

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

**EFEITOS DA MICROCISTINA-LR (*Microcystis aeruginosa*) SOBRE  
PARÂMETROS CARDIO-RESPIRATÓRIOS DE TILÁPIA-DO-  
NILO (*Oreochromis niloticus*).**

NATHAN DIAS MARTINS

SÃO CARLOS  
2010

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

**EFEITOS DA MICROCISTINA-LR (*Microcystis aeruginosa*) SOBRE  
PARÂMETROS CARDIO-RESPIRATÓRIOS DE TILÁPIA-DO-  
NILO (*Oreochromis niloticus*).**

NATHAN DIAS MARTINS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin

SÃO CARLOS  
2010

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M386em

Martins, Nathan Dias.

Efeitos da microcistina-LR (*Microcystis aeruginosa*) sobre parâmetros cardio-respiratórios de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) / Nathan Dias Martins -- São Carlos : UFSCar, 2010.  
44 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

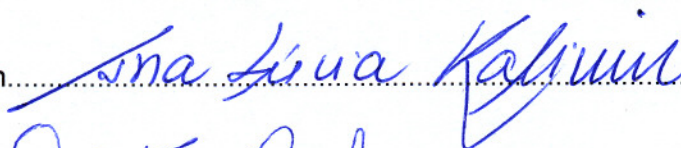
1. Oreochromis niloticus. 2. Microcistina. 3. Tilápia do Nilo. 4. Função cardio-respiratória. I. Título.

CDD: 612.17 (20ª)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas  
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Defesa de Dissertação de Nathan Dias Martins

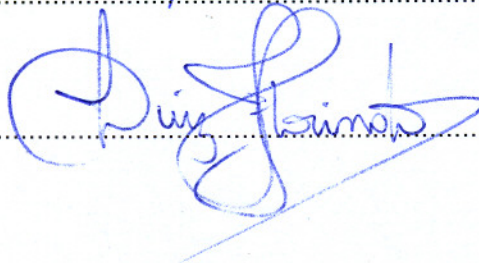
Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin.....



Profa. Dra. Odete Rocha.....



Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo.....



*Dedico este trabalho à minha mãe, Simone Ap. Franco da Silveira, minha avó, Odete Carlota Andreazzi, minha tia, Fábica Alessandra Franco da Silveira e meu irmão Yuri Yan Dias Martins por fazerem parte de toda a história da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra Ana Lúcia Kalinin, pela oportunidade, conselhos, orientação, confiança, paciência, exemplo profissional e apoio.

À amiga Ana Lúcia Kalinin ou “Patroa”, por fazer de seus alunos seus amigos e tornar muito mais prazerosa a convivência em nosso ambiente de trabalho.

À minha mãe, minha avó e minha tia, por todo o sacrifício para que hoje eu pudesse estar aqui, todo o amor, paciência, conselhos e exemplo. Além de terem me ensinado a maior de todas as lições, que é levar a vida sempre com um sorriso no rosto não importa quão difícil ela esteja.

Ao meu irmão, por tudo que nós já passamos juntos e pelas risadas durante toda a nossa vida.

Aos meus tios Léo e Roy por fazerem parte da minha história de vida.

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

Ao Centro de Piscicultura Águas Claras, pela doação dos peixes utilizados no presente estudo.

Ao corpo docente e funcionários do departamento de Ciências Fisiológicas em especial ao Sr. Angelo e ao José Roberto Sanches.

Ao Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin, pelo agradável convívio, pelos ensinamentos e contribuições ao presente trabalho.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite e pelas colaborações ao presente trabalho.

Aos meus amigos do DCF pelas risadas, brincadeiras, incentivo, conselhos, churrascos do departamento, saídas depois do expediente, butecos e tudo mais. Em especial, aos amigos do Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa, pela amizade convívio e apoio: Anelli, André, Juliana, Vivi, Rafael, Samuel, Thiago, Rafael Z, Aline, Luciano, Ellinton, todo o pessoal da I.C, e por toda ajuda e paciência, meu agradecimento especial à Diana.

Aos meus amigos de república, por todos esses anos de convivência e amizade. Meu agradecimento mais do que especial, Vô, Cléston, Marcos, João, Reginaldo, Gordo, Bruno, André, Cortella, Tanajura, Diego e Nelson.

À todos que apesar de não estarem citados aqui contribuíram para minha formação e amadurecimento, tanto pessoal quanto profissional.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | 01 |
| 1.1 Cianotoxinas .....  | 02 |
| 1.2 Microcistinas .....   | 03 |
| 1.3 Função cardio-respiratória de peixes .....  | 04 |
| 1.4 A espécie <i>Oreochromis niloticus</i> .....  | 06 |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....   | 08 |
| <b>3 MATERIAL e MÉTODOS</b> .....   | 09 |
| 3.1 Material .....  | 09 |
| 3.2 Métodos .....   | 09 |
| 3.3 Tratamento estatístico dos dados.....   | 14 |
| <b>4 RESULTADOS</b> .....   | 15 |
| 4.1 Respostas respiratórias de <i>Oreochromis niloticus</i> à hipóxia gradual.....                                  | 15 |
| 4.1.1 Consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$ ) e tensão crítica de oxigênio ( $P_cO_2$ ).....                           | 15 |
| 4.1.2. Ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ), Freqüência respiratória ( $f_R$ ) e Volume ventilatório ( $V_T$ )..... | 18 |
| 4.1.3. Extração de oxigênio da corrente ventilatória ( $EO_2$ ).....  | 22 |
| 4.2. Freqüência cardíaca de <i>O.niloticus</i> submetido a hipóxia gradual.....                                     | 24 |
| <b>5 DISCUSSÃO</b> .....  | 26 |
| 5.1. Respostas respiratórias de <i>Oreochromis niloticus</i> submetido à hipóxia gradual.....                       | 26 |
| 5.1.1 Consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$ ) e tensão crítica de $O_2$ ( $P_cO_2$ ).....                              | 26 |
| 5.1.2. Ventilação Branquial ( $\dot{V}_G$ ), Freqüência Respiratória ( $f_R$ ) e Volume Ventilatório ( $V_T$ )..... | 28 |
| 5.1.3. Extração de $O_2$ da Corrente Ventilatória ( $EO_2$ ).....   | 30 |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.2. Freqüência cardíaca de <i>O. niloticus</i> submetido a hipóxia gradual..... | 31        |
| 5.3. Mecanismos gerais da toxicidade da MC-LR.....                               | 32        |
| <b>6 CONCLUSÕES.....</b>   | <b>34</b> |
| <b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>35</b> |



## Resumo

As cianobactérias, em condições favoráveis podem formar grandes massas superficiais de coloração verde intensa, denominadas florações. Alguns gêneros de cianobactérias são produtoras de toxinas, e durante as florações, pode haver riscos de contaminação da água e conseqüentemente dos organismos dependentes desta. Dentre as toxinas produzidas pelas cianobactérias, destaca-se a microcistina. Esse tipo de toxina apresenta efeitos pronunciados sobre o fígado, embora possa exibir seus efeitos em diversos órgãos. Ademais, é a cianotoxina que se encontra mais amplamente distribuída nos mais variados tipos de ecossistemas. O objetivo do presente estudo foi analisar as respostas cardio-respiratórias de tilápias-do-nylo, *Oreochromis niloticus*, em situação controle e após 48 h de injeção intraperitoneal de microcistina-LR (MC-LR - 100  $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de peso corpóreo) submetidos à hipóxia gradual. A exposição à MC-LR reduziu a taxa metabólica, ( $\dot{V}\text{O}_2$ ) e aumentou significativamente a tensão crítica de  $\text{O}_2$  ( $\text{PcO}_2$ ), reduzindo a capacidade de manutenção da  $\dot{V}\text{O}_2$  constante. A ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) aumentou significativa e progressivamente em ambos os grupos experimentais a fim de manter a  $\dot{V}\text{O}_2$  durante a hipóxia. Ambos os grupos apresentaram o mesmo padrão de resposta respiratória, sendo que os aumentos na  $\dot{V}_G$  foram caracterizados por aumentos no volume ventilatório ( $V_T$ ), enquanto que a frequência respiratória ( $f_R$ ) se manteve pouco alterada. Entretanto a magnitude dessa resposta foi marcadamente inferior no grupo exposto à MC-LR, mostrando que a toxina interferiu de alguma maneira na homeostase do animal impossibilitando-o de desenvolver uma resposta respiratória normal. A MC-LR também reduziu a capacidade de extração de  $\text{O}_2$  durante a hipóxia severa, provavelmente devido à sua ação lesiva nos tecidos branquiais dos animais contaminados. A frequência cardíaca ( $f_H$ ) foi significativamente reduzida pela MC-LR em todas as concentrações de  $\text{O}_2$  experimentais. O grupo controle desenvolveu bradicardia apenas na tensão de 10 mmHg, enquanto que o grupo exposto à MC-LR já exibiu tal resposta a 20 mmHg. O efeito direto da MC-LR sobre o tecido cardíaco provavelmente foi a causa da diminuição da frequência cardíaca do grupo exposto em relação ao controle e em relação aos seus valores normóxicos. Em conjunto, os resultados do presente trabalho mostraram que a exposição à MC-LR reduz as chances de sobrevivência da espécie estudada em ambientes hipóxicos.

## Abstract

Cyanobacteria, in favorable conditions can form large superficial masses of green color called blooms. Some genera of cyanobacteria are producing toxins, and during the bloom, there may be risks of contamination of water bodies and thus of those organisms that depends on this. Among the toxins produced by cyanobacteria, stands the microcystin. This type of toxin has pronounced effects on the liver, although it may show its effects in several organs. Moreover, it is the cyanotoxin which is more widely distributed in various types of ecosystems. The aim of this study was to examine the cardiorespiratory responses of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in control situation and 48 h after intraperitoneal injection of microcystin-LR (MC-LR - 100  $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$  body weight) submitted to gradual hypoxia. Exposure to MC-LR decreased metabolic rate ( $\dot{V}\text{O}_2$ ) and significantly increased the critical  $\text{O}_2$  tension ( $\text{PcO}_2$ ), reducing the ability to maintain constant the  $\dot{V}\text{O}_2$ . The gill ventilation ( $\dot{V}_G$ ) increased significantly and progressively in both experimental groups in order to maintain  $\dot{V}\text{O}_2$  during hypoxia. Both groups showed the same pattern of respiratory response, while increases in  $\dot{V}_G$  were characterized by increases in tidal volume ( $V_T$ ), while respiratory frequency ( $f_R$ ) remained little changed. However the magnitude of this response was markedly lower in the group exposed to MC-LR, showing that the toxin somehow interfered in the homeostasis of the animal preventing it from developing a respiratory response normal. The MC-LR also reduced the ability to extract  $\text{O}_2$  during acute hypoxia, probably due to its action injuring the gill tissues of infected animals. Heart rate ( $f_H$ ) was significantly reduced by microcystin-LR in all the experimental concentrations of  $\text{O}_2$ . The control group developed bradycardia only in tension of 10 mmHg, while the group exposed to MC-LR has exhibited such a response to 20 mmHg. The direct effect of MC-LR on the cardiac tissue was probably the cause of the decrease in heart rate in the exposed group compared to the control and relative to their normoxic values. Together, the results of this study showed that exposure to MC-LR reduces the chances of survival of the species studied in hypoxic environments.

## 1. INTRODUÇÃO.

As cianobactérias, conhecidas como algas azuis, são organismos procariontes capazes de realizar fotossíntese, constituindo um grupo autotrófico. Estão distribuídas em diferentes ambientes, nas águas limpas e eutróficas, em fontes termais, e até geleiras (CHORUS & BARTRAM, 1999). Essas algas desenvolvem-se muito bem em ambientes com alta luminosidade, temperatura elevada da água (15-30°C), faixas de pH entre 6 e 9 e abundância de nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio, formando grandes massas superficiais de coloração verde intensa denominadas florações (REYNOLDS, 1984).

O aparecimento de florações está relacionado ao aumento de nutrientes na água (eutrofização), principalmente devido ao aumento de sais de nitrato e fosfato. A utilização de adubos químicos e estrume, a descarga de esgotos urbanos e efluentes de agroindústrias ou de outros setores industriais, promovem a entrada desses nutrientes e de matéria orgânica em corpos d'água (CORREIA, 2000), culminando na ocorrência dessas florações.

O aparecimento de florações na superfície aquática ocorre no mundo todo com uma incidência cada vez mais elevada (FALCONER *et al.*, 1994; DUY *et al.*, 2000), sendo considerado um risco em potencial à saúde devido à natureza tóxica de algumas dessas algas. Em geral, 50-75% das florações de cianobactérias podem produzir toxinas, sendo possível a ocorrência de mais de um tipo de toxina. Entretanto, no Brasil cerca de 82% das cepas de cianobactérias isoladas são toxigênicas (SOARES *et al.*, 2004). Florações tóxicas e não tóxicas de uma espécie podem ser encontradas juntas (SKULBERG *et al.*, 1993; YOO *et al.*, 1995; CODD & BELL., 1996). É recomendável o cuidado especial quando as florações de cianobactérias ocorrem em áreas de reservatório, mananciais, represas, lagos e outros corpos d'água utilizados para consumo humano e/ou de animais, devido ao risco de intoxicação.

No Brasil, já houve alguns casos de intoxicação por cianotoxinas provenientes das florações de algas azuis (cianobactérias). Entre os casos de intoxicação conhecidos, destacam-se o do reservatório de Itaparica no Estado da Bahia, onde ocorreu a morte de 88 pessoas, entre as 200 intoxicadas pelo consumo de água do reservatório, durante os meses de março e abril de 1988, e o mais conhecido, ocorrido em 1996, onde 123 pacientes renais crônicos, após terem sido submetidos a sessões de hemodiálise em uma clínica de Caruaru, Pernambuco, apresentaram sintomas de hepatotoxicose. Destes, 54 vieram a falecer até 5 meses após o início dos sintomas. A referida clínica, segundo Secretaria da Saúde, recebia água sem um tratamento completo e usualmente era feita uma cloração no próprio caminhão tanque utilizado para transportar a água, em períodos de falha no abastecimento pela rede pública (AZEVEDO, 1998).

Tendo em vista estes acontecimentos, foi lançada a Portaria nº. 1469, de 29 de dezembro de 2000 pelo Ministério da Saúde, exigindo em todas as Estações de Tratamento

e Abastecimento de Água, uma análise mensal da água bruta em casos onde o número de cianobactérias não exceder 10.000 células/mL, e semanal, quando o número de cianobactérias exceder este valor. Acima de 20.000 células/mL, é exigido o controle semanal de toxicidade na água de saída do tratamento e nas entradas (hidrômetros) das clínicas de hemodiálise e indústrias de injetáveis, sendo que esta análise pode ser dispensada quando não houver comprovação de toxicidade na água bruta.

A importância na análise da água em relação à ocorrência de cianobactérias deve-se ao fato de que essas algas após a lise celular podem liberar toxinas, prejudicando assim a potabilidade da água. Algumas dessas toxinas, identificadas como alcalóides organofosforados neurotóxicos, são de ação rápida, causando a morte por parada respiratória após poucos minutos de exposição. Outras, identificadas como peptídeos ou alcalóides hepatotóxicos, atuam menos rapidamente (CHORUS & BARTRAM, 1999).

### 1.1. Cianotoxinas.

Atualmente, encontram-se identificados cerca de 150 gêneros de cianobactérias englobando cerca de 2000 espécies, dentre as quais pelo menos 40 são consideradas como produtoras de toxinas – as cianotoxinas (HITZFELD *et al.*, 2000; JAYATISSA *et al.*, 2006). As cianotoxinas são metabólitos secundários naturais que apresentam uma potente atividade, capazes de induzir patologias graves mesmo após curtos períodos de exposição (CHORUS, 2001). As cianobactérias produzem três tipos de toxinas: as dermatotoxinas (irritantes ao contato), as neurotoxinas e as hepatotoxinas.

As dermatotoxinas são lipopolissacarídeos existentes na membrana externa da parede celular das cianobactérias. A sua toxicidade é revelada pelo simples contato com a pele ou mucosas corporais, desenvolvendo-se uma reação alérgica (SIVONEN & JONES, 1999; CODD, 2000). De um modo geral, as dermatotoxinas são constantemente produzidas no interior das cianobactérias. Contudo, o seu grau de toxicidade não é tão elevado como o de outros lipopolissacarídeos, desaparecendo os sintomas se o contato for interrompido.

Já as neurotoxinas apresentam um elevado grau de toxicidade. A produção dessas toxinas já foi observada em espécies dos gêneros *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon* e *Lyngbia* (CARMICHAEL *et al.*, 1975; PARK *et al.*, 1993;). As neurotoxinas são classificadas estruturalmente como alcalóides e têm como alvo o sistema neuromuscular. De maneira sucinta, englobam a saxitoxina, anatoxina-a e a anatoxina-a(s). Seu modo de ação consiste basicamente em bloquear o impulso nervoso, causando a morte por insuficiência cardíaca e/ou respiratória (CARMICHAEL, 1994; LILLEHEIL *et al.*, 1997).

