



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

CYLENE ZAMBROZI GARCIA

**EFEITOS BIOQUÍMICOS E GENÉTICOS DE FLORAÇÕES
NATURAIS DE CIANOBACTÉRIAS E DE *MICROCYSTIS*
AERUGINOSA NO PEIXE *PROCHILODUS LINEATUS***

CYLENE ZAMBROZI GARCIA

**EFEITOS BIOQUÍMICOS E GENÉTICOS DE FLORAÇÕES
NATURAIS DE CIANOBACTÉRIAS E DE *MICROCYSTIS*
AERUGINOSA NO PEIXE *PROCHILODUS LINEATUS***

Dissertação apresentada ao curso de Pós
Graduação em Ciências Biológicas, da
Universidade Estadual de Londrina, como requisito
para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Bueno dos
Reis Martinez

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (Cip)

G216e Garcia, Cyleny Zambrozi.

Efeitos bioquímicos e genéticos de florações naturais de cianobactérias e de
Microcystis aeruginosa no peixe *Prochilodus Lineatus* / Cyleny Zambrozi Garcia.
– Londrina, 2011
125 f. : il.

Orientador: Claudia Bueno dos Reis Martinez.

Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro
de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas, 2011.

Inclui bibliografia.

1. *Prochilodus Lineatus* – Teses. 2. Cianobacteria – Teses. 3. Peixe – Toxicidade
genética – Teses. 4. Peixe – Toxicidade – Testes – Teses. 5. Antioxidante – Teses. I.
Martinez, Claudia Bueno dos Reis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 597.554.1

CYLENE ZAMBROZI GARCIA

**EFEITOS BIOQUÍMICOS E GENÉTICOS DE FLORAÇÕES NATURAIS
DE CIANOBACTÉRIAS E DE *MICROCYSTIS AERUGINOSA* NO PEIXE
*PROCHILODUS LINEATUS***

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Silvia Helena Sofia
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. José María Monserrat
FURG - Federal do Rio Grande - RS

Londrina, 25 de fevereiro de 2011.

Dedico este trabalho com todo carinho aos meus pais, pelo apoio e exemplo em tudo, ao meus queridos irmãos, pelo companherismo, ao Fernando, meu grande amor e a Claudia, pela oportunidade que me deu.

AGRADECIMENTOS

À DEUS... peça fundamental pela existência de tudo que conquistei e sou.

À minha querida orientadora Claudia. Obrigada por mesmo sem me conhecer, ter me dado a oportunidade de realizar mais um sonho, mais uma conquista. Obrigada pela amizade, pela convivência gostosa no laboratório, pelas boas conversas nas festinhas, pelos ensinamentos e pela paciência. Te admiro muito!

Ao CNPq, pela bolsa de estudo.

Ao Programa de Mestrado de Ciências Biológicas da UEL.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas da UEL.

À UFSCar pelo fornecimento do liofilizado de floração natural de cianobactéria.

À UNESP, campus Ilha Solteira, pelo fornecimento do liofilizado de *Microcystis aeruginosa*.

À minha banca de qualificação, professor Paulo Meletti, professor Francisco Striquer e a Juliana Simonato, que se DEUS quiser, ainda será uma grande professora da UEL.

À minha banca examinadora, Claudia Martinez, Silvia Sofia e José Monserrat.

Às minhas queridas amigas, Dalita, Natália e Thais, obrigada pela amizade, pelos almoços no RU, por fazer meus dias mais felizes aqui em Londrina, por me aguentar ficar falando só de casamento, por me ajudarem nos experimentos e nas análises e a cima de tudo, por me fazer uma pessoa ainda melhor.

Aos amigos do laboratório: Juliana, Luciana, Francine, Lindalva, Cássia, Bruna, Andrea, Rafaela, Alexandre, Thiago, Gabriel, Carozinha, Carol e Kelly. Obrigada por tudo, porque sozinha não se faz nada no nosso laboratório!

Aos funcionários da Estação de Piscicultura da UEL, pelo fornecimento dos peixes.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus queridos pais, que sempre me apoiaram e me deram força para chegar até aqui.

À minha irmã Livia, que mesmo distante, sempre esteve presente na realização deste trabalho.

Ao meu querido irmão Guilherme. Obrigada por esses dois anos maravilhosos de convivência e por me apoiar e me ajudar sempre.

À minha vizinha Léa, que mesmo de idade sempre entendeu meus estudos e sempre me incentivou.

Ao Fernando, grande amor da minha vida, pela dedicação, carinho, companherismo, por me ajudar neste trabalho, pelos incentivos na minha vida profissional e por me fazer muito feliz!

GARCIA, Cyrene Zambrozi. **Efeitos bioquímicos e genéticos de florações naturais de cianobactérias e de *Microcystis aeruginosa* no peixe *Prochilodus lineatus***. 2011. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

A eutrofização das águas doces, decorrente da ação antrópica e da degradação ambiental, apresenta como uma de suas consequências a proliferação de algas, dentre as quais se destacam as cianobactérias. Nas florações de cianobactérias geralmente são liberadas diferentes cianotoxinas e outras substâncias que podem apresentar diversos efeitos sobre os organismos aquáticos. De acordo com seu efeito tóxico e modo de ação as cianotoxinas são classificadas em diferentes classes; as microcistinas (MC) pertencem à classe das hepatotoxinas e são liberadas por diversos organismos fitoplancônicos dentre os quais se destaca a *Microcystis aeruginosa* (MA). Diante disso, o objetivo deste trabalho foi comparar os efeitos de florações naturais de cianobactérias (FNC) com aqueles exercidos apenas pela MA em parâmetros bioquímicos e genéticos do peixe neotropical *Prochilodus lineatus*. Foram realizados experimentos independentes com peixes jovens expostos ao liofilizado de FNC (1 e 2 mg.L⁻¹) ou ao liofilizado de MA (1 e 2 mg.L⁻¹), durante 24 e 96 h. Para cada experimento, peixes expostos apenas à água e amostrados nos mesmos períodos experimentais constituíram os grupos controles (CTR). Após cada exposição amostras de água foram coletadas para a quantificação de microcistina do tipo LR (MC-LR) e os peixes foram amostrados para a coleta de sangue, pela veia caudal, brânquias, fígado, cérebro e músculo. Com as brânquias e o fígado foram realizados ensaios bioquímicos para a determinação da atividade da CYP1A (pelo ensaio da EROD), glutathione S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR), conteúdo de dissulfeto de glutathione (GSH) e peroxidação lipídica (LPO). A atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi determinada no cérebro e no músculo e a ocorrência de danos no DNA, nos eritrócitos e nas células branquiais, foi avaliada pelo ensaio do cometa. Nas amostras de água contendo 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de FNC e de MA foram detectados respectivamente 0,9 e 1,9 µg.L⁻¹ de MC-LR. Os resultados mais significativos obtidos após a exposição dos peixes a FNC foram a ativação da EROD no fígado, das enzimas antioxidantes nas brânquias e a inibição da AChE no cérebro. Já os peixes expostos ao liofilizado de MA apresentaram ativação da GST, tanto na brânquia quanto no fígado, que deve refletir o fato de que a via de metabolização da MC é justamente pela conjugação com a GSH, catalizada pela GST. A redução de GSH, acompanhada pelo aumento na GR, nos peixes expostos a MA reforçam o importante papel da conjugação com a GSH na metabolização da MC. A ativação das defesas antioxidantes nos animais expostos a MA parece ter sido suficiente para evitar LPO, entretanto pode não ter sido suficiente para evitar os danos no DNA, observados nos eritrócitos dos peixes expostos a MA, durante 96 h. Os resultados também mostraram que tanto a exposição ao liofilizado de FNC quanto de MA ativaram a via de detoxificação de fase I no fígado. Assim, verificou-se que tanto a exposição à FNC quanto à MA foram tóxicas para *P. lineatus* e podem trazer prejuízos para as populações desta espécie. A exposição ao liofilizado de FNC promoveu inibição da AChE, que podem gerar alterações comportamentais, enquanto a exposição a MA promoveu danos na molécula do DNA, que se não forem corrigidos podem desencadear mutações.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase. Antioxidantes. Detoxificação. Genotoxicidade.

GARCIA, Cyrene Zambrozi **Biochemical and genetic effects of natural blooms of cyanobacteria and *Microcystis aeruginosa* on the fish *Prochilodus lineatus***. 2011. 125 f. Dissertation (Master's degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

Eutrophication of freshwater, resulting from human action and environmental degradation, features as one of its consequences algal blooms, among which we highlight the cyanobacteria. Blooms of cyanobacteria usually release different cyanotoxins and other substances that may have diverse effects on aquatic organisms. According to their toxicity and type of action cyanotoxins are classified in different groups; the microcystins (MC) belong to the group of hepatotoxins and are released by several phytoplanktonic organisms among which *Microcystis aeruginosa* (MA). Therefore, the objective of this work was to compare the effects of natural blooms of cyanobacteria (FNC) with those promoted only by the MA on biochemical and genetic parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Independent experiments were carried out with juvenile fish exposed to lyophilized FNC (1 and 2 mg.L⁻¹) or lyophilized MA (1 and 2 mg.L⁻¹) for 24 and 96 hours. For each experiment, fish exposed only to water and sampled at the same periods constituted the control groups (CTR). After each exposure period water samples were collected for the quantification of microcystin-type LR (MC-LR) and fish were sampled for the removal of blood, by the caudal vein, gills, liver, brain and muscle. With the gills and the liver biochemical tests were performed to determine the activity of CYP1A (EROD assay), glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), the content of glutathione disulfide glutathione (GSH) and lipid peroxidation (LPO). The activity of acetylcholinesterase (AChE) was determined in the brain and muscle samples and the occurrence of DNA damage, in erythrocytes and gills cells, by the comet assay. In water samples containing 1 e 2 mg.L⁻¹ of lyophilised FNC and MA were detected respectively 0,9 e 1,9 µg. L⁻¹ of MC-LR. The most significant results obtained after exposure of the fishes to the FNC were the activation of EROD in the liver and antioxidants enzymes in the gills, and the inhibition of AChE in the brain. Fish exposed to the lyophilized of MA showed activation of GST in both the gill and the liver, which should reflect the fact that the metabolic pathway of MC is mainly by the conjugation with GSH catalyzed by GST. The reduction of GSH together with an increase in GR, in fish exposed to MA, reinforces the important role of the conjugation with GSH (phase II) in the metabolism of MC. The activation of antioxidants defenses in animals exposed to MA appears to have been sufficient to avoid LPO, however it was not enough to prevent DNA damage, that was observed in the erythrocytes of fishes exposed to MA, for 96 h. The results also showed that the exposure to both FNC and MA activated phase I detoxification in the liver. Thus, it was found that both exposure to FNC and to MA were toxic to *P. lineatus* and may bring harm to populations of this species. Exposure to lyophilized FNC promote inhibition of AChE, which way cause behavioral changes, while exposure to MA caused damage to the DNA molecule, which if not corrected can trigger mutations.

Keywords: Acetylcholinesterase. Antioxidants. Detoxification. Genotoxicity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Características das cianotoxinas	23
--	----

Artigo A

Tabela 3.1 – Frequência média de nucleóides danificados observados em cada uma das classes do Cometa (0, 1, 2 e 3) e número de nucleóides danificados (média $\pm$ EP) nos eritrócitos de <i>Prochilodus lineatus</i> expostos a 1 e 2 mg.L ⁻¹ do liofilizado de FNC (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h.....	63
Tabela 3.2 – Frequência média de nucleóides danificados observados em cada uma das classes do Cometa (0, 1, 2 e 3) e número de nucleóides danificados (média $\pm$ EP) nas células branquiais de <i>Prochilodus lineatus</i> expostos a 1 e 2 mg.L ⁻¹ do liofilizado de FNC (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h.....	63

Artigo B

Tabela 4.1 – Frequência média de nucleóides danificados observados em cada uma das classes do Cometa (0, 1, 2 e 3) e número de nucleóides danificados (média $\pm$ EP) nos eritrócitos de <i>Prochilodus lineatus</i> expostos a 1 e 2 mg.L ⁻¹ do liofilizado de MA (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h.....	92
Tabela 4.2 – Frequência média de nucleóides danificados observados em cada uma das classes do Cometa (0, 1, 2 e 3) e número de nucleóides danificados (média $\pm$ EP, n: de 5 a 8) nas células branquiais de <i>Prochilodus lineatus</i> expostos a 1 e 2 mg.L ⁻¹ do liofilizado de MA (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h	93
Tabela 5.1 – Resultados obtidos para <i>Prochilodus lineatus</i> expostos a 1 e 2 mg.L ⁻¹ do liofilizado de FNC e de MA por 24 e 96 h. Os sinais =, $\uparrow$ e $\downarrow$ indicam, respectivamente, ausência de diferença, aumento ou redução significativa em relação ao respectivo controle	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Morfologia das cianobactérias. A: forma unicelular (<i>Synechocystis</i>); B: forma colonial (<i>Microcystis</i>) e C: forma filamentosa (<i>Anabaena</i>)	20
Figura 1.2 – Estrutura da microcistina do tipo LR (MC-LR) (ANTONIOU et al., 2008)	25
Figura 1.3 – Possíveis vias de entrada da microcistina nas células. GSH: dissulfeto de glutatona; Oatps: polipeptídeos de transporte de ânions orgânicos; MC: microcistina; GST: glutatona S-transferase; ERO: espécie reativa de oxigênio; PP1 e PP2A: proteína fosfatase 1 e 2A. Adaptado de Amado & Monserrat, 2010 e Campos & Vasconcelos 2010	28
Figura 1.4 – Modelo experimental: <i>Prochilodus lineatus</i>	30
Figura 1.5 – Comparação dos efeitos provocados por agentes estressores em um sistema biológico de baixo e alto nível de organização biológica (Adaptado de LAM, 2009, baseado em CONNELL, 1999)	32
Figura 1.6 – Mecanismo de biotransformação, envolvendo a fase I e II. Legenda: Cit P450- citocromo P450; GSTglutatona S-transferase; GSH- dissulfeto de glutatona. Baseado em Van der Oost et al., 2003	34
Figura 1.7 – Reação química catalisada pelo CYP451A, expressada pela EROD (BURKE & MAYER, 1983)	35
Figura 1.8 – Defesa antioxidante após a entrada do xenobiótico no organismo. ERO - espécie reativa de oxigênio; SOD - superóxido dismutase; CAT- catalase; GPx - glutatona peroxidase; GSH – dissulfeto de glutatona; GSSG - glutatona oxidada; GR - glutatona redutase; GST – glutatona S-transferase; O ₂ ^{•-} - ânion radical superóxido; H ₂ O ₂ - peróxido de hidrogênio; •OH – radical hidroxil; G6PDH - glicose 6 fosfato desidrogenase. Adaptado de Hermes-Lima, 2004	41
Figura 1.9 – Danos nos eritrócitos verificados pelo ensaio do cometa. Dano 0 (sem dano aparente), 1 (pouco dano), 2 (dano médio) e 3 (muito dano)	43

Artigo A

- Figura 3.1** – Atividade da EROD nas brânquias (A) e no fígado (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de FNC (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8). *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle (p ≤ 0,05) 58
- Figura 3.2** – Atividade da GST nas brânquias (A) e no fígado (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de FNC (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8) 58
- Figura 3.3** – Atividade da SOD (A), da CAT (B), da GPx (C) e da GR (D) nas brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de FNC (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8). *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle (p ≤ 0,05) 59
- Figura 3.4** – Atividade da SOD (A), da CAT (B), da GPx (C) e da GR (D) no fígado de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de FNC (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8). *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle (p ≤ 0,05) 60
- Figura 3.5** – Conteúdo de GSH nas brânquias (A) e no fígado (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de FNC (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8). *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle (p ≤ 0,05) 60
- Figura 3.6** – Conteúdo de MDA nas brânquias (A) e no fígado (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de FNC (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8). *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle (p ≤ 0,05) 61

- Figura 3.7** – Atividade da enzima acetilcolinesterase no cérebro (A) e no músculo (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de FNC (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8). *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle (p _ 0,05) 61
- Figura 3.8** – Escores de danos em células sanguíneas (A) e branquiais (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de FNC (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 4-8) 62

Artigo B

- Figura 4.1** – Atividade da EROD nas brânquias (A) e no fígado (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de MA (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8). *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle (p _ 0,05) 87
- Figura 4.2** – Atividade da GST nas brânquias (A) e no fígado (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de MA (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8). *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle (p _ 0,05) 87
- Figura 4.3** – Atividade da SOD (A), da CAT (B), da GPx (C) e da GR (D) nas brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de MA (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n:8). *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle (p _ 0,05) 88
- Figura 4.4** – Atividade da SOD (A), da CAT (B), da GPx (C) e da GR (D) no fígado de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de MA (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8). *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle (p ≤ 0,05) 89

- Figura 4.5** – Conteúdo de GSH nas brânquias (A) e no fígado (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de MA (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8). *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle ($p \leq 0,05$) 90
- Figura 4.6** – Conteúdo de MDA nas brânquias (A) e no fígado (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de MA (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8) 90
- Figura 4.7** – Atividade da enzima acetilcolinesterase no cérebro (A) e no músculo (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de MA (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8) 91
- Figura 4.8** – Escores de danos em células sanguíneas (A) e branquiais (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de MA (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 4-8). *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle ($p \leq 0,05$) 91

LISTA DE ABREVIATURAS

•OH	radical hidroxil
ACh	acetilcolina
AChE	acetilcolinesterase
Adda	3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8,trimetildeca-4,6-ácido dienóico
AhR	aril hidrocarboneto
BChE	butirilcolinesterase
CAT	catalase
ChE	colinesterase
CuZn-SOD	cobre-zinco SOD
CYP 450	citocromo P450
EPUEL	Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina/PR
ERO	espécie reativa de oxigênio
EROD	etoxiresorufina-O-desetilase
Fe-SOD	ferro SOD
FNC	Floração Natural de Cianobactéria
G6PDH	glicose 6 fosfato desidrogenase
GPx	glutationala peroxidase
GR	glutationala redutase
GSH	tripeptídeo tiol glutationala, glutationala reduzida ou dissulfeto de glutationala
GSSG	forma oxidada da glutationala reduzida
GST	glutationala S-transferase
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
i.p.	injeção intraperitoneal
LEFA	Laboratório de Ecofisiologia Animal/UEL
LPO	peroxidação lipídica
LPS	lipopolissacarídeo
MA	<i>Microcystis aeruginosa</i>
MC	microcistina
MC-LR	microcistina do tipo LR
MC-RR	microcistina do tipo RR

MC-YR	microcistina do tipo YR
MDA	malondialdeído
Mdha	metildehidroalanina
Mn-SOD	manganês SOD
NO[•]	ácido nítrico
O₂^{-•}	ânion radical superóxido
Oatps	polipeptídeos de transporte de ânions orgânicos
OD	oxigênio dissolvido
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO⁻	peróxido nitrito
PP	proteína fosfatase
PP1	proteína fosfatase 1
PP2A	proteína fosfatase 2A
PUFAs	ácidos graxos poliinsaturados
SOD	superóxido dismutase
TCA	ácido tricloacético
TDI	Tolerância Diária Ingerida
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	CONSEQUÊNCIAS GERADAS PELA EUTROFIZAÇÃO	18
1.2	CIANOBACTÉRIAS	19
1.3	CIANOTOXINAS	21
1.4	MICROCISTINA	24
1.5	O USO DE PEIXES COMO BIOINDICADORES	28
1.6	PROCHILODUS LINEATUS	29
1.7	BIOMARCADOR	31
1.7.1	Enzimas de Biotransformação	33
1.7.2	Defesas Antioxidantes	36
1.7.3	Peroxidação Lipídica	41
1.7.4	Danos no DNA	42
1.7.5	Acetilcolinesterase	44
2	OBJETIVOS E ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	46
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
3	ARTIGO A – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOQUÍMICOS E GENÉTICOS DE FLORAÇÕES NATURAIS DE CIANOBACTÉRIAS PARA O PEIXE NEOTROPICAL <i>PROCHILODUS LINEATUS</i>	48
3.1	INTRODUÇÃO	49
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	52
3.2.1	Animais	52
3.2.2	Preparo do Liofilizado de Florações Naturais de Cianobactérias (FNC) e dos meios de Exposição	52
3.2.3	Teste de Toxicidade	52
3.2.4	Amostragem	53
3.2.5	Análises Bioquímicas	53
3.2.5.1	Enzimas de biotransformação	53
3.2.5.2	Antioxidantes enzimáticos	54
3.2.5.3	Conteúdo de GSH	54

3.2.5.4	Peroxidação lipídica.....	55
3.2.5.5	Atividade da acetilcolinesterase.....	55
3.2.5.6	Concentração de proteína.....	55
3.2.6	Análise de Danos no DNA – Ensaio do Cometa.....	55
3.2.7	Análises Estatísticas	57
3.3	RESULTADOS.....	57
3.3.1	Parâmetros da Água.....	57
3.3.2	Enzimas de Biotransformação.....	57
3.3.3	Antioxidantes Enzimáticos.....	59
3.3.4	Conteúdo de GSH.....	60
3.3.5	Peroxidação Lipídica (LPO).....	61
3.3.6	Atividade da Acetilcolinesterase.....	61
3.3.7	Danos no DNA	62
3.4	DISCUSSÃO	63
3.5	AGRADECIMENTOS.....	70
	Referências	71

4	ARTIGO B – ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E GENÉTICAS NO PEIXE <i>PROCHILODUS LINEATUS</i> INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO À <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i>.....	77
4.1	INTRODUÇÃO	78
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	81
4.2.1	Animais	81
4.2.2	Preparo do Liofilizado de <i>Microcystis Aeruginosa</i> e dos meios de Exposição.....	81
4.2.3	Testes de Toxicidade.....	81
4.2.4	Amostragem	82
4.2.5	Análises Bioquímicas.....	82
4.2.5.1	Enzimas de biotransformação	82
4.2.5.2	Antioxidantes enzimáticos	83
4.2.5.3	Conteúdo de GSH	83
4.2.5.4	Peroxidação lipídica.....	84
4.2.5.5	Atividade da acetilcolinesterase	84
4.2.5.6	Concentração de proteína.....	84
4.2.6	Análise de Danos no DNA – Ensaio do Cometa.....	84

4.2.7	Análise Estatística	86
4.3	RESULTADOS.....	86
4.3.1	Parâmetros da Água.....	86
4.3.2	Enzimas de Biotransformação.....	86
4.3.3	Enzimas Antioxidantes.....	88
4.3.4	Conteúdo de GSH.....	89
4.3.5	Peroxidação Lipídica (LPO).....	90
4.3.6	Atividade da Acetilcolinesterase	91
4.3.7	Danos no DNA	91
4.4	DISCUSSÃO	93
4.5	AGRADECIMENTOS.....	102
	Referência.....	103
	 CONSIDERAÇÕES FINAIS	 109
	 REFERÊNCIAS	 112

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSEQUÊNCIAS GERADAS PELA EUTROFIZAÇÃO

A eutrofização das águas doces é considerada um dos maiores problemas ambientais em nível mundial por causar grandes impactos negativos na natureza, na saúde e na economia. Segundo Wetzel (1993), a eutrofização pode ser definida como uma resposta biológica decorrente do aumento de nutrientes (principalmente fósforo e nitrogênio) e/ou matéria orgânica no ambiente aquático, tendo como consequência o aumento da produtividade, perturbação na qualidade da água e na estabilidade dos organismos.

Embora tenha uma origem natural, atualmente a eutrofização vem apresentando uma origem antropogênica (SALAS & MARTINO, 2001) decorrente da intensa exploração agrícola, do aumento populacional, da descarga de efluentes agrícolas, urbanos e/ou industriais, do uso de fertilizantes, queima de combustíveis fósseis, dentre outros (Codd, 2000; Briand et al., 2003). Diversas são as consequências geradas em um corpo d'água eutrofizado. Segundo Santos e colaboradores (2005) e Smayda (2004) a eutrofização pode ocasionar a diminuição da biodiversidade; acesso restrito à pesca e atividades recreativas devido ao acúmulo de plantas aquáticas; alteração na composição das espécies (em termos econômicos e valor protéico); diminuição no número de peixes causada pela depleção de oxigênio na coluna d'água; formação de espumas superficiais; florescimento ou “bloom” de algas e de plantas flutuantes ou enraizadas.

Além disso, a eutrofização pode favorecer o desenvolvimento de cianobactérias potencialmente tóxicas, conhecidas também como cianofíceas ou algas azuis (BITTENCOURT-OLIVEIRA & MOLICA, 2003). A rápida proliferação desses organismos e seu acúmulo na superfície da água dá origem ao fenômeno conhecido como florações ou “blooms” (Briand et al., 2003), que podem promover aspectos negativos do ponto de vista estético e biológico, uma vez que podem alterar as características organolépticas da água; diminuir a penetração luminosa, perturbando as interações tróficas; reduzir a biodiversidade; liberar potentes toxinas e ainda, levar a anóxia do local, devido à sua decomposição, prejudicando a saúde da biota (VASCONCELOS et al., 1995; WASSMANN & OLLI, 2004; ANTONIOU et al., 2008).

Com efeito, se a eutrofização promove a proliferação de cianobactérias e se uma alta proporção desses seres fitoplancctônicos apresentam a capacidade de liberar toxinas, é de extrema importância o monitoramento de ambientes aquáticos, uma vez que a água doce é essencial para o abastecimento público, atividades recreacionais, turismo, dentre outros.

1.2 CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias pertencem ao reino Monera, divisão Eubacteria e classe Cyanobacteria. Apresentam um grupo ancestral de origem bastante antiga com registros fósseis que datam de 3,5 bilhões de anos atrás, em rochas sedimentares no noroeste da Austrália (BRIAND et al., 2003).

Elas apresentam características semelhantes à das algas pela presença de parede celular, pigmentos celulares e capacidade fotossintética (HITZFELD et al., 2000), e por possuírem pigmentos azulados (ficocianina) eram consideradas como algas azuis. Porém com o advento da microscopia eletrônica, verificou-se que esses organismos não eram algas (eucariontes) já que não possuíam membrana nuclear definida, presença de mitocôndrias e outras organelas, e sim, bactérias (procariontes), que são organismos mais simples, sem membrana nuclear (BITTENCOURT-OLIVEIRA & MOLICA, 2003; ANTONIOU et al., 2008).

As cianobactérias são consideradas como os primeiros produtores primários de matéria orgânica a liberarem oxigênio elementar na atmosfera primitiva, dando início assim a nossa atmosfera atual, rica em oxigênio. Também são consideradas responsáveis pela evolução dos organismos fotossintetizantes, uma vez que os cloroplastos foram originados por endossimbiose por formas atuais de cianobactérias (MUR et al., 1999; BITTENCOURT-OLIVEIRA & MOLICA, 2003; ANTONIOU et al., 2008).

Composta por 150 gêneros e 2000 espécies, as cianobactérias apresentam como características a capacidade de tolerar altas intensidades luminosas; têm necessidades nutricionais relativamente simples; suportam temperaturas entre 15° e 30°C e pH entre 6 e 9; apresentam uma ampla distribuição, podendo ser encontrada em ambientes de água doce, marinhos, terrestres e habitats hipersalinos e hipotermiais, porém é no ambiente de água doce com elevadas cargas de nutrientes que elas se desenvolvem preferencialmente (CHORUS & MUR, 1999; ZIMBA et al., 2001; HUDNELL et al., 2010).

As cianobactérias apresentam uma diversidade morfológica bastante variada, podendo exibir formas unicelulares, coloniais e filamentosas (Figura 1.1). Os indivíduos unicelulares, como o gênero *Synechocystis*, podem apresentar as formas arredondadas, elípticas e cilíndricas. As colônias podem ser formadas por poucas células ou centenas delas, podendo apresentar formas arredondadas, alongadas, tubulares, cúbicas ou irregulares, e ainda podem conter uma mucilagem que permite a conformação da estrutura da colônia, como no gênero *Microcystis*. As formas filamentosas, como os gêneros *Cylindrospermopsis* e *Anabaena*, podem ou não apresentar a bainha de mucilagem e ser do tipo ramificada ou não (SIVONEN & JONES, 1999; ZIMBA et al., 2001; BRIAND et al., 2003).

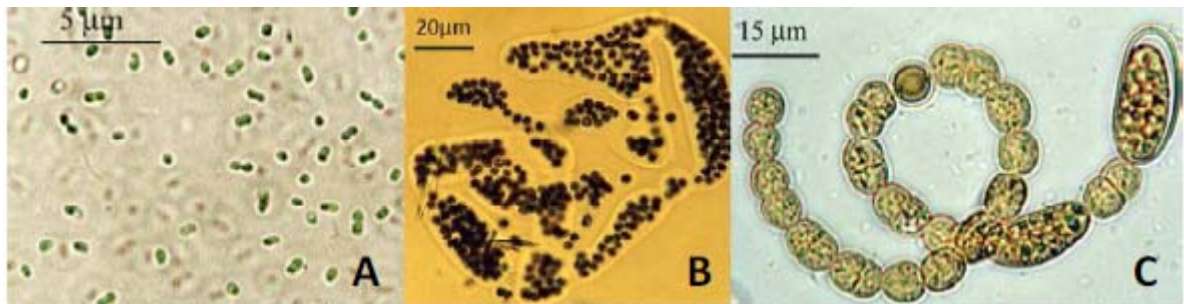


Figura 1.1 – Morfologia das cianobactérias. A: forma unicelular (*Synechocystis*); B: forma colonial (*Microcystis*) e C: forma filamentosa (*Anabaena*).

Algumas cianobactérias filamentosas, como *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Nodularia* e *Nostoc* possuem células diferenciadas, tais como os heterocistos, especializados na fixação do nitrogênio, e acinetos, responsáveis em armazenar substâncias de reserva, como por exemplo, o amido, favorecendo a sobrevivência em condições desfavoráveis. Outras espécies armazenam fósforo na forma de polifosfato, podendo esse nutriente ser utilizado quando o mesmo estiver em concentração baixa ou insuficiente no meio onde se encontram (MUR et al., 1999; BRIAND et al., 2003).

O nitrogênio é um elemento importante na composição da vesícula gasosa presente em cianobactérias. Assimilado somente na forma do íon amônia, esse nutriente muitas vezes limita a sobrevivência de algumas espécies, como por exemplo, *Microcystis* sp. (WHITTON & POTTS, 2000). A vesícula gasosa, também chamada de aerótopo, é uma estrutura que permite algumas espécies planctônicas deslocarem-se pela coluna d'água em busca de maiores intensidades luminosa e de nutrientes (MUR et al., 1999; BRIAND et al.,

2003). *Microcystis* sp. e *Anabaena* sp. por serem capazes de regular sua flutuação e suportarem maiores intensidades luminosas, acabam se acumulando na camada de água de superfície formando espumas que além de alterar o valor paisagístico do meio onde se encontram, podem representar riscos para a saúde dos organismos.

Determinadas espécies de cianobactérias possuem valor econômico, participando da dieta de alguns animais e humanos, ou ainda contribuindo para a fertilidade do solo e da água através da fixação do nitrogênio atmosférico (CHORUS & BARTRAM, 1999). O problema reside no fato de que algumas cianobactérias aquáticas, tanto de água doce quanto salgada, apresentam a capacidade de liberarem substâncias tóxicas para meio aquático, também chamadas de cianotoxinas. Mesmo quando essas cianotoxinas não são produzidas, o desenvolvimento rápido e descontrolado das cianobactérias favorecido pelas combinações sinérgicas de variáveis ambientais favoráveis, como a presença de nutrientes, luminosidade e altas temperaturas, favorecem a formação de florações que são bastante prejudiciais ao meio ambiente (HITZFELD et al., 2000).

1.3 CIANOTOXINAS

Um aspecto importante e muito particular das cianobactérias é que certas cepas ou linhagens dos seus vários gêneros e espécies podem produzir cianotoxinas, substâncias tóxicas que podem provocar alterações na saúde dos animais e do homem (SIVONEN & JONES, 1999; COOD, 2000; MORENO et al., 2004; IBELINGS & CHORUS, 2007), promover riscos para sustentabilidade dos ecossistemas aquáticos (HUDNELL et al., 2010) e ainda tem sido associada com a morte de peixes (ZIMBA et al., 2001; MOHAMED & HUSSEIN, 2006).

Diferentes tipos de cianotoxinas podem ser produzidas por uma mesma cianobactéria, porém, ainda não foi esclarecido o porquê desta produção e qual a sua função dentro da célula (HITZFELD et al., 2000). Dentre as diversas hipóteses existentes, a mais aceita é que a cianotoxina tenha a função protetora, como a dos anti-herbívoros de plantas vasculares, que se protegem contra o ataque de seus predadores (CARMICHAEL, 1992). Cianotoxinas são metabólitos secundários naturais que apresentam uma grande variedade e são capazes de induzir patologias graves, mesmo após curtos períodos de exposição e em

baixa concentração, ou mesmo devido aos diferentes tipos e combinação das mesmas (ANTONIOU et al., 2008).

As cianotoxinas são formadas durante todos os estágios de desenvolvimento da cianobactéria, podendo permanecer no interior das células ou serem liberadas por diferentes maneiras como: durante a senescência, morte ou lise celular, decomposição da floração de cianobactérias ou ainda durante a aplicação de algicidas, como o sulfato de cobre (VASCONCELOS et al., 1995; SIVONEN & JONES, 1999; BITTENCOURT-OLIVEIRA & MOLICA, 2003; DAO et al., 2010).

A exposição às cianotoxinas pode ocorrer por diferentes vias: ingestão de água contaminada; contato direto com água contaminada em atividades recreativas; inalação, durante o banho ou em atividades esportivas na água; via intravenosa em clínicas de hemodiálise (caso Caruaru – Pernambuco (BR), 1996); ingestão de alimentos já previamente contaminados, como peixes e moluscos, que podem bioacumular cianotoxinas afetando níveis tróficos superiores; dentre outros (PEREIRA et al., 2004; IBELINGS & CHORUS, 2007; KAGALOU, 2008).

As cianotoxinas são consideradas citotóxicas, imunotóxicas, embriotóxicas e genotóxicas, e de acordo com seu modo de ação e seu efeito tóxico, elas podem ainda ser classificadas em três categorias: dermatoxinas ou toxinas irritantes ao tato, neurotoxinas e hepatotoxinas.

As dermatoxinas são irritantes ao contato devido a presença de lipopolissacarídeos presentes na membrana externa da parede celular das cianobactérias, entretanto, seu grau de toxicidade não é tão elevado como a de outros lipopolissacarídeos presentes, como por exemplo, em bactérias gram-negativas, como a *Salmonella* (SIVONEN & JONES, 1999). Os principais gêneros envolvidos nesta intoxicação são: *Oscillatoria*, *Lyngbia* e *Schizothrix* e de modo geral elas promovem: hipersensibilidade cutânea, dermatite severa, descamação da pele e reação alérgica, desaparecendo os sintomas se o contato for evitado (SIVONEN & JONES, 1999; BRIAND et al., 2003; COOD et al., 2005).

As neurotoxinas apresentam um alto grau de toxicidade. Sucintamente, são agrupadas em três famílias: anatoxina-a, anatoxina-a(s) e saxitoxina. A anatoxina-a imita os efeitos da acetilcolina; a anatoxina-a(s) é um anticolinesterásico, impedindo a degradação da acetilcolina; e a saxitoxina inibe a condução do impulso nervoso bloqueando os canais de sódio dos axônios, afetando a permeabilidade do potássio ou a resistência das membranas, impedindo assim, a comunicação entre o cérebro e as células musculares. Os principais gêneros que já foram observados quanto à produção dessas endotoxinas são: *Lyngbia*,

Oscillatoria, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Cylindrospermum*, *Cylindrospermopsis*, *Planktothrix* e *Anabaena* (SIVONEN & JONES, 1999; CODD, 2000; BRIAND et al., 2003; CODD et al., 2005).

