

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS UFSCar/UNESP

Efeito do extrato bruto da cianobactéria *Radiocystis fernandoi* em pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887)

Driele Tavares

São Carlos

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS UFSCar/UNESP

Efeito do extrato bruto da cianobactéria *Radiocystis fernandoi* em Pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887)

Driele Tavares

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção de título de mestre em ciências fisiológicas.

São Carlos

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação


Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Drielo Tavares, realizada em 05/09/2017:



Prof. Dra. Mariss Narciso Fernandes
UFSCar



Prof. Dra. Evelise Nunes Fragoso de Moura
UFSCar



Prof. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati
UNESP

Tavares, Driele

Efeito do extrato bruto da cianobactéria *Radiocystis fernandoi* em pacu
(*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) / Driele Tavares. – 2017.
110 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São
Carlos, São Carlos

Orientador: Marisa Narciso Fernandes

Banca examinadora: Evelise Nunes Fragoso de Moura, Elisabeth

Criscuolo Urbinati

Bibliografia

1. Microcistina. 2. Osmorregulação. 3. Hepatotoxicidade. I. Orientador.
II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo amor, incentivo, dedicação e todos os ensinamentos ao longo da vida.

À Dra. Marisa Narciso Fernandes, pela orientação, confiança e apoio. E também por compartilhar todo seu conhecimento. É uma honra ser sua orientada!

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro.

À Dra. Alessandra Giani, da Universidade Federal de Minas Gerais, juntamente com a CEMIG pela colaboração do projeto.

Ao Dr. João Batista Fernandes e Dra. Ana Paula Terezan pela colaboração.

Ao amigo e colega de trabalho, Dr. Marcelo Gustavo Paulino, pela parceria e todo aprendizado ao longo do Mestrado. Por partilhar todos os momentos felizes e todas as dificuldades da pós-graduação. Obrigada por tudo!

À amiga Diana Amaral Monteiro, pela amizade e todos os conselhos. Pela paciência e dedicação para me ajudar com Bioquímica! Sou muito grata por todo carinho e por tudo que vem me ensinando ao longo desses anos. Certamente teria sido muito mais difícil sem você, muito obrigada!

À Ms. Priscila A. Rossi, por todos os ensinamentos e ajuda com as enzimas.

A todo os professores e amigos do Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (LZBC) do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF): Pri Pedrão, Fred, Talita, Marinão, Lívia, Gabi, Karina, Polly, Samantas, Pri Siqueira, Marina, Naiara, Jake, Nathan, Felipe, Renato, Gustavo, Raquel, Rafael Z, Will, Marise, Mariana, Iara, Cibele, Ive, Eliton, Vivian, Lucão, Profª Ana e Prof Cléo. Vocês fizeram meus dias naquele Departamento muito mais felizes! Todo meu carinho e gratidão!

Aos funcionários, Sr. Ângelo, Dona Graça, Carmem, Beth e ao secretário da Pós, Alexandre. Muito obrigada por estarem sempre dispostos a ajudar.

A todos os amigos feitos ao longo das disciplinas e turma de Mestrado. Em especial à Gabi, Fernandinha, Jeffinho e Lia. As aulas foram muito mais divertidas com vocês!

À minha amiga querida, Giovanna, por todo apoio e amor ao longo dessa vida. Por estar ao meu lado em todos os momentos me dizendo que tudo ia dar certo!

À Emanuele, por todo carinho e amizade no momento mais difícil.

A todos, que de certa forma contribuíram para meu trabalho eu agradeço. Muito obrigada!

“A grandeza de um homem não está na quantidade de riqueza que ele adquire, mas em sua integridade e habilidade de afetar positivamente as pessoas ao redor.”

Bob Marley

RESUMO

O aumento dos níveis de eutrofização dos ambientes aquáticos favorece o aparecimento e proliferação de cianobactérias que podem produzir compostos tóxicos e apresentar variados níveis de toxicidade. Microcistinas (MC) são hepatotoxinas que podem ser produzidas por diferentes espécies de cianobactérias, mas que podem afetar outros órgãos. O objetivo do presente estudo foi investigar se o extrato bruto da espécie *Radiocystis fernandoi* cepa R28 que contém como variantes majoritárias MC-RR e MC-YR e pequenas quantidades de outros oligopeptídeos, pode apresentar toxicidade em peixe (*Piaractus mesopotamicus*) comprometendo os processos osmorregulatórios em brânquias e rins, bem como a função hepática. *P. mesopotamicus* foram intraperitonealmente (i.p.) injetados com 100 µg de MC-LR equivalente por kg⁻¹ massa corpórea usando 0,5 mL de solução salina (NaCl 0,9%) como veículo e as brânquias, rins e fígado foram analisados 3, 6 e 24 horas após injeção utilizando biomarcadores bioquímicos e morfológicos. Os respectivos controles para cada tempo foram i.p. injetados com 0,5 mL de solução salina. As brânquias não apresentaram alterações nas proteínas fosfatases PP1e PP2A e nos rins houve inibição 6 h após injeção. Ocorreu alteração no equilíbrio iônico. Nas brânquias, a atividade da Na/K-ATPase (NKA) aumentou após 3 h, diminuiu após 6 h e não alterou após 24 h, as atividades da H-ATPase (HA) e da anidrase carbônica (AC) não foram alteradas; nos rins não houve alteração dessas enzimas. As células cloreto (CC) diminuíram 3 h após injeção de extrato bruto e mostraram tendência a aumentar nas lamelas após 6 e 24 horas. Várias histopatologias tais como hipertrofia celular, fusão parcial das lamelas e deslocamento e ruptura do epitélio lamelar foram observadas nas brânquias, mas não ocorreram alterações nos rins. As alterações histopatológicas e enzimáticas nas brânquias, após a injeção de extrato bruto de *R. fernandoi* e a alteração de Na⁺ plasmático evidenciam que as substâncias presentes no extrato influenciam a homeostase iônica em peixes. No fígado, embora não tenha ocorrido inibição das PP1 e PP2A, foram evidentes alterações na arquitetura hepática e celular, hiperemia, hipertrofia celular, atrofia celular, alterações nucleares e, após 24 horas, o aumento de inclusões intracelulares juntamente com núcleos picnóticos podem ser indicativos de morte celular. Além disso, alterações nas atividades plasmáticas de alanina aminotransferases (ALT), aspartato aminotransferases (AST), fosfatase ácida (FAC) e fosfatase alcalina (FAL) de função hepática bem como alteração nos níveis de bilirrubina, indicam comprometimento e danos na estrutura dos hepatócitos. Em conclusão, os resultados sugerem que o extrato bruto da cianobactéria *R. fernandoi* pode comprometer os processos osmorregulatórios com a alteração da NKA e células cloreto com consequente alteração na concentração plasmática de íons e apresentam toxicidade hepática comprometendo a função do fígado e podendo afetar a saúde e sobrevivência de peixes.

Palavras-chave: microcistina, MC-RR, MC-YR, osmorregulação, hepatotoxicidade, histopatologia, peixe.

ABSTRACT

Increasing levels of eutrophication in aquatic environments favors the appearance and proliferation of cyanobacteria that can produce toxic compounds and exhibit varying levels of toxicity. Microcystins (MCs) are hepatotoxins that can be produced by different species of cyanobacteria, but which can affect other organs. The objective of the present study was to investigate whether the crude extract of *Radiocystis fernandoi* strain R28, which contains MC-RR and MC-YR variants and small amounts of other oligopeptides, may present fish toxicity (*Piaractus mesopotamicus*), compromising the osmoregulatory processes in gills and kidneys, as well as liver function. *P. mesopotamicus* were injected intraperitoneally (ip) with 100 µg of MC-LR equivalent per kg-1 body weight using 0.5 ml of saline solution (NaCl 0.9%) as vehicle and the gills, kidneys and liver were analyzed 6 and 24 hours after injection using biochemical and morphological biomarkers. The respective controls for each time were i.p. injected with 0.5 mL of saline solution. The gills showed no changes in PP1 and PP2A phosphatase proteins and in the kidneys there was inhibition 6 h after injection. A change in ionic balance occurred. In the gills, Na/K-ATPase (NKA) activity increased after 3 h, decreased after 6 h and did not change after 24 h, the activities of H-ATPase (HA) and carbonic anhydrase (CA) were not altered; there was no change in these enzymes. Chloride cells (CC) decreased 3 h after crude extract injection and showed a tendency to increase in the lamellae after 6 and 24 hours. Several histopathologies such as cell hypertrophy, partial lamella fusion, and lamellar epithelial dislocation and disruption were observed in the gills, but no changes occurred in the kidneys. The histopathological and enzymatic changes in the gills after the injection of crude extract of *R. fernandoi* and the alteration of Na⁺ plasma show that the substances present in the extract influence the ionic homeostasis in fish. Changes in hepatic and cellular architecture, hyperemia, cellular hypertrophy, cellular atrophy, nuclear alterations and, after 24 hours, the increase of intracellular inclusions together with pycnotic nuclei may be indicative of the inhibition of PP1 and PP2A in the liver of cell death. In addition, alterations in plasma levels of alanine aminotransferases (ALT), aspartate aminotransferases (AST), acid phosphatase (ACP) and alkaline phosphatase (ALP) of liver function as well as changes in bilirubin levels indicate impairment and damage to hepatocyte structure. In conclusion, the results suggest that the crude extract of the *R. fernandoi* cyanobacteria can compromise the osmoregulatory processes with the alteration of the NKA and chloride cells with consequent alteration in the plasma concentration of ions and present hepatic toxicity compromising the function of the liver and being able to affect the health and survival of fish.

Key words: microcystin, MC-RR, MC-YR, osmoregulation, hepatotoxicity, histopathology, fish.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1.** Floração de cianobactérias na Lagoa de Jacarepaguá (Rio de Janeiro – RJ) em dezembro de 2014. Foto: Mario Moscatelli (Fonte: <https://oglobo.globo.com/rio/lagoa-de-jacarepagua-muda-de-cor-devido-presenca-de-cianobacterias-20846906>).....19
- Figura 2.** *Radiocystis fernandoi* (A) e (B) aspecto geral da colônia; notar a larga mucilagem. (C) e (D) Forma e disposição das células. Escala = 10 µm. (Palacio et al., 2015).....21
- Figura 3.** Estrutura geral da microcistina. Adaptado de Luca et al., 2010.....22
- Figura 4.** Mecanismos de toxicidade celular de MCs. (Paulino, 2015 adaptado de Valério et al., 2010).....25
- Figura 5.** Exemplar de *Piaractus mesopotamicus*, pacu. (Foto: Driele Tavares).....30

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Atividade de proteínas fosfatases nas brânquias (A e B) e rins (C e D) de *Piaractus mesopotamicus* dos grupos controle (C, injeção de solução salina) e dos grupos injetados com extrato bruto (EB, injeção de extrato bruto de *Radiocystis fernandoi*): atividade PP1 (A e C) e atividade PP2A (B e D). Os valores são médias ± E.P.M. *Indica diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao respectivo controle. (n = 8).....45
- Figura 2.** Atividade das enzimas Na/K-ATPase (A, D), H-ATPase (B, E) e anidrase carbônica (C, F) nas brânquias (A, B e C) e nos rins (D, E e F) em *Piaractus mesopotamicus* após 3, 6 e 24h de injeção i.p. Grupos controle (C, injeção de solução salina) e grupos de extrato bruto (EB, injeção de extrato bruto de *Radiocystis fernandoi*). Os valores são médias ± E.P.M. * Indica diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao respectivo controle. (n = 8).....46
- Figura 3.** Concentração de creatinina no plasma de *Piaractus mesopotamicus* dos grupos controle (C, injeção de solução salina) e grupos injetados com extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* (EB) 3, 6 e 24 h após injeção. Os valores são médias ± E.P.M. (n = 8).....47

Figura 4. Histologia de brânquias de *Piaractus mesopotamicus*. A e B representam grupo controle (injeção i.p. salina); A. Aspecto geral dos filamentos branquiais, B. Detalhe do epitélio do filamento e lamelas. SVC – seio venoso central; F – filamento; L – lamelas; CC – células cloreto; CPa – células pavimentosas; CPi – células pilares. C e D representam grupo extrato bruto (3 h após injeção i.p. de extrato bruto de cianobactéria *Radiocystis fernandoi*). C. Hiperplasia no epitélio do filamento; seta preta – hipertrofia do epitélio lamelar; CC – hipertrofia de células cloreto. D. seta vermelha e em destaque – ruptura do epitélio lamelar. Coloração azul de toluidina. Barra de escala = 20 µm. (n = 8).....50

Figura 5. Histologia de brânquias de *Piaractus mesopotamicus* após injeção i.p. extrato bruto de cianobactéria *Radiocystis fernandoi*. A e B representam grupo 6 horas após injeção: ausência de patologias. C e D representam grupo 24 horas após injeção: seta de cabeça redonda – fusão parcial de lamelas; ** – hiperplasia do epitélio lamelar; seta preta – ruptura do epitélio lamelar; * atrofia lamelar. Coloração azul de toluidina. Barra de escala = 20 µm. (n = 8).....51

Figura 6. Histologia de rim de *Piaractus mesopotamicus*. A. Representa grupo controle (injeção i.p. salina): G – glomérulo; TP – túbulo proximal; TI – túbulo intermediário; TD – túbulo distal e * presença de melanomacrófagos. B, C e D. Representam grupo extrato bruto 3, 6 e 24 horas após injeção i.p. extrato bruto de cianobactéria *Radiocystis fernandoi*, respectivamente. Coloração azul de toluidina e fucsina básica. Barra de escala = 20 µm. (n = 8).....52

Figura 7. Células cloreto Na/K-ATPase-positivas em brânquias de *Piaractus mesopotamicus* do grupo controle (C, injeção de solução salina) e grupo extrato bruto (EB, injeção de extrato bruto de *Radiocystis fernandoi*): epitélio do filamento (A) e epitélio lamelar (B). Os valores são médias ± E.P.M. * Indica diferença significativa (P <0,05) em relação ao respectivo controle. (n = 8).....53

Figura 8. Imunohistoquímica contra a enzima Na/K-ATPase em células cloreto (coradas com preto) em brânquias de *Piaractus mesopotamicus* do grupo controle (C, injeção de solução salina) e grupo extrato bruto (EB injeção de extrato bruto *Radiocystis fernandoi*): (A) grupo controle; (B) grupo EB3 h; (C) grupo EB6 h e (D) grupo EB24 h. Escala em 20 µm. (n = 8).....54

CAPÍTULO 2

Figura 1. Atividade das proteínas fosfatases no fígado de *Piaractus mesopotamicus* dos grupos controle (C, injeção de solução salina) e dos grupos injetados com extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* (EB): A. Atividade da PP1; B. Atividade da PP2A. Os valores são as médias \pm E.P.M. (n = 8).....76

Figura 2. Concentração de bilirrubina total e bilirrubina direta no plasma de *Piaractus mesopotamicus* do grupo controle (C, injeção de solução salina) e grupo injetados com extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* (EB) 3 (A), 6 (B) e 24 (C) h após injeção. Os valores são médias \pm E.P.M. * Indica diferença significativa (P <0,05) do respectivo controle. (n = 8).....79

Figura 3. Histopatologias no fígado de *Piaractus mesopotamicus*. A e B representam grupo controle (C, injeção i.p. salina). A. Aspecto geral do fígado mostrando vaso sanguíneo do sistema portal hepático (RAH), pequenos vasos e organização dos hepatócitos; B. Detalhe do fígado mostrando sinusóides (S) e hepatócitos (HP) em destaque. C e D representam grupo extrato bruto (EB, 3 h após injeção i.p. extrato bruto de cianobactéria *Radiocystis fernandoi*). Note hipertrofia celular (setas vermelhas) e a forma e inclusões citoplasmáticas em destaque. D. Aspecto geral do fígado mostrando hiperemia (setas pretas). Coloração azul de toluidina e fucsina básica. Barra de escala em A (50 μ m) B, C e D (20 μ m). (n = 8).....82

Figura 4. Histopatologia do fígado de *Piaractus mesopotamicus* após injeção i.p. extrato bruto de cianobactéria *Radiocystis fernandoi*. A e B representam grupo 6 horas após injeção. Note intensa hiperemia (setas pretas) e atrofia de alguns hepatócitos (seta amarela). C e D representam grupo 24 horas após injeção. Note hiperemia (setas pretas), alterações nucleares – degeneração e perda de formato da carioteca (seta amarela em A em destaque em B) e, em destaque em D, acúmulo de substâncias intracelulares. Coloração azul de toluidina e fucsina básica. Barra de escala em 20 μ m. (n = 8).....83

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1. Exemplos de L-aminoácidos presentes nas variantes de microcistinas.....23

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Alterações histopatológicas e classificação do fator de importância das lesões (Fi) para brânquias e rins de peixes. Onde (1) representa lesão reversível com mínima importância patológica; (2) lesões reversíveis quando o estressor é neutralizado e moderada importância patológica e (3) lesões geralmente irreversíveis de extrema importância patológica (Bernet, et al., 1999).....41

Tabela 2. Concentrações plasmáticas de íons Na⁺, K⁺ e Cl⁻ de *Piaractus mesopotamicus* do grupo controle (C, injeção de solução salina) e grupo extrato bruto (EB, injeção de extrato bruto de *Radiocystis fernandoi*) após 3, 6 e 24 h. Os valores são médias ± E.P.M. *Indica diferença significativa (P <0,05) em relação ao respectivo controle. (n = 8).....44

Tabela 3. Índice de lesão histopatológica em brânquias e rins de *Piaractus mesopotamicus* do grupo controle (C, injeção de solução salina) e grupo extrato bruto (EB, injeção de extrato bruto de *Radiocystis fernandoi*) após 3, 6 e 24 h e porcentagem (%) de alteração de EB em relação a C. (n = 8).....49

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Alterações histopatológicas e classificação do fator de importância das lesões (Fi) para fígado de peixes. Onde (1) representa lesão reversível com mínima importância patológica; (2) lesões reversíveis quando o estressor é neutralizado e moderada importância patológica e (3) lesões geralmente irreversíveis de extrema importância patológica (Bernet, et al., 1999).....75

Tabela 2. Atividade da fosfatase ácida (FAC), fosfatase alcalina (FAL), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) no plasma de *Piaractus mesopotamicus* do grupo controle (C, injeção de solução salina) e grupo injetado com extrato bruto de cianobactéria *Radiocystis fernandoi* (EB) 3, 6 e 24 h após injeção i.p. Os valores são as médias (\pm E.P.M.). * Indica diferença significativa entre os respectivos grupos C e EB ($p < 0,05$). (n = 8).....78

Tabela 3. Índice de lesão histopatológica no fígado de *Piaractus mesopotamicus* do grupo controle (C, injeção de solução salina) e grupo injeção de extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* (EB), após 3, 6 e 24 h. A diferença em porcentagem (%) entre os respectivos grupos C e EB são dados. (n = 8).....81

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	18
1.1. Eutrofização dos ambientes aquáticos	18
1.2. Cianobactérias	19
1.3. Microcistinas	22
1.4. Mecanismo de ação das microcistinas (MC), efeito celular e ação tóxica	23
1.5. Biomarcadores	27
1.6. A espécie <i>Piaractus mesopotamicus</i> (Holmberg, 1887)	29
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBEJITOS	31
3.1. Objetivo geral	31
3.2. Objetivos específicos	32
CAPÍTULO 1: Efeito do extrato bruto de cianobactérias, <i>Radiocystis fernandoi</i> sobre as brânquias e rins de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i>, com ênfase aos processos osmorregulatórios e alterações morfofuncionais	33
Resumo	34
1. Introdução	35
2. Materiais e métodos	36
2.1. Cultura da cianobactéria <i>Radiocystis fernandoi</i> R28, extração e quantificação de MC	37
2.2. Delineamento experimental	37
2.3. Determinação da concentração dos íons Na ⁺ , K ⁺ e Cl ⁻ no plasma.....	38
2.4. Análises Bioquímicas	38
2.4.1. Determinação de PP1 e PP2A endógena	38
2.4.2. Determinação da atividade das enzimas relacionadas à regulação iônica (NKA, HA, AC)	39
2.4.3. Determinação da concentração de creatinina plasmática	40
2.5. Análises Morfológicas.....	40
2.5.1. Histopatologias de brânquias e rins	40
2.5.2. Imunohistoquímica de células cloreto (CC) nas brânquias	42

2.6. Análise Estatística	43
3. Resultados	43
3.1 Íons plasmáticos	43
3.2 Atividade de PP1 e PP2A endógena em brânquias e rins	44
3.3. Atividade enzimática da NKA, HA e AC	45
3.4. Níveis de creatinina	46
3.5. Histopatologias em brânquias e rins	47
3.6. Imunohistoquímica de células cloreto nas brânquias	53
4. Discussão	54
5. Conclusões	60
6. Agradecimentos	60
7. Referências	60

CAPÍTULO 2: Efeito do extrato bruto de cianobactéria *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas no fígado de *Piaractus mesopotamicus*

Resumo	69
1. Introdução	70
2. Materiais e métodos	71
2.1. Cultura da cepa Cianobactéria <i>Radiocystis fernandoi</i> R28, extração e quantificação de MC	71
2.2. Delineamento experimental	72
2.3. Determinação de PP1 e PP2A endógena	73
2.4. Enzimas de injúria hepática (FAC, FAL, ALT, AST)	73
2.5. Bilirrubina	74
2.6. Histopatologia	74
2.7. Análises estatísticas	75
3. Resultados	76
3.1. Atividade de PP1 e PP2A endógena em fígado.....	76
3.2. Biomarcadores bioquímicos de injúria hepática	77
3.2.1. Atividade de enzimas no plasma	77
3.2.2. Bilirrubina	79

3.3. Histopatologias	79
4. Discussão	84
5. Conclusões	88
6. Agradecimentos	88
7. Referências	88
CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
REFEÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	96

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Eutrofização dos ambientes aquáticos

Eutrofização é o processo causado pelo aumento de nutrientes, especialmente fósforo e nitrogênio e também acúmulo de matéria orgânica nos ambientes aquáticos. O processo de eutrofização pode ter origem natural ou artificial. A eutrofização natural é um processo lento e acontece pelo acúmulo espontâneo de matéria orgânica e pode levar até dezenas de anos. O processo artificial ou cultural está relacionado com ações antrópicas como a utilização de fertilizantes agrícolas, dejetos domésticos (esgotos) não tratados ou ainda os efluentes industriais despejados em rios, lagos e reservatórios (Wetzel, 1993). Todos esses fatores refletem um aumento das atividades humanas originárias de atividades domésticas, urbanas e agrícolas em decorrência ao aumento da industrialização e crescimento populacional (Siqueira, 2008).

O aporte de nutrientes juntamente com outros fatores como abundância de luz, pH neutro e temperatura elevada proporcionam um ambiente favorável para o desenvolvimento de organismos como cianobactérias com a formação de uma densa camada de células conhecido como floração ou “bloom” (Chorus e Bartram, 1999; Soares, 2009). Floração de cianobactérias tem sido registrada em diferentes locais do Brasil e outros países e um exemplo dessas florações é mostrado na Figura 1 ocorrido na Lagoa de Jacarepaguá, Rio de Janeiro, RJ, em 2014. O aparecimento de florações traz consequências para os corpos d’água como diminuição da disponibilidade de oxigênio dissolvido devido à respiração pela própria alga ou durante a decomposição das suas células por bactérias que consomem o oxigênio dissolvido na água, alteração nas propriedades organolépticas da água bem como diminuição na transparência hídrica podendo causar comprometimento do abastecimento de água. A proliferação de cianobactérias pode ainda comprometer a qualidade da água uma vez que

esses organismos podem ser produtores de toxinas apresentando risco a saúde humana e de animais.



Figura 1. Floração de cianobactérias na Lagoa de Jacarepaguá (Rio de Janeiro – RJ) em dezembro de 2014. Foto: Mario Moscatelli (Fonte: <https://oglobo.globo.com/rio/lagoa-de-jacarepagua-muda-de-cor-devido-presenca-de-cianobacterias-20846906>).

1.2. Cianobactérias

Cianobactérias também denominadas cianofíceas ou algas azuis são organismos procarióticos e fotossintetizantes. As florações de cianobactérias podem causar impacto nos ecossistemas aquáticos como a depleção de oxigênio ou liberação de substâncias tóxicas no meio. Aproximadamente 70% das cianobactérias conhecidas produzem toxinas e uma espécie pode produzir mais de um tipo de toxina (Soares et al., 2004). A liberação de substâncias tóxicas, denominadas cianotoxinas, ocorre após a morte e lise das cianobactérias extravasando do conteúdo celular no meio aquático (Beasley et al., 1989; Mohamed e Hussein, 2006).

Numa floração pode ocorrer várias espécies de cianobactéria e produzir mais de uma variante de cianotoxina. Da mesma forma, uma mesma espécie de cianobactéria pode ter cepas tóxicas e não tóxicas (Apeldoorn, 2007).

No ambiente natural, as cianobactérias podem ocorrer de forma unicelular isolada, como nos gêneros *Synechococcus*, *Aphanothece* e *Aphanocapsa*. Podem também ser unicelulares coloniais como *Microcystis*, *Gomphospheria* e *Merismopedium* ou constituídas de células organizadas em uma unidade em série, filamentos, como *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Anabaena* e *Cylindrospermopsis* (Azevendo et al., 2006).

O gênero *Radiocystis* foi descrito por Skuja em 1948 e a espécie *Radiocystis fernandoi* foi inicialmente descrita em 1993 por Komárek and Komárková-Legnerová. Há relatos de sua presença na Indonésia e Sri Lanka (Komárek e Komárková-Legnerová, 1993), Belém/PA (Vieira et al., 2003), Diamante do Norte/Paraná (Borges et al., 2003), São Paulo/SP (Sant'Anna et al., 2004) e Furnas/MG (Pereira et al., 2012). A espécie *R. fernandoi* possui colônias arredondadas ou irregulares, formadas por uma ou vários grupos de células com disposição radial do centro para a periferia, mucilagem hialina e aerótopos visíveis (Sant'Anna et al., 2004) (Fig. 2). Ela está presente em ambientes tropicais e subtropicais, é também produtora de microcistinas (MC) e tem sido frequentemente encontrada em reservatórios do Brasil (Vieira, 2003).