As hepatotoxinas incluem as microcistinas e a nodularina. São peptídeos cíclicos, que atuam por inibição das fosfatases protéicas PP1 e PP2A (HONKANEN *et al.*, 1990; MACINTOSH *et al.*, 1990; TOIVOLA & ERIKSSON, 1999; GUZMAN *et al.*, 2003).

A sua produção já foi detectada em *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria* e *Cylindrospermopsis* (CARMICHAEL, 1996; DUY *et al.*, 2000). Como o nome indica, as hepatotoxinas têm como órgão alvo o fígado. São responsáveis pela destruição da sua estrutura interna, levando, numa situação extrema, à hemorragia intra-hepática, choque hipovolêmico e morte (THEISS *et al.*, 1988; CARMICHAEL, 1994; BRIAND *et al.*, 2003). Os sinais observados após a ingestão dessas hepatotoxinas são prostração, anorexia, vômitos, dor abdominal e diarreia (CARMICHAEL & SCHWARTZ, 1984; BEASLEY *et al.*, 1989). Após a ingestão oral da toxina, ela chega ao sistema digestivo e é levada ao íleo, passando via sistema porta para o fígado (CARMICHAEL & FALCONER, 1993; NISHIWAKI *et al.*, 1994). A exposição crônica à toxina pela ingestão de água pode aumentar o índice de câncer hepático. (CHORUS & BARTRAM, 1999).

## 1.2. Microcistinas

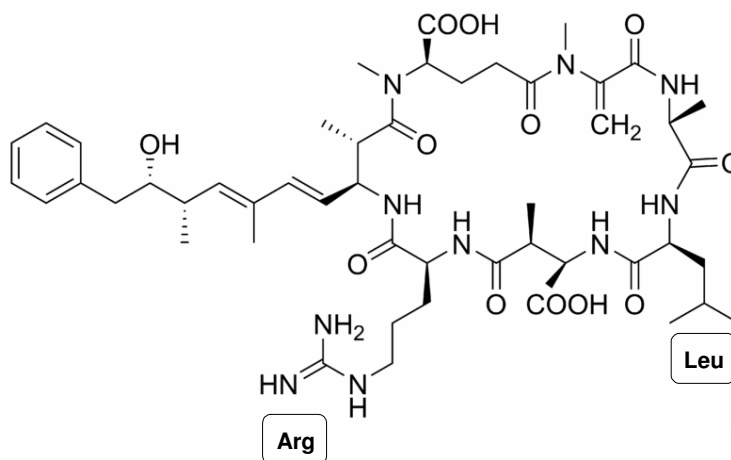
As microcistinas são as cianotoxinas mais comumente encontradas nas florações de cianobactérias de água doce (CARMICHAEL, 1994; KONDO *et al.*, 2002). O nome microcistina deve-se ao fato de ter sido primeiramente encontrada na espécie *Microcystis aeruginosa*, embora posteriormente tenha sido descoberto que outras espécies também possuem a capacidade de produzir este tipo de toxina (CARMICHAEL *et al.*, 1988). Entretanto, também é sabido que o gênero *Microcystis* é o que apresenta uma distribuição mais generalizada em massas de água eutróficas em diferentes partes do mundo.

As microcistinas (MCs) são estruturalmente caracterizadas por heptapeptídeos monocíclicos, compostos por uma D-alanina (D-Ala) na posição 1, dois L-aminoácidos variáveis nas posições 2 e 4, ácido glutâmico (D-Glu) na posição 6 e três aminoácidos incomuns: um ácido D-eritro- $\beta$ -metil-aspártico (D-MeAsp) na posição 3, um ácido (2s, 3s, 8s, 9s)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico (ADDA) na posição 5 e uma N-metil-deidroalanina (Mdha) na posição 7 (VAN APELDOORN *et al.*, 2007). São compostos estáveis e se mostram resistentes à temperatura, hidrólise química e oxidação.

Apesar de 70 tipos de variantes de MCs já terem sido isolados e documentados, um tipo de MC se destaca pela sua alta toxicidade e ampla distribuição, sendo considerado a mais tóxica e difundida variante de MC conhecida. Essa toxina, conhecida como MC-LR (figura 1), possui uma leucina (L) na posição 2 e uma arginina (R) na posição 4. Além desta MC, destacam-se a MC-RR, e a MC-YR por sua ampla distribuição.

Estas toxinas penetram nos hepatócitos através de um sistema de transporte ativo, conhecido como sistema de transporte multi-específico de ácidos biliares (ERIKSSON *et al.*, 1990) envolvendo transportadores membranares polipeptídicos (OATP). As microcistinas atuam na inibição das fosfatases protéicas de serina/treonina, em particular as do tipo 1 e 2A (PP1 e PP2A) (HONKANEN *et al.*, 1990; MACKINTOSH *et al.*, 1990; TOIVOLA &

ERIKSSON, 1999; GUZMAN *et al.*, 2003). A interação da MC-LR com as fosfatases PP1 e PP2A foi descrita como um mecanismo de duas etapas, onde a toxina primeiro se liga a enzima inativando-a e subseqüentemente forma adutos covalentes durante o decorrer do tempo de reação (MCKINTOSH *et al.*, 1990; CRAIG *et al.*, 1996).



**FIGURA 1.** Estrutura química da MC-LR, com detalhe para as posições da leucina e arginina. Adaptado de Andrade (2007).

A inibição destas fosfatases leva a um estado de hiperfosforilação de proteínas reguladoras da dinâmica de formação do citosqueleto, tendo como conseqüência a desintegração da estrutura dos hepatócitos, a perda da arquitetura hepática e sinusoidal, associada à diminuição do volume intracelular e do contato intercelular, o choque hipovolêmico e morte do indivíduo afetado (CARMICHAEL, 1994). Além da inibição das fosfatases, as microcistinas podem também afetar os sistemas de reparo de DNA e expressão de genes (DOUGLAS *et al.*, 2001; ARIZA *et al.*, 1996), e parecem poder interagir com as mitocôndrias de tecidos animais e causar estresse oxidativo e apoptose celular (PRIETO *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2008).

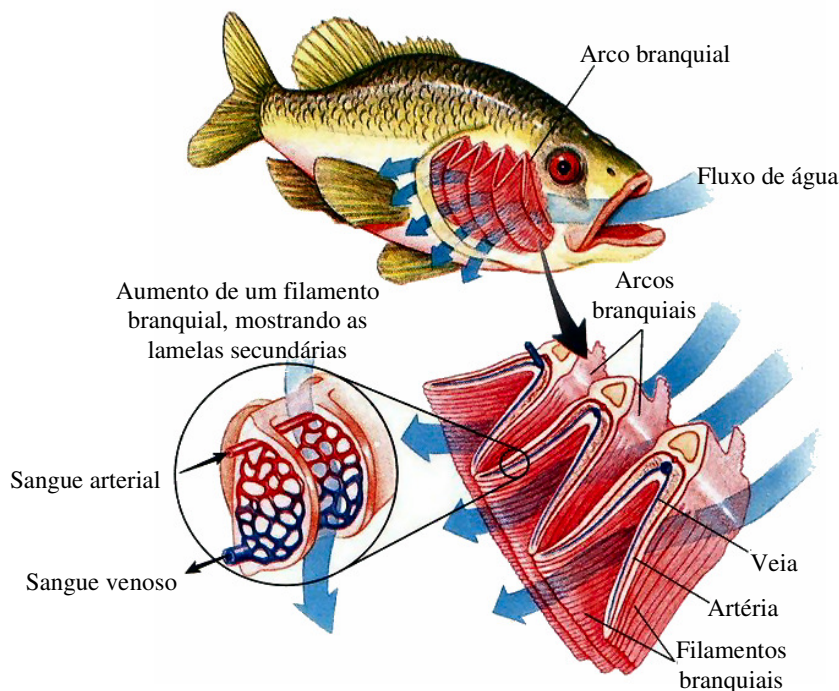
### 1.3. Função Cardio-Respiratória de Peixes

A grande maioria das espécies de peixes apresenta respiração do tipo branquial. As brânquias consistem geralmente de quatro arcos branquiais que estendem em duas fileiras de filamentos branquiais, os quais possuem várias lamelas secundárias, estruturas achatadas e densamente enfileiradas onde ocorrem as trocas gasosas. À medida que a água flui entre essas lamelas em uma direção, o fluxo sanguíneo flui em direção oposta,

fluxo este denominado contracorrente. As brânquias são ventiladas com um fluxo unidirecional de água, garantido pelo bombeamento ativo por meio do trabalho da musculatura esquelética nas cavidades bucal e operculares. (figura 2).

De acordo com Hughes (1973), a tensão de  $O_2$  decresce gradativamente desde o momento em que é captado pelas brânquias até sua utilização na célula, evento chamado “cascata de oxigênio”. As principais barreiras à difusão são as membranas branquiais, a circulação sanguínea e as membranas celulares dos tecidos que receberão o  $O_2$  (GALIS & BAREL, 1980; FERNANDES & RANTIN, 1989; 1994). Qualquer aumento na resistência à difusão do  $O_2$  em um desses pontos pode causar um efeito hipóxico. Assim, qualquer substância que possa causar hipóxia ambiental pode reduzir a quantidade de  $O_2$  disponível às mitocôndrias e, conseqüentemente, comprometer os processos aeróbicos (ANELLI-JR, 2010).

O coração dos peixes teleósteos é formado por quatro câmaras em série: seio venoso, átrio, ventrículo e bulbo arterioso. O seio venoso recebe o sangue venoso da circulação. A quantidade de fibras musculares é variável, podendo aparecer como uma fina camada em algumas espécies, fibras esparsas na maioria das espécies ou estarem completamente ausentes.

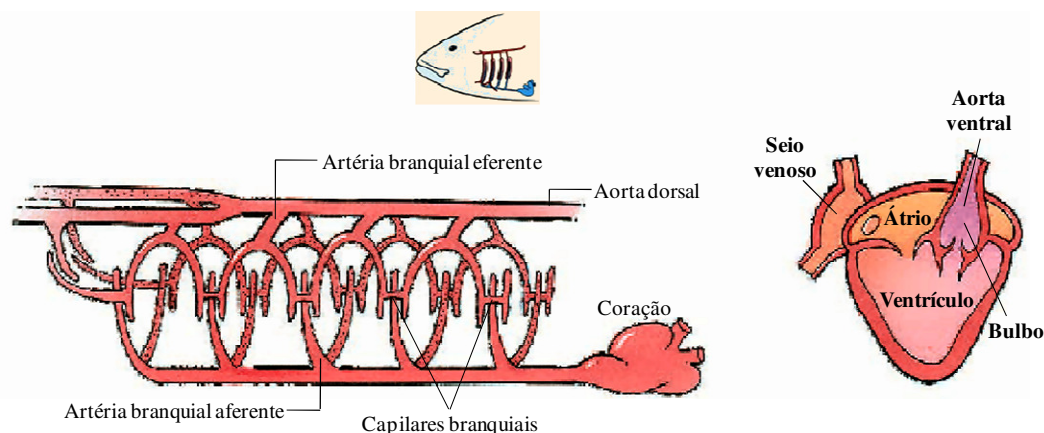


**FIGURA 2.** Esquema do sistema respiratório de peixes teleósteos. (adaptada de CAMPBELL *et al.*, 2008).

O átrio é um amplo saco muscular de parede fina, capaz de gerar pressão suficiente

apenas para encher o ventrículo, que possui parede muscular grossa. O ventrículo é a principal câmara geradora de pressão do coração e compreende 58-85% de seu peso. A quarta câmara, o bulbo arterioso, é elástica devido à presença de elementos elásticos e músculo liso em sua parede.

O sangue venoso, vindo da circulação sistêmica, passa por tais câmaras e é direcionado, via aorta ventral, para as brânquias onde ocorre a oxigenação (SATCHELL, 1981), como mostrado na figura 3.



**FIGURA 3.** Diagrama representativo do sistema circulatório de um peixe teleósteo (modificado de MILLER-HARLEY, 2001).

#### 1.4. A Espécie *Oreochromis niloticus*.

A tilápia-do-nylo, *Oreochromis niloticus* (TREWAVAS, 1983), é uma espécie originalmente endêmica da África, onde encontra-se amplamente distribuída. Posteriormente, foi introduzida na América do Sul, parte da Índia e Ceilão. No Brasil foram introduzidas em 1971 na região Nordeste pelo Departamento de Obras Contra a Seca - DNOCS/Fortaleza, CE, provenientes da Costa do Marfim (DELAVECHIA, 1994). A partir daí, a espécie foi adotada em cultivos intensivos e semi-intensivos.

No Brasil, a tilápia é hoje o peixe mais criado e comercializado, devido ao sabor de sua carne, seu fácil cultivo em cativeiro, sua esportividade na pesca e sua alta taxa de reprodução, aliada à sua resistência às variações climáticas (CASTAGNOLLI, 1997; LOVSHIN, 1997). É uma espécie rústica, bastante resistente a doenças e ao manejo. Apesar de seu hábito alimentar fitoplanctófago, aceita facilmente outros alimentos, o que a torna uma das mais adequadas à piscicultura. Seu peso comercial, que varia entre 250 a 400g, é alcançado dentro de 6 a 8 meses de criação (PINTO, 1988). Possui características como sabor agradável, ossos intramusculares finos que permitem o processamento de filés em



vários produtos e arraçoamento fácil e econômico (SOCCOL, 2002). Um exemplar de tilápia-do nilo é mostrado na figura 4.

Estima-se que o cultivo de tilápias se transformará em uma atividade tão importante como a avicultura, suinocultura e bovinocultura, sendo que sua cadeia produtiva é considerada uma das mais importantes da aquicultura brasileira (<http://www.emparn.rn.gov.br>).



**Figura 4.** Exemplar de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*.

Os fatores determinantes na escolha dessa espécie como objeto de estudo foram, entre outros, sua grande importância econômica no mercado pesqueiro nacional e internacional, de forma que informações sobre sua fisiologia adaptativa poderão contribuir para seu manejo em piscicultura. Sua grande adaptabilidade a condições abióticas adversas, tais como disponibilidade de oxigênio dissolvido, temperatura, pH e fácil adaptação a condições de laboratório, tornam a tilápia-do-nilo um modelo ideal para estudos envolvendo as adaptações fisiológicas ao ambiente. Além disso, a espécie é relativamente bem estudada e a bibliografia disponível permite uma melhor compreensão de seus processos fisiológicos e adaptativos e a comparação com outras espécies.

Segundo TREWAVAS (1983), a tilápia-do-nilo ocupa a seguinte posição sistemática:

Classe: OSTEICHTHYES

Subclasse: ACTINOPTERYGII

Superordem: TELEOSTEI

Ordem: PERCIFORMES

Família: CICHLIDAE

Gênero: *Oreochromis*

Espécie: *Oreochromis niloticus*

## 2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da microcistina - LR sobre os parâmetros cardio-respiratórios de tilápias-do-nilo. Os seguintes parâmetros foram avaliados em grupos controle e expostos às cianotoxinas (microcistina-LR):

- a. Efeito da redução gradual na concentração de oxigênio do meio ( $PO_2$ ) sobre a tomada de  $O_2$  total ( $\dot{V}O_2$ ) e a tensão crítica de  $O_2$  ( $P_cO_2$ ), determinadas por meio de respirometria de fluxo constante;
- b. Efeito da redução gradual na concentração de oxigênio do meio ( $PO_2$ ) sobre os parâmetros ventilatórios (ventilação branquial –  $\dot{V}_G$ ; frequência respiratória -  $f_R$ ; volume ventilatório –  $V_T$ ; extração de  $O_2$  da corrente ventilatória –  $EO_2$ ), determinados por meio de respirometria de fluxo constante;
- c. Efeito da redução gradual na concentração de oxigênio do meio ( $PO_2$ ) sobre a frequência cardíaca *in vivo* ( $f_H$ ), determinada por meio de eletrocardiografia padrão.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Material

Foram utilizados, no presente estudo, 16 exemplares de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* (Wt =  $175 \pm 37$  g) de ambos os sexos, adquiridos na piscicultura Águas Claras (Mococa, SP).

#### 3.2. Métodos

Após a coleta, os peixes foram transportados para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, onde foram mantidos em tanques com capacidade de 1000 L, dotados de recirculação de água aerada e termostatizada ( $25 \pm 1$  °C), por um período mínimo de 30 dias para aclimação às condições laboratoriais. Durante esse período foram alimentados *ad libitum* com ração comercial peletizada.

Após o período de aclimação, os exemplares de *O. niloticus* foram divididos em dois grupos experimentais: o grupo controle (Ctrl, n = 8) e o grupo exposto à toxina (Mcis n = 8). Os peixes do grupo Mcis receberam uma injeção intraperitoneal (0,5 mL de salina 0,9%) contendo a forma purificada da toxina MC-LR na concentração de  $100 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  de peso corpóreo. Após a injeção esperou-se durante um período de 48h até serem realizadas as medidas dos parâmetros respiratórios e cardíacos. A MC-LR purificada foi cedida pelo pós-graduando Wilson Colvara, do Laboratório de Oceanografia Química Física e Geológica da FURG.