Globalmente, as toxinas de cianobactérias mais encontradas são as hepatotoxinas, incluindo as microcistinas, nodularinas e cilindrospermopsinas. As hepatotoxinas como o próprio nome indica, apresentam como órgão alvo o fígado e são responsáveis pela destruição da sua estrutura interna, resultando em choque hipovolêmico e hepatomegalia. A sua produção já foi encontrada em: *Nodularia*, *Anabaena*, *Microcystis*, *Planktothrix*, *Nostoc* e *Oscillatoria* (SIVONEN & JONES, 1999; CODD, 2000; BRIAND et al., 2003; CHEN et al., 2006). Dentre as hepatotoxinas as que recebem maior destaque são as microcistinas. Apesar de ter o fígado como órgão alvo, a ação das microcistinas também vem sendo encontrada em outros tecidos, como no cérebro (Cazenave et al., 2006), por exemplo, sugerindo assim, um efeito neurotóxico desta toxina, além do hepatotóxico.

Na Tabela 1.1, são mostrados resumidamente os diferentes tipos de cianotoxinas, sua estrutura química, o tipo de efeito que é capaz de promover e por fim, em quais gêneros essas toxinas aparecem.

Tabela 1.1 – Características das cianotoxinas

Cianotoxina	Estrutura química	Efeito	Gêneros
Dermatoxina	Ácidos graxos	Alérgico	<i>Oscillatoria</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Schizothrix</i>
Anatoxina-a	Alcalóides	Neurotóxico	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Cylindrospermum</i>
Anatoxina-a(s)	Alcalóides	Neurotóxico	<i>Anabaena</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Lyngbya</i>
Saxitoxina	Alcalóides	Neurotóxico	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Lyngbya</i>
Microcistina	Peptídeo cíclico	Hepatotóxico Neurotóxico?	<i>Anabaena</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Aphanocapsa</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Synechocystis</i>
Nodularina	Peptídeo cíclico	Hepatotóxico	<i>Nodularia</i>
Cilindrospermopsina	Alcalóides	Citotóxico	<i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Umezakia</i> , <i>Aphanizomenon</i>

1.4 MICROCISTINA

O nome microcistina se deve ao fato desta ter sido primeiramente encontrada em *Microcystis aeruginosa* em 1982, embora posteriormente, outras espécies também tenham se mostrado como produtoras desta cianotoxina (SIVONEN & JONES, 1999; HITZFELD, et al., 2000). Na literatura, a cianobactéria mais reportada em água doce é a do gênero *Microcystis* (incluindo *M. aeruginosa*, *M. flos aquae* e *M. viridis*) e *Planktothrix* (*P. agardhii* and *P. rubescens*) (IBELINGS & CHORUS, 2007). Ainda, das 2000 espécies de cianobactérias conhecidas, 40 delas são ditas como toxigênicas, sendo a *M. aeruginosa* a mais frequentemente encontrada nas florações cianobacterianas.

Quanto as suas características, as microcistinas apresentam um peso molecular variando entre 800-1000 Daltons; são solúveis em água; são incapazes de penetrar diretamente na membrana lipídica de animais, plantas e bactérias, precisando desta forma de um sistema de transporte; são resistentes à temperatura, hidrólise química e oxidação (HITZFELD et al., 2000; AMADO & MONSERRAT, 2010).

As microcistinas são heptapeptídeos cíclicos, e sua estrutura química é constituída por três D-aminoácidos que compõe a porção constante e invariável da molécula, dois aminoácidos raros e dois L-aminoácidos variáveis. Os D-aminoácidos são representados por: alanina, β -eritro- β -metil ácido aspártico e γ -ácido glutâmico (D- β MeAsp, D-Ala e D-Glu). Os dois aminoácidos raros são: N-metildehidroalanina (Mdha) e o 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8,trimetil-deca-4,6-ácido dienóico (Adda), ao qual se atribui a hepatotoxicidade da microcistina. Os dois L-aminoácidos variáveis com combinações conhecidas incluem: leucina e alanina (LA), leucina e arginina (LR), tirosina e arginina (YR), tirosina e alanina (YA), e tirosina e metionina (YM) (FIGUEIREDO et al., 2004; CHEN et al., 2006; ANTONIOU et al., 2008).

A substituição de um aminoácido hidrofóbico, por exemplo, a leucina, por outro também hidrofóbico, como alanina, fenilalanina ou triptofano, mantém a toxicidade da microcistina. Porém, a substituição por um aminoácido hidrofílico, como a arginina, promove a redução da toxicidade. Desta forma podemos observar que se ambos os componentes forem hidrofílicos, como a microcistina-RR, menor será a sua toxicidade (PRIETO et al., 2006).

Através das diferentes combinações dos L-aminoácidos nas posições “2” (ou “X”) e “4” (ou “Z”), pode-se encontrar diversos tipos de microcistinas, sendo que até o momento já foram identificados mais de 80 análogos. Destes, o mais tóxico e o mais

freqüente é a microcistina-LR (MC-LR) (Figura 1.2), seguida pela microcistina-RR (MC-RR) e microcistina-YR (MC-YR). Secundariamente, as diferenças estruturais entre as microcistinas devem-se a presença ou ausência de grupamentos metil no β -MeAsp e/ou Mdha (KAMOGAE & HIROOKA, 2000; ANTONIOU et al., 2008).

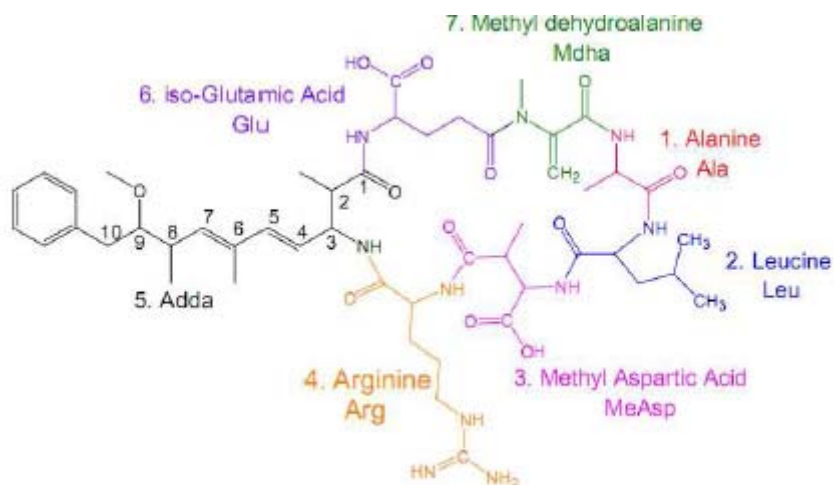


Figura 1.2 – Estrutura da microcistina do tipo LR (MC-LR) (ANTONIOU et al., 2008).

Por serem capazes de promover uma série de efeitos adversos e em alguns casos, ocasionar a morte de diferentes tipos de animais, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu um limite máximo aceitável de MC-LR para a água potável de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ e para os alimentos de $0,04 \mu\text{g.Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ como Tolerância Diária Ingerida (TDI) de microcistina (WHO, 1998).

Um dos casos mais graves envolvendo microcistina no Brasil ocorreu em uma clínica de hemodiálise em Caruaru -Pernambuco (BR), em 1996. Os pacientes foram expostos intravenosamente à água contendo microcistinas e cilindrospermopsinas, tendo como consequência dores de cabeça, náuseas, fraqueza muscular, vômitos e insuficiência renal aguda levando a morte de um grande número de pessoas (AZEVEDO et al., 2002; CHEN et al., 2006).

A microcistina pode entrar nos peixes por diferentes vias, como por exemplo, durante a alimentação ou passivamente pelas brânquias, durante a respiração (KAGALOU et al., 2008), e uma vez dentro do organismo, esta cianotoxina pode se bioacumular. Em caso de ingestão de animais aquáticos contaminados, como os bivalves, as

toxinas bioacumuladas podem afetar o homem, causando principalmente problemas renais, hepáticos, neurológicos e gastrintestinais (SIVONEN & JONES, 1999). Assim sendo, estudos sobre a incorporação das toxinas de cianobactérias em organismos aquáticos, particularmente em peixes, representam importantes questões na economia e na saúde pública.

Em peixes, a toxicidade da microcistina tem sido amplamente estudada em diversos órgãos, como por exemplo, no fígado (GEHRINGER et al., 2004; JOS et al., 2005; LI et al., 2005; MOLINA et al., 2005; CAZENAVE et al., 2006; PRIETO et al., 2006; PRIETO et al., 2007), brânquias (JOS et al., 2005; MOLINA et al., 2005; CAZENAVE et al., 2006; PRIETO et al., 2006; PRIETO et al., 2007), rim (JOS et al., 2005; MOLINA et al., 2005; PRIETO et al., 2006; PRIETO et al., 2007), intestino (CAZENAVE et al., 2006), hepatopâncreas (PINHO et al., 2005; DEWES et al., 2007) e cérebro (CAZENAVE et al., 2006).

Uma vez ingerida, a microcistina rapidamente chega ao fígado, via circulação sanguínea e interage com os hepatócitos por receptores dos ácidos biliares, provocando alteração no citoesqueleto celular, perda de adesão intercelular e a retração dos hepatócitos. A destruição da arquitetura hepática pode provocar hemorragia intra-hepática, devido ao sequestro de sangue pelo fígado ou mesmo insuficiência hepática em algumas horas ou dias (Codd, 2000; CHEN et al., 2006).

Recentes estudos vêm demonstrando que a microcistina pode também entrar nas células por mecanismo ativo utilizando para tanto transportadores (CAMPOS & VASCONCELOS, 2010). Nos organismos há uma diversidade muito grande de transportadores responsáveis pela absorção de substâncias químicas endógenas e exógenas. Os polipeptídeos de transporte de ânions orgânicos (Oatps), por exemplo, é um grupo de carregadores de membrana (AMADO & MONSERRAT, 2010) que medeiam a captação de substratos de diferentes tipos celulares, como dos eritrócitos, hepatócitos, células epiteliais renais e de órgãos, como do coração, pulmão, baço, pâncreas e cérebro (CAMPOS & VASCONCELOS, 2010). Fischer e colaboradores (2005) conseguiram comprovar, por meio de um sistema de expressão de oócitos de *Xenopus laevis*, que a família dos Oatps (roedor: Oatps; humano: OATPs) estão envolvidos com o transporte da microcistina do tipo LR para dentro das células. Assim, a distribuição sistêmica da microcistina nos diferentes órgãos dependerá do grau de perfusão sanguínea e dos tipos e nível de expressão dos Oatps (CAMPOS & VASCONCELOS, 2010).

Embora ainda não tenha sido investigado com detalhes todos os transportadores, acredita-se que o tripeptídeo glutathiona (GSH) (HAGENBUCH & MEIER,

2003) esteja relacionado com os transportadores Oatps 1 e Oatps 2 (FISCHER et al., 2005) na captação da microcistina. Assim, a simples entrada da microcistina para dentro das células promove um efluxo de GSH, ficando desta forma o processo de detoxificação, por meio da glutathione S-transferase (GST) comprometido (Figura 1.3) (AMADO & MONSERRAT, 2010).

A principal via de metabolização e detoxificação da microcistina dentro das células ocorrem por meio da conjugação com a GSH via GST, sendo suas características relatadas posteriormente (Figura 1.3). A microcistina se conjuga com a GSH através do terminal metileno do aminoácido Mdha. Assim, com esta conjugação, o composto pode ser mais facilmente eliminado e ainda a porção Mdha fica impossibilitada de se ligar aos resíduos de cisteína 273 das proteínas fosfatases (PP), evitando assim que efeitos deletérios nos tecidos ocorram. O problema ainda reside no fato de que a porção Adda da microcistina ainda permanece livre, podendo esta se ligar aos sítios ativos das PP, inibindo-as (WIEGAND & PFLUGMACHER, 2005; SOARES, 2009). Ainda assim, o conjugado MC-GSH é mais efetivo, diminuindo a toxicidade da toxina (Codd, 2000).

Ao nível molecular, os principais alvos das microcistinas são as PP da família serina/treonina, dentre as quais se destacam as PP1 e PP2A (Figura 1.3). A microcistina se liga as PP da seguinte maneira: no primeiro momento, o aminoácido Adda da microcistina, por meio de ligação não-covalente, se liga aos sítios ativos da PP, promovendo a inibição da proteína. Na etapa seguinte, o aminoácido Mdha da microcistina se liga covalentemente ao resíduo de cisteína 273 das PP, sendo esta ligação irreversível, capaz de prolongar o efeito deletério no tecido (WIEGAND & PFLUGMACHER, 2005). A inibição das PPs promove o aumento da fosforilação das proteínas, tendo como consequência a ruptura dos microfilamentos do citoesqueleto e a perda da forma celular ocasionando a destruição das células do fígado, podendo levar a hemorragia intra-hepática ou insuficiência hepática, desencadeando em alguns casos, a morte do indivíduo (CAMPOS & VASCONCELOS, 2010) e ainda pode promover um descontrole da divisão celular levando a uma promoção tumoral (PRIETO et al., 2006).

Mikhailov e colaboradores (2003) identificaram mais um alvo da microcistina, além das PP1 e PP2A. O terceiro alvo corresponde à subunidade β da ATP-sintase, e a ligação da microcistina a este novo alvo é capaz de promover uma alteração no potencial de membrana mitocondrial, com subsequente liberação do citocromo c e indução das caspases, levando a apoptose celular (Figura 1.3). Estudos recentes vêm atribuindo ainda a microcistina o aumento do estresse oxidativo, a geração de espécies reativas de oxigênio

(ERO) (Figura 1.3) e variação na resposta antioxidante dos organismos (JOS et al., 2005; PINHO et al. 2005; PRIETO et al., 2006).

A microcistina também está relacionada com a capacidade de induzir danos na molécula de DNA (Figura 1.3). Em 1998, Lakshmana Rao e colaboradores verificaram que a microcistina foi capaz de promover danos no DNA de hepatócitos de ratos *in vivo* e eles ainda sugeriram que tais danos podem ser uma consequência de degradação endonucleótica do DNA (fragmentação do DNA) associada com a citotoxicidade. Zegura e colaboradores (2003) ainda sugerem que os danos na molécula de DNA são promovidos pelas ERO ou seus metabólitos após a exposição à microcistina e não por interação direta da microcistina com a molécula de DNA.

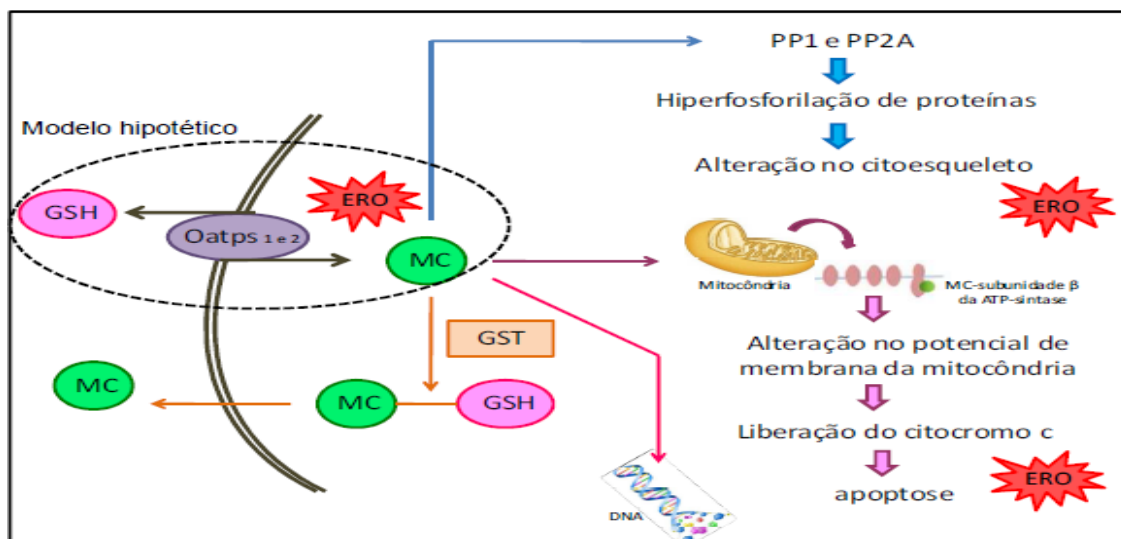


Figura 1.3 – Possíveis vias de entrada da microcistina nas células. GSH: dissulfeto de glutathione; Oatps: polipeptídeos de transporte de ânions orgânicos; MC: microcistina; GST: glutathione S-transferase; ERO: espécie reativa de oxigênio; PP1 e PP2A: proteína fosfatase 1 e 2A. Adaptado de Amado & Monserrat, 2010 e Campos & Vasconcelos 2010.

1.5 O USO DE PEIXES COMO BIOINDICADORES

De forma bastante acentuada e contínua, os ambientes aquáticos recebem uma carga muito grande de compostos exógenos, também chamados de xenobióticos, liberados pelas atividades industriais, urbanas, antropogênicas e pela degradação ambiental. A fim de avaliar as condições ecológicas desses ambientes, desde a década de 1970, muitos

pesquisadores têm utilizado técnicas tradicionais para a classificação das águas, sendo estas baseadas em características físicas, químicas e bacteriológicas. Porém, estas técnicas apresentam algumas desvantagens, tais como: perturbações sutis do ambiente poluído não eram detectadas por análises químicas feitas a longas distâncias e essas avaliações não eram consideradas suficientes para atender os usos múltiplos da água (BUSS et al., 2003; ARIAS et al., 2007).

Assim, com a finalidade de indicar as condições ambientais em que o meio se encontra frente à presença de xenobióticos, muitas espécies tem sido utilizadas no monitoramento ambiental. Embora a utilização de invertebrados seja muito comum, é crescente o número de trabalhos que vêm utilizando peixes como bioindicadores da qualidade dos ecossistemas aquáticos (NIMMO 1985; SILVA & MARTINEZ, 2007), sendo bioindicador definido como um organismo que fornece informações sobre as condições ambientais de seu hábitat por sua presença ou ausência ou pelo seu comportamento (VAN GESTEL & VAN BRUMMELEN, 1996).

De modo geral, o bioindicador, também chamado de indicador biológico, deve apresentar as seguintes características: ser facilmente identificado por leigos; ter a taxonomia bem definida; ter uma ampla distribuição geográfica; ser facilmente coletado; apresentar-se em grande quantidade no ambiente; ter baixa mobilidade, baixa variabilidade genética; possuir um ciclo de vida longo; ser ecologicamente conhecido e ter a possibilidade de se trabalhar em laboratório (BUSS et al., 2003).

Várias literaturas fazem o uso de peixes como bioindicadores pelo fato desses animais ocuparem uma posição chave na cadeia trófica e por estar presente na alimentação de muitos países (VIARENGO et al., 2007). Entretanto, poucas espécies nativas têm sido utilizadas em testes de toxicidade no Brasil e assim, pouco se sabe sobre a sensibilidade das espécies de peixes neotropicais a diversas classes de poluentes em ecossistemas tropicais de água doce (MARTINEZ et al., 2004).

1.6 PROCHILODUS LINEATUS

O peixe neotropical de água doce *Prochilodus lineatus* (Figura 1.4), (Valenciennes, 1847) (= *P. scrofa* Steindachner, 1881), vulgarmente conhecido como curimba ou curimbatá, recentemente está sendo empregado como um organismo sentinela em

programas de biomonitoramento de ambientes que sofreram ou sofrem algum tipo de estresse, como por exemplo, a presença de cianobactérias potencialmente tóxicas. Além disso, esta espécie é considerada como um bioindicador em potencial, pois sua distribuição está restrita a locais poucos impactados, conforme foi demonstrado por Bennemann e colaboradores (1995) em um estudo feito na bacia do rio Tibagi – Paraná (BR).



Figura 1.4 – Modelo experimental: *Prochilodus lineatus*.

O *P. lineatus* pertencente à ordem Characiformes, família Prochilodontidae e superordem Ostariophysi tendo como características: porte grande, podendo pesar 6 kg e alcançar de 30 a 80 cm de comprimento total; possui o corpo de coloração clara a prateada com dorso levemente escurecido; boca protátil em forma de ventosa; lábios carnosos e bastante flexíveis; dentes pequenos implantados nos lábio e não nos ossos; escamas grandes e ásperas com coloração prateada; quanto às nadadeiras, a dorsal possui um espinho procumbente, a adiposa está presente, a caudal é bifurcada e a anal é curta.

Na região Sul e Sudeste do Brasil, o curimba é considerado como uma das espécies mais abundantes e importantes, sendo muito utilizado na dieta alimentar (MARTINEZ, 2006). Por ter um hábito detritívoro, este animal acaba ficando exposto a substâncias tóxicas presentes tanto na água como no sedimento do meio aquático (MARTINEZ & CÓLUS, 2002). De modo geral, esta espécie é bastante sensível a diversos tipos de poluentes (ALMEIDA et al., 2005), sendo assim, ele acaba sendo muito utilizado em testes de toxicidade realizados tanto “in situ” (CAMARGO & MARTINEZ, 2006, 2007) como em laboratórios (VANZELLA et al., 2007; WINKALER et al., 2007; CAVALCANTI et al., 2008; LANGIANO & MARTINEZ, 2008; PEREIRA-MADUENHO & MARTINEZ, 2008; SIMONATO et al., 2008).

1.7 BIOMARCADOR

Atualmente é crescente o nível de compostos xenobióticos nos ambientes aquáticos oriundo de diversas atividades antropogênicas acopladas com o grande aumento populacional, avanço tecnológico e a geração de produtos industriais. Tal fato é considerado extremamente danoso para os diversos compartimentos ambientais (água, solo, ar e sedimento) sendo que muitos desses poluentes são considerados muito tóxicos para os seres vivos que habitam esses ecossistemas, além de promover uma séria ameaça à biodiversidade ambiental (CAJARAVILLE et al., 2000; FREIRE et al., 2008).

Nos organismos vivos, esses xenobióticos podem promover diversas alterações que, por conseguinte, podem gerar graves consequências para a população, comunidade ou ecossistema, sendo que o grau de alteração pode variar em função do tempo de exposição e da concentração dos poluentes (JESUS & CARVALHO, 2008). Porém, antes mesmo de atingir os níveis mais altos de organização (ecossistema), essas substâncias tóxicas são capazes de rapidamente promover efeitos nos níveis mais baixo de organização (molecular, celular, tecido...) (Figura 1.5) (ARIAS et al., 2007). Assim, ao analisar primeiramente os níveis inferiores da organização biológica, faz com que muitas vezes um problema possa ser percebido antes mesmo que todo o ambiente possa ser alterado.

Para que a tomada de ações corretivas possa ser adotada de forma adequada a fim de garantir uma melhor conservação do ambiente, o monitoramento das áreas deve ser realizado (MONSERRAT et al., 2007), entretanto, a avaliação dos ambientes impactados não pode ser feita apenas por análises químicas (BARSIENTE et al., 2006). Assim sendo, para se avaliar a capacidade estressora que um poluente é capaz de promover no ambiente é pertinente que seja mensurado os efeitos que estes xenobióticos são capazes de desencadear nos organismos vivos, podendo desta forma fazer uso de biomarcadores.

Recentemente, o uso de biomarcadores ou marcadores biológicos a nível molecular ou celular tem sido utilizado como uma ferramenta sensível a fim de determinar o grau de impacto que um agente estressor é capaz de promover na saúde da biota (CAJARAVILLE et al. 2000). Segundo Lam (2009), o termo biomarcador tem sido definido como uma variação nos componentes, processos, estruturas ou funcionamento celular e bioquímico induzido por um xenobiótico, sendo estas variações medidas em sistemas biológicos. Em termos práticos, biomarcador corresponde a uma alteração biológica causada pela presença de uma substância estranha no corpo do indivíduo ou pelo efeito que esta

substância é capaz de promover, sendo este parâmetro analisado e/ou quantificado por testes toxicológicos.

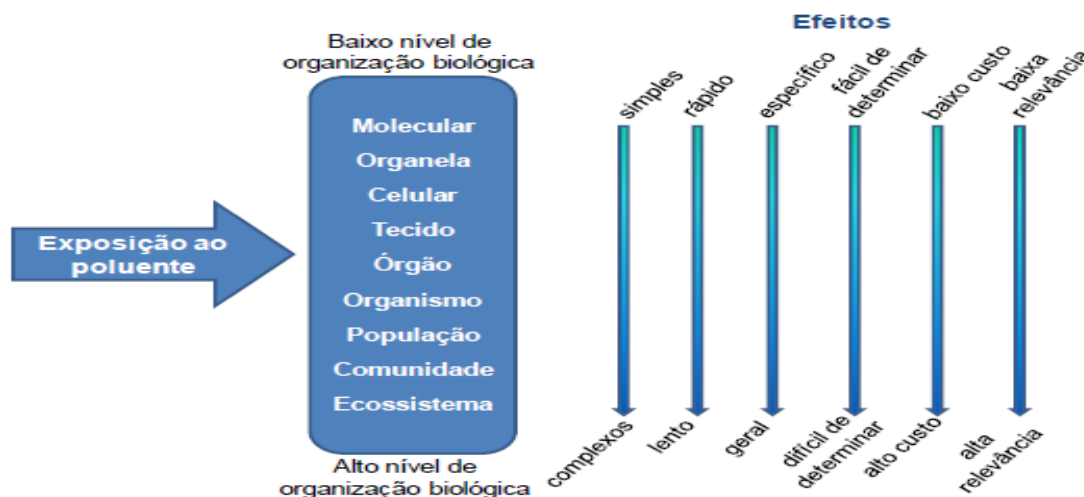


Figura 1.5 – Comparação dos efeitos provocados por agentes estressores em um sistema biológico de baixo e alto nível de organização biológica (Adaptado de LAM, 2009, baseado em CONNELL, 1999).

Alteração nos parâmetros comportamentais está sendo recentemente reconhecido como uma fonte extremamente importante no estabelecimento de inferências ecológicas, podendo esta também servir como um biomarcador (MONSERRAT et al., 2007). Scoot e Sloman (2004) demonstraram que substâncias tóxicas são capazes de desenvolver alterações neurológicas o que acaba por promover algumas modificações comportamentais, como nos órgãos reprodutores, alimentação e comportamento.

De forma geral então, nós podemos observar que o biomarcador é capaz de antecipar possíveis modificações nos níveis mais elevados de organização biológica, sendo que esta característica é conferida a ele devido a capacidade que este tem de detectar possíveis ações do agente estressor em níveis menores de organização, através, por exemplo, de alterações moleculares, celulares, etc. Isso faz do biomarcador um ótimo parâmetro preditivo, evitando desta forma danos ambientais irreversíveis.

Além disso, o uso dos biomarcadores bioquímicos no monitoramento ambiental oferece mais algumas vantagens, como: são capazes de medir os efeitos sub-letais promovidos pela interação do contaminante com o organismo; podem ser detectadas ações de contaminantes conhecidos ou não; ajudam a estabelecer as rotas de exposição através do uso

de diferentes níveis tróficos, auxiliando desta forma na priorização de sistemas de controle e estratégias de intervenção ou de remediação; são aplicáveis para estudos laboratoriais e em campo; são sensíveis; são facilmente detectados e apresentam alta especificidade (MARTINEZ, 2006; SARKAR et al., 2006).

Dentre os diversos tipos de biomarcadores, os que vêm recebendo maiores destaques atualmente são: indução do citocromo P4501A, peroxidação lipídica (LPO), danos no DNA, oxidação de proteínas e atividade da acetilcolinesterase (AChE). Estes biomarcadores tem sido extensivamente utilizados para avaliar os efeitos de vários contaminantes (xenobióticos orgânicos e metais) em diversas espécies sentinelas, dentre os quais se destaca os peixes (SARKAR et al., 2006; MONSERRAT et al., 2007).

1.7.1 Enzimas de Biotransformação

O uso de biomarcadores com o propósito de indicar se a ação de um xenobiótico está sendo significativa no ambiente vem sendo amplamente empregado. No meio aquático, muitos biomarcadores de peixes vem sendo utilizados a fim de avaliar os possíveis efeitos dos contaminantes. Um dos mais sensíveis biomarcadores é representado pelas enzimas de biotransformação, sendo que em peixes, as atividades destas enzimas podem ser tanto inibidas quanto induzidas frente à exposição aos xenobióticos (BUCHELI & FENT, 1995). Ainda, neste mesmo animal, a atividade destas enzimas parece ocorrer em níveis mais elevados no fígado, porém muitos estudos já comprovaram a existências destas em órgãos extra-hepáticos, como em brânquias e rins (MARTINEZ, 2006).

A biotransformação de xenobióticos envolve sistemas enzimáticos diferentes, que vão atuar em diferentes substratos. De modo geral, essas enzimas apresentam como principal função a conversão de estruturas lipofílicas em estruturas hidrofílicas e a conversão de um composto tóxico em uma forma menos tóxica para que assim essas substâncias possam ser mais facilmente excretadas (VAN DER OOST et al., 2003), sendo este processo também conhecido como detoxificação. Há dois tipos de enzimas envolvidas no processo de biotransformação dos xenobióticos: as enzimas de fase I e as enzimas de fase II e cofatores (Figura 1.6).

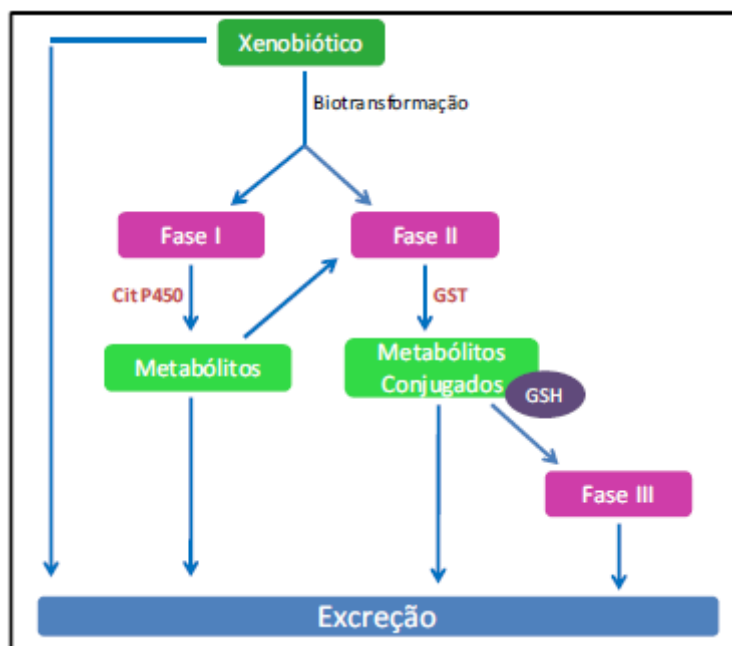


Figura 1.6 – Mecanismo de biotransformação, envolvendo a fase I e II. Legenda: Cit P450- citocromo P450; GST- glutatona S-transferase; GSH- dissulfeto de glutatona. Baseado em Van der Oost et al., 2003.

As reações de fase I são mediadas pelas enzimas da família do citocromo P450 (CYP 450), sendo que em peixes, a principal enzima envolvida neste processo é a subfamília CYP1A (VAN DER OOST et al., 2003). Nesta fase ocorrem reações de redução, oxidação e hidrólise formando um composto hidrossolúvel que poderá ser mais facilmente eliminado ou se tornará um novo substrato, participando então das reações da fase II (MARTINEZ, 2006). Em alguns casos, alguns produtos deste metabolismo podem se tornar ainda mais reativos, ocasionando danos celulares e em certos casos iniciando um processo carcinogênico (WINZER et al., 2002; SILVA et al., 2004).

Em peixes há a presença de alguns receptores intracelulares, dentre os quais se destaca o aril hidrocarboneto (AhR). Este receptor corresponde a uma proteína tetramérica de 300 KDa que está localizada no citosol das células (GOKSØYR & FÖRLIN, 1992). Na presença do xenobiótico, o receptor AhR se liga a ele promovendo uma indução da CYP1A. Tal indução pode ser detectada através da atividade da enzima etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) que é catalisada pela CYP1A (ABRAHAMSON et al., 2007). A EROD catalisa uma reação (Figura 1.7) de O-desalquilação, dependente de NADPH, na qual o substrato 7-etoxiresorufina é convertido em resorufina, podendo esta ser quantificada em fluorímetro de placa. Assim sendo, a atividade da EROD se tornou um ótimo biomarcador de exposição à agonista de AhR para peixes (ABRAHAMSON et al., 2007; JÖNSSON et al., 2009).

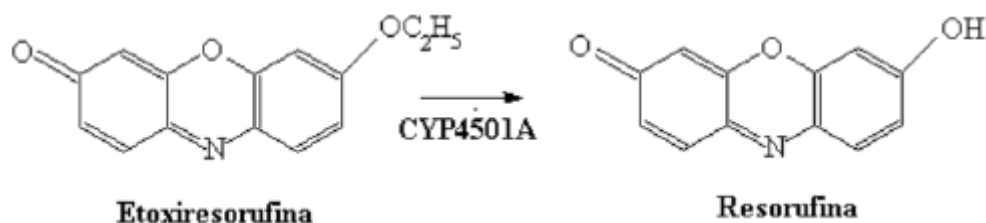


Figura 1.7 – Reação química catalisada pelo CYP451A, expressada pela EROD (BURKE & MAYER, 1983).

Como já foi explicado anteriormente, durante a biotransformação de fase I pode ocorrer a produção de certos compostos capazes de promover danos nas moléculas e nas células. A fim de que tal fenômeno possa ser evitado, os produtos gerados pela fase I, assim como também o xenobiótico na sua forma original, podem passar pela fase II da biotransformação. Nas reações de fase II ocorre então a conjugação desses compostos (metabolizados e/ou na sua forma original) com moléculas endógenas, como acetato, sulfato, ácido glucurônico, glutathione, entre outros, resultando desta forma em produtos mais solúveis em água, menos tóxicos e ionizáveis, facilitando assim a sua excreção (VAN DER OOST et al., 2003; BILBAO et al., 2010).

Considerada como um biomarcador e uma das enzimas mais importantes de fase II, a GST é responsável pela reação de conjugação do xenobiótico e/ou com uma variedade de compostos eletrofílicos, com a GSH, que corresponde a um composto endógeno (HERMES-LIMA, 2004; ALMEIDA et al., 2005). As GSTs também servem como proteínas carreadoras, disponibilizando para as enzimas da fase I os compostos tóxicos que estão presentes no organismo do indivíduo e ainda, por meio de ligações covalentes com agentes tóxicos, reduzem a probabilidade desses agentes se ligarem a outras macromoléculas celulares, como o DNA, evitando assim a ocorrência de maiores danos (MARTINEZ, 2006; AMADO & MONSERRAT, 2010).

A GST é uma família de enzimas multifuncionais, primariamente citosólica, mas também presente no núcleo. São bem distribuídas na natureza, sendo encontradas em bactérias, fungos, plantas e animais. Elas podem ser agrupadas em diferentes classes: alfa, mi, pi, teta e omega, com duas classes menores, sigma e kapa, sendo que em laboratório é geralmente medido a atividade total da GST (HERMES-LIMA, 2004).

1.7.2 Defesas Antioxidantes

Para os organismos aeróbicos o oxigênio é ao mesmo tempo considerado vital como também perigoso. Vital porque é através dele que toda a fonte de energia é proveniente, e perigoso porque durante o seu metabolismo celular é constantemente gerado espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como: ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$), o radical hidroxil ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que em altas concentrações são extremamente perigosos (AMADO et al., 2009; FERRANTE et al., 2008). Dentre essas ERO, o $\cdot OH$ é considerado o de maior toxicidade trazendo extensivos danos às membranas, proteínas e ao DNA. A interação do $O_2^{\cdot -}$ com o ácido nítrico ($NO^{\cdot}$) forma peróxido nitrito ($ONOO^-$). Este, apesar de não ser considerado como uma ERO é uma espécie muito reativa que pode induzir a peroxidação lipídica e danos nas proteínas (HERMES-LIMA et al., 1998).

