da ligação covalente da microcistina-LR com resíduos (-SH) de proteínas ou estar associadas ao estresse oxidativo.

Danos teciduais também associados ao estresse oxidativo induzido pela microcistina foram descritos por Pinho et al. (2005) em caranguejos (*Chasmagnathus granulatus*), uma vez que as cianobactérias fazem parte da dieta destes animais. Estes autores também atribuíram à microcistina a intensa peroxidação lipídica observada na região de hepatopâncreas desta espécie, sugerindo que o aumento na geração de EROs induz também ao aumento do metabolismo aeróbico celular, favorecendo assim, a intensa degradação do

glicogênio hepático e o aumento da síntese e da liberação de glicose. Esta hipótese pode estar relacionada à inibição principalmente das proteínas fosfatases-1 (AOYAMA et al., 2003) e provavelmente, associada também à alteração do metabolismo do glicogênio, relatada em tilápias (JOS et al., 2005; PRIETO et al., 2006), em carpas (RABERGH et al., 1991) e em camundongos (GEHRINGER et al., 2003).

Milutinovic et al. (2003) relataram que os mecanismos responsáveis pela hepatotoxicidade aguda causada pela microcistina em ratos (*Rattus norvegicus*), foram também responsáveis pela nefrotoxicidade crônica observada nestes animais. Para estes autores, exposições crônicas à microcistina em baixas doses são também, potencialmente, nefrotóxicas sendo observado colapso dos capilares glomerulares, corpúsculos renais hipertrofiados com cápsula de Bowman mais delgada e dilatação do espaço de Bowman, além de dilatação de túbulos contorcidos proximais e distais com material eosinofílico no lúmen. Células tubulares com vacuolização citoplasmática, infiltrado inflamatório linfocitário e edema intersticial foram também relatadas. A apoptose observada nas células tubulares, segundo os autores, seria decorrente de alterações no citoesqueleto (filamentos de actina).

5. EXPOSIÇÃO ÀS CIANOTOXINAS E SINAIS CLÍNICOS

As primeiras intoxicações de populações humanas decorrentes do consumo de água contaminada por cepas tóxicas de cianobactérias, foram descritas na Austrália, Inglaterra, China e África do Sul (FALCONER, 1994).

Algumas algas ou os subprodutos destas podem produzir odores e sabores indesejáveis na água. Contudo, a ausência destes sinais não implica na ausência de

cianobactérias e de cianotoxinas (CHORUS & BARTRAM, 1999; FUNASA - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003). Por isso, intoxicações agudas envolvendo a ingestão acidental de água contendo metabólitos secundários de cianobactérias são mais freqüentes nos animais do que no homem (BEASLEY et al., 1989). No entanto, a ingestão de microcistina, em baixas concentrações e por longo período, pode predispor ao desenvolvimento de carcinoma hepático, como observado na China, onde a ingestão de água contaminada pela microcistina foi relacionada à uma incidência oito vezes maior de câncer hepático primário (YU, 1989; YU, 1995).

Codd et al. (1999) relataram que lavagens caseiras podem não remover eficientemente células de *Microcystis aeruginosa* das folhas de alface cultivada e irrigada com águas contaminadas, demonstrando outra importante forma de exposição às cianotoxinas.

Em organismos aquáticos a exposição pode ocorrer por via oral pela ingestão de cianobactérias ou pela absorção de toxinas extracelulares, presentes na água (CARBIS et al, 1997; PINHO et al., 2005).

No Brasil acredita-se que a morte de 88 pessoas na Bahia possa estar relacionada com a ingestão de água contaminada por cianotoxinas (TEIXEIRA et al., 1993). Outro grave incidente ocorreu em Pernambuco, em 1996, no qual morreram mais de 50 pessoas após uma sessão de hemodiálise. Análises confirmaram a presença de microcistinas no carvão ativado utilizado no sistema de filtração de água na clínica e também em amostras de sangue e de fígado dos pacientes que foram a óbito (JOCHIMSEN et al., 1998; CARMICHAEL et al., 2001; YUAN et al., 2006).

Sinais clínicos de hepatotoxicose envolvendo cianotoxinas foram descritos em bovinos, ovinos, eqüinos, suínos, patos, cães e em outros animais domésticos e

silvestres (CARMICHAEL, 1992; MSAGATI et al., 2006). Estudos experimentais descreveram a intoxicação por microcistinas em camundongos, ratos, coelhos, porcos (CARMICHAEL, 1992) e em peixes (RABERGH et al., 1991; KOTAK et al., 1996; FISCHER et al., 2000; FISCHER & DIETRICH, 2000).

Nas intoxicações por microcistina há relatos da ocorrência de gastroenterites com diarreia, náuseas, vômitos, cólicas abdominais e epigástricas, febre, hepatite com anorexia, astenia, vômitos e hepatomegalia, distúrbios respiratórios, alérgicos e morte, devido à hemorragia hepática e choque hipovolêmico (BEASLEY et al., 1989; NISHIWAKI-MATSUSHIMA et al., 1992; FIGUEIREDO et al., 2004). Parte dos sinais gastrintestinais deve-se à ativação dos macrófagos pela microcistina na mucosa intestinal, à liberação de mediadores inflamatórios e, conseqüentemente, à secreção de água e eletrólitos. A inibição das fosfatases também parece ser fator determinante para a manifestação dos sintomas (NOBRE et al., 2004).

Em bovinos as intoxicações por hepatotoxinas resultam em apatia e fraqueza, anorexia, palidez de mucosas, diminuição no refluxo capilar. Alguns animais podem apresentar atonia ruminal, desidratação, diarreia, além de sinais como rinite, conjuntivite, dispnéia ou bronquite aguda, pleurite e edema pulmonar agudo (BEASLEY et al., 1989).

Os efeitos imunossupressores das cianotoxinas têm sido estudados em ratos e em seres humanos (PALÍKOVÁ et al., 1998). Estudos *in vitro*, em cultura de linfócitos T e B, demonstraram que a microcistina-LR estimula o aumento da produção de interleucina 6 (IL₆) e a diminuição de IL₂, diminuindo assim a atividade funcional linfocitária, devido à indução de apoptose e de necrose (LANKOFF et al., 2004).

Ensaio experimentais demonstraram que a dose letal da microcistina intraperitoneal (DL_{50} ip) para ratos pode variar de 100-120 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (HOOSER et al., 1990), enquanto que para algumas espécies de peixes a DL_{50} ip pode atingir 550 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (RABERGH et al., 1991). Rabergh et al. (1991), Kotak et al. (1996) e Bury et al. (1997) relataram que a morte de peixes relacionada à microcistina é decorrente de insuficiência hepática e renal, causada pela intensa necrose nestes órgãos.

6. BIOACUMULAÇÃO DA MICROCISTINA

A microcistina tem sido detectada em alimentos (SOARES et al., 2004), em horticulturas (CODD et al., 1999) e em fontes de água destinadas à recreação ou ao consumo humano (ANVISA, 2004) em quantidades muito além do limite máximo aceitável pela Organização Mundial de Saúde (0,04 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$ ou 1 $\mu\text{g}/\text{L}$) (FIGUEIREDO et al., 2004). No Brasil, o limite máximo aceitável está estabelecido pela Portaria do Ministério da Saúde n. 1469, de 29 de dezembro de 2000, que estipula o padrão de potabilidade e os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano (FUNASA - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Pesquisas têm demonstrado o perigo da bioacumulação de microcistina em invertebrados e vertebrados aquáticos, incluindo os peixes, que participam da cadeia alimentar humana (MAGALHÃES et al., 2001 e 2003; FIGUEIREDO et al., 2004; SOARES et al., 2004; PINHO et al., 2005; XIE et al., 2007). Mohamed et al. (2003) relataram o acúmulo de microcistina no intestino, no fígado e no rim de tilápias (*O. niloticus*). Em ensaio experimental, Soares et al. (2004) também relataram bioacumulação de microcistina-LR no músculo e em maior concentração no fígado de tilápias (*T. rendalli*), uma vez que este é o órgão alvo da toxina.

Li et al. (2004) observaram acúmulo de microcistina-LR no fígado ($261 \text{ ng} \pm 108,3 \text{ ng/g}$ de peixe) e no músculo ($38,3 \pm 12,3 \text{ ng/g}$ de peixe) de carpas (*Cyprinus carpio*). Segundo estes autores, a microcistina pode ser parcialmente excretada pelas fezes do animal após a biotransformação, sendo o restante da toxina acumulado no fígado, músculo e outros tecidos.

Kamogae et al. (2007) relataram marcação imunoistoquímica positiva no fígado de tilápias (*O. niloticus*) expostas experimentalmente à microcistina. Segundo estes autores a marcação imunoistoquímica nos animais inoculados intraperitonealmente foi mais freqüentemente observada do que nos imersos em água contendo microcistina, em que houve marcação somente na maior concentração exposta (1×10^5 células/mL). No estudo proposto, os resultados observados sugerem ter havido menor contaminação dos animais por esta forma de exposição.

Malbrouck et al. (2003) inocularam microcistina-LR ($125 \text{ } \mu\text{g/kg}$ de peso corporal) intraperitonealmente em “goldfish” (*Carassius auratus*) jovens. Estes autores também observaram acúmulo hepático da toxina. Contudo, após 21 dias do experimento, Malbrouck et al. (2003) relataram ter havido diminuição na concentração da toxina no fígado dos animais estudados.

As conseqüências ambientais e os efeitos agudos e crônicos nos animais e no homem dependem da toxicidade da floração de cianobactérias nos reservatórios de água destinados ao consumo ou nos locais destinados ao lazer (natação, pesca) (FIGUEIREDO et al., 2004).

7. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS E DE CIANOTOXINAS

A análise quantitativa e a caracterização da microcistina ou da *Microcystis* spp, em amostras de água, pode ser realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), pela ionização Frit-Fab e *ionspray* (KONDO et al., 1995; YUAN & CARMICHAEL, 2004; OLIVEIRA, 2006) ou pelo imunoensaio ELISA, empregando-se anticorpo anti-microcistina ou anti-ADDA, essencial para a atividade biológica da microcistina (HIROOKA et al., 1999; HARADA et al., 2004; MOUNTFORT et al., 2005; OLIVEIRA, 2006). Msagati et al. (2006) compararam a eficiência, a sensibilidade, bem como as vantagens e limitações das principais técnicas disponíveis para a detecção, caracterização e quantificação das hepatotoxinas. Dentre as técnicas avaliadas estavam o bioensaio com camundongos, a eletroforese por capilaridade, ressonância magnética nuclear, cromatografia gasosa, espectrometria de massa, ELISA e a CLAE.

8. TRATAMENTO DAS INTOXICAÇÕES

Nas intoxicações por microcistina, algumas pesquisas têm proposto terapias com anticorpos monoclonais contra microcistina-LR, o uso de protetores hepáticos e do antibiótico rifampicina (NAGATA et al., 1995; DAWSON, 1998). A suplementação alimentar com vitamina E, de propriedade antioxidante, parece ter um efeito protetor contra a exposição crônica à microcistina-LR (GEHRINGER et al., 2003).

Em camundongos o manitol e a glicose, potentes agentes osmóticos, podem conferir proteção parcial contra a toxicidade da microcistina, pela inativação ou diluição da toxina (HERMANSKY et al., 1991). Da mesma forma, Rao e Bhattacharya (1996) divulgaram que a administração prévia de glutatona à

inoculação intraperitoneal de microcistina, minimiza a intensidade da intoxicação, em decorrência da reação glutatona-MC-LR que reduz a concentração da toxina livre, sem evitar, no entanto os danos ao DNA.

9. REMOÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS E INATIVAÇÃO DA MICROCISTINA

São vários os processos de tratamentos da água para a remoção de microalgas e de cianobactérias, dentre os quais a coagulação-floculação e a clarificação (sedimentação, flotação e filtração rápida). Contudo, os processos convencionais de remoção das cianobactérias não são efetivos na remoção de cianotoxinas. Por isso, são importantes e menos onerosas as medidas de caráter preventivo (FUNASA - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

As microcistinas são muito estáveis e resistentes a hidrólises em pH neutroalcalino. A degradação natural da microcistina depende da irradiação solar ou da exposição artificial a raios ultra-violeta, em intensidade e duração propícias (ALAM et al., 2001; HAIDER et al., 2003; GAJDEK et al., 2004), o que nem sempre é eficaz. Contudo, estas cianotoxinas são suscetíveis à degradação por algumas bactérias, naturalmente encontradas em rios e reservatórios e também em efluentes de esgotos (CHORUS & BARTRAM, 1999; ISHII et al., 2004).

Dentre outras medidas utilizadas na inativação de cianotoxinas destacam-se: adsorção com carvão ativado e a oxidação empregando-se cloro, dióxido de cloro, hipoclorito de cálcio, hipoclorito de sódio, permanganato de potássio, oxigênio e ozônio (ozonização) (FUNASA - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Quanto à densidade de cianobactérias, de acordo com os procedimentos de vigilância da qualidade da água para consumo humano, o Ministério da Saúde

estabelece (Portaria n. 1469, de 29 de dezembro de 2000 - FUNASA - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003):

1. Nível de Vigilância - estágio inicial da floração de cianobactérias: presença de de uma colônia ou cinco filamentos de cianobactérias/ml de água bruta até 1×10^4 células/mL.
2. Nível de Alerta 1 - estabelecimento inicial da floração de cianobactérias: de 1×10^4 a 2×10^4 células /ml de cianobactérias/ mL.
3. Nível de Alerta 2 - confirmação do estabelecimento da floração de cianobactérias com prejuízos na qualidade da água: de 2×10^4 a 1×10^5 células de cianobactérias/ mL.
4. Nível de Alerta 3 - presença da floração tóxica de cianobactérias no manancial e perigo iminente à saúde da população: superior a 1×10^5 células de cianobactérias/ mL.

10. CONCLUSÃO

Devido à grave hepatotoxicidade, à capacidade de bioacumulação e promoção tumoral, intrínsecas às microcistinas, bem como aos sintomas freqüentemente inespecíficos, pesquisas relacionadas a estas cianotoxinas devem ser incentivadas a fim de se detectar a contaminação de alimentos e da água destinada principalmente ao consumo humano e animal. Os agentes de saúde precisam suspeitar de intoxicações em pacientes que tenham tido contato com água possivelmente contaminada por cianobactérias e pela microcistina, a fim de evitar exposições crônicas e o desenvolvimento de carcinogênese hepática. Setores responsáveis pelo abastecimento de água pública devem estar diariamente atentos às florações algais.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. *Portaria 518*, de 25 de março de 2004 (DOU de 26/03/2004).

ALAM, Z.B.; OTAKI, M.; FURUMAI, H.; OHGAKI, S. Direct and indirect inactivation of *Microcystis aeruginosa* by UV-radiation. *Water Research*, England, v. 35, n. 4, p.1008-14, 2001.

AOYAMA, H.; SILVA, T.M.A.; MIRANDA, M.A.; FERREIRA, C.V. Proteínas tirosinas fosfatases: propriedades e funções biológicas. *Química Nova*, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 896-900, 2003.

BEASLEY, V.R.; COOK, W.O.; DAHLEM, A.M.; HOOSER, S.B.; LOVELL, R.A.; VALENTINE, W.M. Algae intoxication in livestock and waterfowl. The *Veterinary Clinics of North América (Food Animal Practice)*, United States, v. 5, p. 345-361, 1989.

BOTHA, N.; VAN DE VENTER, M.; DOWNING, T.G.; SHEPHARD, E.G.; GEHRINGER, M.M. The effect of intraperitoneally administered microcystin-LR on the gastrointestinal tract of Balb/c mice. *Toxicol*, England, v. 43, n. 3, p. 251-254, 2004.

BURY, N.R.; MCGEER, J.C.; EDDY, F.B.; CODD, G.A. Liver damage in brown trout, *Salmo trutta L.*, and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following administration of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR via the dorsal aorta. *Journal of Fish Diseases*, England, v. 20, n. 3, p. 209-215, 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 implication on fish health, *Journal of Fish Disease*, England, v. 20, p. 81-91, 1997.

CAMARGO, S.G.O.; POUHEY, J.L.O.F. Aqüicultura - um mercado em expansão. *Revista Brasileira de Agraociência*, Pelotas, v. 11, n. 4, p. 393-396, 2005.

CARMICHAEL, W.W. Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *The Journal of Applied Bacteriology*, England, v. 72, p. 445-459, 1992.

CARMICHAEL, W.W.; AZEVEDO, S.M.F.O.; AN, J.S.; MOLICA, R.J.R.; JOCHIMSEN, E.M.; LAU, S.; RINEHART, K.I.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*, United States, v. 109, n. 7, p. 663-668, 2001.

CHEN, T.; CUI, J.; LIANG, Y.; XIN, X.; YOUNG, D.O.; CHEN, C.; SHEN, P. Identification of liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase as a potential target for microcystin-LR. *Toxicology*, Ireland, v. 220, p. 71-80, 2006.

CODD, G.A.; METCALF, J.S.; BEATTIE, K.A. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicol*, England, v. 37, p. 1181-1185, 1999.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management. *E & FN Spon on behalf of WHO*, London, .1999, 416 p.

DAWSON, R.M. The toxicology of microcystins. *Toxicon*, England, v. 36, n. 7, p. 953-962, 1998.

ELLINGER-ZIEGELBAUER, H.; STUART, B.; WAHLE, B.; BOMANN, W.; AHR, H.J. Comparison of the expression profiles induced by genotoxic and nongenotoxic carcinogens in rat liver. *Mutation Research*, Netherlands, v. 575, p. 61-84, 2005.

FALCONER, I.R. Health implications of Cyanobacterial (blue-green algae) toxins. In: TOXIC CYANOBACTERIA CURRENT STATUS OF RESEARCH AND MANAGEMENT. Eds Stefensen D.A & Nicholson B.C, Adelaide. *Proceedings for an international Wokshop*, 1994.

FIGUEIREDO, D.R.; AZEITEIRO, U.M.; ESTEVES, S.M.; GONÇALVES, F.J.; PEREIRA, M.J. Microcystin-producing blooms-a serious global public health issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, United States, v. 9, n. 2, p. 151-163, 2004.

FISCHER, W.J.; DIETRICH, D.R. Pathological and biochemical characterization of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, United States, v. 164, n. 1, p. 73-81, 2000.

FISCHER, W.J.; HITZFELD, B.C.; TENCALLA, F.; ERIKSSON, J.E.; MIKHAILOV, A.; DIETRICH, D.R. Microcystin-LR toxicodynamics, induced pathology, and immunohistochemical localization in liver of blue-green alga exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology Sciences*, United States, v. 54, p. 365-373, 2000.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, STATE OF WORD AQUACULTURE 2006, Rome, 2006. 134p. *FAO Fisheries technical paper*, n. 500.

FU, W.; CHEN, J.; WANG, X.; XU, L. Altered expression of p-53, Bcl-2 and Bax induced by microcystin-LR in vivo and in vitro. *Toxicon*, England, v. 46, p. 171-177, 2005.

GAJDEK, P.; BOBER, B.; MEJ, E.; BIALCZYK, J. Sensitised decomposition of microcystin-LR using UV radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology*, Switzerland, v. 76, p.103-106, 2004.

GEHRINGER, M.M.; GOVENDER, S.; SHAH, M.; DOWNING, T.G. An investigation of the role of vitamin E in the protection of mice against microcystin toxicity. *Environmental Toxicology*, United States, v. 18, p. 142-148, 2003.

GOWEN, R.J. Managing eutrophication associated with aquaculture development. *Journal Applied Ichthyology*, Germany, v. 10, p. 245-257, 1994.

HAIDER, S.; NAITHANI, V.; VISWANATHAN, P. N.; KAKKAR, P. Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern. *Chemosphere*, England, v. 52, n. 1, p. 01-21, 2003.

HARADA, K.; IMANISHI, S.; KATO, H.; MIZUNO, M.; ITO, E.; TSUJI, K. Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation. *Toxicon*, England, v. 44, n. 1, p. 107-109, 2004.

HASHIMOTO, E.H. *Interação da Microcistina-Fumonisina-Aflatoxina e o impacto na piscicultura*. 2002. 115f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos - Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual Londrina -PR.

HASHIMOTO, E.H.; ONO, E.Y.S.; SANTOS, M.A.; HAYASHI, C.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; HIROOKA, E.Y. Bromatology and fumonisin/aflatoxin contamination in feed of aquaculture, Londrina, Parana-Brazil. *Semina*, Londrina, v. 24; p. 117-125, 2003.