Embora não se tenha muito conhecimento sobre o potencial tóxico dessa espécie de cianobactéria, Paulino et al., (2017a e 2017b) observaram toxicidade em traíras, *Hoplias malabaricus*, após exposição aguda e crônica do extrato bruto de *R. fernandoi* cepa R28. Borges et al., (2003) estudando as variações temporais na estrutura da comunidade fitoplanctônica no Paraná, constataram que *R. fernandoi* representou mais de 70% da biomassa total das cianobactérias identificadas.

Assim como os fatores ambientais como disponibilidade de nutrientes, luz e temperatura são favoráveis na produção de florações, a variabilidade genética é também determinante para a variação do nível de toxinas produzidas pelas cianobactérias (Figueiredo et al., 2004). Com isso, concentrações de cianotoxinas encontradas em ambientes naturais pode ser bastante variada. Cianotoxinas podem ser de diferentes tipos e são classificadas de acordo com seu órgão-alvo em vertebrados: dermatotoxinas, neurotoxinas e hepatotoxinas. As hepatotoxinas têm sido bastante estudadas por ser a forma de intoxicação mais recorrente (Leal e Soares, 2004). Estas toxinas, denominadas microcistinas (MC) e nodularinas (NOD), são produzidas por linhagens e espécies dentre os gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Hapalosiphon*, *Nodularia*, *Nostoc* e *Oscillatoria* (Carmichael, 1997). No gênero *Microcystis*, a espécie *Microcystis aeruginosa* é a mais conhecida produtora de MCs porém, a espécie *R. fernandoi* também produz a toxina (Pereira et al., 2012).

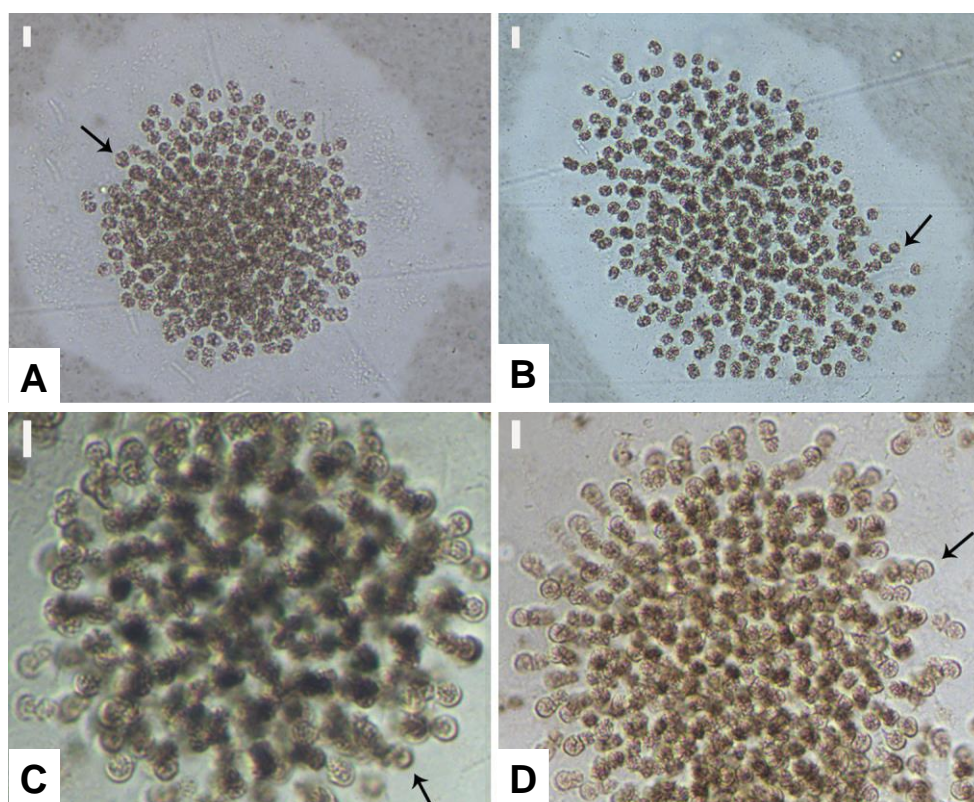


Figura 2. *Radiocystis fernandoi* (A) e (B) aspecto geral da colônia; notar a larga mucilagem. (C) e (D) Forma e disposição das células. Escala = 10 μ m. (Palacio et al., 2015).

1.3. Microcistinas

Microcistinas são classificadas como hepatotoxinas com maior predominância e potencial tóxico produzidas por mais de um gênero de cianobactérias (Liyanage et al., 2016). É um composto bastante estável, resistente à hidrólise enzimática e suportam variações de temperatura e pH. Sob a temperatura de 40 °C a meia vida da MCs é de 3 e 10 semanas em pH 1 e 9, respectivamente (Harada et al., 1996).

Estruturalmente, as MCs são heptapeptídeos cíclicos que apresentam quatro aminoácidos fixos, sendo D-alanina (posição 1), ácido D-metilaspartico (posição 3), um aminoácido específico ADDA (3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienoico; (posição 5), ácido D-glutâmico (posição 6), Mdha (N-metildehidroalanina; posição 7) e dois L-aminoácidos variáveis na posição 2 (R1) e 4 (R2) (Rinehart et al., 1988) (Fig. 3).

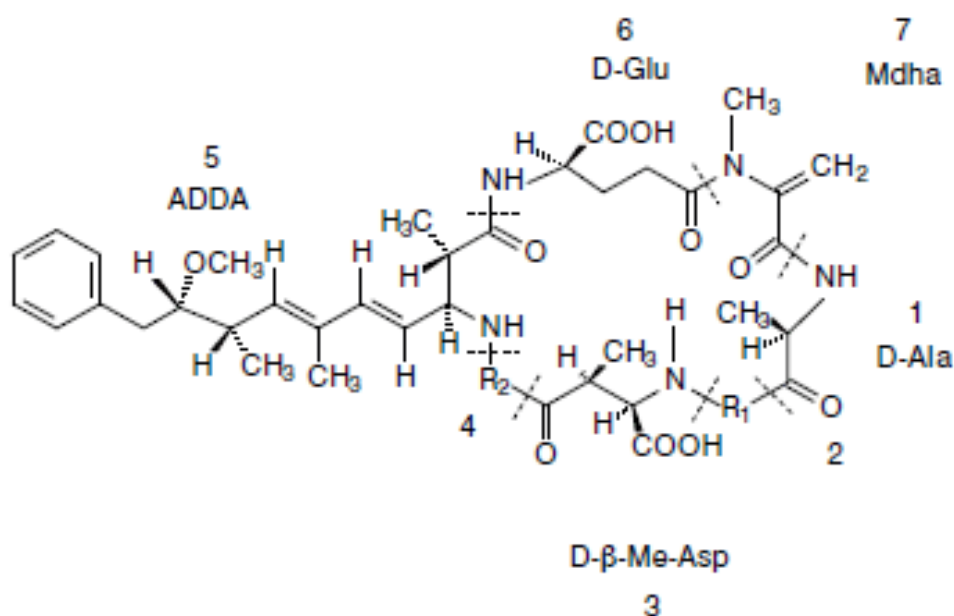


Figura 3. Estrutura geral da microcistina. Adaptado de Luca et al., 2010.

Já foram descritos mais de 90 tipos diferentes de MC e a combinação dos 2 aminoácidos variáveis determinam sua estrutura e nomenclatura (Welker e von Döhren, 2006) (Tabela 1), além do grau de toxicidade que difere quanto maior ou menor hidrofília, dependendo dos aminoácidos presentes na molécula (Mattos, 2011). Dentre as principais variantes de MC estão a MC-LR, MC-RR e MC-YR e, apesar da MC-LR ser predominantemente mais tóxica, muitos estudos tem mostrado que as outras MC também são potencialmente nocivas podendo representar perigo para saúde ambiental, do animal e do homem (Cazenave et al., 2006; Gupta et al., 2003; Prieto et al., 2006; Zhang et al., 2008, Paulino et al., 2017).

Tabela 1. Exemplos de L-aminoácidos presentes nas variantes de microcistinas.

Microcistinas	Posição 2 (R1)	Posição 4 (R2)
MC-LR	Leucina	Arginina
MC-RR	Arginina	Arginina
MC-YR	Tirosina	Arginina
MC-LA	Leucina	Alanina
MC-LL	Leucina	Leucina
MC-LY	Leucina	Tirosina
MC-AR	Alanina	Arginina

1.4.Mecanismo de ação das microcistinas (MC), efeito celular e ação tóxica

As MCs são consideradas hepatotoxinas por ter o fígado como órgão-alvo pois são facilmente captadas pelos hepatócitos via polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATPs). Os OATPs são transportadores transmembrana capazes de transportar substâncias endógenas como sais biliares, hormônios, cátions orgânicos, entre outros e substâncias exógenas, como xenobióticos e estão presentes no fígado, rim, intestino, cérebro, coração, pulmão, baço, pâncreas, pele e barreira hemato-encefálica (Feurstein et al., 2009; Sortica, 2009; Steiner et al., 2015).

O principal mecanismo de ação das MCs é através da inibição das proteínas fosfatases da família serina e treonina, PP1 e PP2A (Honkanen et al., 1990). Essas proteínas estão localizadas no citosol ligadas a outras proteínas alvos que estão relacionadas com vários processos celulares como proliferação, divisão e ciclo celular (Mumby e Walter, 1993; Janssens e Goris, 2001; Strack et al., 2004) e também metabolismo de glicogênio, regulação proteica, contração muscular, síntese de colesterol e ácidos graxos, glicólise, gliconeogênese e quebra de aminoácidos aromáticos (Cohen, 1989; Nelson e Cox, 2005).

Em ambiente natural, uma das principais formas de contaminação é através da ingestão das cianobactérias que são lisadas no estômago liberando seu conteúdo tóxico. Após absorção, a toxina chega, via circulação portal, até o fígado onde é captada pelos OATPs dos hepatócitos interagindo com os mesmos (Fischer et al., 2005; Evers e Chu, 2008). O aminoácido ADDA da molécula MC se liga às proteínas fosfatases PP1 e PP2A, inibindo a atividade das mesmas. Esta inibição enzimática resulta na hiperfosforilação de outras proteínas e alvos subcelulares ligadas a microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários, sendo este o efeito estrutural mais pronunciado causando desorganização do citoesqueleto e perda do formato celular com desarranjo da estrutura de hepatócitos e, conseqüentemente, de todo tecido hepático provocando hemorragias intra-hepática e/ou proliferação celular dando origem a tumores a até morte celular (Falconer e Yeung, 1992; Runnegar, 1999; Wickstrom et al., 1995; Fischer, 2000; Li, 2005; Matos, 2011; Jiang et al., 2013).

Alguns mecanismos concomitantes e/ou consecutivos estão relacionados a toxicidade celular (Valerio et al., 2010) como ativação da proteína quinase II multifuncional dependente de cálcio-calmodulina (CaMKII) com conseqüente produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e dano oxidativo (Weng et al., 2007; Ding et al., 2011), ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) que regulam diversas atividades celulares como expressão

de proto-oncogenes, mitose, diferenciação, proliferação e apoptose celular (Gehring, 2004), atua ainda na ativação das quinases Nek2 que participa do controle de progressão mitótica e segregação cromossômica (Campos e Vasconcelos, 2010). MCs ainda podem causar danos genotóxicos pela sua capacidade de inibir sistemas de reparo de DNA (Rao et al., 1998; Gaudin et al., 2008) (Figura 4).

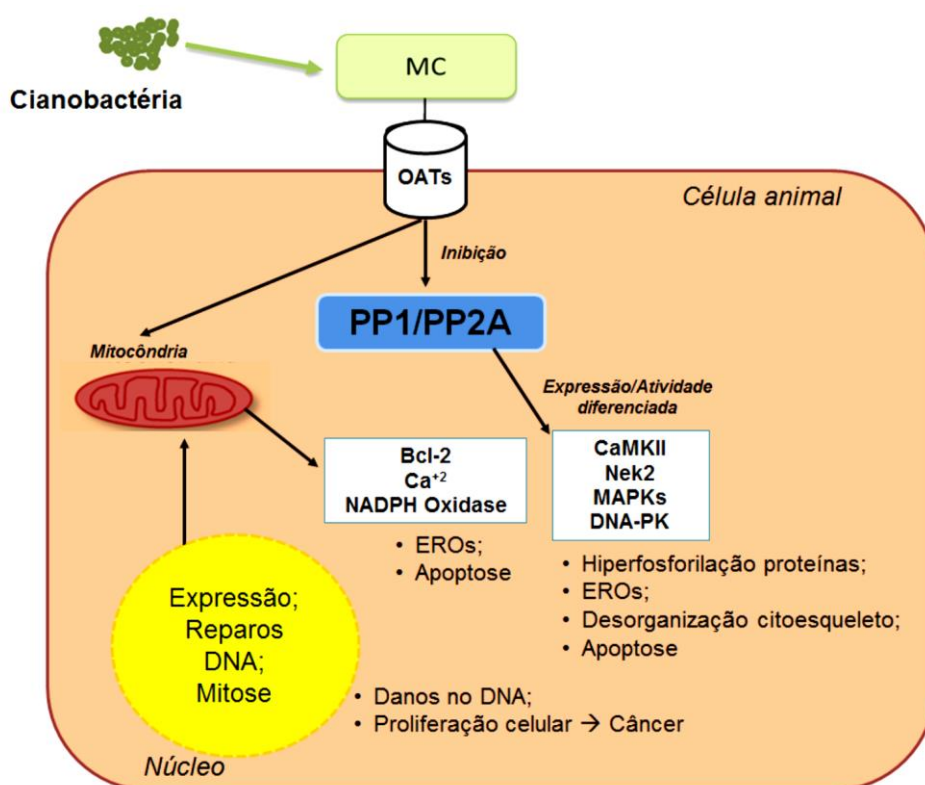


Figura 4. Mecanismos de toxicidade celular de MCs. (Paulino, 2015 adaptado de Valério et al., 2010).

A contaminação em peixes pode ocorrer através da alimentação ou ainda passivamente quando as toxinas passam pelas brânquias durante a respiração, diminuição da disponibilidade de oxigênio dissolvido durante a floração (Molbrouck e Kestemont, 2006) ou ainda, por irritação física em razão da densidade das cianobactérias ou devido ao efeito tóxico direto

(Rodger et al., 1994). Os principais efeitos da MC nos primeiros estágios de vida dos peixes estão entre aumento da mortalidade, diminuição da taxa de sobrevivência, alterações no fígado (Oberemm et al., 1997; Oberemm et al., 1999; Wiegang et al., 1999; Palikova et al., 2004) e alterações na enzima glutathione S-transferase (Pietch et al., 2001; Best et al., 2002). Em adultos, os principais efeitos são elevação das atividades plasmáticas de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e do conteúdo de bilirrubina, disrupção na arquitetura parenquimal hepática, danos em hepatócitos e necrose do fígado (Bury et al., 1995; Navratil et al., 1998; Carbis et al., 1997; Lowe et al., 2012; Kopp et al., 2014; Wang et al., 2014) e ainda alterações na enzima ormorregulatória Na/K-ATPase (Gaete et al., 1994; Zambrano e Canelo, 1996).

Em humanos, a exposição às MC pode ocorrer via ingestão ou contato com água contaminada no abastecimento para o consumo ou locais de recreação podendo provocar desde irritações na pele até gastroenterites agudas (Leal, 2004). Em peixes que vivem em ambientes contaminados e se alimentam de outros seres que, por sua vez se alimentam de cianobactérias, há riscos de bioacumulação por contaminação da cadeia trófica (Kurmayer, 1999) com o risco de atingir humanos através do consumo de peixes. A intoxicação por cianotoxinas, via água, ocorre após lise celular das cianobactérias por senescência ou processos de tratamento de água (Figueiredo, 2004). O risco do consumo de água contaminada por humanos ou animais fez com que a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabelecesse limites para a presença dessas toxinas em água; de acordo com a OMS o nível seguro para o consumo humano é até $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MCs na água (WHO, 2008). No Brasil, o Ministério da Saúde adotou esse valor como referência para a água potável (Brasil, 2004). A OMS também estabelece que a quantidade de ingestão diária tolerável, para a variante potencialmente mais tóxica (MC-LR), de $0,04 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa corpórea. No Brasil, já foram reportados alguns casos de contaminação como no reservatório de Itaparica, na Bahia, em

1988, onde 88 pessoas faleceram e mais de 200 foram intoxicadas devido ao consumo da água do reservatório contaminada com *Microcystis* (Teixeira et al., 1993). Outro exemplo mundialmente conhecido ocorreu na cidade de Caruaru – Estado de Pernambuco, Brasil, em 1996, onde 123 pacientes renais crônicos foram submetidos à sessão de hemodiálise com água contaminada por MCs culminando com 54 óbitos (Azevedo, 1998).

1.5. Biomarcadores

Segundo a Organização Mundial da Saúde (1993), em um sentido amplo, biomarcadores são utilizados como qualquer medida que reflita uma interação entre um sistema biológico e um risco potencial que pode ser químico, físico ou biológico e a resposta pode ser funcional e fisiológica, bioquímica em nível celular, ou uma interação molecular. Biomarcadores, portanto, são utilizados para avaliar a exposição a xenobióticos e seus efeitos nos organismos e podem ser utilizados independentemente da fonte de exposição (Amorim, 2003).

Biomarcadores fisiológicos plasmáticos são amplamente utilizados para detectar alterações causadas por xenobióticos em peixes uma vez que o sangue entra em contato com todos os compostos absorvidos ao serem distribuídos entre os demais tecidos (Clauss et al., 2008), assim, variações nos parâmetros hematológicos sobre a regulação iônica e balanço osmótico que podem incluir perda de eletrólitos através das brânquias ou efeitos específicos na absorção e excreção de eletrólitos (Schlenk et al., 2008).

As alterações dos sistemas de defesa bioquímica são uma resposta inicial típica a qualquer contaminação tóxica por xenobióticos, portanto a mediação desses sistemas pode ser indicador extremamente sensível de funções celulares alteradas (Schlenk et al., 2008). Brânquias, rins e intestinos são os órgãos responsáveis pelos processos osmorregulatórios e

balanço iônico em peixes (Wendelaar Bonga e Lock, 2008). Distúrbios nas concentrações iônicas podem estar relacionados com danos morfológicos no tecido branquial e renal, ou ainda, inibição na atividade enzimática relacionadas a regulação osmo-iônica devido as alterações ambientais e presença de estressores (Morgan et al., 1997; Bury, 2005; Bury et al., 1996; Paulino et al., 2012). As células cloreto (CC) são as principais células de troca iônica e são responsáveis pela captação de Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} em peixes de água doce (Evans et al., 1999; Fernandes et al., 2007). Essas células são ricas em unidades de ATPases [sódio-potássio-ATPase (Na/K-ATPase), hidrogênio-ATPase (H-ATPase) e cálcio ATPase (Ca-ATPase)], anidrase carbônica (AC) além de canais de Na^+ e trocadores como $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e Na^+/H^+ ou NH_4^+ (Hiroi e McCormick, 2012).

O fígado apresenta diversas funções tais como metabolização, excreção, síntese, armazenamento bem como efeitos na desintoxicação e por isso ele se torna principal órgão alvo da ação de toxinas, assim como a MC e as alterações das atividades das enzimas podem ser utilizadas como indicadores de distúrbios metabólicos ou de danos teciduais (Motta, 2000; Leal e Soares, 2004). As enzimas de função hepática são utilizadas para detectar disfunção nesse tecido, as aminotransferases ou as transaminases são um grupo de enzimas que catalisam a interconversão de aminoácidos e ácidos graxos pela transferência de um grupo amino. Aspartato aminotransferases (AST), anteriormente denominado transaminase glutâmica oxalacética (TGO) e alanina aminotransferase (ALT), anteriormente denominado piruvato-transaminase glutâmica pirúvica (TGP) são as duas aminotransferases de maior significância clínica (Vroon and Israili, 1990; Motta, 2000). Para uma avaliação mais completa de hepatotoxicidade, recomenda-se utilizar diferentes biomarcadores associados com dano hepático, tais como a atividade das fosfatases ácidas (FAC) e alcalinas (FAL) e o conteúdo metabólico de bilirrubina no plasma (Motta, 2000). A utilização de atividades

enzimáticas e constituintes bioquímicos ou metabólicos tem sido amplamente explorada pela sua alta sensibilidade e eficiente resposta mediante a estresse (Moraes, 2009).

Além desses biomarcadores ainda há os biomarcadores morfológicos. Os organismos dos peixes podem apresentar alterações estruturais nos tecidos em função da contaminação por tóxicos no meio ambiente que podem se manifestar por várias lesões ou doenças internas ou externas (Au, 2004). As alterações morfológicas e histológicas podem, como consequência, alterar as funções bioquímicas, metabólicas e fisiológicas dos animais. A utilização da abordagem histopatológica não é só importante para estabelecer os índices de toxicidade, mas também para identificação de órgão e mecanismos alvo (Schlenk et al., 2008). Brânquias nos peixes podem sofrer mudanças patológicas em função de alterações de salinidade, temperatura, níveis de oxigênio e exposição a xenobióticos (Sollid e Nilsson, 2006; Mitrovic e Perry, 2008). Fígado e rins desempenham funções importantes em metabolização, excreção e homeostase da saúde dos peixes e quaisquer xenobiótico capaz de interagir com enzimas ou proteínas desses tecidos podem causar alterações histológicas (Bernet et al., 1999). As análises histopatológicas apresentam uma ferramenta importante como biomarcador para avaliar potencial risco para organismos aquáticos que podem interferir na reprodução e no desenvolvimento (Wester et al., 2002; Schlenk, et al., 2008).

1.6.A espécie *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Fig. 5) é um representante da superordem Ostariophysi e tem alto valor comercial na pesca e na piscicultura brasileira, por ser um peixe amplamente consumido pela população (Badisserotto, 2014). Além disso, por ter a biologia bastante conhecida e ocorrer em ambientes sujeitos a florações de cianobactérias é um modelo

biológico adequado para avaliar o impacto na saúde de peixes em contato com as cianotoxinas.



Figura 5. Exemplar de *Piaractus mesopotamicus*, pacu. (Foto: Driele Tavares).

Segundo Holmberg (1887) a espécie possui a seguinte classificação sistemática:

Classe: Osteichthyes

Subclasse: Actinopterygii

Divisão: Teleostei

Superordem: Ostariophysi

Ordem: Characiforme

Família: Characidae

Subfamília: Serrasalminae

Gênero: *Piaractus*

Espécie: *Piaractus mesopotamicus*

2. JUSTIFICATIVA

A presença de MCs em peixes, além de comprometer suas funções orgânicas, pode levar a mortalidade em massa de diversas espécies ou bioacumular nos tecidos e, indiretamente, afetar a saúde de outros animais em nível trófico através da alimentação ou ainda a saúde humana após consumo. Embora a concentração de letalidade de MC não seja estabelecida para a maioria das espécies de peixes, sabe-se que a concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, via injeção intraperitoneal, é capaz de levar ratos a morte em apenas 1 hora. Em estudos realizados na Lagoa de Jacarepaguá (Rio de Janeiro, Brasil), Magalhães e colaboradores (2001) detectaram concentração máxima de $980 \mu\text{g L}^{-1}$ de microcistinas. Concentrações como essas são consideradas altas e aparecem em florações mais intensas embora, em ambiente natural possamos encontrar variadas concentrações que mudam de acordo com a espécie entre outros fatores e ainda é possível ter oscilações diárias de concentração de cianotoxinas (Chorus e Bartram, 1999; Magalhães et al., 2001).

Embora os efeitos de cianobactérias em peixes têm sido bastante estudado, a grande variedade de espécies de cianobactérias com produção de diferentes toxinas e, conseqüentemente, níveis de toxicidade torna importante uma ampla pesquisa a fim de determinar quão tóxico diferentes espécies e gêneros de cianobactérias podem ser e se a saúde dos peixes pode ser comprometida.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da exposição ao extrato bruto da cianobactéria *Radiocystis fernandoi*, cepa R28, contendo MC-RR, MC-YR e outros oligopeptídeos, em brânquias, fígado e rins de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

3.2.Objetivos específicos

- I. Avaliar os efeitos do extrato bruto nos processos osmorregulatórios de brânquias e rins e possíveis alterações histológicas;
- II. Analisar o comprometimento da função hepática e alterações na estrutura do fígado, via manifestação de histopatologias.