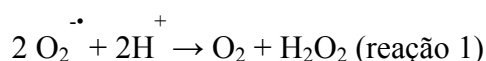
Durante o processo de biotransformação as ERO também podem ser formadas e se estas não forem adequadamente combatidas pode-se dar início ao processo de estresse oxidativo, resultando em danos oxidativos nos componentes celulares, tais como: oxidação de proteínas, quebras nas moléculas de DNA, LPO e até a mesmo a morte celular. Entretanto, os organismos aeróbicos desenvolveram durante sua evolução diferentes mecanismos de defesa antioxidante que são capazes de prevenir a formação das ERO, reagir com esses intermediários reativos, bem como reparar os danos causados pelas mesmas (MARTINEZ, 2006; VALAVANIDIS et al., 2006).

A defesa antioxidante pode ser do tipo enzimática ou não enzimática. Os antioxidantes enzimáticos são principalmente representados pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR). Os antioxidantes não-enzimáticos possuem baixo peso molecular e são representados pela GSH, ácido ascórbico (vitamina C) e antioxidantes lipossolúveis como o β -caroteno (vitamina B) e o α -tocoferol (vitamina E). Alguns autores vêm sugerindo também, o papel das metalotioneínas como antioxidante não-enzimático (LIVINGSTONE, 2001; VAN DER OOST et al., 2003).

É importante ressaltar que a capacidade antioxidante, assim como, o nível de radicais livres presentes no interior dos organismos podem variar de acordo com a espécie do indivíduo e ainda por diversos fatores endógenos, como o tipo de tecido, idade e o ciclo

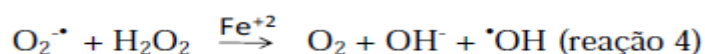
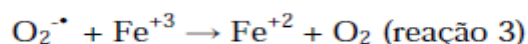
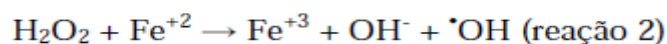
reprodutivo, e por fatores exógenos, como sazonalidade, altas temperaturas e o tipo de contaminante (LIVINGSTONE, 2001).

A primeira enzima da via antioxidante é a SOD. Presentes em todos os organismos aeróbicos, esta metaloenzima apresenta como função a catálise do $O_2^{\cdot -}$ em O_2 e H_2O_2 (reação 1) (Figura 1.8), sendo este último detoxificado por outras duas enzimas, a CAT e a GPx (VAN DER OOST et al., 2003). Existem 3 tipos de SOD, a cobre-zinco SOD (CuZn-SOD), o manganês SOD (Mn-SOD) e o ferro SOD (Fe-SOD). Esta última é encontrada apenas em bactérias e algumas plantas. A Mn-SOD é encontrada em bactérias e mitocôndria, sendo ela responsável por 10% da atividade total da SOD. A CuZn-SOD é a mais abundante, está distribuída em todos os tecidos e é encontrada no citoplasma das células, lisossomos, peroxissomos, núcleo e espaço inter-membranoso das mitocôndrias ou na matriz extracelular (HERMES-LIMA, 2004).

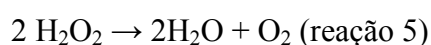


A atividade da SOD como biomarcador vem sendo muito utilizada, isso porque em locais poluídos ela é induzida de forma bastante rápida, dentro de poucas horas, principalmente quando a produção de ERO não está tão elevada (MARTINEZ, 2006). Diversos são os trabalhos que mostram a atividade desta enzima aumentada, como o de Li e colaboradores (2005), após a exposição oral de *Misgurnus mizoleps* a MC-RR e Prieto e colaboradores (2006) após a injeção intraperitoneal (i.p.) de MC-LR em *Oreochromis* sp. Porém, alguns trabalhos mostram a atividade diminuída desta enzima, como o de Atencio e colaboradores (2008) após a exposição oral de *Tinca tinca* a MC-LR.

Muitos estudos descrevem a SOD como produtor de H_2O_2 para a reação de Fenton (reação 2). Outros reconhecem que a SOD é biologicamente importante porque ela mantém o ferro no estado Fe^{+3} (pela remoção de $O_2^{\cdot -}$ da solução -reação 3), assim ela indiretamente inibe a formação do $\cdot OH$ pela reação de Fenton induzida (HERMES-LIMA, 2004). Entretanto, o $\cdot OH$ também pode ser formado durante a reação de Haber Weiss, onde o $O_2^{\cdot -}$ reage com o H_2O_2 na presença de Fe^{+2} (reação 4) (HERMES-LIMA et al., 1998).



Assim como a SOD, a CAT também faz parte das enzimas primárias da via antioxidante. Presente em todos os tecidos de vertebrados, com atividade particularmente alta nos eritrócitos e no fígado, a CAT apresenta como função a catálise do H_2O_2 , transformando-o em O_2 e H_2O nos peroxissomos (reação 5) (Figura 1.8) (ATLI et al., 2006). Ao contrário de outras peroxidases, que reduzem vários peróxidos lipídicos, a CAT é específica em reduzir o H_2O_2 sendo sua atividade aumentada quanto maior for a concentração dessa espécie reativa intracelularmente, enquanto que baixas concentrações de H_2O_2 são geralmente controladas pela GPx (HERMES-LIMA, 2004).



Diversos trabalhos mostram a atividade da CAT aumentada e diminuída, ou mesmo, ambas as situações nos animais expostos a diferentes tipos de xenobióticos (VAN DER OOST et al., 2003). Pinho e colaboradores (2003) encontraram atividade aumentada da CAT em *Chasmagnathus granulatus* após a injeção intraperitoneal (i.p.) de *Microcystis aeruginosa*. Já Leão e colaboradores (2008) encontraram a atividade da CAT diminuída em *Laeonereis acuta* após a exposição à *Microcystis aeruginosa* e Pinho e colaboradores (2005) encontraram ambas as atividades, aumentada e diminuída, em *Chasmagnathus granulatus* após ingestão forçada de *M. aeruginosa*.

Estas discrepâncias podem estar relacionadas a diversos fatores bióticos e abióticos, tais como idade, posição filogenética, comportamento alimentar, taxa metabólica, consumo de oxigênio, fatores ambientais, dentre outros (FERRANTE et al., 2008). Desta forma, apenas a utilização da CAT como bioindicador da condição de um ambiente frente à ação de um agente estressor não é vantajosa, uma vez que sua atividade pode apresentar-se alterada frente a diversas situações. Assim sendo, outro parâmetro bioquímico também deve

ser utilizado quando se almeja determinar qual a condição em que o organismo se encontra na presença de xenobióticos.

As peroxidases são enzimas que utilizam doadores de elétrons para reduzir uma variedade de peróxidos para seus alcoóis correspondentes. Em peixes, a peroxidase de maior importância é a GPx. Esta enzima é encontrada no citosol e na mitocôndria, possui selênio no seu sítio catalítico e utiliza o GSH como co-fator para fazer a redução do H_2O_2 a água (reação 6) (Figura 1.8) e também outros peróxidos naturais e sintéticos, como hidroperóxidos (LOOH), gorduras, hidroperóxidos t-butil e hidroperóxidos cumenos, reduzindo-os a alcoóis e água (reação 7) (FERRANTE et al., 2008). Atualmente algumas evidências indicam a GPx como sendo capaz de decompor o ONOO^- (HERMES-LIMA, 2004).



A GPx apresenta-se dividida em 4 grupos. O primeiro grupo é representado pela GPx clássica, o qual está presente em todos os órgãos tendo maior atividade no fígado, brânquias e rim. Este tipo de peroxidase apresenta como função a decomposição de hidroperóxidos orgânicos, utilizando como co-fator a GSH. De modo geral, os ensaios laboratoriais fazem a quantificação deste grupo de GPx. O segundo grupo da GPx apresenta uma atividade bem menor que a GPx anterior, está presente na maioria dos tecidos e tem ação nos peróxidos fosfolipídicos. O terceiro grupo da GPx é a plasmática e esta é sintetizada pelo rim; e por fim, o último grupo é a GPx gastrointestinal, presente no epitélio do trato gastrointestinal, sendo responsável pela defesa contra ingestão de hidroperóxidos (HERMES-LIMA, 2004).

Durante o processo catalítico realizado pela GPx a forma reduzida do tripeptídeo (GSH) passa para a forma oxidada (GSSG), na qual dois tripeptídeos são ligados por uma ponte dissulfeto. A enzima responsável pela redução de GSSG a GSH é a GR, uma flavoproteína que utiliza NADPH como fonte de elétrons e prótons para a reação, formando o NADP^+ que é reduzido a NADPH pela glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PDH) (Figura 1.8) (GIULIO & MEYER, 2008).

A GR é uma enzima chave no metabolismo da glutatona, pois como já foi dito, é ela a responsável pela redução da GSSG a forma reduzida GSH (Figura 1.8), necessária para a proteção da célula contra a promoção de um estresse oxidativo (TEKMAN et al., 2008). Desta forma podemos dizer então que a GR é uma enzima auxiliar no processo de detoxificação do xenobiótico, porém a sua presença é imprescindível, uma vez que ela mantém a concentração de GSH na célula, podendo-se assim evitar maiores danos ao organismo.

Quanto aos antioxidantes não enzimáticos, a GSH é a que mais se destaca (Figura 1.8). Este tripeptídeo desempenha um papel muito importante uma vez que apresenta nas células diversas funções, tais como: participa no processo de biotransformação de fase II como co-fator para que a GST possa realizar sua atividade catalítica; participa do processo de detoxificação sendo oxidada pela GPx e reduzida pela GR; corresponde a primeira linha de defesa não enzimática contra as ERO; pode servir com trocador para a entrada da microcistina para dentro das células; dentre outros (TEKMAN et al., 2008; AMADO & MONSERRAT, 2010).

A GSH também é muito utilizada como biomarcador, porém em peixes a sua concentração pode variar bastante após a exposição a componentes químicos, por isso é preciso ter cuidado ao se utilizar apenas este biomarcador em ambientes supostamente impactados. Outra característica bastante relevante da GSH é que, uma vez a sua disponibilidade alterada, a atividade de algumas enzimas também podem ser modificadas, como a da GST, GPx e GR (HERMES-LIMA, 2004; MARTINEZ, 2006).

Na Figura 1.8 podemos encontrar de forma resumida todos os mecanismos que estão envolvidos após a entrada do xenobiótico no corpo de um indivíduo. Após a geração das ERO a SOD catalisa o $O_2^{\cdot\cdot}$, sendo o produto desta reação catalisado pela CAT e/ou pela GPx. A GSH atua como um substrato para as reações da GPx e GST e a GR recicla a GSH as custas de energia. As ERO também podem participar de outras reações, como a de Fenton e Haber-Weiss gerando $^{\cdot}OH$, sendo este considerado como a ERO de maior toxicidade.

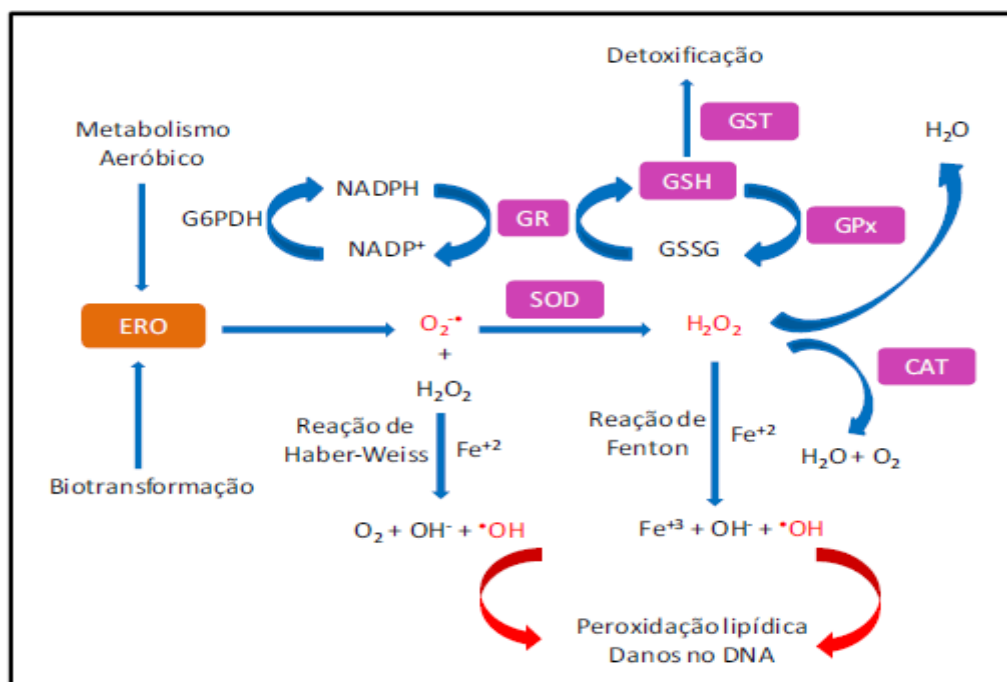


Figura 1.8 – Defesa antioxidante após a entrada do xenobiótico no organismo. ERO - espécie reativa de oxigênio; SOD - superóxido dismutase; CAT- catalase; GPx - glutathiona peroxidase; GSH – dissulfeto de glutathiona; GSSG - glutathiona oxidada; GR - glutathiona redutase; GST – glutathiona S-transferase; $O_2^{\bullet-}$ - ânion radical superóxido; H_2O_2 - peróxido de hidrogênio; $\bullet OH$ – radical hidroxil; G6PDH - glicose 6 fosfato desidrogenase. Adaptado de Hermes-Lima, 2004.

Assim sendo, podemos observar que em uma situação normal as ERO são devidamente combatidas pelo sistema de defesa antioxidante, existindo desta forma um balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes. Entretanto, caso a atividade da via antioxidante esteja baixa ou mesmo alterada, pode ser estabelecido um desequilíbrio pró-oxidativo, gerando um desequilíbrio denominado como estresse oxidativo (LIVINGSTONE, 2001; LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009).

1.7.3 Peroxidação Lipídica

Os lipídeos compõem um grupo bastante heterogêneo sendo muito importante para o organismo, uma vez que serve como fonte de energia; faz parte da constituição das membranas celulares e tecidos nervosos; oferecem isolamento térmico, elétrico e mecânico para proteção de células e órgãos e dão origem a moléculas mensageiras,

como os hormônios. Quando as ERO agem sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares ocorre um fenômeno chamado de peroxidação lipídica (LPO) ou lipoperoxidação (LIMA & ABDALLA, 2001).

A LPO é iniciada quando uma ERO é capaz de retirar um átomo de hidrogênio do grupo metileno dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs). O radical formado pode reagir com um átomo de oxigênio formando o radical lipoperoxil que pode continuar a cadeia ou interagir com outros PUFAs, recomeçando a reação (GIULIO & MEYER, 2008). A LPO é capaz então de desencadear uma sequência de lesões nas células. As membranas celulares podem ser alteradas provendo assim uma alteração na sua permeabilidade, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas, alterações no DNA e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina) (LIMA & ABDALLA, 2001).

Há uma gama muito grande de ensaios que medem a formação de produtos gerados nas diversas etapas da LPO. Em tecidos de peixe, o ensaio mais comumente usado é o ensaio TBARS e este tem por finalidade quantificar um dos produtos finais da LPO, o malondialdeído (MDA). Este ensaio é bastante utilizado pelo fato de ser bastante simples e rápido, porém ele apresenta algumas desvantagens pelo fato de ser inespecífico, uma vez que outros produtos formados durante a LPO também são quantificados. Neste ensaio é medido um composto fluorescente de cor rosa formado pela reação do MDA com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico, em meio ácido e alta temperatura (HERMES-LIMA, 2004). Sendo assim, os resultados da LPO estimados pelo ensaio TBARS devem ser analisados com prudência (MARTINEZ, 2006).

Diversos trabalhos vêm fazendo o uso da LPO como biomarcador, e em muitos tecidos de peixe a LPO apresenta-se aumentada após a exposição às microcistinas (Jos et al., 2005; Dewes et al., 2006; Prieto et al., 2006; Prieto et al., 2007; Atencio et al., 2008; Leão et al., 2008).

1.7.4 Danos no DNA

Como já foi dito anteriormente, se as ERO não forem adequadamente combatidas dentro do corpo do animal, elas poderão desencadear o estresse oxidativo, promovendo diversas consequências, dentre elas, danos na molécula de DNA. Avaliação dos

danos no DNA também é uma ferramenta muito utilizada como biomarcador dentro da ecotoxicologia, sendo encontrada na literatura uma grande variedade de teste que avaliam esses danos, dentre os quais se destaca o ensaio do cometa.

O ensaio do cometa é um teste de genotoxicidade com a capacidade de detectar danos na molécula de DNA causado por agentes químicos, porém esses danos são passíveis de reparo. Em 1984, Ostling e Johanson desenvolveram a técnica do cometa a fim de avaliar quebras na fita dupla da molécula do DNA, sob condição de pH neutro. Mais tarde, Singh e colaboradores (1988) adaptaram o ensaio para a condição de pH alcalino (pH 13), podendo assim, além de determinar as quebras na fita dupla, agora também pode-se avaliar as quebras nas fitas simples e ainda os sítios álcali-lábeis (DHAWAN et al., 2009).

Desde então, o ensaio tem sofrido ao longo dos anos pequenas modificações a fim de se avaliar os danos no DNA de diversos tipos celulares. Hoje o ensaio é bem estabelecido e apresenta uma série de vantagens por ser um teste simples; versátil; rápido; por requer um pequeno número de células por amostra; ter um custo relativamente baixo; apresentar a capacidade de avaliar quantitativamente e qualitativamente os danos no DNA nas células individuais da população; ser aplicado tanto *in vivo* quanto em *in vitro*; e ainda por ser feito com tecidos de diversos organismos, como plantas, invertebrados e vertebrados, incluindo os humanos (OLIVE & BANATH, 2006).

O ensaio do cometa recebe esse nome porque durante a corrida de eletroforese, fragmentos de DNA migram do centro nuclear mais rápido do que o DNA intacto, dando origem assim a um cometa com cauda (TICE et al., 1990). É importante lembrar que quanto menor o fragmento, mais ele vai se deslocar e assim maior será a cauda desse cometa, classificando o tipo de dano em 0 (sem dano aparente), 1 (pouco dano), 2 (dano médio) e 3 (muito dano) (Figura 1.9).

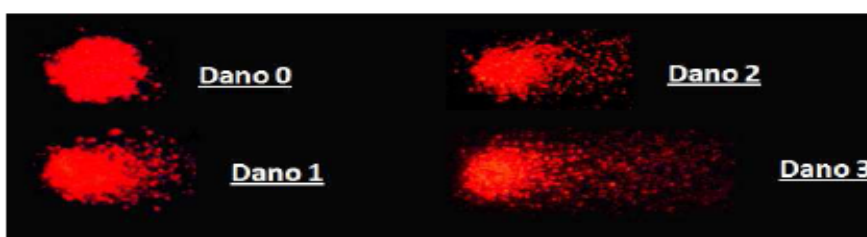


Figura 1.9 – Danos nos eritrócitos verificados pelo ensaio do cometa. Dano 0 (sem dano aparente), 1 (pouco dano), 2 (dano médio) e 3 (muito dano).

No ensaio do cometa os peixes são animais bastante empregados a fim de se avaliar o grau de impacto que uma substância tóxica pode causar no meio ambiente. E além do sangue, diversos tecidos de peixes podem ser utilizados neste ensaio, como intestino, fígado, rim, brânquias, gônadas, baço e músculo (LEE & STEINERT, 2003). O sangue tem uma vantagem por já possuir células dissociadas, entretanto as brânquias, apesar de ter que passar primeiramente pelo processo de dissociação celular, também é um tecido bastante utilizado, uma vez que ela se encontra em contato direto com os compostos químicos presentes no meio aquático.

1.7.5 Acetilcolinesterase

O uso da AChE como biomarcador vem sendo frequentemente e amplamente utilizado a bastante tempo. Em peixes, a inibição desta enzima vem sendo utilizada para diagnosticar ambientes aquáticos que sofreram ou estão sofrendo algum tipo de estresse frente à presença de xenobióticos (SANCHO et al., 2000; JEE & KANG, 2004). Há uma gama muito grande de anti-colinesterásicos, dentre os quais se destaca os inseticidas com enfoque principalmente para os carbamatos e organofosforados (FERRARI et al., 2007). Embora o mecanismo ainda não esteja tão claro, atualmente, os metais (chumbo e cádmio) também vêm recebendo atenção como agentes anti-colinesterásicos, porém a concentração necessária para promover este efeito é relativamente mais alta (ALVES COSTA et al., 2007; PRINTES et al., 2007).

Colinesterases (ChEs) são enzimas que estão presentes em diferentes tecidos de peixes. Essas enzimas são classificadas de acordo com a sua distribuição, propriedade catalítica, especificidade ao substrato e sensibilidade a inibidores. Existem dois tipos de ChE: a AChE que hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil, e a butirilcolinesterase (BChE) que hidrolisa outros tipos de ésteres como a butirilcolina. A principal função da AChE é quebrar a acetilcolina (ACh) durante a transdução do impulso nervoso (CHUIKO et al., 2003; VAN DER OOST et al., 2003; PRINTES et al., 2007).

A ACh, um neurotransmissor, está presente dentro de vesículas localizadas nos axônios das células pré-sinápticas. Uma despolarização da membrana, devido a chegada do impulso nervoso, promove a liberação da ACh na fenda sináptica, sendo que esta posteriormente se difunde para a célula pós-sináptica onde se liga a receptores colinérgicos,

ocorrendo desta forma a transmissão das informações. Após a ativação do receptor, a ACh é quebrada por hidrólise, catalisada pela enzima AChE, resultando em colina e ácido acético. A colina então é recaptada pelo terminal axônico e reutilizada na síntese do neurotransmissor, que ocorre da seguinte maneira: a acetil-coenzima A, produto do metabolismo oxidativo, se liga a colina, que foi captada do meio extracelular através de um transportador de membrana dependente de sódio, dando origem assim a ACh (LINDEN, 2008).

A atividade da AChE pode muitas vezes variar de acordo com o tecido ou órgão que está sendo avaliado. De modo geral, os ensaios com peixes avaliam a atividade da AChE no músculo e no cérebro, sendo que neste último, a atividade da enzima é muito mais aparente e estudada (FERRARI et al., 2007). A correlação entre a inibição da AChE e a mortalidade de peixes ainda não é bem estabelecida, uma vez que algumas espécies são capazes de tolerar altos graus de inibição da AChE cerebral sem apresentar nenhuma consequência, enquanto que para outras espécies, a sobrevivência é afetada (FERRARI et al., 2004). Tal fato pode estar relacionado com diferentes fatores fisiológicos e metabólicos, como também pela diferença nas propriedades bioquímicas desta enzima (FERRARI et al., 2007).

A atividade da AChE é extremamente importante em muitas funções fisiológicas, como na localização de presas, fuga do predador e orientação para o encontro de alimentos (DUTTA & ARENDS, 2003; SANTOS MIRON et al., 2005). Distúrbios na sua atividade podem afetar além dos fatores já citados, como também no equilíbrio, apetite e comportamento reprodutivo (BRETAUD et al., 2000). Quando a atividade da AChE diminui ocorre um acúmulo de ACh na fenda sináptica promovendo um aumento na transmissão do impulso nervoso, exaustão do nervo e falha no sistema nervoso. No músculo, a inibição da AChE promove hiperestimulação das fibras musculares podendo levar a tetania, paralisia ou até mesmo a morte. Os músculos respiratórios também são bastante afetados e a sua paralisia é geralmente imediata, ocasionando a morte do indivíduo (KIRBY et al., 2000; JEE & KANG, 2004; GLUSCZAK et al., 2006).

2 OBJETIVOS E ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A microcistina é uma substância tóxica liberada por cianobactérias, dentre as quais se destaca a *M. aeruginosa* (MA). Porém no ambiente, dificilmente vai ocorrer florações de cianobactérias onde somente a MA esteja presente. Normalmente, pode-se encontrar nas florações outras cianobactérias capazes de liberar diferentes cianotoxinas que em conjunto com a microcistina podem aumentar ou diminuir os efeitos que esta substância tóxica é capaz de promover nos organismos aquáticos. Ainda, mesmo baixas concentrações dessa substância tóxica, próximas àquelas estipuladas pela legislação ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR para água potável), podem ser capazes de promover alterações na saúde da biota. Partindo deste princípio, o objetivo geral deste trabalho foi comparar os efeitos de florações naturais de cianobactérias (FNC) com aqueles exercidos apenas pela MA em parâmetros bioquímicos e genéticos do peixe neotropical *Prochilodus lineatus*. Sendo assim, o curimba foi exposto a duas situações diferentes: 1º ao liofilizado de FNC e 2º somente ao liofilizado de MA. Os resultados e as discussões deste trabalho encontram-se na forma de artigos, sendo que os mesmo, posteriormente, serão enviados para publicação na revista Comparative Biochemistry and Physiology -Part C: Toxicology & Pharmacology. O artigo A retrata a exposição do *P. lineatus* ao liofilizado de FNC e o artigo B, a exposição do mesmo animal, ao liofilizado de MA. Por fim, foi feita uma conclusão geral, comparando os diferentes efeitos encontrados no *P. lineatus* após as duas exposições.

Os objetivos específicos para a exposição ao liofilizado de FNC e de MA são os mesmos, por isso eles foram escritos juntos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar testes de toxicidade aguda (24 e 96 h) com juvenis de *P. lineatus* expostos a duas concentrações (1 e 2 mg.L^{-1}) do liofilizado de FNC;

- Realizar testes de toxicidade aguda (24 e 96 h) com juvenis de *P. lineatus* expostos a duas concentrações (1 e 2 mg.L⁻¹) do liofilizado de MA;
- Verificar se a exposição aos diferentes meios experimentais promove alterações na atividade das enzimas de biotransformação (CYP1A e GST) nas brânquias e no fígado de *P. lineatus*;
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e GR) e a concentração do antioxidante não enzimático GSH nas brânquias e no fígado de *P. lineatus* após as exposições aos liofilizados de FNC e de MA;
- Avaliar se a exposição aos diferentes meios experimentais gera peroxidação lipídica nas brânquias e no fígado de *P. lineatus*;
- Averiguar se a exposição aos diferentes meios experimentais produz danos no DNA de eritrócitos e nas células branquiais de *P. lineatus*, através do ensaio do cometa;
- Examinar se a exposição aos diferentes meios experimentais promove alterações na atividade da acetilcolinesterase no cérebro e músculo de *P. lineatus*;
- Comparar os efeitos que os dois materiais liofilizados (de FNC e de MA) são capazes de promover no *P. lineatus*.

3 ARTIGO A

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOQUÍMICOS E GENÉTICOS DE FLORAÇÕES
NATURAIS DE CIANOBACTÉRIAS PARA O PEIXE NEOTROPICAL
*PROCHILODUS LINEATUS***

Cylene Zambrozi Garcia; Claudia Bueno dos Reis Martinez*

**Artigo a ser submetido para publicação na revista
Comparative Biochemistry and Physiology -Part C: Toxicology & Pharmacology**

AValiação dos Efeitos Bioquímicos e Genéticos de Florações NATURAIS DE CIANOBACTÉRIAS PARA O PEIXE NEOTROPICAL *PROCHILODUS LINEATUS*

Cylene Zambrozi Garcia¹; Claudia Bueno dos Reis Martinez^{1*}

Resumo

Os efeitos de florações naturais de cianobactérias (FNC) foram avaliados para juvenis de *Prochilodus lineatus* expostos a duas concentrações do liofilizado de FNC (1 e 2 mg.L⁻¹) ou somente à água durante 24 e 96 h. Após as exposições os animais foram amostrados e as brânquias e o fígado foram usados para as análises bioquímicas, células sanguíneas e branquiais para as análises genéticas e o cérebro e o músculo para análise da atividade da acetilcolinesterase (AChE). Os resultados mais significativos encontrados após a exposição dos peixes ao liofilizado de FNC foram ativação da EROD no fígado, das enzimas antioxidantes nas brânquias e inibição da AChE no cérebro. Embora tenha sido observado ativação da fase I, isto não é relatado na literatura, necessitando mais estudos nesta área. A ativação das defesas antioxidantes parece ter sido suficiente para evitar lipoperoxidação e ocorrência de danos no DNA. A inibição da AChE pode estar atribuída a presença da anatoxina-a(s) e/ou a presença da microcistina, já que estudos mostram a presença desta substância tóxica no cérebro de peixes. Embora somente a MC-LR tenha sido quantificada, podemos inferir que há na FNC a presença de outras ciantoxinas que foram capazes de exercer influência nos parâmetros analisados.

Palavras-chave: Acetilconesterase. Antioxidantes. Cianotoxinas.

3.1 INTRODUÇÃO

A eutrofização das águas doces, decorrente do grande aumento populacional, das atividades antropogênicas e da entrada de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, nos corpos d'água (Li et al., 2010) é considerada como um dos maiores problemas ambientais pelo fato de favorecer o desenvolvimento de cianobactérias potencialmente tóxicas (Bittencourt-Oliveira & Molica, 2003). A rápida proliferação desses organismos e seu acúmulo na superfície da água dá origem ao fenômeno conhecido como

¹ Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. C.P. 6001. CEP 86051-990.

^{1*} Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. C.P. 6001. CEP 86051-990. *corresponding author. Tel.: +55 (43) 3371-4650; fax: +55 (43) 3371-4207; E-mail address: cbueno@uel.br (C. B. R. Martinez).

florações ou “blooms” (Briand et al., 2003), que podem promover aspectos negativos do ponto de vista estético e biológico, uma vez que podem alterar as características organolépticas da água (Li et al., 2010) e liberar potentes metabólitos secundários tóxicos, também chamados de cianotoxinas (Zimba et al., 2001; Pasková et al., 2008).

Diferentes tipos de cianotoxinas podem ser produzidas por uma mesma cianobactéria (Hitzfeld et al., 2000) e de acordo com seu modo de ação e seu efeito tóxico elas podem ser classificadas em três categorias: dermatoxinas ou toxinas irritantes ao tato, neurotoxinas e hepatotoxinas. As dermatoxinas são irritantes ao contato devido à presença de lipopolissacarídeos; as neurotoxinas (anatoxina-a, anatoxina-a(s) e saxitoxina) e as hepatotoxinas (microcistinas, nodularinas e cilindrospermopsinas) apresentam alto grau de toxicidade (Sivonen & Jones, 1999; Codd, 2000; Briand et al., 2003; Chen et al., 2006).

Dentre as cianotoxinas, a microcistina (MC) corresponde à substância tóxica mais amplamente encontrada e estudada, sendo ela produzida por uma diversidade de cianobactérias tóxicas, dentre as quais se destacam as dos gêneros *Microcystis* e *Anabaena*, principalmente, e *Nostoc* e *Oscillatoria* (Sivonen & Jones, 1999). Esta cianotoxina pode facilmente entrar em contato com os organismos aquáticos diretamente, por meio da alimentação de cianobactérias tóxicas (Li et al., 2004), ou indiretamente, pelas brânquias, durante o processo de respiração (Zimba et al., 2001). A MC atua como hepatotoxina porque são predominantemente absorvidas pelo fígado por meio de receptores dos ácidos biliares (Codd, 2000; Chen et al., 2006). Entretanto, Fischer e colaboradores (2005) reportaram que os polipeptídeos de transporte de ânions orgânicos (Oatps), presentes no fígado, trato gastrointestinal, rim e cérebro (Pasková et al., 2008), também estão relacionados com a sua captação, aumentando assim os alvos das MCs.

Exposição a florações de cianobactérias e/ou a MC pura, tem sido relacionado com a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Li et al., 2003; Li et al., 2007; Prieto et al., 2007; Weng et al., 2007) que em excesso no organismo pode interferir no sistema de defesa antioxidante ou induzir danos oxidativos. A homeostase do animal é mantida quando o sistema de defesa antioxidante está em equilíbrio com a geração de ERO (Modesto & Martinez, 2010a). Quando ocorre um desequilíbrio nesta relação em favor dos oxidantes, é gerada no organismo uma situação de estresse oxidativo, resultando na oxidação de proteínas, peroxidação lipídica (LPO), danos na molécula do DNA e até mesmo a morte celular (Atencio et al., 2008). Entretanto, os organismos aeróbicos possuem mecanismos de defesa antioxidante que podem prevenir a formação dessas ERO ou neutralizá-las (Martinez, 2006; Valavanidis et al., 2006). Dentre esses estão a superóxido dismutase (SOD), que atua

no ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), que atuam sobre o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a glutathione redutase (GR), que reduz a GSSG a GSH, que corresponde ao antioxidante não enzimático mais importante e ainda atua como co-fator para a GPx e para a GST (Livingstone, 2001).

Os biomarcadores de estresse oxidativo são considerados como uma ferramenta bastante valiosa a fim de monitorar os efeitos que os xenobióticos podem promover nos organismos (Qiu et al., 2007). Todavia, há outros biomarcadores que também podem ser utilizados, dentre os quais se destaca a acetilcolinesterase (AChE). Nos organismos aquáticos a atividade desta enzima é estudada principalmente no cérebro e no músculo dos animais (Ferrari et al., 2007), sendo que a sua inibição pode afetar algumas funções fisiológicas como localização de presas, fuga do predador, orientação para o encontro de alimentos, equilíbrio, apetite e comportamento reprodutivo (Bretaud et al., 2000; Dutta & Arends, 2003; Santos Miron et al., 2005).

Na literatura, embora tenha relatos da predominância da *Microcystis aeruginosa* nas florações de cianobactérias, outros organismos fitoplanctônicos também podem estar presentes e estes podem liberar além da MC, outras substâncias tóxicas que isoladas ou coadjuvadas com a MC podem modular os efeitos que essa toxina é capaz de promover nos organismos aquáticos. Há uma diversidade de trabalhos que relatam a toxicidade que a MC é capaz de promover nos organismos, porém, a maioria dos experimentos faz o uso da MC pura, tendo poucos dados que retratam a ação desta substância tóxica presente em florações de cianobactérias ocorridas naturalmente no ambiente, cujos efeitos tóxicos podem estar sendo modulados devido à presença de outras toxinas. Partindo deste princípio, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos que as florações naturais de cianobactérias (FNC) podem promover nas vias de biotransformação (CYP1A e GST) e nos biomarcadores de estresse oxidativo (SOD, CAT, GPx, GR, GSH, GST, LPO) avaliados nas brânquias e no fígado; na atividade da AChE, avaliada no cérebro e no músculo; e na integridade da molécula de DNA, avaliada nas células sanguíneas e branquiais de uma espécie de peixe neotropical, *Prochilodus lineatus*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Animais

Exemplares jovens de *Prochilodus lineatus* com $20,11 \pm 0,14$ g (média $\pm$ EP, $n = 70$), fornecidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina, foram aclimatados por uma semana em tanques de 300L, contendo água desclorada e aerada (temperatura: $24,29^\circ$ C, pH: 6,81, condutividade: $136 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, oxigênio dissolvido: $9,17 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$) e com fotoperíodo de 12h:12 h. Os peixes foram alimentados com ração comercial a cada 48 h e não foram alimentados 48 h antes do início dos testes de toxicidade e durante os testes. Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina.