HERMANSKY, S.J.; STOHS, S.J.; ELDEEN, Z.M.; ROCHE, V.F.; MEREISH, K.A. Evaluation of potential chemoprotectants against microcystin-LR hepatotoxicity in mice. *Journal of Applied Toxicology*, England, v. 11, p. 65-74, 1991.

HIROOKA, E.Y. PINOTTI, M.H.; TSUTSUMI, T.; YOSHIDA, F.; UENO, Y. Survey of microcystins in water between 1995 and 1996 in Paraná, Brazil using ELISA. *Natural Toxins*, United States, v. 7, p. 103-109, 1999.

HOOSER, S.B.; BEASLEY, V.R.; BASGALL, E.J.; CARMICHAEL, W.W.; HASCHEK, W.M. Microcystin-LR-induced ultrastructural changes in rats. *Veterinary Pathology*, United States, v. 27, n. 1, p. 09-15, 1990.

ISHII, H.; NISHIJIMA, M.; ABE, T. Characterization of degradation process of cyanobacterial hepatotoxins by a gram-negative aerobic bacterium. *Water Research*, England, v. 38, n. 11, p. 2667-76, 2004.

JOCHIMSEN, E.M.; CAMICHAEL, W.W.; AN, J.; CARDO, D.M.; COOKSON, S.T.; HOLMES, C.E.M.; ANTUNES, M.B.C.; FILHO, D.A.M.; LYRA, T.M.; BARRETO, V.S.; AZEVEDO, S.M.F.O.; JARVIS, W.R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *The New England Journal of Medicine*, United States, v. 338, n. 13, p. 873-878, 1998.

JOS, A.; PICHARDO, S.; PRIETO, A.I.; REPETTO, G.; VÁZQUEZ, C.M.; MORENO, I.; CAMEÁN, A.M. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology*, Amsterdam, v. 72, p. 261-271, 2005.

KAMOGAE, M.; HASHIMOTO, E.H.; PÁDUA, C.G.; SOARES, F.S.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; YABE, M.J.S.; ONO, E.Y.S.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; SANT'ANA, C.L.; TSUTSUMI, T.; NAGATA, S.; UENO, Y.; HARADA, K.-I.; HIROOKA, E.Y. *Monitoring microcystin and physicochemical parameters: role of agricultural-aquaculture activity in the water quality*. Wageningen Academic Publishers: Netherlands, p. 321-331, 2006.

KAMOGAE, M.; HASHIMOTO, E.H.; SANTOS, A.P.M.E.; FRANCBANDIERA, A.I.; PÁDUA, C.G.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; COLUS, I.M.S.; ITANO, E.N.; KAMAMURA, O.; TSUTSUMI, T.; NAGATA, S.; K-I.; H.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Imunoistoquímica: detecção de microcistina em tilápia exposta ao extrato de *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria). *Semina*, Londrina, 2007. *In press*

KONDO, F.; IKAI, Y.; OKA, H.; MATSUMOTO, H.; YAMADA, S.; ISHIKAWA, N.; TSUJI, K.; HARADA, K.I.; SHIMADA, T.; OSHIKATA, M.; SUZUKI, M. Reliable and sensitive method for determination of microcystin in complicated matrices by Fast-flow atom bombardment liquid chromatography/mass spectrometry. *Natural Toxins*, United States, v. 3, p. 41-49, 1995.

KOTAK, B. G.; SEMALULU, S.; FRITZ, 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*, England, v. 34, n. 5, p. 517-525, 1996.

KUBITZA, F. *Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial*. 1 ed.: Jundiaí, São Paulo, 2000. 285 p.

LANKOFF, A.; CARMICHAEL, W.W.; GRASMAN, K.A.; YUAN, M. The uptake kinetics and immunotoxic effects of microcystin-LR in human and chicken peripheral blood lymphocytes in vitro. *Toxicology*, Ireland, v.204, n.1, p.23-40, 2004.

LeCLAIRE, R.D.; PARKER, G.W.; FRANZ, D.R. Hemodynamic and colorimetric changes induced by microcystin-LR in the rat. *Journal of Applied Toxicology*, England, v. 15, n. 4, p. 303-311, 1995.

LI, X.Y.; CHUNG, I.K.; KIM, J.I.; LEE, J.A. Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicon*, England, v. 44, n. 8, p. 821-7, 2004.

LI, L.; XIE, P.; CHEN, J. Biochemical and ultrastructural changes of the liver and kidney of the phytoplanktivorous silver carp feeding naturally on toxic *Microcystis* blooms in Taihu Lake, China. *Toxicon*, England, v. 49, p. 1042-1053, 2007.

LIN, Q.; BUCKLER IV, E. S.; MUSE, S. V.; WALKER, J. C. *Mol. Phyloge. Evol.*, v. 12, p. 57, 1999 apud AOYAMA, H.; SILVA, T.M.A.; MIRANDA, M.A.; FERREIRA, C.V. Proteínas tirosinas fosfatases: propriedades e funções biológicas. *Química Nova*, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 896-900, 2003.

MAGALHÃES, V.F.; SOARES, R.M.; AZEVEDO, S.M.F.O. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon*, England, v. 39, n. 7, p. 1077-1085, 2001.

MAGALHÃES, V.F.; MARINHO, M.M.; DOMINGOS, P.; OLIVEIRA, A.C.; COSTA, S.M.; AZEVEDO, L.O. AZEVEDO, S.M.F.O. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon*, England, v. 42, p. 289-295, 2003.

MALBROUCK, C.; TRAUSCH, G.; DEVOS, P.; KESTEMONT, P. Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part. C.*, United States, v. 135, n. 1, p. 39-48, 2003.

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*, England, v. 36, n. 12, p. 1981-1996, 1998.

MILUTINOVIC, A.; ZIVIN, M.; ZORC-PLESKOVIC, R.; SEDMAK, B.; SUPUT, D. Nephrotoxic effects of chronic administration of microcystins -LR and -YR. *Toxicon*, England, v. 42, n. 3, p. 281-288, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). *Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano*. 56 p. 2003. Acesso em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/mnl_ciano_bacterias.pdf >, 23 de junho de 2007.

MOHAMED, Z.A.; CARMICHAEL, W.W.; HUSSEIN, A.A. Estimation of microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in a Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom. *Environmental Toxicology*, United States, v. 18, n. 2, p. 137-141, 2003.

MOHAMED, Z.A.; HUSSEIN, A.A. Depuration of microcystins in tilapia fish exposed to natural populations of toxic cyanobacteria: A laboratory study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, United States, v. 63, p. 424-429, 2006.

MOUNTFORT, D.O.; HOLLAND, P.; SPROSEN, J. Method for detecting classes of microcystins by combination of protein phosphatase inhibition assay and ELISA: comparison with LC-MS. *Toxicon*, England, v. 45, n. 2, p. 199-206, 2005.

MSAGATI, T.A.M.; SIAME, B.A.; SHUSHU, D.D. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquatic Toxicology*, Amsterdam, v. 78, p. 382-397, 2006.

NAGATA, S.; SOUTOME, H.; TSUTSUMI, T.; HASEGAWA, A.; SEKJIMA, M.; SUGANUMA, M.; HARADA, K.I.; UENO, I. Novel monoclonal antibodies against microcystin and their protective activity for hepatotoxicity. *Natural Toxins*, United States, v. 3, p. 78-86, 1995.

NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R.; OHTA, T.; NISHIWAKI, S.; SUGANUMA, M.; KOHYAMA, K.; ISHIKAWA, T.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H.R. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, Germany, v. 118, p. 420-424, 1992.

NOBRE, A.C.; NUNES-MONTEIRO, S.M.; MONTEIRO, M.C.; MARTINS, A.M.; HAVT, A.; BARBOSA, P.S.; LIMA, A.A.; MONTEIRO, H.S. Microcystin-LR promote intestinal secretion of water and electrolytes in rats. *Toxicon*, England, v. 44, n. 5, p. 555-559, 2004.

OLIVEIRA, E.J.A. A fluorescent-labeled microcystin-LR terbium cryptate. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, capturado em 15 fev. 2006. Online. Disponível em: < <http://www.sciello.com.br> >. Accessed in february, 2006.

PAER, H.W.; MILLIE, D.F. Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. *Journal of phycology*, English, v. 35, p. 160-167, 1996.

PINHO, G.L.L.; ROSA, C.M.; MACIEL, F.E.; BIANCHINI, A.; YUNES, J.S.; PROENÇA, L.A.O.; MONSERRAT, J.M. Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, United States, v. 61, p. 353-360, 2005.

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*, Amsterdam, v.77, p.314-321, 2006.

PALÍKOVÁ, M.; KOVÁRU, F.; NAVRÁTIL, S.; KUBALA, L.; PESÁK, S.; VAJCOVÁ, V. The effects of pure Microcystin LR and biomass of blue-green algae on selected immunological indices of carp (*Cyprinus carpio* L.) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.). *Acta Veterinária (Brno)*, Czech Republic, v. 67, n. 4, p. 265-272, 1998.

RABERGH, C.M.I.; BYLUND, G.; ERIKSSON, J.E. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Toxicology*, Amsterdam, v. 20, p. 131-145, 1991.

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

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P. Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia*, v. 71, n. 3-4, p. 359-385, 2000.

SANTOS, A.P.M.E.; HASHIMOTO, E.H.; HASEGAWA, M.; KAMOGAE, M.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; SABINO, M.; UENO, Y.; HARADA, K-I; HIROOKA, E.Y.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Immuno-histopathology of acute microcystin contamination in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). In: XII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Istambul, Turquia, junho de 2007.

SCHMITTOU, H.R.; CREMER, M.C.; ZHANG, J.I.A N. Status and trends of caged tilapia farming in China. In: SIMPÓSIO CENTRO AMERICANO DE AQUACULTURA IV, Anais, Tegucigalpa, Honduras, p. 119-126, 1997.

SICINSKA, P.; BUKOWSKA, B.; MICHALOWICZ, J.; DUDA, W. Damage of cell membrane and antioxidative system in human erythrocytes incubated with microcystin-LR in vitro. *Toxicon*, England, v. 47, p. 387-397, 2006.

SILVA, A.G. *Análise de Parâmetros morfológicos de Curimbas, Prochilodus lineatus, submetidos a testes in situ, para o monitoramento ambiental*. 2002. 119f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina-PR.

SOARES, R.M.; MAGALHAES, V.F.; AZEVEDO, S.M. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (*Cichlidae*) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology*, Amsterdam, v. 70, n. 1, p. 01-10, 2004.

SONTAG, E. *Cell. Signall.* V. 13, p. 7, 2001 apud AOYAMA, H.; SILVA, T.M.A.; MIRANDA, M.A.; FERREIRA, C.V. Proteínas tirosinas fosfatases: propriedades e funções biológicas. *Química Nova*, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 896-900, 2003.

TEIXEIRA, M.G.L.C.; COSTA, M.C.N.; CARVALHO, V.L.P.; PEREIRA, M.S.; HAGE, E. Gastroenteritis epidemic in the area of Itaparica, Bahia, Brazil. *Bulletin of PAHO*, v. 27, n. 3, 244-253, 1993.

VAJCOVÁ, V.; NAVRÁTIL, S.; PALÍKOVÁ, M. The effect of intraperitoneally applied pure Microcystin-LR on haematological, biochemical and morphological indices of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.). *Acta Veterinária (Brno)*, English, v.67, n.4, p. 281-287, 1998.

VIEIRA, J.M.S.; AZEVEDO, M.T.P.; AZEVEDO, S.M.F.O.; HONDA, R.Y.; CORRÊA, B. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. *Toxicon*, England, v. 45, p. 901-909, 2005.

XIE, L.; YOKOYAMA, A.; NAKAMURA, K.; PARK, H. Accumulation of microcystins in various organs of the freshwater snail *Sinotaia histrica* and three fishes in a temperate lake, the eutrophic Lake Suwa, Japan. *Toxicon*, England, v. 49, p. 646-652, 2007.

XING, Y.; XU, Y.; CHEN, Y.; JEFFREY, P.D.; LIN, Z.; LI, Z.; STRACK, S.; STOCK, J.B.; SHI, Y. Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins. *Cell*, United States, v. 127, p. 341-353, 2006.

WENG, D.; LU, Y.; WEI, T.; LIU, Y.; SHEN, P. The role of ROS in microcystin-LR-induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice. *Toxicology*, Ireland, v. 232, p. 15-23, 2007.

YU, S-Z. Drinking water and primary liver cancer. In: TANG, Z.Y.; WU, M.C.; XIA, S.S. (Eds.): Primary Liver Cancer. China Academic Publishers, Beijing Springer-Verlag, Berlin, p. 30-37, 1989.

YU, S-Z. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, Austrália, v. 10, p. 674-682, 1995.

YUAN, M.; CARMICHAEL, W.W. Detection and analysis of the cyanobacterial peptide hepatotoxins microcystin and nodularin using SELDI-TOF mass spectrometry. *Toxicon*, England, v. 44, n. 5, p. 561-570, 2004.

YUAN, M.; CARMICHAEL, W.W.; HILBORN, E.D. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brasil 1996. *Toxicon*, England, v. 48, n. 6, p. 627-640, 2006.

ZHAN, L.; SAKAMOTO, H.; SAKURABA, M.; WU DE S, ZHANG, L.S.; SUZUKI, T.; HAYASHI, M.; HONMA, M. Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutation Research*, Netherlands, v. 557, n.1, p. 01-06, 2004.

ZHANG, J.; ZHANG, H.; CHEN, Y. Sensitive apoptosis induced by microcystins in the crucian carp (*Carassius auratus*) lymphocytes in vitro. *Toxicology in Vitro*, England, v. 20, p. 560-566, 2006.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL]

- Avaliar as alterações histológicas hepáticas em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), induzidas pela microcistina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as alterações histológicas hepáticas induzidas pela microcistina em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), expostas por imersão e por inoculação intraperitoneal, em ensaio agudo e subcrônico.
- Avaliar a proliferação de hepatócitos pelo método imunohistoquímico, utilizando anticorpo anti-PCNA.
- Avaliar a proliferação de hepatócitos pelo método histoquímico, utilizando a técnica de AgNOR.

4 ARTIGOS

**“ACHADOS HISTOLÓGICOS E PROLIFERAÇÃO CELULAR EM
FÍGADO DE TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) ASSOCIADOS À
MICROCISTINA – ENSAIO EXPERIMENTAL AGUDO”**

**“ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS E AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO
CELULAR EM FÍGADO DE TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*)
ASSOCIADAS À MICROCISTINA – ENSAIO EXPERIMENTAL
SUBCRÔNICO”**

ARTIGO 1

“ACHADOS HISTOLÓGICOS E PROLIFERAÇÃO CELULAR EM FÍGADO DE TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) ASSOCIADOS À MICROCISTINA – ENSAIO EXPERIMENTAL AGUDO”

“HISTOLOGICAL FINDINGS AND CELL PROLIFERATION IN LIVER OF TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) ASSOCIATED WITH MICROCYSTIN – AN EXPERIMENTAL ACUTE STUDY “

RESUMO

Nos últimos anos a hepatotoxicidade das microcistinas (MCs) tem sido investigada em mamíferos e em organismos aquáticos. O efeito carcinogênico tem sido relatado nas exposições às MCs. Entretanto, há poucas investigações sobre a proliferação celular, especialmente sobre a proliferação induzida pela MC no fígado de peixes. Neste estudo, tilápias foram expostas por 72 horas ao extrato de *Microcystis aeruginosa* (CCBUSP 262) contendo MCs. Os peixes foram expostos por imersão a à MC nas concentrações de 30,1; 60,2 e 150,5 µg/L de 7-desmetil MC-LR ou foram inoculados intraperitonealmente (ip) com 0,602; 1,204 e 3,01µg/Kg de 7-desmetil MC-LR. A análise histopatológica revelou figuras sugestivas de apoptose, necrose, megalocitose e depleção de glicogênio hepático, principalmente nos animais inoculados ip. A morfometria pelo método AgNOR não demonstrou diferença entre os peixes controles e os expostos à MC. A imunistoquímica hepática com PCNA foi positiva em todos os peixes expostos. Não houve lesão ou marcação imunistoquímica no grupo controle. Houve aumento na proliferação de hepatócitos nas tilápias expostas por imersão ou inoculação ip, a diferentes doses de 7-desmetil MC-LR.

Palavras-chave: tilápia; 7-desmetil MC-LR; hepatotoxicidade, PCNA, AgNOR.

ABSTRACT

The hepatotoxicity of microcystins has been investigated in mammals and aquatic organisms in recent years. Carcinogenic effect has been related to microcystins exposition. However, there are few investigations in cell proliferation, especially microcystin-induced proliferation in fish liver. In this study, tilapias were exposed for 72 h to *Microcystis aeruginosa* cell extracts containing microcystins. Tilapias were exposed by immersion to concentrations of microcystins (30.1, 60.2 and 150 µg/L of MC-LR) . In intraperitoneally inoculated fish, the concentrations were 0.6, 1.2 and 3.01 µg/Kg body weight of MC-LR. Histological analysis revealed figures suggestive of apoptosis, necrosis, megalocytosis, and glycogen depletion of hepatocytes, mainly in intraperitoneally inoculated fish. AgNOR morphometry showed no significant difference in exposed and control fish. Liver immunohistochemistry with PCNA stained positive in exposed fish. No lesions or immunohistochemical staining were observed in control group. Results of the present study indicated that tilapias exposed by immersion or intraperitoneally with different doses of microcystins LR showed an increase in hepatocyte proliferation.

Key words: tilapia; 7-desmetil MC-LR; hepatotoxicity, PCNA, AgNOR.

INTRODUÇÃO

A contaminação de fontes de água por cianobactérias tem sido responsável pela intoxicação e/ou morte de animais silvestres e domésticos (HAIDER et al., 2003), bem como tem representado sérios perigos à saúde pública em diversos países e inclusive no Brasil (JOCHIMSEN et al., 1998; YUAN et al., 2006). Dentre as 2000 espécies de cianobactérias existentes, a *Microcystis aeruginosa* é freqüentemente estudada devido à produção de cianotoxinas chamadas microcistinas. A microcistina (MC) é um importante xenobiótico hepatotóxico de ocorrência natural, em ecossistemas eutrofizados (SOLTER et al., 1998; ZHANG et al., 2006). Existem mais de 60 isoformas de microcistinas (MCs) diferenciadas pela constituição dos L-aminoácidos, nas posições “2” e “4”. Dentre as variações mais importantes destaca-se a microcistina-LR (MC-LR), constituída dos aminoácidos leucina (L) e arginina (R). Esta isoforma molecular é um heptapeptídeo cíclico que contém na cadeia terminal (C₂₀) a estrutura D-aminoácido, denominada de ADDA (3-

amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienóico), responsável pela hepatotoxicidade (SICINSKA et al., 2006).

A MC interage com os hepatócitos, promovendo a destruição do citoesqueleto destas células, a perda da adesão intercelular, insuficiência hepática e necrose hepática, podendo levar a óbito, devido à grave hemorragia hepática e ao choque hipovolêmico (BEASLEY et al., 1989). Além disso, devido à inibição das proteínas fosfatases (PP-1 e PP-2A) e à inibição ou hiperfosforilação de proteínas reguladoras do processo de apoptose (p53, Bcl-2, Bax) (FU et al., 2005), a MC tem sido considerada importante promotor tumoral (NISHIWAKI-MATSUSHIMA et al., 1992; DING et al., 1999). Segundo Pitot (1995) quando há exposição prolongada a agentes promotores, endógenos ou exógenos, pode haver alteração na expressão gênica e na replicação celular, havendo grande possibilidade de ocorrer progressão espontânea de células alteradas. Relatos sugerem ainda a necessidade de investigação da atividade iniciadora de carcinogênese relacionada à MC (ITO et al., 1997). Ding et al. (1999), utilizando o ensaio do cometa, evidenciaram o efeito genotóxico da MC, em cultura primária de hepatócitos de ratos.

A MC-LR tem sido detectada em alimentos e fontes de água, destinados à recreação ou ao consumo humano, muito além do limite máximo (0,04µg/Kg/dia ou 1µg/L) estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (FIGUEIREDO et al., 2004). No Estado do Paraná, Hirooka et al. (1999) relataram concentrações de MCs entre 0,2 e 6,6 µg/L em águas da região do lago Itaipu. Kamogae et al. (2006) relataram a ocorrência de florações tóxicas e de MCs também em rios desse mesmo Estado.