A concentração de  $100 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  de peso corpóreo foi baseada no trabalho de Prieto et al. (2006), que também estudaram o efeito de injeções intraperitoneais de MC-LR sobre as respostas de enzimas antioxidantes em fígado, rins e brânquias de tilápia-do-nilo, porém na dose de  $500 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ . De acordo com estes autores, esta dose ( $500 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ ), quando injetada intraperitonealmente, é suficiente para produzir efeitos tóxicos agudos em tilápia-do-nilo.

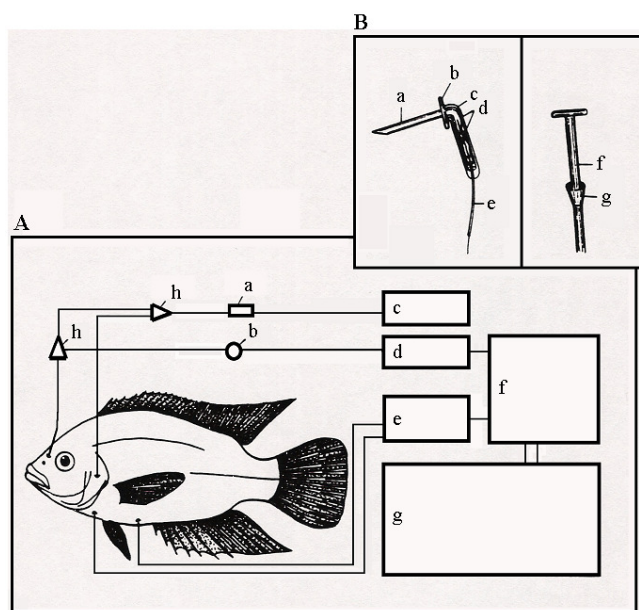
O grupo controle (Ctrl) recebeu o mesmo tratamento, porém só foi inoculado com 0,5 mL de salina 0,9%.

As preparações empregadas para a obtenção dos parâmetros respiratórios e dos eletrocardiogramas (ECG) para análise da frequência cardíaca ( $f_H$ ) foram baseadas na metodologia utilizada por Glass et al. (1991) e adaptada por Rantin *et al.* (1993).

As cirurgias foram precedidas de anestesia em um banho em benzocaína 0,01% (1 g de benzocaína diluída em 10 litros de água) por aproximadamente 5 minutos (ou até a cessação da atividade espontânea). Imediatamente após a anestesia, os animais foram

transferidos para uma mesa cirúrgica onde se procedeu a implantação dos catéters de polietileno para o monitoramento das tensões de  $O_2$  da água inspirada e expirada e a sutura de eletrodos de eletrocardiografia para o registro da atividade cardíaca.

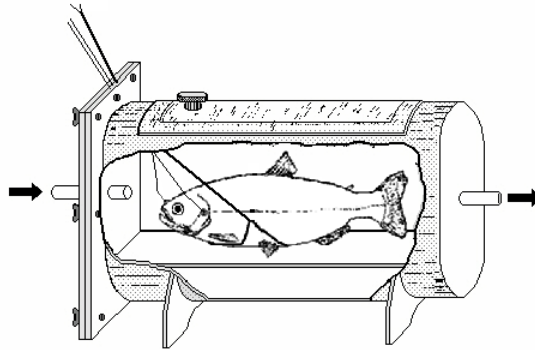
As tensões de  $O_2$  da água inspirada ( $P_iO_2$  - mmHg) e expirada ( $P_eO_2$  - mmHg) e a frequência respiratória ( $f_R$  – inspirações.min<sup>-1</sup>) foram obtidas pela inserção de catéters de polietileno (PE 60) no interior da cavidade bucal através de orifício aberto dorsalmente, próximo a boca, com o auxílio de uma broca e nas partes distais de ambos os cleitros operculares (figura 5).



**FIGURA 5.** Esquema do sistema a ser utilizado na obtenção das respostas cardio-respiratórias de *Oreochromis niloticus*. Em **A**: a. Cuveta termostatzada com eletrodos de  $O_2$ ; b. Transdutor de pressão; c. Analisadores de  $O_2$ ; d. Amplificador de pressão; e. Amplificador de ECG; f. Microcomputador com sistema de aquisição de dados; g. Registrador de 4 canais; h. Torneira de 3 vias. Em **B**: Detalhe de um eletrodo de ECG e do cateter para medidas de  $PO_2$ : a. Ponta da agulha; b. Pedaço de cateter com a extremidade flangeada; c. Revestimento termo-retrátil; d. Fixação do fio de cobre através de pressão mecânica; e. Fio de cobre encapado; f. Cateter de polietileno com a extremidade flangeada para a tomada de água; g. Peça de fixação. (MARICONDI-MASSARI, 1993).

Após a preparação acima descrita, os peixes foram introduzidos no respirômetro de fluxo constante (figura 6) e imediatamente transferidos para a câmara experimental, mantida em condições normóxicas, a  $25 \pm 1$  °C, onde permaneceram por um período de 24 horas para a recuperação da anestesia e restabelecimento das condições metabólicas basais (figura 7).

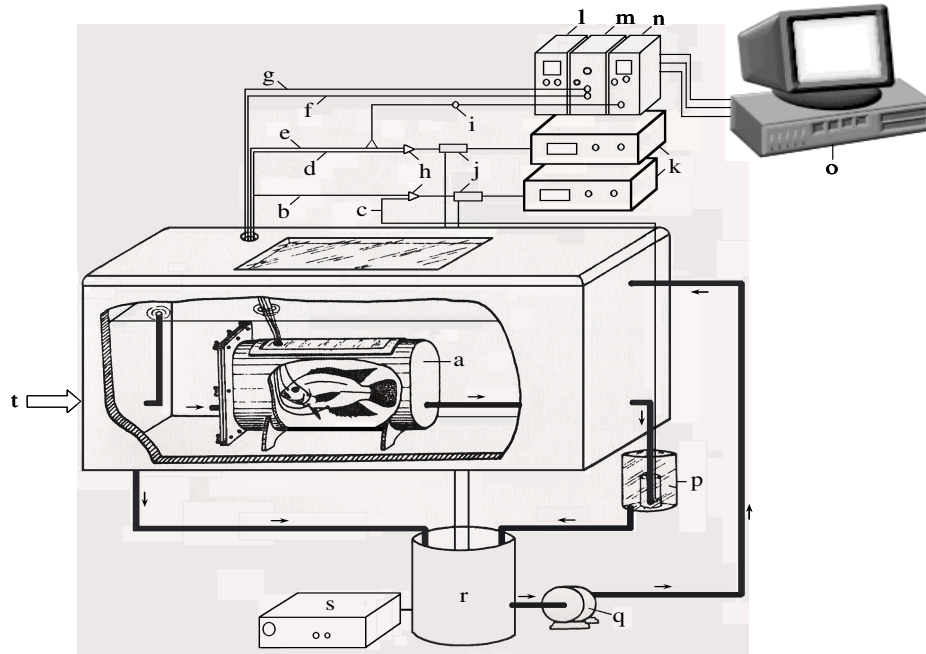
Os experimentos foram conduzidos utilizando-se um animal de cada vez e, após o período de recuperação, as medidas e registros dos parâmetros acima citados, foram realizados a intervalos de 1 hora, por um período de 5 horas.



**FIGURA 6.** Esquema do respirômetro de fluxo constante. As setas indicam a direção do fluxo de água através do respirômetro (adaptada de OLLE, 2007).

As tensões de  $O_2$  (mmHg) da água de entrada ( $P_{in}O_2$ ) e de saída ( $P_{out}O_2$ ) do respirômetro, bem como das tensões de  $O_2$  da água inspirada ( $P_iO_2$ ) e expirada ( $P_eO_2$ ) pelos peixes foram continuamente monitoradas conectando-se os catéteres de polietileno a um sistema de torneiras de 3 vias acopladas a eletrodos de analisadores de  $O_2$ .

Para analisar a resposta do animal frente à hipóxia, a temperatura experimental foi mantida constante ( $25 \pm 1,0$  °C) por meio de um termostato localizado no interior da câmara experimental e os experimentos foram conduzidos em normóxia ( $P_{in}O_2 = 140$  mmHg) e nas seguintes tensões de  $O_2$  hipóxicas: 120, 100, 80, 60, 40, 20 e 10 mmHg, obtidas borbulhando-se, por meio de um dispersor (pedra de aeração), quantidades controladas de  $N_2$  e ar comprimido no interior da câmara experimental.



**FIGURA 7.** Sistema de respirometria de fluxo constante e respostas cardíacas utilizado no presente estudo. **a.** respirômetro; **b, c.** cateteres de polietileno para tomada da água que entra ( $P_{in}O_2$ ) e que sai ( $P_{out}O_2$ ) do respirômetro, respectivamente; **d, e.** cateteres de polietileno para tomada da água inspirada ( $P_iO_2$ ) e expirada ( $P_eO_2$ ), respectivamente; **f.** eletrodo cardíaco; **g.** eletrodo de referência; **h.** torneiras de 3 vias; **i.** transdutor de pressão; **j.** cuvetas termostatizadas com eletrodos de  $O_2$ ; **k.** analisadores de  $O_2$ ; **l.** monitor cardíaco; **m.** amplificador de ECG; **n.** amplificador de pressão; **o.** computador com sistema de aquisição de dados; **p.** frasco de ajuste de fluxo de água através do respirômetro; **q.** bomba para circulação de água; **r.** balde; **s.** controlador de temperatura; **t.** entrada de quantidades controladas de  $N_2$  ou ar comprimido. (adaptado de MARICONDI-MASSARI, 1993).

Após a estabilização, cada tensão de O<sub>2</sub> foi mantida por um período mínimo de 30 minutos antes de serem efetuadas as medidas e registros dos parâmetros acima citados. Os procedimentos de tomada de medidas e registros foram efetuados, em média, dentro de 5 minutos.

A tomada de O<sub>2</sub> total ( $\dot{V}O_2$ ) em cada uma das tensões de O<sub>2</sub> experimentais foi determinada utilizando-se o sistema de respirometria de fluxo constante, pelo monitoramento das tensões de O<sub>2</sub> da água de entrada (P<sub>in</sub>O<sub>2</sub>) e de saída (P<sub>out</sub>O<sub>2</sub>) do respirômetro. A  $\dot{V}O_2$  foi calculada por meio da equação proposta por Hughes *et al.* (1983):

$$\dot{V}O_2 = [(P_{in}O_2 - P_{out}O_2) \cdot \alpha_{O_2} \cdot \dot{V}_R] / Wt \quad , \text{ onde:}$$

$\alpha_{O_2}$  = coeficiente de solubilidade do O<sub>2</sub> na água (mLO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.mmHg<sup>-1</sup>);

$\dot{V}_R$  = fluxo de água através do respirômetro (L.h<sup>-1</sup>);

Wt = peso fresco do animal (Kg). Os valores de  $\dot{V}O_2$  assim obtidos foram expressos em mL O<sub>2</sub>.Kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

Para a determinação da ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) foi empregado o método descrito por Saunders (1962). Tal método, envolvendo respirometria de fluxo constante, consiste na tomada de amostras da água de entrada (P<sub>in</sub>O<sub>2</sub>) e de saída (P<sub>out</sub>O<sub>2</sub>) do respirômetro, bem como da água inspirada (P<sub>i</sub>O<sub>2</sub>) e expirada (P<sub>e</sub>O<sub>2</sub>) pelos peixes. A  $\dot{V}_G$  foi calculada de acordo com Kalinin *et al.* (1996), por meio da expressão:

$$\dot{V}_G = [(P_{in}O_2 - P_{out}O_2 / P_iO_2 - P_eO_2) \cdot \dot{V}_R] / Wt \quad , \text{ onde:}$$

$\dot{V}_R$  = fluxo de água através do respirômetro (mL.min<sup>-1</sup>),

Wt = peso fresco do animal (Kg).

Os valores finais de  $\dot{V}_G$  foram expressos em mLH<sub>2</sub>O.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>.

Para as medidas de frequência respiratória (f<sub>R</sub>), os catéteres de polietileno inseridos na boca e opérculos do peixe foram conectados a transdutores de pressão que enviam o sinal para um sistema computadorizado de aquisição de dados (ADInstruments - PowerLab) (figuras 5, 6 e 7). A f<sub>R</sub> foi obtida por meio da contagem do número de ciclos respiratórios por unidade de tempo em cada tensão experimental e seus valores, expressos em ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>.

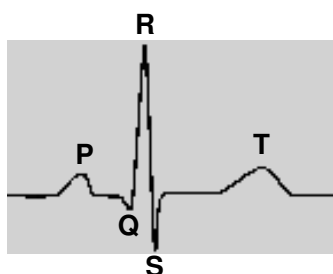
O volume ventilatório, ou volume corrente (V<sub>T</sub>) foi calculado pelo quociente entre a ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) e a respectiva frequência respiratória. O V<sub>T</sub> foi expresso em mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>.

A extração de O<sub>2</sub> da corrente ventilatória (EO<sub>2</sub>) pelas brânquias foi calculada a partir da equação:

$$EO_2 = [(PiO_2 - PeO_2)/PiO_2].100$$

Dessa forma, a  $EO_2$  foi expressa em porcentagem (%).

Para a obtenção do ECG e análise da frequência cardíaca ( $f_H$ ), foram inseridos dois eletrodos de aço inoxidável: o positivo, posicionado ventralmente entre as brânquias e o coração; e o negativo, em posição ventro-caudal próximo às nadadeiras pélvicas, ambos suturados com pontos cirúrgicos à musculatura corpórea para evitar seu deslocamento (figura 5). Um terceiro eletrodo, de referência, foi colocado na água da câmara experimental (figura 7). Os eletrodos foram conectados ao bio-amplificador que envia o sinal para um sistema computadorizado de aquisição de dados (ADInstruments - PowerLab). Esta preparação permite que sejam obtidos registros similares àqueles observados na derivação DI da eletrocardiografia padrão. Um traçado de ECG típico de peixes teleósteos é mostrado na figura 8. Após o período de recuperação, a  $f_H$  foi registrada, como descrito para os parâmetros respiratórios.



**FIGURA 8.** Representação de um traçado eletrocardiográfico típico de peixes teleósteos, contendo a onda P (despolarização atrial), o complexo QRS (despolarização ventricular) e a onda T (repolarização ventricular).

### 3.3. Tratamento estatístico dos dados

Os valores estão apresentados como média  $\pm$  D.P. Foram consideradas diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância. Os seguintes procedimentos estatísticos foram adotados no presente estudo: Análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas para verificar a existência de possíveis variações significativas entre os valores obtidos nas diferentes tensões de  $O_2$  para um mesmo grupo experimental. O teste de Mann-Whitney foi realizado para verificar a ocorrência de possíveis diferenças significativas entre pontos correspondentes dos dois grupos experimentais.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Respostas respiratórias de *Oreochromis niloticus* à hipóxia gradual.

#### 4.1.1. Consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$ ) e tensão crítica de oxigênio ( $P_cO_2$ ).

Os animais dos dois grupos analisados, grupo controle (Ctrl) e o grupo exposto à microcistina (Mcis), sobreviveram ao período do experimento. Não foi observada nenhuma diferença marcante no comportamento dos animais do grupo Mcis em relação ao Ctrl.

A tomada de  $O_2$  total ou taxa metabólica ( $\dot{V}O_2 - mL O_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ ) foi medida durante hipóxia gradual e seus valores médios tanto para o grupo Ctrl quanto para o grupo Mcis podem ser vistos na tabela 1 e suas representações gráficas nas figuras de 9 a 11.