3.2.2 Preparo do Liofilizado de Florações Naturais de Cianobactérias (FNC) e dos meios de Exposição

Porções liofilizadas de florações naturais de cianobactérias (FNC), coletadas em Barra Bonita (BR) no período chuvoso em 2007, fornecidas pela professora doutora Odete Rocha, pertencente à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), foram maceradas, pesadas e posteriormente preparadas soluções com água destilada, com concentração de 1 e $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, para serem diluídas nos aquários onde os peixes foram expostos. Antes da exposição, as soluções passaram por três fases de congelamento e descongelamento, a fim de que as possíveis cianotoxinas fossem liberadas. Após as exposições, alíquotas de água foram coletadas para a quantificação da microcistina do tipo LR (MC-LR), sendo a mesma quantificada por meio de ensaio imunoenzimático em leitora de microplacas, por meio do kit Beacon, específico para MC-LR.

3.2.3 Teste de Toxicidade

Para a realização dos testes de toxicidade os peixes foram distribuídos em aquários de 100 L (8 peixes por aquário) contendo água desclorada e continuamente aerada. Os animais foram expostos às diferentes concentrações do material liofilizado de FNC (1 ou $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) ou somente a água (controle), durante 24 e 96 h, sendo os experimentos

independentes. Os grupos controles, assim como, os grupos experimentais, foram amostrados simultaneamente e todos os experimentos foram feitos em duplicata. Os seguintes parâmetros da água foram monitorados durante os experimentos: temperatura, oxigênio dissolvido (OD), condutividade e pH.

3.2.4 Amostragem

Imediatamente após serem retirados dos aquários, os peixes foram anestesiados em benzocaína 5%, por no máximo 2 min., para a coleta de amostra de sangue pela veia caudal (Cavalcante et al., 2008; Pereira Maduenho & Martinez, 2008). As amostras de sangue foram armazenadas em gelo para a realização do ensaio do cometa. Após os animais serem pesados, medidos e mortos por secção medular, foram retirados as brânquias, fígado, cérebro e músculo, que foram mantidos congelados a -80°C até o momento dos ensaios bioquímicos (Simonato et al., 2008; Modesto & Martinez, 2010a, 2010b). Quatro arcos brânquias foram separados para as análises bioquímicas e os outros quatro arcos restantes, foram utilizados para as análises genéticas.

3.2.5 Análises Bioquímicas.

As análises bioquímicas foram feitas com as amostras de brânquias, fígado, cérebro e músculo. Os tecidos foram pesados e homogeneizados (5x o volume para as brânquias e 10x o volume para o fígado, cérebro e músculo) em tampão fosfato de K (0,1 M), pH 7,0 para as brânquias e fígado e pH 7,5 para o cérebro e músculo. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados (20 min, 13.200 g, 4°C) e os sobrenadantes foram separados para os ensaios enzimáticos. Com as brânquias e o fígado foi analisada a atividade da CYP1A, por meio da atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD), da GST, SOD, CAT, GPx e GR, o conteúdo de GSH e a ocorrência de peroxidação lipídica (LPO), por meio do ensaio TBARS. Com o cérebro e o músculo foi avaliada a atividade da enzima AChE.

3.2.5.1 Enzimas de biotransformação

A indução da CYP1A foi determinada pela análise da atividade da EROD, estimada pela taxa de conversão da 7-etoxiresorufina em resorufina, seguindo-se o protocolo de Eggens e colaboradores (1992), com modificações. A reação foi iniciada pela adição da

amostra (sobrenadante da brânquia ou de fígado) na mistura reativa (tampão fosfato de K 0,1M; pH 7,6; NADPH 2 mM e 0,1 mM 7-etoxiresorufina). O aumento progressivo da fluorescência, resultante da formação de resorufina, foi medida a cada minuto, durante 10 minutos para o fígado e 20 minutos para a brânquia (excitação: 530 nm e emissão: 590 nm). A porção inicial linear da curva foi utilizada para avaliar a taxa de reação e a atividade da EROD foi expressa em $\text{pmol de resorufina} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$, baseada em uma curva padrão de resorufina. A atividade da GST foi determinada seguindo-se a complexação da glutathiona reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), em 340 nm (Keen et al., 1976), expressa em $\text{nmol CDBN conjugado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

3.2.5.2 Antioxidantes enzimáticos

A atividade da SOD foi determinada pela medida da inibição da taxa de redução do citocromo c pelo $\text{O}_2^{\bullet -}$ oriundo do sistema xantina/xantina oxidase, em 550 nm de acordo com McCord e Fridovich (1969). A atividade desta enzima foi expressa em U de SOD.mg de proteína. Uma unidade (U) de SOD representa a quantidade de enzima necessária para produzir 50% de inibição da taxa de redução do citocromo c. A atividade da CAT foi determinada seguindo-se a velocidade de decomposição do H_2O_2 , através do decréscimo de absorbância em 240 nm (Beutler, 1975). A atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ metabolizado $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. A atividade da GPx selênio-dependente foi determinada pelo método de Hopkins e Tudhope (1973), baseado na oxidação do $\text{NADPH} + \text{H}^+$ em presença de H_2O_2 , em 340 nm. A atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{mol NADPH oxidado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. A GR foi determinada indiretamente pela redução do NADPH mediante a presença da glutathiona oxidada (GSSG) (Carlberg & Mannervik, 1975), em 340 nm. A atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{mol NADPH oxidado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

3.2.5.3 Conteúdo de GSH

A concentração de GSH foi determinada de acordo com o método de Beutler e colaboradores (1963). Nas amostras foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) (1:1 v/v com TCA 6 %). Após centrifugação (1.200 g) foi adicionado tampão fosfato de potássio

0,1 M, pH 7,0, e DTNB 2,5 mM (5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico) formando o ânion tiolato, determinado em 412 nm. O conteúdo de GSH foi expresso em μg de GSH.mg de proteína⁻¹, a partir de uma curva padrão de 10 a 200 μM de GSH.

3.2.5.4 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi estimada através da quantificação do malondialdeído (MDA) que corresponde a um dos produtos finais da LPO, por meio do ensaio TBARS, seguindo-se a metodologia de Federici e colaboradores (2007). Em resumo, a determinação do MDA foi quantificada pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em 530 nm. A LPO foi expressa em equivalentes de MDA, como μmol MDA.mg de proteína⁻¹, usando uma curva padrão de MDA.

3.2.5.5 Atividade da acetilcolinesterase

A atividade da AChE foi determinada com base no método calorimétrico de Ellman e colaboradores (1961) adaptado para leitura em microplaca, de acordo com Alves Costa e colaboradores (2007). A atividade da enzima foi determinada através da quantificação do produto da reação da acetilcolina com o DTNB, em 415 nm. A atividade da enzima foi expressa em nmol de DTNB. min^{-1} .mg de proteína⁻¹.

3.2.5.6 Concentração de proteína

A concentração de proteína foi determinada de acordo com a metodologia de Lowry e colaboradores (1951) utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 700 nm. Os dados das concentrações de proteínas foram utilizados para a normalização de todos os outros dados anteriormente obtidos.

3.2.6 Análise de Danos no DNA – Ensaio do Cometa

Para o ensaio do cometa, as células precisam estar dissociadas. Para tanto, os arcos branquiais passaram por algumas etapas. Primeiramente, as brânquias foram limpas com salina (PBS: NaCl 126,6 mM, KCL 4,8 mM, CaCl 1,5 mM, NaHCO₃ 3,7 mM, Na₂HPO₄

8,9 mM, NaH_2PO_4 2,9 mM) e seus filamentos foram armazenados em 700 μL de solução salina para posterior suspensão celular, sendo esta baseada no protocolo descrito por Kilemade e colaboradores (2004), com modificações. Posteriormente, os filamentos foram seccionados e o material resultante foi colocado em um tubo de micro-centrífuga, onde foi acrescido 300 μL de tripsina a 0,25% (0,125 g de tripsina em pó + 50 mL de H_2O + 0,5 mL de EDTA 0,5M), para a dissociação celular. Para cessar esta etapa, 300 μL de soro bovino fetal foi acrescentado. Por fim, a solução foi filtrada obtendo-se assim as células em suspensão que foram utilizadas no ensaio do cometa. No caso do sangue, alíquotas de 10 μL de sangue foram transferidas para microtubos contendo 700 μL de salina. Antes do ensaio do cometa foi avaliada a integridade das células sanguíneas e branquiais usando o método de exclusão de células pelo corante azul de Trypan 1% (1 g de tripan em 100 mL de salina). De cada animal foram contadas 100 células, sendo consideradas viáveis amostradas com células sanguíneas ou branquiais com, pelo menos, 80% de viabilidade.

O ensaio do cometa foi realizado com células sanguíneas e branquiais. O ensaio para o sangue teve como base a metodologia descrita por Singh e colaboradores (1988), com modificações descritas por Vanzella e colaboradores (2007) e para brânquias teve como base a metodologia descrita por Cavalcante e colaboradores (2008). Para as análises foram seguidos os seguintes passos: (a) 10 μL de cada solução contendo as células em suspensão foram misturados com 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% (100 mg em 20 mL PBS), sendo em seguida colocados em lâminas de vidro previamente cobertas com agarose normal 1,5% (300 mg em 20 mL PBS); (b) as lâminas foram cobertas com lamínulas, permanecendo na geladeira por 30 min; (c) as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram colocadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1 mL Triton X-100, pH 10,0) por, no mínimo, 1 h; (d) em cubas de eletroforese, as lâminas foram colocadas em solução tampão (0,3 N NaOH/1 mM EDTA, pH > 13) por 30 min., em gelo e no escuro; (e) eletroforese: 20 min, 300 mA, 25 V, 1 V cm^{-1} ; (f) neutralização: 3 lavagens, a cada 5 min., com tampão (0,4 M Tris, pH 7,5); (g) fixação das lâminas com etanol por 10 min.; (h) estocagem das lâminas em refrigerador até a leitura das mesmas.

Para a leitura em microscópio de fluorescência (objetiva 100X), as lâminas foram coradas com gel red, da marca Biotium. Para cada animal foi feito duas lâminas e as mesmas foram codificadas a fim de ter um teste cego, sendo analisadas 100 células por lâminas. De acordo com Kobayashi et al. (1995), os danos no DNA foram classificados considerando-se o tamanho da cauda do cometa, em 4 classes: classe 0 = sem dano aparente;

classe 1 = cauda curta menor que o diâmetro do núcleo; classe 2 = comprimento da cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do núcleo; classe 3 = comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do núcleo. A partir dessa classificação foi calculado o escore de danos no DNA para cada tecido, de cada indivíduo, pela soma do valor da multiplicação do número de nucleóides encontrados em cada classe pelo valor da classe. Também foi calculado o número de nucleóides danificados através da soma do total de nucleóides encontrados nas classes 1, 2 e 3.

3.2.7 Análises Estatísticas

As diferenças entre os grupos controles e experimentais de cada exposição e para cada tempo, testes independentes, foram comparados entre si utilizando-se teste estatístico paramétrico t de Student's ou o teste não paramétrico de Mann-Whitney, dependendo da distribuição dos dados. Foram considerados valores significativos de $p \leq 0,05$.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Parâmetros da Água

Durante os experimentos, os parâmetros da água mantiveram-se constantes, sendo encontrado para o grupo controle e os grupos experimentais (média $\pm$ EP), respectivamente, os seguintes valores de temperatura: $23,29 \pm 0,04$ e $23,31 \pm 0,44$ ° C; OD: $8,40 \pm 0,36$ e $8,67 \pm 0,06$ mg O₂.L⁻¹; condutividade: $99,0 \pm 1,00$ e $100,83 \pm 4,83$ µS.cm⁻¹ e pH: $7,31 \pm 0,05$ e $7,30 \pm 0,01$. A análise da água contendo 1 mg.L⁻¹ do liofilizado de FNC mostrou a presença de 0,9 µg.L⁻¹ de MC-LR e da a água contendo 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de FNC, 1,9 µg.L⁻¹ de MC-LR.

3.3.2 Enzimas de Biotransformação

Os peixes expostos ao liofilizado de FNC, em relação aos seus respectivos controles, não apresentaram nenhuma diferença significativa na atividade da EROD (Figuras

3.1 A). Já no fígado, foi observado aumento significativo após 24 e 96 h de exposição à concentração de 1 mg.L^{-1} , em relação ao seu respectivo controle (Figuras 3.1 B).

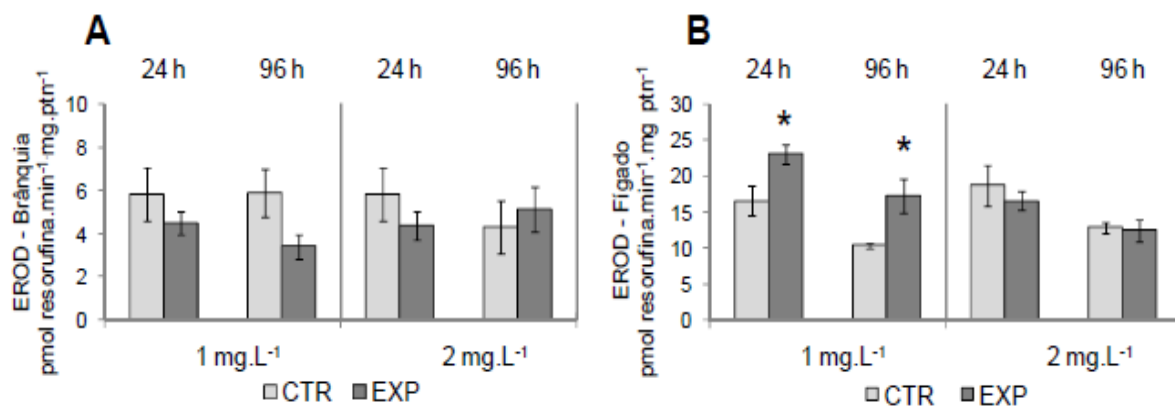


Figura 3.1 – Atividade da EROD nas brânquias (A) e no fígado (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L^{-1} do liofilizado de FNC (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8). *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle ($p < 0,05$).

Quanto a atividade da enzima GST (Figuras 3.2), não foi observado nenhuma diferença significativa em relação aos seus respectivos controles nas duas concentrações do liofilizado de FNC, 1 e 2 mg.L^{-1} , e nos dois tempo de exposição, 24 e 96 h, analisados nas brânquias e no fígado.

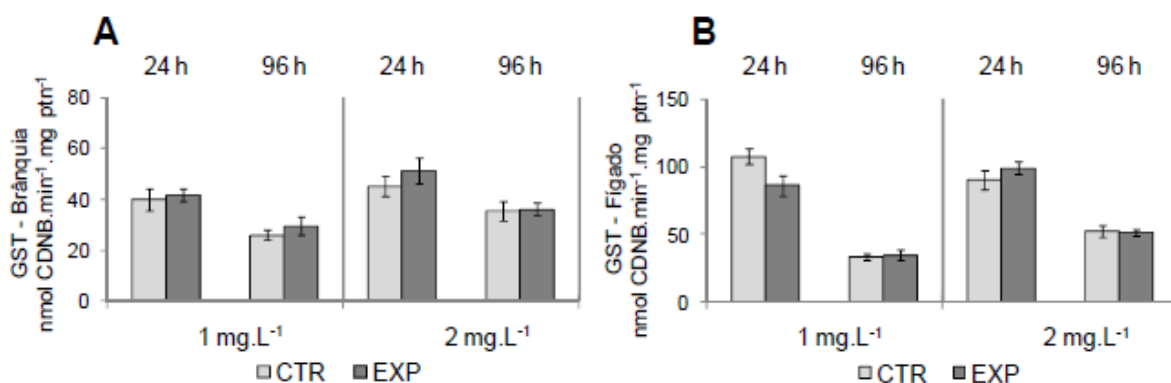


Figura 3.2 – Atividade da GST nas brânquias (A) e no fígado (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L^{-1} do liofilizado de FNC (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8).

3.3.3 Antioxidantes Enzimáticos

A atividade da SOD nas brânquias apresentou aumento significativo, em relação aos seus respectivos grupos controles, após 96 h, a 1 mg.L^{-1} , e após 24 h, a 2 mg.L^{-1} do liofilizado de FNC (Figura 3.3 A). A GPx branquial também se mostrou aumentada significativamente após 96 h de exposição à concentração de 1 mg.L^{-1} do liofilizado de FNC (Figura 3.3 C). A atividade da CAT e da GR branquial não apresentou variação significativa, em relação aos respectivos grupos controles, nas duas concentrações, nos dois tempos de exposição (Figuras 3.3 B e 3.3 D).

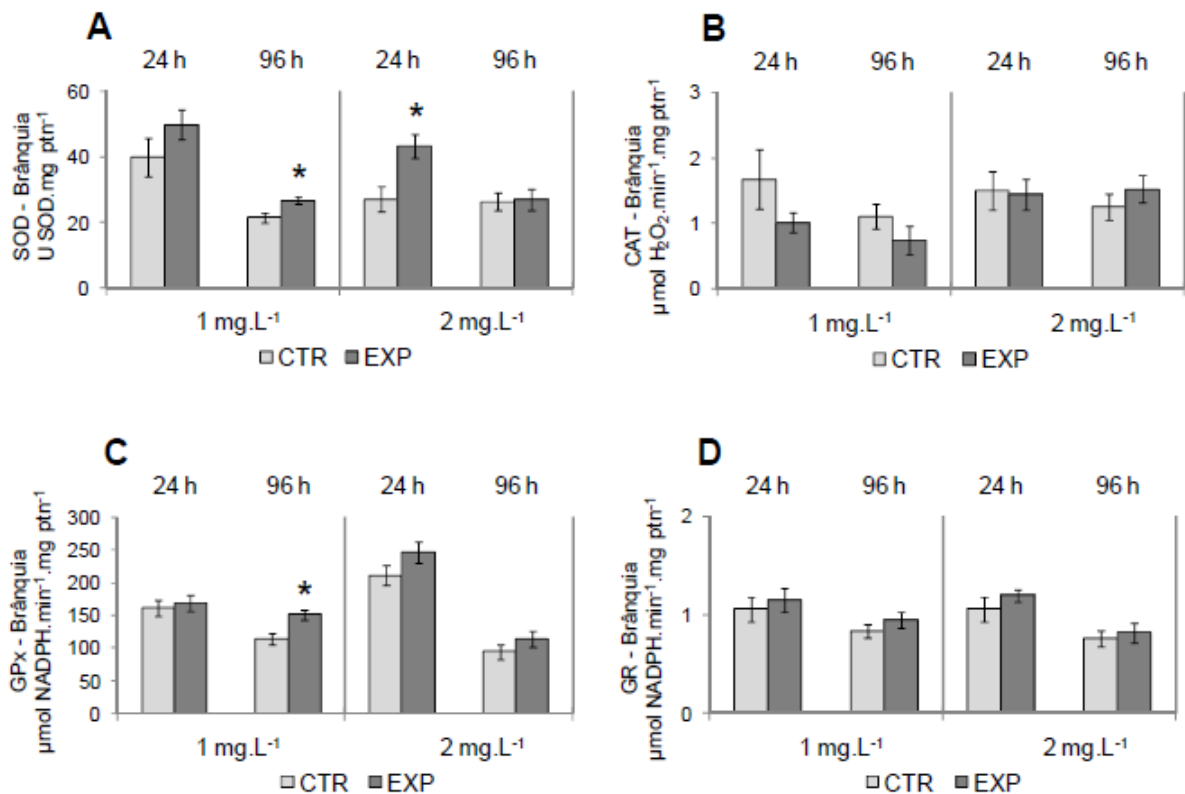


Figura 3.3 – Atividade da SOD (A), da CAT (B), da GPx (C) e da GR (D) nas brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de FNC (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8). *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle ($p \leq 0,05$).

Para os animais expostos ao liofilizado de FNC foi encontrado aumento significativo na atividade da SOD hepática após 24 h, a 1 mg.L^{-1} (Figura 3.4 A), em relação ao seu respectivo controle. A atividade da GR no fígado diminuiu significativamente após 24 h de exposição a 2 mg.L^{-1} do liofilizado de FNC; porém após 96 h de exposição, na mesma

concentração, houve um aumento significativo da sua atividade, em relação ao seu respectivo controle (Figura 3.4 D). A atividade da CAT e da GPx, não se mostraram alteradas significativamente em relação aos seus respectivos controles (Figuras 3.4 B e 3.4 C) após a exposição ao liofilizado de FNC, nos dois tempos experimentais.

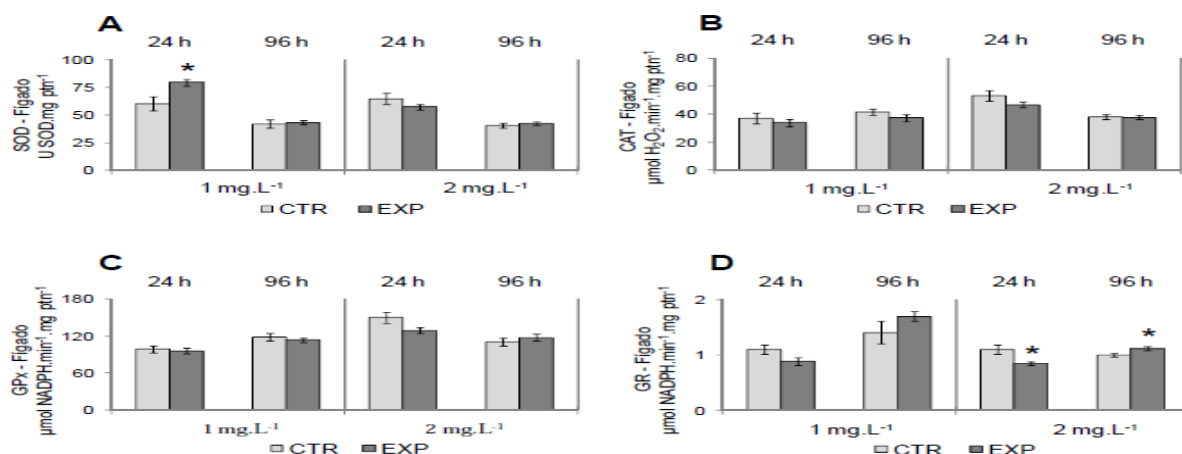


Figura 3.4 – Atividade da SOD (A), da CAT (B), da GPx (C) e da GR (D) no fígado de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de FNC (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8). *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle (p ≤ 0,05).

3.3.4 Conteúdo de GSH

O conteúdo de GSH apresentou aumento significativo, em relação ao grupo controle, apenas no fígado após 96 h de exposição a 1 mg.L⁻¹ do liofilizado de FNC (Figura 3.5 B).

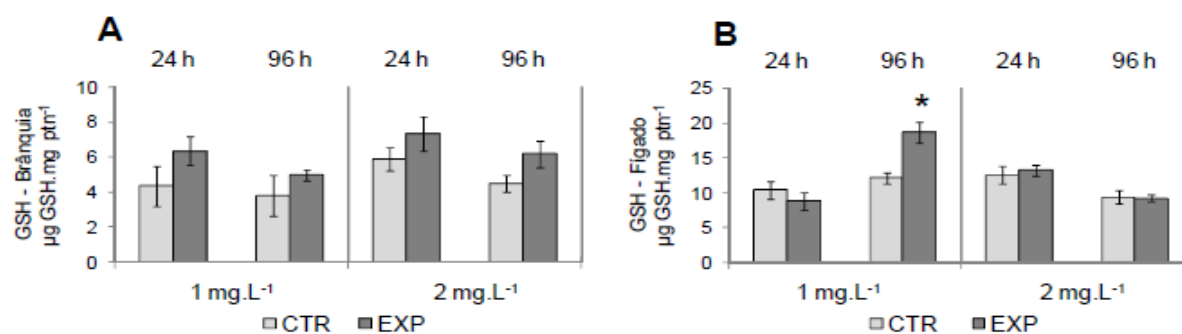


Figura 3.5 – Conteúdo de GSH nas brânquias (A) e no fígado (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de FNC (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8). *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle (p ≤ 0,05).

3.3.5 Peroxidação Lipídica (LPO)

Os resultados da LPO determinada pelo ensaio TBARS, por meio da quantificação do MDA, estão apresentados na Figura 3.6. A LPO apresentou diminuição significativa apenas no fígado após 96 h de exposição a 1 mg.L⁻¹ do liofilizado de FNC, em relação ao seu respectivo grupo controle (Figura 3.6 B).

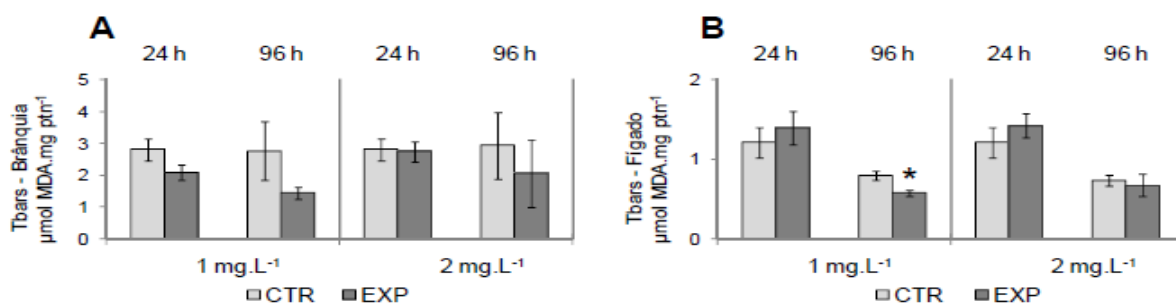


Figura 3.6 – Conteúdo de MDA nas brânquias (A) e no fígado (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de FNC (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8). *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle (p < 0,05).

3.3.6 Atividade da Acetilcolinesterase

Os resultados da atividade da enzima AChE no cérebro e no músculo dos peixes expostos ao liofilizado de FNC e respectivos grupos controle estão representados na Figura 3.7. Apenas no cérebro foi observada diminuição significativa desta enzima após 96 h a 1 mg.L⁻¹ do liofilizado de FNC (Figura 3.7 A).

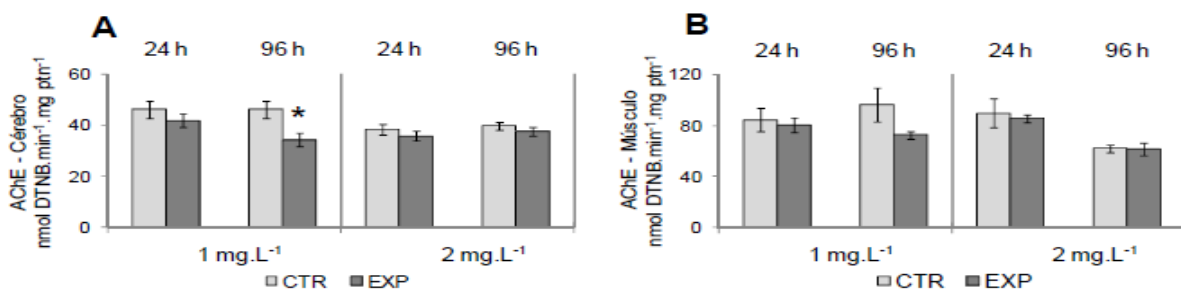


Figura 3.7 – Atividade da enzima acetilcolinesterase no cérebro (A) e no músculo (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de FNC (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8). *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle (p < 0,05).

3.3.7 Danos no DNA

Na Figura 3.8 encontram-se os resultados dos escores médios de danos do DNA nos eritrócitos e nas células branquiais, detectados pelo ensaio do cometa. Nos dois órgãos analisados nenhuma alteração significativa foi observada nos escores médios de danos do DNA após a exposição de *P. lineatus* às duas concentrações do liofilizado de FNC.

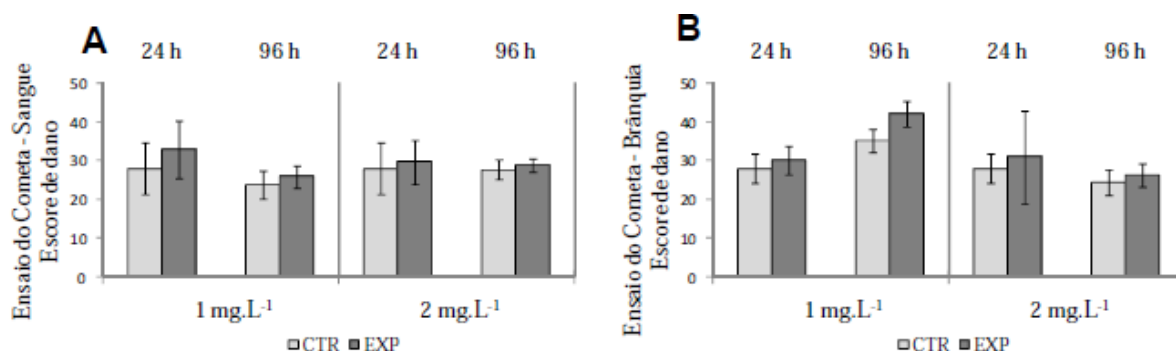


Figura 3.8 – Escores de danos em células sanguíneas (A) e branquiais (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de FNC (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 4-8).

Quanto a frequência e o número de nucleóides danificados, nos eritrócitos (Tabela 3.1) e nas células branquiais (Tabela 3.2), não foi observado nenhuma alteração significativa de nucleóides danificados após a exposição às duas concentrações do liofilizado de FNC. A maior parte dos eritrócitos apresentaram danos de classe 0 (70%) e classe 1 (30%) e uma pequena incidência de danos de classe 2 (0,23%) e classe 3 (0,07%). Para as células das brânquias foi encontrado maiores danos de classe 0 (70%) e classe 1 (28%) e menores porcentagens de danos para a classe 2 (1%) e classe 3 (0,1%).

Tabela 3.1 – Frequência média de nucleóides danificados observados em cada uma das classes do Cometa (0, 1, 2 e 3) e número de nucleóides danificados (média $\pm$ EP) nos eritrócitos de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de FNC (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h.

Tecido	Tempo	Grupo	Classes de danos					Nucleóides danificados
			N	0 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)	
Eritrócitos	24 h	CTR	7	68,00	31,25	0,25	0,00	27,71 ± 6,52
		1 mg.L ⁻¹	8	67,5	32,13	0,38	0,00	32,50 ± 6,95
	96 h	CTR	7	68,00	31,75	0,25	0,33	27,71 ± 6,52
		1 mg.L ⁻¹	8	71,63	28,38	0,63	0,29	29,00 ± 5,49
	24 h	CTR	4	67,00	31,43	0,14	0,00	23,50 ± 3,43
		2 mg.L ⁻¹	6	77,88	21,88	0,25	0,00	25,50 ± 2,60
	96 h	CTR	6	70,29	29,71	0,00	0,00	27,67 ± 2,60
		2 mg.L ⁻¹	7	73,13	26,88	0,00	0,00	28,00 ± 1,81

Tabela 3.2 – Frequência média de nucleóides danificados observados em cada uma das classes do Cometa (0, 1, 2 e 3) e número de nucleóides danificados (média $\pm$ EP) nas células branquiais de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de FNC (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h.

Tecido	Tempo	Grupo	Classes de danos					Nucleóides danificados
			N	0 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)	
Células Branquiais	24 h	CTR	6	67,75	31,75	0,50	0,00	28,00 ± 3,76
		1 mg.L ⁻¹	5	75,50	24,50	0,00	0,00	30,00 ± 3,62
	96 h	CTR	6	67,50	31,75	0,50	0,00	28,00 ± 3,76
		1 mg.L ⁻¹	5	69,00	31,00	0,00	0,00	31,00 ± 11,95
	24 h	CTR	7	66,00	30,28	3,63	0,00	32,86 ± 2,59
		2 mg.L ⁻¹	5	71,57	23,29	4,43	0,86	35,40 ± 1,72
	96 h	CTR	7	66,71	33,29	0,00	0,00	24,40 ± 3,45
		2 mg.L ⁻¹	5	82,63	17,13	0,00	0,00	26,25 ± 2,94

3.4 DISCUSSÃO

A fim de elucidar os efeitos tóxicos que a exposição à cianobactérias é capaz de promover, este estudo apresenta grande relevância. Ultimamente, a contaminação

das águas doces com florações de cianobactérias vem se tornando um problema sério principalmente porque certos organismos fitoplanctônicos apresentam a capacidade de liberar cianotoxinas, que podem influenciar a saúde da biota. Dentre as cianotoxinas, a MC é a que mais se destaca e diversos são os trabalhos que mostram a capacidade que ela tem em promover o estresse oxidativo nos organismo, desencadeando LPO (Jos et al., 2005; Pinho et al., 2005; Cazenave et al., 2006; Dewes et al., 2006; Prieto et al., 2006; Prieto et al., 2007; Atencio et al., 2008) e danos na molécula do DNA (Zegura et al., 2003; Zegura et al., 2004; Votto et al., 2007; Zegura et al., 2008).

A análise do liofilizado de FNC utilizado neste trabalho confirmou a presença de MC-LR, em quantidades distintas, nos dois tratamentos utilizados. Quanto à concentração de MC-LR encontrada, o trabalho apresenta grande importância, já que foram quantificadas concentrações de MC-LR próximas a legislação ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$ para água potável) (WHO, 1998) e mesmo essas baixas concentrações, promoveram alterações em alguns dos parâmetros analisados, demonstrando assim que o limite estabelecido pela OMS para água potável não é tão eficaz assim. Entretanto, deve-se ressaltar que outras cianotoxinas podem estar presentes nesta FNC e estas também podem influenciar na saúde da biota.

Após a exposição dos animais às diferentes concentrações do liofilizado de FNC (1 e 2 mg.L^{-1}), nos dois tempos experimentais (24 e 96 h), pôde-se verificar ativação da EROD no fígado e das enzimas antioxidantes, principalmente nas brânquias. O aumento da defesa antioxidante parece ter sido suficiente, uma vez que não foi observado LPO e ocorrência de danos no material genético da espécie estudada. Quanto a atividade da AChE, foi observado a sua inibição apenas no cérebro.

As enzimas da família do citocromo P450 são conhecidas como enzimas chaves no processo de detoxificação de fase I, sendo que em peixes a principal enzima envolvida neste processo é a subfamília CYP1A (Van der Oost et al., 2003). Analisada por meio da atividade da EROD, a ativação desta enzima é um parâmetro bastante utilizado, pois através dela pode-se verificar se o composto está promovendo alterações no organismo e ainda se o mesmo é ou não metabolizado pela primeira fase de detoxificação. Neste trabalho foi observado aumento na atividade da EROD no fígado na menor concentração, nos dois tempos analisados. Embora a literatura não traga resultados que comprovem a ativação dessa fase, estudos devem ser realizados nesta área, uma vez que foi observado ativação da primeira fase de detoxificação neste trabalho, assim como em outro trabalho também realizado no

nosso laboratório de pesquisa após a exposição a *Microcystis aeruginosa* e também no trabalho realizado por Pasková e colaboradores (2008).

Pasková e colaboradores (2008) ao avaliar a toxicidade da MC presente em uma floração de cianobactéria ocorrida naturalmente no ambiente, em uma codorna japonesa - *Coturnix coturnix japonica*, também verificaram aumento na atividade da CYP1A, porém a explicação dada por esses autores foi baseada na presença de outro composto presente na floração, que seria capaz de promover a ativação da fase I, não responsabilizando a MC pela ativação desta fase, já que a mesma está relacionada com a fase II do processo de detoxificação, envolvendo para tanto a enzima GST (Wang et al., 2006).