A bioacumulação de MCs em invertebrados e vertebrados aquáticos, que participam da cadeia alimentar humana, tem sido amplamente relatada

(MAGALHÃES et al., 2001 e 2003; SOARES et al., 2004; JOS et al., 2005; LI et al., 2005, KAMOGAE et al., 2007; SANTOS et al. 2007). Tais fatores aumentam o perigo de intoxicação humana nas formas aguda, subcrônica e crônica, ou mesmo o desenvolvimento de neoplasias hepáticas (YU & CHEN, 1994; YU, 1995; DING et al., 1999).

Estudos realizados com marcadores de neoplasias, principalmente humanas, têm demonstrado que a expressão do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular pela imunistoquímica (PCNA) e a avaliação das regiões organizadoras de nucléolos marcadas pela prata histoquímica (AgNORs) têm considerável valor prognóstico e permitem estimar a atividade proliferativa tecidual (MEHTA, 1995; SHIMIZU et al., 1995; ROMÃO-CORREA et al., 2005; FILIPPIN et al., 2006).

Romão-Correa et al. (2005) relataram que em neoplasias cutâneas humanas o número, a disposição e a forma das AgNORs estão associadas com os níveis de transcrição do DNA e com a multiplicação celular. De acordo com estes autores, a avaliação destas AgNORs poderia ser utilizada como método de prognóstico complementar a outros procedimentos histológicos. A marcação das AgNORs tem sido amplamente empregada para diferenciar lesões pré-neoplásicas de neoplásicas (CUCER et al., 2007). A avaliação quantitativa e a distributiva das AgNORs têm sido empregada no diagnóstico, prognóstico e também na definição da terapêutica clínica de doenças neoplásicas humanas (DERENZINI, 2000; FILIPPIN et al., 2006).

A proliferação celular tem sido também pesquisada pela marcação das proteínas nucleares PCNA e Ki-67, pela imunistoquímica ou imunocitoquímica, possibilitando também a avaliação de tratamentos antineoplásicos instituídos (ROSAL et al., 2002; DEPES et al., 2003; MARINHEIRO et al., 2003; GREATTI et al., 2004). O PCNA é uma proteína de 36 kDa que atua como cofator da enzima

DNA polimerase delta. Este marcador de proliferação celular aparece no núcleo imediatamente antes da síntese de DNA, atingindo expressão máxima durante a fase “S” do ciclo celular, não sendo detectado na fase de mitose (GAIOTTO et al., 2000).

O objetivo deste trabalho foi observar as alterações histológicas no fígado de tilápias (*Oreochromis niloticus*) provocadas pela MC, em condição experimental, por imersão dos peixes em água contendo cepas tóxicas de *Microcystis aeruginosa* ou por inoculação intraperitoneal (ip), das mesmas cepas produtoras de 7-desmetil MC-LR e MC-LW. Objetivou-se também avaliar a proliferação de hepatócitos nos animais expostos à MC, pelo método imunohistoquímico (IHQ), utilizando anticorpo anti-PCNA e pelo método histoquímico AgNOR, realizando a morfometria nuclear, a quantificação e a observação da distribuição das AgNORs.

MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS

Quarenta e oito (N=48) tilápias (*Oreochromis niloticus*) jovens com aproximadamente 50 g (\pm 10 g) de peso vivo, provenientes da Estação de Piscicultura, da Universidade Estadual de Londrina (UEL), foram aclimatadas neste local e os parâmetros limnológicos foram monitorados diariamente. Os animais foram mantidos em tanques plásticos (500L). Durante a aclimação (12 dias), os peixes permaneceram no tanque (fluxo contínuo), sendo alimentados com ração comercial extrusada, com 30% de proteína, fornecida duas vezes ao dia, na taxa de 2% do peso vivo. Os peixes foram divididos em dois grupos experimentais (1 e 2), cada qual contendo três tanques teste e um tanque controle, com seis peixes por tanque mantidos em sistema estático.

INÓCULO - *Microcystis aeruginosa* E MICROCISTINAS

As cepas de *Microcystis aeruginosa* (CCBUSP 262) utilizadas nos grupos experimentais (1 e 2) foram cultivadas no Instituto de Biologia (ESALQ), Piracicaba-SP, onde também foram liofilizadas. Após o rompimento celular, realizado no Laboratório do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CTA – UEL), a concentração de MC foi analisada no Laboratory of Environmental Sciences, University of Meijo, Nagoya-Japan, por Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas por ionização *electrospray* (HARADA et al., 1996). A linhagem utilizada produziu 1054,76µg/g de 7-desmetil MC-LR e 8,66 µg/g de MC-LW por grama de material liofilizado.

EXTRAÇÃO DE MICROCISTINAS

O extrato de *Microcystis aeruginosa* (CCBUSP 262) foi liofilizado e extraído três vezes, com 10mL de ácido acético 5% em água (para MC-LR, RR e YR) ou metanol (MC-LW e, MC-LF), por 30 minutos sob agitação. O extrato foi centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos e o sobrenadante aplicado em minicoluna C-18 (Waters Co Ltd.). A minicoluna foi previamente lavada com água (5mL) e metanol 20% (5mL). Após, as MCs foram eluídas com metanol 90% (5mL) e metanol (5mL). O eluato foi seco em rotavapor e o resíduo dissolvido em metanol para análise.

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROCISTINAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO ELECTRON-SPRAY (IES-CL-EM)

As MCs foram analisadas utilizando cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (EM). A separação por cromatografia líquida foi realizada pelo sistema CLAE Agilent 1100. 5µL de amostra filtrada foi introduzida em coluna de gel TSK Super ODS (2µm, 2,0x100mm, TOSOH) a 40°C. A fase móvel consistiu (A) 0,1% de ácido fórmico em água e (B) 0,1% de ácido fórmico em metanol. O fluxo foi mantido a 200µL.min⁻¹, sob comprimento de onda de 238nm. Após a análise por LC, o eluato foi submetido a um espectrômetro de massas acoplado em Finnigan LCQ Deca SP plus ITMS (Ion Trap Mass Spectrometry), equipado com uma interface de ionização electrospray (IES). As análises de IES-EM foram realizadas em modo positivo. As condições experimentais foram: temperatura do capilar: 300°C, voltagem da fonte: 5.0kV, voltagem do capilar: 43V (HARADA et al., 1996; HARADA et al., 2004).

O software Xcalibur™ 1.3 foi utilizado para operar os dados. Para cada análise foi fornecido ion-cromatograma total (ICT) e ion selecionados monitorados (ISM). Para ICT foram utilizados intervalo de m/z 150-2000 para análise de MCs. Nos métodos de ISM foi analisado intervalos de acordo com o peso molecular de cada analito, correspondente ao ion protonado [M+H]⁺.

PROCOLO EXPERIMENTAL

GRUPO 1 - IMERSÃO EM ÁGUA CONTENDO *Microcystis aeruginosa*

As seis tilápias de cada um dos três tanques foram submetidas à imersão em água contendo *Microcystis aeruginosa*, por 72 horas. Células produtoras de MC-LR

e de MC-LW foram diluídas nos tanques: 1×10^4 , 2×10^4 e 5×10^4 células, respectivamente, correspondendo às seguintes concentrações: 30,1, 60,2 e 150,5 $\mu\text{g/L}$ de 7-desmetil MC-LR e 0,25, 0,50 e 1,25 $\mu\text{g/L}$ de MC-LW. No tanque do grupo controle não houve adição das células.

GRUPO 2 – INOCULAÇÃO ip COM *Microcystis aeruginosa*

As tilápias de outros três tanques, com seis peixes cada, foram inoculadas intraperitonealmente com concentrado de *Microcystis aeruginosa*, produtoras de MC-LR e de MC-LW, nas seguintes concentrações: 2×10^5 , 4×10^5 e 1×10^6 de células, respectivamente, correspondendo à concentração de 0,602, 1,204 e 3,01 $\mu\text{g/Kg}$ de 7-desmetil MC-LR e 0,005, 0,01 e 0,025 $\mu\text{g/Kg}$ de MC-LW. O grupo controle foi inoculado com 0,1ml/kg de solução salina estéril (0,07%). Os peixes também foram acompanhados por 72 horas. As concentrações de MCs citadas (grupo 1 e 2) foram determinadas posteriormente à realização do ensaio.

PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após o desafio agudo proposto, os peixes de ambos os experimentos foram anestesiados por imersão em solução de benzocaína 1:5.000 e, em seguida eutanasiados, mediante secção medular. Uma amostra de fígado de cada peixe foi fixada em solução de Bouin, por 18 horas e outra, em formalina tamponada 10%, por 24 horas. Uma vez fixadas, as amostras foram processadas rotineiramente, cortadas em micrótomo em secções de 5 μm de espessura e então coradas, respectivamente, pelo ácido periódico de Schiff (PAS), para marcação do glicogênio hepático e pela hematoxilina e eosina (H.E.), para avaliação histopatológica.

PROCESSAMENTO HISTOQUÍMICO

Uma amostra de cada secção de fígado preparada rotineiramente foi desparafinizada, reidratada e então, submetida à impregnação por nitrato de prata (técnica modificada de TRERÈ, 2000), a fim de se proceder a contagem e a morfometria das AgNORs, identificadas visualmente como pontos ou agregações de formas arredondadas ou irregulares, coradas em castanho-escuro ou preto, distribuídas em células cujo núcleo apresenta coloração amarelada (SANTOS et al., 1998; TRERÈ, 2000). Foram contados e mensurados em microscópio de luz, em objetiva de 100x, a área e o perímetro nuclear de 100 células por fragmento, bem como de todas as NORs passíveis de serem marcadas. As imagens e a morfometria das variáveis estudadas foram realizadas com câmera de vídeo e programa de análise de imagem Motic 2000.

PROCESSAMENTO IMUNOISTOQUÍMICO

Uma amostra de cada secção de fígado foi disposta em lâminas preparadas com Poly-L-Lisina, desparafinizada, reidratada e então, submetida ao processamento imunohistoquímico (modificado de FISCHER et al., 2000), utilizando-se anticorpo monoclonal anti-PCNA, na diluição 1:100 (ZYMED, São Francisco, Califórnia, EUA), seguido da marcação pelo método do polímero (DAKO Envision-system, Carpinteria, Califórnia, EUA). A solução de diaminobenzidina (DAB) 0,1% foi utilizada como revelador. Em todos os procedimentos foram utilizados controle positivo e negativo para a reação tecidual.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As medidas referentes à área e ao perímetro nuclear e das AgNORs foram submetidas ao método estatístico de Tukey, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Concentrações de MC próximas às utilizadas neste trabalho foram relatadas por Hirooka et al. (1999) e por Kamogae et al. (2006), em ocorrência natural, em diferentes mananciais no Estado do Paraná. Além disso, as concentrações de MCs estão também relacionadas com a Portaria n. 1469, de 29 de dezembro de 2000 (FUNASA - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003), que estabelece os procedimentos de vigilância quanto à densidade de cianobactérias na da água destinada ao consumo humano. Neste trabalho, embora nos grupos estudados (1 e 2) as formas de exposição e as concentrações de MCs tenham sido diferentes, alterações histológicas hepáticas foram evidenciadas em ambos.

Carbis et al. (1996) também realizaram a exposição de carpas à *Microcystis aeruginosa*, por imersão em (1,7µg/L), por inoculação ip (2,5; 25 e 50 µg/Kg de MCs) e por administração oral (2,5; 25 e 250 µg/Kg de MCs), para comparar a resposta bioquímica nos tratamentos realizados. Segundo estes autores os resultados sugerem haver distúrbios hepáticos, branquiais e na função osmorregulatória dos peixes intoxicados pela MC. Contudo, Carbis et al. (1996) e Malbrouck et al. (2003) citaram que a hepatotoxicidade da MC, em carpas e em “goldfish”, respectivamente, é maior quando inoculada ip, do que quando administrada oralmente ou quando os peixes são expostos à *Microcystis aeruginosa*, por imersão.

Natação errática e perda de equilíbrio foram observadas nas tilápias inoculadas ip, com as diferentes concentrações do extrato de *Microcystis*

aeruginosa. Os peixes que receberam as concentrações de 4×10^5 e 1×10^6 de células encontravam-se acentuadamente letárgicos no momento da eutanásia. Estas observações comportamentais foram similares às relatadas por Rabergh et al. (1991) em carpas (*Cyprinus carpio*) e por Kotak et al. (1996), em trutas (arco-íris), após a inoculação ip com diferentes concentrações de MC-LR.

Alterações histológicas de diferentes intensidades foram observadas em todos os peixes expostos à *Microcystis aeruginosa* (MC BCC-USP 262) (Tabela 1). Os achados mais intensos à arquitetura hepática foram evidenciados nas tilápias inoculadas ip (grupo 2). Células com cromatina nuclear condensada característica do fenômeno apoptótico (Figura 1) foram vistas neste ensaio, semelhantemente às imagens divulgadas por Fischer et al. (2000) e por Fischer e Dietrich (2000), na coloração H.E. e por Santos et al. (2005), nas colorações H.E. e Giemsa. Megalocitose (Figura 2) e/ou necrose foram observadas no grupo 2. Tais achados sugerem que as isoformas 7-desmetil MC-LR e MC-LW são patogênicas e hepatotóxicas. Até o momento, os autores desconhecem relatos a respeito da ação hepatotóxica da isoforma 7-desmetil MC-LR.

O comprometimento mais intenso da arquitetura hepática nos animais inoculados ip foi também relatado anteriormente, por diversos pesquisadores (HOOSER et al., 1990; NISHIWAKI-MATSUSHIMA et al., 1992; KOTAK et al., 1996; BURY et al., 1997), tendo sido estudado por Li et al. (2005) de forma ultra-estrutural em carpas inoculadas ip com MC-LR. Segundo Zhan et al. (2004) o fígado tem sido considerado órgão alvo da toxicidade das MCs, devido ao heptapeptídeo cíclico destas toxinas não penetrar na maioria das células, inclusive em bactérias, sem um transporte específico.

A maioria das alterações foi também observada por Rodger et al. (1994), ao estudarem um extrato algal que também produziu três variações diferentes de MCs: MC-LR, MC-RR e um terceiro tipo, não identificado no momento da pesquisa. Estes autores estudaram os efeitos patológicos da MC-LR, em trutas (*Salmo trutta*), decorrentes de “bloom” naturalmente ocorrido em um lago na Escócia. Rodger et al. (1994) descreveram todas as alterações relatadas nas tilápias do grupo 1, inclusive quanto aos distúrbios circulatórios, infiltrado inflamatório e focos de necrose, observados no grupo 2. Provavelmente, estes achados histopatológicos mais importantes nas trutas devam-se não somente à concentração da hepatotoxina liberada, como também ao tempo decorrido na exposição, uma vez que os peixes permaneciam em água contendo as cianobactérias.

Vesículas intracitoplasmáticas, de diversos tamanhos, foram identificadas de forma difusa nos hepatócitos dos animais do grupo 1, assim como relatado por Molina et al. (2005), em intoxicação experimental subcrônica de tilápias com MC. Segundo estes autores as vesículas continham conteúdo lipídico.

No grupo 2, exceto pela megalocitose de hepatócitos, os principais achados histopatológicos no fígado das tilápias foram também relatados por Malbrouck et al. (2003) em “goldfish” (*Carassius auratus*), 96 horas após a inoculação ip de 125 µg/kg de MC-LR. No entanto, Rabergh et al. (1991) e Bury et al. (1997) descreveram como achados principais a degeneração (hidrópica) de hepatócitos e severa necrose focal, sem distúrbios circulatórios, respectivamente, em carpas e em trutas (marrom e arco-íris) inoculadas ip com MC-LR.

Andersen et al. (1993) observaram todas as alterações descritas no grupo 2, sendo inclusive os primeiros pesquisadores a relatarem megalocitose de hepatócitos em salmão, associada provavelmente a MCs. Segundo estes autores, até então,

não havia relatos deste achado patológico em peixes ou mamíferos, atribuído à MC. Koehler et al. (2004) também descreveram a ocorrência de hepatocitomegalia, inclusões lipídicas, polimorfismo nuclear e necrose focal em *Platichthys flesus* induzida pela exposição crônica a xenobióticos, originários do rio Elbe, segundo estes autores, um dos mais poluídos da Europa.

As alterações morfológicas dos hepatócitos e a perda da arquitetura geral do órgão, decorrentes da exposição aguda às MCs, nos animais inoculados ip, segundo Solter et al. (1998) devem-se à toxicidade resultante da hiperfosforilação das proteínas do citoesqueleto dos hepatócitos, devido à inibição das proteínas fosfatases (PP1 e PP 2A). Jos et al. (2005) e Pinho et al. (2005) relataram que as alterações teciduais decorrentes da exposição à MC estão associadas ao aumento do consumo de oxigênio e à alteração das defesas antioxidantes, enzimáticas e não enzimáticas, estando a toxicidade diretamente associada ao estresse oxidativo e à peroxidação lipídica.

O edema celular observado macroscopicamente em alguns cortes de fígado (grupos 1 e 2) pode estar relacionado à alteração na bomba de sódio e potássio e na lesão mitocondrial, em decorrência da exposição à MC. Li et al. (2005) citaram que 24 horas após a inoculação ip de 200 µg MC-LR/Kg em carpas, a análise ultra-estrutural dos hepatócitos demonstrou ter havido dilatação das cristas mitocondriais, enquanto que na inoculação de 500 µg MC-LR/Kg foi observada a perda das cristas e da matriz mitocondrial. Estes autores relataram ainda que a apoptose ocorre comumente nas exposições à baixa concentração de MC, enquanto que a necrose celular ocorre em exposições a maiores concentrações. Os resultados demonstrados na Tabela 1, diferiram do relato de Li et al. (2005) apenas na ausência de apoptose nas menores concentrações de MC (grupo 1), provavelmente

devido à metabolização e excreção da MC, sem maiores prejuízos celulares (apoptose/necrose).

A depleção do glicogênio hepático variou de intensa a moderada (Figura 4), nos hepatócitos das tilápias de ambos os grupos (1 e 2). Pinho et al. (2005) relataram que nas exposições às MCs a depleção do glicogênio, bem como a síntese ou a utilização de glicose, podem ser decorrentes do estresse oxidativo, do aumento do metabolismo aeróbico e da inibição das proteínas fosfatases. Contudo, é importante lembrar que alterações no metabolismo celular podem também levar à glicólise anaeróbica a partir do glicogênio, para a geração de ATP, justificando assim, a rápida exaustão das reservas de glicogênio. A depleção do glicogênio hepático poderia também estar associada à inibição ou à mutação na proteína fosfatase - 1 (PP-1), importante na mitose, meiose, na integridade celular e no metabolismo do glicogênio (LIN et al., 1999 e SONTAG, 2001 apud AOYAMA et al., 2003).

Rabergh et al. (1991) e Malbrouck et al. (2004) citaram que a mobilização do glicogênio hepático depende da ativação de fosforilases, para que haja a liberação de glicose. Entretanto, quando há danos irreversíveis na arquitetura hepática e inibição das proteínas fosfatases, pode haver prejuízo na síntese do glicogênio, bem como na manutenção da integridade do citoesqueleto celular. Rabergh et al. (1991) ressaltaram ainda que as proteínas fosfatases são de extrema importância para a normalidade do citoesqueleto celular, tanto nos mamíferos como nos peixes.

As variáveis nucleares mensuradas pelo método AgNOR nos grupos expostos às MCs e nos controles apresentaram valores diferentes. Contudo, estes resultados não foram estatisticamente significativos.

As alterações histológicas nos fragmentos hepáticos do grupo 1 foram mais discretas, contudo, mesmo não sendo significativo, observou-se uma tendência de aumento no número médio de AgNORs/célula neste grupo, sugerindo assim maior síntese protéica e maior atividade de proliferação celular nos animais expostos por imersão e maior hepatotoxicidade nos animais inoculados ip, uma vez que nestes as lesões evoluíram para a morte celular (Tabela 3). De forma geral, os hepatócitos dos controles negativos apresentaram apenas um ou dois nucléolos, enquanto que os hepatócitos dos animais expostos a concentrações superiores a 2×10^4 células de *Microcystis aeruginosa* apresentaram dois ou mais nucléolos, além de muitas AgNORs pequenas e dispersas na periferia do núcleo, independente da ocorrência de megalocitose (Tabela 3; Figuras 5 e 6). Esta distribuição das AgNORs foi chamada por Santos et al. (1998) de AgNORs agrupadas em forma de colar.