CAPÍTULO 1

Efeito do extrato bruto de cianobactérias, *Radiocystis fernandoi* sobre as brânquias e rins de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, com ênfase nos processos osmorregulatórios e alterações morfofuncionais

Resumo

A proliferação de cianobactérias em rios e lagos, causada por processos de eutrofização, pode aumentar a liberação de substâncias tóxicas chamadas cianotoxinas. A cianobactéria *Radiocystis fernandoi* produz compostos tóxicos como microcistinas e outros peptídeos que podem interferir nas atividades das enzimas relacionadas regulação iônica e osmótica. Juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) foram divididos em 6 grupos experimentais sendo 3 que receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de extrato bruto de *R. fernandoi* cepa R28, contendo 100 µg de MC-LR equivalente por kg⁻¹ diluído em 0,5 mL de solução salina (NaCl 0,9%) usada como veículo (grupo EB) e 3 controles (grupo C) que receberam 0,5 mL de solução salina. Após 3 h, 6 h e 24 h, amostras de sangue, brânquias e rins foram coletadas para análise. As concentrações de íons no plasma e a atividade das enzimas PP1 e PP2A, Na/K-ATPase (NKA), H-ATPase (HA) e anidrase carbônica (AC) nas brânquias e rins foram determinadas e efetuada a análise histológica nesses tecidos: histopatologia em brânquias e rins e imunohistoquímica contra NKA nas brânquias. A concentração plasmática de Na⁺ diminuiu nos grupos EB após 3 h e aumentou após 24 h; a concentração de K⁺ diminuiu após 6 h. A atividade das PP1 e PP2A endógenas não foi alterada nas brânquias; nos rins foi inibida 6 h após a injeção. Nas brânquias, a atividade da NKA aumentou após 3 h, diminuiu após 6 h e não se alterou após 24 h; a atividade da HA não foi alterada e a atividade da AC diminuiu após 3 h. Nos rins, as atividades dessas enzimas se mantiveram inalteradas. As alterações histopatológicas mais frequentes nas brânquias foram hiperplasia do epitélio do filamento, hipertrofia, atrofia, fusão lamelar e ruptura do epitélio 3 h e 24 h pós injeção. Após 6 h não houve alterações histopatológicas. O número de células cloreto (CC) diminuiu após 3 h no filamento e lamela; diminuiu apenas nas lamelas após 6 h e aumentou nas lamelas após 24 h. Nos rins não ocorreram alterações histopatológicas. As alterações na atividade das enzimas NKA e AC evidenciam mecanismos para controlar o desequilíbrio iônico o que sugere que as cianotoxinas e outros compostos presentes no *R. fernandoi* afetam as concentrações de íons plasmáticos devido as alterações histopatológicas e nas CC nas brânquias.

Palavras-chave: MC-RR, MC-YR, Na/K-ATPase, H-ATPase, anidrase carbônica, células cloreto.

1. Introdução

Os processos de eutrofização em rios e lagos causados pelo aumento das atividades humanas proporcionam um ambiente favorável ao desenvolvimento de cianobactérias que podem ser produtoras de neurotoxinas ou hepatotoxinas. As microcistinas (MC) e as nodularinas (NOD), conhecidas por sua ação hepatotóxica, são produzidas por diferentes cepas de espécies dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Hapalosiphon*, *Nodularia*, *Nostoc* e *Oscillatoria* (Carmichael et al., 1997) e têm sido amplamente estudadas como causa recorrente de intoxicação animal (Azevedo et al., 2006). Estruturalmente MC é um heptapeptídeo cíclico constituído por 5 D-aminoácidos fixos e 2 L-aminoácidos variáveis (Rinehart et al., 1988) que caracterizam as numerosas variantes das quais MC-LR, MC-RR, MC-YR e MC-LA são os mais comuns (Rahman et al., 1993). A espécie, *Radiocystis fernandoi*, também produz MC, foi descrita por Komárek e Komárková-Legnerová, em 1993 e tem sido encontrada em lagos e reservatórios no estado de São Paulo, Brasil, no Reservatório de Utinga, cidade de Belém, estado de Pará (Vieira et al., 2003; Sant'Anna et al., 2008).

Radiocystis fernandoi cepa R28, isolada em florações de cianobactérias no reservatório de Furnas (20° 40'S, 46° 19'W), Minas Gerais, Brasil, produz majoritariamente MC-RR e MC-YR e outros oligopeptídeos secundários tais como MC-FR e MC-WR, cianopeptolina-1071 e microviridina-1709; esta cepa não produziu MC-LR independente da condição ambiental (Pereira et al., 2012; Pereira et al., 2015; Pereira e Giani, 2014). Essas variantes têm toxicidade menor do que a MC-LR (Gupta et al., 2003), mas constituem risco para a saúde de animais e humanos (Zhao et al., 2012; Huguet et al., 2013; Paulino et al., 2017b). O principal mecanismo de toxicidade das MC é a inibição da fosfatases da família de serina/treonina, PP1 e PP2A, iniciando uma cascata de reações intracelulares, tais como hiperfosforilação de componentes do citoesqueleto, afetando o mesmo e resultando em

desorganização celular com consequente disfunção tecidual (Runnegar et al., 1995; Campos e Vasconcelos, 2010; Fischer et al., 2000; Chen et al., 2016). Embora essas enzimas estejam presentes em maior quantidade no fígado, elas são encontradas em outros órgãos, tais como brânquias, rins e intestino, e sua inibição pode afetar o funcionamento desses órgãos (Carbis et al., 1996; Fischer et al., 2000; Wiegang e Pflugmacher, 2005; Bieczynski et al., 2014).

A função principal das brânquias é a troca de gases respiratórios (O_2 e CO_2), mas também desempenham outras funções importantes. Elas são o principal órgão osmorregulatório no peixe teleósteo, em que a absorção ou excreção ativa de íons ocorre contra um gradiente de concentração na água doce ou água do mar, respectivamente (Takei et al., 2014) e ainda, participa do equilíbrio ácido-base e da excreção de nitrogênio (Evans et al., 2005). Juntamente com as brânquias, os rins desempenham papel importante na osmorregulação e equilíbrio ácido-base (Whittamore, 2012). A osmorregulação é um dos processos mais importantes em animais e humanos e seu desequilíbrio altera a função das células.

As toxinas das cianobactérias e outros compostos celulares quando em contato com peixes podem ser absorvidos e transportados através da corrente sanguínea e, posteriormente, ser absorvidos pela membrana celular de diferentes órgãos, via difusão ou sua estrutura e função. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da toxina da cianobactéria *R. fernandoi*, cepa R28 no equilíbrio iônico em peixe (*Piaractus mesopotamicus*). *Piaractus mesopotamicus*, comumente conhecido como pacu, é amplamente distribuído nas Bacias do Paraná e Paraguai e locais com possibilidade de ocorrências de florações de cianobactérias e muito consumidas pela população.

2. Materiais e Métodos

2.1.Cultura da cianobactéria *Radiocystis fernandoi* R28, extração e quantificação de MC

Radiocystis fernandoi cepa R28 foi cultivada de acordo com Pereira et al. (2012) no Laboratório de Fitologia do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Minas Gerais. O extrato bruto foi obtido de cianobactérias liofilizadas de acordo com Paulino et al. (2017a). A quantificação de MC (MC-LReq, MC totais que equivalem a toxicidade de MC-LR) no extrato foi determinada usando kit comercial de ensaio de imunabsorbância enzimática (ELISA) (Beacon Analytical Systems Inc., EUA) em leitor de microplaca Molecular Devices SpectraMax M5 (Molecular Devices, U.S.) a 450 nm. O conteúdo de MC-LReq no extrato foi $160 \mu\text{g mL}^{-1}$; este extrato foi utilizado nos experimentos para injeção em peixes.

2.2.Delineamento experimental

Juvenis de pacu, *P. mesopotamicus* ($n = 48$, peso $257,5 \pm 88,0$ g; comprimento do corpo $22,4 \pm 2,5$ cm) foram adquiridos na Piscicultura Santa Cândida (Santa Cruz da Conceição, São Paulo, Brasil). Os peixes foram aclimatados durante 30 dias em tanques de 500 L contendo água desclorada e aeração constante, a 25 ± 1 °C. Os peixes foram alimentados com ração comercial (FRI-ACQUA 40, Fri-Ribe Rações, 40% de proteína) *ad libitum*. Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos ($n = 8$ em cada grupo) em tanques de 200 L. Os experimentos consistiram em três grupos de controle (C) e três grupos extrato bruto (EB), sendo um grupo C e um grupo EB por tempo experimental, que receberam apenas uma injeção (uma única dose) intraperitoneal (i.p.) de solução salina (grupos C) ou extrato bruto de cianobactérias de *R. fernandoi* R28 (grupos EB) e foram analisados 3 h (C3h; EB3h), 6 h (C6h; EB6h) e 24 h (C24h; EB24h) pós-injeção. Os grupos controle foram injetados com 0,5

mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%) e os grupos EB foram injetados com o extrato bruto de *R. fernandoi* R28 contendo uma dose subletal de 100 µg de MC-LReq (concentração de MC-RR e YR que equivale a MC-LR) por kg peixe⁻¹, diluído em 0,5 mL de solução salina estéril. A concentração foi determinada com base na literatura bem como por sem uma concentração encontrada em períodos de florações intensas. Após período experimental, uma amostra de sangue foi retirada de cada animal, através de punção da veia caudal. Depois, os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,1 g L⁻¹) e mortos por seção medular. Brânquias e rins foram removidas e sub-amostras foram fixadas em 2,5% de glutaraldeído em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3 ou solução fixadora de Bouin para análises morfológicas e outras sub-amostras foram imediatamente congeladas a -80 °C para análises bioquímicas.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de São Carlos (Proc. N. 2954101115).

2.3.Determinação da concentração dos íons Na⁺, K⁺ e Cl⁻ no plasma

Cada amostra de sangue foi centrifugada a 4 °C para separar plasma. As concentrações plasmáticas de Na⁺ e K⁺ foram determinadas utilizando fotômetro de chama Flamer (Digimed DM-61, Digimed, Brasil). A concentração de Cl⁻ foi determinada pelo método do tiocianato com um kit comercial (Labtest, Brasil) em leitor de microplacas Molecular Devices SpectraMax M5, a 490 nm.

2.4.Análises Bioquímicas

2.4.1. Determinação de PP1 e PP2A endógena em brânquias e rins

As amostras de brânquia e rim foram homogeneizadas em tampão (Tris-HCl 40 mM, KCl 20 mM, MgCl₂ 30 mM, pH 8,6) usando um homogeneizador Ultra Turrax (IKA –T10). Os homogeneizados foram centrifugados a 12.000 g, 4 °C, durante 15 min. Os sobrenadantes foram utilizados como fontes de enzimas PP1 e PP2A e para medir a concentração de proteínas (pt). As atividades de PP1 e PP2A (nmol min⁻¹ mg pt⁻¹) foram medidas usando p-nitrofenil fosfato (pNPP) (40 nM para PP1 e 60 nM para PP2A) como substrato de acordo com Carmichael e An (1999) e Heresztyn e Nicholson (2001), respectivamente, e adaptado por Bieczynski e colaboradores (2013). A absorbância foi determinada a 405 nm, em triplicata, a cada 1 min, durante 10 minutos em leitor de microplacas Molecular Devices SpectraMax M5. A concentração de proteína (pt) no homogeneizado foi determinada utilizando o reagente de Bradford e a albumina de soro bovino como padrão, e leitura a 595 nm.

2.4.2. Determinação da atividade das enzimas relacionadas à regulação iônica Na/K-ATPase (NKA), H-ATPase (HA) e anidrase carbônica (AC) em brânquias e rins

A determinação das atividades da NKA (nmol ATP mg pt⁻¹ h⁻¹) e da HA (U mg pt⁻¹) em brânquias e rins foram realizadas de acordo com o método de Gibbs e Somero (1989), adaptado por Kultz e Somero (1995) e Gonzáles et al. (2005) para leitor de microplacas. As amostras foram homogeneizadas em 0,5% de tampão SEID (sacarose 150 mM, imidazol 50 mM, EDTA 10 mM, deoxicolato de sódio 1%) e centrifugados a 10.000 g durante 7 minutos, a 4 °C. A atividade foi determinada pela taxa total em relação à taxa específica de inibidor (ouabaína para NKA e N-Etilmaleimida - NEM para HA). Em cada poço da microplaca foram pipetados 5 µL do homogeneizado da amostra e 200 µL do tampão de reação (imidazol 30 mM, NaCl 45 mM, KCl 15 mM, MgCl₂*6 H₂O 3 mM, 0,4 KCN, ATP 1 mM, NADH 0,2

mM, 3 U/mL de PK, 2 U/mL de LDH, frutose 0,1 mM, PEP 2 mM) puro ou adicionado com ouabaína 2 mM ou NEM 10 mM. As leituras foram realizadas a 340 nm, em triplicata, a cada 1 min durante 10 min em leitor de microplaca Molecular Devices SpectraMax M5. Para a determinação da atividade da AC, amostras de brânquias e rins foram homogeneizados em tampão (manitol 225 mM, sacarose 75 mM, Tris-fosfato 10 mM, pH 7,4) e centrifugadas a 10.000 g a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteína (pt) e atividade de AC, a 2,5 °C, conforme descrito por Vitale et al. (1999). A atividade de AC foi determinada pela adição de 7,5 mL de meio de reação em 0,05 mL de homogeneizado de tecido e 1 mL de água destilada saturada de CO₂ a 2,5 °C. A mudança de pH foi medida a cada 4 s durante 20 s utilizando medidor de pH (Jenway 3510, Bibby Scientific Ltd., UK). A atividade de AC foi determinada pela relação entre as inclinações de regressões lineares da reação catalisada e não catalisada pela enzima.

2.4.3. Determinação da concentração de creatinina plasmática

Creatinina foi quantificada (plasma mg dL⁻¹) a 525 nm utilizando kit comercial (Labtest® 35, Labtest, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante adaptado para peixes. As leituras foram adaptadas para microplaca e realizadas em leitor Molecular Devices SpectraMax M5.

2.5. Análises Morfológicas

2.5.1. Histopatologias de brânquias e rins

As amostras de brânquias e rins fixadas em 2,5% de glutaraldeído em 0,1 M de tampão de fosfato, pH 7,3 foram desidratadas em série crescente de etanol e incluídas em historesina (Historesin, Leica, Alemanha). Os cortes (3 µm de espessura) de brânquias foram corados

com azul de toluidina e dos rins com azul de toluidina e fucsina básica. Os cortes (5/animal) foram analisados (25 campos aleatórios por corte) utilizando microscópio de luz Olympus BX51 (Olympus, Dinamarca) com câmera de vídeo digital e software Olympus DP2-BSW. As análises histopatológicas foram classificadas de acordo com um escore (Sc) e um fator de importância (Fi) de acordo com Bernet et al. (1999), com modificações. O Sc depende da distribuição de lesões no órgão, onde (1) ausência de lesão; (2) lesão raramente presente; (3) lesão pouco frequente; (4) lesão com frequência moderada; (5) lesão altamente frequente. O Fi que indica como tal alteração afetaria a função do órgão e a possibilidade de sobrevivência do animal está indicado na Tabela 1 juntamente com as descrições das lesões, onde (1) representa lesão reversível com mínima importância patológica; (2) lesões reversíveis quando o estressor é neutralizado e moderada importância patológica e (3) lesões geralmente irreversíveis de extrema importância patológica. O índice de lesões (ILorg) para cada patologia foi determinado multiplicando o Fi pelo Sc: $ILorg = Fi \times Sc$. Desse índice foi calculada a porcentagem de alterações entre os grupos controles e os grupos expostos.

Tabela 1. Alterações histopatológicas e classificação do fator de importância das lesões (Fi) para brânquias e rins de peixes. Onde (1) representa lesão reversível com mínima importância patológica; (2) lesões reversíveis quando o estressor é neutralizado e moderada importância patológica e (3) lesões geralmente irreversíveis de extrema importância patológica (Bernet, et al., 1999).

Alterações em brânquias	Fi
Aneurisma (canal marginal, apical e basal e redes capilares)	1
Congestão/Hiperemia/Hemorragia	1
Dilatação canal marginal e basal	1
Descolamento do epitélio lamelar e edemas	1
Células pilares (constricção/rupturas)	1
Atrofia do epitélio lamelar	2
Hipertrofia do epitélio lamelar	1
Hiperplasia do epitélio lamelar	2
Hipertrofia de células cloreto	1
Proliferação de células mucosas	1
Fusão parcial de lamelas	1
Fusão total de lamelas	2
Ruptura do epitélio lamelar	2
Necrose	3

Alterações nos rins	
Acúmulo de substâncias intracelulares	1
Alterações da arquitetura renal e alterações celulares estruturais	1
Alterações do tecido intersticial	1
Alterações nucleares	2
Centros de melanomacrófagos	1
Atrofia dos túbulos renais	2
Atrofia de glomérulos	2
Hipertrofia dos glomérulos	1
Hipertrofia dos túbulos	1
Hiperplasia dos túbulos	2
Hiperplasia dos glomérulos	2
Necrose	3

2.5.2. Imunohistoquímica de células cloreto (CC) nas brânquias

As amostras de brânquias fixadas em solução de Bouin foram lavadas em etanol 70% até clareamento do líquido e retirada da solução fixadora. Em seguida, foram desidratadas em série crescente de etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Os cortes (6 µm de espessura) foram desparafinizados, lavados em tampão Tris-salina e Triton (TBS-T 0,5 mM, pH 7,4) diluído 1:10 e incubados por 20 min em soro de cabra a 20% (Gibco, Life Technologies, EUA) para bloquear sítios inespecíficos. Posteriormente, os cortes foram incubados, durante 5 h, em câmara úmida a 20 °C com o primeiro anticorpo, $\alpha 5$ anti Na/K-ATPase (Developmental Studies Hybridoma Bank, Department of Biological Science, Universidade de Iowa, EUA) diluído 1:300. Em seguida, os cortes foram lavados em TBS-T e novamente incubados com o segundo anticorpo GAMPO conjugado com peroxidase por 1 h (GAMPO, Chemicon International, EUA) diluído 1: 100. Os cortes foram novamente lavados em tampão TB (Tris base 0,5 mM, pH 7,4). O complexo de anticorpos foi visualizado por coloração dos cortes com DAB-Ni (3,30-diaminobenzidina em hexahidratado de sulfato de níquel amônio (II) em tampão Tris com 0,0125% de H₂O₂ adicionado imediatamente antes da utilização. Os controles negativos foram obtidos por omissão do primeiro ou do segundo anticorpo e foram incubados e corados como descrito acima. As seções foram analisadas

usando um microscópio de luz Olympus BX51 (Olympus, Dinamarca) com uma câmera de vídeo digital e o software Olympus DP2-BSW. A densidade das CC Na/K-ATPase imuno-positivas foi quantificada no filamento e na lamela de 25 campos aleatórios/corte/animal. As CC foram contadas manualmente no epitélio do filamento e epitélio lamelar e os dados foram apresentados como número CC mm⁻² de filamento ou epitélio lamelar.

2.6. Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média \pm E.P.M. (erro padrão da média). Para os dados bioquímicos foi aplicado o teste de distribuição normal D'Agostino-Pearson. As diferenças entre grupos de controle e expostos a EB de *R. fernandoi* foram analisadas utilizando Test-t de Student. Todos os testes foram realizados usando o software GraphPad Prism (versão 7.0) e a significância dos dados foi designada em $p < 0,05$.

Para a análise histopatológica foi utilizado Test-t de Student usando o software GraphPad Prism (versão 7.0). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estaticamente significativos.

3. Resultados

Durante o experimento, não ocorreu mortalidade de peixes em nenhum grupo. Não houve alteração no comportamento ou na coloração dos animais.

3.1. Íons Plasmáticos

Os resultados estão apresentados na Tabela 2. A concentração plasmática de Na^+ diminuiu 9,8% após 3 h e aumentou 6,3% após 24 h da injeção i.p. de extrato bruto de *R. fernandoi* em relação aos seus respectivos controle. A concentração de íons K^+ no plasma diminuiu 27% em após 6 h de injeção. A concentração de íons Cl^- não se alterou.

Tabela 2. Concentrações plasmáticas de íons Na^+ , K^+ e Cl^- de *Piaractus mesopotamicus* do grupos controle (C, injeção de solução salina) e grupos extrato bruto (EB, injeção de extrato bruto de *Radiocystis fernandoi*) após 3, 6 e 24 h. Os valores são médias \pm E.P.M. *Indica diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao respectivo controle. (n = 8)

Concentração de íons plasmáticos						
Grupos						
Íons (mEq L^{-1})	C3h	EB3h	C6h	EB6h	C24h	EB24h
Na^+	213,8 \pm 2,1	192,9 \pm 5,0*	214,0 \pm 2,3	222,9 \pm 5,2	205,8 \pm 4,0	217,9 \pm 4,8*
K^+	4,9 \pm 0,3	4,4 \pm 0,1	5,2 \pm 0,2	3,8 \pm 0,1*	5,0 \pm 0,3	4,7 \pm 0,1
Cl^-	161,6 \pm 6,1	150,8 \pm 4,5	153,5 \pm 3,5	162,8 \pm 4,7	160,8 \pm 3,8	163,4 \pm 6,5

3.2. Atividade de PP1 e PP2A endógena em brânquias e rins

As atividades enzimáticas das PP1 e PP2A em brânquias estavam inalteradas nos grupos experimentais EB quando comparados aos seus respectivos controles. Nos rins, as atividades da PP1 e PP2A diminuíram 26% e 38%, respectivamente, após 6 h de injeção i.p. de extrato bruto de *R. fernandoi* (Fig. 1).

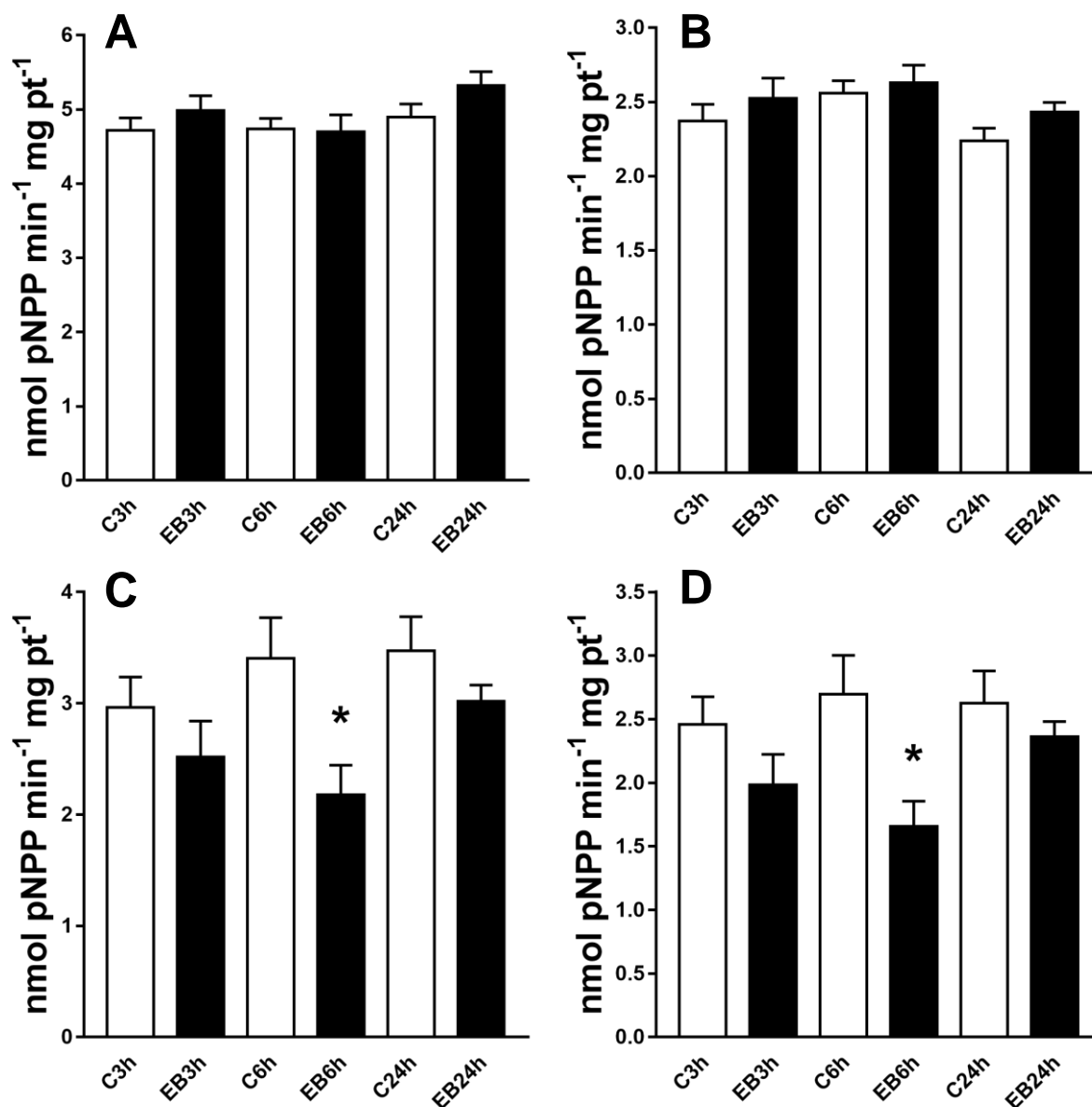


Figura 1. Atividade de proteínas fosfatases nas brânquias (A e B) e rins (C e D) de *Piaractus mesopotamicus* dos grupos controle (C, injeção de solução salina) e dos grupos injetados com extrato bruto (EB, injeção de extrato bruto de *Radiocystis fernandoi*): atividade PP1 (A e C) e atividade PP2A (B e D). Os valores são médias \pm E.P.M. *Indica diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao respectivo controle. (n = 8).

3.3. Atividade enzimática da NKA, HA e AC em brânquias e rins

As atividades de NKA em brânquias aumentaram 79,6% enquanto que as atividades da HA não apresentaram alterações após 3 h de injeção i.p. de extrato bruto *R. fernandoi*. Após 6

h de injeção i.p. de extrato bruto *R. fernandoi* apenas as atividades da NKA apresentaram alterações com diminuição em 44,6% em relação ao grupo controle (Fig. 2). Não foram observadas alterações enzimática após 24 h em relação ao respectivo grupo controle (Fig. 2).

Nos rins, as atividades de NKA, HA e CA não mudaram em nenhum tempo experimental após injeção i.p. de extrato bruto de *R. fernandoi* (Fig. 2).