Estudos prévios demonstram que a conversão da MC em uma forma mais polar está relacionada com a depleção no pool da GSH (Kondo et al., 1996) e o conjugado MC-GSH formado enzimaticamente via GST faz parte da fase II do processo de detoxificação nos organismos aquáticos (Pflugmacher et al., 1998). Sendo assim, é de se esperar que na presença da MC a atividade da GST apresente-se aumentada significativamente. Entretanto, neste trabalho, a atividade desta enzima permaneceu inalterada após a exposição às duas concentrações do liofilizado de FNC, nos dois tempos experimentais (Figura 3.2). Por outro lado, Pietsch e colaboradores (2001) sugerem que lipopolissacarídeos são capazes de reduzir a atividade ou a expressão da GST, ficando assim a via de detoxificação da MC-LR prejudicada. Esta informação permite sinalizar a presença deste composto no material liofilizado utilizado neste trabalho, uma vez que a atividade da GST não apresentou nenhuma diferença significativa. Podemos ainda inferir que a presença de lipopolissacarídeos no liofilizado de FNC utilizado neste trabalho pode estar modulando os efeitos da MC-LR, já que a GST não apresentou alteração na presença da MC-LR. Muitos autores fazem o uso de florações de cianobactérias para avaliar a toxicidade da MC, porém é importante ter em mente que não só a MC, mas também outros compostos presentes nestas florações são capazes de promover efeitos tóxicos nos peixes (Falconer, 2007).

A GSH é considerada como o principal antioxidante não enzimático; constitui a primeira linha de proteção contra as ERO (Dewes et al., 2006); é utilizada na conversão da MC em um composto mais polar (Kondo et al., 1996); opera como um substrato para algumas reações enzimáticas, tais como para a GPx e GST (Wiegand & Pflugmacher, 2005; Pasková et al., 2008); possivelmente serve como um trocador para a entrada da MC na célula através dos Oatps 1 e 2 (Amado & Monserrat, 2010). No presente trabalho, foi verificado aumento na concentração da GSH no fígado, após 96 h de exposição ao liofilizado de FNC. Segundo Li e colaboradores (2007), elevadas concentrações de GSH sugerem alta

resistência do animal à microcistina. Sendo assim, podemos verificar neste trabalho, que o aumento no conteúdo da GSH sugere uma proteção do animal contra os efeitos prejudiciais que a MC-LR, presente no liofilizado de FNC, seria capaz de promover. Além disso, Ding e colaboradores (2000) ainda sugerem que o aumento da GSH promove a proteção das células contra mudanças no citoesqueleto e diminui a citotoxicidade.

Estudos prévios demonstram que tanto extratos de cianobactérias como MCs pura são capazes de induzir a produção de ERO (Li et al., 2003; Weng et al., 2007; Li et al., 2007; Prieto et al., 2007), promovendo assim o aumento na concentração de algumas espécies reativas, tais como o $O_2^{\cdot-}$, o radical hidroxil ($\cdot OH$) e o H_2O_2 , que podem ser combatidas pela defesa antioxidante enzimática e não enzimática do animal. Os antioxidantes enzimáticos como a SOD, CAT, GPx e GR fazem parte do maior sistema de defesa contra as ERO (Van der Oost et al., 2003; Cazenave et al., 2006). Se por ventura, essas ERO não forem adequadamente combatidas de forma eficiente pela defesa antioxidante, pode ser induzido no organismo o estresse oxidativo, sendo a MC reportada como a responsável por esses danos oxidativos em diferentes organismos (Prieto et al., 2007). No presente trabalho foi observado aumento significativo na atividade da SOD, nas brânquias e no fígado, da GPx, apenas nas brânquias, e quanto a GR hepática, foi observado queda e aumento na sua atividade.

As alterações antioxidantes encontradas no fígado após a exposição ao liofilizado de FNC deve-se a afinidade que a MC tem com este órgão (Fischer et al., 2005). Entretanto, neste trabalho, a brânquia também demonstrou tais alterações, demonstrando que ela também pode ser alvo da MC e ainda indica a grande participação dela na defesa contra as ERO. Embora o fígado seja comprovadamente o órgão mais afetado, as MCs também podem afetar outros órgãos de peixes, como o rim, (tilápia, Molina et al., 2005), brânquia (tilápia, Molina et al., 2005; Prieto et al., 2007), intestino (tilápia, Molina et al., 2005) e cérebro (coridora pontado, Cazenave et al., 2006). Prieto e colaboradores (2007) sugerem que diferentes vias de exposição podem influenciar a localização dos principais efeitos tóxicos exercidos por MCs, podendo deste modo, diferentes órgãos serem alvos desta cianotoxina.

A SOD e a CAT fazem parte das enzimas primárias da via antioxidante. A SOD catalisa o $O_2^{\cdot-}$ em O_2 e H_2O_2 , sendo este último detoxificado pela CAT quando estiver em alta concentração ou pela GPx, em concentrações mais baixas (Van der Oost et al., 2003; Hermes-Lima, 2004). Após a exposição aos diferentes tipos de poluentes, a atividade destas duas enzimas parece apresentar-se aumentada (Pandey et al., 2003; Atencio et al., 2008), porém isso não é uma regra, já que após a exposição a MC, mesmo que por diferentes meios,

tempos e concentrações, a atividade destas enzimas pode variar bastante, ocorrendo ativação, inibição ou mesmo, nenhuma alteração nas suas atividades. Jos e colaboradores (2005) observaram aumento significativo na atividade da SOD e da CAT no fígado de *Oreochromis* sp, porém na brânquia, foi observado aumento significativo apenas da SOD. No trabalho realizado por Pinho e colaboradores (2003) a atividade da CAT apresentou-se aumentada significativamente no hepatopâncreas de *Chasmagnathus granulatus*, enquanto a SOD não apresentou nenhuma diferença significativa. E Atencio e colaboradores (2008) observaram inibição destas duas enzimas no fígado de *Tinca tinca*. No presente estudo, embora não tenha sido observada nenhuma diferença significativa na atividade da CAT, a SOD apresentou-se aumentada significativamente. A ativação desta enzima é um indicativo da presença do $O_2^{\bullet -}$ devido a alta especificidade que a SOD apresenta com esta espécie reativa. Com isso podemos inferir que após a exposição ao liofilizado de FNC, houve a produção de ERO.

Segundo Pandey e colaboradores (2003), a atuação da SOD e da CAT representa uma linha de defesa bastante importante contra as ERO, entretanto, neste trabalho, os resultados destas duas enzimas não apresentaram uma co-relação, já que nenhuma alteração significativa foi observada na atividade da CAT. No entanto, foi observado neste trabalho aumento significativo na atividade da GPx, que como já dito anteriormente, também é capaz de detoxificar o H_2O_2 , gerado pela SOD, em H_2O . O aumento na atividade da GPx é de grande importância para os organismos, uma vez que ao detoxificar o H_2O_2 , ela diminui o substrato para a reação de Fenton, evitando assim a formação do $\cdot OH$, que corresponde a espécie mais reativa, quando comparada com as outras, evitando desta forma a ocorrência de LPO e danos ao DNA da espécie de peixe estudada. Com esses dados nós podemos verificar que o animal está tentando combater as ERO geradas após a exposição ao liofilizado de FNC.

A GR é responsável em catalisar a redução da GSSG para a sua forma reduzida, a GSH, em uma reação dependente de NADPH, sendo assim necessária para a proteção da célula contra a promoção de um estresse oxidativo (Jos et al., 2005; Cazenave et al., 2006). No presente trabalho foi verificado no fígado queda e aumento na atividade desta enzima em 24 e 96 h, respectivamente, após a exposição ao liofilizado de FNC. A queda na atividade desta enzima pode estar relacionada a diversos fatores. Segundo Bagnyukova e colaboradores (2006), algumas espécies reativas, tais como o $O_2^{\bullet -}$ e o H_2O_2 , são capazes de promover a inibição da GR. Após a exposição ao liofilizado de FNC por 24 h foi observado ativação da SOD branquial, indicando que há a presença do $O_2^{\bullet -}$. O excesso desta espécie reativa poderia então estar relacionado com a queda na atividade da GR hepática. A

diminuição na atividade da GR também foi encontrada no fígado e no rim de ratos expostos i.p. a MC-LR (Moreno et al., 2005). Por outro lado, também foi verificada ativação na atividade da GR neste trabalho, que é de grande valia para o animal, uma vez que ao reduzir a GSSG, ocorre o aumento na concentração da GSH, que corresponde a um dos principais antioxidantes não enzimáticos. O aumento na atividade da GR também já foi verificado no fígado e rim de *Oreochromis* sp expostos a MC-LR (Jos et al., 2005) e no fígado de *Corydoras paleatus* após a exposição a MC-RR (Cazenave et al., 2006).

Em peixes, o ensaio mais comumente utilizado para se quantificar a LPO é o ensaio TBARS, que na verdade quantifica um dos produtos finais da LPO, o MDA. É sabido que as toxinas de cianobactérias são capazes de promover LPO (Cazenave et al., 2006; Pasková et al., 2008). Prieto e colaboradores (2007) observaram aumento da LPO no fígado, rim e brânquias de *Oreochromis niloticus* após a exposição ao liofilizado de células cianobacterianas, contendo MC-LR, misturada com ração. Entretanto, não só o aumento da LPO vem sendo demonstrado na literatura, a diminuição nos níveis de LPO também ocorre. Sendo assim, esse biomarcador de efeito deve ser usado com bastante cautela. Gehringher e colaboradores (2004) observaram diminuição significativa da LPO no fígado de ratos expostos (i.p.) à MC-LR. No presente trabalho foi observada diminuição nos níveis de LPO no fígado de *P. lineatus*. Esta diminuição pode estar relacionada com o aumento na defesa antioxidante (SOD, GPX, GR e GSH) que este animal apresentou após a exposição ao xenobiótico. Isso significa que a capacidade antioxidante desta espécie de peixe está sendo eficiente para combater as ERO geradas após a exposição ao liofilizado de FNC. Uma outra hipótese seria que, em baixas concentrações de MCs, inicialmente ocorre aumento da produção de ERO, seguida pela sua diminuição (Ding et al., 2001). Esses aumentos sinalizam uma resposta rápida das células do animal expostas a MC, onde posteriormente, as ERO seriam rapidamente combatidas e desativadas pelo sistema de defesa antioxidante celular, evitando assim, a ocorrência de danos, como LPO (Cazenave et al., 2006). Ainda, o fígado é considerado como o órgão que apresenta os níveis mais altos de antioxidantes capazes de eliminar as ERO e produz um dos mais importantes agentes antioxidantes, a GSH (Moreno et al., 2005), que se mostrou aumentada significativamente na mesma concentração e no mesmo tempo em que a LPO apareceu diminuída significativamente, demonstrando mais uma vez que o animal está conseguindo fazer o controle redox que foi alterado após a exposição ao liofilizado de FNC.

Além de não ter ocorrido LPO, neste estudo também não foi verificado a ocorrência de danos na molécula de DNA desta espécie de peixe. Os danos na molécula de

DNA geralmente são verificados pelo ensaio do cometa, por se tratar de um teste rápido e simples (Olive & Banath, 2006). Embora na literatura vários estudos tenham demonstrado que a MC é capaz de promover danos na molécula de DNA, sendo então considerada genotóxica (Zegura et al., 2003; Zegura et al, 2004; Zegura et al., 2006), no presente trabalho isso não ocorreu. Provavelmente, a ativação da defesa antioxidante (SOD, CAT, GPx e GR) desta espécie de peixe tenha sido o suficiente para protegê-lo contra os possíveis efeitos prejudiciais que a MC é capaz de desencadear, dentre os quais se destaca os danos na molécula de DNA. Além disso, é importante lembrar que no material liofilizado de FNC utilizado neste trabalho, pode conter outras substâncias que podem ter modulado a ação genotóxica da MC.

Em peixes, a atividade da enzima AChE vem sendo mais amplamente estudada no músculo e no cérebro e diversos estudos têm demonstrado que os pesticidas, com destaque para os organofosforados e os carbamatos, apresentam grande capacidade anticolinesterásica (Ferrari et al., 2007). Pereira Maduenho e Martinez (2008) observaram inibição na atividade desta enzima no músculo de *P. lineatus* após a exposição ao inseticida Dimilin®, a base de diflubenzuron e Modesto e Martinez (2010a, 2010b), também observaram a atividade da AChE diminuída neste órgão, assim como no cérebro, após a exposição deste mesmo animal ao herbicida Roundup® e ao Roundap Transorb, ambos a base de glifosato.

No presente trabalho a atividade da AChE mostrou-se diminuída significativamente no cérebro após 96 h de exposição na menor concentração do liofilizado de FNC. Outros estudos já demonstraram que o fígado não é único alvo da MC. A presença dos Oapts no cérebro, também faz desse órgão grande alvo da MC (Fischer et al., 2005; Votto et al., 2007). Entretanto, não há na literatura dados que comprovem a ação desta cianotoxina na atividade da AChE, mas sim de outras, dentre as quais se destaca a anatoxina-a(s). Todavia, se a microcistina é capaz de entrar no cérebro, via Oapts (Fischer et al., 2005; Votto et al., 2007), e se ela é capaz de interferir na atividade de algumas outras enzimas, como na da GST, conforme demonstrou Cazenave e colaboradores (2006) após a exposição de *Corydoras paleatus* à diferentes concentrações de microcistina, ela também poderia promover alguma alteração na atividade de AChE. Aqui fica uma questão que ainda precisa ser esclarecida, mostrando a necessidade de mais estudos nesta área.

A anatoxina-a(s), uma neurotoxina, é uma substância tóxica que atua inibindo a atividade da AChE (Monserrat et al., 2001). Molica e colaboradores (2005) expuseram (i.p.) ratos a diferentes tipos de algas isoladas de florações de cianobactérias, coletados durante vários meses no reservatório de Tapacurá -Recife (BR), a fim de

diagnosticar a atividade da AChE. Na exposição da cultura dominada por *Anabaena spiroides*, produtora de anatoxina-a(s), foi encontrado inibição da AChE, já na exposição dominada por *M. aeruginosa*, nenhuma alteração na atividade desta enzima foi observada. Assim nós podemos inferir que no material liofilizado utilizado neste trabalho, não há somente MC-LR, que foi quantificada, mas também outras substâncias tóxicas, como a anatoxina-a(s), que embora não tenha sido quantificada, poderia também exercer influência na atividade de algumas enzimas avaliadas neste estudo, como por exemplo, na da AChE.

Sendo assim, podemos verificar que o liofilizado de FNC é capaz de promover alteração em alguns dos parâmetros analisados neste trabalho. Porém, tais variações não podem ser atribuídas apenas a MC-LR quantificada neste estudo, pois algumas delas, como na atividade da GST e da AChE, sugerem a presença de outras cianotoxinas, como a de lipopolissacarídeos e anatoxina-a(s), respectivamente. A ativação da fase I encontrada neste trabalho sugere a necessidade de mais estudos nesta área, uma vez que a literatura não traz dados de ativação desta primeira fase, e sim, apenas da segunda fase e por fim, embora tenha sido sugerido a presença da anatoxina-a(s), devido a inibição da AChE, a MC também pode estar presente no cérebro e poderia ser a responsável por tal inibição. Ficando assim mais uma sugestão para estudos futuros, a fim de se verificar quais cianotoxinas são capazes de influenciar em cada parâmetro analisado neste trabalho.

3.5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina/PR (EPUEL), pelo fornecimento de peixes e a professora doutora Odete Rocha, pertencente à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pela doação do liofilizado de Florações Naturais de Cianobactérias. Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida para C.Z. Garcia e pela bolsa de pesquisador para C.B.R. Martinez, que é membro do Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Toxicologia Aquática (INCT-TA, CNPq: 573949/2008-5). Este trabalho faz parte da dissertação de mestrado de C. Z. Garcia.

Referências

- Alves Costa, J.R.M., Mela, M., Silvia de Assis, H.C., Pelletier, E., Randi, M.F., Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 82 -88.
- Amado, L.L., Monserrat, J.M., 2010. Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: Why and how. *Environ. Int.* 36, 226 -235.
- Atencio, L., Moreno, I., Jos, A., Pichardo, S., Moyano, R., Blanco, A., Cameán, A.M., 2008. Dose-dependent antioxidant responses and pathological changes in tenca (*Tinca tinca*) after acute oral exposure to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicol.* 52, 1 -12.
- Bagnyukova, T. V., Chahrak, O. I., Lushchak, V. I., 2006. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquat. Toxicol.* 78, 325 -331.
- Beutler, E., Durom, O., Kelly, B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* 61, 882 -890.
- Beutler, E., 1975. *Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods*. New York: Grune & Straton.
- Bittencourt-Oliveira, M.C., Molica, R., 2003. “Cianobactéria Invasora”. *Biotecnologia Ciênc. Desenvolv.* 30, 82 -90.
- Brethead, S., Toutant, J.P., Saglio, P., 2000. Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 47, 117 -124.
- Briand, J.F., Jacquet, S., Bernard, C., Humbert, J.F., 2003. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Vet. Res.* 34, 361 -377.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 260, 5475 -5480.
- Cavalcante, D.G.S.M., Martinez, C.B.R., Sofia, S.H., 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat. Res.* 655, 41 -46.
- Cazenave, J., Bistoni, M.A., Pesce, S.F., Wunderin, D.A., 2006. Differential detoxification and antioxidant response diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquat. Toxicol.* 76, 1 -12.
- Chen, T., Cui, J., Liang, Y., Xin, X., Young, D. O., Chen, C., Shen, P., 2006. Identification of liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase as a potential target for microcystin-LR. *Toxicol.* 220, 71 -80.
- Codd, G.A., 2000. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecol. Eng.* 16, 51 -60.
- Dewes, L.J., Sandrini, J.Z., Monserrat, J.M., Yunes, J.S., 2006. Biochemical and physiological responses after exposure to microcystins in the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Brachyura). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 201 -208.

- Ding, W., Shen, H., Ong, C., 2001. Critical role of ROS formation in microcystin-induced cytoskeletal disruption in primary cultured hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health.* 64, 507 - 519.
- Ding, W.X., Shen, H.M., Ong, C.N., 2000. Microcystic cyanobacteria extract induces cytoskeletal disruption and intracellular glutathione alteration in hepatocytes. *Environ. Health Perspect.* 108, 605 -609.
- Dutta, H.M., Arends, D.A., 2003. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. *Environ. Res.* 91, 157 -162.
- Eggens, M.L., Galgani, F., 1992. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish-fast determination with a fluorescence plate-reader. *Mar. Environ. Res.* 33, 213 -221.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, JR.V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- Falconer, I.R., 2007. Cyanobacterial toxins present in *Microcystis aeruginosa* extracts-More than microcystins! *Toxicon.* 50, 585 -588.
- Federici, G., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat. Toxicol.* 84, 415 -430.
- Ferrari, A., Venturino, A., Péchen de D'Angelo, A. M., 2007. Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.* 146C, 308 -313.
- Fischer, W.J., Altheimer, S., Cattori, V., Meier, P.J., Dietrich, D.R., Hagenbuch, B., 2005. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 257 -263.
- Gehring, M.M., Shephard, E.G., Downing, T.G., Wiegand, C., Neilan, B.A., 2004. An investigation into the detoxification of microcystin-LR by the glutathione pathway in Balb/c mice. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 931 -941.
- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed.) *Functional metabolism: regulation and adaptation*. New York, John Wiley & Sons, Inc., pp. 319 -368.
- Hitzfeld, B.C., Höger, S.J., Dietrich, D.R., 2000. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment and human risk assessment. *Environ. Health Perspect. Suppl.* 108, 113 -122.
- Hopkins, J., Tudhope, G.R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *J. Haematol.* 25, 563 -575.
- Jos, A., Pichardo, S., Prieto, A. I., Repetto, G., Vázquez, C. M., Moreno, I., Cameán, A. M., 2005. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* 72, 261 -271.

- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakobi, W. B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferase. *J. Biol. Chem.* 251, 6183 -6188.
- Kilemade, M.F., Hartl, M.G.J., Sheehan, D., Mothersill, C., Van Pelt, F.N.A.M., O'Halloran, J., O'Brien, N.M., 2004. Genotoxicity of field-collected inter-tidal sediments from Cork Harbor, Ireland, to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus L.*) as measured by the comet assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 44, 56 -64.
- Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T.A., 1995. Comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. *MMS Comum.* 3, 103 -115.
- Kondo, F., Matsumoto, H., Yamada, S., Ishikawa, N., Ito, E., Nagata, S., Ueno, Y., Suzuki, M. Harada, K., 1996. Detection and identification of metabolites of microcystins formed in vivo in mouse and rat livers. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 1355 -1359.
- Li, J., Yu, J., Yang, M., Zhang, J., Burch, M.D, Han, W., 2010. Cyanobacterial population and harmful metabolites dynamics during a bloom in Yanghe Reservoir, North China. *Harmful Algae.* 9, 481 -488.
- Li, L., Xie, P., Chena, J., 2007. 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.* 49, 1042 -1053.
- Li, X., Chung, I., Kim, J., Lee, J., 2004. Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio L.*) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicon.* 44, 821 -827.
- Li, X., Liu, Y., Song, L., Liu, J., 2003. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio L.*) to the toxicity of microcystin-LR. *Toxicon.* 42, 85 -89.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656 -666.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 -275.
- Martinez, C.B.R., 2006. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: Ângela Teresa Silva-Souza. (org.). *Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil*. Maringá: ABRAPOA, pp. 43 -62.
- McCord, J.E., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049 -6055.
- Modesto, K.A, Martinez, C.B.R., 2010a. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere.* 78, 294 -299.
- Modesto, K.A, Martinez, C.B.R., 2010b. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere.* 81, 781 -787.

- Molica, R.J.R., Oliveira, E.J.A, Carvalho, P.V.V.C., Costa, A.N.S.F., Cunha, M.C.C., Melo, G., Azevedo, S.M.F.O., 2005. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae*. 4, 743 -753.
- Molina, R., Moreno, I., Pichardo, S., Jos, A., Moyano, R., Monterde, J.G., Cameán, A., 2005. 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. *Toxicon*. 46, 725 -735.
- Monserat, J.M., Yunes, J.S., Bianchini, A., 2001. Effects of *Anabaena spiroides* (cyanobacteria) aqueous extracts on the acetylcholinesterase activity of aquatic species. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1228 -1235.
- Moreno, I., Pichardo, S., Jos, A., Gómes-Amores, L., Mate, A., Vazquez, C.M, Cameán, A.M., 2005. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. *Toxicon*. 45, 395 -402.
- Olive, P.L., Banath, J.P., 2006. The Comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protoc.* 1, 23 -29.
- Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., Raisuddin, S., 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl & Schn.). *Sci. Total Environ.* 309, 105 -115.
- Pasková, V., Adamovsky, O., Pikula, J., Skocovska, B., Band'Ouchova, H., Horáková, J., Babica, P., Marsálek, B., Hilscherova, K., 2008. Detoxification and oxidative stress responses along with microcystins accumulation in Japanese quail exposed to cyanobacterial biomass. *Sci. Total Environ.* 98, 34 -47.
- Pereira-Maduenho, L, Martinez, C.B.R., 2008. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 148C, 265 -272.
- Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K.A., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C., 1998. Identification of non enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR. The first step of detoxification. *Biochem. Biophys. Acta.* 1425, 527 -533.
- Pietsch, C., Wiegand, C., Amé, V., Nicklisch, A., Wunderlin, D., Pflugmacher, S., 2001. The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. *Environ. Toxicol.* 16, 535 -542.
- Pinho, G.L.L., Moura da Rosa, C., Maciel, F.E., Bianchini, A., Yunes, J.S., Proença, L.A.O., Monserat, J.M., 2005. Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 353 -360.
- Pinho, G.L.L., Moura da Rosa, C., Yunes, J.S., Luquet, C.M., Bianchini A., Monserat, J.M., 2003. Toxic effects of microcystins in the hepatopancreas of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 135C, 459-468.
- Prieto, A.I., Jos, A., Pichardo, S., Moreno, I., Cameán, A.M., 2006. Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.). *Aquat. Toxicol.* 77, 314 -321.

- Prieto, A.I., Pichardo, S., Jos, A., Moreno, I., Cameán, A.M., 2007. Time-dependent oxidative stress responses after acute exposure to toxic cyanobacterial cells containing microcystins in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* 84, 337 -345.
- Qiu, T., Xie, P., Ke, Z., Li, L., Guo, L., 2007. In situ studies on physiological and biochemical responses of four fishes with different trophic levels to toxic cyanobacterial blooms in a large Chinese lake. *Toxicon.* 50, 365 -376.
- Santos Miron, D., Crestani, M., Shettringer, M.R., Morsch, V.M., Baldisserotto, B., Tierno, M.A., Moraes, G., Vieira, V.L.P., 2005. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 398 -403.
- Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram J. (Eds.). *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring, and Management*. WHO, London, New York, pp. 40 -112.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice R.R., Schneider E.L., 1988. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T.; Dassenakis, M., Scoullos, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178 -189.
- Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57 -149.
- Vanzella, T.P., Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S., 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutat. Res.* 631, 36 -43.
- Votto, A.P.S, Renon, V.P., Yunes, J.S, Rumjanek, V.M., Capella, M.A.M., Neto, V.M., Freitas, M.S., Geracitano, L.A., Monserrat, J.M., Trindade, J.S., 2007. Sensitivity to microcystins: A comparative study in human cell lines with and without multidrug resistance phenotype. *Cell Biol. Int.* 31, 1359 -1366.
- Wang, L., Liang, X.F., Liao, W.Q., Lei, L.M., Han, B.P., 2006. Structural and functional characterization of microcystin detoxification-related liver genes in a phytoplanktivorous fish, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 144C, 216 -227.
- Weng, D., Lu, Y., Wei, Y., Liu, Y., Shen, P., 2007. The role of ROS in microcystin-LR induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice. *Toxicol.* 232, 15 -23.
- WHO, 1998. Blue-green algae in inland waters: Assessment and control of risks to public health. WHO Document, Annex G.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S., 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 201 -218.
- Zegura, B., Lah, T.T., FilipiC, M., 2004. The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. *Toxicol.* 200, 59 -68.

- Zegura, B., Lah, T.T., Filipic, M., 2006. Alteration of intracellular GSH levels and its role in microcystin-LR-induced DNA damage in human hepatoma HepG2 cells. *Mutat. Res.* 611, 25-33.
- Zegura, B., Sedmark, B., Filipic, M., 2003. Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicon.* 41, 41-48.
- Zegura, B., Zajc, I., Lah, T.T., Filipic, M., 2008. Patterns of microcystin-LR induced alteration of the expression of genes involved in response to DNA damage and apoptosis. *Toxicon.* 51, 615-623.
- Zimba, P.V., Khoo, L., Gaunt, P., Carmichael, W.W., Brittaina, S., 2001. Confirmation of catfish mortality from *Microcystis* toxins. *J. Fish Dis.* 24, 41-47.

4 ARTIGO B

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E GENÉTICAS NO PEIXE *PROCHILODUS*
LINEATUS INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO À *MICROCYSTIS AERUGINOSA***

Cylene Zambrozi Garcia; Claudia Bueno dos Reis Martinez*

**Artigo a ser submetido para publicação na revista
Comparative Biochemistry and Physiology -Part C: Toxicology & Pharmacology**

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E GENÉTICAS NO PEIXE *PROCHILODUS LINEATUS* INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO À *MICROCYSTIS AERUGINOSA*

Cylene Zambrozi Garcia¹; Claudia Bueno dos Reis Martinez^{1*}

Resumo

Microcistinas são metabólitos secundários produzidos por diferentes gêneros de cianobactérias, dentre os quais se destaca *Microcystis aeruginosa* (MA). Neste trabalho, os efeitos bioquímicos e genéticos do liofilizado de MA foram avaliados para o peixe neotropical *Prochilodus lineatus*. Os peixes foram expostos à 1 ou 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de MA ou somente a água (controle) em testes de toxicidade estáticos e independentes durante 24 e 96 h. As brânquias e o fígado foram usados nas análises bioquímicas, células sanguíneas e branquiais nas análises genéticas e com o cérebro e o músculo foi avaliada a atividade da acetilcolinesterase (AChE). Os resultados mostraram ativação da via de biotransformação devido ao aumento na atividade da CYP1A e da glutathione S-transferase (GST). A defesa antioxidante mostrou-se bastante alterada, sendo encontrado ativação da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR) e aumento no conteúdo do tripeptídeo glutathione (GSH) e queda na atividade da CAT e no conteúdo da GSH. Embora não tenha sido detectado lipoperoxidação, danos na molécula do DNA foram verificados. Assim, podemos verificar que liofilizado de MA é capaz de promover alterações nos parâmetros bioquímicos e genéticos do *P. lineatus*.

Palavras-chave: Antioxidante. Cianotoxina. Detoxificação.

4.1 INTRODUÇÃO

Microcistinas (MC) são cianotoxinas amplamente encontradas e estudadas que são produzidas por diferentes gêneros de cianobactérias, dentre os quais se destaca *Microcystis aeruginosa* (MA) (Prieto et al., 2007; Atencio et al., 2008). Um dos casos mais graves envolvendo MC no Brasil ocorreu em uma clínica de hemodiálise em Pernambuco (BR), em 1996. Os pacientes foram expostos intravenosamente à água contendo MC, levando a morte de um grande número de pacientes (Fischer et al., 2005; Chen et al., 2006). Por serem capazes de promover uma série de efeitos adversos e em alguns casos, ocasionar a morte dos

¹ Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. C.P. 6001. CEP 86051-990.

^{1*} Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. C.P. 6001. CEP 86051-990. *corresponding author. Tel.: +55 (43) 3371-4650; fax: +55 (43) 3371-4207; E-mail address: cbueno@uel.br (C. B. R. Martinez).

indivíduos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu um limite máximo aceitável de MC-LR para a água potável de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ e para os alimentos de $0,04 \mu\text{g.Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ como Tolerância Diária Ingerida (TDI) de MC (WHO, 1998).

As MCs são heptapeptídeos cíclicos, constituídas por três D-aminoácidos que compõe a porção constante e invariável da molécula (alanina, β -eritro- β -metil ácido aspártico e γ -ácido glutâmico), por dois aminoácidos raros (N-metildehidroalanina (Mdha) e o 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8,trimetil-deca-4,6-ácido dienóico (Adda)) e por mais dois L-aminoácidos variáveis, cujas combinações conhecidas incluem: leucina e arginina (LR), arginina e arginina (RR) e tirosina e arginina (YR), dentre outras (Figueiredo et al., 2004; Chen et al., 2006; Antoniou et al., 2008). Diferentes combinações dos L-aminoácidos podem ser encontradas nos diferentes tipos de MC e até o momento já foram identificadas mais de 80 isoformas, dentre as quais se destaca a MC-LR por ser a mais tóxica e a mais frequente. Quanto às suas características, a MC apresenta um peso molecular variando entre 800-1000 Daltons; são solúveis em água e incapazes de atravessar a membrana lipídica de animais, plantas e bactérias; são resistentes à temperatura, hidrólise química e oxidação (Hitzfeld et al., 2000; Amado & Monserrat, 2010).

Os peixes podem entrar em contato com esta toxina por diferentes vias, como por exemplo, durante a alimentação (Li et al., 2004) ou passivamente pelas brânquias, durante a respiração (Zimba et al., 2001). Uma vez dentro do organismo, a MC apresenta como órgão alvo o fígado, podendo entrar nos hepatócitos por duas vias diferentes: pelos receptores de ácidos biliares (Codd, 2000; Chen et al., 2006) ou pelos polipeptídeos de transporte de ânions orgânicos (Oatps) (Fischer et al., 2005). Entretanto, outros órgãos, como o trato gastrointestinal, rim e cérebro também apresentam esses transportadores (Pasková et al., 2008), aumentando assim os alvos desta toxina. Ao nível molecular, os principais alvos das MCs são as proteínas fosfatases (PP) da família serina/treonina. A inibição das PPs promove o aumento da fosforilação das proteínas, tendo como consequência a ruptura dos microfilamentos do citoesqueleto e a perda da forma celular ocasionando a destruição da célula do fígado, podendo levar a hemorragia intra-hepática ou insuficiência hepática, desencadeando em alguns casos, a morte do indivíduo (Campos & Vasconcelos, 2010) e ainda pode promover um descontrole da divisão celular levando a promoção tumoral (Prieto et al., 2006).

Alguns estudos também atribuem à MC a capacidade de gerar estresse oxidativo (Jos et al., 2005), devido ao aumento da geração de espécies reativas de oxigênio

(ERO) (Li et al., 2003; Weng et al., 2007) e de lesões oxidativas, como peroxidação lipídica (LPO) (Pinho et al., 2005; Dewes et al., 2006) e danos na molécula do DNA (Zegura et al., 2003; Zegura et al., 2006; Zegura et al., 2008). As ERO são combatidas pelo sistema de defesa antioxidante, que nos organismos aquáticos é representado principalmente pelas enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR), e por antioxidantes não enzimáticos, como o dissulfeto de glutathione (GSH) (Livingstone, 2001). Quando a defesa antioxidante não é suficiente para combater as ERO, ou estas se encontram em grande quantidade, elas podem desencadear lesões oxidativas, como danos nos lipídeos de membrana e no DNA.

Além desses biomarcadores de estresse oxidativo, a avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) também é considerada uma ferramenta bastante valiosa, pois através dela também pode-se averiguar os efeitos que os contaminantes são capazes de promover nos organismos (Ferrari et al., 2007). Carbamatos e organofosforados, por exemplo, são anticolinesterásicos (Ferrari et al., 2007) e uma vez inibida a AChE, algumas funções fisiológicas podem ficar comprometidas como a localização de presas, fuga do predador, orientação para o encontro de alimentos, equilíbrio, apetite e comportamento reprodutivo (Breteau et al., 2000; Dutta & Arends, 2003; Santos Miron et al., 2005).

Alterações nos parâmetros bioquímicos e genéticos de diferentes espécies expostas à MC vêm sendo retratado na literatura. Cazenave e colaboradores (2006) encontraram, no fígado e nas brânquias, diferenças significativas na enzima de detoxificação de fase II (GST), nos antioxidantes enzimáticos (GPx, GR e CAT) e ainda LPO após a exposição de *Corydoras paleatus* a diferentes concentrações de MC-LR. Jos e colaboradores (2005) após a exposição de tilápias (*Oreochromis* sp.) à células de cianobactérias contendo MC, observaram indução da defesa antioxidante e aumento da LPO, sendo o fígado o órgão mais afetado, seguido pelo rim e pela brânquia. Zegura e colaboradores (2003) comprovaram, por meio da exposição de células do hepatoma humano HepG2 a MC-LR, que esta cianotoxina é capaz de promover, de forma indireta, danos oxidativos no DNA. Todavia, os efeitos da MC, mais especificamente a do tipo LR (MC-LR), em peixes dulciaquícolas neotropicais, ainda é escasso. Sendo assim, este trabalho teve por finalidade avaliar, de forma integrada, as variações nos parâmetros bioquímicos e genéticos de uma espécie de peixe neotropical, o *Prochilodus lineatus*, após a exposição ao liofilizado de MA, contendo MC-LR.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Animais

Juvenis de *Prochilodus lineatus* com $16,42 \pm 0,78$ g (média $\pm$ EP, n =84), fornecidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina, foram aclimatados por uma semana em tanques de 300 L, contendo água desclorada e aerada (temperatura: 21,08° C, pH: 6,92, condutividade: $110,80 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, oxigênio dissolvido: $8,52 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$) e com fotoperíodo de 12 h:12 h. Neste período, os animais foram alimentado com ração comercial a cada 48 h, e 48 h antes do início dos testes de toxicidade e durante os testes a alimentação foi suspensa. Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina.

4.2.2 Preparo do Liofilizado de *Microcystis Aeruginosa* e dos meios de Exposição

Porções liofilizadas de *Microcystis aeruginosa* (MA), cepa NPLJ-4, fornecidas pelo professor doutor Alessandro Minillo, pertencente à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus Ilha Solteira, foram maceradas, pesadas e posteriormente preparadas soluções com água destilada, com concentração de 1 e $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, para serem diluídas nos aquários onde os peixes foram expostos. Antes da exposição, as soluções passaram por três fases de congelamento e descongelamento, a fim de que as possíveis cianotoxinas fossem liberadas. Após as exposições, alíquotas de água foram coletadas para a quantificação da microcistina do tipo LR (MC-LR) por meio de ensaio imunoenzimático em leitora de microplacas, por meio do kit Beacon, específico para MC-LR.