Derenzini (2000) e Santos et al. (1998) relataram que a frequência de AgNORs no núcleo é significativamente maior em células neoplásicas malignas, do que em células normais, reativas ou neoplásicas benignas. Por isso, a técnica AgNOR poderia ser empregada como marcador de proliferação celular e no diagnóstico e prognóstico de doenças neoplásicas.

Madej et al. (2006) relataram que o aumento no tamanho e na quantidade nucléolos está associado aos processos proliferativos e à intensa produção protéica das células. Segundo Derenzini (2000) nenhuma outra técnica, inclusive imunohistoquímica, mensuraria a proliferação celular de lesões tumorais de forma tão rápida como a técnica AgNOR. Matheus et al. (2004) e Filippin et al. (2006) sugeriram que o aumento do número de AgNOR pode estar relacionado não somente com a alta atividade proliferativa tecidual, mas também com a agressividade das células tumorais.

Exceto nos grupos controles, a análise IHQ visando a marcação da proteína nuclear PCNA foi positiva em todos os fragmentos hepáticos, dos peixes expostos ao extrato de *Microcystis aeruginosa* por imersão e por inoculação ip (Figuras 7 e 8). Contudo, nestes grupos a marcação nuclear ocorreu de forma discreta, sendo multifocal no grupo 1 e focal no grupo 2. Mehta (1995) e Rosal et al. (2002) relataram que o PCNA tem se mostrado confiável como método de avaliação da atividade proliferativa celular. Mehta (1995) relatou que a expressão da proteína PCNA tem sido pesquisada em pacientes humanos onde há proliferação de hepatócitos, como nos casos de hepatite viral aguda, cirrose e carcinoma hepático primário, tendo a expressão aumentada de acordo com o aumento da malignidade do processo e que, a quantificação das NORs poderia ajudar a estimar o estágio da carcinogênese.

Rosal et al. (2002) avaliaram a expressão do PCNA em pacientes com carcinoma espinocelular do colo uterino. Segundo estes autores, a IHQ (PCNA) foi fundamental para detectar a atividade proliferativa de neoplasias residuais em pacientes previamente tratados com radioterapia. Depes et al. (2003) também utilizaram o PCNA como parâmetro de resposta clínica na avaliação de carcinoma de mama, após quimioterapia.

Embora não tenha havido correlação positiva entre AgNOR e PCNA, a expressão deste marcador de proliferação celular nos fragmentos hepáticos estudados sugere que a MC-LW e a 7-desmetil MC-LR podem estimular a proliferação de hepatócitos, quer devido a alterações nas proteínas fosfatases (PP1 e PP2A), reguladoras dos processos de apoptose, necrose e da divisão celular, quer devido ao estímulo regenerativo em função da injúria tecidual associada à toxicidade e à metabolização e excreção das MCs. Soares et al. (2004) ressaltaram que os processos de excreção e de detoxificação são ecologicamente importantes para

evitar a bioacumulação das MCs na cadeia trófica, a fim de também se evitar a contaminação humana, uma vez que estes são os consumidores finais da referida cadeia.

Sabe-se que a MC é predominantemente hepatotóxica, contudo, pesquisas demonstram a ocorrência de lesões e o acúmulo da toxina em tecidos tais como músculo, rim, brânquias e trato gastrintestinal (RABERGH et al., 1991; CARBIS et al., 1997; FISCHER & DIETRICH, 2000; MALBROUCK et al., 2003; MILUTINOVIC et al., 2003; PINHO et al., 2005; PRIETO et al., 2006). Sendo assim, seria importante estudar fragmentos destes órgãos pelos métodos AgNOR e imunoistoquímicos (PCNA), para avaliar a possibilidade de proliferação celular induzida pela MC.

Em suma, estudos epidemiológicos têm indicado íntima associação entre carcinoma hepático primário e a presença de MCs, presentes em fontes de água destinados ao abastecimento público (YU & CHEN, 1994; YU, 1995; DING et al., 1999). Por isso, pesquisas relacionadas ao estudo das cianotoxinas devem ser realizadas, visando entender os fenômenos envolvidos na proliferação celular, na expressão ou supressão de proteínas nucleares indicativas de danos ao DNA, bem como entender a expressão anormal de oncogenes (c-MYC, Ki-67, Bcl-2, Tp53, Bax) capazes de induzir ou de inibir a apoptose, considerados indicadores da atividade dos processos neoplásicos (PITOT, 1995; MATHEUS et al., 2004; FU et al., 2005).

AGRADECIMENTOS: À ESALQ (Piracicaba-SP) pela cessão das cepas de *Microcystis aeruginosa* e aos funcionários da Estação de Piscicultura (UEL) pela colaboração durante os experimentos.

Alterações Histológicas	im em <i>Microcystis aeruginosa</i> Grupo 1			ip com <i>Microcystis aeruginosa</i> Grupo 2			Controles
	1x10 ⁴ células (n = 6)	2x10 ⁴ células (n = 6)	5x10 ⁴ células (n = 6)	2x10 ⁵ células (n = 6)	4x10 ⁵ células (n = 6)	1x10 ⁶ células (n = 6)	Grupo 1 e Grupo 2
Congestão Passiva*	+ F (4/6) ++ MF (2/6)	+ MF 3/6 ++ F (1/6)	+ MF (3/6) ++ MF (3/6)	++ MF (4/6) +++ D (2/6)	+ MF (6/6)	+ MF (6/6)	ausente
Hepatócitos*	Normais mesclados a condensados (6/6)	Normais/ hipertrofiados (4/6); condensados (2/6)	Normais mesclados a edemaciados/ hipertrofiados/ condensados (6/6)	Núcleos condensados (6/6); Megalocitose ++ MF (1/6); edemaciados/mal delimitados (6/6)	Núcleos condensados (6/6); Megalocitose ++ F (2/6); edemaciados/ hipertrofiados/mal delimitados (6/6)	Núcleos condensados (6/6); mal delimitados (6/6)	Normais, morfologicamente semelhantes; bem delimitados; citoplasma com vacuolizações
Infiltrado Inflamatório Mononuclear*	+ F (6/6)	+ MF (2/6) ++ MF (1/6)	+ F (2/6) ++ MF (4/6)	++ F (5/6) +++ F (1/6)	++ MF (6/6)	+++ MF (6/6)	ausente
Infiltrado de Células Granulocíticas*	+ F (4/6) ++ MF (2/6)	+ F (1/6)	++ MF (3/6) +++ F (2/6)	+ F (5/6)	+ F (3/6) ++ MF (3/6)	ausente	ausente
Presença de Melanomacrófagos*	++ MF (2/6)	+ F (1/6) ++ MF (2/6)	+ F (1/6)	++ MF (2/6)	+ F (3/6) ++ MF (3/6)	++ MF (4/6) +++ D (2/6)	ausente
Sugestivo de Apoptose*	ausente	ausente	+++ MF (5/6)	+++ MF (5/6)	+ MF (6/6)	+ MF (6/6)	ausente
Necrose*	ausente	ausente	ausente	+ F (1/6) +++ F (5/6)	++ MF (4/6)	++ MF (4/6) +++ D (2/6)	ausente
Depleção de Glicogênio**	+++	++ a +++	++ a +++	++	+++	+++	ausente

Tabela 1 - Alterações histológicas hepáticas induzidas pelas microcistinas 7-desmetil MC-LR e MC-LW em tilápias (*O. niloticus*) expostas à *Microcystis aeruginosa*, por imersão (im) e por inoculação intraperitoneal (ip), por 72 horas.

LEGENDA:
F = Focal;
MF = Multi-focal; D = Difusa; + = Discreto; ++ = Moderado; +++ = Intenso; coloração H.E.* e PAS**

Tabela 2a - Morfometria nuclear e de AgNORs, pelo método histoquímico AgNOR, em hepatócitos de tilápias (*O. niloticus*) expostas por imersão, por 72 horas, a diferentes concentrações de *Microcystis aeruginosa*, contendo 7-desmetil MC-LR e MC-LW.

Tratamento (n = 6)	Área Nuclear (μm^2)	Perímetro Nuclear (μm)	Área das AgNORs (μm^2)	Perímetro das AgNORs (μm^2)
1x10 ⁴ células	22,29± 9,2a	20,66± 3,5a	7,34± 5,32a	11,41± 4,54a
2x10 ⁴ células	15,82± 2,7a	17,82± 1,7a	3,43± 2,82a	8,20± 2,85a
5x10 ⁴ células	19,76± 4,3a	19,29± 2,1a	2,79± 1,18a	7,28± 1,62a
Controle Negativo	16,56± 3,0a	17,66± 1,8a	2,71± 0,93a	7,02± 1,4a

Médias na mesma coluna seguidas por letras diferentes diferem entre si, pelo teste de Tukey (p<0,05).

Tabela 2b - Morfometria nuclear e de AgNORs, pelo método histoquímico AgNOR, em hepatócitos de tilápias (*O. niloticus*) expostas por inoculação intraperitoneal (ip), por 72 horas, a diferentes concentrações de *Microcystis aeruginosa*, contendo 7-desmetil MC-LR e MC-LW.

Tratamento (n = 6)	Área Nuclear (μm^2)	Perímetro Nuclear (μm)	Área das AgNORs (μm^2)	Perímetro das AgNORs (μm^2)
2x10 ⁵ células	35,55± 27a	24,76± 7,6a	3,94± 3,34a	8,45± 3,13a
4x10 ⁵ células	17,08± 3,4a	17,75± 1,8a	4,16± 1,88a	8,63± 2,02a
1x10 ⁶ células	22,96± 5,9a	20,67± 2,6a	3,54± 1,44a	8,02± 1,80a
Controle Negativo	16,73± 4,4a	18,48± 2,5a	3,22± 3,83a	7,60± 1,57a

Médias na mesma coluna seguidas por letras diferentes diferem entre si, pelo teste de Tukey (p<0,05).

Tabela 3 – Número médio de AgNORs por célula, pelo método histoquímico AgNOR, em hepatócitos de tilápias (*O. niloticus*) expostas ao extrato de *Microcystis aeruginosa*, contendo 7-desmetil MC-LR e MC-LW, por imersão (im) e por inoculação intraperitoneal (ip), por 72 horas.

Tratamento	Número Médio de AgNORs /célula
im 1×10^4 células	1,68± 1,3a
im 2×10^4 células	1,62± 0,8a
im 5×10^4 células	1,82± 0,9a
Controle Negativo (im)	1,28± 0,5a
ip 2×10^5 células	1,85± 1,1a
ip 4×10^5 células	1,51± 0,8a
ip 1×10^6 células	1,35± 0,6a
Controle Negativo (ip)	1,30± 0,6a

Médias na mesma coluna seguidas por letras diferentes diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

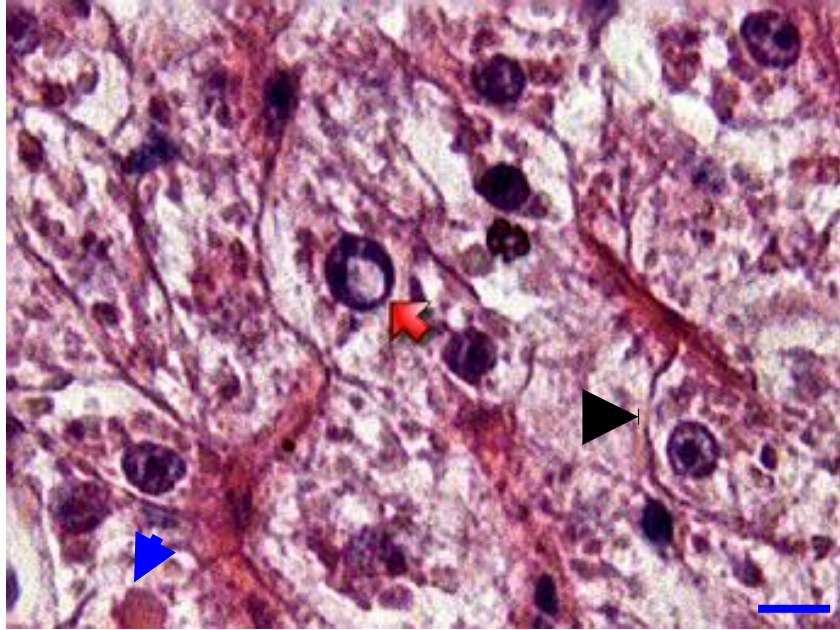


Figura 1 - Fotomicrografia de fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à 7-desmetil MC-LR e MC-LW, por imersão com extrato de *Microcystis aeruginosa* (5×10^4 células), evidenciando hepatócito normal (cabeça de seta); hepatócito com núcleo sugestivo de apoptose (seta vermelha) e vesículas intracitoplasmáticas (seta azul). H.E (Barra de 10 μ m).

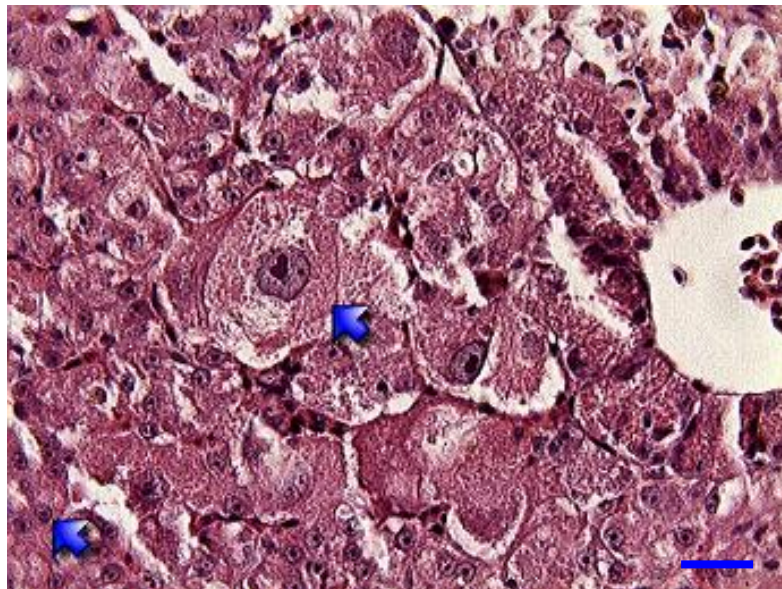


Figura 2 - Fotomicrografia de fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à 7-desmetil MC-LR e MC-LW, por inoculação ip com extrato de *Microcystis aeruginosa* (2×10^5 células), evidenciando hepatócito em megalocitose (seta azul superior) e hepatócito normal (seta azul inferior). H.E (Barra de 10 μ m).

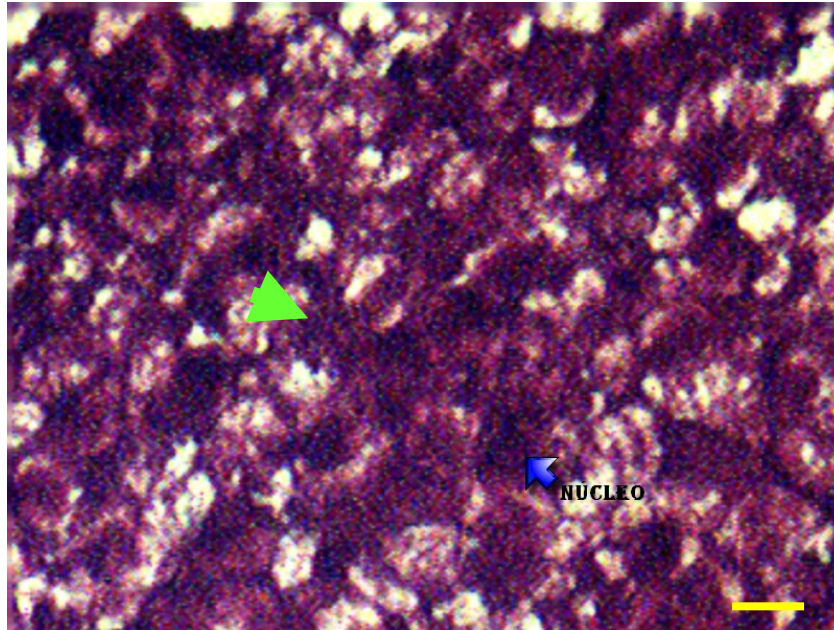


Figura 3 - Fotomicrografia de fígado de tilápia (*O. niloticus*) do grupo controle evidenciando hepatócitos normais repletos de glicogênio (seta verde); núcleo (seta azul). PAS (Barra de 10 μ m).

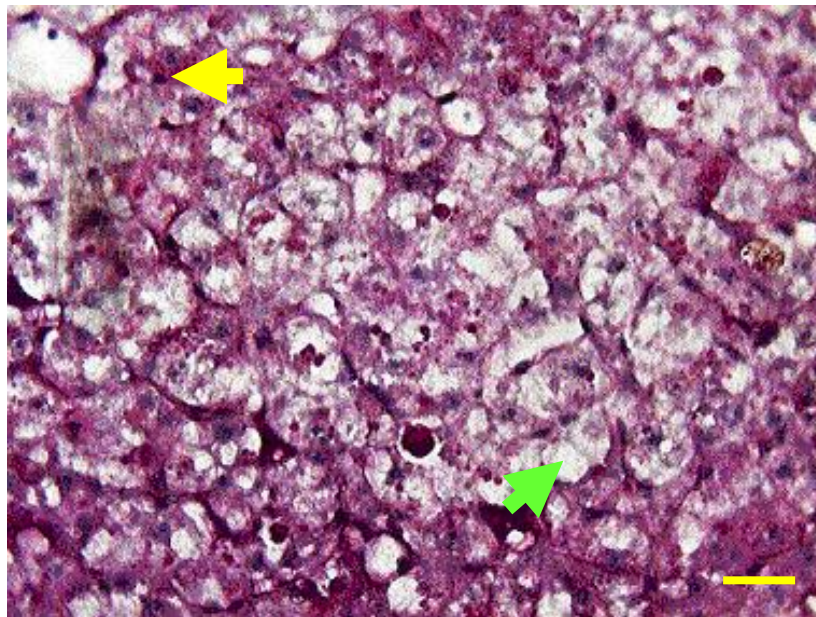


Figura 4 - Fotomicrografia de fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à 7-desmetil MC-LR e MC-LW, por imersão com extrato de *Microcystis aeruginosa* (2×10^4 células), evidenciando depleção moderada de glicogênio: hepatócito repleto de glicogênio (seta amarela) e hepatócito com depleção glicogênio (seta verde). PAS (Barra de 10 μ m).

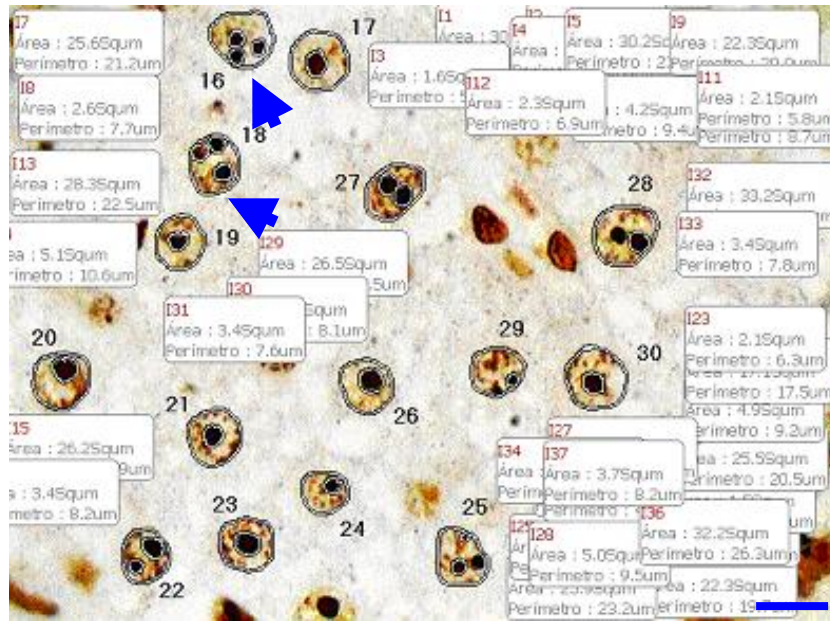


Figura 5 - Morfometria de regiões organizadoras de nucléolos marcadas pela prata (AgNORs) (setas) em fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à 7-desmetil MC-LR e MC-LW, por imersão com extrato de *Microcystis aeruginosa* (5×10^4 células). AgNOR (Barra de 10 μm).