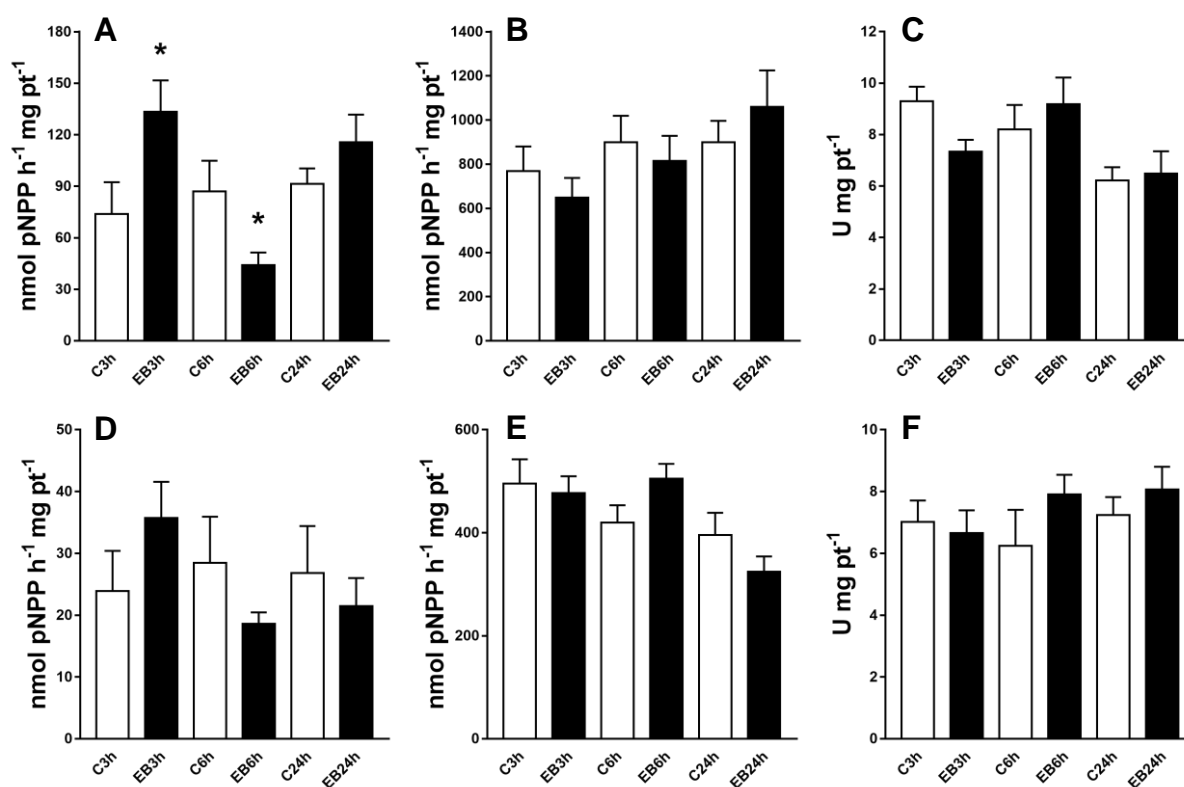


Figura 2. Atividade das enzimas Na/K-ATPase (A, D), H-ATPase (B, E) e anidrase carbônica (C, F) nas brânquias (A, B e C) e nos rins (D, E e F) em *Piaractus mesopotamicus* após 3, 6 e 24h de injeção i.p. Grupos controle (C, injeção de solução salina) e grupos de extrato bruto (EB, injeção de extrato bruto de *Radiocystis fernandoi*). Os valores são médias \pm E.P.M. * Indica diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao respectivo controle. (n = 8).

3.4. Níveis plasmáticos de creatinina

Os níveis de creatinina em plasma dos grupos experimentais EB não apresentaram alteração em relação aos seus respectivos controles após a injeção i.p.de extrato bruto de *R. fernandoi* R28 (Fig. 3).

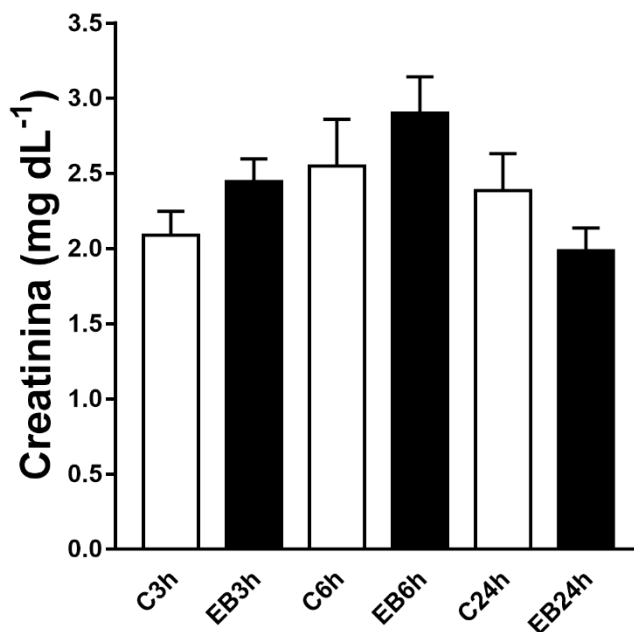


Figura 3. Concentração de creatinina no plasma de *Piaractus mesopotamicus* dos grupos controle (C, injeção de solução salina) e grupos injetados com extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* (EB) 3, 6 e 24 h após injeção. Os valores são médias \pm E.P.M. (n = 8).

3.5.Histopatologias em brânquias e rins

As brânquias dos animais controle apresentaram filamentos com epitélio com aproximadamente seis camadas de células e lamelas com epitélio constituído por duas camadas de células, uma camada de célula pavimentosa em contato com ambiente aquático e uma camada celular indiferenciada junto a membrana basal que cobre as células pilares; as células pilares formam espaços intercelulares nos quais flui o sangue nas lamelas (Fig. 4A e 4B). Os principais tipos celulares, células pavimentosas, cloreto e células mucosas são facilmente identificados e alguns animais no grupo de controle apresentaram diferenças em

relação ao tamanho dos filamentos e lamelas de acordo com a localização (Fig. 4A e 4B). Três horas após injeção de extrato bruto de *R. fernandoi* (EB3h), a principal alteração epitelial da brânquia foi a hiperplasia do epitélio lamelar e ruptura do epitélio lamelar que aumentaram 50 e 44%, respectivamente. Em menor grau, o grupo EB3h apresentou 10,5% de hipertrofia de CC (Fig. 4C e 4D). O grupo EB6h não apresentou alteração no tecido branquial exibindo características semelhantes às do grupo controle (Fig. 5A e 5B). As lesões nos animais do grupo EB24h variaram entre os indivíduos; alguns animais apresentaram hiperplasia do epitélio lamelar até 70% maior que o grupo controle. Em algumas regiões branquiais, a hiperplasia evoluiu para a fusão lamelar parcial (62,5%) e a fusão total das lamelas (37,5%). Atrofia do epitélio lamelar também aumentou 175%, caracterizada por diminuir a espessura das lamelas. O descolamento do epitélio lamelar aumentou 37,5% seguindo de ruptura do epitélio lamelar que aumentou 125% em relação ao grupo controle em que o tecido já não apresentava a estrutura lamelar normal, o epitélio se rompeu e houve extravasamento de células sanguíneas (Fig. 5C e 5D).

Os rins de *P. mesopotamicus* são constituídos por glomérulos com cápsula e espaço de Bowman evidentes, túbulos, proximais, intermediários e distais, cercados por tecido hematopoiético intersticial e linfóide. Centros de melanomacrófagos foram observados em todos os grupos controle e experimentais. Atrofia glomerular foi observada após 24 h. Todas as alterações encontradas não apresentaram diferença significativas (Fig. 6). Todas as patologias encontradas estão descritas na Tabela 4.

Tabela 3. Índice de lesões histopatológicas em brânquias e rins de *Piaractus mesopotamicus* dos grupos controle (C, injeção de solução salina) e grupos extrato bruto (EB, injeção de extrato bruto de *Radiocystis fernandoi*) após 3, 6 e 24 h e porcentagem (%) de alteração de EB em relação a C. Em negrito as lesões significativas. (n = 8)

Índice de lesões histopatológicas									
Lesões	Grupos								
Brânquias	C3 h	EB3 h	%	C6 h	EB6 h	%	C24 h	EB24 h	%
Aneurisma (canal marginal, apical e basal and redes capilares)	1	1	0	1	1,1	12,5	1	1	0
Congestão/Hiperemia/Hemorragia	1	1	0	1	1	0	1,12	1,1	0
Descolamento do epitélio lamelar e edemas	1	1	0	1	1,2	25	1,4	1,9	37,5
Atrofia do epitélio lamelar	2	2,8	25	2,5	2,6	5	3	8,2	175
Hiperplasia do epitélio lamelar	3,5	5,3	50	3	3,2	8,3	2,5	4,2	70
Hipertrofia de células cloreto	2,3	2,6	10,5	2,4	2,2	-5,3	2,4	2,1	-
									10,5
Fusão parcial de lamelas	1,5	1,8	16,7	1	1	0	1	1,6	62,5
Fusão total de lamelas	2	2,3	12,5	2	2	0	2	2,7	37,5
Ruptura do epitélio lamelar	4	5,8	44	3,5	3,5	0	4	9	125
Necrose celular (focal)	3	3	0	3	3	0	3	2,9	-4,2
Rim									
Atrofia (túbulos and glomérulos)	2	2	0	2	2	0	2	2,75	37,5
Centros de melanomacrófagos	2,25	2,3	2,2	2,25	2,5	11,1	2	2,13	6,3

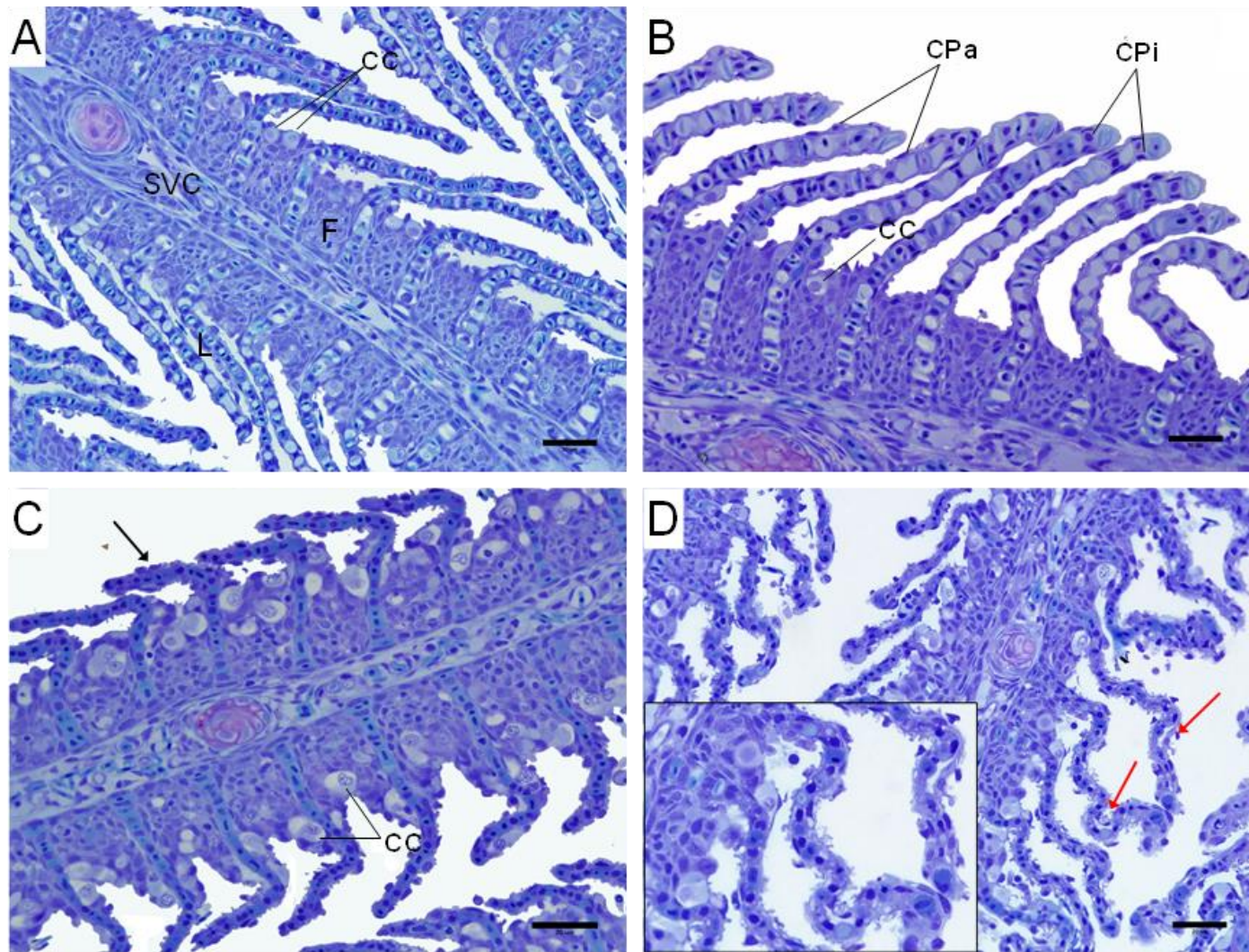


Figura 4. Histologia de brânquias de *Piaraactus mesopotamicus*. A e B representam grupo controle (injeção i.p. salina); A. Aspecto geral dos filamentos branquiais, B. Detalhe do epitélio do filamento e lamelas. SVC – seio venoso central; F – filamento; L – lamelas; CC – células cloreto; CPa – células pavimentosas; CPi – células pilares. C e D representam grupo extrato bruto (3 h após injeção i.p. de extrato bruto de cianobactéria *Radiocystis fernandoi*). C. Hiperplasia no epitélio do filamento; seta preta – hipertrofia do epitélio lamelar; CC – hipertrofia de células cloreto. D. seta vermelha e em destaque – ruptura do epitélio lamelar. Coloração azul de toluidina. Barra de escala = 20 μm . (n = 8)

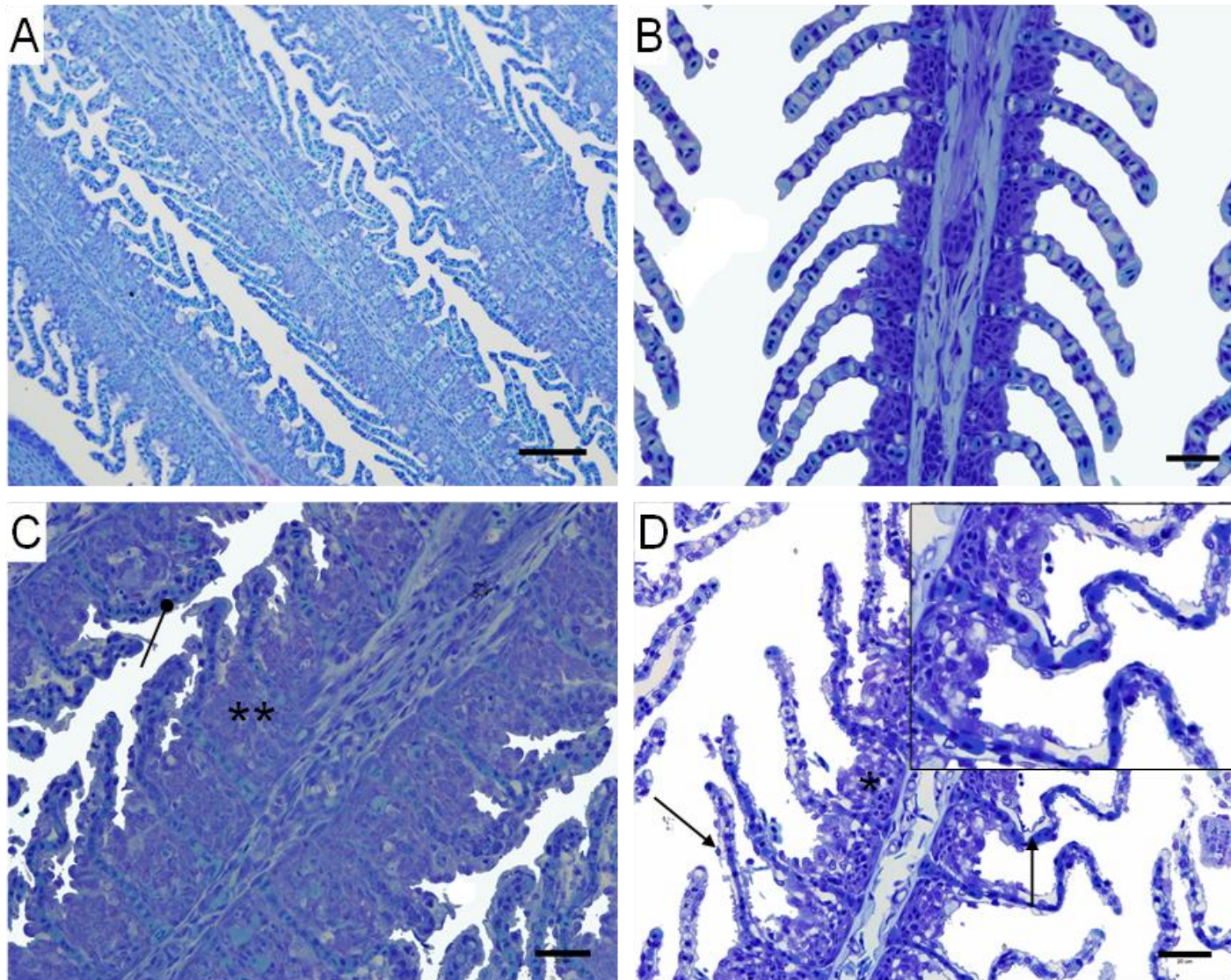


Figura 5. Histologia de brânquias de *Piaractus mesopotamicus* após injeção i.p. extrato bruto de cianobactéria *Radiocystis fernandoi*. A e B representam grupo 6 horas após injeção: ausência de patologias. C e D representam grupo 24 horas após injeção: seta de cabeça redonda – fusão parcial de lamelas; ** – hiperplasia do epitélio lamelar; seta preta – ruptura do epitélio lamelar; * atrofia lamelar. Coloração azul de toluidina. Barra de escala = 20 μ m. (n = 8)

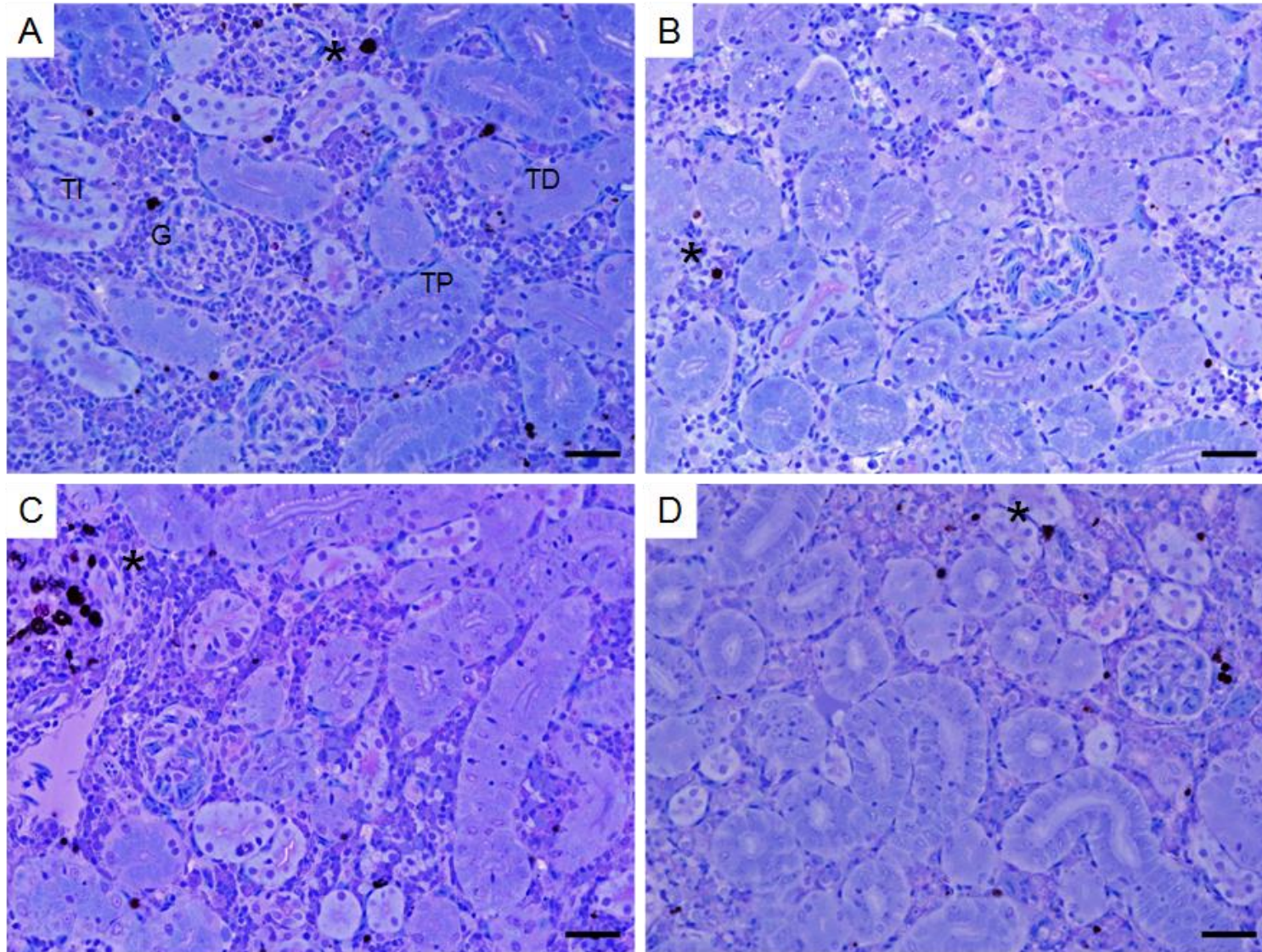


Figura 6. Histologia de rim de *Piaractus mesopotamicus*. A. Representa grupo controle (injeção i.p. salina): G – glomérulo; TP – túbulo proximal; TI – túbulo intermediário; TD – túbulo distal e * presença de melanomacrófagos. B, C e D. Representam grupo extrato bruto 3, 6 e 24 horas após injeção i.p. extrato bruto de cianobactéria *Radiocystis fernandoi*, respectivamente. Coloração azul de toluidina e fucsina básica. Barra de escala = 20 μ m. (n = 8)

3.6. Imunohistoquímica de células cloreto em brânquias

O grupo controle é caracterizado por ampla distribuição das células de cloreto nos filamentos e epitélio lamelar. O número de CC nos filamentos diminuiu 21,55% e, nas lamelas, diminuiu 45,92% após 3 h em relação ao controle. O número de CC do grupo EB6h diminuiu 24,30% apenas no epitélio lamelar. Em contraste, o número CC aumentou 91,53% na lamela do grupo EB24h (Fig. 7). A Figura 8 mostra as células cloreto marcadas com imunohistoquímica contra a Na/K-ATPase nos diferentes grupos.

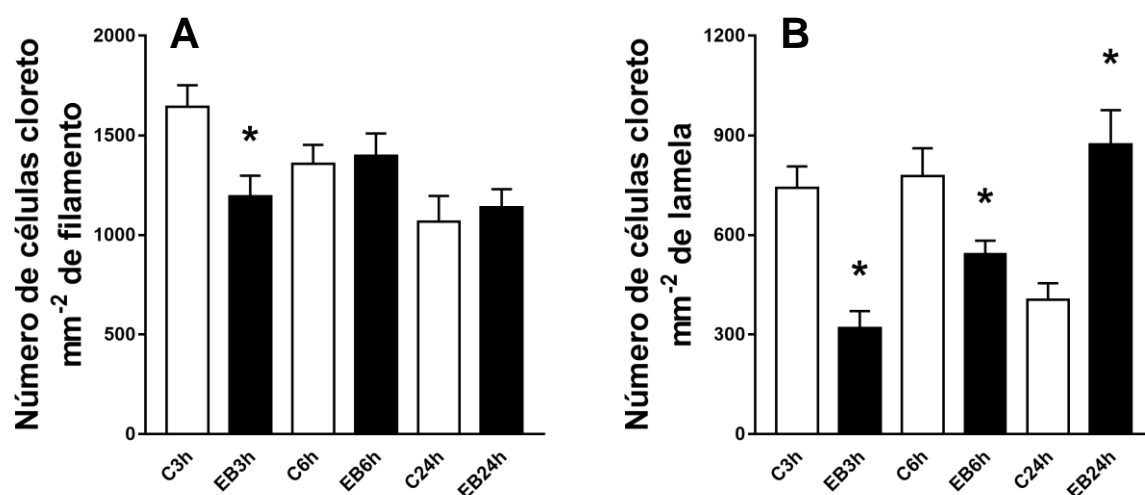


Figura 7. Células cloreto Na/K-ATPase-positivas em brânquias de *Piaractus mesopotamicus* dos grupos controle (C, injeção de solução salina) e grupos extrato bruto (EB, injeção de extrato bruto de *Radiocystis fernandoi*): epitélio do filamento (A) e epitélio lamelar (B). Os valores são médias \pm E.P.M. * Indica diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao respectivo controle. (n = 8).