4.2.3 Testes de Toxicidade

Para a realização dos testes de toxicidade os peixes foram distribuídos em aquários de 100 L (8 peixes por aquário) contendo água desclorada e continuamente aerada. Os animais foram expostos às diferentes concentrações do material liofilizado de MA (1 ou $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) ou somente a água (controle), durante 24 e 96 h, sendo os experimentos independentes. Os grupos controles, assim como, os grupos experimentais, foram amostrados

simultaneamente e todos os experimentos foram feitos em duplicata. Os seguintes parâmetros da água foram monitorados durante os experimentos: temperatura, oxigênio dissolvido (OD), condutividade e pH.

4.2.4 Amostragem

Imediatamente após serem retirados dos aquários, os peixes foram anestesiados em benzocaína 5% %, por no máximo 2 min., para a coleta de amostra de sangue pela veia caudal (Cavalcante et al., 2008; Pereira Maduenho e Martinez, 2008). As amostras de sangue foram armazenadas em gelo para a realização do ensaio do cometa. Após os animais serem pesados, medidos e mortos por secção medular, foram retirados as brânquias, fígado, cérebro e músculo, que foram mantidos congelados a -80°C até o momento dos ensaios bioquímicos (Simonato et al., 2008; Modesto e Martinez, 2010a, 2010b). Quatro arcos brânquias foram separados para as análises bioquímicas e os outros quatro arcos restantes, foram utilizados para as análises genéticas.

4.2.5 Análises Bioquímicas

As análises bioquímicas foram feitas com as amostras de brânquias, fígado, cérebro e músculo. Os tecidos foram pesados e homogeneizados (5x o volume para as brânquias e 10x o volume para o fígado, cérebro e músculo) em tampão fosfato de K (0,1 M), pH 7,0 para as brânquias e fígado e pH 7,5 para o cérebro e músculo. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados (20 min, 13.200 g , 4°C) e os sobrenadantes foram separados para os ensaios enzimáticos. Com as brânquias e o fígado foi analisada a atividade da CYP1A, por meio da atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD), da GST, SOD, CAT, GPx e GR, o conteúdo de GSH e a ocorrência de peroxidação lipídica (LPO), por meio do ensaio TBARS. Com o cérebro e o músculo foi avaliada a atividade da enzima AChE.

4.2.5.1 Enzimas de biotransformação

A indução da CYP1A foi determinada pela análise da atividade da EROD, estimada pela taxa de conversão da 7-etoxiresorufina em resorufina, seguindo-se o protocolo de Eggens e colaboradores (1992), com modificações. A reação foi iniciada pela adição da amostra (sobrenadante da brânquia ou de fígado) na mistura reativa (tampão fosfato de K

0,1M; pH 7,6: NADPH 2 mM e 0,1 mM 7-etoxiresorufina). O aumento progressivo da fluorescência, resultante da formação de resorufina, foi medida a cada minuto, durante 10 minutos para o fígado e 20 minutos para a brânquia (excitação: 530 nm e emissão: 590 nm). A porção inicial linear da curva foi utilizada para avaliar a taxa de reação e a atividade da EROD foi expressa em $\text{pmol de resorufina} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$, baseada em uma curva padrão de resorufina. A atividade da GST foi determinada seguindo-se a complexação da glutathiona reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), em 340 nm (Keen et al., 1976), expressa em $\text{nmol CDBN conjugado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

4.2.5.2 Antioxidantes enzimáticos

A atividade da SOD foi determinada pela medida da inibição da taxa de redução do citocromo c pelo $\text{O}_2^{\bullet -}$ oriundo do sistema xantina/xantina oxidase, em 550 nm de acordo com McCord e Fridovich (1969). A atividade desta enzima foi expressa em U de $\text{SOD} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. Uma unidade (U) de SOD representa a quantidade de enzima necessária para produzir 50% de inibição da taxa de redução do citocromo c. A atividade da CAT foi determinada seguindo-se a velocidade de decomposição do H_2O_2 , através do decréscimo de absorbância em 240 nm (Beutler, 1975). A atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ metabolizado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. A atividade da GPx selênio-dependente foi determinada pelo método de Hopkins e Tudhope (1973), baseado na oxidação do $\text{NADPH} + \text{H}^+$ em presença de H_2O_2 , em 340 nm. A atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{mol NADPH oxidado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. A GR foi determinada indiretamente pela redução do NADPH mediante a presença da glutathiona oxidada (GSSG) (Carlberg & Mannervik, 1975), em 340 nm. A atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{mol NADPH oxidado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

4.2.5.3 Conteúdo de GSH

A concentração de GSH foi determinada de acordo com o método de Beutler e colaboradores (1963). Nas amostras foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) (1:1 v/v com TCA 6 %). Após centrifugação (1.200 g) foi adicionado tampão fosfato de potássio

0,1 M, pH 7,0, e DTNB 2,5 mM (5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico) formando o ânion tiolato, determinado em 412 nm. O conteúdo de GSH foi expresso em μg de GSH.mg de proteína⁻¹, a partir de uma curva padrão de 10 a 200 μM de GSH.

4.2.5.4 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi estimada através da quantificação do malondialdeído (MDA) que corresponde a um dos produtos finais da LPO, por meio do ensaio TBARS, seguindo-se a metodologia de Federici e colaboradores (2007). Em resumo, a determinação do MDA foi quantificada pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em 530 nm. A LPO foi expressa em equivalentes de MDA, como μmol MDA.mg de proteína⁻¹, usando uma curva padrão de MDA.

4.2.5.5 Atividade da acetilcolinesterase

A atividade da AChE foi determinada com base no método calorimétrico de Ellman e colaboradores (1961) adaptado para leitura em microplaca, de acordo com Alves Costa e colaboradores (2007). A atividade da enzima foi determinada através da quantificação do produto da reação da acetilcolina com o DTNB, em 415 nm. A atividade da enzima foi expressa em nmol de DTNB. min^{-1} .mg de proteína⁻¹.

4.2.5.6 Concentração de proteína

A concentração de proteína foi determinada de acordo com a metodologia de Lowry e colaboradores (1951) utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 700 nm. Os dados das concentrações de proteínas foram utilizados para a normalização de todos os outros dados anteriormente obtidos.

4.2.6 Análise de Danos no DNA – Ensaio do Cometa

Para o ensaio do cometa, as células precisam estar dissociadas. Para tanto, os arcos branquiais passaram por algumas etapas. Primeiramente, as brânquias foram limpas com salina (PBS: NaCl 126,6 mM, KCL 4,8 mM, CaCl 1,5 mM, NaHCO₃ 3,7 mM, Na₂HPO₄

8,9 mM, NaH_2PO_4 2,9 mM) e seus filamentos foram armazenados em 700 μL de solução salina para posterior suspensão celular, sendo esta baseada no protocolo descrito por Kilemade e colaboradores (2004), com modificações. Posteriormente, os filamentos foram seccionados e o material resultante foi colocado em um tubo de micro-centrífuga, onde foi acrescido 300 μL de tripsina a 0,25% (0,125 g de tripsina em pó + 50 mL de H_2O + 0,5 mL de EDTA 0,5M), para a dissociação celular. Para cessar esta etapa, 300 μL de soro bovino fetal foi acrescentado. Por fim, a solução foi filtrada obtendo-se assim as células em suspensão que foram utilizadas no ensaio do cometa. No caso do sangue, alíquotas de 10 μL de sangue foram transferidas para microtubos contendo 700 μL de salina. Antes do ensaio do cometa foi avaliada a integridade das células sanguíneas e branquiais usando o método de exclusão de células pelo corante azul de Trypan 1% (1 g de tripan em 100 mL de salina). De cada animal foram contadas 100 células, sendo consideradas viáveis amostradas com células sanguíneas ou branquiais com, pelo menos, 80% de viabilidade.

O ensaio do cometa foi realizado com células sanguíneas e branquiais. O ensaio para sangue teve como base a metodologia descrita por Singh e colaboradores (1988), com modificações descritas por Vanzella e colaboradores (2007) e para brânquias teve como base a metodologia descrita por Cavalcante e colaboradores (2008). Para as análises foram seguidos os seguintes passos: (a) 10 μL de cada solução contendo as células em suspensão foram misturados com 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% (100 mg em 20 mL PBS), sendo em seguida colocados em lâminas de vidro previamente cobertas com agarose normal 1,5% (300 mg em 20 mL PBS); (b) as lâminas foram cobertas com lamínulas, permanecendo na geladeira por 30 min; (c) as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram colocadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1 mL Triton X-100, pH 10,0) por, no mínimo, 1 h; (d) em cubas de eletroforese, as lâminas foram colocadas em solução tampão (0,3 N NaOH/1 mM EDTA, pH > 13) por 30 min., em gelo e no escuro; (e) eletroforese: 20 min, 300 mA, 25 V, 1 V cm^{-1} ; (f) neutralização: 3 lavagens, a cada 5 min., com tampão (0,4 M Tris, pH 7,5); (g) fixação das lâminas com etanol por 10 min.; (h) estocagem das lâminas em refrigerador até a leitura das mesmas.

Para a leitura em microscópio de fluorescência (objetiva 100X), as lâminas foram coradas com gel red, da marca Biotium. Para cada animal foi feito duas lâminas e as mesmas foram codificadas a fim de ter um teste cego, sendo analisadas 100 células por lâminas. De acordo com Kobayashi et al. (1995), os danos no DNA foram classificados considerando-se o tamanho da cauda do cometa, em 4 classes: classe 0 = sem dano aparente;

classe 1 = cauda curta menor que o diâmetro do núcleo; classe 2 = comprimento da cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do núcleo; classe 3 = comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do núcleo. A partir dessa classificação foi calculado o escore de danos no DNA para cada tecido, de cada indivíduo, pela soma do valor da multiplicação do número de nucleóides encontrados em cada classe pelo valor da classe. Também foi calculado o número de nucleóides danificados através da soma do total de nucleóides encontrados nas classes 1, 2 e 3.

4.2.7 Análise Estatística

As diferenças entre os grupos controles e experimentais de cada exposição e para cada tempo, testes independentes, foram comparados entre si utilizando-se teste estatístico paramétrico t de Student's ou o teste não paramétrico de Mann-Whitney, dependendo da distribuição dos dados. Foram considerados valores significativos de $p \leq 0,05$.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Parâmetros da Água

Durante os experimentos, os parâmetros da água mantiveram-se constantes, sendo encontrado para o grupo controle e os grupos experimentais (média $\pm$ EP), respectivamente, os seguintes valores de temperatura: $21,79 \pm 1,43$ e $21,54 \pm 1,96^\circ \text{C}$; OD: $8,32 \pm 0,43$ e $7,86 \pm 0,20 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$; condutividade: $97,17 \pm 7,82$ e $94,33 \pm 4,67 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ e pH: $7,24 \pm 0,22$ e $7,04 \pm 0,33$. A concentração de MC-LR nos meios de exposição contendo 1 e 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ do liofilizado de MA foi de 0,9 e 1,9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de MC-LR, respectivamente.

4.3.2 Enzimas de Biotransformação

Os peixes expostos à MA, em relação aos seus respectivos controles, não apresentaram nenhuma diferença significativa na atividade da EROD nas brânquias após a exposição as duas concentrações do liofilizado de MA, nos dois tempos experimentais (Figura 4.1 A). Já os animais expostos a 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ do liofilizado de MA por 96 h, apresentaram

aumento significativo na atividade da EROD no fígado, em relação ao seu respectivo controle (Figura 4.1 B).

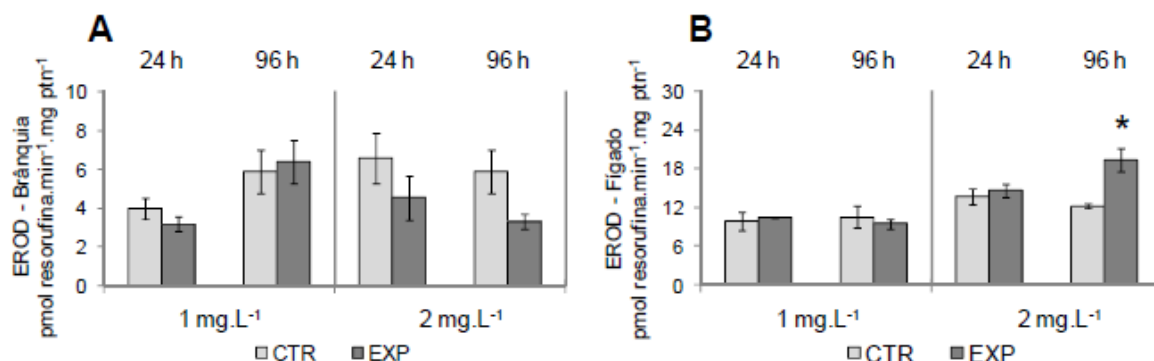


Figura 4.1 – Atividade da EROD nas brânquias (A) e no fígado (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de MA (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8). *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle ($p \leq 0,05$).

Os peixes expostos a 2 mg.L⁻¹ do liofilizados de MA apresentaram aumento significativo da GST nas brânquias nos dois tempos de exposição, em relação aos seus respectivos controles (Figura 4.2 A). A atividade da GST hepática aumentou significativamente apenas nos peixes expostos por 24 h à menor concentração do liofilizado de MA (Figura 4.2 B).

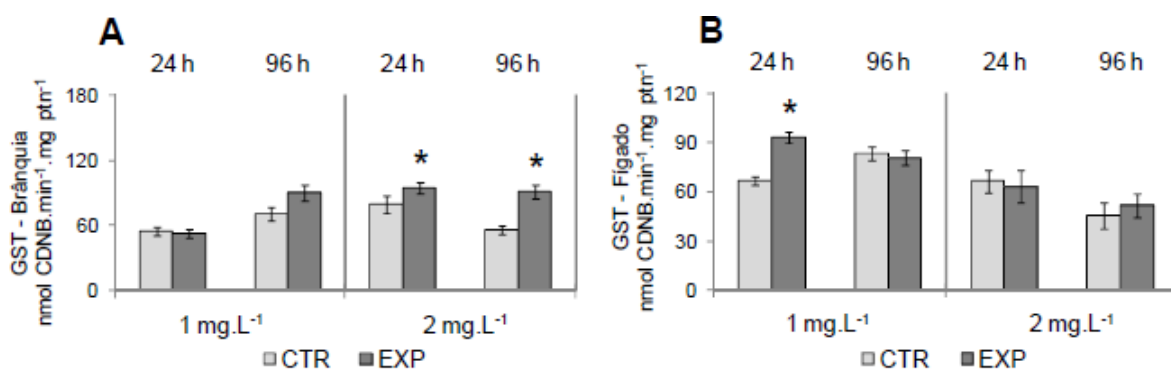


Figura 4.2 – Atividade da GST nas brânquias (A) e no fígado (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de MA (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8). *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle ($p \leq 0,05$).

4.3.3 Enzimas Antioxidantes

A atividade da SOD nas brânquias dos peixes expostos às duas concentrações do liofilizado de MA não apresentou variação significativa, em relação aos respectivos grupos controles, em nenhum tempo de exposição (Figura 4.3 A). Após 24 h de exposição a 1 mg.L^{-1} do liofilizado de MA, os animais apresentaram aumento significativo na atividade branquial da CAT e da GPx em relação aos respectivos controles (Figuras 4.3 B e 4.3 C). A GPx branquial também se mostrou aumentada significativamente após 96 h de exposição à concentração de 2 mg.L^{-1} do liofilizado de MA (Figura 4.3 C). Em relação à GR, foi observado um aumento significativo da sua atividade branquial após 96 h de exposição em ambas as concentrações do liofilizados de MA, em relação aos seus respectivos controles (Figura 4.3 D).

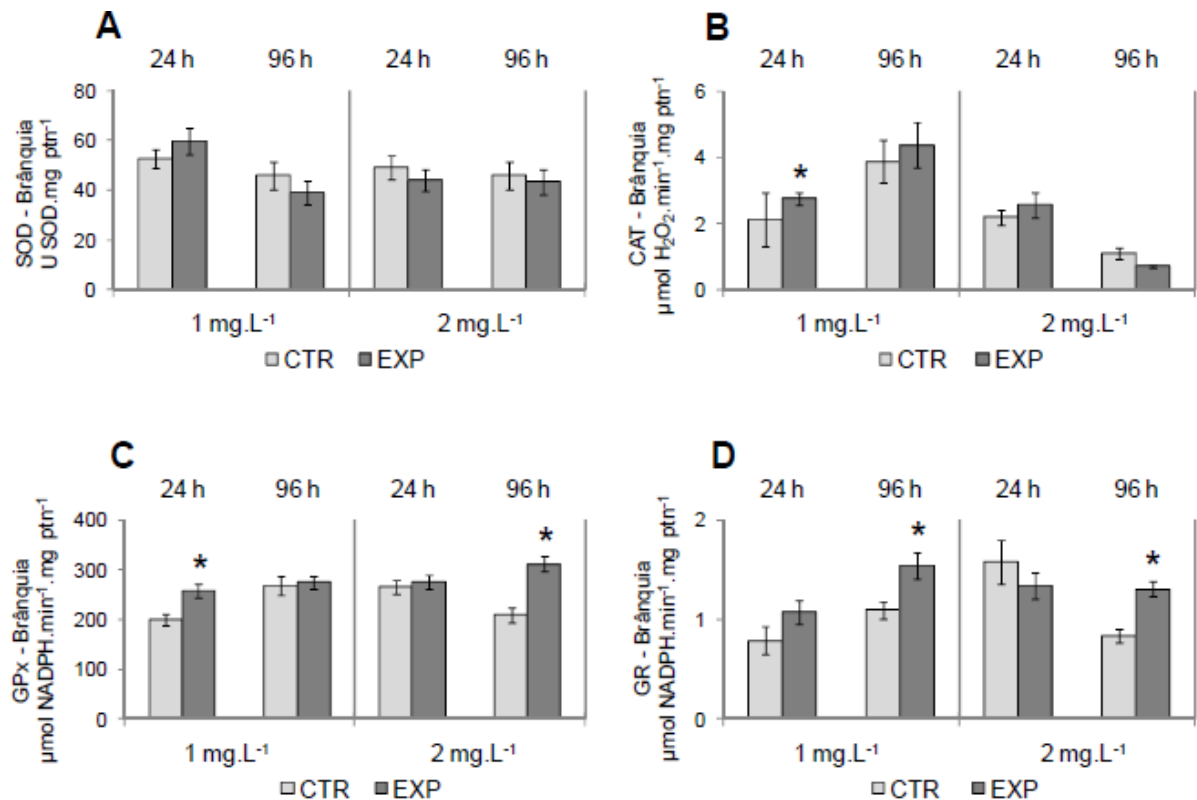


Figura 4.3 – Atividade da SOD (A), da CAT (B), da GPx (C) e da GR (D) nas brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L^{-1} do liofilizado de MA (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n:8). *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle ($p < 0,05$).

Após 96 h de exposição a 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de MA, a atividade hepática da SOD aumentou significativamente em relação ao seu respectivo controle (Figura 4.4 A). A atividade hepática da CAT aumentou significativamente após 24 h de exposição a 1 mg.L⁻¹ do liofilizado de MA; entretanto, após 96 h de exposição a ambas concentrações do liofilizado de MA, ocorreu a diminuição significativa da atividade da CAT no fígado, em relação aos respectivos controles (Figura 4.4 B). Quanto a atividade hepática da GPx e da GR, não foram observadas alterações significativas após a exposição ao liofilizado de MA (Figuras 4.4 C e 4.4 D).

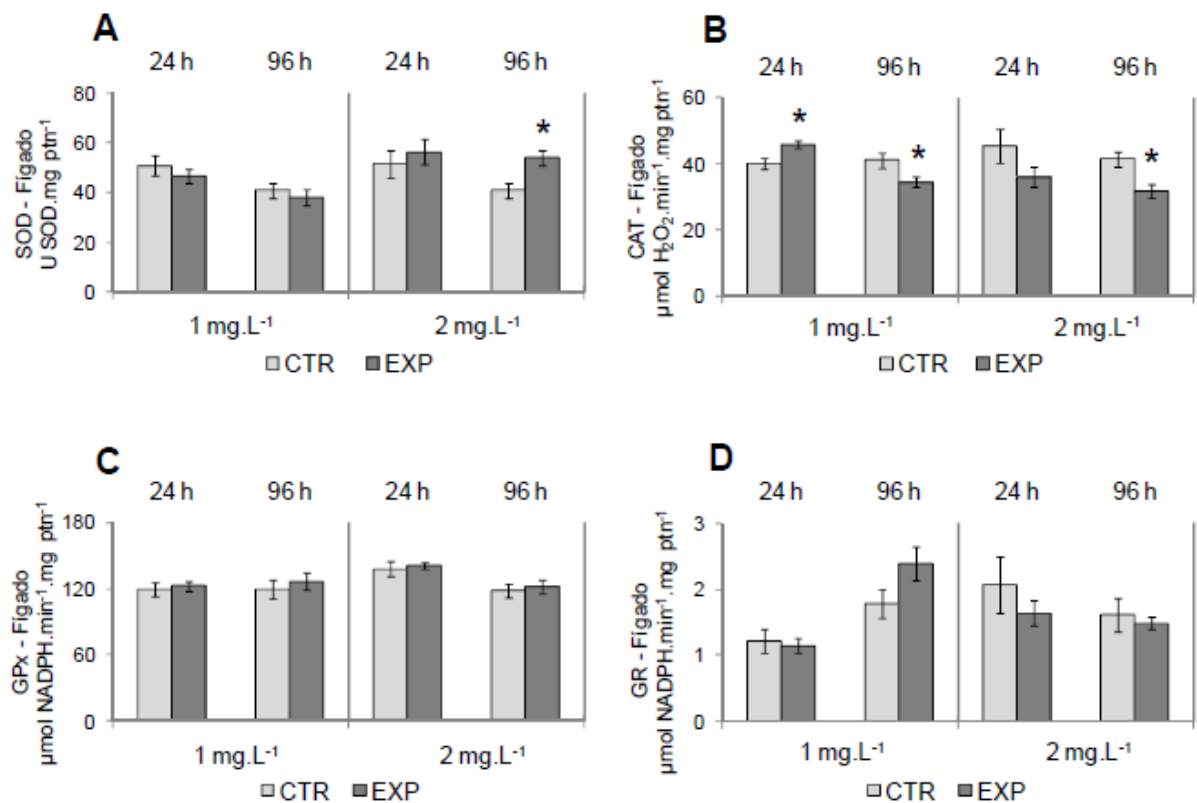


Figura 4.4 – Atividade da SOD (A), da CAT (B), da GPx (C) e da GR (D) no fígado de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de MA (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8). *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle ($p \leq 0,05$).

4.3.4 Conteúdo de GSH

Nas brânquias dos peixes expostos a 1 mg.L⁻¹ do liofilizados de MA por 96 h houve diminuição significativa do conteúdo de GSH, em relação ao seu respectivo controle (Figura 4.5 A). Quanto ao fígado, houve aumento significativo da GSH após 24 h de

exposição a 1 mg.L^{-1} do liofilizado de MA e uma diminuição significativa após 96 h de exposição a 2 mg.L^{-1} do liofilizado de MA (Figura 4.5 B).

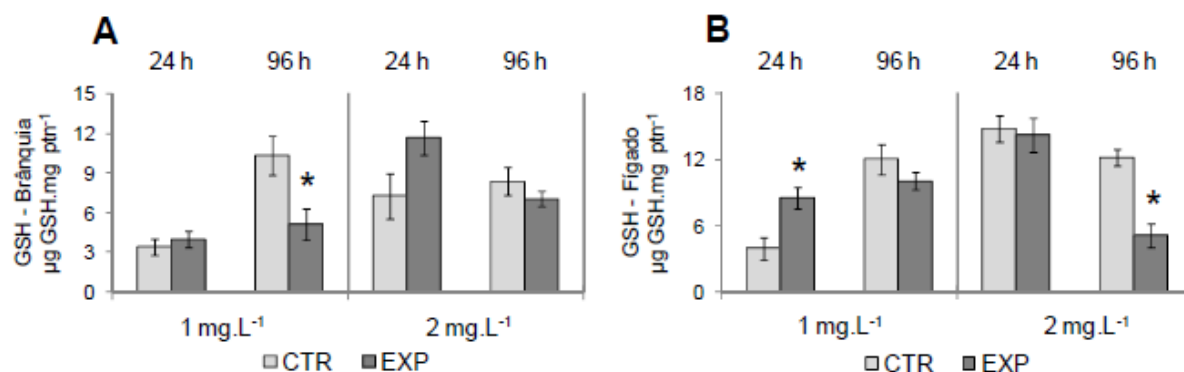


Figura 4.5 – Conteúdo de GSH nas brânquias (A) e no fígado (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L^{-1} do liofilizado de MA (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8). *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle ($p \leq 0,05$).

4.3.5 Peroxidação Lipídica (LPO)

A ocorrência de LPO foi determinada através da quantificação do MDA, pelo ensaio TBARS, e os resultados estão apresentados na Figura 4.6. Nenhuma diferença significativa, em relação aos respectivos controles, foi observada nas brânquias e no fígado dos animais expostos as diferentes concentrações do liofilizado de MA, nos dois tempos de exposição.

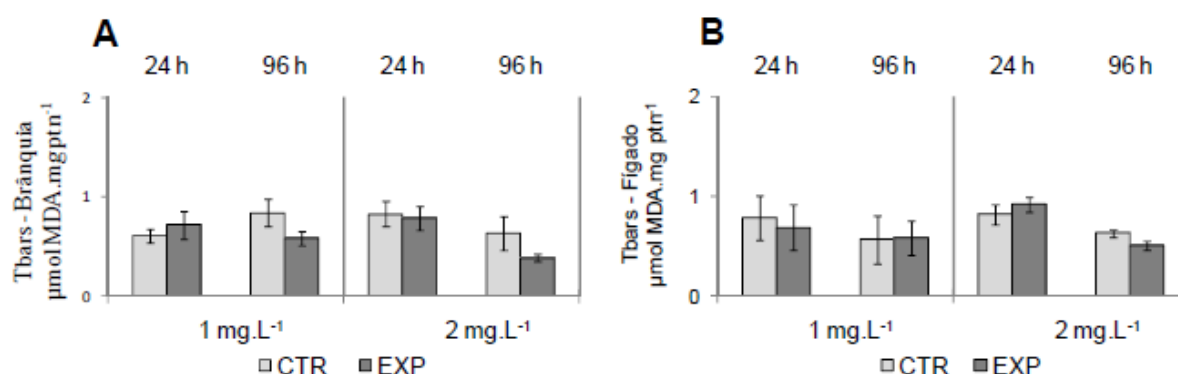


Figura 4.6 – Conteúdo de MDA nas brânquias (A) e no fígado (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L^{-1} do liofilizado de MA (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8).

4.3.6 Atividade da Acetilcolinesterase

Os resultados da atividade da enzima AChE no cérebro e no músculo dos peixes expostos ao liofilizado de MA e respectivos grupos controles pode ser visualizada na Figura 4.7. Nos dois órgãos analisados nenhuma alteração significativa foi observada na atividade da AChE após a exposição de *P. lineatus* às duas concentrações do liofilizado de MA.

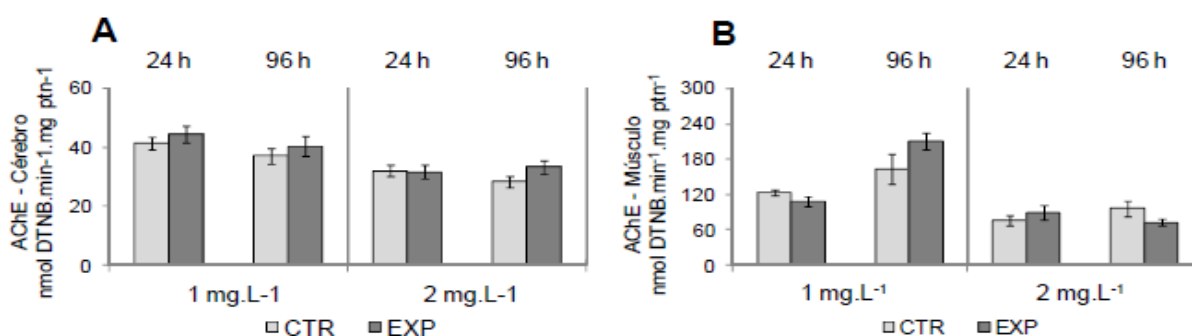


Figura 4.7 – Atividade da enzima acetilcolinesterase no cérebro (A) e no músculo (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de MA (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 8).

4.3.7 Danos no DNA

Os resultado do escore de danos do DNA, obtidos no ensaio do cometa, mostraram que apenas os eritrócitos dos peixes expostos a 1 mg.L⁻¹ do liofilizado de MA, durante 96 h, apresentaram escore de dano significativamente maior do que o respectivo grupo controle (Figura 4.8 A).

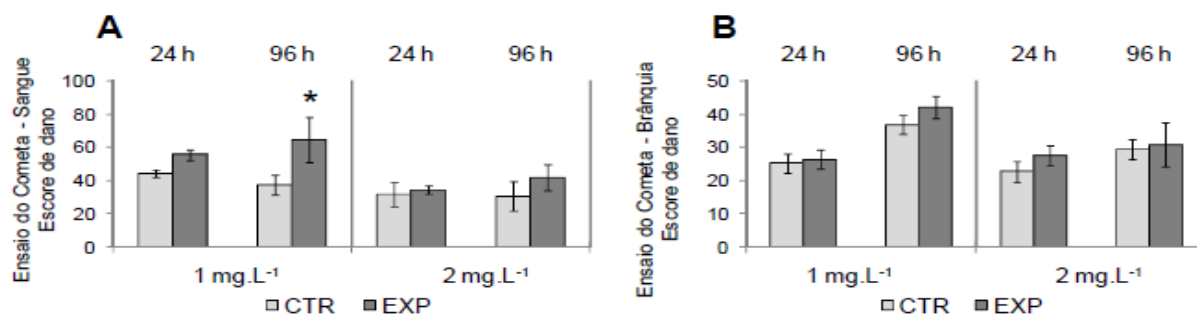


Figura 4.8 – Escores de danos em células sanguíneas (A) e branquiais (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de MA (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 4-8). *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle (p < 0,05).

Quanto a frequência e o número de nucleóides danificados nos eritrócitos (Tabela 4.1) e nas células branquiais (Tabela 4.2), foi observado aumento significativo de nucleóides danificados apenas nos eritrócitos após 96 h de exposição dos peixes a 1 mg.L⁻¹ do liofilizado de MA. A maior parte destes eritrócitos apresentaram danos de classe 0 (60%) e classe 1 (37%) e uma pequena incidência de danos de classe 2 (3%) e classe 3 (0,07%). Para as células das brânquias foi encontrado maiores danos de classe 0 (72%) e classe 1 (27%) e menores porcentagens de danos para a classe 2 (1%) e classe 3 (0,1%).

Tabela 4.1 – Frequência média de nucleóides danificados observados em cada uma das classes do Cometa (0, 1, 2 e 3) e número de nucleóides danificados (média ± EP) nos eritrócitos de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de MA (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h.

Tecido	Tempo	Grupo	Classes de danos					Nucleóides danificados
			N	0 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)	
Eritrócitos	24 h	CTR	6	54,25	43,25	2,50	0,00	43,00 ± 2,08
		1 mg.L ⁻¹	6	54,63	40,25	5,13	0,00	49,67 ± 3,40
	96 h	CTR	5	61,17	35,00	3,50	0,33	35,80 ± 4,57
		1 mg.L ⁻¹	6	47,86	44,00	7,86	0,29	55,17 ± 8,30*
	24 h	CTR	8	68,38	31,38	0,25	0,00	31,63 ± 7,30
		2 mg.L ⁻¹	5	72,00	28,00	0,00	0,00	34,40 ± 2,46
	96 h	CTR	5	54,29	45,71	0,14	0,00	30,60 ± 8,79
		2 mg.L ⁻¹	7	68,20	31,70	0,10	0,00	41,71 ± 7,68

(n: 5-8). *: indica diferença significativa em relação ao respectivo controle ($p \leq 0,05$).

Tabela 4.2 – Frequência média de nucleóides danificados observados em cada uma das classes do Cometa (0, 1, 2 e 3) e número de nucleóides danificados (média $\pm$ EP, n: de 5 a 8) nas células branquiais de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de MA (EXP) ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h.

Tecido	Tempo	Grupo	Classes de danos					Nucleóides danificados
			N	0	1	2	3	
				(%)	(%)	(%)	(%)	
Células Branquiais	24 h	CTR	5	67,38	32,63	0,00	0,00	25,20 ± 2,83
		1 mg.L ⁻¹	7	74,38	25,38	0,00	0,00	26,43 ± 2,79
	96 h	CTR	7	66,00	30,38	3,63	0,00	34,14 ± 2,14
		1 mg.L ⁻¹	5	71,57	23,29	4,43	0,86	35,40 ± 1,72
	24 h	CTR	7	79,25	20,50	0,25	0,00	22,43 ± 3,15
		2 mg.L ⁻¹	6	75,00	24,71	0,29	0,00	27,33 ± 2,84
	96 h	CTR	5	66,43	32,57	1,00	0,00	29,40 ± 3,04
		2 mg.L ⁻¹	6	76,33	23,17	0,50	0,00	30,00 ± 6,16

4.4 DISCUSSÃO

Há na literatura uma gama de trabalhos que retratam os efeitos tóxicos que as diferentes isoformas de MC são capazes de promover em diversos órgãos de diferentes espécies. Isso ocorre devido a vários fatores envolvidos, como: diferentes tipos de exposição (na água, alimentação ou injeção intraperitoneal (i.p.)), tempo de exposição, concentração de exposição, sensibilidade do organismo, estado nutricional e fisiológico em que o organismo se encontra e também devido às diferentes espécies.

Os resultados obtidos após a exposição do *P. lineatus* às diferentes concentrações do liofilizado de MA, contendo MC-LR, em diferentes tempos de exposição, sustentam a ideia de que a MC-LR presente neste material foi capaz de promover alteração em alguns dos parâmetros analisados. Neste ponto o trabalho mostra uma grande relevância já que algumas das alterações observadas foram encontradas após a exposição ao liofilizado de MA contendo 0,9 µg.L⁻¹ de MC-LR e esta concentração é muito próxima da legislação

permitida ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$ para água potável) (WHO, 1998), demonstrando assim que o limite de microcistina para a água potável, permitido pela OMS, não é tão eficaz assim.

Após a exposição às duas concentrações do liofilizado de MA pode-se verificar que a MC-LR presente neste material foi capaz de promover ativação da via de biotransformação, assim como, desencadear respostas variadas na capacidade antioxidante enzimática e não enzimática desta espécie de peixe. A ativação das defesas antioxidantes nos animais expostos a MA parece ter sido suficiente para evitar LPO, entretanto pode não ter sido suficiente para evitar os danos no DNA, observados nos eritrócitos dos peixes expostos a MA, durante 96 h. Quanto a atividade da enzima AChE, não foi observado diferença significativa no seu nível basal, tanto no cérebro, como no músculo.