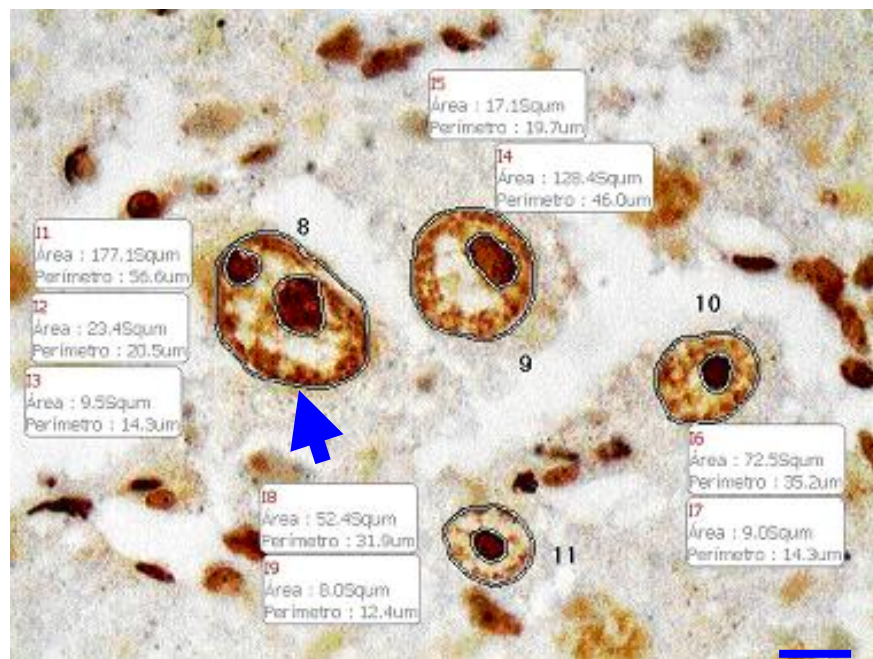


Figura 6 – Morfometria de hepatócito de tilápia (*O. niloticus*) exposta à 7-desmetil MC-LR e MC-LW, por inoculação ip com extrato de *Microcystis aeruginosa* (2×10^5 células), evidenciando hepatócito em megalocitose com AgNORs dispersas periféricamente (seta). AgNOR (Barra de 10 μm).

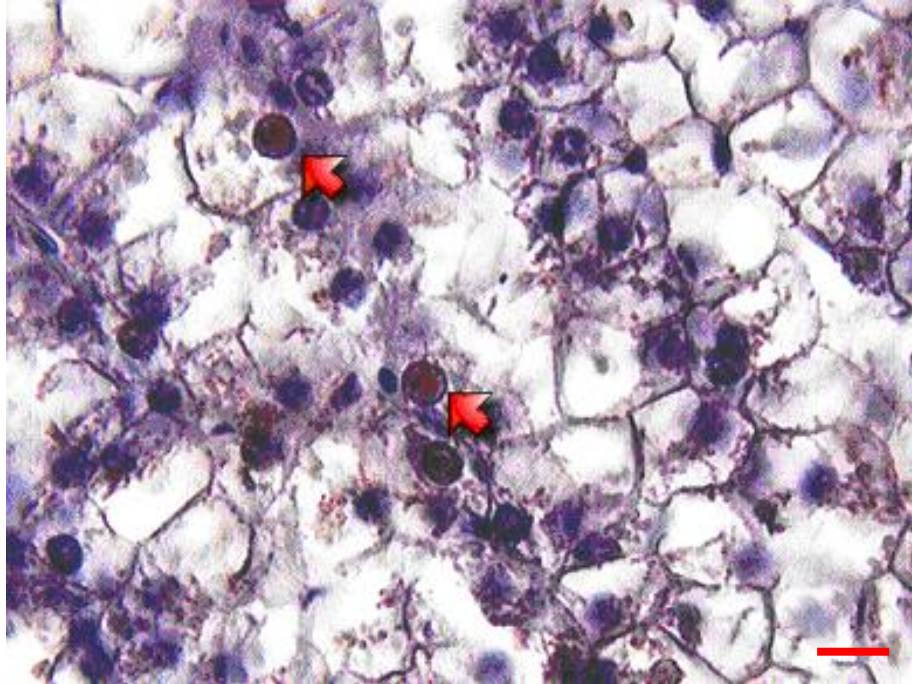


Figura 7 – Fotomicrografia de fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à 7-desmetil MC-LR e MC-LW, por imersão com extrato de *Microcystis aeruginosa* (5×10^4 células), evidenciando marcação positiva com anticorpo anti-PCNA em hepatócitos (seta). IHQ (Barra de 10 μm).

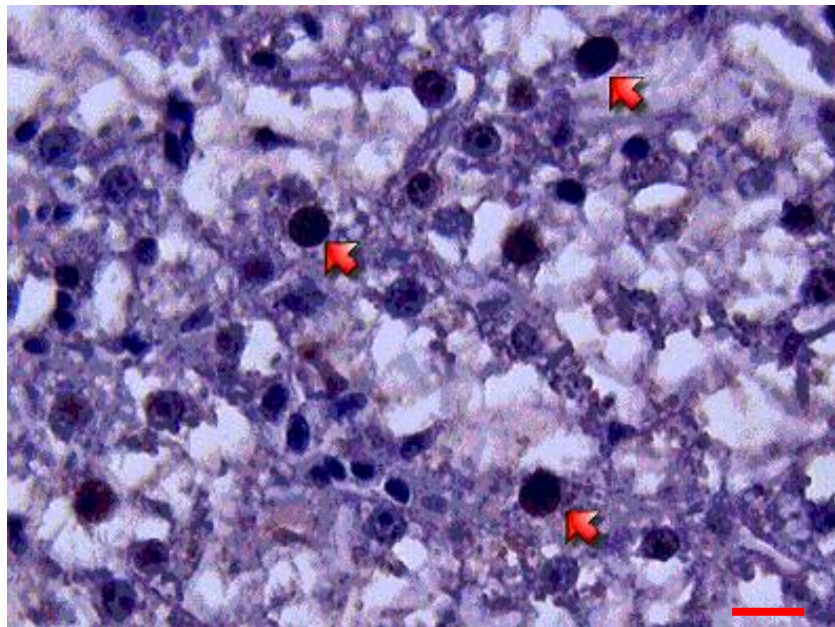


Figura 8 – Fotomicrografia de fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à 7-desmetil MC-LR e MC-LW, por inoculação ip com extrato de *Microcystis aeruginosa* (2×10^5 células), evidenciando marcação positiva com anticorpo anti-PCNA em hepatócitos (setas). IHQ (Barra de 10 μm).

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, R. J.; LUU, H. A.; CHEN, D. Z. X.; HOLMES, C. F. B.; KENT, M. L.; LeBLANC, M.; TAYLOR, F. J. R.; WILLIAMS, D. E. Chemical and biological evidence links microcystins to salmon netpen liver disease. **Toxicon**, v. 31(10), p. 1315-1323, 1993.

BEASLEY, V.R.; COOK, W.O.; DAHLEM, A.M.; HOOSER, S.B.; LOVELL, R.A. & VALENTINE, W.M. Algae intoxication in livestock and waterfowl. **Vet.Clin. North.A.M. (Food Anim. Pract.)**, v. 5, p. 345-361, 1989.

BURY, N.R.; MCGEER, J.C.; EDDY, F.B.; CODD, G.A. Liver damage in brown trout, *Salmo trutta L.*, and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following administration of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR via the dorsal aorta. **Journal of Fish Diseases**, v. 20(3), p. 209-215, 1997.

CARBIS, C.R.; MITCHELL, G.F.; ANDERSON, J.W.; McCAULEY, I. The effects of microcystins on the the serum biochemistry of carp, *Cyprinus carpio L.*, when toxins are administered by gavage, immersion and intraperitoneal routes. **Journal of Fish Disease**, v. 19, p. 151-159, 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 implication on fish health, **Journal of Fish Disease**, v. 20, p. 81-91, 1997.

CUCER, N.; IMAMOGLU, N.; TOZAK, H.; DEMIRTAS, H.; SARAC, F.; TATLISEN, A.; ÖZTÜRK, F. Two-dimensional AgNOR evaluation as a prognostic variable in urinary bladder carcinoma: A different approach via total AgNOR área/nucleus área per cell. **Micron**, v. 38, p. 674-679, 2007.

DEPES, D.D.B.; SOUZA, M.A.; RIBALTA, J.C.L.; ALVES, M.T.S.; KEMP, C.; LIMA, G.R. Alterações na expressão do antígeno nuclear de proliferação celular e dos receptores de estrogênio e de progesterona provocadas pela quimioterapia primária no carcinoma de mama. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 25(8), p.545-552, 2003.

DERENZINI, M. The AgNORs. **Micron**, v. 31, p. 117-120, 2000.

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**, v. 442, p. 69-77, 1999.

FIGUEIREDO, D.R.; AZEITEIRO, U.M.; ESTEVES, S.M.; GONCALVES, F.J.; PEREIRA, M.J. Microcystin-producing blooms-a serious global public health issue. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 59(2), p. 151-63, 2004.

FILIPPIN, C.; CHISTOFOLETTI, L.D.; RIBEIRO, M.C.M.; VITURI, C.L. Determinação do número de regiões organizadoras de nucléolo (AgNOR) em lesões do epitélio cervical uterino. **RBAC**, v. 38(3), p. 133-139, 2006.

FISCHER, W.J.; HITZFELD, B.C.; TENCALLA, F.; ERIKSSON, J.E.; MIKHAILOV, A.; DIETRICH, D.R. Microcystin-LR toxicodynamics, induced pathology, and immunohistochemical localization in liver of blue-green alga exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicology Sciences: an Official Journal of the Society of Toxicology**, v. 54, p. 365-373, 2000.

FISCHER, W.J.; DIETRICH, D.R. Pathological and biochemical characterization of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 164 (1), p. 73-81, 2000.

FU, W.; CHEN, J.; WANG, X.; XU, L. Altered expression of p-53, Bcl-2 and Bax induced by microcystin-LR in vivo and in vitro. **Toxicol**, v. 46, p. 171-177, 2005.

GAIOTTO, M.A.M.; RIBALTA, J.C.L.; FOCCHI, J.; STÁVALE, J.N.; YMAYO, M.R.; CODÁ, N.M. Relação entre a atividade proliferativa do epitélio e a resposta angiogênica estromal em neoplasias intra-epiteliais do colo uterino. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 22(6), p. 339-345, 2000.

GREATTI, W.F.P.; AMARAL, A.S.; SILVA, S.B.; GASPAR, L.F.J.; BARBISAN, L.F.; ROCHA, N.S. Índices proliferativos do tumor venéreo canino transmissível pelas técnicas do CEC e Ki-67 na citologia aspirativa com agulha fina. **Archives of Veterinary Science**, v. 9(1), p. 53-59, 2004.

HAIDER, S.; NAITHANI, V.; VISWANATHAN, P. N.; KAKKAR, P. Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern. **Chemosphere**, v. 52(1), p. 01-21, 2003.

HARADA K-I., MURATA, H., QIANG, Z., SUZUKI, M., KONDO, F. Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria. **Toxicol**, v. 34, p. 701-710, 1996.

HARADA, K.; IMANISHI, S.; KATO, H.; MIZUNO, M.; ITO, E.; TSUJI, K. Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation. **Toxicol**, v. 44(1), p. 107-9, 2004.

HIROOKA, E.Y. PINOTTI, M.H.; TSUTSUMI, T.; YOSHIDA, F.; UENO, Y. Survey of microcystins in water between 1995 and 1996 in Paraná, Brazil using ELISA. **Natural Toxins**, v.7, p. 103-109, 1999.

HOOSER, S.B.; BEASLEY, V.R.; BASGALL, E.J.; CARMICHAEL, W.W.; HASCHEK, W.M. Microcystin-LR-induced ultrastructural changes in rats. **Vet. Pathol.**, v. 27(1), p. 9-15, 1990.

ITO, E.; KONDO, F.; TERAOKA, K.; HARADA, K-I. Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR. **Toxicol**, v. 35(9), p. 1453-1457, 1997.

JOCHIMSEN, E.M.; CAMICHAEL, W.W.; AN, J.; CARDO, D.M.; COOKSON, S.T.; HOLMES, C.E.M.; ANTUNES, M.B.C.; FILHO, D.A.M.; LYRA, T.M.; BARRETO, V.S.; AZEVEDO, S.M.F.O.; JARVIS, W.R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v.338, n. 13, p.873-878, 1998.

JOS, A.; PICHARDO, S.; PRIETO, A.I.; REPETTO, G.; VÁZQUEZ, C.M.; MORENO, I.; CAMEÁN, A.M. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*) under laboratory conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 72, p. 261-271, 2005.

KAMOGAE, M.; HASHIMOTO, E.H.; PÁDUA, C.G.; SOARES, F.S.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; YABE, M.J.S.; ONO, E.Y.S.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; SANT'ANA, C.L.; TSUTSUMI, T.; NAGATA, S.; UENO, Y.; HARADA, K-I.; HIROOKA, E.Y. **Monitoring microcystin and physicochemical parameters: role of agricultural-aquaculture activity in the water quality**. Wageningen Academic Publishers: Netherlands, p. 321-331, 2006.

KAMOGAE, M.; HASHIMOTO, E.H.; SANTOS, A.P.M.E.; FRANCOBANDIERA, A.I.; PÁDUA, C.G.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; COLUS, I.M.S.; ITANO, E.N.; KAMAMURA, O.; TSUTSUMI, T.; NAGATA, S.; K-I.; H.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Imunoistoquímica: detecção de microcistina em tilápia exposta ao extrato de *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria). **Semina**, Londrina, 2007. *In press*

KOEHLER, A.; ALPERMANN, T.; LAURITZEN, B.; VAN NOORDEN, C.J.F. Clonal xenobiotic resistance during pollution-induced toxic injury and hepatocellular carcinogenesis in liver of female flounder (*Platichthys flesus* (L.)). **Acta Histochemica**, v. 106, p. 155-170, 2004.

KOTAK, B. G.; SEMALULU, S.; FRITZ, 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*). **Toxicol**, v. 34(5), p. 517-525, 1996.

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

LIN, Q.; BUCKLER IV, E. S.; MUSE, S. V.; WALKER, J. C. Mol. Phylog. Evol., v. 12, p. 57, 1999 apud AOYAMA, H.; SILVA, T.M.A.; MIRANDA, M.A.; FERREIRA, C.V. Proteínas tirosinas fosfatases: propriedades e funções biológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 896-900, 2003.

MADEJ, P.; PLEWKA, A.; MADEJ, J.A.; PLEWKA, D.; RUTKOWSKI, T. Nucleolar organizer regions (NORs) in adenomyosis. **Research and Practice**, v. 202, p. 433-437, 2006.

MAGALHÃES, V.F.; SOARES, R.M.; AZEVEDO, S.M.F.O. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. **Toxicol**, v. 39(7), p. 1077-1085, 2001.

MAGALHÃES, V.F.; MARINHO, M.M.; DOMINGOS, P.; OLIVEIRA, A.C.; COSTA, S.M.; AZEVEDO, L.O. AZEVEDO, S.M. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). **Toxicol**, v. 42(3), p. 289-95, 2003.

MALBROUCK, C.; TRAUSSCH, G.; DEVOS, P.; KESTEMONT, P. Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. **Comparative Biochemistry and Physiology Part. C.**, v. 135 (n.1), p. 39-48, 2003.

MALBROUCK, C.; TRAUSSCH, G.; DEVOS, P.; KESTEMONT, P. Effect of microcystin-LR on protein phosphatase activity and glycogen content in isolated hepatocytes of fed and fasted juvenile goldfish *Carassius auratus* L. **Toxicol**, v. 44(8), p. 927-32, 2004.

MARINHEIRO, L.P.F.; GRAUDENZ, M.; RECKTENVALD, M.; MEIRELLES, R.M.R.; CALEFFI, M. Expressão dos fatores de proliferação celular PCNA e Ki-67 e receptores de estrogênio e progesterona em tecido mamário normal de mulheres na pós-menopausa submetidas a dois esquemas de terapia de reposição hormonal. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 47(1), p. 37-48, 2003.

MATHEUS, R.S.; BERNARDI FDEL, C.; GALLO, C.P.; DA SILVA, A.P.; RODRIGUES, O.R.; CAPELOZZI, M.; LOPES, A.; FENEZELIAN, S.; SALDIVA, P.H.; CAPELOZZI, V.L. Nuclear markers (star volume, mitotic index, AgNOR and Ki-67) of the primary tumor and its metastasis in non-small cell lung carcinomas. **Pathol. Res. Pract.**, v. 200(1), p.13-23, 2004.

MEHTA, R. The potential for the use of cell proliferation and oncogene expression as intermediate markers during liver carcinogenesis. **Cancer Lett.**, v. 93(1), p. 85-102, 1995.

MILUTINOVIC, A.; ZIVIN, M.; ZORC-PLESKOVIC, R.; SEDMAK, B.; SUPUT, D. Nephrotoxic effects of chronic administration of microcystins -LR and -YR. **Toxicol.**, England, v. 42(3), p. 281-288, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano. 56 p. 2003. Acesso: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/mnl_ciano_bacterias.pdf>, em 23 de junho de 2007.

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

NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R., OHTA, T.; NISHIWAKI, S.; SUGANUMA, M.; KOHYAMA, K.; ISHIKAWA, T.; C ARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H.; R. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. **Journal Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 118, p. 420-424, 1992.

PINHO, G.L.L.; ROSA, C.M.; MACIEL, F.E.; BIANCHINI, A.; YUNES, J.S.; PROENÇA, L.A.O.; MONSERRAT, J.M. Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, p. 353-360, 2005.

PITOT, H.C. The role of receptors im multistage carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 333, p. 3-14, 1995.

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**, v. 77, p. 314-321, 2006.

RABERGH, C.M.I.; BYLUND, G.; ERIKSSON, J.E. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio L.*). **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 20, p. 131-145, 1991.

RODGER, H.D.; TURNBULL, T.; EDWARDS, C.; CODD, G.A. Cyanobacterial bloom associated pathology in brown trout *Salmo trutta L.* **Journal of Fish Diseases**, v. 17, p. 117-181, 1994.

ROMÃO-CORREA, R.F.; MARIA, D.A; SOMA, M. et al. Nucleolar organizer region staining patterns in paraffinembedded tissue cells from skin cancers. **J. Cutaneous Pathol.**, v.32, p.323-328, 2005.

ROSAL, M.A.; GONÇALVES, W.J.; ALVES, M.T.S.; BARACAT, E.C.; LIMA, G.R. Análise histopatológica e imuno-histoquímica (antígeno nuclear de proliferação celular) de pacientes com carcinoma cervical invasor antes e após radioterapia e cirurgia. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 48(1), p. 32-35, 2002.

SANTOS, F.G.A.; GUEDES, R.M.C.; CASSALI, G.D.; MEJIA, G.E.G.; VASCONCELOS, A.C. Caracterização e quantificação de regiões organizadoras de nucléolos coradas pela prata (AgNORs) em tumor venéreo transmissível canino, genital e extragenital. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 50(6), p. 665-672, 1998.

SANTOS, F.G.A.; VASCONCELOS, A.C.; NUNES, J.E.S.; CASSALI, G.D.; PAIXÃO, T.A.; MORO, L. Tumor venéreo transmissível canino – aspectos gerais e abordagens moleculares (revisão de literatura). **Biosci. J.**, v. 21(3), p. 41-53, 2005.

SANTOS, A.P.M.E.; HASHIMOTO, E.H.; HASEGAWA, M.; KAMOGAE, M.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; SABINO, M.; UENO, Y.; HARADA, K-I; HIROOKA, E.Y.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Immuno-histopathology of acute microcystin contamination in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **In: XII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**, Istambul, Turquia, junho de 2007.

SHIMIZU, K.; IZUMI, R.; II, T.; MURAOKA, K.; INOUE, T.; FUKUSHIMA, W.; SAKAMOTO, K.; TANI, T.; HASHIMOTO, T.; YAGI, M.; MIYAZAKI, I.; NONOMURA, A. Prognostic significance of nucleolar organizer regions in hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 21(2), p. 393-397, 1995.