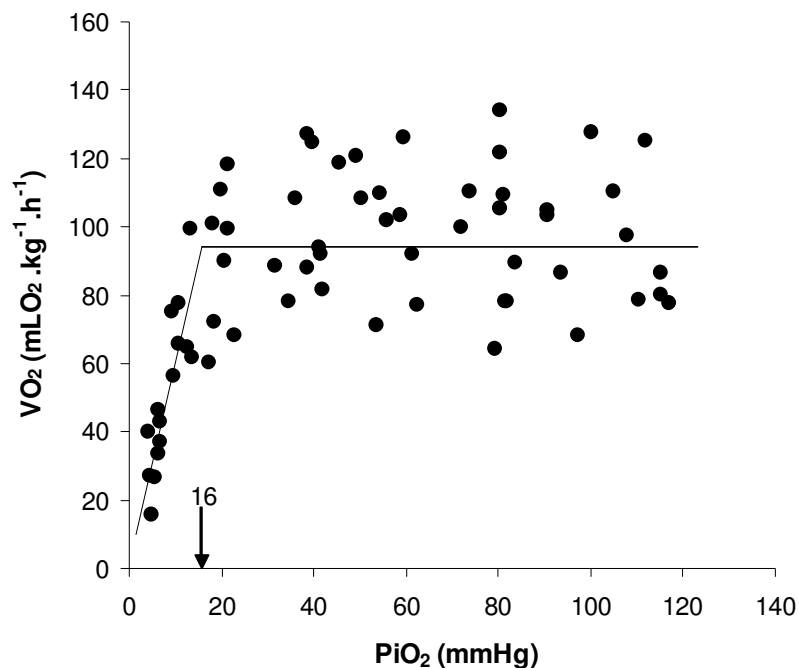
A  $\dot{V}O_2$  dos animais do grupo Ctrl manteve-se constante até a tensão de 20 mmHg, com valor médio de  $94,3 \pm 2,9 mL O_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ . Apenas durante a menor tensão ao que o peixe foi exposto (10 mmHg) é que foi observado uma redução significativa nos valores da  $\dot{V}O_2$ , atingindo  $33,8 \pm 7,1 mL O_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ . A tensão crítica de  $O_2$  ( $P_cO_2$ ) para este grupo experimental, calculada pela intersecção das retas de regressão obtida pelo método descrito por Rantin *et al.* (1992), abaixo da qual a  $\dot{V}O_2$  deixa de ser independente do  $O_2$  disponível e o animal não consegue mais regular eficientemente sua tomada de oxigênio do meio, foi de ~16 mmHg (fig. 7).

Não foram detectadas diferenças significativas entre os valores de  $\dot{V}O_2$  obtidos entre 140 e 80 mmHg (valor médio de  $76,1 \pm 2,0 mL O_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ ) no grupo Mcis. À partir da tensão de 60 mmHg a  $\dot{V}O_2$  dos peixes do grupo Mcis reduziu-se progressiva e significativamente ( $49,9 \pm 10,4 mL O_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ ), sendo que a  $P_cO_2$  calculada para este grupo experimental foi de ~58 mmHg, como ilustra a fig. 10.

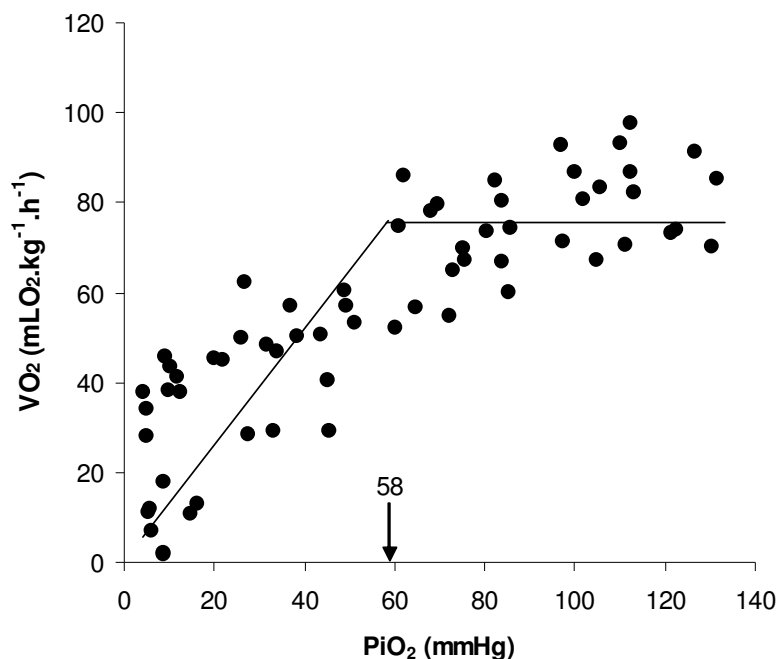
Comparativamente os valores das  $\dot{V}O_2$  do grupo Mcis foram significativamente inferiores aos do grupo Ctrl nas  $P_{in}O_2$  compreendidas entre 100 e 10 mmHg como mostra a figura 11.

**TABELA 1.** Valores médios do consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2 - \text{mLO}_2.\text{kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) de *O. niloticus* dos grupos controle (Ctrl - n = 8) e exposto à microcistina (Mcis - n = 8, [ ]100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  via *i.p.*), submetidos a diferentes tensões de  $O_2$  da água. Valores médios  $\pm$  1 D.P. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia. \* diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

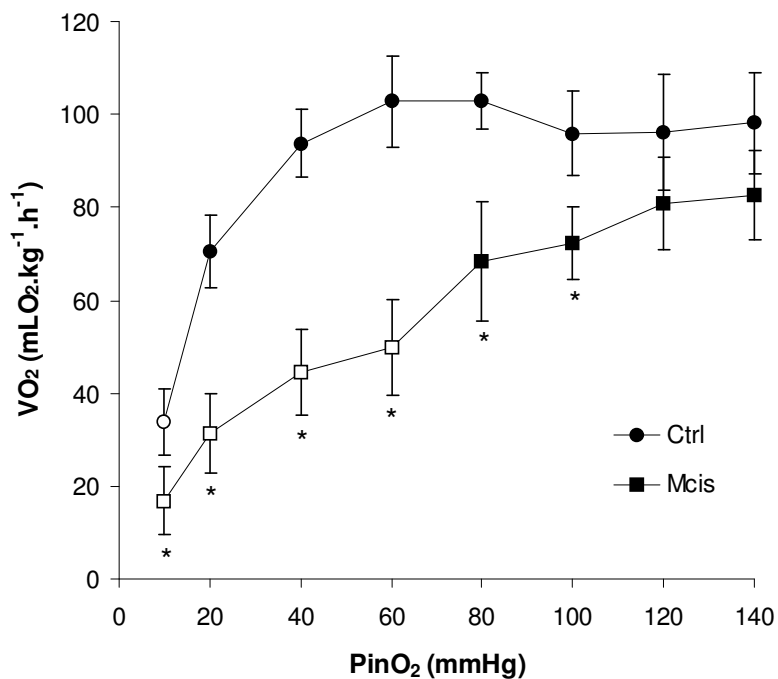
| PinO <sub>2</sub><br>(mmHg) | VO <sub>2</sub> (mLO <sub>2</sub> .kg <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) |                                     |
|-----------------------------|--|-------------------------------------|
|                             | Ctrl   | Mcis                                |
| 140                         | 98.1 $\pm$ 10.8  | 82.7 $\pm$ 9.6                      |
| 120                         | 96.0 $\pm$ 12.5  | 80.8 $\pm$ 10.1                     |
| 100                         | * 96.0 $\pm$ 9.0   | * 72.3 $\pm$ 8.0                    |
| 80                          | * 102.9 $\pm$ 6.1  | * 68.5 $\pm$ 12.9                   |
| 60                          | * 102.7 $\pm$ 9.7  | * <b>49.9 <math>\pm</math> 10.4</b> |
| 40                          | * 93.7 $\pm$ 7.3   | * <b>44.6 <math>\pm</math> 9.2</b>  |
| 20                          | * 70.3 $\pm$ 7.8   | * <b>31.2 <math>\pm</math> 8.6</b>  |
| 10                          | * <b>33.8 <math>\pm</math> 7.1</b>                                     | * <b>16.9 <math>\pm</math> 7.4</b>  |



**FIGURA 9.** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ( $P_{in}O_2 - \text{mmHg}$ ) sobre o consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2 - \text{mLO}_2.\text{kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) do grupo controle (n = 8) de *O. niloticus*. A seta representa a  $P_{c}O_2$ .



**FIGURA 10.** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ( $P_{in}O_2$  – mmHg) sobre o consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$  –  $mLO_2.kg^{-1}.h^{-1}$ ) do grupo exposto à microcistina ( $n = 8$ ) de *O. niloticus*. A seta representa a  $P_{cO_2}$



**FIGURA 11.** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ( $P_{in}O_2$  – mmHg) sobre o consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$  –  $mLO_2.kg^{-1}.h^{-1}$ ) dos grupos controle, Ctrl ( $n = 8$ ) e exposto à microcistina, Mcis ( $n = 8$ ) de *O. niloticus*. Valores médios  $\pm 1$  D.P. \*: diferença significativa entre os grupos experimentais. Os símbolos vazios indicam diferenças significativas em relação à normóxia ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2. Ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ), Frequência respiratória ( $f_R$ ) e Volume ventilatório ( $V_T$ ).

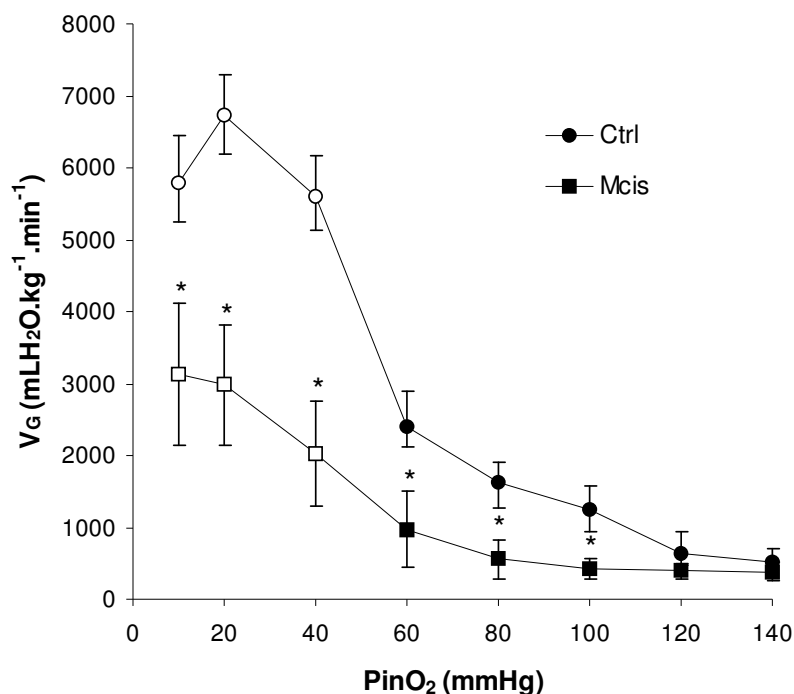
Os valores médios da ventilação branquial ( $\dot{V}_G$  – mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), da frequência respiratória ( $f_R$  - ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>) e do volume ventilatório, ( $V_T$  – mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>) dos exemplares de *O. niloticus* do grupo controle (Ctrl) e do grupo exposto à microcistina (Mcis), quando submetidos à diminuição gradual da tensão de O<sub>2</sub> da água, são apresentados nas tabelas 2, 3 e 4 e representados graficamente nas figuras 12, 13 e 14.

A  $\dot{V}_G$  do grupo Ctrl foi mantida constante desde normóxia até a P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 60 mmHg, a partir da qual, aumentos progressivos e significativos foram registrados. O maior valor de  $\dot{V}_G$  foi registrado a 20 mmHg (6741.1 ± 545.8 mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), valor esse quase 13 vezes mais elevado que o obtido em normóxia (522.5 ± 177.0 mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>).

No grupo Mcis, a  $\dot{V}_G$  também foi mantida constante desde a normóxia até P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 60 mmHg, a partir da qual aumentos progressivos e significativos foram registrados, porém em menor intensidade em comparação ao grupo Ctrl. O maior valor de  $\dot{V}_G$  registrado para esse grupo foi de 3134.5 ± 983.9 mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, sendo esse valor 8 vezes maior do que o encontrado em normóxia (388.0 ± 130.5 mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>).

**TABELA 2.** Valores da ventilação branquial ( $\dot{V}_G$  - mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) do grupo Ctrl (n = 8) e do grupo Mcis (n = 8, [ ]100 µg/Kg via *i.p*) de *O. niloticus*, em resposta à diminuição gradual na tensão de O<sub>2</sub> da água. Valores médios ± 1 D.P. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia. \* diferença significativa entre os grupos experimentais (p < 0,05).

| P <sub>in</sub> O <sub>2</sub><br>(mmHg) | $\dot{V}_G$ (mLH <sub>2</sub> O.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ) |                         |
|--|---|-------------------------|
|  | Ctrl  | Mcis                    |
| 140                                      | 522.5 ± 177.0   | 388.0 ± 130.5           |
| 120                                      | 644.9 ± 297.0   | 391.6 ± 103.2           |
| 100                                      | * 1247.5 ± 336.3  | * 426.3 ± 143.1         |
| 80                                       | * 1616.7 ± 297.0  | * 557.1 ± 276.8         |
| 60                                       | * 2409.2 ± 479.1  | * 971.8 ± 534.6         |
| 40                                       | * <b>5603.1 ± 555.5</b>   | * <b>2016.8 ± 733.8</b> |
| 20                                       | * <b>6741.1 ± 545.8</b>   | * <b>2977.5 ± 824.8</b> |
| 10                                       | * <b>5790.6 ± 659.6</b>   | * <b>3134.5 ± 983.9</b> |



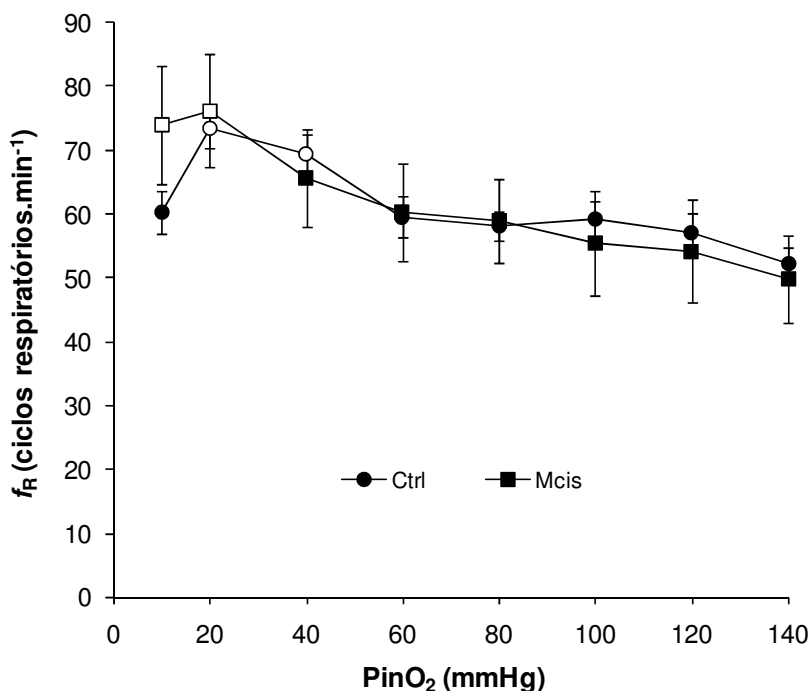
**Figura 12.** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água ( $P_{in}O_2$  – mmHg) sobre a ventilação branquial ( $\dot{V}_G$  - mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) dos grupos Ctrl (n = 8) e Mcis (n = 8) de *O. niloticus*. Valores médios  $\pm$  1 D.P. \*: diferença significativa entre os grupos experimentais. Os símbolos vazios indicam diferença em relação aos valores obtidos em normóxia (p < 0,05).

Durante normóxia, a frequência respiratória ( $f_R$ ) do grupo Ctrl foi de  $52,1 \pm 7,9$  ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>, mantendo-se constante até a  $P_{in}O_2$  de 60 mmHg. Nas tensões de 40 e 20 mmHg a  $f_R$  exibiu aumento significativo, porém durante a  $P_{in}O_2$  de 10 mmHg restabeleceram-se valores próximos aos vistos durante a normóxia. O maior valor da  $f_R$ , observado na  $P_{in}O_2$  de 20 mmHg, foi de  $73,4 \pm 8,4$  ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>, valor este 1,4 vezes maior que o observado em normóxia.

A  $f_R$  dos peixes do grupo Mcis só sofreu alterações significativas em relação á normóxia, nas  $P_{in}O_2$  de 20 e 10 mmHg, durante todas as outras tensões a  $f_R$  manteve-se constante. O maior valor de  $f_R$  encontrado para esse grupo experimental foi de  $76,3 \pm 12,8$  ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup> durante a tensão de 20 mmHg, sendo esse valor 1,5 vezes maior que o valor normóxico. Comparativamente a  $f_R$  dos dois grupos não apresentou diferenças significativas.