Uma vez absorvida, as MCs são distribuídas em diferentes órgãos onde podem ser biotransformadas. Neste processo, compostos lipofílicos são convertidos em hidrofílicos e compostos tóxicos, em uma forma menos tóxica, para que assim eles possam ser mais facilmente eliminados (Van der Oost et al., 2003; Cazenave et al., 2006). Este processo de detoxificação pode ocorrer em duas fases, sendo a fase I mediada pelas enzimas da família do citocromo P450, sendo que em peixes, a principal enzima envolvida neste processo é a subfamília CYP1A, e na fase II, a enzima mais importante é a GST. Embora tenha sido encontrada ativação da CYP1A, quantificada por meio da EROD, no fígado no maior tempo de exposição, na maior concentração (Figura 4.1 B), isso não é um fenômeno normalmente verificado após a exposição aos diferentes tipos de MCs. Wang e colaboradores (2006) após a exposição (i.p.) de tilápias, *Oreochromis niloticus*, a MC-LR não observaram nenhuma mudança no nível da CYP1A, quantificada por meio da expressão do mRNA do citocromo P450 1A. Apesar de estudos prévios demonstrarem que o processo de detoxificação da MC ocorre por meio da conjugação com a GSH, via GST (Pflugmacher, et al., 1998), esta é uma área que merece mais estudos, uma vez que alguns trabalhos recentes estão mostrando ativação da primeira fase, como observado neste trabalho e em outro trabalho realizado no nosso laboratório após a exposição a florações naturais de cianobactérias, e também no realizado por Pasková e colaboradores (2008).

Kondo e colaboradores (1996) demonstraram que a conversão da MC em um composto mais polar, geralmente ocorrendo no fígado, está correlacionada com a depleção no pool da glutatona (GSH), que corresponde a um co-fator para a atividade da enzima GST, que faz parte da fase II do processo de biotransformação. Pflugmacher e colaboradores (1998) foram os primeiros a descrever a formação do conjugado MC-GSH em uma reação catalisada pela GST, sendo este conjugado considerado como a primeira via de

detoxificação de cianobactérias tóxicas. De fato, a conjugação da MC com a GSH, via GST, poupa a ocorrência de danos aos tecidos (Ding et al., 2000), pois evita que este xenobiótico entre em contato com outras partes do organismo, ou ainda, reaja com outras substâncias internas, protegendo-o assim da ocorrência dos efeitos tóxicos gerados pela MC após o contato com a mesma (Pinho et al., 2005). No presente estudo, a atividade da GST apresentou-se aumentada nas brânquias e no fígado, demonstrando assim a alta capacidade de detoxificação de curimbas expostos a MC. Pinho e colaboradores (2003) também encontraram a atividade da GST aumentada em *Neohelice granulatus* (Decapoda, Grapsidae) após a ingestão oral forçada de $176 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC.

Segundo a literatura, o órgão mais relacionado com os processos de biotransformação é o fígado (Van der Oost et al., 2003). Porém, atualmente, alguns autores vêm sugerindo outros órgãos como detoxificadores, destacando-se as brânquias, rim e o intestino (Jönsson et al., 2002; Abrahamson et al., 2007; Jönsson et al., 2009). Neste trabalho podemos observar que não só o fígado, mas também as brânquias apresentaram-se como órgãos detoxificadores da MC.

Após a exposição à MC pode ocorrer a formação de ERO, que se não forem adequadamente combatidas pela defesa antioxidante, pode se instalar o estresse oxidativo, resultando na oxidação de proteínas, LPO, danos na molécula de DNA e até mesmo a morte celular (Atencio et al., 2008). Diversos estudos têm demonstrado que a MC induz a produção de ERO (Ding et al., 2001; Li et al., 2003; Weng et al., 2007). Estas devem ser combatidas pela defesa antioxidante do animal, sendo que a SOD, CAT, GPx e GR fazem parte da maior sistema de defesa antioxidante enzimático contra as ERO (Van der Oost et al., 2003; Cazenave et al., 2006).

A SOD e a CAT fazem parte das enzimas primárias da via antioxidante. A SOD catalisa o $\text{O}_2^{\bullet -}$ em O_2 e H_2O_2 , sendo este último detoxificado pela CAT (Van der Oost et al., 2003). Normalmente uma indução simultânea dessas duas enzimas é observada quando ocorre a exposição a contaminantes (Pandey et al., 2003; Atencio, 2008), porém neste trabalho, as respostas destas duas enzimas apresentaram-se bastante variadas.

Variação na atividade destas enzimas expostas a MC não é difícil de ocorrer e diversos são os trabalhos que mostram a atividade destas enzimas variando. Jos e colaboradores (2005) observaram aumento significativo na atividade da SOD e da CAT no fígado de *Oreochromis* sp, porém na brânquia, foi observado aumento significativo apenas da SOD. Em alguns casos, pode-se encontrar também a atividade dessas enzimas diminuídas, como foi encontrado por Atencio e colaboradores (2008) no fígado de *Tinca tinca*.

No presente trabalho, a indução da CAT hepática e branquial após 24 h de exposição a 1 mg.L^{-1} do liofilizado de MA sugere um aumento na concentração do H_2O_2 , devido a alta especificidade desta enzima em detoxificar essa ERO; além disso, quanto maior for a concentração desta espécie reativa, maior será a atividade da CAT, sendo que baixas concentrações do H_2O_2 são controladas pela GPx (Hermes-Lima, 2004). Ding e colaboradores (2001) e Botha e colaboradores (2004) comprovaram que após a exposição de duas linhagens celulares diferentes à MC-LR ocorre o aumento do H_2O_2 o que leva a danos no citoesqueleto das células e apoptose, respectivamente. O aumento na atividade da CAT é de grande valia para o animal, uma vez que ao detoxificar essa espécie reativa, ela diminui o substrato (H_2O_2) para a reação de Fenton, evitando assim a ocorrência de LPO e danos ao DNA, ao evitar a produção do $\bullet\text{OH}$ (Hermes-Lima, 2004; Bagnyukova et al., 2006). Sendo assim, podemos observar que o animal está tentando combater o H_2O_2 gerado após a exposição à microcistina.

Entretanto, apesar da indução, foi observado também uma queda na atividade da CAT hepática após 96 h de exposição ao liofilizado de MA. Assim como as ERO podem ativar a atividade enzimática, elas também podem desencadear a sua inibição, sendo que este processo pode ser promovido tanto pelo excesso do oxidante, como quanto pelo excesso seu próprio substrato. A SOD, por exemplo, pode ser inibida pelo excesso de H_2O_2 e a CAT pelo $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Pandey et al., 2003; Bagnyukova et al., 2006). Como na exposição a 1 mg.L^{-1} do liofilizado de MA em 96 h não houve ativação da SOD, nós podemos inferir que a CAT foi inibida devido ao excesso do $\text{O}_2^{\bullet-}$. Porém, para o mesmo tempo experimental, só que na concentração de 2 mg.L^{-1} do liofilizado de MA nós não podemos fazer a mesma afirmação, já que a SOD apresentou-se aumentada significativamente. Entretanto, estudos prévios demonstraram que o $\text{O}_2^{\bullet-}$ não é o único capaz de promover a inativação da CAT, mas também o oxigênio “singlet” e os radicais peroxil (Pinho et al., 2005). Assim sendo, podemos inferir que essas outras duas espécies reativas podem ter sido as responsáveis pela diminuição da atividade da CAT após 96 h de exposição à maior concentração de MA. Quanto a CAT branquial, podemos verificar que o aumento na sua atividade reflete o efeito da MC com a capacidade de gerar ERO, como H_2O_2 , já que esta espécie reativa não foi formada pela SOD, uma vez que a atividade desta enzima não se mostrou alterada significativamente neste órgão.

O aumento na atividade da GPx neste trabalho só foi verificado nas brânquias. Já no fígado não foi observado nenhuma alteração significativa, o que contradiz alguns trabalhos nos quais geralmente se observa aumento significativo desta enzima, após a exposição à microcistina. Jos e colaboradores (2005) e Cazenave e colaboradores (2006) verificaram aumento significativo da GPx no fígado de *Oreochromis* sp após exposição de 21

dias a MCLR e no fígado de *Corydoras paleatus* após 24 h de exposição a MC-RR, respectivamente, e ainda, nestes mesmos trabalhos, foi observado uma diminuição significativa da GPx nas brânquias desses animais. Li e colaboradores (2003) e Li e colaboradores (2005) também verificaram aumento na atividade da GPx no fígado de *Cyprinus carpio* e de *Misgurnus mizolepis* após a exposição de hepatócitos *in vitro* a MC-LR e exposição oral a MC-RR, respectivamente. Entretanto, o aumento da GPx após a exposição aos diferentes tipos de MC não é uma regra. Outros trabalhos, como o realizado por Prieto e colaboradores (2006), após a exposição i.p. de *Oreochromis* sp a MC-LR e MC-RR, não foi verificada nenhuma alteração significativa na atividade da GPx, tanto na brânquia quanto no fígado. Todas essas diferenças encontradas podem ser devido aos diferentes tipos de sistemas experimentais, tempos de exposição, rotas e doses empregados nestes trabalhos (Prieto et al., 2006).

A GPx utiliza a GSH como co-fator para fazer a redução do H_2O_2 a água e também outros peróxidos naturais e sintéticos, reduzindo-os a alcoóis e água (Ferrante et al., 2008). O aumento na atividade da GPx nas brânquias reforça a idéia de um aumento na concentração do H_2O_2 neste órgão, provavelmente provocado pela exposição à MC. E apesar de ter ocorrido aumento da CAT branquial, é importante ressaltar que a atividade desta enzima neste órgão é ínfima, quando comparado com o fígado e pouco representativa para o animal. Sendo assim, podemos inferir que em *P. lineatus* a GPx branquial está atuando com maior intensidade na eliminação da espécie reativa do que a CAT.

A GR tem um papel importante como antioxidante dentro da célula, uma vez que ela é a responsável em catalisar a redução da GSSG para a sua forma reduzida, a GSH, necessária para a proteção da célula contra o estabelecimento de estresse oxidativo (Tekman et al., 2008). Neste trabalho foi observado um aumento na atividade da GR apenas nas brânquias após 96 de exposição ao liofilizado de MA. O aumento da atividade da GR nas brânquias está de acordo com aumento significativo da atividade da GPx no mesmo órgão, não havendo assim excesso de GSSG, já que a mesma está sendo reduzida a GSH pela GR. Stephensen e colaboradores (2000) demonstraram que peixes de lugares poluídos apresentam a atividade da GR aumentada por causa da alta concentração dos componentes peroxidativos presentes nos ambientes aquáticos. Jos e colaboradores (2005) também observaram aumento significativo da GR, só que no fígado e no rim de *Oreochromis* sp expostos a MC-LR.

A GSH está envolvida com diversas funções dentro da célula. A conversão da MC em um composto mais polar ocorre através de uma depleção no pool da glutathiona celular (Kondo et al., 1996); a GSH pode se ligar a MC, via GST, sendo esta conjugação

sugerida como a primeira via de detoxificação desta cianotoxina em organismos aquáticos (Pflugmacher et al., 1998); a GSH corresponde a primeira linha de defesa não enzimática contra as ERO; participa do processo de detoxificação sendo oxidada pela GPx e reduzida pela GR (Tekman et al., 2008); e ainda serve como um trocador para a entrada da MC na célula através dos Oatps (Amado & Monserrat, 2010).

Embora a concentração de GSH hepática possa ser considerada como um ótimo biomarcador para a exposição à MC (Atencio et al., 2008), os últimos trabalhos vêm apresentando uma variação bastante acentuada no seu nível após a exposição de peixes e de outros organismos aquáticos a esta cianotoxina. O aumento significativo deste tripeptídeo foi observado no hepatopâncreas de *Cyprinus carpio* após a exposição a MC-LR (Li et al., 2003); sua diminuição foi observada em *Hypophthalmichthys molitrix* após a exposição a um Bloom de cianobactéria (Blaha et al., 2004) e nenhuma diferença foi observada em *Tinca tinca* exposta oralmente a MC-LR (Atencio et al., 2008). No presente trabalho foi observado aumento significativo da GSH no fígado, após 24 h de exposição ao liofilizado de MA, e diminuição significativa no fígado e nas brânquias após 96 h de exposição ao liofilizado de MA.

O aumento significativo da GSH hepática após 24 h de exposição é indicativo de que o animal está tentando combater as ERO presentes no seu organismo após a exposição à MC. Além disso, esse aumento pode ser justificado pelo fato de algumas enzimas, como a GST, requererem a GSH como co-fator para a realização de suas funções. O aumento da GSH hepática em 24 h estaria então servindo como substrato para a enzima GST, que também se mostrou aumentado neste mesmo órgão, nesta mesma condição, demonstrando mais uma vez que a via de detoxificação neste animal foi ativada após a presença da MC.

A GSH pode ser produzida por duas vias diferentes: por ação da GR, ao reduzir a GSSH em GSH ou por um próprio aumento na sua síntese celular (Tekman et al., 2008). No presente trabalho, o aumento da GSH hepática se deve ao aumento na sua síntese já que não foi observado aumento significativo da GR no fígado. Todavia, na brânquia houve aumento na atividade da GR acompanhada por uma diminuição significativa na atividade da GSH. Essa diminuição significativa da GSH na brânquia, assim como também observado no fígado, após 96 h de exposição a 2 mg.L⁻¹, pode ter ocorrido por duas hipóteses. Alta concentração da toxina na célula pode ter promovido um efeito secundário, promovendo a sua inibição (Cazenave et al., 2006), ou ainda, durante a entrada da MC na célula pelos Oatps, a GSH é requerida como um trocador, diminuindo assim a sua concentração intracelular (Amado & Monserrat, 2010). Esta última hipótese é de grande valia para a cianotoxina, uma

vez que ela se beneficia por entrar na célula e ainda porque ao entrar, um dos antioxidantes que poderia combatê-la, já se encontra diminuído intracelularmente.

Como dito anteriormente, se as ERO não forem adequadamente combatidas dentro do corpo do animal, elas poderão desencadear o estresse oxidativo, promovendo LPO e danos na molécula de DNA. O uso da LPO como um biomarcador de efeito após a exposição à MC vem sendo demasiadamente utilizado, entretanto, na literatura, o seu aumento e a sua diminuição vem sendo detectado. Prieto e colaboradores (2007) observaram aumento da LPO no fígado, rim e brânquias de *Oreochromis niloticus* após a exposição ao liofilizado de células cianobacterianas, contendo MC-LR. Já Gehringher e colaboradores (2004) observaram diminuição significativa da LPO no fígado de ratos expostos (i.p.) à MC-LR. Sendo assim, o uso de tal biomarcador deve ser feito com bastante critério. Em peixes, o ensaio TBARS é um dos mais comumente utilizados e ele tem por finalidade quantificar um dos produtos finais da LPO, o MDA. Neste trabalho, a LPO foi quantificada pelo ensaio TBARS, entretanto, nenhuma diferença significativa foi observada nas brânquias e no fígado do *P. lineatus* exposto ao liofilizado de MA.

Os resultados das brânquias de *P. lineatus* mostraram um aumento significativo na atividade dos antioxidantes enzimáticos, como a CAT, GPx e GR. Podemos verificar assim que, o aumento na capacidade antioxidante destas enzimas podem ter sido suficientes para proteger o animal de injúrias nas brânquias, já que não foi detectado LPO. Vinagre e colaboradores (2003) também não observaram LPO nas brânquias de *Chasmagnathus granulatus*, um caranguejo, após a exposição (i.p.) à MC. No fígado, também foi observado aumento na atividade da SOD (96 h / 2 mg.L⁻¹) e da CAT (24 h / 1 mg. L⁻¹) e nenhuma mudança no nível de LPO foi verificado, o que corrobora com os estudos de Li e colaboradores (2005) que também tiveram aumento na atividade de alguns antioxidantes enzimáticos (SOD, CAT e GPx) e nenhuma alteração nos níveis de LPO do fígado de *Misgurnus mizolepis*, expostos oralmente a MC-RR. Os danos na molécula do DNA podem ser avaliados por meio de vários teste, porém o ensaio do cometa vem sendo o mais empregado devido a vários fatores favoráveis, dentre os quais incluem a sua simplicidade, versatilidade, por requer um pequeno número de células por amostra, ter um custo relativamente baixo e pela alta sensibilidade para vários tipos de danos no DNA (Olive & Banath, 2006). Neste trabalho, o ensaio do cometa revelou que o liofilizado de MA foi capaz de promover alterações na molécula de DNA de eritrócitos do curimba após 96 h de exposição na menor concentração.

Como inferido anteriormente, a concentração do $O_2^{\bullet -}$ deve ser alta nos hepatócitos, já que foi encontrado queda na atividade da CAT após 96 h de exposição a 1 e 2 $mg.L^{-1}$ do liofilizado de MA. A alta concentração do $O_2^{\bullet -}$ pode então ter favorecido a reação de Haber- Weiss, gerando o $\bullet OH$ como um dos seus produtos, sendo esta espécie reativa considerada como a ERO de maior toxicidade (Hermes-Lima et al., 1998). O $\bullet OH$ pode ser o responsável então pela ocorrência de danos na molécula de DNA de eritrócitos do *P. lineatus* após 96 h de exposição a 1 $mg.L^{-1}$ do liofilizado de MA. Estes resultados vão de acordo com os estudos realizados por Lakshmana Rao e colaboradores (1998) e Zegura e colaboradores (2003) onde foi comprovado que a MC foi capaz de induzir danos no DNA da cultura de células de rim de filhotes de hamster, em fibroblastos primários de embriões de ratos e em células de hepatoma humano HepG2, respectivamente. Esses dados, somando-se aos encontrados neste trabalho, comprovam as evidências de que a MC é genotóxica, sendo sugerido que a sua genotoxicidade é mediada pelas ERO (Zegura et al., 2003; Zegura et al., 2004; Zegura et al., 2006).

Um fato interessante observado foi que o maior índice de dano no DNA foi identificado na menor concentração, quando comparada com a maior concentração. Provavelmente, na maior concentração o sistema de reparo tenha atuado, não sendo encontrados danos significativos nos eritrócitos de curimbas após a exposição ao liofilizado de MA. De qualquer forma, diversos são os trabalhos que comprovam a capacidade que a MC tem em promover danos na molécula de DNA (Zegura et al., 2003; Zegura et al., 2008; Votto et al., 2007), sendo que estes danos são promovidos pelas ERO presentes na célula e não pela interação direta da MC com a molécula de DNA (Zegura et al., 2003). Isso comprova mais uma vez a nossa hipótese da geração de espécies reativas após a exposição ao liofilizado de MA, e a capacidade que estas têm de promover danos ao organismo.

A enzima AChE é responsável em hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica, e sua atividade é essencial para o bom funcionamento das funções musculares e para o comportamento normal dos animais (Ferrari et al., 2007). Em peixes, a inibição desta enzima vem sendo bastante utilizada a fim de diagnosticar a presença de xenobióticos nos ambientes aquáticos (Jee & kang, 2004). A gama de anticolinesterásicos é imensa, tendo maior destaque os pesticidas, dentre os quais se destacam os organofosforados e os carbamatos (Van der Oost et al., 2003; Ferrari et al., 2007). De modo geral, a atividade da AChE em peixes vem sendo mais avaliada no cérebro e no músculo. No peixe *P. lineatus* a atividade desta enzima pode ser inibida por diferentes tipos de inseticidas. Pereira Maduenho & Martinez (2008) observaram a inibição da atividade desta enzima no músculo de curimba

após a exposição ao inseticida Dimilin®, a base de diflubenzuron e Modesto & Martinez (2010a, 2010b), também observaram a atividade da AChE diminuída neste órgão, assim como no cérebro, após a exposição deste mesmo animal ao herbicida Roundup® e ao Roundap Transorb, ambos a base de glifosato.

Neste trabalho, a atividade da AChE não apresentou mudanças do seu nível basal no cérebro e no músculo após a exposição do curimba ao liofilizado de MA, contendo MC-LR. De acordo com os conhecimentos atuais, efetivamente, os efeitos da MC não estão associados diretamente com a atividade da AChE. Dentre as cianotoxinas, as que parecem exercer maior influência na atividade da AChE, são as do grupo das neurotoxinas, dentre as quais se destaca as anatoxinas-a(s) que atua inibindo a atividade da AChE. Monserrat e colaboradores (2001) observaram a inibição da AChE no cérebro de peixes e nos gânglios torácicos de caranguejos após a exposição, *in vitro*, ao extrato de *Anabaena spiroides*, coletada de um bloom, que continha grandes quantidades de anatoxina-a(s). Ainda esses mesmos autores sugerem que tal toxina pode ser estruturalmente similar a pesticidas orgânicos, confirmando mais uma vez a grande capacidade que certos pesticidas tem em inibir a atividade da AChE. Molica e colaboradores (2005) também expuseram (i.p.) ratos a diferentes tipo de algas isoladas de blooms de cianobactérias, coletados durante vários meses (março-maio de 2002) no reservatório de Tapacurá-Recife (BR), a fim de diagnosticar a atividade da AChE. Na exposição da cultura dominada por *A. spiroides*, produtora de anatoxina-a(s), foi encontrado inibição da AChE, já na exposição dominada por *M. aeruginosa*, nenhuma alteração na atividade desta enzima foi observada, o que corrobora com os dados encontrados neste trabalho.

Diante dos resultados encontrados neste trabalho podemos concluir que a exposição ao liofilizado de MA foi capaz de promover ativação da via de detoxificação, comprovado pelo aumento na atividade da GST nas brânquias e no fígado, e ainda foi capaz de promover alteração na capacidade antioxidante enzimática e não enzimáticas destes dois tecidos, sendo que a brânquia mostrou-se com a maior capacidade na defesa antioxidante quando comparado com o fígado. Embora não tenha sido detectado LPO nos tecidos, a defesa antioxidante não foi totalmente eficiente na eliminação das ERO geradas após a exposição a MC-LR, uma vez que foi detectado danos nos eritrócitos da espécie estudada, sugerindo a capacidade genotóxica que esta cianotoxina apresenta. Desta forma, podemos concluir que a exposição do *P. lineatus* ao liofilizado de MA, contendo MC-LR, é capaz de promover uma situação de estresse oxidativo e não foi capaz de promover alteração na atividade da AChE.

4.5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina/PR (EPUEL), pelo fornecimento de peixes e ao professor doutor Alessandro Minillo, pertencente à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Ilha Solteira, pela doação do liofilizado de MA. Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida para C. Z. Garcia e pela bolsa de pesquisador para C.B.R. Martinez, que é membro do Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Toxicologia Aquática (INCT-TA, CNPq: 573949/2008-5). Este trabalho faz parte da dissertação de mestrado de C. Z. Garcia.

Referência

- Abrahamson, A., Anderson, C., Jönsson, M.E., Fogelberg, O., Örberg, J., Brunström, B.; Brandt, I., 2007. Gill EROD in monitoring of CYP1A inducers in fish-A study in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) caged in Stockholm and Uppsala Waters. *Aquat. Toxicol.* 85, 1 - 8.
- Alves Costa, J.R.M., Mela, M., Silvia de Assis, H.C., Pelletier, E., Randi, M.F., Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 82 - 88.
- Amado, L.L., Monserrat, J.M., 2010. Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: Why and how. *Environ. Int.* 36, 226 - 235.
- Antoniou, M.G, Shoemaker, J.A, Cruz, A.A, Dionysiou, D.D., 2008. LC/MS/MS structure elucidation of reaction intermediates formed during the TiO₂ photocatalysis of microcystin-LR. *Toxicon.* 51, 1103 - 1118.
- Atencio, L., Moreno, I., Jos, A., Pichardo, S., Moyano, R., Blanco, A., Cameán, A.M., 2008. Dose-dependent antioxidant responses and pathological changes in tenca (*Tinca tinca*) after acute oral exposure to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicon.* 52, 1 - 12.
- Bagnyukova T. V., Chahrak, O. I., Lushchak V. I., 2006. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquat. Toxicol.* 78, 325 - 331.
- Beutler, E., Durom, O., Kelly, B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* 61, 882 - 890.
- Beutler, E., 1975. *Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods*. New York: Grune & Straton.
- Bláha, L., Kopp, R., Imková, K., Mares, J., 2004. Oxidative stress biomarkers are modulated in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) exposed to microcystin-producing cyanobacterial water bloom. *Acta Vet. Brno* 73, 477 - 482.
- Botha, N., Gehringer, M.M., Downinga, T.G., Venter, M., Shephardb, E.G., 2004. The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo₂ cells. *Toxicon.* 43, 85 - 92.
- Bretaud, S., Toutant, J.P., Saglio, P., 2000. Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 47, 117 - 124.
- Campos, A., Vasconcelos, V., 2010. Molecular Mechanisms of Microcystin Toxicity in Animal Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 268 - 287.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 260, 5475 - 5480.
- Cavalcante, D.G.S.M., Martinez, C.B.R., Sofia, S.H., 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat. Res.* 655, 41 - 46.

- Cazenave, J., Bistoni, M.A., Pesce, S.F., Wunderin, D.A., 2006. Differential detoxification and antioxidant response diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquat. Toxicol.* 76, 1 - 12.
- Chen, T., Cui, J., Liang, Y., Xin, X., Young, D. O., Chen, C., Shen, P., 2006. Identification of liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase as a potential target for microcystin-LR. *Toxicol.* 220, 71 - 80.
- Codd, G.A., 2000. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecol. Eng.* 16, 51 - 60.
- Dewes, L.J., Sandrini, J.Z., Monserrat, J.M., Yunes, J.S., 2006. Biochemical and physiological responses after exposure to microcystins in the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Brachyura). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 201 - 208.
- Ding, W., Shen, H., Ong, C., 2001. Critical role of ROS formation in microcystin-induced cytoskeletal disruption in primary cultured hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health.* 64, 507 - 519.
- Ding, W.X., Shen, H.M., Ong, C.N., 2000. Microcystic cyanobacteria extract induces cytoskeletal disruption and intracellular glutathione alteration in hepatocytes. *Environ. Health Perspect.* 108, 605 - 609.
- Ding, W.X., Shen, H.M., Ong, C.N., 2000. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology.* 32, 547 - 555.
- Dutta, H.M., Arends, D.A., 2003. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. *Environ. Res.* 91, 157 - 162.
- Eggens, M.L., Galgani, F., 1992. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish: fast determination with a fluorescence plate-reader. *Mar. Environ. Res.* 33, 213 - 221.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, J.R.V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88 - 95.
- Federici, G., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat. Toxicol.* 84, 415 - 430.
- Ferrante, I., Ricci, R., Aleo, E., Passi, S., Cataudella, S., 2008. Can enzymatic antioxidant defences in liver discriminate between wild and sea cage-reared Bluefin Tuna quality? *Aquaculture.* 279, 182 - 187.
- Ferrari, A., Venturino, A., Péchen de D'Angelo, A. M., 2007. Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.* 146C, 308 - 313.

- Figueiredo, D.R., Azeiteiro, U.M., Esteves, S.M., Gonçalves, F.J.M., Pereira, M.J., 2004. Microcystin-producing blooms-a serious global public health issue. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59, 151 - 163.
- Fischer, W.J., Altheimer, S., Cattori, V., Meier, P.J., Dietrich, D.R., Hagenbuch, B., 2005. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 257 - 263.
- Gallagher, E.P., Sheehy, K.M., 2000. Altered glutathione S-transferase catalytic activities in female brown bullheads from a contaminated central Florida lake. *Mar. Environ. Res.* 50, 399 - 403.
- Gehring, M.M., Shephard, E.G., Downing, T.G.; Wiegand, C., Neilan, B.A., 2004. An investigation into the detoxification of microcystin-LR by the glutathione pathway in Balb/c mice. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 931 - 941.
- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed.) *Functional metabolism: regulation and adaptation*. New York, John Wiley & Sons, Inc., pp. 319 - 368.
- Hermes-Lima, M., Storey, J.M., Storey, K.B., 1998. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comp. Biochem. Physiol.* 120B, 437 - 448.
- Hitzfeld, B.C., Höger, S.J., Dietrich, D.R., 2000. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment and human risk assessment. *Environ. Health Perspect. Suppl.* 108, 113 - 122.
- Hopkins, J., Tudhope, G.R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *J. Haematol.* 25, 563 - 575.
- Jee, J.H, Kang, J.C., 2004. Effect of phenanthrene on haematological parameters in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminch et Schlegel). *Aquacul. Res.* 35, 1310 - 1317.
- Jönsson, M.E, Brandt, I., Brunström, B., 2002. Gill Filament-Based EROD assay for monitoring waterborne dioxin-like pollutants in fish. *Environ. Sci. Technol.* 36, 340 - 3344.
- Jönsson, M.E, Brunström, B., Brandt, I., 2009. The zebrafish gill model: Induction of CYP1A, EROD and PAH adduct formation. *Aquat. Toxicol.* 91, 62 - 70.
- Jos, A., Pichardo, S., Prieto, A. I., Repetto, G., Vázquez, C. M., Moreno, I., Cameán, A. M., 2005. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* 72, 261 - 271.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakobi, W. B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferase. *J. Biol. Chem.* 251, 6183 - 6188.
- Kilemade, M.F., Hartl, M.G.J., Sheehan, D., Mothersill, C., Van Pelt, F.N.A.M., O'Halloran, J., O'Brien, N.M., 2004. Genotoxicity of field-collected inter-tidal sediments from Cork

- Harbor, Ireland, to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) as measured by the comet assay. Environ. Mol. Mutagen. 44, 56 - 64.
- Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T.A., 1995. Comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. MMS Comum. 3, 103 - 115.
- Kondo, F., Matsumoto, H., Yamada, S., Ishikawa, N., Ito, E., Nagata, S., Ueno, Y., Suzuki, M. Harada, K., 1996. Detection and identification of metabolites of microcystins formed in vivo in mouse and rat livers. Chem. Res. Toxicol. 9, 1355 - 1359.
- Lakshmana Rao, P.V., Bhattacharya, R., Parida, M.M., Jana, A.M., Bhaskar, A.S.B., 1998. Freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UTEX 2385) induced DNA damage in vivo and in vitro. Environ. Toxicol. Pharmacol. 5, 1 - 6.
- Lankoff, A., Krzowski, L., Głab, J., Banasik, A., Lisowska, H., Kuszewski, T., Gozdz, S., Wójcik, A., 2004. DNA damage and repair in human peripheral blood lymphocytes following treatment with microcystin-LR. Mutat. Res. 559, 131 - 142.
- Li, X., Chung, I., Kim, J., Lee, J., 2004. Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. Toxicon. 44, 821 - 827.
- Li, X., Liu, Y., Song, L., Liu, J., 2003. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. Toxicon. 42, 85 - 89.
- Li, X.Y., Chung, I.K., Kim, J.I., Lee, J.A., 2005. Oral exposure to *Microcystis* increases activity-augmented antioxidant enzymes in the liver of loach (*Misgurnus mizolepis*) and has no effect on lipid peroxidation. Comp. Biochem. Physiol. 141C, 292 - 296.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Mar. Pollut. Bull. 42, 656 - 666.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 - 275.
- McCord, J.E., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). J. Biol. Chem. 244, 6049 - 6055.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010a. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. Chemosphere. 78, 294 - 299.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010b. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. Chemosphere. 81, 781 - 787.
- Molica, R.J.R., Oliveira, E.J.A., Carvalho, P.V.V.C., Costa, A.N.S.F., Cunha, M.C.C., Melo, G., Azevedo, S.M.F.O., 2005. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. Harmful Algae. 4, 743 - 753.

- Monserat, J.M., Yunes, J.S., Bianchini, A., 2001. Effects of *Anabaena spiroides* (cyanobacteria) aqueous extracts on the acetylcholinesterase activity of aquatic species. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1228 - 1235.
- Olive, P.L., Banath, J.P., 2006. The Comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protoc.* 1, 23 - 29.
- Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., Raisuddin, S., 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl & Schn.). *Sci. Total Environ.* 309, 105 - 115.
- Pasková, V., Adamovsky, O., Pikula, J., Skocovska, B., Band'Ouchova, H., Horáková, J., Babica, P., Marsálek, B., Hilscherova, K., 2008. Detoxification and oxidative stress responses along with microcystins accumulation in Japanese quail exposed to cyanobacterial biomass. *Sci. Total Environ.* 98, 34 - 47.
- Pereira-Maduenho, L, Martinez, C.B.R., 2008. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 148C, 265 - 272.
- Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K.A., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C., 1998. Identification of na enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR. The first step of detoxification. *Biochem. Biophys. Acta.* 1425, 527 - 533.
- Pinho, G.L.L., Moura da Rosa, C., Maciel, F.E., Bianchini, A., Yunes, J.S., Proença, L.A.O., Monserat, J.M., 2005. Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 353 - 360.
- Pinho, G.L.L., Moura da Rosa, C., Yunes, J.S., Luquet, C.M., Bianchini A., Monserat, J.M., 2003. Toxic effects of microcystins in the hepatopancreas of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 135C, 459 - 468.
- Prieto, A.I., Jos, A., Pichardo, S., Moreno, I., Cameán, A.M., 2006. Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.). *Aquat. Toxicol.* 77, 314 - 321.
- Prieto, A.I., Pichardo, S., Jos, A., Moreno, I., Cameán, A.M., 2007. Time-dependent oxidative stress responses after acute exposure to toxic cyanobacterial cells containing microcystins in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* 84, 337 - 345.
- Santos Miron, D., Crestani, M., Shettringer, M.R., Morsch, V.M., Baldisserotto, B., Tierno, M.A., Moraes, G., Vieira, V.L.P., 2005. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 398 - 403.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice R.R., Schneider E.L., 1988. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184 - 191.

- Stephensen, E., Svavarsson, J.; Sturve, J., Ericson, G., Adolfsson-Erici, M., Forlin, L., 2000. Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. *Aquat. Toxicol.* 48, 431 - 442.
- Tekman, B., Ozdemir, H., Senturk, M., Ciftci M., 2008. Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. *Comp. Biochem. Physiol.* 148C, 117 - 121.
- Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57 - 149.
- Vanzella, T.P., Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S., 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutat. Res.* 631, 36 - 43.
- Vinagre, T.M., Alciati, J.C., Regoli, F., Bocchetti, R., Yunes, J.S., Bianchini, A., Monserrat, J.M., 2003. Effect of hepatotoxins (microcystin) on ion-regulation and antioxidant system in gills of *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 135C, 67 - 75.
- Votto, A.P.S, Renon, V.P., Yunes, J.S, Rumjanek, V.M., Capella, M.A.M., Neto, V.M., Freitas, M.S., Geracitano, L.A., Monserrat, J.M., Trindade, J.S., 2007. Sensitivity to microcystins: A comparative study in human cell lines with and without multidrug resistance phenotype. *Cell Biol. Int.* 31, 1359 - 1366.
- Wang, L., Liang, X.F., Liao, W.Q., Lei, L.M., Han, B.P., 2006. Structural and functional characterization of microcystin detoxification-related liver genes in a phytoplanktivorous fish, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 144C, 216 - 227.
- Weng, D., Lu, Y., Wei, Y., Liu, Y., Shen, P., 2007. The role of ROS in microcystin-LR induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice. *Toxicol.* 232, 15-23.
- WHO, 1998. Blue-green algae in inland waters: Assessment and control of risks to public health. WHO Document, Annex G.
- Zegura, B., Lah, T.T., Filipic, M., 2004. The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. *Toxicol.* 200, 59 - 68.
- Zegura, B., Lah, T.T., Filipic, M., 2006. Alteration of intracellular GSH levels and its role in microcystin-LR-induced DNA damage in human hepatoma HepG2 cells. *Mutat. Res.* 611, 25 - 33.
- Zegura, B., Sedmark, B., Filipic, M., 2003. Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicon.* 41, 41 - 48.
- Zegura, B., Zajc, I., Lah, T.T., Filipic, M., 2008. Patterns of microcystin-LR induced alteration of the expression of genes involved in response to DNA damage and apoptosis. *Toxicon.* 51, 615 - 623.
- Zimba, P.V., Khoo, L., Gaunt, P., Carmichael, W.W., Brittaina, S., 2001. Confirmation of catfish mortality from *Microcystis* toxins. *J. Fish Dis.* 24, 41 - 47.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, o peixe neotropical *P. lineatus* foi exposto a duas situações diferentes. Primeiro o animal foi exposto ao liofilizado de FNC e segundo ao de MA, a fim de se comparar os possíveis efeitos de FNC com os efeitos produzidos apenas pela MA, em parâmetros bioquímicos e genéticos desta espécie de peixe.