SICINSKA, P.; BUKOWSKA, B.; MICHALOWICZ, J.; DUDA, W. Damage of cell membrane and antioxidative system in human erythrocytes incubated with microcystin-LR in vitro. **Toxicol.**, v. 47, p. 387-397, 2006.

SOARES, R.M.; MAGALHAES, V.F.; AZEVEDO, S.M. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in Tilapia rendalli (*Cichlidae*) under laboratory conditions. **Aquat. Toxicol.**, v. 70(1), p. 1-10, 2004.

SOLTER, P.F.; WOLLENBERG, G.K.; HUANG, X.; CHU, F.S.; RUNNERGAR, M.T. Prolonged sublethal exposure to the protein phosphatase inhibitor microcystin-LR results in multiple dose-dependent hepatotoxic effects. **Toxicological Sciences**, v. 44, p. 87-96, 1998.

SONTAG, E. *Cell. Signall.* V. 13, p. 7, 2001 apud AOYAMA, H.; SILVA, T.M.A.; MIRANDA, M.A.; FERREIRA, C.V. Proteínas tirosinas fosfatases: propriedades e funções biológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 896-900, 2003.

TRERÈ, D. AgNOR staining and quantification. **Micron**, v. 31, p. 127-131, 2000.

YU, S. Z.; CHEN, G. Blue-green algae toxins and liver cancer. **Chin. J. Cancer Res.**, v. 6, p. 9-17, 1994.

YU, S. Z. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. **Gastroenterol. Hepatol.**, v. 10, p. 674-682, 1995.

YUAN, M.; CARMICHAEL, W.W.; HILBORN, E.D. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brasil 1996. **Toxicon**, v. 48(6), p. 627-640, 2006.

ZHAN, L.; SAKAMOTO, H.; SAKURABA, M.; WU DE S, ZHANG, L.S.; SUZUKI, T.; HAYASHI, M.; HONMA, M. Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells. **Mutat Res.**, v. 557(1), p. 1-6, 2004.

ZHANG, J.; ZHANG, H.; CHEN, Y. Sensitive apoptosis induced by microcystins in the crucian carp (*Carassius auratus*) lymphocytes in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 20, p. 560-566, 2006.

ARTIGO 2**“ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS E AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR
EM FÍGADO DE TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) ASSOCIADAS À
MICROCISTINA – ENSAIO EXPERIMENTAL SUBCRÔNICO”****“HISTOLOGICAL FINDINGS AND CELL PROLIFERATION IN LIVER
ASSOCIATED WITH MICROCYSTIN: A SUBCHRONIC STUDY IN TILAPIA”****RESUMO**

Microcistinas (MCs) são metabólitos das cianobactérias. Estas toxinas são hepatotóxicas e podem induzir neoplasia hepática. No presente estudo, a hepatotoxicidade e a proliferação de hepatócitos de tilápias tratadas com extrato de *Microcystis aeruginosa* (CCBUSP 262) contendo MCs foram avaliadas. Tilápias foram inoculadas intraperitonealmente (ip) com dose única de $2,845 \times 10^{-4}$ µg MC-LR, $1,131 \times 10^{-4}$ µg MC-LW e $1,707 \times 10^{-4}$ µg MC-LF/Kg de peixe vivo, por 15 dias. Diferentemente do grupo controle, a análise histológica indicou apoptose, necrose, megalocitose e depleção de glicogênio hepático. Embora não significativo, o número médio de AgNORs por célula foi maior no grupo exposto às MCs. Na análise imunoistoquímica pelo PCNA somente os animais inoculados apresentaram marcação positiva. Assim, este estudo indicou que as MCs têm efeito tóxico no fígado e que podem também induzir a proliferação de hepatócitos.

Palavras-chave: tilápia; MC-LR; MC-LW; MC-LF; hepatotoxicidade, PCNA, AgNOR.

ABSTRACT

Microcystins are toxic metabolites from cyanobacteria. These toxins are hepatotoxic and can induce liver neoplasia. In the present study, the hepatotoxicity and hepatocyte proliferation of tilapia treated with *Microcystis aeruginosa* cell extracts containing microcystins were evaluated. Tilapia were exposed intraperitoneally to a single dose of $2.84 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ MC-LR, $1.13 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ MC-LW and $1.71 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ MC-LF/Kg body weight for 15 days. In contrast to control group, histological examination indicated that the liver of exposed tilapia had apoptosis, necrosis, megalocytosis, and glycogen depletion. Histochemical analysis by AgNOR showed no significant increase in hepatocyte proliferation. In addition, in immunohistochemical analysis by PCNA only inoculated animals had a positive staining. This study indicated that microcystins had toxic effects on tilapia liver, and could also induce hepatocyte proliferation.

Key words: tilapia; MC-LR; MC-LW; MC-LF; hepatotoxicity, PCNA, AgNOR.

INTRODUÇÃO

As cianotoxinas são metabólitos secundários, de ocorrência natural, produzidos por diversos gêneros de cianobactérias (CARMICHAEL, 1992) e que, dependendo da atividade biológica, são classificadas como neurotóxicas, citotóxicas, genotóxicas, imunotóxicas, embriotóxicas ou hepatotóxicas (VAJCOVÁ et al., 1998). A *Microcystis aeruginosa* é uma das cianobactérias toxigênicas, responsável pela produção de MCs (MCs), heptapeptídeos cíclicos de importante atividade hepatotóxica, também considerados promotores tumorais, tanto para animais como para seres humanos (CARMICHAEL, 1992; YOSHIDA et al., 1998). Dentre as diversas isoformas de MCs existentes (mais de 60), a microcistina-LR (MC-LR) constituída dos aminoácidos leucina (L) e arginina (R) e da estrutura denominada de ADDA (3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienóico) tem sido considerada a mais comum e mais hepatotóxica (SICINSKA et al., 2006).

A intoxicação e a morte de animais domésticos e silvestres, bem como a contaminação ou morte humana, decorrentes do envenenamento por MCs têm sido

amplamente relatadas (SAHIN et al., 1995; MSAGATI et al., 2006; YUAN et al., 2006). Florações ou “blooms algais” potencialmente tóxicos, representando importante perigo à saúde pública, têm sido relatados em diferentes regiões do Brasil (VIEIRA et al.; 2005).

Cousins et al. (1996) citaram que a degradação da MC-LR (10 µg/L), em reservatórios de água estudados, pode ocorrer em aproximadamente uma semana. Em água deionizada a toxina manteve-se estável por até 27 dias e por 12 dias em reservatórios esterilizados. Dawson (1998) relatou que o processo de biodegradação natural da microcistina (MC), pela exposição solar, acontece geralmente em 10 dias pela modificação da cadeia ADDA. Já a exposição à luz-UV aceleraria a degradação. Li et al. (2003) relataram que a degradação natural das MCs é lenta, podendo permanecer viáveis na água por tempo variado, representando grave perigo à saúde pública.

Em condições naturais ou laboratoriais de exposições agudas, as MCs podem causar danos ao citoesqueleto e às organelas celulares, perda de adesão intercelular, bem como insuficiência hepática e/ou choque hipovolêmico, devido à grave hemorragia intra-hepática (BEASLEY et al., 1989; LI et al., 2005). Estas alterações também podem estar relacionadas ao aumento do estresse oxidativo (SICINSKA et al., 2006; WENG et al., 2007) ou ainda, à alteração de proteínas que regulam a fosforilação e desfosforilação, processo importante no controle da divisão celular, chave do controle que regula a apoptose (FU et al., 2005).

A histoquímica AgNOR que visa a marcação de regiões organizadoras de nucléolos (NORs) pela prata e a marcação imunohistoquímica (IHQ) do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) têm sido realizadas na histopatologia humana no estudo da proliferação celular e no diagnóstico de doenças neoplásicas

(MEHTA, 1995; FIGUEIREDO et al., 2003; MADER et al., 2006). SANTOS et al. (1998) citaram que as NORs são segmentos cromossomais que contêm genes ribossomais (RNAr), além de outras proteínas. A marcação destas proteínas argirofílicas pode ser facilmente observada, em secções histológicas processadas rotineiramente. Tanto a morfologia quanto a quantificação destas estruturas permitem avaliar a atividade proliferativa celular (DERENZINI, 2000). Células malignas freqüentemente apresentam um número maior de NORs do que células normais ou benignas (SIRRI et al., 2000; TRERÈ, 2000).

O PCNA é uma proteína de 36 kDa, com papel crítico na fase inicial da proliferação celular, atuando como cofator da enzima DNA polimerase delta. Este marcador de proliferação celular aparece no núcleo durante a fase G1, imediatamente antes da síntese de DNA, atinge o máximo durante esta fase (S), declinando durante a fase G2 e apresenta níveis não-detectáveis na fase de mitose (GAIOTTO et al., 2000). Ainda segundo estes autores pormenores sobre a proliferação celular poderiam ser úteis para predizer o potencial metastático, a recidiva, além do prognóstico de várias neoplasias humanas.

As hepatotoxinas têm sido consideradas promotoras de carcinogênese (NISHIWAKI-MATSUSHIMA et al., 1992; ITO et al., 1997) e bioacumulativas na cadeia trófica (MAGALHÃES et al., 2001 e 2003; SOARES et al., 2004; LI et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi observar alterações histológicas e a proliferação celular no fígado de tilápias (*Oreochromis niloticus*), 15 dias após a inoculação intraperitoneal (ip) de extrato celular de *Microcystis aeruginosa*, contendo MC-LR, MC-LF e MC-LW. A avaliação da proliferação de hepatócitos foi realizada pelos métodos imunistoquímico (anticorpo anti-PCNA) e histoquímico (AgNOR) e a

análise histopatológica pelas colorações hematoxilina e eosina (H.E.) e pelo ácido periódico de Schiff (PAS).

MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS

Doze tilápias (*Oreochromis niloticus*) com aproximadamente 74,95 g (± 15 g) de peso vivo, provenientes da Estação de Piscicultura, da Universidade Estadual de Londrina (UEL), foram aclimatadas (12 dias) neste local e os parâmetros limnológicos foram monitorados diariamente. Os animais foram mantidos em tanques plásticos (500L), em sistema de fluxo contínuo, sendo alimentados com ração comercial extrusada, com 30% de proteína, fornecida duas vezes ao dia, na taxa de 2% do peso vivo. Os peixes foram divididos em dois grupos experimentais: grupo controle e grupo teste, cada qual contendo seis animais.

INÓCULO - *Microcystis aeruginosa* E MICROCISTINAS

As cepas de *Microcystis aeruginosa* (MC BCC-USP 262) utilizadas no grupo experimental 2 foram cultivadas no Instituto de Biologia (ESALQ), Piracicaba-SP, onde também foram liofilizadas. Após o rompimento celular, realizado no Laboratório do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos (CTA – UEL), a concentração de MC foi analisada no Laboratory of Environmental Sciences, University of Meijo, Nagoya-Japan, por Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas por ionização *electrospray* (HARADA et al., 1996). A linhagem utilizada produziu MC-LF; MC-LW e MC-LR.

EXTRAÇÃO DE MICROCISTINAS

O extrato de *Microcystis aeruginosa* (CCBUSP 262) foi liofilizado e extraído três vezes, com 10mL de ácido acético 5% em água (para MC-LR, RR e YR) ou metanol (MC-LW e, MC-LF), por 30 minutos sob agitação. O extrato foi centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos e o sobrenadante aplicado em minicoluna C-18 (Waters Co Ltd.). A minicoluna foi previamente lavada com água (5mL) e metanol 20% (5mL). Após, as MCs foram eluídas com metanol 90% (5mL) e metanol (5mL). O eluato foi seco em rotavapor e o resíduo dissolvido em metanol para análise.

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MCS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO ELECTRON-SPRAY (IES-CL-EM)

As MCs foram analisadas utilizando cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (EM). A separação por cromatografia líquida foi realizada pelo sistema CLAE Agilent 1100. 5µL de amostra filtrada foi introduzida em coluna de gel TSK Super ODS (2µm, 2,0x100mm, TOSOH) a 40°C. A fase móvel consistiu (A) 0,1% de ácido fórmico em água e (B) 0,1% de ácido fórmico em metanol. O fluxo foi mantido a 200µL.min⁻¹, sob comprimento de onda de 238nm. Após a análise por LC, o eluato foi submetido a um espectrômetro de massas acoplado em Finnigan LCQ Deca SP plus ITMS (Ion Trap Mass Spectrometry), equipado com uma interface de ionização electrospray (IES). As análises de ESI-MS foram realizadas em modo positivo. As condições experimentais foram: temperatura do capilar: 300°C, voltagem da fonte: 5.0kV, voltagem do capilar: 43V (HARADA et al., 1996; HARADA et al., 2004).

O software Xcalibur™ 1.3 foi utilizado para operar os dados. Para cada análise foi fornecido ion-cromatograma total (ICT) e ion selecionados monitorados

(ISM). Para ICT foram utilizados intervalo de m/z 150-2000 para análise de MCs. Nos métodos de ISM foi analisado intervalos de acordo com o peso molecular de cada analito, correspondente ao ion protonado $[M+H]^+$.

PROCOLO EXPERIMENTAL

INOCULAÇÃO ip COM *Microcystis aeruginosa*

As tilápias do grupo 2 (n = 6) foram inoculadas ip com extrato de *Microcystis aeruginosa* (100.000 células/kg de peixe), em dose única, correspondendo à inoculação de $2,845 \times 10^{-4}$ µg MC-LR, $1,131 \times 10^{-4}$ µg MC-LW e $1,707 \times 10^{-4}$ µg MC-LF/Kg de peixe. O grupo controle (n = 6) foi inoculado ip com 0,1ml/kg de solução salina estéril (0,07%). Todos os peixes foram acompanhados diariamente, durante 15 dias.

PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após o desafio proposto, todos os peixes foram anestesiados por imersão em solução de benzocaína 1:5.000 e, em seguida eutanasiados, mediante secção medular. Uma amostra de fígado de cada peixe foi fixada em Bouin, por 18 horas e outra, em formalina tamponada 10%, por 24 horas. Uma vez fixadas, as amostras foram processadas rotineiramente, cortadas em micrótomo em secções de 5µm de espessura e então coradas, respectivamente, pelo ácido periódico de Schiff (PAS), para marcação do glicogênio hepático e pela hematoxilina e eosina (H.E.), para avaliação histopatológica. Em alguns cortes teciduais, quando necessário, foi realizada a coloração de Mallory, a fim de diferenciar fibrose tecidual de hipertrofia de tecido muscular liso.

PROCESSAMENTO HISTOQUÍMICO

Uma amostra de cada secção de fígado preparada rotineiramente foi desparafinizada, reidratada e então, submetida à impregnação por nitrato de prata (técnica modificada de TRERÈ, 2000), a fim de se proceder a contagem e a morfometria das AgNORs, identificadas visualmente como pontos ou agregações de formas arredondadas ou irregulares, coradas em castanho-escuro ou preto, distribuídas em células cujo núcleo apresenta coloração amarelada (SANTOS et al., 1998; TRERÈ, 2000). Foram contados e mensurados em microscópio de luz, em objetiva de 100x, a área e o perímetro nuclear de 100 células por fragmento, bem como de todas as NORs passíveis de serem marcadas. As imagens e a morfometria das variáveis estudadas foram realizadas com câmera de vídeo e programa de análise de imagem Motic 2000.

PROCESSAMENTO IMUNOISTOQUÍMICO

Uma amostra de cada secção de fígado foi disposta em lâminas preparadas com Poly-L-Lisina, desparafinizada, reidratada e então, submetida ao processamento imunohistoquímico (modificado de FISCHER et al., 2000), utilizando-se anticorpo monoclonal anti-PCNA, na diluição 1:100 (ZYMED, São Francisco, Califórnia, EUA), seguido da marcação pelo método do polímero (DAKO Envision-system, Carpinteria, Califórnia, EUA). A solução de diaminobenzidina (DAB) 0,1% foi utilizada como revelador. Em todos os procedimentos foram utilizados controle positivo e negativo para a reação tecidual.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As medidas referentes à área e ao perímetro nuclear e das AgNORs foram submetidas ao método estatístico de Tukey, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve óbito nos grupos experimentais. A concentração de MC utilizada neste ensaio foi menor do que a inoculada ip por outros pesquisadores e foi menor ou próxima às concentrações relatadas após “bloom”, em ambiente natural. Contudo, alterações histológicas significativas foram observadas nos peixes inoculados ip com o extrato de *Microcystis aeruginosa* (MC BCC-USP 262) (Tabela 1).

Malbrouck et al. (2003) inocularam ip 125 µg/Kg de MC-LR em “goldfish” para analisar as alterações histológicas e o perfil das enzimas plasmáticas. Com a mesma finalidade, Rabergh et al. (1991) inocularam 130, 150, 250, 300 e 550 µg/Kg de MC-LR em carpas. Solter et al. (1998) sugeriram haver bioacumulação hepática de MC-LR em ratos inoculados ip com 3, 6 e 9 µg/Kg da hepatotoxina, durante 28 dias.

Rodger et al. (1994) citaram concentrações de MC-LR entre 16 e 19 µg/L no lago Leven, na Escócia, após “bloom” algal. No Brasil, Hirooka et al. (1999) relataram concentrações de MCs entre 0,2 e 6,6 µg/L no lago Itaipu, no Estado do Paraná. Neste mesmo Estado, Kamogae et al. (2006) relataram concentrações de MCs variando entre 0,134 e 240 µg/L nos ribeirões Capivara e Três Bocas e também no lago Itaipu.

Exceto pela hipertrofia da parede da artéria hepática e/ou ducto biliar (Figura 1), de forma geral, a maioria das alterações hepáticas observadas nos animais

estudados foi mais discreta do que as observadas no fígado de tilápias após inoculação ip, também em dose única, com concentrações superiores do mesmo extrato (2×10^5 , 4×10^5 e 1×10^6 células) (dados não publicados). Entretanto, essas alterações foram mais acentuadas quando comparadas às observadas no fígado de tilápias expostas por imersão, em concentrações inferiores (1×10^4 , 2×10^4 e 5×10^4 células) (dados não publicados). No ensaio mencionado houve a produção das MCs MC-LW e 7-desmetil MC-LR, enquanto que neste, foram produzidas as isoformas MC-LR, MC-LW e MC-LF. Embora a concentração, as isoformas de MC e a forma de exposição às MCs tenham diferido em ambos os ensaios, as alterações histológicas observadas nos animais expostos sugerem que todas têm atividade hepatotóxica.

Andersen et al. (1993) observaram em ensaio experimental com salmão as mesmas alterações hepáticas relatadas neste trabalho, inclusive quanto à megalocitose. Estes pesquisadores fizeram o primeiro relato deste achado em hepatócitos, associado provavelmente à MC, o que até então não havia sido mencionado em mamíferos e em peixes. Ainda segundo estes autores, evidências experimentais sugerem que tal patologia seria decorrente de exposições crônicas a toxinas de ocorrência natural. Entretanto, megalocitose foi também observada 72 horas, após a inoculação ip em tilápias, com concentrações superiores a 1×10^5 células/Kg de peixe (dados não publicados), sugerindo que para a ocorrência desta alteração a dose é tão importante quanto o tempo de exposição à MC.

A observação de áreas com hepatócitos normais próximas a áreas com hepatócitos necrosados e/ou principalmente apoptóticos também foi relatada por Kotak et al. (1996). Estes autores ao inocularem ip 400 e 1000 $\mu\text{g/Kg}$ de MC-LR em trutas descreveram a ocorrência de ilhas de hepatócitos normais próximas a ilhas de hepatócitos necrosados, principalmente em se tratando da maior concentração

inoculada. Pesquisas relatam que as alterações celulares e a perda da arquitetura hepática estão relacionadas à hiperfosforilação de proteínas do citoesqueleto, dos hepatócitos e também com a inibição das proteínas fosfatases (PP1 e PP 2A) (WENG et al., 2007). Yin et al. (2006) ressaltaram que a permeabilidade na membrana mitocondrial, decorrente da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), é responsável pelas alterações e pela indução da apoptose.