**TABELA 3.** Valores da frequência respiratória ( $f_R$  – ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>) dos grupo Ctrl (n = 8) e Mcis (n = 8, [ ]100 µg/Kg via *i.p*) de *O. niloticus*, em resposta à diminuição gradual na tensão de O<sub>2</sub> da água. Valores médios ± 1 D.P. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia (p < 0,05).

| P <sub>in</sub> O <sub>2</sub><br>(mmHg) | $f_R$ (ciclos respiratórios.min <sup>-1</sup> ) |                    |
|--|---|--------------------|
|  | Ctrl  | Mcis               |
| 140                                      | 52,1 ± 7,9                                      | 49,8 ± 6,9         |
| 120                                      | 57,0 ± 9,2                                      | 54,3 ± 8,2         |
| 100                                      | 59,1 ± 8,4                                      | 55,5 ± 8,2         |
| 80                                       | 58,1 ± 6,7                                      | 59,0 ± 6,5         |
| 60                                       | 59,6 ± 9,3                                      | 60,3 ± 7,7         |
| 40                                       | <b>69,5 ± 8,5</b>                               | 65,8 ± 7,6         |
| 20                                       | <b>73,4 ± 8,4</b>                               | <b>76,3 ± 12,8</b> |
| 10                                       | 60,3 ± 9,4                                      | <b>74,0 ± 17,3</b> |



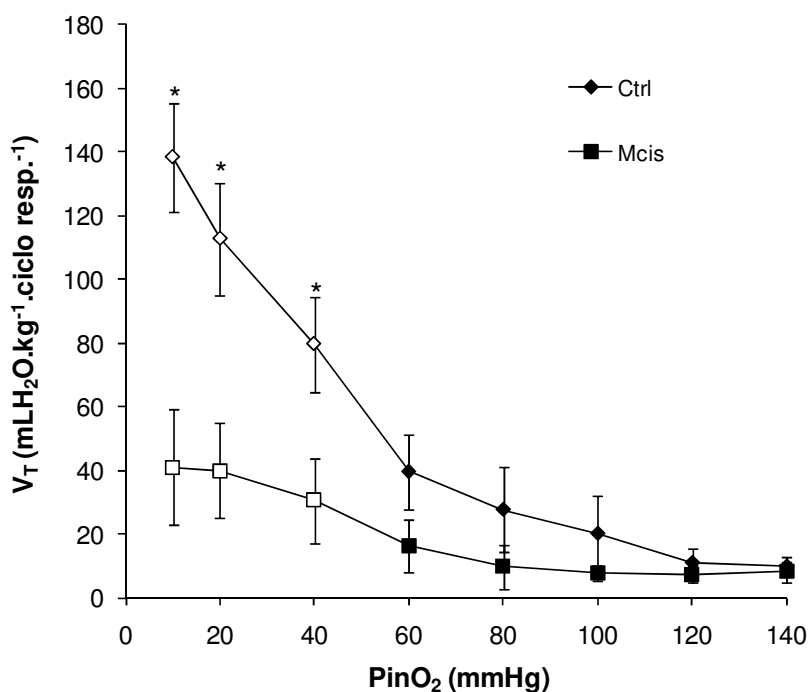
**FIGURA 13.** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água (P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> – mmHg) sobre a frequência respiratória ( $f_R$  – ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>) dos grupos Ctrl (n = 8) e Mcis (n = 8) de *O. niloticus*. Valores médios ± 1 D.P. Os símbolos vazios indicam diferença em relação aos valores obtidos em normóxia (p < 0,05).

A gradativa diminuição da concentração de  $O_2$  da água do respirômetro provocou um aumento significativo do volume ventilatório ( $V_T$ ) do grupo Ctrl somente a partir de 60 mmHg. O valor de  $V_T$  observado em normóxia foi de  $10,0 \pm 2,8$  mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>. Durante a  $P_{inO_2}$  de 10 mmHg, o  $V_T$  atingiu o valor máximo de  $138,4 \pm 67,1$  mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>, valor este 13,8 vezes maior que o obtido em normóxia.

Assim como observou-se para o grupo Ctrl, o desenvolvimento da hipóxia gradual só acarretou aumentos significativos nos valores observados para o grupo Mcis a partir da tensão de 60mmHg. Durante a normóxia o valor do  $V_T$  para esse grupo foi de  $8,0 \pm 3,0$  mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup> e seu valor máximo observado desenvolveu-se durante a tensão de 10 mmHg ( $41,1 \pm 22,2$  mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>) sendo esse valor apenas 5,1 vezes maior do que o obtido em normóxia. Diferenças significativas entre os grupos experimentais só foram observadas a partir da tensão de 40 mmHg, sendo que os valores vistos no grupo Ctrl foram significativamente superiores aos do grupo Mcis.

**TABELA 3.** Valores do volume ventilatório ( $V_T$  - mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>) do grupo Ctrl (n = 8) e do grupo Mcis (n = 8, [ ]100 µg/Kg via *i.p*) de *O. niloticus*, em resposta à diminuição gradual na tensão de  $O_2$  da água. Valores médios  $\pm$  1 D.P. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia. \* indica diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

| <b><math>P_{inO_2}</math><br/>(mmHg)</b> | <b><math>V_T</math> (mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo resp.<sup>-1</sup>)</b> |                                     |
|--|---|-------------------------------------|
|  | <b>Ctrl</b>   | <b>Mcis</b>                         |
| 140                                      | 10,0 $\pm$ 2,8  | 8,0 $\pm$ 3,0                       |
| 120                                      | 11,1 $\pm$ 4,3  | 7,4 $\pm$ 2,7                       |
| 100                                      | 20,3 $\pm$ 11,6   | 7,7 $\pm$ 2,3                       |
| 80                                       | 27,8 $\pm$ 13,6   | 9,7 $\pm$ 7,0                       |
| 60                                       | 39,7 $\pm$ 11,8   | 16,2 $\pm$ 8,3                      |
| 40                                       | <b>* 79,8 <math>\pm</math> 25,0</b>   | <b>* 30,5 <math>\pm</math> 33,2</b> |
| 20                                       | <b>* 112,9 <math>\pm</math> 37,6</b>  | <b>* 40,0 <math>\pm</math> 24,9</b> |
| 10                                       | <b>* 138,4 <math>\pm</math> 67,1</b>  | <b>* 41,1 <math>\pm</math> 22,2</b> |



**FIGURA 14.** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água ( $P_{in}O_2$  – mmHg) sobre o volume ventilatório ( $V_T$  - mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>) dos grupos Ctrl e (n = 8) e Mcis (n = 8) de *O. niloticus*. Valores médios  $\pm$  1 D.P. \*: diferença significativa entre os grupos experimentais. Os símbolos vazios indicam diferença em relação aos valores obtidos em normóxia ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.3. Extração de oxigênio da corrente ventilatória (EO<sub>2</sub>).

Os valores médios da extração de O<sub>2</sub> da corrente ventilatória (EO<sub>2</sub>) dos grupos controle (Ctrl) e exposto à microcistina (Mcis) em resposta à diminuição da tensão de O<sub>2</sub> da água de entrada do respirômetro, são apresentados na tabela 4. A representação gráfica desses resultados pode ser observada na figura 15.

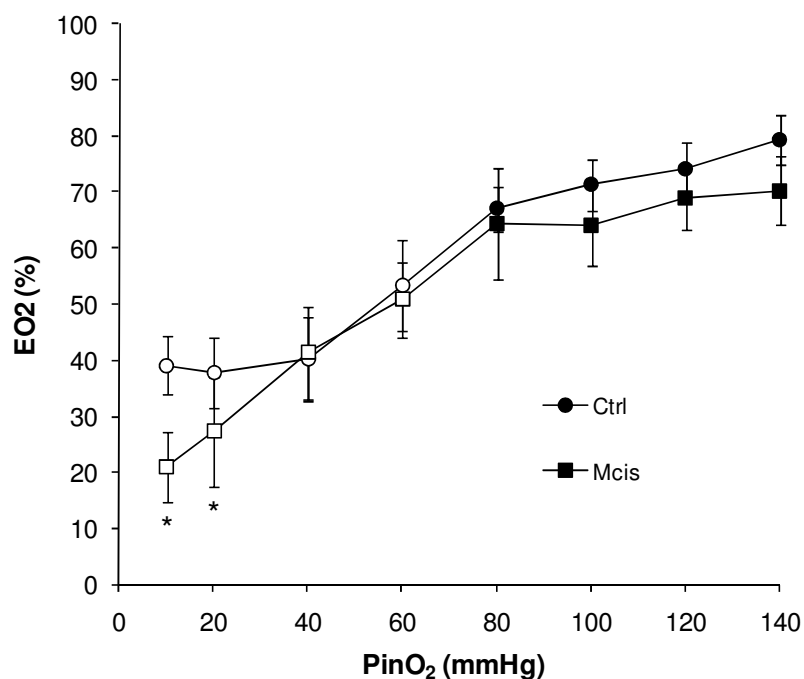
Os resultados mostram que houve uma diminuição significativa da EO<sub>2</sub> do grupo Ctrl nas  $P_{in}O_2$  abaixo de 80 mmHg, partindo do valor de  $79,4 \pm 4,5$  %, observado em normóxia, até o valor mínimo de  $37,7 \pm 6,3$  %, observado na  $P_{in}O_2$  de 20 mmHg.

No grupo Mcis, também houve uma redução significativa da EO<sub>2</sub> em relação aos valores em normóxia ( $70,3 \pm 12,1$  %), a partir da  $P_{in}O_2$  de 80 mmHg, atingindo o valor mínimo de  $21,1 \pm 6,2$  %, na menor  $P_{in}O_2$  (10 mmHg). Diferenças entre os grupos Ctrl e Mcis só foram observadas nas tensões de 20 e 10 mmHg, sendo os valores do grupo Mcis significativamente inferiores aos do grupo Ctrl.



**TABELA 4.** Valores da extração de O<sub>2</sub> da corrente ventilatória (EO<sub>2</sub> - %) dos grupos Ctrl (n = 8) e Mcis (n = 8, [ ]100 µg/Kg via *i.p*) de *O. niloticus*, submetidos a diminuições graduais na tensão de O<sub>2</sub> da água. Valores médios ± 1 D.P. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia.\* indica diferença significativa entre os grupos experimentais (p < 0,05).

| PinO <sub>2</sub><br>(mmHg) | EO <sub>2</sub> (%) |                     |
|-----------------------------|---------------------|---------------------|
|                             | Ctrl                | Mcis                |
| 140                         | 79,4 ± 4,5          | 70,3 ± 12,1         |
| 120                         | 74,2 ± 4,6          | 69,0 ± 10,8         |
| 100                         | 71,3 ± 4,5          | 64,0 ± 14,1         |
| 80                          | 67,0 ± 3,9          | 64,5 ± 9,9          |
| 60                          | <b>53,3 ± 8,1</b>   | <b>50,8 ± 13,8</b>  |
| 40                          | <b>40,2 ± 7,4</b>   | <b>41,3 ± 17,3</b>  |
| 20                          | * <b>37,7 ± 6,3</b> | * <b>27,2 ± 9,9</b> |
| 10                          | * <b>39,1 ± 5,3</b> | * <b>21,1 ± 6,2</b> |



**FIGURA 15.** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água (P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> – mmHg) sobre a extração de O<sub>2</sub> (EO<sub>2</sub> - %) dos grupos Ctrl (n = 8) e Mcis (n = 8) de *O. niloticus*. Valores médios ± 1 D.P. Os símbolos vazios indicam diferença em relação aos valores obtidos em normóxia (p < 0,05).

#### 4.2. Frequência cardíaca de *O. niloticus* submetido a hipóxia gradual

Na Tabela 5 são apresentados os valores médios da frequência cardíaca ( $f_H$ - bpm) dos grupos Ctrl e Mcis, submetidos a diferentes tensões de  $O_2$  na água.

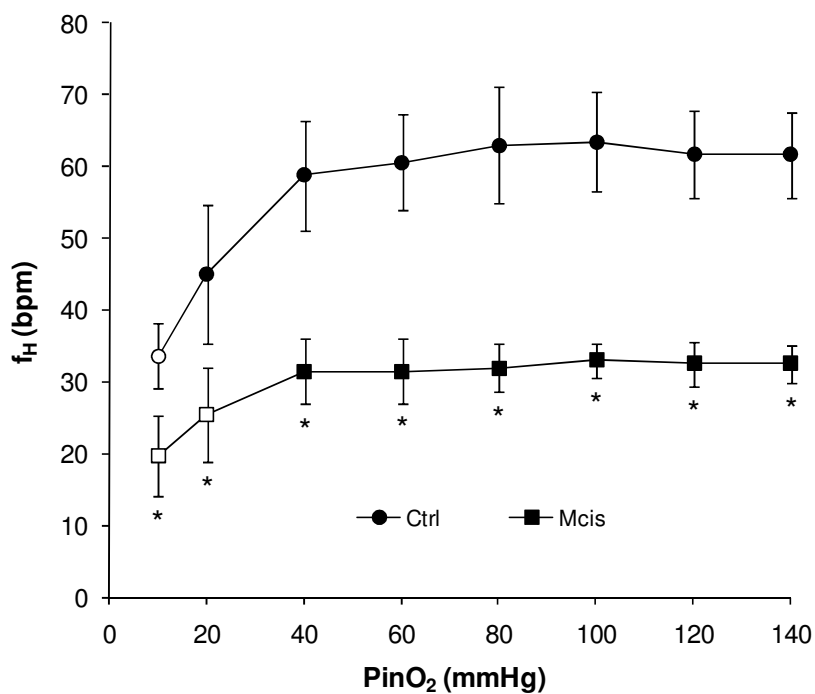
No grupo controle (Ctrl), os valores médios de  $f_H$  obtidos em normóxia ( $61,6 \pm 11,9$  bpm) não diferiram significativamente durante quase todas as  $P_{in}O_2$ , a exceção foi a tensão de 10 mmHg ( $33,6 \pm 8,6$  bpm), que apresentou uma queda de 45,5 % em relação ao valor normóxico.

No grupo exposto à microcistina (Mcis), os valores médios da  $f_H$  sofreram redução em relação ao valor normóxico ( $32,5 \pm 2,6$  bpm) apenas nas  $P_{in}O_2$  20 e 10 mmHg. O valor mínimo observado, foi de  $19,8 \pm 5,6$  bpm, na menor tensão utilizada nesses experimentos (10 mmHg). A redução da  $f_H$  na tensão de 10 mmHg em relação ao valor normóxico foi de 39%.

Comparando-se os dois grupos experimentais, observou-se que os valores de  $f_H$  do grupo Mcis foram significativamente menores que os obtidos para o grupo Ctrl em todas as tensões de  $O_2$  utilizadas no experimento (figura 16).

**TABELA 5.** Valores médios da frequência cardíaca ( $f_H$  – bpm) de espécimes de *O. niloticus* do grupo Ctrl (n = 8) e Mcis (n = 8, [ ]100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  via *i.p*), submetidos a diferentes tensões de  $O_2$  na água. Valores médios  $\pm 1$  D.P. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia. \*: diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

| <b><math>P_{in}O_2</math></b><br><b>(mmHg)</b> | <b><math>f_H</math> (bpm)</b>      |                                    |
|--|------------------------------------|------------------------------------|
|  | <b>Ctrl</b>                        | <b>Mcis</b>                        |
| 140  | * $61,6 \pm 11,9$                  | * $32,5 \pm 2,6$                   |
| 120  | * $61,8 \pm 12,1$                  | * $32,5 \pm 3,2$                   |
| 100  | * $63,5 \pm 12,9$                  | * $33,0 \pm 2,4$                   |
| 80   | * $63,0 \pm 17,1$                  | * $32,0 \pm 3,4$                   |
| 60   | * $60,6 \pm 13,7$                  | * $31,5 \pm 4,5$                   |
| 40   | * $58,8 \pm 16,7$                  | * $31,5 \pm 4,5$                   |
| 20   | * $45,0 \pm 11,8$                  | * <b><math>25,5 \pm 6,6</math></b> |
| 10   | * <b><math>33,6 \pm 8,6</math></b> | * <b><math>19,8 \pm 5,6</math></b> |



**Figura 16-** Efeito da diminuição da tensão de  $O_2$  da água no desenvolvimento de frequência cardíaca ( $f_H$  – bpm) de espécimes de *O. niloticus*, dos grupos Ctrl ( $n = 8$ ) e Mcis ( $n = 8$ ). Valores médios  $\pm 1$  D.P. Os símbolos vazios indicam diferença em relação aos valores obtidos em normóxia. \* indica diferença significativa entre os grupos experimentais. ( $p < 0,05$ ).

## 5. Discussão.

### 5.1. Respostas respiratórias de *Oreochromis niloticus* submetido à hipóxia gradual.

#### 5.1.1 Consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$ ) e tensão crítica de $O_2$ ( $P_cO_2$ ).

O consumo de oxigênio reflete a atividade metabólica global de um animal em resposta a fatores ambientais específicos, refletindo o gasto energético (MEHRLE & MAYER, 1984). A taxa metabólica de peixes normalmente é mensurada pelo consumo de oxigênio, sendo que, quando o consumo de oxigênio é medido em função da redução da pressão parcial de oxigênio da água, os peixes podem ser: (I) conformistas - a  $\dot{V}O_2$  se reduz de maneira uniforme com a diminuição do oxigênio ambiental, ou (II) reguladores - a  $\dot{V}O_2$  permanece relativamente constante com a redução do oxigênio ambiental desde o valor de saturação até a tensão crítica de oxigênio ( $P_cO_2$ ), abaixo da qual a  $\dot{V}O_2$  se reduz com a diminuição da pressão de oxigênio ambiental, provavelmente devido à redução gradual na eficiência dos mecanismos homeostáticos envolvidos na tomada de  $O_2$  pelas brânquias e na difusão do gás para os tecidos (DAVIS, 1975; STEFFENSEN, 2006).