Embora tenha sido encontrada a mesma concentração da MC-LR nos dois materiais liofilizados ($0,9 \mu\text{g.L}^{-1}$ MC-LR na exposição a 1 mg.L^{-1} de ambos os liofilizados e $1,9 \mu\text{g.L}^{-1}$ MC-LR na exposição a 2 mg.L^{-1} de ambos os liofilizados), os resultados foram completamente diferentes. Isso ocorreu porque, provavelmente, há no liofilizado de FNC outra(s) cianotoxina(s) que foram capazes de alterar os efeitos que a MC-LR sozinha é capaz de promover, conforme foi discutido anteriormente no artigo A.

A Tabela 5.1 mostra resumidamente todos os resultados encontrados neste trabalho. E baseados nos mesmos, nós podemos verificar que após a exposição aos diferentes meios experimentais, houve a ativação da fase I e II de detoxificação no fígado. Além disso, houve alteração na capacidade antioxidante (diminuição e ativação) nos dois tecidos analisados, sendo que na exposição ao liofilizado de FNC, a capacidade antioxidante parece ter sido mais eficiente, uma vez que não foram observados danos no DNA desta espécie de peixe e a LPO apareceu diminuída significativamente. Já para a exposição ao liofilizado de MA, embora não tenha sido detectado LPO, foi verificado danos na molécula do DNA dos eritrócitos, mostrando deficiência na defesa antioxidante. Quanto a atividade da AChE, esta foi inibida somente na exposição ao liofilizado de FNC, podendo esta inibição ser realizada pela presença de outra cianotoxina, como a anatoxina-a(s), ou pela própria MC-LR, quantificada no trabalho. Ao comparar os dois trabalhos então, podemos verificar que as duas exposições foram tóxicas a espécie *P. lineatus*. A exposição à FNC foi prejudicial ao curimba, pois promoveu inibição da AChE, que pode trazer alterações comportamentais. Já a exposição ao liofilizado de MA também se apresentou tóxica devido sua capacidade de gerar danos na molécula do DNA de eritrócitos e se esses danos não forem corrigidos mutações futuras poderão ser desencadeadas, levando a um prejuízo para a população de *P. lineatus*.

Como perspectivas futuras esse trabalho sugere a necessidade de estudos bastante específicos: fase I e atividade da AChE. Poucos são os trabalhos na literatura que retratam a ativação da fase I após a exposição às cianotoxinas, uma vez que já foi comprovado que ela estaria relacionada apenas com a fase II do processo de detoxificação. Entretanto, nas

duas exposições realizadas neste trabalho, houve ativação desta primeira fase, e no trabalho realizado por Pasková e colaboradores (2008) também foi encontrado ativação desta fase. Por isso, são necessários mais estudos nesta área para esclarecer se realmente a MC, assim como outras ciantoxinas, estão envolvidas somente com a fase I, não apresentando relação com a fase II do processo de detoxificação. Quanto a atividade da AChE, não há na literatura dados que comprovem a ação da MC na atividade desta enzima, porém esta cianotoxina é capaz de entrar no cérebro por meio dos Oatps e interferir na atividade de algumas enzimas, como na da GST, demonstrada por Cazenave e colaboradores (2006). Será então que a MC também não é capaz de interferir na atividade da AChE, assim como a anatoxina-a(s)? Se isso for confirmado sugere-se então além do efeito hepatotóxico, o neurotóxico da MC.

Tabela 5.1 – Resultados obtidos para *Prochilodus lineatus* expostos a 1 e 2 mg.L⁻¹ do liofilizado de FNC e de MA por 24 e 96 h. Os sinais =, ↑ e ↓ indicam, respectivamente, ausência de diferença, aumento ou redução significativa em relação ao respectivo controle.

		FNC				MA			
		1 mg.L ⁻¹		2 mg.L ⁻¹		1 mg.L ⁻¹		2 mg.L ⁻¹	
		24 h	96 h	24 h	96 h	24 h	96 h	24 h	96 h
EROD	Brânquia	=	=	=	=	=	=	=	=
	Fígado	↑	↑	=	=	=	=	=	↑
GST	Brânquia	=	=	=	=	=	=	↑	↑
	Fígado	=	=	=	=	↑	=	=	=
SOD	Brânquia	=	↑	↑	=	=	=	=	=
	Fígado	↑	=	=	=	=	=	=	↑
CAT	Brânquia	=	=	=	=	↑	=	=	=
	Fígado	=	=	=	=	↑	↓	=	↓
GPx	Brânquia	=	↑	=	=	↑	=	=	↑
	Fígado	=	=	=	=	=	=	=	=
GR	Brânquia	=	=	=	=	=	↑	=	↑
	Fígado	=	=	↓	↑	=	=	=	=
GSH	Brânquia	=	=	=	=	=	↓	=	=
	Fígado	=	↑	=	=	↑	=	=	↓
LPO	Brânquia	=	=	=	=	=	=	=	=
	Fígado	=	↓	=	=	=	=	=	=
AChE	Cérebro	=	↓	=	=	=	=	=	=
	Músculo	=	=	=	=	=	=	=	=
Danos no DNA	Sangue	=	=	=	=	=	↑	=	=
	Brânquia	=	=	=	=	=	=	=	=

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSON, A.; ANDERSON, C.; JÖNSSON, M.E.; FOGELBERG, O.; ÖRBERG, J.; BRUNSTRÖM, B.; BRANDT, I. Gill EROD in monitoring of CYP1A inducers in fish-A study in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) caged in Stockholm and Uppsala Waters. **Aquatic Toxicology**, v. 85, p. 1-8, 2007.
- ALMEIDA, J.S.; MELETTI, P.C.; MARTINEZ, C.B.R. Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology and Pharmacology**, v. 140, p. 356-363, 2005.
- ALVES COSTA, J.R.M.; MELA, M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; PELLETIER, E.; RANDI, M.F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, p. 82-88, 2007.
- AMADO, L.L.; GARCIA, M.L.; RAMOS, P.B.; FREITAS, R.F.; ZAFALON, B.; FERREIRA, J.L.R.; YUNES, J.S.; MONSERRAT, J.M. A method to measure total antioxidant capacity against peroxyl radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 2115-2123, 2009.
- AMADO, L.L.; MONSERRAT, J.M. Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: Why and how. **Environment International**, v. 36, p. 226-235, 2010.
- ANTONIOU, M.G.; SHOEMAKER, J.A.; CRUZ, A.A.; DIONYSIOU, D.D. LC/MS/MS structure elucidation of reaction intermediates formed during the TiO₂ photocatalysis of microcystin-LR. **Toxicon**, v. 51, p.1103-1118, 2008.
- ARIAS, A.R.L.; BUSS, D.F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A.F.; FREIRE, M.M.; EGLER, M. MUGNAI, R.; BAPTISTA, D.F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência e Saúde**, v.12, p.61-72, 2007.
- ATENCIO, L.; MORENO, I.; JOS, A.; PICHARDO, S.; MOYANO, R.; BLANCO, A.; CAMEÁN, A.M. Dose-dependent antioxidant responses and pathological changes in tenca (*Tinca tinca*) after acute oral exposure to *Microcystis* under laboratory conditions. **Toxicon**, v. 52, p. 1-12, 2008.
- ATLI, G.; ALPTEKIN, O.; TÜKEL, S.; CANLI, M. Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 143, p. 218-224, 2006.
- AZEVEDO, S.M.F.O; CARMIVHAEL, W.W; JOCHIMSEN, E.M.; RINEHART, K.L.; LAU, S.; SHAW, G.R; EAGLESHAM, G.K. Human intoxication by microcystis during renal dialysis treatment in Caruaru – Brazil. **Toxicology**, v. 181-182, p. 441-446, 2002.
- BAGNYUKOVA T. V.; CHAHRAK O. I.; LUSHCHAK V. I. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. **Aquatic Toxicology**, v. 78, p. 325-331, 2006.

BARSIENE, J.; LEHTONEN, K.K.; KOEHLER, A.; BROEG, K.; VUORINEN, P.J.; LANG, T.; PEMPKOWIAK, J.; SYVOKIENE, J.; DEDONYTE, V.; RYBAKOVAS, A.; REPECKA, R.; VUONTISJÄRVI, H.; KOPECKA J. Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and mussel (*Mytilus edulis*) in the Klaipeda-Būtinge area (Baltic Sea). **Marine Pollution Bulletin**, v. 53, p. 422-436, 2006.

BENNEMANN, S.T.; SILVA-SOUZA, A.T.; ROCHA, G.R.A. Composición ictiofaunística em cinco localidades de la cuenca Del río Tibagi, PR - Brasil. **Interciencia**, v. 20, p. 7-13, 1995.

BEUTLER, E. **Red Cell Metabolism**: A manual of biochemical methods. New York: Grune & Straton, 1975.

BEUTLER, E.; DUROM, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882-890, 1963.

BILBAO, E.; RAINGEARD, D.; DIAZ de CERIO, O.; ORTIZ-ZARRAGOITIA, M.; RUIZ, P.; IZAGIRRE, U.; ORBEA, A.; MARIGÓMEZ, I.; CAJARAVILLE, M.P.; . CANCIO, I. Effects of exposure to Prestige-like heavy fuel oil and to perfluorooctane sulfonate on conventional biomarkers and target gene transcription in the thicklip grey mullet *Chelon labrosus*. **Aquatic Toxicology**, v. 98, p. 282-296, 2010.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; MOLICA, R. “Cianobactéria Invasora”. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 30, p. 82-90, 2003.

BLAHA, L.; KOPP, R.; IMKOVÁ, K.; MARES, J. Oxidative stress biomarkers are modulated in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) exposed to microcystin-producing cyanobacterial water bloom. **Acta Veterinaria Brno**, v. 73, p. 477-482, 2004.

BOTHA, N.; GEHRINGER, M.M.; DOWNINGA, T.G.; VENTER, M.; SHEPHARDB, E.G. The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo₂ cells. **Toxicon**, v. 43, p. 85-92, 2004.

BRETAUD, S.; TOUTANT, J.P.; SAGLIO, P. Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 47, p. 117-124, 2000.

BRIAND, J.F.; JACQUET, S.; BERNARD, C.; HUMBERT, J.F. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. **Veterinary Research**, v. 34, p. 361-377, 2003.

BUCHELI, T. D.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 25, p. 201-268, 1995.

BURKE, M.D.; MAYER, R.T. Differential effects os phenobarbitone and 3 methylcholanthrene induction on the hepatic microsomal metabolism and cytochrome P450 binding of phenoxazone and a homologous series of its n-alkyl ethers (alkoxyresorufins). **Chemical Biologic Interactive**, v.45, p. 243, 1983.

BUSS, D.F.; BAPTISTA, D.F.; NESSIMIAN, J.L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de valiação da qualidade da água de rios. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, p. 465-473, 2003.

CAJARAVILLE, M.P.; BENIANNIO, J.M.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, v.247, p. 295-311, 2000.

CAMARGO, M.M.P.; MARTINEZ, C.B.R. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, p. 61-69, 2006.

CAMARGO, M.M.P.; MARTINEZ, C.B.R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, p. 327-336, 2007.

CAMPOS, A.; VASCONCELOS, V. Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. **International Journal of Molecular Science**, v. 11, p. 268-287, 2010.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 260, p. 5475-5480, 1975.

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

CAVALCANTE, D.G.S.M.; MARTINEZ, C.B.R.; SOFIA, S.H. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research**, v. 655, p. 41-46, 2008.

CAZENAVE, J.; BISTONI, M.A.; PESCE, S.F.; WUNDERIN, D.A. Differential detoxification and antioxidant response diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. **Aquatic Toxicology**, v. 76, p. 1-12, 2006.

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**, v. 220, p. 71-80, 2006.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management**. WHO, London, New York, 1999.

CHORUS, I.; MUR, L. Preventative Measures. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Eds.). **Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring, and Management**. WHO, London, New York, p. 235-273, 1999.

CHUIKO, G.M.; PODGORNAYA, V.A.; ZHELNIN, Y.Y. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in brain and plasma of freshwater teleosts: cross-species and cross-family differences. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 135, p. 55-61, 2003.

CODD, G.A. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. **Ecological Engineering**, v. 16, p. 51-60, 2000.

CONNELL D.W.; LAM, P.K.S.; RICHARDSON, B.J., WU, R.S.S. **Introduction to ecotoxicology**. London: Blackwell Science, 1999.

COOD, G.A.; LINDSAY, J.; YOUNG, F.M.; MORRISON, L.F; METCALF, J.S. Harmful cyanobacteria – From mass mortalities to management measures. In: HUISMAN, J.; MATTHIJS, H.C.P; VISSER, P.M. (Eds.). **Harmful Cyanobacteria**. The Netherlands. Springer, v. 3, p. 1-25, 2005.

DAO, T.S; DO-HONG, L.C; WIEGAND, C. Chronic effects of cyanobacterial toxins on *Daphnia magna* and their offspring. **Toxicon**, p. 1-11, 2010.

DEWES, L.J.; SANDRINI, J.Z.; MONSERRAT, J.M.; YUNES, J.S. Biochemical and physiological responses after exposure to microcystins in the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Brachyura). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, p. 201-208, 2006.

DEWES, L.J; MONSERRAT, J.M; UHARA, P.M.; YUNES, J.S. Toxin accumulation and biochemical alterations in the estuarine crab *Neohelice granulata* (Decapoda, Brachyura) after exposure to microcystins. **Journal Brazilian Society Ecotoxicology**, v. 2, p. 203-209, 2007.

DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biology Toxicology**, v. 25, p. 5-32, 2009.

DING, W.; SHEN, H.; ONG, C. Critical role of ROS formation in microcystin-induced cytoskeletal disruption in primary cultured hepatocytes. **Journal Toxicology Environmental Health**, v. 64, p. 507-519, 2001.

DING, W.X., SHEN, H.M., ONG, C.N. Microcystic cyanobacteria extract induces cytoskeletal disruption and intracellular glutathione alteration in hepatocytes. **Environmental Health Perspective**, v. 108, p. 605-609, 2000.

DING, W.X., SHEN, H.M., ONG, C.N. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes. **Hepatology**, v. 32, p. 547-555, 2000.

DUTTA, H.M.; ARENDS, D.A. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. **Environmental Research**, v. 91, p. 157-162, 2003.

EGGENS, M.L.; GALGANI, F. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfishfast determination with a fluorescence plate-reader. **Marine Environmental Research**, v. 33, p. 213-221, 1992.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES J.R.V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

FALCONER, I.R. Cyanobacterial toxins present in *Microcystis aeruginosa* extracts-More than microcystins! **Toxicon**, v. 50, p. 585-588, 2007.

FEDERICI, G.; SHAW, B.J.; HANDY, R.D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v. 84, p. 415-430, 2007.

FERRANTE, I.; RICCI, R.; ALEO, E.; PASSI, S.; CATAUDELLA, S. Can enzymatic antioxidant defences in liver discriminate between wild and sea cage-reared Bluefin Tuna quality? **Aquaculture**, v. 279, p. 182-187, 2008.

FERRARI, A.; VENTURINO, A.; PÉCHEN DE D'ANGELO, A. M. Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 146, p. 308-313, 2007.

FERRARI, A.; VENTURINO, A.; PECHEN DE D'ANGELO, A.M. The time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphosmethyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p. 420-425, 2004.

FIGUEIREDO, D.R.; AZEITEIRO, U.M.; ESTEVES, S.M.; GONÇALVES, F.J.M.; PEREIRA, M.J. Microcystin-producing blooms-a serious global public health issue. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 59, p. 151-163, 2004.

FISCHER, W.J.; ALTHEIMER, S.; CATTORI, V.; MEIER, P.J.; DIETRICH, D.R.; HAGENBUCH, B. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, p. 257-263, 2005.

FREIRE, M.M.; SANTOS, V.G.; GINUINO, I.S.F.; ARIAS, A.R.L. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, p. 347-354, 2008.

GALLANGHER, E.P.; SHEEHY, K.M. Altered glutathione S-transferase catalytic activities in female brown bullheads from a contaminated central Florida lake. **Marine Environmental Research**, v. 50, p. 399-403, 2000.

GEHRINGER, M.M.; SHEPHARD, E.G.; DOWNING, T.G.; WIEGAND, C.; NEILAN, B.A. An investigation into the detoxification of microcystin-LR by the glutathione pathway in Balb/c mice. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 931-941, 2004.

GIULIO, R.T.D.; MEYER, J.N. Reactive oxygen species and oxidative stress. In: GIULIO, R.T.D.; HINTON, D.E. (Eds.). **The Toxicology of fishes**. New York. Taylor & Francis Group, cap. 6, p. 273-324, 2008.

GLUSCZAK, L.; MIRON, D.S.; CRESTANI, M.C; FONSECA, M.B.; PEDRON, F.A.; DUARTE, M.F.; VIEIRA, V.L.P. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, p. 237-241, 2006.

GOKSØYR, A.; FÖRLIN, L. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. **Aquatic Toxicology**, v. 22, p. 287-311, 1992.

HAGENBUCH, B.; MEIER, P.J. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1609, p. 1-18, 2003.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (ed.) **Functional metabolism: regulation and adaptation**. New York, John Wiley & Sons, Inc., p. 319-368, 2004.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, J.M.; STOREY, K.B. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 120, p. 437-448, 1998.

HITZFELD, B.C.; HÖGER, S.J.; DIETRICH, D.R. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment and human risk assessment. **Environmental Health Perspectives Supplements**, v. 108, p. 113-122, 2000.

HOPKINS, J.; TUDHOPE, G.R. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. **Journal Haematology**, v. 25, p. 563-575, 1973.

HUDNELL, H.K.; JONES, C.; LABISI, B.; HILL, D.R.; EILERS, J. Freshwater harmful algal bloom (FHAB) suppression with solar powered circulation (SPC). **Harmful Algae**, v. 9, p. 208-217, 2010.

IBELINGS, W.B.; CHORUS, I. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: A review. **Environmental Pollution**, v. 150, p. 177-192, 2007.

JEE, J.H.; KANG, J.C. Effect of phenanthrene on haematological parameters in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminch et Schlegel). **Aquaculture Research**, v. 35, p. 1310-1317, 2004.

JESUS, T.B.; CARVALHO, C.E.V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia Brasiliensis**, v.12, p. 680-693, 2008.

JÖNSSON, M.E.; BRANDT, I.; BRUNSTRÖM, B. Gill filament-based EROD assay for monitoring waterborne dioxin-like pollutants in fish. **Environmental Scientific Technology**, v. 36, p. 3340-3344, 2002.

JÖNSSON, M.E.; BRUNSTRÖM, B.; BRANDT, I. The zebrafish gill model: Induction of CYP1A, EROD and PAH adduct formation. **Aquatic Toxicology**, v. 91, p. 62-70, 2009.

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.

KAGALOU, I.; PAPADIMITRIOU, T.; BACOPOULOS, V.; LEONARDOS, I. Assessment of microcystins in lake water and the omnivorous fish (*Carassius gibelius*, Bloch) in Lake Pamvotis (Greece) containing dense cyanobacterial bloom. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 137, p. 185-195, 2008.

KAMOGAE, M.; HIROOKA, E.Y. Microcistina: risco e contaminação em águas eutróficas. **Acta Scientiarum**, v. 22, p. 1189-1200, 2000.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBI, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferase. **Journal of Biology Chemistry**, v. 251, p. 6183-6188, 1976.

KILEMADE, M.F.; HARTL, M.G.J.; SHEEHAN, D.; MOTHERSILL, C.; VAN PELT, F.N.A.M.; O'HALLORAN, J.; O'BRIEN, N.M. Genotoxicity of field-collected intertidal sediments from Cork Harbor, Ireland, to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) as measured by the comet assay. **Environmental Molecular Mutagen**, v. 44, p. 56-64, 2004.

KIRBY, M.F.; MORRIS, S.; HURST, M.; KIRBY, S.J.; NEALL, P.; TYLOR, T.; FAGG, A. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, p. 780-791, 2000.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T.A. Comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **MMS Comum**, v. 3, p. 103-115, 1995.

KONDO, F.; MATSUMOTO, H.; YAMADA, S.; ISHIKAWA, N.; ITO, E.; NAGATA, S.; UENO, Y.; SUZUKI, M.; HARADA, K. Detection and identification of metabolites of microcystins formed in vivo in mouse and rat livers. **Chemical Research Toxicology**, v. 9, p. 1355-1359, 1996.

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

LAM, P.K.S. Use of biomarkers in environmental monitoring. **Ocean & Coastal Management**, v. 52, p. 348-354, 2009.

LANGIANO, V.C.; MARTINEZ, C.B.R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology C, Toxicology & Pharmacology**, v. 147, p. 222-231, 2008.

LANKOFF, A.; KRZOWSKI, L.; GŁAB, J.; BANASIK, A.; LISOWSKA, H.; KUSZEWSKI, T.; GOZDZ, S.; WÓJCIK, A. DNA damage and repair in human peripheral blood lymphocytes following treatment with microcystin-LR. **Mutation Research**, v. 559, p. 131-142, 2004.

LEÃO, J.C.; GERACITANO, L.A.; MONSERRAT, J.M.; AMADO, L.L.; YUNES, J.S. Microcystin induced oxidative stress in *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae). **Marine Environmental Research**, v. 66, p. 92-94, 2008.

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

LI, G.; XIE, P.; FU, J.; HAO, L.; XIONG, Q.; LI, H. Microcystin-induced variations in transcription of GSTs in an omnivorous freshwater fish, goldfish. **Aquatic Toxicology**, v. 88, p. 75-80, 2008.

LI, J.; YU, J.; YANG, M.; ZHANG, J.; BURCH, M.D.; HAN, W. Cyanobacterial population and harmful metabolites dynamics during a bloom in Yanghe Reservoir, North China. **Harmful Algae**, v. 9, p. 481-488, 2010.

LI, L.; XIE, P.; CHENA, 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**, v. 49, p. 1042-1053, 2007.

LI, X.; Chung, I.; Kim, J.; Lee, J. Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. **Toxicon**, v. 44, p. 821-827, 2004.

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. **Toxicon**, v. 42, p. 85-89, 2003.

LI, X.Y.; CHUNG, I.K.; KIM, J.I.; LEE, J.A. Oral exposure to *Microcystis* increases activity augmented antioxidant enzymes in the liver of loach (*Misgurnus mizolepis*) and has no effect on lipid peroxidation. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 141, p. 292-296, 2005.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, p. 293-303, 2001.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidantrelated enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research**, v. 674, p. 137-147, 2009.

LINDEN, R. Transmissão Sináptica. In: Aires, M.M. (coord.). **Fisiologia**. 3 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. Cap 14, p. 222-233, 2008.

LIVINGSTONE, D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, p. 656-666, 2001.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurements with the folin phenol reagent. **Journal of Biology Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MARTINEZ, C.B.R. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: Ângela Teresa Silva-Souza. (org.). **Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil**. Maringá: ABRAPOA, p. 43-62, 2006.

MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. (Eds.). **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: MC Gráfica, p. 551-577, 2002.

MARTINEZ, C.B.R.; NAGAE, M.Y.; ZAIA, C.T.B.V.; ZAIA, D.A.M. Acute morphological and physiological affects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal Biology**, v. 64, p. 797-807, 2004.

McCORD, J.E.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biology Chemistry**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MIKHAILOV, A.; HÄRMÄLÄ-BRASKÉN, A.-N.; HELLMAN, J.; MERILUOTO, J.; ERIKSSON, J. E. Identification of ATP-synthase as a novel intracellular target for microcystin-LR. **Chemico-Biological Interactions**, v. 142, p. 223-237, 2003.

MODESTO, K.A; MARTINEZ, C.B.R. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 78, p. 294-299, 2010a.

MODESTO, K.A; MARTINEZ, C.B.R. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere**, v. 81, p. 781-787, 2010b.

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**, v. 63, p. 424-429, 2006.

MOLICA, R.J.R.; OLIVEIRA, E.J.A; CARVALHO, P.V.V.C.; COSTA, A.N.S.F.; CUNHA, M.C.C.; MELO, G.; AZEVEDO, S.M.F.O. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. **Harmful Algae**, v. 4, p. 743-753, 2005.

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. **Toxicon**, v. 46, p. 725-735, 2005.

MONSERRAT, J.M.; MARTÍNEZ, P.E.; GERACITANO, L.A.; AMADO, L.L.; MARTINS, C.M.G; PINHO, G.L.L.; CHAVES, I.S; FERREIRA-CARVO, M.; VENTURA-LIMA, J.; BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 146, p. 221-234, 2007.

MONSERRAT, J.M.; YUNES, J.S.; BIANCHINI, A. Effects of *Anabaena spiroides* (cyanobacteria) aqueous extracts on the acetylcholinesterase activity of aquatic species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 1228-1235, 2001.

MORENO, I.; PICHARDO, S.; JOS, A.; GÓMES-AMORES, L.; MATE, A.; VAZQUEZ, C.M; CAMEÁN, A.M. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. **Toxicon**, v. 45, p. 395-402, 2005.

MORENO, I.M.; MARAVER, J.; AGUETE, E.C.; LEÃO, M.; GAGO-MARTÍNEZ, A.; CAMEÁN, A.M. Decomposition of microcystin-LR, microcystin-RR, and microcystin-YR in water samples submitted to in vitro dissolution tests. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 52, p. 5933-5938, 2004.

MUR, L.; SKULBERG, O.M.; UTKILEN, H. Cyanobacteria in the environment. In: Chorus I, BARTAM J (Eds.). **Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management**. WHO, London e New York, p. 15-40, 1999.

NIMMO, D.R. Pesticides. In: RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. (Eds.) **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. New York: Hemisphere, p. 335-373, 1985.

OLIVE, P.L.; BANATH, J.P. The Comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nature Protocols**, v. 1, p.23-9, 2006.

OSTLING, O; JOHANSON, K.J. Microeletrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 12, p. 291-298, 1984.

PANDEY, S.; PARVEZ, S.; SAYEED, I.; HAQUE, R.; BIN-HAFEEZ, B.; RAISUDDIN, S. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl & Schn.). **The Science of the Total Environment**, v. 309, p. 105-115, 2003.

PASKOVÁ, V.; ADAMOVSKY, O.; PIKULA, J.; SKOCOVSKA, B.; BAND'OUCHOVA, H.; HORÁKOVÁ, J.; BABICA, P.; MARSÁLEK, B.; HILSCHEROVA, K. Detoxification and oxidative stress responses along with microcystins accumulation in Japanese quail exposed to cyanobacterial biomass. **Science of the Total Environment**, v. 98, p. 34-47, 2008.

PEREIRA, P.; DIAS, E.; FRANCA, S.; PEREIRA, E.; CAROLINO, M.; VASCONCELOS, V.M. Accumulation and depuration of cyanobacterial paralytic shellfish toxins by the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. **Aquatic Toxicology**, v. 68, p. 339-350, 2004.

PEREIRA-MADUENHO, L; MARTINEZ, C.B.R. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 148, p. 265-272, 2008.

PFLUGMACHER, S.; WIEGAND, C.; OBEREMM, A.; BEATTIE, K.A.; KRAUSE, E.; CODD, G.A.; STEINBERG, C. Identification of na enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR. The first step of detoxification. **Biochemical Biophysics Acta**, v. 1425, p. 527-533, 1998.

PIETSCH, C.; WIEGAND, C.; AMÉ, V.; NICKLISCH, A.; WUNDERLIN, D.; FLUGMACHER, S. The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. **Environmental Toxicology**, v. 16, p. 535-542, 2001.

PINHO, G.L.L.; MOURA DA ROSA, C.; 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.

PINHO, G.L.L.; MOURA DA ROSA, C.; YUNES, J.S.; LUQUET, C.M.; BIANCHINI A.; MONSERRAT, J.M. Toxic effects of microcystins in the hepatopancreas of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 135, p. 459-468, 2003.

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.

PRIETO, A.I.; PICHARDO, S.; JOS, A.; MORENO, I.; CAMEÁN, A.M. Time-dependent oxidative stress responses after acute exposure to toxic cyanobacterial cells containing microcystins in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) under laboratory conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 84, p. 337-345, 2007.

PRINTES, L.B.; ESPÍNDOLA, E.L.G; FERNANDES, M.N. Biochemical Biomarkers in Individual Larvae of *Chironomus xanthus* (Rempel, 1939) (Diptera, Chironomidae). **Journal Brazilian Society Ecotoxicology**, v. 2, p. 53-60, 2007.

QIU, T.; XIE, P.; KE, Z.; LI, L.; GUO, L. In situ studies on physiological and biochemical responses of four fishes with different trophic levels to toxic cyanobacterial blooms in a large Chinese lake. **Toxicon**, v. 50, p. 365-376, 2007.

SALAS, H.J.; MARTINO, P. Metodologías Simplificadas para la Evaluación de eutroficación em lagos cálidos tropicales. **Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS)**, p. 63, 2001.

SANCHO, E.; CERÓN, J.J.; FERRANDO, M.D. Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in *Anguilla anguilla*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 46, p. 81–86, 2000.

SANTOS MIRON, D.; CRESTANI, M.; SHETTINGER, M.R.; MORSCH, V.M.; BALDISSEROTTO, B.; TIerno, M.A.; MORAES, G.; VIEIRA, V.L.P. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, p. 398-403, 2005.

SANTOS, M.C.R.; PACHECO, D.M.; SANTANA, F.; RODRIGUES, A. A Eutrofização das Lagoas das Sete-Cidades e Furnas (S. Miguel – Açores) Análise evolutiva entre 1988 e 2002. **Tecnologia da Água**, v. 36, p. 54-65, 2005.

SARKAR, A.; RAY, D.; SHRIVASTAVA, A.N.; SARKER, S. Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. **Ecotoxicology**, v. 15, p. 333-340, 2006.

SCOTT, G.R.; SLOMAN, K.A. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquatic Toxicology**, v. 68, p. 369-392, 2004.

SILVA, A.G.; MARTINEZ, C.B.R. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, p. 185-192, 2007.

SILVA, M.E.F; SILVA, J.A.; MARANGONI, S.; NOVELL, J.C.; MEIRELLES, N.C. A new method to purify hepatic CYP1A of *Prochilodus scrofa*, a Brazilian freshwater fish. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 138, p. 67-74, 2004.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I.; Bartram J. (eds.). **Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring, and Management**. WHO, London, New York, p. 40-112, 1999.

SIMONATO, J.D.; GUEDES, C.L.B.; MARTINEZ, C.B.R. Biochemical, physiological and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, p. 112-120, 2008.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE R.R.; SCHNEIDER E.L. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, p.184-191, 1988.

SMAYDA, T. Eutrophication and phytoplankton. In: WASSMANN, P.; OLLI K. (Eds). **Drainage basin nutrient inputs and eutrophication: an integrated approach**. University of Tromsø, Norway, 2004.

SOARES, R.M. Toxicologia de cianotoxinas: microcistinas, as estrelas do tema. **Oecol. Bras**, v. 13, p. 259-271, 2009.

STEPHENSEN, E.; SVAVARSSON, J.; STURVE, J.; ERICSON, G.; ADOLFSSON-ERICI, M.; FORLIN, L. Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. **Aquatic Toxicology**, v. 48, p. 431-442, 2000.

TEKMAN, B.; OZDEMIR, H.; SENTURK, M.; CIFTCI M. Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 148, p. 117-121, 2008.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single Cell Gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 178-189, 2006.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VAN GESTEL, C.A.M.; VAN BRUMMELEN, T.C. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. **Ecotoxicology**, v. 5, p. 217-225, 1996.

VANZELLA, T.P.; MARTINEZ, C.B.R.; CÓLLUS, I.M.S. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. **Mutation Research**, v. 631, p. 36-43, 2007.

VASCONCELOS, V.M.; SIVONEN, K.; EVANS W.R.; CARMICHAEL, W.W.; NAMIKOSHI, M. Isolation and characterization of microcystins (heptapeptide hepatotoxins) from Portuguese strains of *Microcystis aeruginosa* Kutz. **Arch. Hydrobiol**, v. 134, p. 295-305, 1995.

VIARENGO, A.; LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E.; KOEHLER, A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v.146, p.281-300, 2007.

VINAGRE, T.M.; ALCIATI, J.C.; REGOLI, F.; BOCCHETTI, R.; YUNES, J.S.; BIANCHINI, A.; MONSERRAT, J.M. Effect of hepatotoxins (microcystin) on ion-regulation and antioxidant system in gills of *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). **Comparative Biochemistry Physiology C**, v. 135, p. 67-75, 2003.

VOTTO, A.P.S.; RENON, V.P.; YUNES, J.S.; RUMJANEK, V.M.; CAPELLA, M.A.M.; NETO, V.M.; FREITAS, M.S.; GERACITANO, L.A.; MONSERRAT, J.M.; TRINDADE, J.S. Sensitivity to microcystins: A comparative study in human cell lines with and without multidrug resistance phenotype. **Cell Biology International**, v. 31, p. 1359-1366, 2007.

WANG, L.; LIANG, X.F.; LIAO, W.Q.; LEI, L.M.; HAN, B.P. Structural and functional characterization of microcystin detoxification-related liver genes in a phytoplanktivorous fish, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 144, p. 216-227, 2006.

WASSMANN, P.; OLLI, K. **Drainage basin nutrient inputs and eutrophication: an integrated approach**. University of Tromsø, Norway. p. 325, 2004.

WENG, D.; LU, Y.; WEI, Y.; 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.

WETZEL, R.G. **Limnologia**. Ed. Fundação Calouste Goulbekian, Lisboa. p. 919, 1993.

WHITTON, B.A.; POTTS, M. Introduction to the Cyanobacteria. In: WITTON, B.A.; POTTS, M. (Eds.). **The ecology of Cyanobacteria – Their diversity in time and space**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 1-11, 2000.

WHO **Blue-green algae in inland waters: Assessment and control of risks to public health**. WHO Document, Annex G, 1998.

WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, p. 201-218, 2005.

WINKALER, E.U.; SANTOS, T.R.M.; MACHADO NETO, J.G.; MARTINEZ, C.B.R. Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology. C, Toxicology & Pharmacology**, v. 145, p. 236-244, 2007.

WINZER, K.; VAN NOORDEN, C. J. F.; KOHLER, A. Sex-specific biotransformation and detoxification after xenobiotic exposure of primary cultured hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L.). **Aquatic Toxicology**, v. 59, p. 17-33, 2002.

ZEGURA, B.; LAH, T.T.; FILIPIC, M. The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. **Toxicology**, v. 200, p. 59-68, 2004.

ZEGURA, B.; LAH, T.T.; FILIPIC, M. Alteration of intracellular GSH levels and its role in microcystin-LR-induced DNA damage in human hepatoma HepG2 cells. **Mutation Research**, v. 611, p. 25-33, 2006.

ZEGURA, B.; SEDMARK, B.; FILIPIC, M. Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. **Toxicon**, v. 41, p. 41-48, 2003.

ZEGURA, B.; ZAJC, I.; LAH, T.T.; FILIPIC, M. Patterns of microcystin-LR induced alteration of the expression of genes involved in response to DNA damage and apoptosis. **Toxicon**, v. 51, p. 615-23, 2008.

ZIMBA, P.V.; KHOO, L.; GAUNT, P.; CARMICHAEL, W.W.; BRITTAIN, S. Confirmation of catfish mortality from *Microcystis* toxins. **Journal of Fish Disease**, v. 24, p. 41-47, 2001.