A inoculação ip de 1×10^5 células de *Microcystis aeruginosa* induziu a ocorrência de necrose e, principalmente, de células em apoptose com cromatina condensada e distribuída periféricamente (Figura 2), semelhante ao relatado por Fischer et al. (2000) e Fischer e Dietrich (2000). Estas alterações bem como as observadas em inoculações ip, com concentrações celulares superiores, foram semelhantes às descritas por Li et al. (2005). Segundo estes autores, os hepatócitos de mamíferos ou de peixes, *in vivo* ou *in vitro*, entram em apoptose se a concentração de MC exposta for baixa e em necrose, se a concentração de MC exposta for alta. Figuras apoptóticas, com cromatina extremamente condensada e periférica também foram demonstradas por Yin et al. (2006). Lankoff et al. (2003) relataram que células ovarianas de hamsters (CHO-K1) incubadas com 25, 50 e 100 μM de MC-LR, por 14, 18 e 22 horas, entraram em apoptose mais freqüentemente e rapidamente, do que em necrose, demonstrando assim que ambos os processos são tempo e dose dependentes.

Além de apoptose e de necrose, a presença de vesículas intracitoplasmáticas, citadas por Molina et al. (2005), foram também observadas neste trabalho (Figura 2). Pela coloração ao H.E., estas vesículas eosinofílicas sugerem alteração no metabolismo protéico, dos hepatócitos. Li et al. (2005) descreveram diversas alterações morfológicas nas organelas de hepatócitos de carpas, inoculados ip com

MC, dentre as quais: deformação, condensação ou fragmentação nuclear e gotas ou vesículas intracitoplasmáticas com grande quantidade de lipofucsina. Li et al. (2007) analisaram fragmentos hepáticos de carpas, provenientes do lago Taihu, na China, onde ocorreu “bloom” de *Microcystis aeruginosa*. Estes autores observaram a ocorrência de gotas lipídicas, além de proliferação de lisossomos e vacuolização citoplasmática.

Neste ensaio, 15 dias após a inoculação ip da toxina, intensa depleção desse polímero foi observada no fígado das tilápias estudadas (Figura 4). Isto sugere que a dose inoculada foi tóxica o bastante para promover as lesões observadas e também para alterar o metabolismo celular. Molina et al. (2005) também observaram intensa mobilização do glicogênio hepático durante todo o experimento subcrônico realizado experimentalmente com tilápias, alimentadas com extrato de *Microcystis aeruginosa*, o que intensifica a teoria da especificidade da MC por células hepáticas e do comprometimento destas células, decorrente da hepatotoxicidade. Segundo alguns relatos, a mobilização do glicogênio hepático depende da ativação de fosforilases (ATPases), para que haja a liberação de glicose. Contudo, quando há inibição das proteínas fosfatases e danos irreversíveis à arquitetura hepática, pode haver prejuízo na síntese do glicogênio, bem como na manutenção da integridade do citoesqueleto celular (MALBROUCK et al., 2004; PINHO et al., 2005). Assim, os resultados da coloração PAS deste ensaio subcrônico, sugerem que a interação (reversível ou irreversível) da MC com as proteínas fosfatases (PP1 e PP2A), também interfere na neoglicogênese, além de determinar o tipo de morte celular (FISCHER et al., 2000). Ensaio agudo realizado em peixes expostos diretamente à MC ou ao extrato de *Microcystis aeruginosa*, por diferentes vias, na maioria das vezes, demonstraram que a depleção de glicogênio hepático varia de moderada ou

intensa (RABERGH et al., 1991). Entretanto, Botha et al. (2004) observaram que em camundongos os níveis de glicogênio permaneceram próximo do normal, quando comparado ao grupo controle, 24 horas após a administração ip de dose subletal de MC-LR. O prejuízo da neoglicogênese observada nas tilápias estudadas, talvez seja mais uma diferença da hepatotoxicidade da MC em peixes e em mamíferos.

Pelo método AgNOR observou-se a presença de um ou dois nucléolos nos hepatócitos do grupo controle e mais de dois nucléolos, nos animais expostos à MC (Tabela 02; Figuras 5 e 6). AgNORs pequenas e dispersas em forma de colar foram observadas, na periferia do núcleo, independente da ocorrência de megalocitose. Embora os resultados das variáveis mensuradas não tenham sido estatisticamente significativos (Tabela 2), houve uma tendência ao aumento do número de AgNORs no grupo exposto às MCs, sugerindo assim estímulo da proliferação de hepatócitos. Sabendo-se que é baixa a taxa de reposição celular no fígado, a proliferação deste tecido poderia estar associada à citotoxicidade das MCs (MC-LR, MC-LW e MC-LF), à regeneração tecidual ou, à alteração nos mecanismos reguladores do ciclo celular, compatível com o desenvolvimento de neoplasia hepática.

Matheus et al. (2004) citaram que o aumento do número de AgNOR pode estar relacionado com a alta atividade proliferativa do tecido, bem como com a agressividade das células tumorais, uma vez que os AgNORs estão associados à síntese de RNA ribossômico (RNAr), cuja demanda é alta na síntese protéica relacionada aos processos metastáticos. Santos et al. (1998) relataram que a frequência de AgNORs no núcleo é significativamente maior em células neoplásicas malignas, do que em células normais, reativas ou neoplásicas benignas. Estes autores relataram ainda que a técnica AgNOR tem sido empregada como marcador

de proliferação celular, contribuindo assim no diagnóstico e prognóstico de doenças neoplásicas.

Nos animais expostos à MC houve marcação nuclear moderada e multi-focal da proteína PCNA, pela IHQ, em todos os fragmentos hepáticos analisados, independentemente do polimorfismo nuclear (Figuras 7 e 8). Não houve marcação IHQ no grupo controle.

A imunexpressão do PCNA tem sido relatada em várias neoplasias humanas como carcinoma epidermóide de esôfago, câncer pulmonar, carcinoma de células transicionais da bexiga, hipernefoma, câncer de mama e carcinoma epidermóide de pênis. Quando revela coloração forte e difusa, mesmo em tumores bem diferenciados, indica uma agressividade biológica maior (MARTINS et al., 2000).

De acordo com Mehta (1995) esta positividade é indicativa de proliferação celular, uma vez que a proteína está presente em todas as fases do ciclo celular, havendo maior síntese na “fase S” e sendo expressa, principalmente, nas células em proliferação. Este autor citou haver correlação positiva entre o resultado AgNOR e a IHQ (PCNA) e ressaltou ainda que há poucos estudos avaliando a expressão da proteína PCNA, como marcador de proliferação celular. Contudo, Rivero e Aguiar (2002) não observaram essa correlação entre PCNA e AgNOR, nos fragmentos de carcinoma adenóide cístico de glândulas salivares humanas estudados.

Mader et al. (2006) estudaram fragmentos teciduais de pacientes humanos com adenocarcinoma gástrico de cárdia e também relataram haver correlação positiva entre a proliferação celular avaliada pela marcação PCNA e o índice apoptótico nas biópsias estudadas.

Este é o primeiro relato que avalia a aplicabilidade dos métodos AgNOR e PCNA em tilápias, visando estudar a proliferação celular de hepatócitos. Da mesma

forma que relatado por Rivero e Aguiar (2002), neste trabalho os resultados não demonstraram correlação positiva entre PCNA e AgNOR.

Na natureza, a biodegradação natural das MCs pode levar dias. Sabe-se que MC é biocumulativa (MAGALHÃES et al., 2003), genotóxica (DING et al., 1999) e promotora de carcinogênese em animais (ITO et al., 1997) e em seres humanos (NISHIWAKI-MATSUSHIMA et al., 1992; DING et al., 1999). Exposições subcrônicas ou crônicas a doses não letais da cianotoxina podem comprometer a arquitetura hepática e, portanto, a capacidade de detoxificação do órgão dentre outras funções (SOLTER et al., 1998). Por isso, faz-se necessário estudar os mecanismos envolvidos na hepatotoxicidade e no estímulo da proliferação celular, em situações experimentais, mas também em condições naturais, uma vez que a contaminação pode ter como consequência o desenvolvimento de neoplasias (NISHIWAKI-MATSUSHIMA et al., 1992; DING et al., 1999).

AGRADECIMENTOS: Ao Instituto de Biologia (ESALQ) - Piracicaba-SP pela cessão das cepas de *Microcystis aeruginosa* e aos funcionários da Estação de Piscicultura (UEL) pela colaboração durante os experimentos.

Tabela 01 - Alterações histológicas em fígado de tilápias (*Oreochromis niloticus*), expostas à MC-LR, MC-LF e MC-LW, por inoculação intraperitoneal com extrato de *Microcystis aeruginosa* (1x10⁵ células), avaliadas 15 dias.

Alterações Histológicas	Grupo ip 1x10 ⁵ células/Kg peixe	Grupo Controle
	(n = 6)	(n = 6)
Congestão Passiva*	Discreta e focal (3/6) Moderada e focal (3/6)	ausente
Morfologia dos Hepatócitos*	Normais mesclados a hipertrofiados/condensados (6/6) Megalocitose: moderada e multi-focal (1/6) Mal delimitados e com núcleo (4/6) Mal delimitados e sem núcleo (2/6)	Normais, morfológicamente semelhantes; bem delimitados; citoplasma com vacuolizações
Infiltrado Inflamatório Mononuclear*	Discreto e focal (3/6) Moderado e focal (1/6) Intenso e multi-focal (1/6)	ausente
Infiltrado de Células Granulocíticas*	Discreto e focal (2/6) Intenso e multi-focal (2/6)	ausente
Presença de Melanomacrófagos*	Discreta e multi-focal (4/6) Moderada e multi-focal (1/6)	ausente
Sugestivo de Apoptose / figuras apoptóticas*	Intensa e multi-focal (4/6)	ausente
Necrose*	Discreta e focal (4/6) Moderada e focal (1/6)	ausente
Hipertrofia da parede da artéria hepática e/ou ducto biliar*	Moderada e multi-focal (2/6)	ausente
Depleção de Glicogênio**	Intensa (6/6)	ausente

Coloração H.E* e PAS**

Tabela 2- Morfometria nuclear e número médio de AgNORs por célula, pelo método histoquímico AgNOR, em hepatócitos de tilápias (*O. niloticus*) expostas ao extrato de *Microcystis aeruginosa*, contendo MC-LR, MC-LW e MC-LF, por inoculação intraperitoneal (ip), avaliadas 15 dias após.

Grupos	Área Nuclear (μm^2)	Perímetro Nuclear (μm)	Área das AgNORs (μm^2)	Perímetro das AgNORs (μm^2)	Número Médio de AgNORs/Célula
ip 1×10^5 células (n = 6)	17,94 \pm 3,7a	18,67 \pm 2,03a	2,85 \pm 1,19a	7,61 \pm 1,76a	1,95 \pm 0,8a
Controle Negativo (n = 6)	16,97 \pm 3,3a	18,30 \pm 2,08a	2,93 \pm 0,9a	7,3 \pm 1,26a	1,30 \pm 0,5a

Médias na mesma coluna seguidas por letras diferentes diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

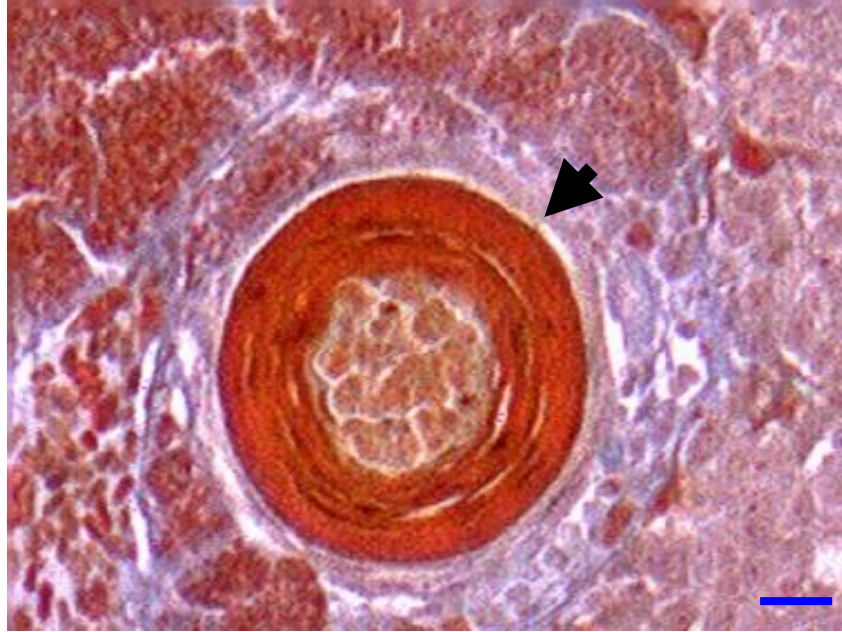


Figura 1 - Fotomicrografia de fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à MC-LR, MC-LF e MC-LW, por inoculação ip com extrato de *Microcystis aeruginosa* (1×10^5 células), evidenciando hipertrofia de parede da artéria hepática (seta). Mallory (Barra de 10 μ m).

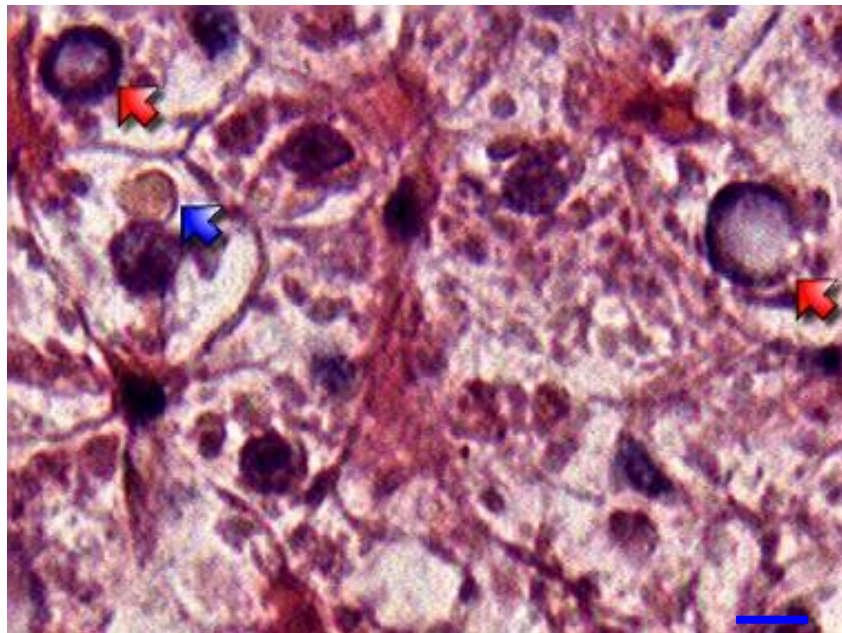


Figura 2 - Fotomicrografia de fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à MC-LR, MC-LF e MC-LW, por inoculação ip com extrato de *Microcystis aeruginosa* (1×10^5 células), evidenciando vesícula intracitoplasmática (seta azul) e hepatócito em apoptose (seta vermelha). H.E. (Barra de 10 μ m).

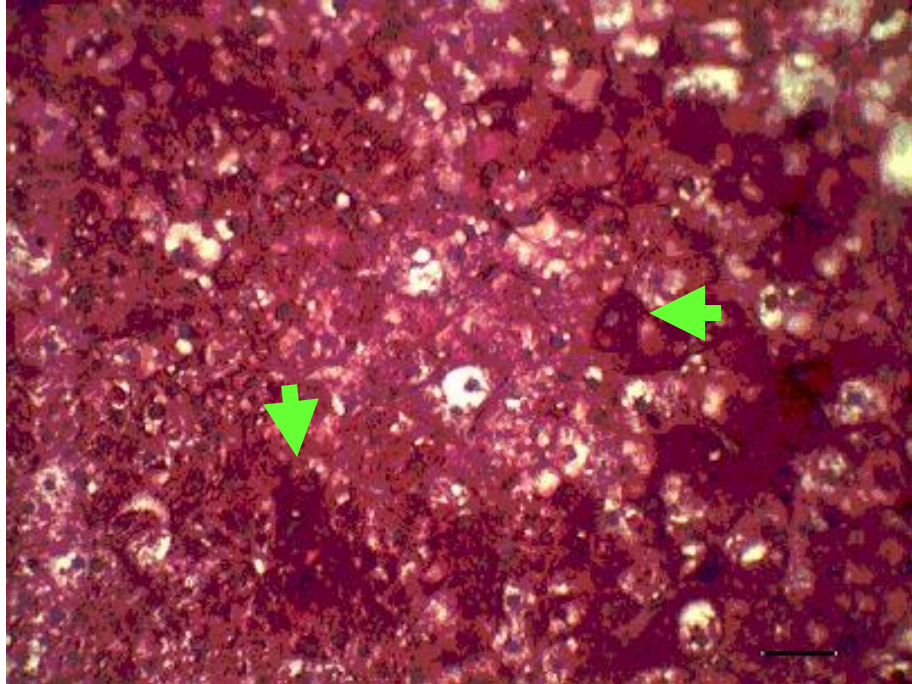


Figura 3 - Fotomicrografia de fígado de tilápia (*O. niloticus*) evidenciando hepatócitos normais repletos de glicogênio (setas) – grupo controle. PAS (Barra de 10 μ m).

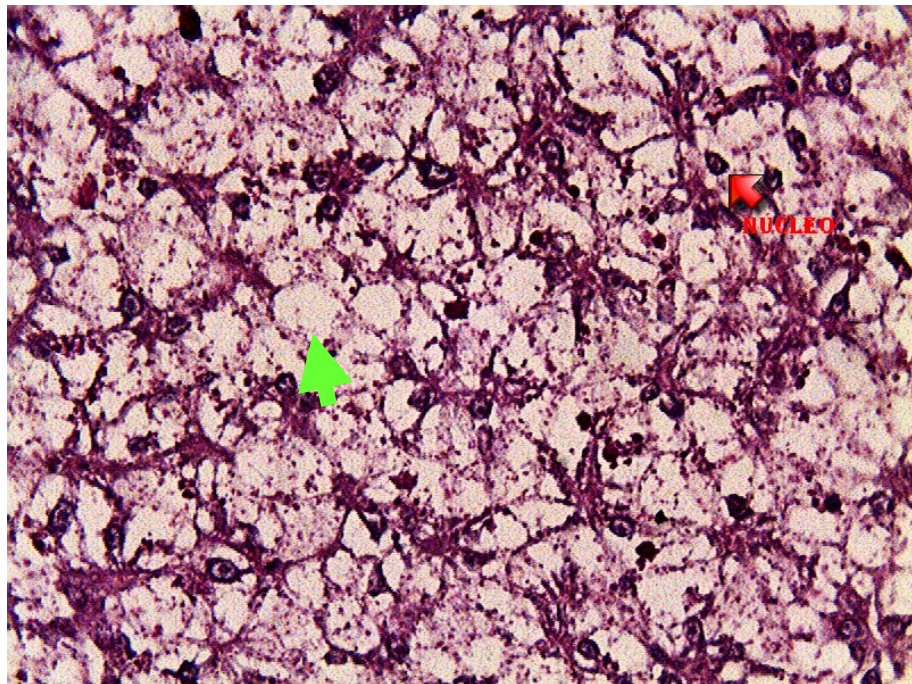


Figura 4 - Fotomicrografia de fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à 7-desmetil MC-LR e MC-LW, por inoculação ip com extrato de *Microcystis aeruginosa* (1×10^5 células), evidenciando núcleo celular (seta vermelha) e intensa depleção de glicogênio hepático (seta verde). PAS (Barra de 10 μ m).