Nosso estudo reforça os resultados prévios de Fernandes & Rantin (1989) e Kalinin *et al.*, (1999), os quais mostraram que a espécie *Oreochromis niloticus* é oxirreguladora, já que a  $\dot{V}O_2$  manteve-se constante, independente da  $PO_2$  ambiental até a sua pressão crítica de oxigênio ( $P_cO_2$ ) ser atingida. Contudo, os resultados do presente estudo indicam que a exposição à microcistina – LR (MC-LR) não só reduziu os valores de  $\dot{V}O_2$  em condições hipóxicas, como também aumentou significativamente a  $P_cO_2$ , reduzindo a capacidade de manter a tomada de  $O_2$  constante, diminuindo as chances de sobrevivência em ambientes hipóxicos.

No presente estudo, o valor médio da  $\dot{V}O_2$  observada para o grupo Ctrl ( $98,1 \pm 10,8$   $mLO_2.kg^{-1}.h^{-1}$ ) durante normóxia foi superior ao descrito por Fernandes & Rantin (1989), de  $58,7 \pm 8,0$  e Delavechia (1994), de  $63,7 \pm 2,4$ , porém ficou próximo ao descrito por Thomaz *et al.* (2009), que encontraram valores da ordem de  $99,4 \pm 7,4$   $mLO_2.kg^{-1}.h^{-1}$  em condições normóxicas. A metodologia empregada no presente trabalho foi a mesma apresentada por Thomaz *et al.* (2009), sendo esse provavelmente o motivo da semelhança de resultados.

A  $P_cO_2$  calculada para *O. niloticus* do grupo Ctrl, no presente trabalho, foi de 16 mmHg. Este valor de  $P_cO_2$  está de acordo com o descrito por Delavechia (1994) que foi de 20 mmHg e Fernandes & Rantin (1989) que ficou em torno de 18 mmHg para a espécie em questão, assim como com os descritos para outros teleósteos de água doce, a exemplo de,

*Cyprinus carpio*, 20mmHg, (OTT *et al.*, 1980), *Hoplias malabaricus*, 18 mmHg (KALININ, 1991) e *Hoplias lacerdae* (RANTIN *et al.*, 1992).

Os ambientes tropicais, devido as suas elevadas temperaturas, expõem as espécies tropicais à hipóxia ambiental, sendo que os baixos valores de  $P_cO_2$  podem representar uma vantagem adaptativa, pois permitem uma maior capacidade de regular a tomada de  $O_2$  do meio (FERNANDES & RANTIN, 1989). Dessa maneira, o baixo valor da  $P_cO_2$  observado em *O. niloticus* pode ser um mecanismo adaptativo dessa espécie, sugerindo a capacidade em manter a  $\dot{V}O_2$  em ambientes com baixas tensões de  $O_2$ .

A inoculação intraperitoneal de MC-LR aumentou significativamente a  $P_cO_2$  de *Oreochromis niloticus*, de ~16 para ~58 mmHg. Dessa maneira, a microcistina reduziu a capacidade de manter a tomada de  $O_2$  constante, fazendo com que a  $\dot{V}O_2$  da espécie passe a ser dependente da concentração de  $O_2$  do meio em tensões de  $O_2$  mais elevadas, reduzindo sua capacidade de sobrevivência em ambientes hipóxicos.

Ainda não existem na literatura, trabalhos que relatem os efeitos da exposição à microcistina sobre parâmetros cardio-respiratórios de peixes e, pelo que temos conhecimento, o presente estudo é pioneiro nessa linha de pesquisa. Entretanto algumas hipóteses para a diminuição na capacidade de *O. niloticus* manter sua  $\dot{V}O_2$  constante podem ser discutidas.

Diversos estudos em peixes teleósteos têm demonstrado os efeitos da microcistina-LR e suas variantes sobre órgãos como fígado, brânquias, rins, coração entre outros. Prieto *et al.* (2006) descreveram aumentos significativos na atividade do sistema antioxidante de *O. niloticus* durante a exposição a 500  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$  de peso corpóreo injetados intraperitonealmente. Além da ocorrência de estresse oxidativo, os autores observaram lipoperoxidação em brânquias, fígado e rins de *O. niloticus*. Segundo Davis (1975) e Steffensen (2006), os peixes oxirreguladores quando são expostos a tensões de  $O_2$  abaixo de sua  $P_cO_2$ , sofrem redução de sua taxa metabólica de acordo com a diminuição da pressão de oxigênio ambiental. Ainda de acordo com os autores, isso ocorre provavelmente devido à redução gradual na eficiência dos mecanismos homeostáticos envolvidos na tomada de  $O_2$  pelas brânquias e na difusão do gás para os tecidos. O fato do grupo exposto à microcistina apresentar  $P_cO_2$  aumentada indica que a homeostase descrita pelos autores pode estar sendo, de alguma maneira, alterada pela ação dessa cianotoxina, seja na tomada de  $O_2$  ou na difusão até os tecidos.

Sabe-se que o fígado é o órgão mais afetado pela ação da MC-LR (JOS *et al.*, 2005; FISCHER & DIETRICH, 2000; PRIETO *et al.*, 2007), embora outros órgãos como rins e brânquias também exibam efeitos da toxina (RABERGH *et al.*, 1991; CARBIS *et al.*, 1997, ZHANG *et al.*, 2007).

A ocorrência de alteração na homeostase pode estar relacionada a mudanças na capacidade do sangue em transportar oxigênio, provavelmente por uma possível queda na proporção de eritrócitos no sangue (hematócrito) e na concentração de hemoglobina, com conseqüente diminuição do transporte de O<sub>2</sub>. Estudos vêm demonstrando que a microcistina, ao lesar os tecidos hematopoiéticos de peixes teleósteos como baço, fígado e principalmente rins (QUENTEL & OBACH, 1992; MATUSHIMA, 1995), acaba por interferir na constituição do sangue desses peixes (ZHANG *et al*, 2007; JONES, 1971; KATHARIOS *et al*, 2002), com conseqüências diretas no transporte de oxigênio.

Como os rins são os mais importantes órgãos hemogênicos em peixes (OSAKI, 1982), é possível que a injeção intraperitoneal de MC-LR possa ter resultado em hipofunção desse órgão a qual, aliada aos danos ocorridos no fígado, pode ter induzido um quadro de anemia, que poderia ter influenciado o aumento da P<sub>c</sub>O<sub>2</sub> observado no grupo exposto à microcistina (Mcis). Tal quadro foi descrito por Zhang *et al* (2007) para a carpa cruciana, *Carassius carassius*, submetida a injeções de microcistina *i.p* de 50 e 200 µg.Kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo.

### 5.1.2. Ventilação Branquial ( $\dot{V}_G$ ), Frequência Respiratória ( $f_R$ ) e Volume Ventilatório ( $V_T$ ).

Interações adaptativas entre fatores ambientais, como baixos níveis de oxigênio da água, e mecanismos respiratórios em peixes são inevitáveis, a fim de se manter o gradiente de transferência do oxigênio da água para os tecidos (FERNANDES & RANTIN, 1989).

A manutenção da homeostasia respiratória depende da capacidade de mobilizar mecanismos compensatórios, como o aumento na ventilação branquial, para manter o gradiente de oxigênio entre a água e o sangue o mais elevado possível, assegurando assim a eficiência nas trocas gasosas (FERNANDES & RANTIN, 1989).

Aumentos na ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ), como resposta primária à redução na tensão de oxigênio ambiental, foram observados em várias espécies de peixes, como pacu, *Piaractus mesopotamicus* (KALININ *et al.*, 2000), traíra, *Hoplias malabaricus*, trairão, *Hoplias lacerdae* (RANTIN *et al.*, 1992), carpa comum, *Cyprinus carpio* (SAUNDERS, 1962; LOMHOLT & JOHANSEN, 1979), entre outras.

No presente estudo, verificaram-se aumentos significativos na ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) de ambos os grupos experimentais frente à exposição à hipóxia gradual. O aumento exibido por ambos os grupos na  $\dot{V}_G$  foi caracterizado pelo maior aumento no volume ventilatório ( $V_T$ ), (cerca de 13,9 vezes no grupo Ctrl e 5,1 no grupo Mcis) em relação à frequência respiratória ( $f_R$ ), (cerca de 1,4 vezes no grupo Ctrl e 1,5 no grupo Mcis).

Vários estudos apontam para diferentes estratégias utilizadas pelos teleósteos para o ajuste da ventilação branquial durante períodos hipóxicos. Uma estratégia utilizada por esses animais é o aumento na  $\dot{V}_G$  resultante de um maior aumento na  $f_R$  do que no  $V_T$ . Tal resposta foi encontrada em estudos com a carpa comum, *C. carpio* (MARVIN & HEATH, 1968), "bluegill sunfish", *Lepomis macrochirus* (LOMHOLT & JOHANSEN, 1979) e pacu, *P. mesopotamicus* (AGUIAR *et al.*, 2002).

Entretanto, a estratégia mais comumente observada em peixes teleósteos se baseia em um maior aumento no  $V_T$  em comparação à  $f_R$ . Entre os animais que apresentam esse tipo de resposta estão: tilápia-do-nilo, *O. niloticus* (FERNANDES & RANTIN, 1989; KALININ *et al.*, 1999), traíra, *H. malabaricus* (KALININ *et al.*, 1993), curimatá, *Prochilodus scrofa* (FERNANDES *et al.*, 1995) e cascudo, *Hypostomus regani* (MATTIAS *et al.*, 1998).

A estratégia de um maior aumento do  $V_T$  em comparação à  $f_R$  é, do ponto de vista metabólico, a forma mais eficaz de aumentar a  $\dot{V}_G$  (JOHANSEN *et al.*, 1967). De acordo com Rantin *et al.* (1992), a utilização desta estratégia baseia-se no baixo custo para a manutenção da velocidade e constância da contração muscular, enquanto que uma alta frequência de contração é limitada pelo trabalho muscular contra uma alta viscosidade da água ventilada.

Durante a normóxia, os valores da  $\dot{V}_G$  de ambos os grupos não diferiram de forma significativa. Durante o desenvolvimento da hipóxia gradual, os valores de  $\dot{V}_G$  do grupo Ctrl chegaram a aumentar até 13 vezes na tensão de 20 mmHg enquanto que, no grupo Mcis, os aumentos nos valores da  $\dot{V}_G$  foram da ordem de 8 vezes, representando um decréscimo de 38,5% na capacidade de elevar sua ventilação branquial.

De acordo com a "equação fundamental da fisiologia respiratória" (DEJOURS, 1981),

$$(\dot{V}_G / \dot{V}O_2) \cdot EO_2 \cdot P_{in}O_2 = 1,$$

a manutenção da tomada de  $O_2$  constante quando a concentração de  $O_2$  do meio declina só é possível se ocorrer um aumento na ventilação branquial e/ou na extração de  $O_2$  da corrente ventilatória ( $EO_2$ ). Como a capacidade de aumento na  $EO_2$  é muito limitada em peixes, o aumento na  $\dot{V}_G$  é necessário para a manutenção da  $\dot{V}O_2$  (KALININ, 1996). Na ciência de que ao aumento na ventilação branquial é necessário para a manutenção da  $\dot{V}O_2$  constante, perdas na capacidade de aumentar os valores da  $\dot{V}_G$  tendem a dificultar a sobrevivência desses animais em ambientes hipóxicos.

Portanto, a exposição à MC-LR impossibilitou de alguma maneira o desenvolvimento normal das respostas respiratórias no grupo Mcis, dado que apesar desse grupo exibir o mesmo tipo de estratégia respiratória do grupo Ctrl, sua amplitude de resposta foi consideravelmente menor.





### 5.1.3. Extração de O<sub>2</sub> da Corrente Ventilatória (EO<sub>2</sub>).

A espécie estudada, *Oreochromis niloticus*, apresenta elevados valores de extração de O<sub>2</sub>, da ordem de 75 – 80% (FERNANDES & RANTIN, 1989; KALININ, 1996; DELAVECHIA, 1994). Outras espécies estudadas também apresentam valores altos de EO<sub>2</sub>, dentre elas estão: o tambaqui, *C. macropomum*, o pacu, *P. mesopotamicus*, o curimatá, *P. scrofa*, a traíra, *H. malabaricus* e carpas, todas apresentando valores de EO<sub>2</sub> em normóxia superiores a 70 %. (KALININ, 1996; CORRÊA, 1996; GUERRA, 1992; FERNANDES *et al.*, 1995; MATTIAS *et al.*, 1996; SAUNDERS, 1962).

No presente estudo, observou-se valores de EO<sub>2</sub> em normóxia de 79,4% para o grupo Ctrl e de 70,3 % para o grupo Mcis. Em ambos os grupos a EO<sub>2</sub> manteve-se constante até a tensão de 80 mmHg e, abaixo desta PO<sub>2</sub>, a mesma reduziu-se gradativamente até atingir os valores de 39,1 % para o grupo Ctrl e 21,1 % para o Mcis na menor tensão analisada (10mmHg). O mesmo padrão de resposta foi observada por Fernandes & Rantin (1989) e Thomaz (2008).

Embora *O. niloticus* tenha apresentado reduções na extração de O<sub>2</sub> frente à exposição à hipóxia gradual, a extração apresentada por essa espécie foi tão alta quanto de outras espécies já estudadas. O aumento na  $\dot{V}_G$  enquanto a EO<sub>2</sub> se mantém relativamente alta e constante constitui uma das mais importantes compensações respiratórias durante reduções na PO<sub>2</sub> ambiental (FERNANDES & RANTIN, 1989).

Segundo Steffensen *et al*, (1982), uma comparação entre peixes nos diferentes níveis de tolerância à hipóxia indica que as espécies que são mais tolerantes possuem grande potencial de aumento de sua ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ), enquanto mantém a extração de O<sub>2</sub> em níveis constantes.

No presente estudo, os valores de EO<sub>2</sub> dos grupos experimentais foram significativamente diferentes nas tensões mais hipóxicas (20 e 10 mmHg). Quando comparados aos valores normóxicos, a EO<sub>2</sub> do grupo Mcis reduziu-se ~27,9 % na tensão de 20 mmHg e 46,1 % na tensão de 10 mmHg a mais do que a redução observada no grupo Ctrl.

Carbis *et al* (1997) verificaram necrose em células de brânquias de *Cyprinus carpio* expostas a florações de cianobactérias produtoras de microcistina. Prieto *et al* (2006) e Prieto *et al* (2007) mostraram que a exposição de *O. niloticus* à microcistina em doses sub-letais (500 µg.Kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo) causa estresse oxidativo com subsequente destruição celular (lipoperoxidação) em vários órgãos, inclusive em brânquias. A destruição celular ocasionada pela lipoperoxidação induzida por estresse oxidativo, descrita por esses autores, pode estar diminuindo a capacidade das brânquias em manter a extração de oxigênio relativamente alta e constante durante a hipóxia severa (20 e 10 mmHg). Como já citado acima, Steffensen (1982) afirma que espécies tolerantes a hipóxia exibem grande potencial

de aumento da  $\dot{V}_G$  com concomitante manutenção da  $EO_2$ . Em nosso estudo, tanto a capacidade de aumentar a  $\dot{V}_G$  quanto de manter a  $EO_2$  se mostram comprometidas no grupo Mcis, diminuindo em muito as chances de sobrevivência desses animais em ambientes hipóxicos.

## 5.2. Frequência cardíaca de *Oreochromis niloticus* submetido à hipóxia gradual.

A  $f_H$  vêm sendo utilizada como indicador de efeitos tóxicos de contaminantes ambientais em peixes, e reduções em seus valores com concomitantes aumentos na ventilação branquial são respostas comuns em peixes expostos a uma variedade de xenobióticos (TEUSCHLER *et al.*, 2005; HEATH, 1995).

No presente estudo, os valores médios da  $f_H$  do grupo Ctrl em normóxia mantiveram-se constantes em ~61 bpm e apresentaram queda significativa apenas na menor tensão analisada (10mmHg). Esses valores encontrados para a  $f_H$  são maiores do que os observados por Thomaz *et al* (2009), mas estão próximos aos verificados para espécies de peixes tropicais como o pacu, *P. mesopotamicus* (50 bpm; RANTIN *et al.*, 1998) e o tambaqui, *C. macropomum* (48 bpm; RANTIN & KALININ, 1996).

Segundo Farrell (1984), o reflexo bradicárdico produzido pela hipóxia pode ser valioso para assegurar a performance do coração durante a hipóxia do miocárdio. Assim a redução da  $f_H$  de *O. niloticus* nas tensões próximas da  $P_cO_2$  provavelmente preserva o gasto energético do coração quando a disponibilidade de  $O_2$  se torna reduzida. Além disso, a bradicardia aumenta o tempo de residência do sangue dentro do ventrículo, o que poderia permitir um aumento da extração de  $O_2$  pelo próprio miocárdio esponjoso. Apesar de sugerirem que a bradicardia aumenta a eficiência da transferência de gases nas brânquias pelo desenvolvimento da sincronia cardio-respiratória, Glass *et al.* (1991) questionam até que ponto a bradicardia hipóxica é apenas um reflexo compensatório e não uma consequência do sofrimento miocárdico imposto pelas baixas tensões de  $O_2$ , uma vez que abaixo da  $P_cO_2$  é normalmente acompanhada de alterações eletrocardiográficas indicativas de isquemia miocárdica.