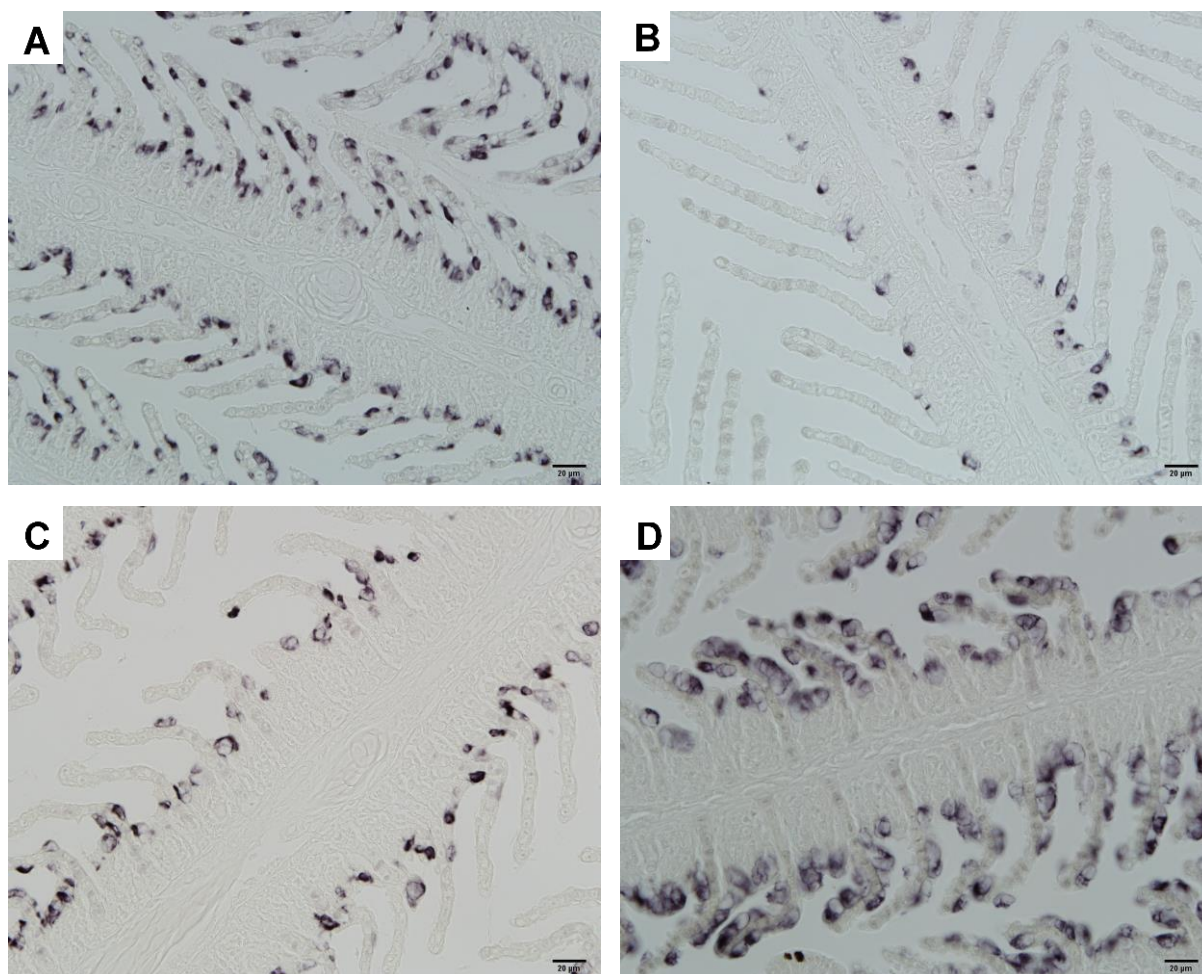


Figura 8. Imunohistoquímica contra a enzima Na/K-ATPase em células cloreto (coradas com preto) em brânquias de *Piaractus mesopotamicus* do grupo controle (C, injeção de solução salina) e grupo extrato bruto (EB injeção de extrato bruto *Radiocystis fernandoi*): (A) grupo controle; (B) grupo EB3 h; (C) grupo EB6 h e (D) grupo EB24 h. Escala em 20 µm. (n = 8).

4. Discussão

O extrato bruto de *R. fernandoi* cepa R28 contendo majoritariamente as variantes MC-RR e MC-YR e outros oligopeptídeos menores (Pereira et al., 2012) causou alterações histopatológicas no epitélio branquial e alteração na enzima osmorregulatória Na/K-ATPase bem como na densidade de células cloreto resultando em desequilíbrio iônico. Apesar do mesmo lote de peixe ser usado no presente estudo, foram observadas algumas

diferenças entre os controles que foram atribuídas ao possível estresse de manipulação, bem como aos diferentes tempos de confinamento. Essas diferenças não interferem nos resultados, uma vez que as comparações foram feitas entre o controle e os animais injetados que estavam nas mesmas condições experimentais. Embora, as principais toxinas de cianobactérias sejam hepatotóxicas e alterem a estrutura e a função do fígado, essas toxinas, transportadas através do sangue, podem atingir outros órgãos alterando outras funções do organismo. Os polipeptídios transportadores de ânions orgânicos (OATPs) na membrana celular, conhecido por capturar MC, são abundantes no fígado e, em níveis mais baixos, em outros órgãos como brânquias, cérebro, intestino, rim e músculo, amplificando a ação das toxinas das cianobactérias (Feurstein et al., 2009; Steines et al., 2016).

A interação entre MC e proteínas fosfatases é o principal mecanismo de toxicidade dessas toxinas. Numerosos estudos relataram inibição máxima de PP1 e PP2A endógena em fígado de peixe, em geral de 3 a 6 h após a contaminação por MC (Malbrouck et al., 2004; Tencalla e Dietrich 1997), que foram seguidas por recuperação gradual até 72-96 h devido a reversibilidade da ligação ou síntese de novas proteínas (Tencalla e Dietrich, 1997, Kondo et al., 1996; Ito et al., 2002; Malbrouck et al., 2004). Nas células branquiais, as atividades das proteínas fosfatases são muito baixas e a ausência de inibição após a injeção de extrato bruto de *R. fernandoi* pode ser devido à baixa absorção de MC pelas células brânquias ou à reversibilidade da ligação MC-fosfatase. Após injeção i.p. do extrato bruto, MCs e outros compostos celulares atingem primeiro o fígado e, posteriormente, outros órgãos. Como a maior parte da toxina pode ser absorvida pelas células do fígado as concentrações de MC circulantes no sangue são reduzidas. A possibilidade de ligação reversível de MC-fosfatase foi sugerida por Tencalla e Dietrich (1997), que não observaram inibição de PP1 e PP2A em fígado de *Oncorhynchus mykiss* 3 h após gavage contendo 5700 µg de MC-LR kg⁻¹ de massa

corporal. Em rim, apesar de ocorrer inibição das fosfatases PP1 e PP2A após 6 horas não observamos outras alterações.

Além de MCs inibirem proteínas fosfatases, essas cianotoxinas e outros peptídeos presentes no extrato de cianobactérias podem atuar sobre outras enzimas. No presente estudo, não ocorreu inibição da NKA e sim aumento da atividade dessa enzima nas primeiras horas (3 h) de exposição ao extrato bruto isso pode ser um mecanismo compensatório do animal para controlar o equilíbrio iônico uma vez que ocorreu diminuição das CC no filamento e lamela. Entretanto, após 6 horas de exposição, a diminuição da atividade da NKA pode ter sido o resultado da redução de CC nas lamelas e que, embora tenha ocorrido o retorno do número das CC no filamento, as CC imaturas têm menor unidades de NKA como demonstrado por Dang et al. (2000). Após 24 horas, a atividade da enzima estava restaurada. Os rins, que complementam a ação das brânquias no processo de regulação iônica e osmótica e equilíbrio ácido-base em peixes, não mostraram alterações na NKA. Entretanto, Lowe et al. (2012) observaram diminuição na atividade de NKA em rins de ratos Wistar, 24 horas após injeção i.p. contendo 55 µg MC-LR kg⁻¹. Algumas hipóteses demonstram que a atividade da NKA pode ser inibida por microcistinas ou extrato de cianobactéria que se ligam no mesmo sitio de ligação da ouabaína na enzima inibindo a hidrólise do ATP e consequentemente a desfosforilação do aspartato que impede a alteração conformacional da enzima e, então, não libera o K⁺ para o interior da célula (Gaete et al., 1994, Zambrano e Canelo, 1996) impossibilitando que o peixe mantenha a homeostase iônica (Fischer et al., 2000, Li et al., 2005). Estudos *in vitro* mostraram inibição na atividade da NKA em brânquias de *Cyprinus carpio* após exposição ao extrato de *M. aeruginosa* contendo MC-LR (Gaete et al., 1994) e de *Oreochromis niloticus* (Bury et al., 1996a), bem como inibição de absorção de Ca⁺⁺ (Bury et al., 1996b). A inibição de NKA pelo extrato de *M. aeruginosa* foi atribuída aos ácidos graxos de cadeia longa

presentes no extrato (Bury et al., 1998) e/ou outros compostos tóxicos presentes no extrato de cianobactérias como descrito anteriormente.

As atividades das enzimas HA e AC também estão relacionadas à osmorregulação e ao equilíbrio ácido-base. A não alteração na atividade dessas enzimas sugere que o extrato bruto de *R. Fernandoi* contendo majoritariamente MC-RR e MC-YR e minoritariamente outros oligopeptídeos não afetou a atividade destas enzimas em *P. mesopotamicus*. HA atua como uma bomba eletrogênica eliminando excesso de H^+ gerado no processo de hidratação gerando uma tendência de desequilíbrio de elétrons que favorece a entrada de íons Na^+ nas células (Evans et al., 1999; Clairbone et al., 2002). A AC catalisa a hidratação do CO_2 fornecendo os íons H^+ e HCO_3^- para a troca de Na^+ e Cl^- para manter o equilíbrio homeostático do animal (Evans et al., 1999). As alterações observadas nas células de cloreto, local onde essas enzimas são encontradas, não foram suficientes para afetar o funcionamento das mesmas.

No presente estudo, os níveis de creatinina nos grupos EB semelhantes aos do grupo controle indicam que os danos histopatológicos no tecido renal não resultaram em disfunção do órgão. Além das funções de regulação osmo-iônica o rim é o principal órgão de excreção de resíduos metabólicos em peixes e, alterações na sua estrutura podem impossibilitar a filtração e excreção eficiente de alguns metabólitos eles podem apresentar níveis elevados em plasma. A creatinina, produzida no músculo pela degradação da fosfocreatinina é totalmente eliminada pelos rins, sendo um biomarcador da função renal. Se a filtração do rim está deficiente, os níveis sanguíneos de creatinina aumentam (Kopp et al., 2011). Alguns estudos indicam o rim como uma das principais vias de eliminação das MC o que tornaria o órgão alvo das ações dessas toxinas. Li et al. (2013) detectaram a presença de 0,14% de MCs no rim de *Carassius auratus*, 48h após injeção i.p. de 200 μg

MC-LR kg^{-1} que foram associadas a lesões ultraestruturais e a elevação dos níveis sanguíneos de ureia e creatinina.

Em relação à histologia das brânquias, embora Fischer e Dietrich (1999) tenham sugerido que as patologias são difusas e progressivas entre 1 e 24 horas após exposição à MC, as patologias apresentadas em EB3h e EB24h foram classificadas, de acordo com Bernet et al. (1999), como regressivas, ou seja, há restauração do tecido branquial se a exposição ao estressor cessar como no presente estudo onde a exposição foi feita em dose única de injeção intraperitoneal. A hipertrofia das CC, observada apenas no grupo EB3h, sugere uma resposta compensatória à diminuição do número de CC indicando aumento do metabolismo e atividade enzimática celular para compensar. A hiperplasia do epitélio do filamento observada em EB3h e EB24h, pode ser mecanismo compensatório de proteção do epitélio. Semelhantes alterações foram observadas por Chen et al. (2016), após 30 dias de exposição a $5 \mu\text{g}$ de MC-LR L^{-1} em *Danio rerio* com hiperemia e hipertrofia de células epiteliais nos filamentos e, animais expostos a $20 \mu\text{g}$ de MC-LR L^{-1} apresentaram ruptura de lamelas branquiais e maior proliferação de células epiteliais. Drobac et al. (2016) observaram lesões semelhantes em brânquias de *Cyprinus carpio* coletadas em viveiros de peixes contaminados com cianotoxinas. Esses estudos são consistentes com as principais patologias encontradas nas brânquias do presente trabalho. Embora atividade enzimática e número de CC tivessem exibido sinais de recuperação, a frequência e a intensidade das patologias estavam aumentadas nos animais EB24h, não apresentando sinais de restauração da estrutura geral de epitélio lamelar. Carbis et al. (1996) observaram desordem total de tecido branquial em carpa 8 h após injeção i.p. contendo $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ de extrato bruto de *M. aeruginosa*; em doses menores ($25 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $2,5 \mu\text{g kg}^{-1}$), no mesmo experimento, as brânquias coletadas após 4 dias apresentaram hiperplasia do tecido lamelar, necrose e descolamento do epitélio. Rodger et al. (1994) observaram edema e descolamento do

epitélio lamelar em *Salmo trutta* L., coletadas de um lago durante floração em concentrações entre 16 e 19 μg de MC-LReq L^{-1} . Esses resultados encontrados por outros autores são consistentes com nossos dados e evidenciam que MC e outros oligopeptídeos presentes no extrato bruto alteram o epitélio branquial. Muitos estudos demonstraram a capacidade das brânquias para se adaptarem a situações adversas, como taxa de oxigênio, temperatura ou contaminação pelo agente estressor (Sollid et al., 2003; Sollid et al., 2005; Sollid e Nilsson, 2006). Essa plasticidade branquial permite que o tecido aumente ou diminua sua área de superfície lamelar, aumente o número de CC ou altere a área de superfície dessas células. Essa remodelação é essencial para a adaptação às novas condições em que o animal está exposto (Sollid e Nilsson, 2006; Nilsson, 2012).

Alterações no número de CC e na atividade das enzimas presentes nessas células explicam o desequilíbrio de Na^+ e K^+ . A diminuição da densidade de CC em filamentos e lamelas 3 h pós-injeção poderia explicar a diminuição dos níveis de Na^+ no plasma sendo que o aumento na atividade de NKA não foi suficiente para restabelecer os níveis iônicos no plasma. A alteração na concentração de K^+ ainda após 6 h pode estar relacionada com o fato dos animais desse grupo ainda não apresentarem reestabelecimento do número de células cloreto, especialmente nas lamelas. Após 24 h de injeção, o número de CC mostrou recuperação contribuindo para restaurar os níveis plasmáticos de Na^+ e K^+ . Entretanto, em estudo com *Carassius auratus* após 96 h de e injeção i.p. de 125 μg de MC-LR kg^{-1} de massa corpórea não foram observados alterações na osmolaridade plasmática (Malbrouck et al., 2003) e em estudo com *Chasmagnathus granulatus* após injeção, a cada 24 h durante 48 h, de extrato de *M. aeruginosa* contendo 39,20 μg de MC L^{-1} foi observado aumento na concentração de Na^+ (Vinagre et al., 2003).

No presente estudo, rins de *P. mesopotamicus* além de não apresentarem alterações enzimáticas também não exibiram sinais de alterações histológicas. Entretanto alguns

estudos obtiveram resultados diferentes. Atencio et al., (2008) utilizando rações contaminadas com MC-LR em concentrações de 5, 11, 25 e 55 $\mu\text{g MC-LR kg}^{-1}$ de peixe em *Tinca tinca* observaram hemorragia do parênquima renal, glomerulopatia com dilatação da capsula de Bowman e diminuição dos componentes glomerulares e ainda tubulonefroses no rim. Rabergh et al. (1991) observaram dilatação na capsula de Bowman em *Cyprinus carpio* L. após injeção i.p. de 250 e 300 $\mu\text{g MC-LR kg}^{-1}$ e, em peixes injetados com 550 $\mu\text{g MC-LR kg}^{-1}$, bem como presença de núcleo picnóticos e necrose das células epiteliais.

5. Conclusões

Considerando as alterações encontradas nas brânquias e a ausência de alterações nos rins nos animais injetados com extrato bruto de *R. fernandoi* utilizado nesse estudo, contendo majoritariamente as microcistinas RR e YR além de outros oligopeptídeos, evidenciam que esses compostos atuam sobre as CC e enzimas relacionadas a regulação iônica gerando desequilíbrio iônico.

6. Agradecimentos

Este estudo teve apoio financeiro da Companhia de Energia de Minas Gerais (CEMIG, Proc. GT 346) e bolsa de estudo fornecida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

7. Referências

- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases* 22, 25-34
- Bieczynski, F., Bianchi, V.A., Luquet, C.M., 2013. Accumulation and biochemical effects of microcystin-LR on the Patagonian pejerrey (*Odontesthes hatcheri*) fed with the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. *Fish Physiology and Biochemistry* 39, 1309-1321.
- Bieczynski, F., De Anna, J.S., Pirez, M., Brena, B.M., Villanueva, S.S.M., Luquet, C.M., 2014. Cellular transport of microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) across the intestinal wall: Possible involvement of multidrug resistance-associated proteins. *Aquatic Toxicology* 154, 97–106.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. *Analytical Biochemistry: methods in the biological sciences* 72, 248-254.
- Buratti, F.M., Scardala, S., Funari, E., Testai, E., 2013. The conjugation of microcystin-RR by human recombinant GST's and hepatic cytosol. *Toxicology Letters* 219, 231-238.
- Bury, N.R., Eddy, F.B., Codd, G.A., 1996a. Stress responses of brown trout, *Salmo trutta* L., to the cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Environmental Toxicology Water Quality* 11, 187–193.
- Bury, N.R., Flik, G., Eddy, F.B., Codd, G. A., 1996b. The effects of cyanobacterium and the cyanobacterial toxin microcystin-LR on Ca^{2+} transport and Na^+/K^+ ATPase in tilapia gills. *Journal of Experimental Biology* 199, 1319–1326.
- Bury N.R., Codd, G.A., Wendelaar Bonga, S.E., Flik, G., 1998. Fatty acids from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* with potent inhibitory effects on fish gill Na, K ATPase activity. *Journal of Experimental Biology* 201, 81–89.
- Campos, A., Vasconcelos, V., 2010. Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *International Journal of Molecular. Science* 11, 268-287.
- Carbis, C.R., Mitche, G.F., Anderson, J.W., McCauley, I., 1996. The effects of microcystins on the serum biochemistry of carp, *Cyprinus carpio* L., when the toxins are

administered by gavage, immersion and intraperitoneal routes. *Journal of Fish Diseases* 19, 151-159.

Carmichael, W.W., 1997. The cyanotoxins. *Advances in Botanical Research* 27, 211–256

Carmichael, W.W., An, J., 1999. Using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and a protein phosphatase inhibition assay (PPIA) for the detection of microcystins and nodularins. *Natural Toxins* 7, 377-385

Cazenave, J., Wunderlin, D. A., Bistoni, M. A., Amé, M. V., Krause, E., Pflugmacher, S., Wiegand, C., 2005. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*. *Aquatic Toxicology* 75, 178-190.

Claiborne, J. B., Edwards, S. L. and Morrison-Shetlar, A. I., 2002. Acid base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. *Journal of Experimental Zoology*. 293, 302-319.

Chen, C., Liu, W., Wang, L., Li, J., Chen, Y., Jin, J., Kawan, A., Zhang, X., 2016. Pathological damage and immunomodulatory effects of zebrafish exposed to microcystin-LR *Toxicon* 118, 13-20.

Chen, L., Chen, J., Zhang, X., Xie, P., 2016. A review of reproductive toxicity of microcystin. *Journal of Hazardous Materials* 301, 381–399.

Dang, Z., Lock, R.A.C., Flik, G., Wendelaar Bonga, S.E., 2000. Na⁺/K⁺-ATPase immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. *Journal of Experimental Biology* 203, 379-387.

Drobac, D., Tokodi, N., Lujic, J., Marinovic, Z., Subakov-Simic, G., Dulic, T., Vaz, T., Nybom, S., Meriluoto, J., Codd, G.A., Svirc, Z., 2016. Cyanobacteria and cyanotoxins in fishponds and their effects on fish tissue. *Harmful Algae* 55, 66–76.

Evans, D.H., Piermarini, P.M., Potts, W.T.W., 1999. Ionic transport in the fish gill epithelium. *Journal of Experimental Zoology* 283, 641–652.

Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews* 85, 97–177.

Fernandes, M.N., Moron, S.E., Sakuragui, M.M., 2007. Gill morphological adjustments to environment and gas exchange function in: Fernandes, MN., Rantin, F.T., Glass, M.L., Kapoor, B.G. (Eds.), *Fish Respiration and Environment Science Publishers*, New Hampshire, pp. 93-120.

Feurstein, D., Hoist, I., Fischer, A., Dietrich, D.R., 2009. Oatp-associated uptake and toxicity of microcystins in primary murine whole brain cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 234, 247-255.

Fisher, W. J., Hitzfeld, B. C., Tencalla, F., Eriksson, J. E., Mikhailov, A., Dietrich, D.R., 2000. Microcystin-LR toxicodynamics, induced pathology, and immunohistochemical localization in livers of blue-green algae exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicological Sciences* 54, 365-373.

Gaete V., Canelo, E., Lagos, N., Zambrano, F., 1994. Inhibitory effects of *Microcystis aeruginosa* toxin on ion pumps of the gill of freshwater fish. *Toxicon* 32, 121–127.

Gibbs, A., Somero, G.N., 1989. Pressure adaptation of Na⁺/K⁺-ATPase in gills of marine teleosts. *The Journal of Experimental Biology* 143, 475-492.

González, P.C., Vázquez, R.P.M., Garcia, M.A.G., Sanz, P., Palau, F., 2005. Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins. *Human Molecular Genetics* 14, 2091-2098.

Gupta, N., Pant, S.C., Vijayaraghavan, R., Rao, P.V., 2003. Comparative toxicity evaluation cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystins variants (LR, RR, YR) in mice. *Toxicology* 188, 285–296.

Heresztyn, T., Nicholson, B.C., 2001. Determination of cyanobacterial hepatotoxins directly in water using a protein phosphatase inhibition assay. *Water Research* 35, 3049-3056.

Huguet, A., Henri, J., Petitpas, M., Hogeveen, K., Fessard, V., 2013. Comparative cytotoxicity, oxidative stress, and cytokine secretion induced by two cyanotoxin variants, microcystin LR and RR, in human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Biochemical Molecular Toxicology* 27, 253-258.

- Ito, E., Takai, A., Kondo, F., Masui, H., Imanishi, S., Harada, K., 2002. Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compounds. *Toxicon* 40, 1017-1025.
- 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. *Chemical Research in Toxicology* 9, 1355-1359.
- Kultz, D., Somero, G.N., 1995. Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*. *The Journal of Experimental Biology* 198, 1883-1894.
- Li, L., Xie, P., Chen, J., 2005. In vivo studies on toxin accumulation in liver and ultrastructural changes of hepatocytes of the phytoplanktivorous bighead carp i.p.-injected with extracted microcystins. *Toxicon* 46, 533-545.
- Malbrouck, C., Trausch, G., Devos, P., Kestemont, P., 2003. Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C* 135, 39-48.
- Malbrouck, C., Trausch, G., Devos, P., Kestemont, P., 2004. Effect of microcystin-LR on protein phosphatase activity in fed and fasted juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Toxicon* 43, 295–301.
- McCormick, S. D., 1995. Hormonal control of gill Na⁺/K⁺-ATPase and chloride cell function. In *Fish Physiology, Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation*. Academic Press 14, 285-316.
- Nilsson, G.E., Dymowska, A., Stecyk, J.A.W., 2012. New insights into the plasticity of gill structure respiratory. *Physiology & Neurobiology* 184, 214–222.
- Paresková, H., Hilscherová, K., Bláha, L., 2012. Oxidative stress and detoxification biomarker responses in aquatic freshwater vertebrates exposed to microcystins and cyanobacterial biomass. *Environmental Science and Pollution Research* 19, 2024-2037.
- Paulino, M.G., Tavares, D., Bieczynski, F., Pedrão, P.G., Souza, N.E.S., Sakuragui, M.M., Luquet, C.M., Terezan, A.P., Fernandes, J.B., Giani, A., Fernandes, M.N., 2017a. Crude extract of cyanobacteria (*Radiocystis fernandoi*, strain R28) induces liver impairments in fish. *Aquatic Toxicology* 182, 91–101.

Paulino, M.G., Rossi, P.A., Venturini, F.P., Souza, N.E.S., Sakuragui, M.M., Moraes, G., Terezan, A.P., Fernandes, J.B., Giani, A., Fernandes, M.N., 2017b. Hepatotoxicity and metabolic effects of cellular extract of cyanobacterium *Radiocystis fernandoi* containing microcystins RR and YR on neotropical fish (*Hoplias malabaricus*). *Chemosphere* 175, 431-439.

Pereira, D.A., Pimenta, A.D.C., Giani, A., 2012. Profiles of toxic and non-toxic oligopeptides of *Radiocystis fernandoi* (Cyanobacteria) exposed to three different light intensities. *Microbiological Research* 167, 413-421.

Pereira, D.A., Giani, A., 2014. Cell density-dependent oligopeptide production in cyanobacterial strains. *FEMS Microbiology Ecology* 88, 175-183.

Pereira, D.A., Pimentel, J.S.M., Bird, D.F., Giani, A., 2015. Changes in oligopeptide production by toxic cyanobacterial strains under iron deficiency. *Aquatic Microbial Ecology* 74, 205-214.

Rahman, S.A., El-Ayouty, Y.M., Kamael, H.A., 1993. Characterization of heptapeptide toxins extracted from *Microcystis aeruginosa* (egyptian isolate) comparison with some synthesized analogs. *International Journal of Peptide and Protein Research* 41, 1-7.

Ramos, C.A., Fernandes, M.N., Costa, O.T.F., Duncan, W.P., 2013. Implications for osmorepiratory compromise by anatomical remodeling in the gills of *Arapaima gigas*. *The Anatomical Record* 296, 1664–1675.

Rinehart, K. L., Harada, K., Namikoshi, M., Chen, C., Harvir, C. A., 1988. Nodularin, microcystin, and the configuration of Adda. *Journal of the American Chemical Society* 110, 8557-8558.