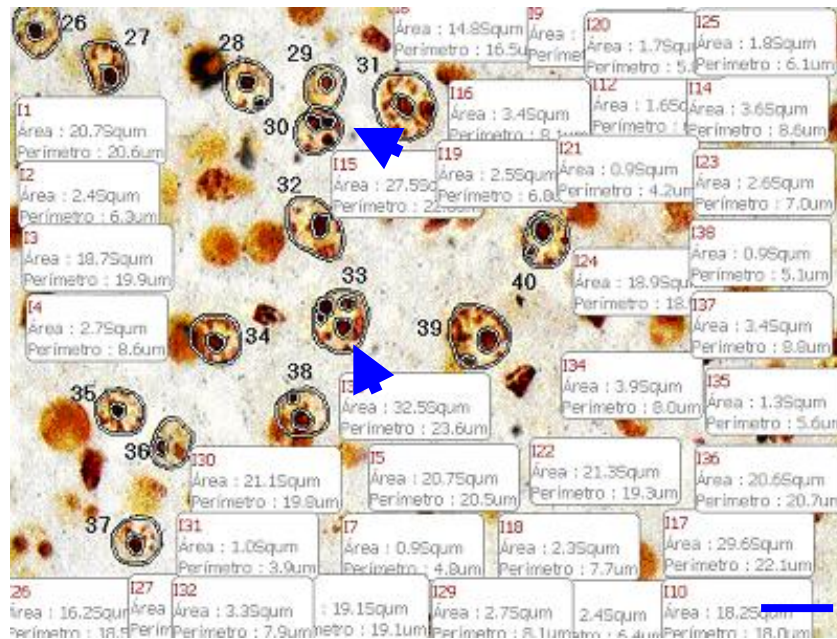


Figura 5 - Morfometria de regiões organizadoras de nucléolos marcadas pela prata (AgNORs) (setas) em fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à MC-LR, MC-LF e MC-LW, por inoculação ip com extrato de *Microcystis aeruginosa* (1×10^5 células). AgNOR (Barra de 10 μ m).

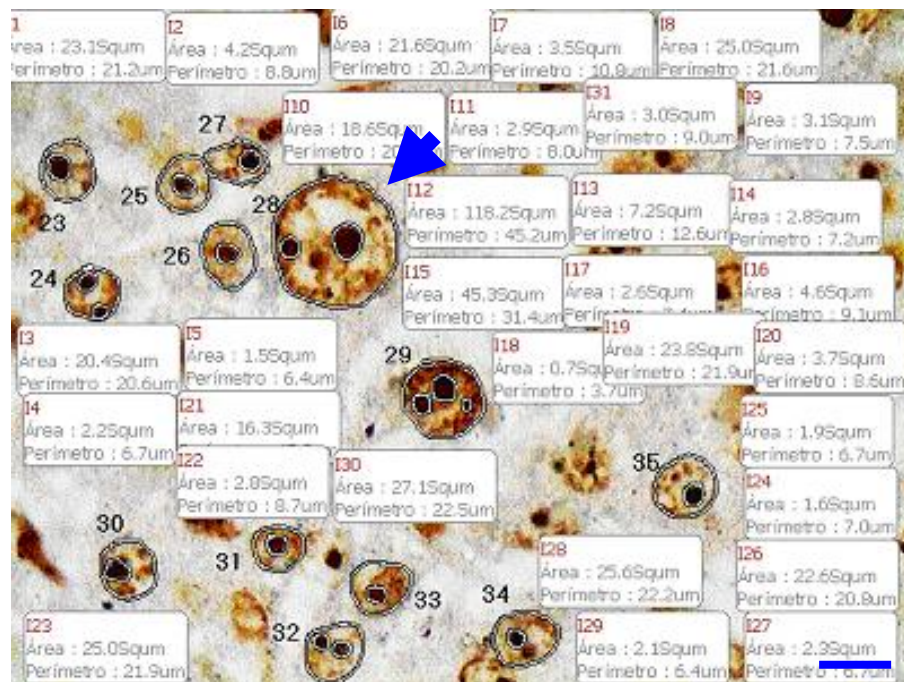


Figura 6 - Morfometria de regiões organizadoras de nucléolos marcadas pela prata (AgNORs) em fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à MC-LR, MC-LF e MC-LW, por inoculação intraperitoneal com extrato de *Microcystis aeruginosa* (1×10^5 células), evidenciando hepatócito em megalocitose com AgNORs dispersas perifericamente (seta). AgNOR (Barra de 10 μ m).

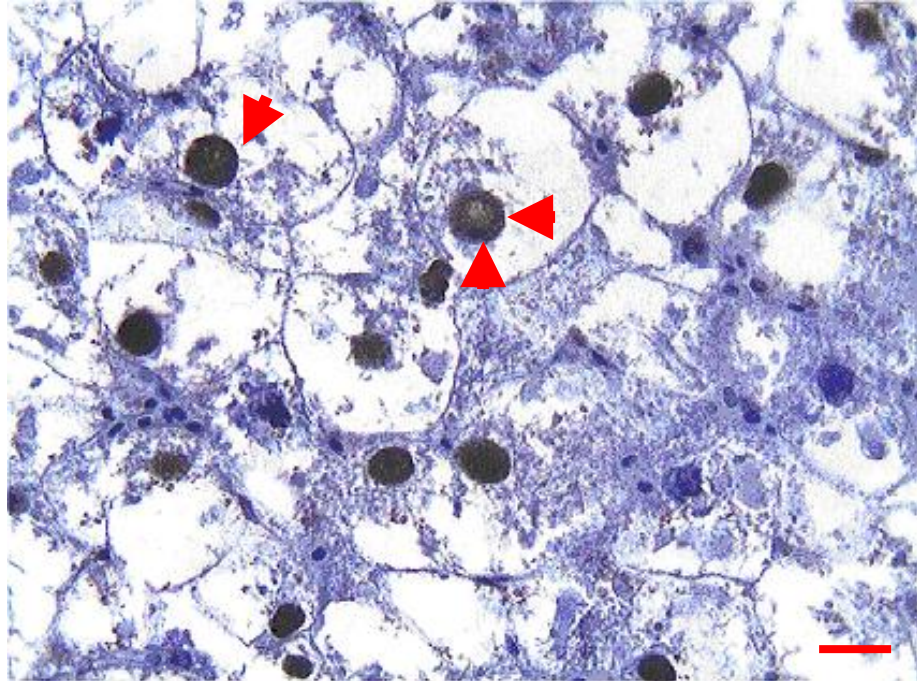


Figura 7 – Fotomicrografia de fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à MC-LR, MC-LF e MC-LW, por inoculação ip com extrato de *Microcystis aeruginosa* (1×10^5 células), evidenciando marcação positiva com anticorpo anti-PCNA em hepatócitos (setas). IHQ (Barra de 10 μ m).

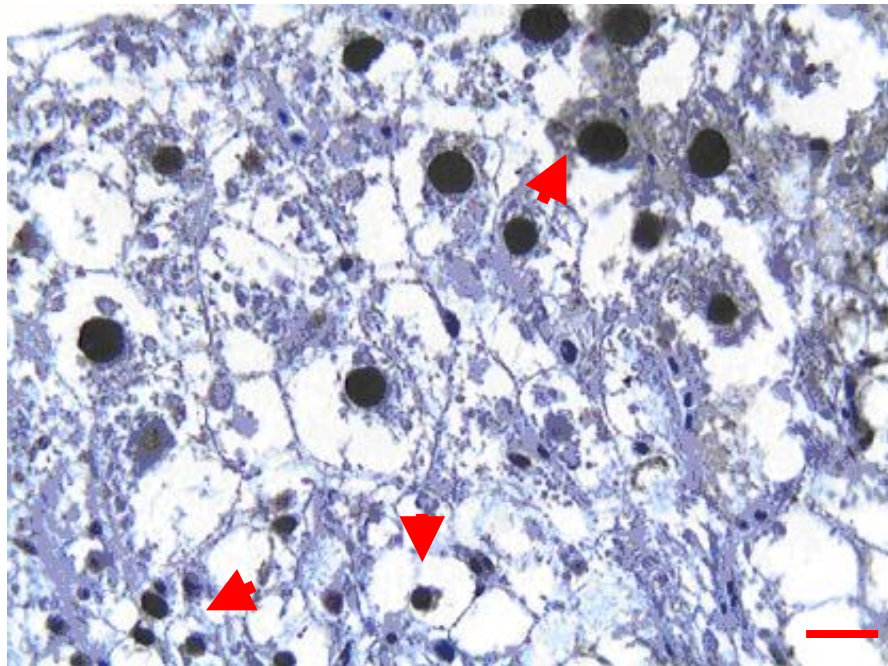


Figura 8 – Fotomicrografia de fígado de tilápia (*O. niloticus*) exposta à MC-LR, MC-LF e MC-LW, por inoculação ip com extrato de *Microcystis aeruginosa* (1×10^5 células), evidenciando marcação positiva com anticorpo anti-PCNA em hepatócitos (setas). IHQ (Barra de 10 μ m).

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, R. J.; LUU, H. A.; CHEN, D. Z. X.; HOLMES, C. F. B.; KENT, M. L.; LeBLANC, M.; TAYLOR, F. J. R.; WILLIAMS, D. E. Chemical and biological evidence links microcystins to salmon netpen liver disease. **Toxicon**, v. 31(10), p. 1315-1323, 1993.

BEASLEY, V.R.; COOK, W.O.; DAHLEM, A.M.; HOOSER, S.B.; LOVELL, R.A. & VALENTINE, W.M. Algae intoxication in livestock and waterfowl. **Vet.Clin. North.A.M. (Food Anim. Pract.)**, v. 5, p. 345-361, 1989.

BOTHA, N.; VAN DE VENTER, M.; DOWNING, T.G.; SHEPHARD, E.G.; GEHRINGER, M.M. The effect of intraperitoneally administered microcystin-LR on the gastrointestinal tract of Balb/c mice. **Toxicon**, v. 43(3), p. 251-4, 2004.

CARMICHAEL, W.W. Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 72, p. 445-459, 1992.

COUSINS, I.T.; BEALING, D.J.; JAMES, H.A.; SUTTON, A. Biodegradation of microcystin-LR by indigenous mixed bacterial populations. **Water Research**, v. 30, p. 481-485, 1996.

DAWSON, R.M. The toxicology of microcystins. **Toxicon**, v. 36(7), p. 953-962, 1998.

DERENZINI, M. The AgNORs. **Micron**, v. 31, p. 117-120, 2000.

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**, v. 442, p. 69-77, 1999.

FIGUEIREDO, L.C.; CORDEIRO, L.N.; ARRUDA, M.D.F.; RIBEIRO, E.M.; COUTINHO, H.D.M. Câncer de pele: estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49(3), p. 179-183, 2003.

FISCHER, W.J.; HITZFELD, B.C.; TENCALLA, F.; ERIKSSON, J.E.; MIKHAILOV, A.; DIETRICH, D.R. Microcystin-LR toxicodynamics, induced pathology, and immunohistochemical localization in liver of blue-green alga exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicology Sciences: an Official Journal of the Society of Toxicology**, v. 54, p. 365-373, 2000.

FISCHER, W.J.; DIETRICH, D.R. Pathological and biochemical characterization of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 164 (1), p. 73-81, 2000.

FU, W.; CHEN, J.; WANG, X.; XU, L. Altered expression of p-53, Bcl-2 and Bax induced by microcystin-LR in vivo and in vitro. **Toxicon**, v. 46, p. 171-177, 2005.

GAIOTTO, M.A.M.; RIBALTA, J.C.L.; FOCCHI, J.; STÁVALE, J.N.; YMAYO, M.R.; CODÁ, N.M. Relação entre a atividade proliferativa do epitélio e a resposta angiogênica estromal em neoplasias intra-epiteliais do colo uterino. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 22(6), p. 339-345, 2000.

HARADA K-I., MURATA, H., QIANG, Z., SUZUKI, M., KONDO, F. Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria. **Toxicol.**, v. 34, p. 701-710, 1996.

HARADA, K.; IMANISHI, S.; KATO, H.; MIZUNO, M.; ITO, E.; TSUJI, K. Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation. **Toxicol.**, v. 44(1), p. 107-9, 2004.

HIROOKA, E.Y. PINOTTI, M.H.; TSUTSUMI, T.; YOSHIDA, F.; UENO, Y. Survey of microcystins in water between 1995 and 1996 in Paraná, Brazil using ELISA. **Natural Toxins**, New York, v.7, p. 103-109, 1999.

ITO, E.; KONDO, F.; TERAOKA, K.; HARADA, K-I. Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR. **Toxicol.**, v. 35(9); p. 1453-1457, 1997.

KAMOGAE, M.; HASHIMOTO, E.H.; PÁDUA, C.G.; SOARES, F.S.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; YABE, M.J.S.; ONO, E.Y.S.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; SANT'ANA, C.L.; TSUTSUMI, T.; NAGATA, S.; UENO, Y.; HARADA, K-I.; HIROOKA, E.Y. **Monitoring microcystin and physicochemical parameters: role of agricultural-aquaculture activity in the water quality.** Wageningen Academic Publishers: Netherlands, p. 321-331, 2006.

KOTAK, B. G.; SEMALULU, S.; FRITZ, 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*). **Toxicol.**, v. 34(5), p. 517-525, 1996.

LANKOFF, A.; BANASIK, A.; OBE, G.; DEPERAS, M.; KUZMINSKI, K.; TARCZYNSKA, M.; JURCZAK, T.; WOJCIK, A. Effect of microcystin-LR and cyanobacterial extract from Polish reservoir of drinking water on cell cycle progression, mitotic spindle, and apoptosis in CHO-K1 cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 189(3), p. 204-13, 2003.

LI, X.; LIU, Y.; SONG, L.; LIU, J. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. **Toxicol.**, v. 42(1), p. 85-89, 2003.

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

LI, L.; XIE, P.; CHEN, J. Biochemical and ultrastructural changes of the liver and kidney of the phytoplanktivorous silver carp feeding naturally on toxic *Microcystis* blooms in Taihu Lake, China. **Toxicol.**, v. 49, p. 1042-1053, 2007.

MADER, A.M.A.A.; PATRÍCIO, F.R.S.; RIGUEIRO, M.P.; LOURENÇO, L.G. Estudo clínico-patológico, da proliferação celular e da apoptose no adenocarcinoma gástrico da cárdia. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 43(3), p. 184-190, 2006.

MALBROUCK, C.; TRAUSSCH, G.; DEVOS, P.; KESTEMONT, P. Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. **Comparative Biochemistry and Physiology Part. C.**, v. 135(1), p. 39-48, 2003.

MALBROUCK, C.; TRAUSCH, G.; DEVOS, P.; KESTEMONT, P. Effect of microcystin-LR on protein phosphatase activity and glycogen content in isolated hepatocytes of fed and fasted juvenile goldfish *Carassius auratus* L. **Toxicol.**, v. 44(8), p. 927-32, 2004.

MAGALHÃES, V.F.; SOARES, R.M.; AZEVEDO, S.M.F.O. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. **Toxicol.**, v. 39(7), p. 1077-1085, 2001.

MAGALHÃES, V.F.; MARINHO, M.M.; DOMINGOS, P.; OLIVEIRA, A.C.; COSTA, S.M.; AZEVEDO, L.O. AZEVEDO, S.M. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). **Toxicol.**, v. 42(3), p. 289-95, 2003.

MARTINS, A.C.P.; FARIA, S.M.; VELLUDO, M.A.L.; COLOGNA, A.J.; SUAID, H.J.; JR, S.T. Carcinoma of the penis: the value of proliferating cellular nuclear antigen (PCNA). **Braz J Urol**, v. 26, p. 38-42, 2000.

MATHEUS, R.S.; BERNARDI FDEL, C.; GALLO, C.P.; DA SILVA, A.P.; RODRIGUES, O.R.; CAPELOZZI, M.; LOPES, A.; FENEZELIAN, S.; SALDIVA, P.H.; CAPELOZZI, V.L. Nuclear markers (star volume, mitotic index, AgNOR and Ki-67) of the primary tumor and its metastasis in non-small cell lung carcinomas. **Pathol. Res. Pract.**, v. 200(1), p. 13-23, 2004.

MEHTA, R. The potential for the use of cell proliferation and oncogene expression as intermediate markers during liver carcinogenesis. **Cancer Lett.**, v. 93(1), p. 85-102, 1995.

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

MSAGATI, T.A.M.; SIAME, B.A.; SHUSHU, D.D. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. **Aquatic Toxicology**, v. 78, p. 382-397, 2006.

NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R., OHTA, T.; NISHIWAKI, S.; SUGANUMA, M.; KOHYAMA, K.; ISHIKAWA, T.; C ARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H.; R. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. **Journal Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 118, p. 420-424, 1992.

PINHO, G.L.L.; ROSA, C.M.; MACIEL, F.E.; BIANCHINI, A.; YUNES, J.S.; PROENÇA, L.A.O.; MONSERRAT, J.M. Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, p. 353-360, 2005.

RABERGH, C.M.I.; BYLUND, G.; ERIKSSON, J.E. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquatic Toxicology**, v. 20, p. 131-145, 1991.

RIVERO, E.R.-C.; AGUIAR, M.C.F. Análise quantitativa das AgNORs no carcinoma adenóide cístico intra-oral através da técnica de dupla marcação PCNA/AgNOR. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38(1), p. 39-44, 2002.

RODGER, H.D.; TURNBULL, T.; EDWARDS, C.; CODD, G.A. Cyanobacterial bloom associated pathology in brown trout *Salmo trutta* L. **Journal of Fish Diseases**, v. 17, p. 117-181, 1994.

SAHIN, A.; TENCALLA, F.G.; DIETRICH, D.R.; MEZ, K.; NAEGELI, H. Enzymatic analysis of liver samples from rainbow trout for diagnosis of blue-green algae-induced toxicosis. **Am. J. Vet. Res.**, v. 56(8), p. 1110-1115, 1995.

SANTOS, F.G.A.; GUEDES, R.M.C.; CASSALI, G.D.; MEJIA, G.E.G.; VASCONCELOS, A.C. Caracterização e quantificação de regiões organizadoras de nucléolos coradas pela prata (AgNORs) em tumor venéreo transmissível canino, genital e extragenital. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 50 (6), p. 665-672, 1998.

SICINSKA, P.; BUKOWSKA, B.; MICHALOWICZ, J.; DUDA, W. Damage of cell membrane and antioxidative system in human erythrocytes incubated with microcystin-LR in vitro. **Toxicol.**, v. 47, p. 387-397, 2006.

SIRRI, V.; ROUSSEL, P.; HERNANDEZ-VERDUN, D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. **Micron**, v. 31, p. 121-126, 2000.

SOARES, R.M.; MAGALHAES, V.F.; AZEVEDO, S.M. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. **Aquat. Toxicol.**, v. 70(1), p. 1-10, 2004.

SOLTER, P.F.; WOLLENBERG, G.K.; HUANG, X.; CHU, F.S.; RUNNERGAR, M.T. Prolonged sublethal exposure to the protein phosphatase inhibitor microcystin-LR results in multiple dose-dependent hepatotoxic effects. **Toxicological Sciences**, v. 44, p. 87-96, 1998.

TRERÈ, D. AgNOR staining and quantification. **Micron**, v. 31, p. 127-131, 2000.

VAJCOVÁ, V.; NAVRÁTIL, S.; PALÍKOVÁ, M. The effect of intraperitoneally applied pure microcystin LR on haematological, biochemical and morphological indices of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.). **Acta-Veterinaria-Brno**, v. 67(4), p. 281-287, 1998.

VIEIRA, J.M.S.; AZEVEDO, M.T.P.; AZEVEDO, S.M.F.O.; HONDA, R.Y.; CORRÊA, B. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. **Toxicol.**, v. 45, p. 901-909, 2005.

WENG, D.; LU, Y.; WEI, T.; LIU, Y.; SHEN, P. The role of ROS in microcystin-LR-induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice. **Toxicology**, v. 232, p. 15-23, 2007.

YIN, L.; HUANG, J.; LI, W.; LIU, Y. Microcystin-RR-induced apoptosis in tobacco BY-2 cells. **Toxicol.**, v. 48, p. 204-210, 2006.

YOSHIDA, T.; MAKITA, Y.; TSUTSUMI, T.; NAGATA, S.; TASHIRO, F.; YOSHIDA, F.; SEKIJIMA, M.; TAMURA, S.I.; HARADA, T.; MAITA, K.; UENO, Y. Immunohistochemical localization of microcystin-LR in the liver of mice: A study on pathogenesis of microcystin-LR induced hepatotoxin. **Environmental Toxicology Pathology**, v. 26(3), p. 411-418, 1998.

YUAN, M.; CARMICHAEL, W.W.; HILBORN, E.D. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brasil 1996. **Toxicol.**, v. 48(6), p. 627-640, 2006.

5 CONCLUSÕES

- 5.1. A exposição à microcistina induziu alterações histológicas irreversíveis nos ensaios propostos.
- 5.2. As alterações histológicas foram acentuadas e difusas nos animais inoculados intrapritoneal, tanto no ensaio agudo quanto no ensaio subcrônico.
- 5.3. A microcistina induziu proliferação de hepatócitos nos animais submetidos à exposição aguda, por imersão e à exposição subcrônica, por inoculação intrapritoneal.