No presente trabalho, a  $f_H$  do grupo Ctrl foi significativamente superior a do grupo Mcis em todas as tensões analisadas, que apresentou bradicardia significativa já a partir da tensão de 20 mmHg, diferentemente do grupo Ctrl, que apresentou tal resultado apenas na tensão de 10 mmHg. Apesar da resposta bradicárdica à hipóxia do grupo Mcis ter sido semelhante à do grupo Ctrl, o grupo Mcis apresentou valores de  $f_H$  significativamente menores desde os seus valores normóxicos (cerca de ~47%). Esses resultados indicam que de alguma maneira a exposição à MC-LR prejudica o funcionamento normal do coração de *O. niloticus*.

Atencio *et al* (2008), submeteram exemplares de *O. niloticus* a injeções intraperitoneais de MC-LR ( 500 µg.Kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo) e, além de danos a órgãos como fígado e rins, verificaram a ocorrência de histopatologias nos miócitos cardíacos. Dentre essas alterações foram observadas miopatias com processos de fibrólise e edema generalizado nos cardiomiócitos. Segundo os autores, esses resultados provavelmente foram devidos à ação da MC-LR diretamente no tecido cardíaco. Esses resultados reforçam nossa tese de que a MC-LR, através de seus mecanismos de ação nas células, pode ter lesionado o tecido cardíaco de *O. niloticus* no presente estudo, impossibilitando o funcionamento normal do coração.

### 5.3. Mecanismos gerais da toxicidade da MC-LR.

As microcistinas são potentes inibidoras das proteínas fosfatases serina/treonina específicas, como a PP1 e a PP2A, através de sua ligação no sítio catalítico dessas enzimas (MCKINTOSH *et al*, 1990; GULLEDGEA *et al*, 2002). A fosforilação e desfosforilação de proteínas é um processo dinâmico e uma importante via para a regulação das atividades de muitas proteínas nas células. Esse processo é catalisado pelas quinases e fosfatases. Portanto a inibição dessas enzimas pode ter sérios impactos na homeostase celular.

Dessa maneira, a aguda toxicidade das microcistinas pode ser explicada pelo fato de que a inibição dessas fosfatases (PP1 e PP2A) leva a uma excessiva fosforilação de proteínas e a alterações no citoesqueleto, perda da forma celular com subsequente destruição de células, principalmente as células hepáticas, o que pode causar hemorragia intra-hepática ou insuficiência hepática, com desenvolvimento de necrose no tecido hepático (VAN APELDOORN *et al*, 2007).

Além da inibição das fosfatases, as microcistinas podem também afetar os sistemas de reparo de DNA e expressão de genes (DOUGLAS *et al*, 2001; ARIZA *et al*, 1996), e parece poder interagir com as mitocôndrias de tecidos animais e causar estresse oxidativo e apoptose celular. (PRIETO *et al*, 2009; ZHANG *et al*, 2008).

Alguns estudos demonstraram que a capacidade de penetração da MC-LR na membrana celular é baixa, indicando que a toxina requer um mecanismo ativo de captação. Fischer *et al*, (2005) explicaram a hepatotoxicidade da MC-LR através do transporte dessas toxinas mediado por peptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATP), uma superfamília de transportadores de membrana que são expressos principalmente nos hepatócitos. Isso explica porque geralmente o efeito da MC-LR em peixes é visto inicialmente no fígado e posteriormente em outros órgãos como brânquias e rins.

Em mamíferos, existem dois grandes sistemas de transporte de ácidos orgânicos: um sistema sódio-independente e um sistema sódio-dependente (VAN MONTFOORT, 2003). Em contraste, no fígado de peixes como a raia, *Raja erinacea* (BOYER *et al*, 1993; FRICKER *et al*, 1987), e a truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, (RABERGH *et al*, 1994), o sistema sódio-dependente está ausente. Particularmente, o sistema de transporte sódio-independente possui um largo espectro de ação. Ele transporta, além de sais biliares, ácidos biliares, esteróides e vários peptídeos lineares e cíclicos, dentre os quais se inclui a MC-LR. Portanto, esse sistema é o provável transportador da MC-LR em peixes. A MC-LR é rapidamente captada no trato gastrointestinal e é transportada até os tecidos via corrente sanguínea (FISCHER *et al*, 2000).

Como dito anteriormente, os OATPs são um sistema multiespecífico que está expresso em diferentes tipos de células como enterócitos, hepatócitos e células epiteliais renais e em órgãos como coração, pulmões, baço, pâncreas, cérebro e barreira hematocefálica (FEURSTEIN *et al*, 2009), sendo que a distribuição da MC-LR nos tecidos é dependente do grau de perfusão sanguínea e do nível de expressão dos OATPs. Portanto, o primeiro fator limitante para a ação tóxica da MC-LR na célula é a sua entrada, sendo que uma vez dentro da célula seu modo de ação será praticamente o mesmo.

Os resultados do presente estudo mostram que possivelmente vários tecidos foram lesados pela ação da MC-LR e o mais importante, fornece indícios de que a homeostase do animal estava prejudicada.

Como o presente estudo se propôs a analisar os efeitos da MC-LR *in vivo*, é mais do que necessário se levar em conta os efeitos dessa toxina no organismo como um todo e sua interferência na manutenção da homeostase.

Sendo assim, pode-se inferir que a relação entre o aumento na  $P_{cO_2}$ , a diminuição da  $\dot{V}O_2$ , a diminuição na capacidade de aumentar a  $\dot{V}_G$ , a queda na  $EO_2$  durante hipóxia severa e a redução na frequência cardíaca do grupo Mcis reflete mais do que o efeito dessa toxina sobre cada estrutura em particular, como eritrócitos, brânquias, fígado e coração, mas um efeito global da toxina sobre o organismo em sua atividade normal, diminuindo suas chances de sobrevivência em seus habitats naturais.

## 6. Conclusões

O estudo das respostas cardio-respiratórias de tilápias-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, em situação controle e após 48 h de injeção intraperitoneal de microcistina-LR (MC-LR - 100  $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de peso corpóreo) permitiu as seguintes conclusões:

- a. A exposição à MC-LR reduziu a capacidade de manter a taxa metabólica constante durante hipóxia gradual, causando tanto a diminuição da própria taxa metabólica ( $\dot{V}\text{O}_2$ ) quanto o aumento da tensão crítica de  $\text{O}_2$  ( $\text{PcO}_2$ ).
- b. A exposição à MC-LR não alterou o padrão das respostas respiratórias em comparação ao grupo Ctrl durante a redução gradual na  $\text{PO}_2$ , entretanto a magnitude dos aumentos da ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) e do volume ventilatório ( $V_T$ ) foi consideravelmente menor. Esse fato indica que a MC-LR altera os mecanismos homeostáticos, impossibilitando dessa forma a manutenção de uma resposta respiratória normal frente à hipóxia ambiental;
- c. A capacidade de manter a extração de  $\text{O}_2$  da corrente ventilatória ( $\text{EO}_2$ ) durante hipóxia severa foi significativamente reduzida pela exposição à MC-LR;
- d. Os menores valores de frequência cardíaca in vivo ( $f_H$ ) do grupo exposto à MC-LR durante a redução gradual na  $\text{PO}_2$ , quando comparados aos controle indicam que esta toxina, através de seus mecanismos de ação nas células, pode ter lesionado o tecido cardíaco de *O. niloticus* no presente estudo, impossibilitando o funcionamento normal do coração.
- e. Em conjunto, os resultados do presente trabalho mostraram que a exposição à MC-LR pode reduzir as chances de sobrevivência da espécie estudada em ambientes hipóxicos.

## 7. Referências Bibliográficas

AGUIAR, L. H.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T. The effects of temperature on the cardiorespiratory function of the neotropical fish *Piaractus mesopotamicus*. **J. Therm. Biol.**, v. 27, p. 299-308, 2002.

ANDRADE, M.S.B. **Avaliação de efeitos citotóxicos, morfológicos e ultraestruturais de microcistinas em células Vero**. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2007.

ANELLI-Jr, L.C. **Efeitos de diferentes formulações comerciais do herbicida Roundup® sobre a função cardiorespiratória de matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei, Characidae)**. Doutorado (tese). Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal de São Carlos, 92 p, 2010.

ARIZA, R.R.; KEYSE, S.M.; MOGGS, J.G.; WOOD, R.D. Reversible protein phosphorylation modulates nucleotide excision repair of damaged DNA by human cell extracts. **Nucl. Acid. Res.**, v. 24, p. 433-440, 1996.

ATENCIO, L.; MORENO, I.; PRIETO, A. I.; MOYANO, R.; MOLINA, A.M.; CAMEÁN, A.M. Acute Effects of Microcystins MC-LR and MC-RR on Acid and Alkaline Phosphatase Activities and Pathological Changes in Intraperitoneally Exposed Tilapia Fish (*Oreochromis sp.*) **Toxicologic Pathology.**, v. 36, p. 449-458, 2008

AZEVEDO, S.M.F.O. Toxinas de Cianobactérias: Causas e Conseqüências para a Saúde Pública. **Medicina On - Line**, v. 1. n. 3, 1998.

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

BOYER, J.L.; HAGENBUCH, B.; ANANTHANARAYANAN, M.; SUCHY, F.; STIEGER, B.; MEIER, P.J. Phylogenic and ontogenic expression of hepatocellular bile acid transport. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 435-438, 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº. 1469. Norma de qualidade da água para consumo humano. **Diário Oficial da União**, 18p. Brasília, DF, 29 DEZ. 2000.

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

CAMPBELL, N.; REECE, J.; TAYLOR, M.; SIMON, E.; DICKEY, J. **Biology: Concepts and Connections**, Benjamin Cummings, 6th Edition. 928p, 2008.

CARBIS, C.R.; RAWLIN, G.T.; GRANT, P.; MITCHELL, G.F.; ANDERSON, J.W.; MacCAULEY. A study of feral carp *Cyprinus carpio* L., exposed to *Microcystis aeruginosa* at Lake Mokoan, Australia, and possible implication on fish health. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v.20, n.2, p.81-91, 1997.

CARMICHAEL, W.W.; BRIGGS, D.F.; GORHAM, P.R. Toxicology and pharmacology action of *Anabaena flos-aquae* toxin. **Science**, v.187, p. 542-544, 1975.

CARMICHAEL, W.W.; SCHWARTZ, L.D. Preventing livestock deaths from blue-green algae poisoning. **Farmers Bulletin** 2275, Washington, DC: US Dept. of Agriculture, 1984.

CARMICHAEL, W.W.; BEASLEY, V.R.; BUNNER, D.L.; ELOFF, J.N.; FALCONER, I.; GORHAM, P.; HARADA, K.I.; KRISHNAMURTHY, T.; YU, M.J.; MOORE, R.E.; RINEHART, K.; RUNNEGAR, M.; SKULBERG, O.M.; WATANABE, M. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). **Toxicon**, v. 26, p. 971-973, 1988.

CARMICHAEL, W.W.; FALCONER, I.R. Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures. In: I.R. Falconer, Editor, **Algal Toxins in Seafood and Drinking Water**, Academic Press, London, p. 187-209, 1993.

CARMICHAEL, W.W. The toxins of cyanobacteria. **Scientific American**, v. 270, p. 78-86, 1994.

CARMICHAEL, W.W. Toxic microcystis and the environment. In WATANABE, M.F.; HARADA, K.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H. (Eds). **Toxic Microcystis**. CRC Press, USA, 1996.

CASTAGNOLLI, N. Espécies nativas próprias para a piscicultura. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES. 1997, São Paulo. **Anais**. Piracicaba: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal: 117-130.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health, monitoring and management**, London: Spon Press, 416p., 1999.

CHORUS, I. **Cyanotoxins: Occurrence, causes and consequences**. Springer, Germany, 2001.

CODD, G.A.; BELL, S.G. The occurrence and fate of the blue-green algal toxins in freshwaters. **National Rivers Authority R and D report 29**, London: Her Majesty's Stationery Office, 1996.

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

CORRÊA, C.F. **Efeitos das reduções graduais do oxigênio ambiental sobre a função cardíaco-respiratória de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier) (Teleostei, Serrasalminidae)**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal de São Carlos, 109p, 1996.

CORREIA, F.; DELGADO, P.; CASTRO, V. Impacto do Desenvolvimento e Toxicidade das Cianobactérias. **Ecotoxicologia**. Lisboa, 2000.

CRAIG, M.; LUU, H.A.; MCCREADY, T.L.; WILLIAMS, D.; ANDERSEN, R.J.; HOLMES, C. F. Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporin and microcystins with type-1 and type-2A protein phosphatases. **Biochem. Cell Biol.**, v. 74, p. 569-578, 1996.

DAVIS, J.C. Minimal dissolved oxygen requirements of aquatic life with emphasis on Canadian species: a review. **J. Fish. Res. Board Can.**, v. 32, n. 12, p. 2295-2332, 1975.

DEJOURS, P. **Principles of comparative respiratory physiology**. New York: Elsevier, 265 p., 1981.

DELAVECHIA, M.L. **Respostas cardio-respiratórias de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus* (SCHWARTZ, 1983) às variações de oxigênio no ambiente e durante a recuperação subsequente**. Tese (doutorado), Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos naturais. Universidade Federal de São Carlos, 324p, 1994.

- DIAL, N.A. Methylmercury: some effects on embryogenesis in the Japanese medaka *Oryzias latipes*. **Teratology**, v. 17, p. 83-92, 1978
- DOUGLAS, P.; MOORHEAD, G.B.; YE, R.; LEES-MILLER, S.P. Protein phosphatases regulate DNA-dependent protein kinase activity. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 50, 2001.
- DUY, T.N.; LAM, P.K.S.; SHAW, G.R.; CONELL, D.W. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 163, p. 113-186, 2000.
- ERIKSSON, J.E.; GRÖNBERG, L.; NYGARD, S.; SLOTTE, J.P.; MERILUOTO, J.A.O. Hepatocellular uptake of 3-H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1025, n. 1, p. 60-66, 1990.
- FALCONER, I.R.; BURCH, M.D.; STEFFENSEN, A.D.; CHIOCE, M.; COVERDALE, B.R. Toxicity of the blue-green alga (*Cyanobacterium*) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury risk and assessment, **Environmental toxicology and water quality**, v.9, n.2, p.131-139, 1994.
- FARRELL, A.P. A review of cardiac performance in the teleost heart: intrinsic and humoral regulation, **Can. J. Zool.**, v. 62, p. 523-536, 1984.
- FERNANDES, M.N.; BARRIONUEVO, W.R.; RANTIN, F.T. Effects of thermal stress on respiratory responses to hypoxia of a South American Prochilodontid fish, *Prochilodus scrofa*. **J. Fish Biol.**, v. 46, p. 123-133, 1995.
- FERNANDES, M.N.; RANTIN, F.T. Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) to environmental hypoxia under different thermal conditions. **J. Fish. Biol.**, v. 35, p. 509-519, 1989.
- FERNANDES, M.N.; RANTIN, F.T. Relationships between oxygen availability and metabolic cost of breathing in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Aquacultural consequences. **Aquaculture**, v. 127, p. 339-346, 1994.
- FEURSTEIN, D.; HOLST, K.; FISCHER, A.; DIETRICH, D.R. Oatp-associated uptake and toxicity of microcystins in primary murine whole brain cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 234, p. 247-255, 2009.
- FISCHER, W. J., ALTHEIMER, S., CATTORI, V., MEIER, P. J., DIETRICH, D. R., and HAGENBUCH, B. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 203, p. 257-263, 2005.
- FISCHER, W.J.; DIETRICH, D.R. Pathological and Biochemical Characterization of Microcystin-Induced Hepatopancreas and Kidney Damage in Carp (*Cyprinus carpio*). **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 164, p. 73-81, 2000.
- FISCHER, W.J.; HITZFELD, B.C.; TENCALLA, F.; ERIKSSON, J.E.; MIKHAILOV, A.; DIETRICH, D.R. Microcystin-LR Toxicodynamics, Induced Pathology, and Immunohistochemical Localization in Livers of Blue-Green Algae Exposed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicological Sciences**, v. 54, p. 365-373, 2000.
- FRICKER, G.; HUGENTOBLE, G.; MEIER, P.J.; KURZ, G.; BOTER, J.L. Identification of a single sinusoidal bile salt uptake system in skate liver. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** v. 253, p. 816-822, 1987.



GALIS, F.; BAREL, C. D. N. Comparative functional morphology of the gills of African lacustrine Cichlidae (Pisces, Teleostei). An eco-morphological approach. **Neth. J. Zool.**, v. 30(2), 392-430. 1980.

GLASS, M.L.; RANTIN, F.T.; VERZOLA, R.M.M.; FERNANDES, M.N.; KALININ, A.L. Cardio-respiratory synchronization and myocardial function in hypoxic carp (*Cyprinus carpio* L.). **J. Fish. Biol.**, v. 39, p. 143-149, 1991.