Runnegar, M., Berndt, N., Kong, S., Lee, E.Y.C., Zhang, L., 1995. In vivo and in vitro binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 216, 162-169.

Sant'Anna, C.L., Azevedo, M.T.P., Werner, V.R., Dogo, C.R., Rios, F.R., Carvalho, L.R., 2008. Review of toxic species of cyanobacteria in Brazil. *Algological Studies* 126, 251–265.

Steiner, K., Zimmermann, L., Hagenbuch, B., Dietrich D., 2016. Zebrafish Oatp mediated transport of microcystin congeners. *Archives Toxicology* 90, 1129–1139.

- Takei, Y., Hiroi, J., Takahashi, H., Sakamoto, T., 2014. Diverse mechanisms for body fluid regulation in teleost fishes. *American Journal of Physiology* 307, 778-792.
- Tencalla, F., Dietrich, D., Schattler, C., 1994. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 30, 215–23.
- Tencalla, F., Dietrich, D., 1997. Biochemical characterization of microcystin toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicon* 35, 583-595.
- Vieira, J.M.S., Azevedo, M.T.P., Azevedo, S.M.F.O., Honda, R.Y., Correa, B., 2003. Microcystin production by *Radiocystis fernandoi* (Chroococcales, cyanobacteria) isolated from a drinking water reservoir in the city of Belém, PA, Brazilian amazonia region. *Toxicon* 42, 709–713.
- Vinagre, T. M., Alciati, J. C., Regoli, F., Bocchetti, R., Yunes, J. S., Bianchini, A., Monserrat, J.M., 2003. Effect of microcystin on ion regulation and antioxidant system in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C* 135, 67-75.
- Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P., Rodriguez, E.M., 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* 122, 121-129.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*. 77, 591–625.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S., 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203, 201–218.
- Zambrano F., Canelo, E., 1996. Effects of microcystin-LR on the partial reactions of the Na-K pump or the gill of carp (*Cyprinus carpio* Linneo). *Toxicon* 34, 451–458.
- Zhao, S., Xie, P., Li, G., Jun, C., Cai, Y., Xiong, Q., Zhao Y., 2012. The proteomic study on cellular responses of the testes of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to microcystin-RR. *Proteomics* 12, 300–312.

CAPÍTULO 2

Efeito do extrato bruto de cianobactéria *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas no fígado de *Piaractus mesopotamicus*

Resumo

Os processos de eutrofização, sejam naturais ou antrópicos, somado a fatores ambientais como temperatura, disponibilidade de oxigênio e pH propiciam ambiente ideal para o desenvolvimento de florações de cianobactérias que muitas vezes podem ser produtoras de toxinas. Microcistinas (MC) são hepatotoxinas produzidas por várias espécies de cianobactéria e podem apresentar diferentes graus de toxicidade de acordo com a variante da molécula. O presente estudo teve por objetivo investigar o grau de hepatotoxicidade do extrato bruto da cianobactéria *Radiocystis fernandoi* cepa R28 contendo majoritariamente as MC-RR e MC-YR além de pequenas quantidades de outros oligopeptídeos, mas não a MC-LR e comprometimento da estrutura dos hepatócitos analisando a atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase ácida (FAC) e fosfatase alcalina (FAL) e a quantificação da bilirrubina no plasma, a atividade das proteínas fosfatases PP1 e PP2A e morfologia do fígado em peixe (*Piaractus mesopotamicus*) 3, 6 e 24 horas após injeção intraperitoneal (i.p.) de 100 µg de MC-LR equivalente por kg⁻¹ massa corpórea. Embora as atividades de PP1 e PP2A não tenham apresentado inibição em nenhum dos tempos experimentais, as atividades das ALT e AST aumentaram após 3, 6 e 24 h e a da FAL aumentou após 3 h sugerindo que houve comprometimento da função hepática. As alterações nos conteúdos de bilirrubina plasmática e as alterações histopatológicas progressivas como desorganização na arquitetura hepática, hipertrofia celular, núcleos picnóticos, acúmulo de substâncias intracelulares e hiperemia corroboram aos resultados bioquímicos evidenciando as alterações na função do fígado. Em conclusão, embora a *R. fernandoi* cepa R28 não produz MC-LR as demais MCs produzidas por essa cepa de cianobactéria tem alto potencial hepatotóxico e pode comprometer de forma severa a saúde de peixes.

Palavras chave: MC-RR, MC-YR, hepatotoxicidade, injúria hepática, histopatologia.

1. Introdução

A proliferação de cianobactérias nas águas dos rios, lagos e mares, motivada por processos naturais ou, em maior grau, por ações antrópicas, pode causar problemas ambientais como alteração na disponibilidade de oxigênio dissolvido na água, mudança nas propriedades organolépticas bem como levar a intoxicação acarretando problemas de saúde (Codd, 2000). As cianobactérias podem ser produtoras de hepatotoxinas, dermatotoxinas ou neurotoxinas e diferentes espécies podem produzir toxinas. *Microcystis aeruginosa* é uma das espécies que produz hepatotoxina conhecida como Microcistina (MC), e esta espécie é bem conhecida e estudada pois pode ser encontrada em todas as partes do mundo. Nos últimos anos, foi encontrada outra espécie que também produz MC, *Radiocystis fernandoi*. Esta está presente em águas de clima tropical e subtropical e foi descrita por Komárek e Komárková-Legnerová, 1993, ocorrendo no Sri Lanka e na Indonésia. No Brasil, *R. fernandoi* foi encontrado em alguns lagos e reservatórios no estado de São Paulo, Reservatório de Utinga, cidade de Belém, estado do Pará (Vieira et al., 2003; Sant'Anna et al., 2008).

Radiocystis fernandoi, cepa R28, foi isolada de florações de cianobactérias no reservatório de Furnas (20 ° 40'S; 46 ° 19'W), Minas Gerais, Brasil, e foi descrita como produtora das variantes majoritárias MC RR e YR e em menor quantidade, oligopeptídeos tais como MC FR e WR, cianopeptolin-1071 e microviridin-1709. Esta cepa não produz MC LR (Pereira et al., 2012; Pereira et al., 2015; Pereira e Giani, 2014; Paulino et al., 2017).

As variantes de MCs determinam seu nível de toxicidade, embora a variante MC-LR seja considerada mais tóxica, e outras variantes também podem apresentar risco para a saúde (Gupta et al., 2003; Paulino et al., 2017). MC é um heptapeptídeo cíclico e tem uma estrutura capaz de inibir PP1 e PP2A proteína fosfatases da membrana celular e estes são os mecanismos comuns de ação de MC (Runnegar et al., 1995; Chen et al., 2016). Uma vez que PP1 e PP2A são inibidos, desencadeia uma cascata de reação em que ocorre hiperfosforilação

de proteínas ligadas a microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários, componentes do citoesqueleto (Wickstrom et al., 1995; Zeng et al., 2014; Zhou et al., 2015). Os danos sofridos pelo citoesqueleto fazem com que as células percam a forma e conseqüentemente, aderência entre si e até mesmo sofra ruptura (Jiang et al., 2013; Chen et al., 2016).

Uma vez dentro do organismo, MCs são transportadas para os órgãos através de polipeptídios transportadores de ânions orgânicos (OATPs) que capturaram MC a partir do meio extracelular e introduz dentro da célula. Eles são abundantes no fígado e, portanto, é o órgão alvo da ação de MCs, mas outros órgãos também possuem OATPs e podem sofrer ação de toxina, como rim, cérebro, intestino, coração, pulmão, baço, pâncreas e músculo (Feurstein et Al., 2009; Steines et al., 2016).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a toxicidade do extrato bruto da cianobactéria *R. fernandoi* cepa R28 que produz majoritariamente as MC RR e YR além de pequenas quantidades de outros oligopeptídeos, mas não produz a MC LR, na estrutura e função hepática de juvenis de *Piaractus mesopotamicus*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Cultura da cepa Cianobactéria *Radiocystis fernandoi* R28, extração e quantificação de MC

Radiocystis fernandoi cepa R28 foi cultivada de acordo com Pereira et al. (2012) no Laboratório de Fitologia do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Minas Gerais. O extrato bruto foi obtido de cianobactérias liofilizadas de acordo com Paulino et al. (2017a). A quantificação de MC (MC-LReq, MC totais que equivalem a toxicidade de MC-

LR) no extrato foi determinada usando kit comercial de ensaio de imunabsorbância enzimática (ELISA) (Beacon Analytical Systems Inc., EUA) em leitor de microplaca Molecular Devices SpectraMax M5 (Molecular Devices, U.S.) a 450 nm. O conteúdo de MC-LReq no extrato foi $160 \mu\text{g mL}^{-1}$; este extrato foi utilizado nos experimentos para injeção em peixes.

2.2.Delineamento experimental

Juvenis de pacu, *P. mesopotamicus* ($n = 48$, peso $257,5 \pm 88,0$ g; comprimento do corpo $22,4 \pm 2,5$ cm) foram adquiridos na Piscicultura Santa Cândida (Santa Cruz da Conceição, São Paulo, Brasil). Os peixes foram aclimatados durante 30 dias em tanques de 500 L contendo água desclorada e aeração constante, a 25 ± 1 °C. Os peixes foram alimentados com ração comercial (FRI-ACQUA 40, Fri-Ribe Rações, 40% de proteína) *ad libitum*. Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos ($n = 8$ em cada grupo) em tanques de 200 L. Os experimentos consistiram em três grupos de controle (C) e três grupos extrato bruto (EB), sendo um grupo C e um grupo EB por tempo experimental, que receberam apenas uma injeção (uma única dose) intraperitoneal (i.p.) de solução salina (grupos C) ou extrato bruto de cianobactérias de *R. fernandoi* R28 (grupos EB) e foram analisados 3 h (C3h; EB3h), 6 h (C6h; EB6h) e 24 h (C24h; EB24h) pós-injeção. Os grupos controles foram injetados com 0,5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%) e os grupos EB foram injetados com o extrato bruto de *R. fernandoi* R28 contendo uma dose subletal de $100 \mu\text{g}$ de MC-LReq (concentração de MC-RR e YR que equivale a MC-LR) por kg peixe⁻¹, diluído em 0,5 mL de solução salina estéril. A concentração foi determinada com base na literatura bem como por sem uma concentração encontrada em períodos de florações intensas. Após período experimental, uma amostra de sangue foi retirada de cada animal, através de punção da veia caudal. Depois, os peixes foram anestesiados com benzocaína ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) e mortos por seção medular. Fígados foram removidas e sub-amostras foram fixadas em 2,5% de glutaraldeído em tampão fosfato

0,1 M pH 7,3 para análises morfológicas e outras sub-amostras foram imediatamente congeladas a -80 °C para análises bioquímicas.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de São Carlos (Proc. N. 2954101115).

2.3.Determinação de PP1 e PP2A endógena em fígado

As amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão (Tris-HCl 40 mM, KCl 20 mM, MgCl₂ 30 mM, pH 8,6) usando um homogeneizador Ultra Turrax (IKA –T10). Os homogeneizados foram centrifugados a 12.000 g, 4 °C, durante 15 min. Os sobrenadantes foram utilizados como fontes de enzimas PP1 e PP2A e para medir a concentração de proteínas (pt). As atividades de PP1 e PP2A (nmol min⁻¹ mg pt⁻¹) foram medidas usando p-nitrofenil fosfato (pNPP) (40 nM para PP1 e 60 nM para PP2A) como substrato de acordo com Carmichael e An (1999) e Heresztyn e Nicholson (2001), respectivamente, e adaptado por Bieczynski et al. (2013). A absorbância foi determinada a 405 nm, em triplicata, a cada 1 min, durante 10 minutos em leitor de microplacas Molecular Devices SpectraMax M5. A concentração de proteína (pt) no homogeneizado foi determinada utilizando o reagente de Bradford e a albumina de soro bovino como padrão, e leitura a 595 nm.

2.4.Determinação da atividade plasmática de enzimas de injúria hepática: Fosfatase alcalina (FAC), Fosfatase ácida (FAL), Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST)

As amostras de plasma foram utilizadas para determinação de aminotransferases e fosfatases.

As atividades de alanina aminotransferase (ALT, nmol NADH mg pt⁻¹) e aspartato aminotransferase (AST, nmol NADH mg pt⁻¹) foram determinadas com base na oxidação de NADH e medidas a 340 nm utilizando kit comercial (Labtest® 108 e Labtest® 109, Brasil) de

acordo com o protocolo do fabricante. Para as atividades de fosfatase ácida (FAC, nmol p-nitrofenilfosfato $\text{min}^{-1} \text{mg pt}^{-1}$) e fosfatase alcalina (FAL, nmol p-nitrofenilfosfato $\text{min}^{-1} \text{mg pt}^{-1}$) foram utilizados tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 5,0) e glicina (0,05 M, MgCl_2 0,01 M, pH 8,5) respectivamente, conforme descrito por Bergmeyer e Beach (1983). A concentração de proteína (pt) no plasma foi determinada usando o reagente de Bradford e a albumina de soro bovino como padrão, a 595 nm.

2.5. Níveis plasmáticos de bilirrubina

Bilirrubina total (BT) e bilirrubina direta (BD) foram quantificados simultaneamente (mg de plasma dL^{-1}) a 525 nm (Sims e Horn, 1958) utilizando kit comercial (Labtest® 31, Labtest, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. As leituras foram adaptadas para microplaca e realizadas em leitor Molecular Devices SpectraMax M5 (Molecular Devices, U.S.).

2.6. Histopatologia de fígado

As amostras de fígado fixadas em 2,5% de glutaraldeído em 0,1 M de tampão de fosfato, pH 7,3 foram desidratadas em série crescente de etanol e incluídas em historesina (Historesin, Leica, Alemanha). Os cortes (3 μm de espessura) foram corados com azul de toluidina e fucsina básica. Os cortes (5/animal) foram analisados (25 campos aleatórios por corte) utilizando microscópio de luz Olympus BX51 (Olympus, Dinamarca) com câmera de vídeo digital e software Olympus DP2-BSW. As análises histopatológicas foram classificadas de acordo com um escore (Sc) e um fator de importância (Fi) de acordo com Bernet et al. (1999), com modificações. O Sc depende da distribuição de lesões no órgão, onde (1) ausência de lesão; (2) lesão raramente presente; (3) lesão pouco frequente; (4) lesão com frequência moderada; (5) lesão altamente frequente. O Fi que indica como tal alteração afetaria a função do órgão e a possibilidade de sobrevivência do animal está indicado na Tabela 1 juntamente

com as descrições das lesões, onde (1) representa lesão reversível com mínima importância patológica; (2) lesões reversíveis quando o estressor é neutralizado e moderada importância patológica e (3) lesões geralmente irreversíveis de extrema importância patológica. O índice de lesões (ILorg) para cada patologia foi determinado multiplicando o Fi pelo Sc: $ILorg = Fi \times Sc$. Desse índice foi calculada a porcentagem de alterações entre os grupos controles e os grupos expostos.

Tabela 1. Alterações histopatológicas e classificação do fator de importância das lesões (Fi) para fígado de peixes. Onde (1) representa lesão reversível com mínima importância patológica; (2) lesões reversíveis quando o estressor é neutralizado e moderada importância patológica e (3) lesões geralmente irreversíveis de extrema importância patológica (Bernet, et al., 1999).

Alterações em fígado	Fi
Acúmulos substâncias intracelulares (grânulos eosinófilos)	1
Alteração nuclear	2
Alteração da arquitetura hepática e estrutura celular	1
Aneurisma	1
Atrofia	2
Centros de melanomacrófagos	1
Degeneração citoplasmática	1
Fibrose	2
Hemorragia intra-hepática	1
Hipertrofia	1
Hiperemia (sinusóides)	1
Necrose	3

2.7. Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média \pm E.P.M. (erro padrão da média). Para os dados bioquímicos foi aplicado o teste de distribuição normal D'Agostino-Pearson. As diferenças entre grupos de controle e exposição foram analisadas utilizando test-t de Student. Todos os testes foram realizados usando o software GraphPad Prism (versão 7.0) e a significância dos dados foi designada em $p < 0,05$.

Para a análise histopatológica foi utilizado t-test de Student usando o software GraphPad Prism (versão 7.0). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estaticamente significativos.

3. Resultados

Durante o experimento, não ocorreu mortalidade de peixes em nenhum grupo. Não houve alteração no comportamento ou na coloração dos animais.

3.1. Atividade de PP1 e PP2A endógena em fígado.

As atividades das PP1 e PP2A não foram alteradas no fígado 3, 6 e 24 h após a injeção do extrato bruto de *R. fernandoi* (Fig. 1)

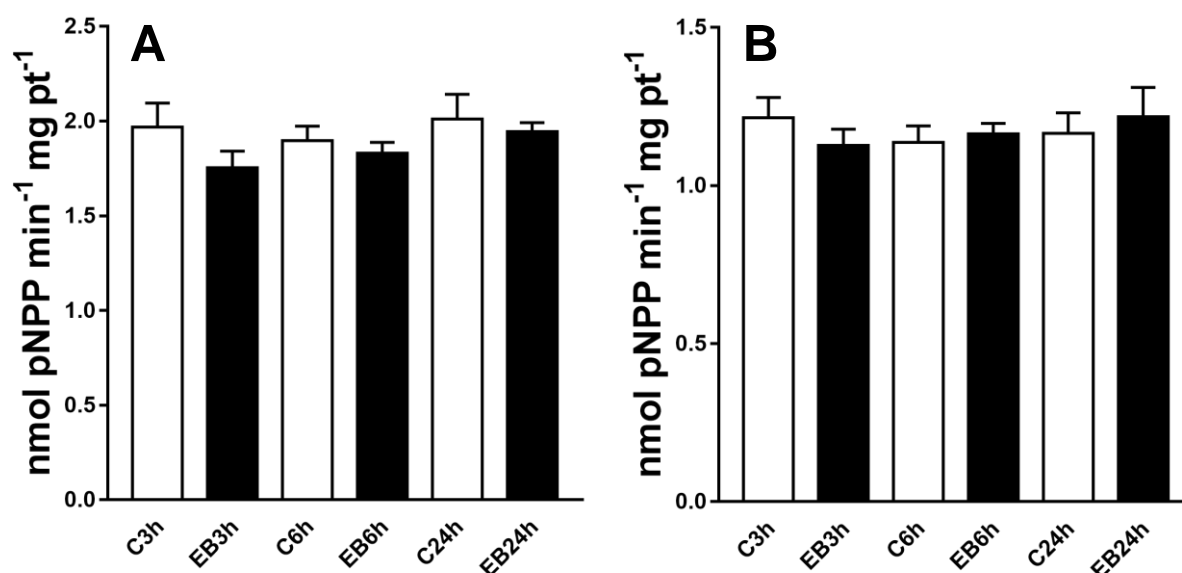


Figura 1. Atividade das proteínas fosfatases no fígado de *Piaractus mesopotamicus* dos grupos controle (C, injeção de solução salina) e dos grupos injetados com extrato bruto de

Radiocystis fernandoi (EB): A. Atividade da PP1; B. Atividade da PP2A. Os valores são as médias \pm E.P.M. (n = 8)

3.2. Biomarcadores bioquímicos de injúria hepática

3.2.1. Atividade de enzimas no plasma (FAC, FAL, ALT e AST)

Os valores das atividades da FAC, FAL, AST e ALT em amostras de plasma após injeção i.p. de extrato bruto de *R. fernandoi* são mostrados na Tabela 2. Após 3 h, FAL aumentou 49% e FAC não se alterou. Não foram observadas alterações em FAC e FAL após 6 h. Após 24 h FAC e FAL diminuíram 21% e 20%, respectivamente. A atividade da AST aumentou 44%, 33% e 741% após 3, 6 e 24 h, e a atividade da ALT aumentou 158%, 221% e 2343% após 3, 6 e 24 h, respectivamente.

Tabela 2. Atividade da fosfatase ácida (FAC), fosfatase alcalina (FAL), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) no plasma de *Piaractus mesopotamicus* do grupo controle (C, injeção de solução salina) e grupo injetado com extrato bruto de cianobactéria *Radiocystis fernandoi* (EB) 3, 6 e 24 h após injeção i.p. Os valores são as médias (\pm E.P.M.). * Indica diferença significativa entre os respectivos grupos C e EB ($p < 0,05$). (n = 8)

Plasma				
Enzimas	Grupos			
		3h	6h	24h
FAC (nmol p-nitrofenilfosfato min ⁻¹ mg pt ⁻¹)	C	0,54 \pm 0,09	0,64 \pm 0,08	0,62 \pm 0,03
	EB	0,57 \pm 0,03	0,68 \pm 0,06	0,48 \pm 0,03*
FAL (nmol p-nitrofenilfosfato min ⁻¹ mg pt ⁻¹)	C	6,34 \pm 0,51	9,46 \pm 0,76	8,19 \pm 0,53
	EB	9,45 \pm 0,40*	8,63 \pm 0,46	6,51 \pm 0,36*
AST (nmol NADH mg pt ⁻¹)	C	15,34 \pm 1,99	19,80 \pm 2,63	15,10 \pm 1,45
	EB	39,65 \pm 6,09*	63,59 \pm 5,11*	368,9 \pm 23,66*
ALT (nmol NADH mg pt ⁻¹)	C	3,38 \pm 0,37	3,91 \pm 0,30	3,79 \pm 0,49
	EB	4,90 \pm 0,60*	5,22 \pm 0,34*	31,85 \pm 4,33*

3.2.2. Bilirrubina

A concentração de bilirrubina total aumentou 13% 6 h após injeção i.p. de extrato bruto de *R. fernandoi*. Não houve alteração na concentração de bilirrubina plasmática após 3 e 24 h (Fig. 2)

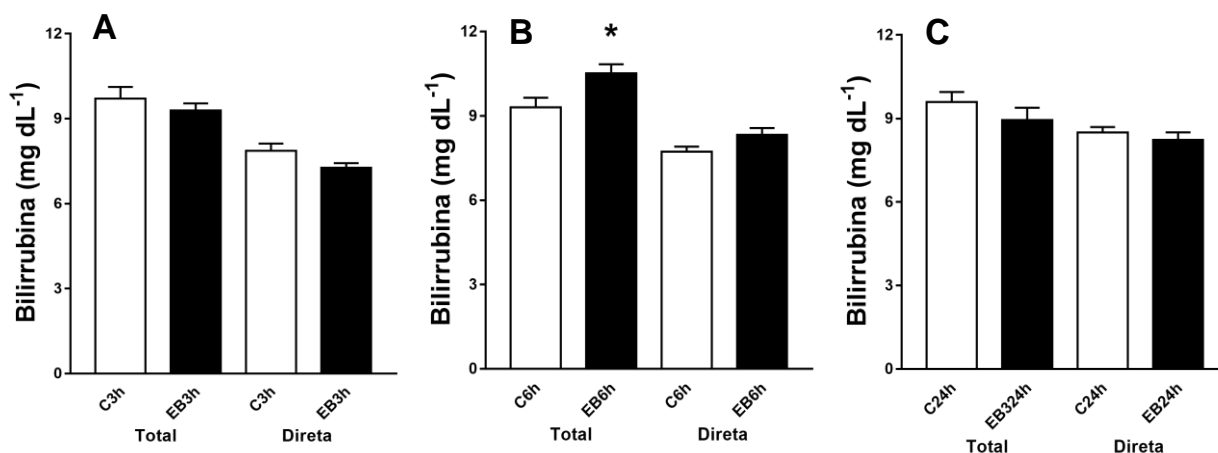


Figura 2. Concentração de bilirrubina total e bilirrubina direta no plasma de *Piaractus mesopotamicus* do grupo controle (C, injeção de solução salina) e grupo injetados com extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* (EB) 3 (A), 6 (B) e 24 (C) h após injeção. Os valores são médias \pm E.P.M. * Indica diferença significativa ($P < 0,05$) do respectivo controle. (n = 8)

3.3.Histopatologias

No geral, o fígado de *P. mesopotamicus* dos grupos C apresentou estrutura normal com hepatócitos em forma hexagonal com núcleo central formando cordões (Fig. 3A e 3B). A rede de capilares ao redor dos hepatócitos denominados sinusóides, bem como a tríade portal com veia, artéria e ducto biliar também apresentaram aspecto normal (Fig. 3A e 3B). As principais patologias encontradas estão apresentadas na Tabela 3. Algumas alterações histológicas em fígado de *Piaractus mesopotamicus* foram observadas nos grupos controle como acúmulo de substâncias intracelulares, atrofia e degeneração citoplasmática. Nos grupos injetados com

extrato bruto de *R. fernandoi* (100 µg de MC-LReq kg⁻¹) as histopatologias, em geral, foram alterações estruturais, nucleares e hiperemia. Três horas após a injeção i.p., as alterações na arquitetura hepática e estrutura celular aumentaram 183,3%; hipertrofia celular, alterações nucleares (picnose e fragmentações) e hiperemia aumentaram 50; 100 e 91,7%, respectivamente (Fig. 3C, D). Após 6 h, as alterações na arquitetura hepática e estrutura celular e hiperemia estavam aumentadas 125 e 69,2% respectivamente; atrofia celular aumentou 44,4 em relação ao controle (Fig. 4A, B). Após 24 h, o grupo EB mostrou o maior número de alterações em relação ao grupo controle: acúmulo de substâncias intracelulares (grânulos eosinófilos), 110%; alterações arquitetônicas e estruturais 88,9%, hipertrofia celular, 93,3%; alterações nucleares (picnose e fragmentações), 111% e hiperemia 93,3% (Fig. 4E e 4F).