GUERRA, C.D.R. **Respostas cardio-respiratórias de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), às variações de oxigênio no ambiente e durante a recuperação subsequente.** Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos naturais. Universidade Federal de São Carlos, 114p, 1992.

GULLEDGEA, B.M.; AGGENA, J.B.; HUANGB, H.B.; NAIRNC, A.C.; CHAMBERLIN, A.R. The microcystins and nodularins: Cyclic polypeptide inhibitors of PP1 and PP2A. **Curr. Med. Chem.** 2002, v. 9, 1991–2003.

GUZMAN, R.E.; SOLTER, P.F.; RUNNEGAR, M.T. Inhibition of nuclear protein phosphatase activity in mouse hepatocytes by the cyanobacterial toxin microcystin-LR. **Toxicol.**, v. 41, p. 773-781, 2003.

HEAT, A.G. **Water pollution and fish physiology.** Second Edition. Lewis Publishers, CRC Press, 359p, 1995.

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

HONKANEN, R.E.; ZWILLER, J.; MOORE, R.E.; DAILY, S.L.; KHATRA, B.S.; DUKELOW, M.; BOYNTON, A.L. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265(32), p. 19401-19404, 1990.

HUGHES, G.M. Respiratory Responses to Hypoxia in Fish. **Am. Zool.** v. 13(2). p. 475-489, 1973.

HUGHES, G. M.; ALBERS, C.; MUSTER, D.; GOETZ, K.H. Respiration of the carp, (*Cyprinus carpio* L.) at 10 and 20°C and the effects of hypoxia. **Journal of Fish Biology**, v.22, p. 613-628, 1983.

JAYATISSA, L.P.; SILVA, E.I.L.; McELHINEY, J.; LAWTON, L.A. Occurrence of toxigenic cyanobacterial blooms in freshwaters of Sri Lanka. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p. 156-164, 2006.

JOHANSEN, K.; LENFANT, C.; GRIGG, G. C. Respiratory control in lungfish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 20A, p. 835-854, 1967.

JONES, D.R. The effect of hypoxia and anemia on the swimming performance of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **J. Exp. Biol.** v. 55, p.541–551, 1971.

JOS, A.; REPETTO, G.; RÍOS, J.C.; DEL PESO, A.; SALGUERO, M.; HAZÉN, M.J.; MOLERO, M.L.; FERNANDEZ-FREIRE, P.; PÉREZ-MARTÍN, J.M.; LABRADOR, V.; CAMÉAN, A. Ecotoxicological evaluation of the additive butylated hydroxyanisole using a battery with six model systems and eighteen endpoints, **Aquatic Toxicology**, v.71. p. 183-192, 2005.

KALININ, A.L. **Função respiratória de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, em diferentes condições de O<sub>2</sub> ambiental: tomada de O<sub>2</sub> branquial e cutânea, medidas diretas e determinações indiretas dos parâmetros ventilatórios.** Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos naturais. Universidade Federal de São Carlos, 101p, 1996.

KALININ, A.L., **Respostas respiratórias de traíra, *Hoplias malabaricus* (BLOCH), em diferentes fases de crescimento às reduções do oxigênio dissolvido no ambiente. aspectos fisiológicos e adaptativos.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais. Universidade Federal de São Carlos, 177p, 1991.

KALININ, A.L.; GLASS, M.L.; RANTIN, F.T. A comparison of directly measured and estimated gill ventilation in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 122A, p. 207-211, 1999.

KALININ, A.L.; RANTIN, F.T.; FERNANDES, M.N.; GLASS, M.L. Ventilatory flow relative to intrabuccal and intraopercular volumes in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to normoxia and graded hypoxia. In **Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon** (Val, A. L., Almeida-Val, V. M. F. & Randall, D. J., eds), p. 191–202. Manaus: Editora do INPA, 1996.

KALININ, A. L.; RANTIN, F.T.; GLASS, M L. Dependence on body size of respiratory function in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae) during hypoxia. **Fish Physiol. Biochem.**, v. 12, p. 47-51, 1993.

KALININ, A.L.; SEVERI, W.; GUERRA, C. D. R.; COSTA, M.J.; RANTIN, F.T. Ventilatory flow relative to intrabuccal and intraopercular volumes in the serrasalmid fish *Piaractus mesopotamicus* during normoxia and exposed to graded hypoxia. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 60, n. 2, p. 249-254, 2000.

KATHARIOS, P.; GEORGUDAKI, J.I.; ZOUMBOS, K.K.; SPIROPOULOS, S. Toxicity of intraperitoneally injected ivermectin in sea bream, *Sparus aurata*. **Fish. Physiol. Biochem.** v. 25, p.99–108, 2002.

KONDO, F.; ITO, Y.; OKA, H.; YAMADA, S.; TSUJI, K.; IMOKAWA, M.; NIIMI, Y.; HARADA, K.I.; UENO, Y.; MIYAZAKI, Y. Determination of microcystins in lake water using reusable immunoaffinity column. **Toxicon**, v. 40, p. 893-899, 2002.

LILLEHEIL, G.; ANDERSEN, R.A.; SKULBERG, O.M.; ALEXANDER, J. Effects of a homoanatoxin- $\alpha$ -containing extract from *Oscillatoria Formosa* (Cyanophyceae/Cyanobacteria) on neuromuscular transmission. **Toxicon**, v. 35, p.1275-1289, 1997.

LINNAEUS, C. Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. **Holmiae Systema Nature**. ed. x, 824 p. 1758.

LOMHOLT, J.P.; JOHANSEN, K. Hypoxia acclimation in carp: how it affects oxygen uptake, ventilation and oxygen extraction from water. **Physiol. Zool.**, v. 52, p. 38-49, 1979.

LOVSHIN, L.L. Tilapia farming: a growing worldwide aquaculture industry. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 1, Piracicaba, 1997. **Anais...** Piracicaba: CBNA, p.137-164, 1997.

MACKINTOSH, C.; BEATTIE, K.A.; KLUMPP, S.; COHEN, P.; CODD, G.A. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. **FEBS Letters**, v. 264, p. 187-192, 1990.

MARICONDI-MASSARI, M. **Avaliação das respostas cardio-respiratórias de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (Schwartz, 1983), às variações da temperatura ambiental e recuperação subsequente.** Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, 87p, 1993.

MARVIN, D.E.; HEATH, A.G. Cardiac and respiratory responses to gradual hypoxia in three ecologically distinct species of freshwater fish. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 27A p. 349-355, 1968.

MATTIAS, A.T.; RANTIN, F.T.; FERNANDES, M.N. Gill respiratory parameters during progressive hypoxia in the facultative air-breathing fish, *Hypostomus regani* (Loricariidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 120A, p. 311-315, 1998.

MATTIAS, A.T.; MORON, S.E.; FERNANDES, M.N. Aquatic respiration during hypoxia of the facultative air-breathing *Hoplerythrinus unitaeniatus*. A comparison with the water-breathing *Hoplias malabaricus*. In: Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., Randall, D.J. (eds.). **Physiology and Biochemistry of the Fishes of The Amazon**. Manaus: INPA, p. 203-211, 1996.

MATUSHIMA, E. R.. **Sistema linfóide em peixes.** In: Santos, H.S.L. (ed.). *Histologia de peixes*. Jaboticabal: FCAV-Unesp, p. 44-45, 1995.

MEHRLE, P. M.; MAYER, F.L. Biochemistry/physiology. In: RAND, G. M; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and application**. New York: Hemisphere, p 264-274, 1984.

MILLER, S.A.; HARLEY, J.P. **Zoology**. McGraw-Hill Science/Engineering/Math; Fifth Edition, 540 p, 2002.

NISHIWAKI, R.; OHTA, T.; SUEOKA, E.; SUGAMUNA, M., K.; WATANABE, M. F.; FUJIKI, H. Two significant aspects of microcystin-LR: Specific binding and Liver Specificity. **Cancer Lett**, v. 83, p. 283-289, 1994.

OLLE, C.D. **Efeito do inseticida organofosforado metilparation (Folisuper 600BR®) sobre a função cardio-respiratória do peixe teleosteo matrinxã, *Brycon cephalus*.** Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, 130p, 2007.

OTT, M. E.; HEISLER, N.; ULTSCH, G. R. A re-evaluation of the relationship between temperature and the critical oxygen tension in freshwater fishes. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 27A, p. 349-355, 1980.

OZAKI. *Fish Blood and Circulation Physiology*. **Science and Technology Press**, Shanghai, 1982.

PARK, H.D.; WATANABE, M.F.; HARADA, K.I.; NAGAI, H.; SUZUKI, M.; WATANABE, M.; HAYASHI, H. Hepatotoxin (microcystin) and neurotoxin (anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters. **Natural Toxins**, v.1, p. 353-360, 1993.

PINTO, M.L.G. Espécies exóticas para a piscicultura: Tilápias. In: CASTAGNOLLI, N. & PINTO, M.L.G. **Piscicultura**. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, p. 49-52, 1988.

- PRIETO, A.I.; JOS, A.; PICHARDO, S.; MORENO, I.; DE SOTOMAYOR, M.A.; MOAYANO, R.; BLANCO, A.; CAMÉAN, A.M. Time-dependent protective efficacy of Trolox (vitamin E analog) against microcystin-induced toxicity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environ. Toxicol.**, v. 24, p. 563–579, 2009.
- PRIETO, A.I.; PICHARDO, S.; JÓŠ, A.; MORENO, I.; CAMEÁN, A.M. Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*). **Aquatic Toxicology**, v.77, p. 314–321, 2006.
- PRIETO, A.I.; PICHARDO, S.; JÓŠ, A.; MORENO, I.; CAMEÁN, A.M. Time-dependent oxidative stress responses after acute exposure to toxic cyanobacterial cells containing microcystins in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) under laboratory conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 84, p. 337-345, 2007.
- QUENTEL C.; OBACH, A. The cellular composition of the blood and haematopoietic organs of turbot *Scophthalmus maximus* L. **J. Fish Biol.**, v. 41. p. 709-716, 1992.
- RABERGH, C.M.I.; BYLUND, G.; ERIKSSON, J.E. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquatic Toxicology**. v. 20, p. 131-146, 1991.
- RABERGH, C.M., ZIEGLER, K., ISOMAA, B., LIPSKY, M.M., ERIKSSON, J.E., 1994. Uptake of taurocholic acid in isolated hepatocytes from rainbow trout. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 267. p. 380–386, 1994.
- RANTIN, F.T.; KALININ, A.L.; GLASS, M.L.; FERNANDES, M.N. Respiratory responses to hypoxia in relation to mode of life in two erythrinid species (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*). **J. Fish. Biol.**, v. 41, p. 805-812, 1992.
- RANTIN, F.T.; GLASS, M.L.; KALININ, A.L.; VERZOLA, R.M.M. Cardio-respiratory responses in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to graded environmental hypoxia. **Environmental Biology of Fishes**, v. 36, p. 93-97, 1993.
- RANTIN, F.T., GUERRA, C.D.R., KALININ, A.L., GLASS, M.L. The influence of aquatic surface respiration (ASR) on cardio-respiratory function of the serrasalmid fish *Piaractus mesopotamicus*. **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 119, pp. 991-997, 1998.
- RANTIN, F.T., KALININ, A.L. Cardiorespiratory function and aquatic surface respiration in *Colossoma macropomum* exposed to graded and acute hypoxia. In: Val, A.L., Randall, D.J., MacKinley, D. (eds.). **The Physiology Of Tropical Symposium Proceedings. International Congress On The Biology Of Fishes. Am. Fisheries Society – Physiology Section**. San Francisco State University, 141p, 1996.
- REYNOLDS, C.S. 1984. **The ecology of freshwater phytoplankton**. Cambridge Univ. Press, 367 p, 1984.
- SATCHELL, G.H. **Physiology and form of fish circulation**. Cambridge, Great Britain, Cambridge University Press, 235p. 1981.
- SAUNDERS, R.L. The irrigation of the gills of fishes. II. Efficiency of oxygen uptake in relation to respiratory flow, activity and concentrations of oxygen and carbon dioxide. **Canadian Journal of Zoology**. v. 40, p. 817-62, 1962.
- SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management** (Chorus I, Bartam J, eds.). E & FN Spon, London, New York, p. 55-124, 1999.

SKULBERG, O.M.; CARMICHAEL, W.W.; CODD, G.A.; SKULBERG, R. Taxonomy of toxic Cyanophyceae (cyanobacteria). In: FALCONER, I.R. **Algal toxins in sea food and drinking water**. London: Academic Press, p. 145-164, 1993.

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

SOCCOL, M.C.H. **Otimização da vida útil da tilápia cultivada (*Oreochromis niloticus*), minimamente processada e armazenada sob refrigeração**. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 124p., 2002.

SOLOMON, H.M.; WEIS, J.S. Abnormal circulatory development in medaka caused by the insecticides carbaryl, malathion, and parathion. **Teratology**, v. 19, p. 51-62, 1979.

STEFFENSEN, J.F. Oxygen consumption of fish exposed to hypoxia: Are they all oxyregulators or are any oxyconformers? **Fish Physiology, Toxicology, and Water Quality**. U.S. Environmental Protection Agency. Proceedings of the Ninth International Symposium, Capri, Italy, p. 239-250, 2006.

STEFFENSEN, J. F.; LOMHOLT, J. P.; JOHANSEN, K. Gill ventilation and O<sub>2</sub> extraction during graded hypoxia in two ecologically distinct species of flatfish, the flounder (*Platichthys flesus*) and the plaice (*Pleuronectes platessa*). **Env. Biol. Fish.** v. 7. p. 157-163, 1982.

STOSS, F.W., HAINES, T.A., The effects of toluene on embryos and fry of the Japanese medaka *Oryzias latipes* with a proposal for rapid determination of maximum acceptable toxicant concentration. **Environ. Pollut.**, v. 13, p. 139-148, 1979.

TEUSCHLER, L.K.; GENNINGS, C.; HARTLEY, W.R.; CARTER, H., THIYAGARAJAH, A.; SCHOENY, R.; CUBBISON, C. The interaction effects of binary mixtures of benzene and toluene on the developing heart of medaka (*Oryzias latipes*). **Chemosphere**, v. 58, p. 1283-1291, 2005.

THEISS, W.C.; CARMICHAEL, W.W.; WYAMAN, J.; BRUNER, R. Blood pressure and hepatocellular effects of the cyclic heptapeptide toxin produced by the freshwater cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa* strain PCC-7820. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 603-613, 1988.

THOMAZ, J.M. **Efeito do organofosforado triclorfon (Neguvon®) sobre a função cardio-respiratória da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal de São Carlos, 116p, 2008.

TOIVOLA, D.M.; ERIKSSON, J.E. Toxins affecting cell signaling and alteration of cytoskeletal structure. **Toxicology in Vitro**, v. 13, p. 521-530, 1999.

TREWAVAS, E. Tilapias: Taxonomy and speciation. In: THE BIOLOGY AND CULTURE OF TILAPIAS, 7, **Proceedings**. Philippines: RSV Pullim, 1983.p. 1-432, 1982.

VAN APELDOORN, M.E.; VAN EGMOND, H.P.; SPEIJERS, G.J.; BAKKER, G.J. Toxins of cyanobacteria. **Mol. Nutr. Food Res.** v. 51, p. 7-60, 2007.

VAN MONTFOORT, J.E.; HAGENBUCH, B.; GROOTHUIS, G.M.; KOEPESELL, H.; MEIER, P.J.; MEIJER, D.K. Drug uptake systems in liver and kidney. **Current drug metabolism**. v. 4, p 185-211, 2003.

VILLALOBOS, S.A.; HAMM, J.T.; TEH, S.J.; HINTON, D.E. Thiobencarb-induced embryotoxicity in medaka (*Oryzias latipes*): stage-specific toxicity and the protective role of chorion. **Aquatic Toxicol.**, v. 48, p. 309-326, 2000.

WEIS, P.; WEIS, J.S. Cardiac malformations and other effects due to insecticides in embryos of the killifish, *Fundulus heteroclitus*. **Teratology**, v. 10, p. 263-268, 1974.

YOO, R.S.; CARMICHAEL, W.W.; HOEHN, R.C.; HRUDEY, S.E. **Cyanobacterial (blue-green algal) toxins a resource guide # 925**. Denver: AWWA Research Foundation and American Water Works Association, 1995.

ZHANG, X.; XIE, P.; LI, D.; SHI, Z. Hematological and plasma biochemical responses of crucian carp (*Carassius auratus*) to intraperitoneal injection of extracted microcystins with the possible mechanisms of anemia. **Toxicol.**, v.49. p. 1150-1157, 2007.

ZHANG, H.; ZHANG, J.; CHEN, Y.; ZHU, Y. Microcystin-RR induces apoptosis in fish lymphocytes by generating reactive oxygen species and causing mitochondrial damage. **Fish Physiol. Biochem.** v. 34, p. 307–312, 2008.