Tabela 3. Índice de lesão histopatológica no fígado de *Piaractus mesopotamicus* do grupo controle (C, injeção de solução salina) e grupo injeção de extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* (EB), após 3, 6 e 24 h. A diferença em porcentagem (%) entre os respectivos grupos C e EB são dados. (n = 8)

Lesões	Índice de lesão histopatológica								
	Grupos								
	C3 h	EB3 h	%	C6 h	EB6 h	%	C24 h	EB24 h	%
Acúmulo de substâncias intracelulares (grânulos eosinófilos)	1,5	1,6	8,3	1,62	1,5	-7,7	1,25	2,62	110
Alteração da arquitetura hepática e estrutura celular	1,5	4,3	183,3	2	4,5	125	2,25	4,25	88,9
Atrofia celular	2	2,5	25	2,25	3,25	44,4	2,25	2	-11
Hipertrofia celular	1	2	50	1,37	1,62	18,2	1	3,62	93,3
Degeneração citoplasmática	1,75	2,1	21,4	3	2,12	-29,2	2	1,5	-25
Alterações nucleares (picnoses e fragmentações)	2,5	5	100	3	4	33,3	2,25	4,75	111
Hiperemia	1,5	2,9	91,7	1,62	2,75	69,2	1,87	3,62	93,3
Centros de melanomacrófagos	1	1,1	12,5	1	1	0	1	1	0
Necroses	3	3,4	12,5	3,75	3	-20	3	3	0

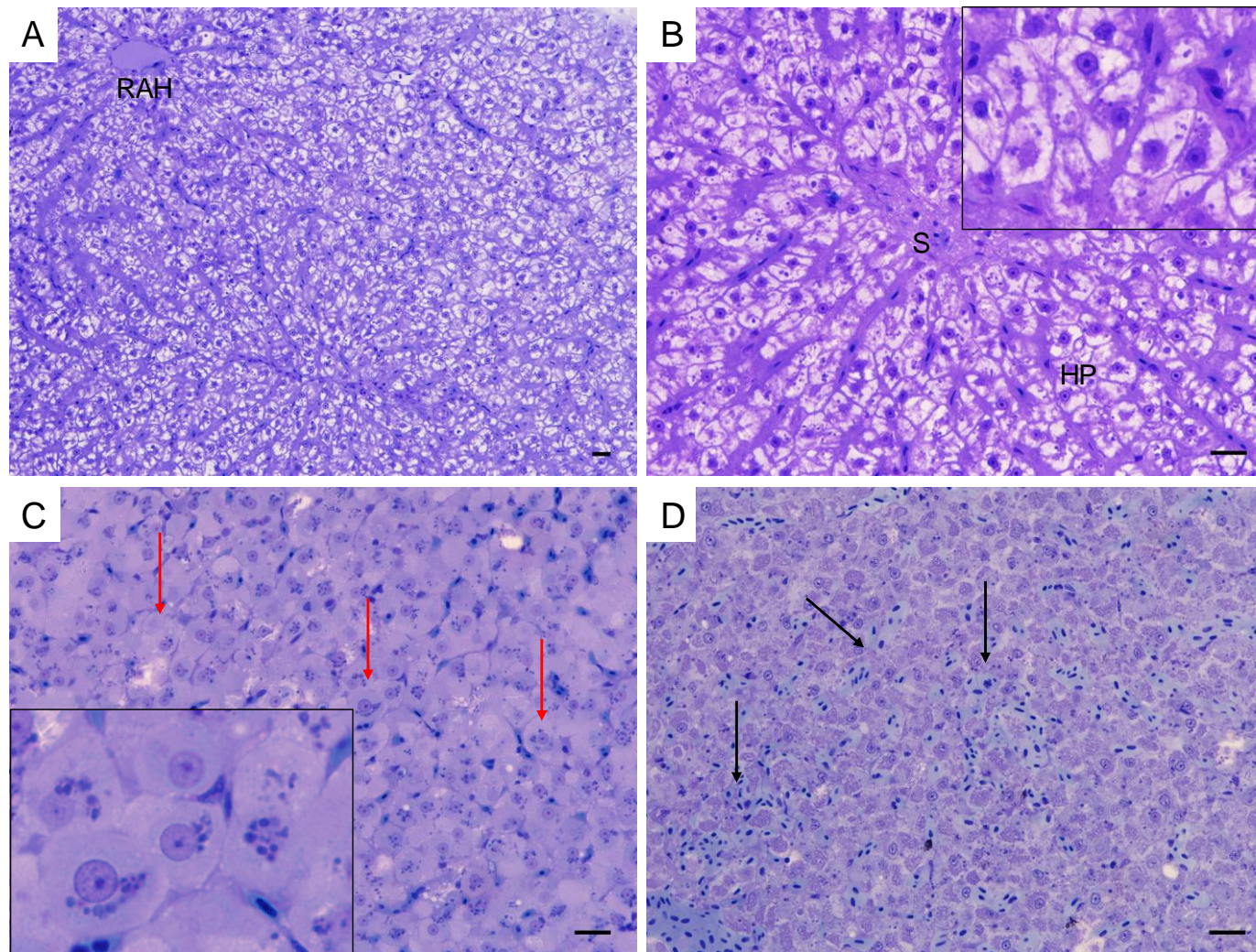


Figura 3. Histopatologias no fígado de *Piaractus mesopotamicus*. A e B representam grupo controle (C, injeção i.p. salina). A. Aspecto geral do fígado mostrando vaso sanguíneo do sistema portal hepático (RAH), pequenos vasos e organização dos hepatócitos; B. Detalhe do fígado mostrando sinusóides (S) e hepatócitos (HP) em destaque. C e D representam grupo extrato bruto (EB, 3 h após injeção i.p. extrato bruto de cianobactéria *Radiocystis fernandoi*). Note hipertrofia celular (setas vermelhas) e a forma e inclusões citoplasmáticas em destaque. D. Aspecto geral do fígado mostrando hiperemia (setas pretas). Coloração azul de toluidina e fucsina básica. Barra de escala em A (50 μ m) B, C e D (20 μ m). (n = 8)

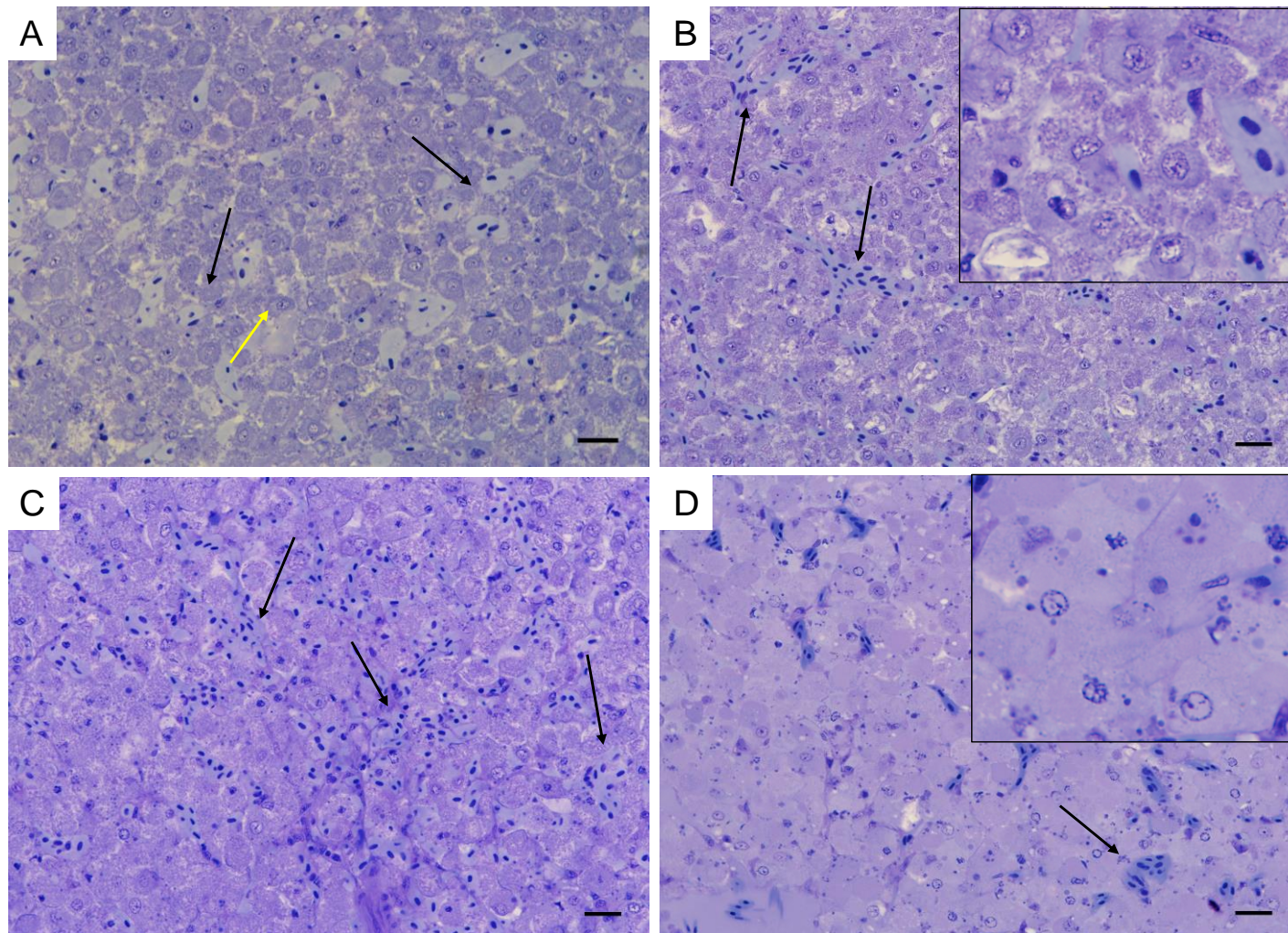


Figura 4. Histopatologia do fígado de *Piaractus mesopotamicus* após injeção i.p. extrato bruto de cianobactéria *Radiocystis fernandoi*. A e B representam grupo 6 horas após injeção. Note intensa hiperemia (setas pretas) e atrofia de alguns hepatócitos (seta amarela). C e D representam grupo 24 horas após injeção. Note hiperemia (setas pretas), alterações nucleares – degeneração e perda de formato da carioteca (seta amarela em A em destaque em B) e, em destaque em D, acúmulo de substâncias intracelulares. Coloração azul de toluidina e fucsina básica. Barra de escala em 20 μm . (n = 8)

4. Discussão

O presente estudo mostrou que o extrato bruto da cianobactéria *Radiocistys fernandoi* cepa R28 que produz majoritariamente MC-RR e MC-YR e minoritariamente outros oligopeptídeos, mas não produz MC-LR (Pereira et al., 2012), encontrada em águas de ambientes tropicais e subtropicais, é tóxica para peixes, corroborando com os estudos de Paulino et al. (2017a e 2017b) em traíra, *Hoplias malabaricus*.

Microcistinas são hepatotóxicas e, no fígado, causam a inibição das proteínas fosfatases, específicas na membrana celular, desencadeiam uma cascata de reações que culmina com danos a estrutura tecidual (Campos e Vasconcelos, 2010; Chen et al., 2016). Embora, no presente estudo, não tenha sido observado alteração da PP1 e PP2A no fígado, as demais alterações enzimáticas e histopatológicas mostram a ocorrência de hepatotoxicidade, corroborando com outros autores que observaram toxicidade mesmo após recuperação de PP1 e PP2A. Tencalla and Dietrich (1997) sugeriram reversibilidade das ligações MC-fosfatase após 3 h de gavagem com 5700 $\mu\text{g MC-LR kg}^{-1}$ no fígado de *Oncorhynchus mykiss*. Paulino et al. (2017a) também observaram danos a morfologia hepática, 12 e 96 horas após injeção i.p. de 100 $\mu\text{g MC-LR eq kg}^{-1}$ em *Hoplias malabaricus* apesar de não ter detectado a inibição das PP1 e PP2A. Apesar da inibição das fosfatases PP1 e PP2A ser um processo que possa ser reversível, os danos causados podem ser observados em alguns minutos ou horas. Gupta et al. (2003), observaram fragmentação do DNA 30 minutos após injeção i.p. em ratos Siwss albinos em três grupos experimentais expostos a 43 $\mu\text{g MC-LR kg}^{-1}$, 235.4 $\mu\text{g MC-RR kg}^{-1}$ e 110.6 $\mu\text{g MC-YR kg}^{-1}$.

As enzimas FAC, FAL, AST e ALT são consideradas marcadores de dano hepático e tem muito utilizadas em estudos que avaliam a ação de substâncias hepatotóxicas. Uma vez que o tecido hepático sofre danos em sua estrutura e as células são lisadas, essas enzimas extravasam para o plasma sendo considerados indicadores de disfunção hepática (Torkadi et al., 2013). O aumento da FAL após 3 horas bem como o aumento da atividade de AST e ALT em todos os grupos experimentais EB juntamente com as alterações observadas na histologia do fígado sugerem que o extrato bruto de cianobactéria *R. fernandoi* contendo as variantes RR e YR de microcistinas e outros oligopeptídeos secundários apresenta alto grau de hepatotoxicidade uma vez que as alterações estruturais do tecido podem interferir no metabolismo enzimático. Embora a atividade da FAC não tenha se alterado após 3 e 6 horas, talvez pela sua menor especificidade e níveis menores em fígado, após 24 horas ambas enzimas FAC e FAL diminuíram no plasma o que pode sugerir falha na recuperação da dinâmica da enzima. Todas as análises enzimáticas no plasma, após 24 horas, mostraram maior nível de comprometimento do tecido hepático resultando em aumento da atividade dos marcadores enzimáticos no plasma e nas alterações histopatológicas. Malbrouck et al., (2003) observaram aumento significativo de AST de 24 a 96 horas e ALT de 3 a 96 horas após injeção i.p. de 125 $\mu\text{g MC-LR kg}^{-1}$ no peixe dourado, *Carassius auratus* L. Nossos estudos corroboram com o trabalho de Woźny et al., (2016) que observaram aumento nos níveis de AST e ALT 24 horas após injeção i.p. de 100 $\mu\text{g MC-LR kg}^{-1}$ em *Coregonus lavaretus* porém, no mesmo trabalho os níveis de FAL aumentaram somente nos animais expostos a 28 dias (injeções a cada 7 dias). As fosfatases ácida e alcalina são hidrolases que estão presentes em outros tecidos além do fígado, porém a FAL está presente em grandes níveis no tecido hepático na membrana celular do hepatócito próximo aos canalículos biliares, sendo sua atividade mais alta nos hepatócitos próximos aos ductos biliares (Torkadi et al., 2013). As enzimas AST e ALT são transaminases que catalisam alanina e aspartato à oxalacetato e piruvato, respectivamente. AST está presente

em alguns tecidos, como eritrócitos, músculo, rim e pâncreas sendo mais abundante no fígado. ALT apresenta alta concentração no fígado e menor concentração em rim, músculos, pâncreas e eritrócitos (Vroon and Israili, 1990).

Bilirrubina é um metabólito formado a partir da destruição das hemácias sendo o fígado órgão central para o processo de metabolização e excreção da bilirrubina. O aumento da bilirrubina total 6 h após a injeção i.p., pode ter sido causado por obstrução do fluxo de bile devido a alteração na forma dos hepatócitos e lesão dos mesmos, causando deficiência na captação e conjugação da bilirrubina e também refluxo da bilirrubina conjugada para o sangue (Fevery, 2008; Woźny et al., 2016). Os hepatócitos captam a bilirrubina indireta que é conjugada dentro da célula formando a bilirrubina direta (DB) e, então, secretada nos canalículos biliares; a ocorrência de dano celular e conseqüentemente nos canalículos biliares que são formados pela conformação hexagonal dos hepatócitos, a bilirrubina direta passa para a corrente sanguínea (Fevery, 2008).

Os resultados obtidos após injeção i.p. de extrato bruto de cianobactéria *R. fernandoi* em *P. mesopotamicus* evidenciam que outras microcistinas, que não a variante LR, causam efeitos semelhantes no fígado. As alterações estruturais e na arquitetura bem como a hiperemia do tecido encontrada em todos os animais dos grupos EB, são conseqüências clássicas do principal mecanismo de ação dessas hepatotoxinas. Uma vez que no organismo, as MCs são captadas por polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATPs) presentes em grandes quantidades no hepatócito no fígado, após inibição das proteínas fosfatases, ocorre hiperfosforilação de proteínas ligadas ao citoesqueleto e os hepatócitos perdem seu formato poligonal e a aderência entre si, ocorrendo conseqüentemente desestruturação do tecido hepático que pode culminar em hemorragia intra-hepática (Falconer e Yeung, 1992). Após gavagem (5700 µg MC-LR kg⁻¹) em *Oncorhynchus mykiss*, Fischer et al., (2000) observaram alterações na organização dos cordões hepáticos após 1 hora de exposição. Shi et al., (2015)

constatarem dissociação dos hepatócitos, desarranjo dos cordões hepáticos, dilatação dos sinusóides e veia central com estase de sangue após 5 horas de injeção i.p. de 120 $\mu\text{g MC-LR kg}^{-1}$ em fígado de *Cyprinus carpio* L. A hipertrofia celular observada após 3 e 24h é uma resposta esperada devido ao aumento da atividade celular como um mecanismo compensatório na tentativa de neutralizar os efeitos da toxina e atrofia celular observada após 6 horas pode ser considerada uma alteração regressiva relacionada a redução ou até perda de função do órgão (Bernet et al., 1999). Embora os grupos EB tenham apresentado patologias, após 24 h de exposição as alterações foram em maior número e frequência. O desarranjo tecidual após 24 horas foi mais acentuado tanto à nível celular quanto nuclear sendo potencialmente responsável pelo acúmulo de substâncias intracelulares e estas, por sua vez, podem ser indicadores de apoptose celular que é caracterizada pelo aparecimento de núcleos picnóticos e fragmentação nuclear (Orrenius et al., 2010). Nosso trabalho é consistente com outros estudos que mostraram alterações semelhantes no fígado. Após 14 dias de exposição à 10 $\mu\text{g/L}^{-1}$ de MC-LR, com renovação de água com MC-LR a cada 48 h, Jiang et al., (2011) observaram leve hipertrofia de hepatócitos, estase de sinusóides, alteração parênquimal com degeneração vacuolar, danos nucleares e infiltração de células inflamatórias em *Cyprinus carpio* L. Nosso estudo reforça os achados em outros trabalhos como Atencio et al., (2008) que utilizando ração contaminadas com MC-LR com concentrações de 5, 11, 25 e 55 $\mu\text{g MC-LR kg}^{-1}$ de peixe mostraram a ocorrência de perda da estrutura em cordão, degeneração glucogênica, esteatose hepática, núcleos picnóticos e hiperemia no fígado de *Tinca tinca*. Além dos efeitos na membrana do hepatócito, alguns estudos mostraram que a MC pode internalizar no núcleo e se ligar com proteínas fosfatases PP1 e PP2A do núcleo (Guzman and Solter, 2002). Fischer et al. (2000) notaram alterações morfológicas nucleares consistentes com apoptose em truta arco-íris 72 horas após gavagem com 5.7 mg/kg^{-1} de MC-LR. As alterações nucleares como picnose, atrofia e ausência de núcleo que ocorreram nos núcleos de hepatócitos de *P. mesopotamicus* após 3 e 24

horas podem estar relacionadas com essa possível interação entre MC e fosfatases PP1 e PP2A nuclear. Guzman et al. (2003) observaram inibição quase completa da atividade nuclear de PP1 e PP2A em ratos Balb/C, 50 min após injeção i.p. de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ de MC-LR.

5. Conclusões

Embora *Radiocystis fernandoi* cepa R28 tenha apenas MC-RR e MC-YR como variantes majoritárias o extrato bruto de cianobactérias dessa cepa contendo essas MCs e, em menor quantidade outros oligopeptídeos, foi tóxico para *P. mesopotamicus* uma vez que alteraram as principais enzimas do fígado consideradas como indicadores de injúria hepática e a histologia do fígado.

6. Agradecimento

Este estudo teve apoio financeiro da Companhia de Energia de Minas Gerais (CEMIG, Proc. GT 346) e bolsa de estudo fornecida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

7. Referências

- Atencio, L., Moreno, I., Josa, 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.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases* 22, 25-34

- Bieczynski, F., Bianchi, V.A., Luquet, C.M., 2013. Accumulation and biochemical effects of microcystin-LR on the Patagonian pejerrey (*Odontesthes hatcheri*) fed with the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. *Fish Physiology and Biochemistry* 39, 1309-1321.
- Bieczynski, F., De Anna, J.S., Pirez, M., Brena, B.M., Villanueva, S.S.M., Luquet, C.M., 2014. Cellular transport of microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) across the intestinal wall: Possible involvement of multidrug resistance-associated proteins. *Aquatic Toxicology* 154, 97–106.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. *Analytical Biochemistry: methods in the biological sciences* 72, 248-254.
- Bury, N.R., Flik, G., Eddy, F.B., Codd, G. A., 1996. The effects of cyanobacterium and the cyanobacterial toxin microcystin-LR on Ca^{2+} transport and Na^+/K^+ ATPase in tilapia gills. *Journal of Experimental Biology* 199, 1319–1326.
- Campos, A., Vasconcelos, V., 2010. Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *International Journal of Molecular Science* 11, 268-287.
- Chen, L., Chen, J., Zhang, X., Xie, P., 2016. A review of reproductive toxicity of microcystin. *Journal of Hazardous Materials* 301, 381–399.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., POTTS, W.T.W., 1999. Ionic transport in the fish gill epithelium. *Journal of Experimental Zoology* 283, 641–652.
- Falconer, I.R., Yeung, D.S.K. 1992. Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by *Microcystis* toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins. *Chemico-Biological Interactions* 81, 181-196.
- Ferevy, J., 2008. Bilirubin in clinical practice: a review. *Liver International* 28, 592-605.
- Feurstein, D., Hoist, I., Fischer, A., Dietrich, D.R., 2009. Oatp-associated uptake and toxicity of microcystins in primary murine whole brain cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 234, 247-255.
- Fisher, W. J., Hitzfeld, B. C., Tencalla, F., Eriksson, J. E., Mikhailov, A., Dietrich, D.R., 2000. Microcystin-LR toxicodynamics, induced pathology, and immunohistochemical localization in livers of blue-green algae exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicological Sciences* 54, 365-373.

Gaete V., Canelo, E., Lagos, N., Zambrano, F., 1994. Inhibitory effects of *Microcystis aeruginosa* toxin on ion pumps of the gill of freshwater fish. *Toxicon* 32, 121–127.

Gibbs, A., Somero, G.N., 1989. Pressure adaptation of Na⁺/K⁺-ATPase in gills of marine teleosts. *The Journal of Experimental Biology* 143, 475-492.

González, P.C., Vázquez, R.P.M., Garcia, M.A.G., Sanz, P., Palau, F., 2005. Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins. *Human Molecular Genetics* 14, 2091-2098.

Gupta, N., Pant, S.C., Vijayaraghavan, R., Rao, P.V., 2003. Comparative toxicity evaluation cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystins variants (LR, RR, YR) in mice. *Toxicology* 188, 285–296.

Guzman, R.E., Solter, P.F., Runnegar, M.T. 2003. Inhibition of nuclear protein phosphatase activity in mouse hepatocytes by the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Toxicon* 41,773-781.

Jiang, J., Gu, X., Song, R., Zhang, Q., Geng, J., Wang, W., Yang, L. 2011 Time-dependent oxidative stress and histopathological changes in *Cyprinus carpio* L. exposed to microcystin-LR. *Ecotoxicology* 20, 1000-1009.

Jiang, L. J., Shan, Z., Xu, W., Wang, X., Zhou, J., Kong, D., Xu, J., 2013. Microcystin-LR induced reactive oxygen species mediate cytoskeletal disruption and apoptosis of hepatocytes in *Cyprinus carpio*. *PLoS One* 8, e84768.

Kopp, R., Palikova, M., Mares, J., Navratil, S., Kubicek, Z., Zikova, A. 2011. Haematological indices are modulated in juvenile carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to microcystins produced by cyanobacterial water bloom. *Journal of Fish Diseases* 34, 103-114.

Kultz, D., Somero, G.N., 1995. Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*. *The Journal of Experimental Biology* 198, 1883-1894.

Li, L., Xie, P., Lei, H., Zhang, X. 2013 Renal accumulation and effects of intraperitoneal injection of extracted microcystins in omnivorous crucian carp (*Carassius auratus*). *Toxicon* 70, 62-69.

Lowe, J., Souza-Menezes, J., Freire, D.S., Mattos, L.J., Castiglione, R.C., Barbosa, C.M.L., Santiago, L., Ferrão, F.M., Cardoso, L.H.D., da Silva, R. T., Vieira-Beiral, H.J., Vieyra, A.,

- Morales, M.M., Azevedo, S.M. F.O., Soares, R.M. 2012. Single sublethal dose of microcystin-LR is responsible for different alterations in biochemical, histological and physiological renal Parameters. *Toxicon* 59, 601-609.
- Malbrouck, C., Trausch, G., Devos, P., Kestemont, P., 2003. Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C* 135, 39-48.
- Orrenius, S., Nicotera, P., Zhivotovsky, B. 2010. Cell death mechanisms and their implications in toxicology. *Toxicological Science* 119, 3-19.
- Paulino, M.G., Tavares, D., Bieczynski, F., Pedrão, P.G., Souza, N.E.S., Sakuragui, M.M., Luquet, C.M., Terezan, A.P., Fernandes, J.B., Giani, A., Fernandes, M.N., 2017a. Crude extract of cyanobacteria (*Radiocystis fernandoi*, strain R28) induces liver impairments in fish. *Aquatic Toxicology* 182, 91-101.
- Paulino, M.G., Rossi, P.A., Venturini, F.P., Souza, N.E.S., Sakuragui, M.M., Moraes, G., Terezan, A.P., Fernandes, J.B., Giani, A., Fernandes, M.N., 2017b. Hepatotoxicity and metabolic effects of cellular extract of cyanobacterium 2 containing microcystins RR and YR on neotropical fish (*Hoplias malabaricus*). *Chemosphere* 175, 431-439.
- Pereira, D.A., Pimenta, A.D.C., Giani, A., 2012. Profiles of toxic and non-toxic oligopeptides of *Radiocystis fernandoii* (Cyanobacteria) exposed to three different light intensities. *Microbiological Research* 167, 413-421.
- Pereira, D.A., Giani, A., 2014. Cell density-dependent oligopeptide production in cyanobacterial strains. *FEMS Microbiology Ecology* 88, 175-183.
- Pereira, D.A., Pimentel, J.S.M., Bird, D.F., Giani, A., 2015. Changes in oligopeptide production by toxic cyanobacterial strains under iron deficiency. *Aquatic Microbial Ecology* 74, 205-214.
- Rabergh, C.M.I., Bylund, G., Eriksson, J.E., 1991. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa* on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Toxicology* 20, 131-146.
- Runnegar, M., Berndt, N., Kong, S., Lee, E.Y.C., Zhang, L., 1995. In vivo and in vitro binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 216, 162-169.

Sant'Anna, C.L., Azevedo, M.T.P., Werner, V.R., Dogo, C.R., Rios, F.R., Carvalho, L.R., 2008. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. *Algol. Stud.* 126, 251–265.

Shi, Y., Jiang, J., Shan, Z., Bu, Y., Deng, Z., Cheng, Y., 2015. Oxidative stress and histopathological alterations in liver of *Cyprinus carpio* L. induced by intraperitoneal injection of microcystin-LR. *Ecotoxicology* 24, 511-519.

Sicin'ska, P., Bukowska, B., Michałowicz, J., Duda, W., 2006. Damage of cell membrane and antioxidative system in human erythrocytes incubated with microcystin-LR in vitro. *Toxicon* 47, 387-397.

Steiner, K., Zimmermann, L., Hagenbuch, B., Dietrich D., 2016. Zebrafish Oatp-mediated transport of microcystin congeners. *Archives Toxicology* 90, 1129–1139.

Tencalla, F., Dietrich, D., 1997. Biochemical characterization of microcystin toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicon* 35, 583-595.

Torkadi, P.P., Apte, I.C., Bhute, A.K., 2013. Biochemical evaluation of patients of alcoholic liver disease and non-alcoholic liver disease. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 29, 79-83.

Vieira, J.M.S., Azevedo, M.T.P., Azevedo, S.M.F.O., Honda, R.Y., Correa, B., 2003. Microcystin production by *Radiocystis fernandoi* (Chroococcales, cyanobacteria) isolated from a drinking water reservoir in the city of Belém, PA, Brazilian amazonia region. *Toxicon* 42, 709–713.

Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P., Rodriguez, E.M., 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* 122, 121-129.

Vroon, D.H., Israili, Z., Editors In: Walker, H.K., Hall, W.D., Hurst, J.W., editors. *Source clinical methods: The history, physical, and laboratory examinations*. 3rd edition. Boston: Butterworths; 1990. Chapter 99.

Wickstrom M.L., Khan S.A., Haschek W.M., Wyman J.F., Eriksson J.E., Schaeffer D.J., Beasley V.R., 1995. Alterations in microtubules, intermediate filaments, and microfilaments induced by microcystin-LR in cultured cells. *Toxicologic Pathology* 23, 326-337.

Woźny, M., Lewczuk, B., Ziółkowska, N., Gomułka, P., Dobosz, S., Łakomiak, A., Florczyk, M., Brzuzan, P., 2016. Intraperitoneal exposure of whitefish to microcystin-LR induces rapid

liver injury followed by regeneration and resilience to subsequent exposures. *Toxicology and Applied Pharmacology* 313, 68-87.

Zeng, J., Tu, W., Lazar, L., Chen, D., Zhao, J., Xu, J., 2014. Hyperphosphorylation of microfilament-associated proteins is involved in microcystin-LR-induced toxicity in HL7702 cells. *Environmental Toxicology* 30, 981-988.

Zhou, M., Tu, W., Xu, J., 2015. Mechanisms of microcystin-LR-induced cytoskeletal disruption in animal cells. *Toxicon* 101, 92-200.

Zhou, W., Liang, H., Zhang, X., 2012. Erythrocyte damage of crucian carp (*Carassius auratus*) caused by microcystin-LR: in vitro study. *Fish Physiology and Biochemistry* 38, 849-858.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O crescimento populacional e a falta de planejamento urbano têm aumentado a disponibilidade de matéria orgânica em rios, lagos e mares que aliados a elevação da temperatura das águas são fatores propícios para a proliferação de cianobactérias que podem, ou não, produzir substâncias tóxicas. Muitas variáveis podem interferir na possibilidade de toxicidade da cianobactéria sendo, ainda, que uma mesma espécie que cresce sob condições diferentes pode ter graus de toxicidade diferentes. Todas essas condições dificultam tanto a determinação de quais espécies são tóxicas bem como a caracterização do nível de toxicidade. Fatores como esses tornam importante um amplo estudo de diferentes gêneros e espécies para que se estabeleça de forma mais precisa quais cianobactérias podem ser perigosas para humanos e animais.

Na tentativa de reproduzir o que acontece em ambiente natural, utilizamos o extrato bruto uma vez que este contém não somente as microcistinas (MC), mas também outras substâncias produzidas pelas cianobactérias. Devido à dificuldade de se determinar a CL50 para peixes, uma vez que os mesmos podem sofrer exposições prolongadas e talvez desenvolver mecanismos para combater a contaminação recorrente, utilizamos uma concentração que poder encontrada durante as florações. No Brasil, a espécie utilizada, o pacu é amplamente utilizado em piscicultura para venda e consumo além da sua pesca em ambientes naturais. Isso o torna um importante modelo para utilização nesse estudo.

Após os experimentos conseguimos avaliar que o extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* cepa R28 causou alterações nos processos osmorregulatórios dos peixes afetando somente o tecido branquial com comprometimento severo do tecido. Observamos também que, assim como outras cianobactérias que contenham MC, a espécie *R. fernandoi* também causou danos hepatotóxicos com altos níveis de destruição celular e comprometimento enzimático.

Osmorregulação é um dos processos fundamentais nos organismos de animais aquáticos assim como bom funcionamento do fígado como tecido metabolizador. Danos a essas funções essenciais podem acarretar sérios problemas a saúde e em casos mais graves levar o animal a morte. Embora as análises bioquímicas e morfológicas sejam biomarcadores eficientes para determinação de lesão nos organismos aquáticos, mais estudos seria necessários para determinar as vidas responsáveis pelas alterações nos processos osmorregulatórios e na atividade da enzima NKA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Amorim, L.C.A., 2003. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 6, 158-170.

Apeldoorn, M.E., Egmond, H.P., Speijers, G.J.A., Bakker, G.J.I., 2007. Toxins of Cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research* 51, 7-60.

Azevedo, S.M.F.O., 1998. Toxinas de cianobactérias: causas e consequências para a saúde pública. *Medicina On-line*, 1, 1-16.

Azevedo, S.M.F.O., Vasconcelos, V.M., 2006. Toxinas de cianobactérias: causas e consequências para a saúde pública. In: Zagatto, P.A.; Bertoletti, E. *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações*. São Carlos: RiMA, 433-452.

Au, D.W.T., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin* 48, 817–834.

Baldisserotto, B., Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., 2014. *Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce*. Jaboticabal: FUNEP; UNESP.

Beasley, Y.V.R., Cook, W.O., Dahlem, A.M., Hooser, S.B., Lovell, R.A., Valentine, W.M., 1989. Algae intoxication in livestock and waterfowl. *The Veterinary Clinics of North América: Food Animal Practice, United States* 5, 345-361.

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases* 22, 25-34.

Best, J.H., Pflugmacher, S., Wiegand, C., Eddy, F.B., Metcalf, JS, Codd, GA., 2002. Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of MC-LR, on glutathione *S*-transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 60, 223–231.

Borges, P.A.F., Train, S., Rodrigues, L.C., 2008. Estrutura do fitoplâncton, em curto período de tempo, em um braço do reservatório de Rosana (ribeirão do Corvo, Paraná, Brasil). *Acta Scientiarum Biological Science* 30, 57-65.

Bury, N.R., Eddy, F.B., Codd, G.A., 1995. The effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, the cyanobacterial hepatotoxin MC-LR, and ammonia on growth rate and ionic regulation of brown trout. *Journal of Fish Biology* 46, 1042–1054.

Bury, N.R., Flik, G., Eddy, F.B., Codd, G.A., 1996. The effects of cyanobacteria and the cyanobacterial toxin microcystin-LR on Ca^{2+} transport and Na^+/K^+ -ATPase in tilápia gills. *The Journal of Experimental Biology* 199, 1319–1326.

Bury, N.R., 2005. The changes to apical silver membrane uptake, and basolateral membrane silver export in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on exposure to sublethal silver concentrations. *Aquatic Toxicology* 72, 135–145.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518/2004, de 25 de Março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle de vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, nº 59, seção I, 266-270.

Campos, A., Vasconcelos, V., 2010. Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *International Journal of Molecular Sciences* 11, 268-287.

Carbis, C.R., Rawlin, G.T., Grant, P., Mitchell, G.F., Anderson, J.W., McCauley, I., 1997. A study of feral carp, *Cyprinus carpio* L. exposed to *Microcystis aeruginosa* at Lake Mokoan, Australia, and possible implications for fish health. *Journal of Fish Diseases* 20, 81–91.

Carmichael, W.W. 1997. The Cyanotoxins. *Advances in Botanical Research* 27, 211-256.

Cazenave, J., Wunderlin, D. A., Bistoni, M. A., Amé, M. V., Krause, E., Pflugmacher, S., Wiegand, C., 2005. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*. *Aquatic Toxicology* 75, 178-190.

Chorus, I., Bartram, J., 1999. Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health, monitoring and management. Londres: Spon Press, p 416.

Clauss, T.M., Dove, A.D.M., Arnold, J.E., 2008. Hematologic disorders of fish. *Veterinary Clinics of Exotic Animals* 11, 445-703.

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

Cohen, P., 1989. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annual Review of Biochemistry* 58, 453-508.

Ding, W., Shen, W., Ong, C., 2001. Critical role of reactive oxygen species formation in microcystin induced cytoskeleton disruption in primary cultured hepatocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 64, 507–519

Evans, D.H., Piermarini, P.M., Potts, W.T.W., 1999. Ionic transport in the fish gill epithelium. *Journal of Experimental Zoology* 283, 641–652.

Evers, R., Xiao-Yan Chu., X., 2008. Role of the murine organic anion-transporting polypeptide 1b2 (Oatp1b2) in Drug disposition and hepatotoxicity. *Molecular Pharmacology* 74, 309–311.

Falconer, I.R., Yeung, D.S.K. 1992. Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by microcystis toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins. *Chemico-Biological Interactions* 81, 181-196.

Fernandes, M.N., Moron, S.E., Sakuragui, M.M., 2007. Gill morphological adjustments to environment and gas exchange function in: Fernandes, MN., Rantin, F.T., Glass, M.L., Kapoor, B.G. (Eds.), *Fish respiration and environment*. Science Publishers, New Hampshire, pp. 93-120.

Feurstein, D., Hoist, I., Fischer, A., Dietrich, D.R., 2009. Oatp-associated uptake and toxicity of microcystins in primary murine whole brain cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 234, 247-255.

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. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59, 151–163.

Fisher, W. J., Hitzfeld, B. C., Tencalla, F., Eriksson, J. E., Mikhailov, A., Dietrich, D.R., 2000. Microcystin-LR toxicodynamics, induced pathology, and immunohistochemical localization in livers of blue-green algae exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicological Sciences* 54, 365-373.

Fischer, W., Altheimer, S., Cattori, V., Meier, P., Dietrich, D., Hagenbuch, B., 2005. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203, 3257 – 263.

Fischer, A., Hoeger, S., Stemmer, K., et al 2010. The role of organic anion transporting polypeptides (OATPs/SLCOs) in the toxicity of different microcystin congeners in vitro: a comparison of primary human hepatocytes and OATP-transfected HEK293 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245, 9–20.

Gaete, V., Canelo, E., Lagos, N., Zambrano, F., 1994. Inhibitory effects of *Microcystis aeruginosa* toxin on ion pump of the gill of freshwater fish. *Toxicon* 32, 121–127.

Gaudin, J., Huet, S., Jarry, G., Fessard, V., 2008. In vivo DNA damage induced by the cyanotoxin microcystin-LR: comparison of BioMed research international intra-peritoneal and oral administrations by use of the comet assay. *Mutation Research* 652, 65–71.

Gehringer, M.M., 2003. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. *FEBS Letters* 557, 1-8.

Gupta, N., Pant, S.C., Vijayaraghavan, R., Rao, P.V., 2003. Comparative toxicity evaluation cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystins variants (LR, RR, YR) in mice. *Toxicology* 188, 285–296.

Harada K.I., Tsuji K., Watanabe, M.F., 1996. Stability of microcystins from cyanobacteria. III. Effect of pH and temperature. *Phycologia* 35, 83-88.

Hiroi, J., McCormick, S.D., 2012. New insights into gill ionocyte and ion transporter function in euryhaline and diadromous fish. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 184, 257–268.

Honkanen, R.E. Zwiller, J., Moore, R.E., Daily, L., Khatra, B.S., Dukelow, M., Boynton, A.L., 1990. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *The Journal of Biological Chemistry* 265, 19401-19404.

Janssens, V., Goris, J., 2001. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochemical Journal* 353, 417-439.

Jiang, L. J., Shan, Z., Xu, W., Wang, X., Zhou, J., Kong, D., Xu, J., 2013. Microcystin-LR induced reactive oxygen species mediate cytoskeletal disruption and apoptosis of hepatocytes in *Cyprinus carpio*. *PLoS One* 8, e84768.

Komárek, J., Komárková-Legnerová, J., 1993. *Radiocystis fernandoi*, a new plantic cyanoprokariotic species from tropical freshwater reservoirs. *Preslia*, 65, 355–357.

Kopp, R., Palíková, M., Navrátil, S., Mareš, J., 2014. Modulation of biochemical indices in common carp (*Cyprinus carpio* L.) under the influence of toxic cyanobacterial biomass in diet. *Fish Physiology Biochemistry* 40, 1651–1658.

Kurmayer, R., Jünter, F., 1999. Strategies for the co-existence of zooplankton with the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in Lake Zürich. *Journal of Plankton Research* 21, n.4, 659-683.

Leal, A.C., Soares, M.C.P., 2004. Hepatotoxicidade da cianotoxina microcistina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37, 84-89.

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

Liyanage, H.M., Arachchi, D.M.N., Abeysekara, T., Guneratne, L., 2016. Toxicology of freshwater Cyanobacteria. *Journal of Environmental Science and Health, Part C* 34, 137-168.

Lowe, J., Souza-Menezes, J., Freire, D.S., Mattos, L.J., Castiglione, R.C., Barbosa, C.M.L., Santiago, L., Ferrão, F.M., Cardoso, L.H.D., da Silva, R. T., Vieira-Beiral, H.J., Vieira, A., Morales, M.M., Azevedo, S.M. F.O., Soares, R.M. 2012. Single sublethal dose of microcystin-LR is responsible for different alterations in biochemical, histological and physiological renal Parameters. *Toxicon* 59, 601-609.

Luca, S.J., Pegorer, M.G., Luca, M.A., 2010. Oxidação de microcistinas-LR em águas pelo íon ferrato (VI). *Engenharia Sanitária e Ambiental* 15, 5-10.

Magalhães, V.F. Soares, R.M., Azevedo, S.M.F.O., 2001. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): Ecological implication and human health risk. *Toxicon* 39, 1077-1085.

Malbrouck, C., Kestemont, P., 2006. Effects of microcystins on fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 72–86.

Mattos, L.J., 2011. Efeitos subletais de microcistina (cianotóxica) sobre aspectos bioquímicos, estereológicos e fisiológicos de modelos murinos. Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Mitrovic, D., Perry, S.F., 2009. The effects of thermally induced gill remodeling on ionocyte distribution and branchial chloride fluxes in goldfish (*Carassius auratus*). The Journal of Experimental Biology 212, 843-852.

Mohamed, Z.A., Hussein, A.A., 2006. Depuration of microcystins in tilapia fish exposed to natural populations of toxic cyanobacteria: A laboratory study. Ecotoxicology and Environmental Safety 63, 424–429.

Monks, N.R., Liu, S., Xu, Y., Yu, H., Bendelow, A.S., Moscow, J.A., 2007. Potent cytotoxicity of the phosphatase inhibitor microcystin LR and microcystin analogues in OATP1B1-and OATP1B3-expressing HeLa cells. Molecular Cancer Therapeutics 6, 587–598.

Motta, V.T., 2000. Bioquímica Clínica: Princípios e interpretações, 3ª ed, v.9, Porto Alegre: Editora Médica Missau, 388p.

Moraes, F. D., 2009. Toxicidade aguda e respostas metabólicas e hematológicas do bagre do canal (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque, 1818) exposto a concentração sub-letal de fenol e recuperação. Dissertação de Mestrado, São Carlos:UFSCar.

Morgan, I.J., Henry, R. P., Wood, C.M., 1997. The mechanism of acute silver nitrate toxicity in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is inhibition of gill Na⁺ and Cl⁻ transport. Aquatic Toxicology 38, 145-163.

Mumby, M.C., Walter, G., 1993. Protein serine/threonine phosphatases: Structure, regulation, and functions in cell growth. The American Physiological Society 73, n. 4, 673-699.

Navratil, S., Palikova, M., Vajcova, V., 1998. The effects of pure MC-LR and biomass of blue-green algae on blood indices of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Veterinaria Brno* 67, 273–279.

Nelson, D., Cox, M. 2005 in Lehninger principles of biochemistry W.H. Freeman and Company, New York, 4 ed., 1216 pp.

Oberemm, A., Fastner, J., Steinberg, C., 1997. Effects of MC-LR and cyanobacterial crude extracts on embryo-larval development of zebrafish. *Water Research* 31, 2918–2921.

Oberemm, A., Becker, J., Codd, G., Steinberg, C., 1999. Effects of cyanobacterial toxins and aqueous crude extracts on the development of fish and amphibians. *Environmental Toxicology* 14, 77–88.

Palacio, H.M., Remírez, J.J., Echenique, R.O., Palacio, J.A., Sant’Anna, C.L., 2015. Floristic composition of cyanobacteria in a neotropical, eutrophic reservoir. *Brazilian Journal of Botany* 38, 865-876.

Palikova, M., Navratil, S., Tichy, F., Sterba, F., Marsalek, B., Blaha, L., 2004. Histopathology of carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae exposed to cyanobacteria extract. *Acta Vet Brno* 73, 253–257.

Paulino, M.G., Sakuragui, M.M., Fernandes, M.N., 2012. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 86, 1–7.

Paulino, M.G., 2015. Efeitos do extrato bruto da cianobactéria *Radiocystis fernandoi* no teleósteo, *Hoplias malabaricus*. – Tese de Doutorado, São Carlos : UFSCar.

Paulino, M.G., Tavares, D., Bieczynski, F., Pedrão, P.G., Souza, N.E.S., Sakuragui, M.M., Luquet, C.M., Terezan, A.P., Fernandes, J.B., Giani, A., Fernandes, M.N., 2017a.

Crude extract of cyanobacteria (*Radiocystis fernandoi*, strain R28) induces liver impairments in fish. *Aquatic Toxicology* 182, 91-101.

Paulino, M.G., Rossi, P.A., Venturini, F.P., Souza, N.E.S., Sakuragui, M.M., Moraes, G., Terezan, A.P., Fernandes, J.B., Giani, A., Fernandes, M.N., 2017b. Hepatotoxicity and metabolic effects of cellular extract of cyanobacterium *Radiocystis fernandoi* containing microcystins RR and YR on neotropical fish (*Hoplias malabaricus*). *Chemosphere* 175, 431-439.

Pereira, D.A., Pimenta, A.D.C., GIANI, A. 2012. Profiles of toxic and non-toxic oligopeptides of *Radiocystis fernandoi* (Cyanobacteria) exposed to three different light intensities. *Microbiological Research* 167, 413-421.

Pietsch, C., Wiegand, C., Amé, M.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. *Environmental Toxicology* 16, 535-542.

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.). *Aquatic Toxicology* 77, 314-321.

Rao, P.V., Bhattacharya, R., Parida, M.M., Jana, M.M., Bhaskar, A.S.B., 1998. Freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UTEX 2385) induced DNA damage in vivo and in vitro. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 5, 1-6.

Rinehart, K.L., Harada, K., Namikoshi, M., Chen, C., Harvis, C.A., 1988. Nodularin, microcystin, and the configuration of Adda. *Journal of the American Chemical Society* 110, 8557-8558.

Rodger, H.D., Turnbull, T., Edwards, C., Codd, G.A., 1994. Cyanobacterial (blue-green algal) bloom associated pathology in brown trout, *Salmo trutta* L., in Loch Leven, Scotland. *Algal bloom associated pathology* 17, 177-181.

Runnegar, M., Berndt, N., Kong, S., Lee, E.Y.C., Zhang, L., 1995. In vivo and in vitro binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 216, 162-169.

Sant'Anna, C.L., Azevedo, M.T.P., Senna, P.A.C., Komárek, J., Komárková, J., 2004. Planktic cyanobacteria from São Paulo State, Brazil: Chroococcales. *Revista Brasileira de Botânica*, 27, n.2, 213-227.

Schlenk, D., Handy, R., Steinert, S., Depledge, M.H., Benson, W., 2008. Biomarkers. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D. *The toxicology of fishes*. Boca Raton: CRC Press. 683-731.

Siqueira, D.B., Oliveira-Filho, E.C., 2008. Cianobactéria de Água Doce e a Saúde Pública: uma revisão. *Universitas: Ciências da Saúde* 03, 109-127.

Soares, R.M., Magalhães, V.F., Azevedo, S.M., 2004. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology* 70, 1-10.

Soares, R.M., 2009. Toxicologia de cianotoxinas: Microcistinas as estrelas do tema. *Ecologia Brasiliensis* 13, 259-271.

Sollid, J., Nilsson, G.E., 2006. Plasticity of respiratory structures—Adaptive remodeling of fish gills induced by ambient oxygen and temperature. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 154, 241–251.

Sortica, V.A., 2009. Investigação dos polimorfismos dos genes de polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATP) e a resposta ao tratamento com sinvastatina. Dissertação de Mestrado, Porto Alegre: UFRGS.

Steiner, K., Zimmermann, L., Hagenbuch, B., Dietrich D., 2015. Zebrafish Oatp-mediated transport of microcystin congeners. *Archives Toxicology* 90, 1129–1139.

Strack, S., Cribbs, J.T., Gomez, L. 2004. Critical role for protein phosphatase 2A heterotrimers in mammalian cell survival. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 47732–47739.

Teixeira, M.G.L.C., Costa, M.C.N., Carvalho, V.L.P., Pereira, M.S., Hager, E., 1993. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bulletin of PAHO* 27, n. 3, 244-253.

Valério, E., Chaves, S. Tenreiro, R., 2010. Diversity and impact of prokaryotic toxins on aquatic environments: a review. *Toxins* 2, 2359-2410.

Vroon, D.H., Israili, Z., Editors In: Walker, H.K., Hall, W.D., Hurst, J.W., editors. *Source Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd edition. Boston: Butterworths; 1990. Chapter 99.

Wang, H., Liu, J., Lin, S., Wang, B., Xing, M., Guo, Z., Xu, L., 2014. MCLR-induced PP2A inhibition and subsequent Rac1 inactivation and hyperphosphorylation of cytoskeleton-associated proteins are involved in cytoskeleton rearrangement in SMMC-7721 human liver cancer cell line. *Chemosphere* 112, 141–153.

Welker, M., Von Döhren, H., 2006. Cyanobacterial peptides: nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS. Microbiology Reviews*. 30, 530–563.

Wendelaar-Bonga, S.E.W., Lock, R.A.C., 2008. The osmoregulatory system. In: Di

Giulio, R.T., Hinton, D. The toxicology of fishes. Boca Raton: CRC Press. 401-415.

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. *Toxicology* 232, 15–23.

Wester, P.W., van der Vem, L.T.M., Vethaak, A.D., Grinwis, G.C.M., Vos, J.G. 2002. Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 11, 289-/295.

Wetzel, R.G., 1993. *Limnologia*. Fundação Calouste Gulbenkian, 2° ed., 696p., Lisboa.

Wiegand, C., Pflugmacher, S., Oberemm, A., Meems, N., Beattie, K.A., Steinberg, C.E.W., Codd, G.A., 1999. Uptake and effects of MC-LR on detoxication enzymes of early life stages of the zebra fish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology* 14, 89–95.

Wickstrom M.L., Khan S.A., Haschek W.M., Wyman J.F., Eriksson J.E., Schaeffer D.J., Beasley V.R., 1995. Alterations in microtubules, intermediate filaments, and microfilaments induced by microcystin-LR in cultured cells. *Toxicologic Pathology* 23, 326-337.

WHO - World Health Organization, 1993. International Programme on Chemical Safety (IPCS) – Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Geneva.

WHO - World Health Organization, 2008. Cyanobacterial Toxins. Guidelines For Drinking Water Quality, World Health Organization, Geneva, Switzerland 1, 192-196.

Zambrano F., Canelo, E., 1996. Effects of microcystin-LR on the partial reactions of the Na-K pump or the gill of carp (*Cyprinus carpio* Linneo). *Toxicon* 34, 451–458.

Zhang, H., Zhang, J., Chen, Y., Zhu, Y., 2008. Microcystin-RR induces apoptosis in fish lymphocytes by generating reactive oxygen species and causing mitochondrial damage. *Fish Physiology Biochemistry* 34, 307-312.

WORK HARD

HAVE FUN

NO DRAMA