

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

**Efeitos do extrato bruto da cianobactéria *Radiocystis fernandoi* no teleósteo,  
*Hoplias malabaricus*.**

Marcelo Gustavo Paulino

**São Carlos**

**2015**

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

**Efeitos do extrato bruto da cianobactéria *Radiocystis fernandoi* no teleósteo,  
*Hoplias malabaricus*.**

Marcelo Gustavo Paulino

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

**São Carlos**  
**2015**

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

P328eb Paulino, Marcelo Gustavo.  
Efeitos do extrato bruto da cianobactéria *Radiocystis fernandoi* no teleósteo, *Hoplias malabaricus* / Marcelo Gustavo Paulino. -- São Carlos : UFSCar, 2015.  
141 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Peixe - fisiologia. 2. Microcistina. 3. Marcadores biológicos. 4. Bioacumulação. 5. Danos hepáticos. 6. Cianobactéria. I. Título.

CDD: 597.01 (20<sup>a</sup>)

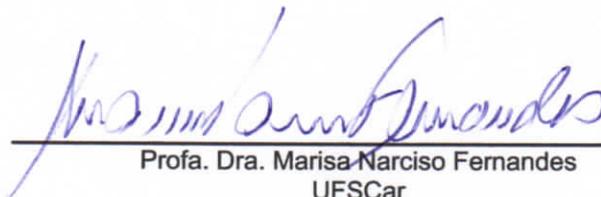


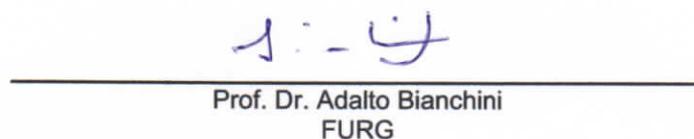
---

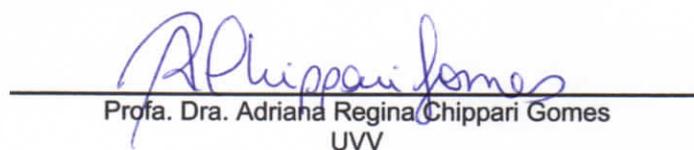
**Folha de Aprovação**

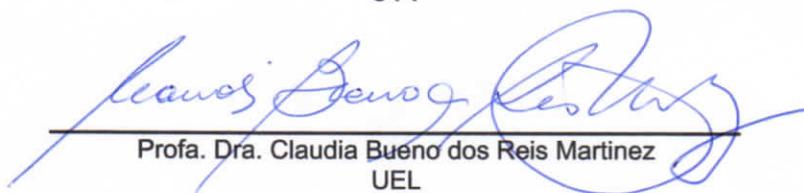
---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Marcelo Gustavo Paulino, realizada em 29/05/2015:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes  
UFSCar

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Adalto Bianchini  
FURG

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Adriana Regina Chippari Gomes  
UUV

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez  
UEL

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Odete Rocha  
UFSCar

*“Uma pessoa se torna um cientista não para salvar o mundo, enriquecer ou ficar famosa: acima de tudo, a motivação é simplesmente saciar uma curiosidade infinita. Ser cientista é fazer e responder perguntas.”*

*Marco A.R. Mello*

***Dedico:***

Aos meus pais:

José Carlos e Cidinha

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo agradeço a Deus, por manter minha fé, pelo dom da capacidade, perseverança e vida!

À minha família, o alicerce da minha vida. Meus ídolos e heróis. Agradeço infinitamente a compreensão, apoio, incentivo e a positividade em todos os momentos.

À Dra. Marisa Narciso Fernandes, por toda a jornada. Sem dúvida um exemplo de profissional a qual tenho orgulho de fazer parte da sua equipe. Obrigado!

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela oportunidade, bolsa e apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Ao Instituto Nacional de Pesquisa de Ciência e Tecnologia em Toxicologia Aquática (INCT-TA) e a Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa (FUNDEP) pela parceria e apoio financeiro a realização desse trabalho.

À banca examinadora: Dr. Adalberto Bianchini, Dra. Claudia B. R. Martinez, Dra. Odete Rocha e a Dra. Adriana Chippari Gomes.

À Dra. Alessandra Giani, da Universidade Federal de Minas Gerais e toda sua equipe; juntamente com o pessoal da CEMIG na colaboração e elaboração do projeto em sua realização.

À Dra. Ana Paula Terezan e ao Dr. João Batista Fernandes pela amizade e colaboração no desenvolvimento da parte química do trabalho.

À Dra. Marise Margareth Sakuragui e Ms. Naiara E. S. Souza pela amizade e espírito de equipe. Agradeço de coração fazer parte desse time. Sem dúvida são pessoas muito importantes para mim.

Um agradecimento especial vai para a bióloga e amiga, Driele Tavares. Sem dúvida a maior colaboradora nesse trabalho. Por tudo que passamos juntos até aqui e claro pela dedicação em tempo integral na minha vida. Pessoas como você, levamos no coração para o resto da vida. Obrigado por tudo!

Ao Dr. Gilberto Moraes e toda sua equipe que me recebeu no laboratório por mais de um ano com os braços abertos, paciência e fé na minha capacidade. Em

especial a Dra. Francine P. Venturini e Ms. Priscila A. Rossi, por todo trabalho que fizemos juntos e principalmente pela amizade que levarei pra sempre.

À Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez e toda sua equipe pela utilização do laboratório, orientação e amizade não só agora no período de doutorado, como desde meu início na jornada científica.

Aos doutores Francisco Tadeu Rantin e Ana Lúcia Kalinin e sua equipe por toda ajuda que necessitei, em especial a Dra. Diana Amaral Monteiro.

Ao Dr. Carlos Marcelo Luquet e a Dra. Flavia Bieczynski, do Laboratório de Ecotoxicología Acuática (LEA), no Centro de Ecología Aplicada Del Neuquén (CEAN), pelo Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medio Ambiente (CONICET - INIBIOMA), na Argentina; pela oportunidade de estágio e experiência em técnicas importantes ao projeto, assim como por tudo que aprendi referente à toxicologia de microcistinas.

À Priscila G. Pedrão por toda ajuda, dedicação e por confiar em mim como profissional ao orientar seu trabalho de conclusão de curso na sua formação.

A todos os amigos do laboratório de zoofisiologia e bioquímica comparativa (LZBC): Jakeline, Laís, Neda, Iara, Mariana, Marina, Greyce Kelly, Natália, Pri Siqueira, Pamela, Vivian, Rafael Z, Thiago, Nathan e demais amigos do departamento.

Aos amigos feitos na Pós durante as disciplinas.

Aos Funcionários do LZBC: 'Dona' Vera, Carmem, 'Dona' Graça, 'Seu' Ângelo, e Alexandre pela ajuda durante todo esse tempo.

Ao "Piau" e 'Seu' Toninho com toda ajuda com os peixes durante o período.

Ao Departamento de Engenharia de Materiais - DEMa (UFSCar) pela utilização do microscópio eletrônico de varredura.

Novamente, assim como no mestrado, agradeço imensamente aos grandes amigos, externos à Universidade, que sempre acreditaram, incentivaram e me apoiaram. Em especial: Tia Rose, Juliana Sé, Mazinha Bianchi, José Augusto, Priscila (minha irmã), Rica Palomino e "Caê" Lima. Obrigado por ouvirem mesmo sem entender nada do que eu dizia sobr meu trabalho (a cara de vocês me convencia, viu?). Ao menos agora vocês sabem o que é uma traíra!!

Agradeço de coração ao Eduardo Brasil Sousa, pelo companheirismo. Sem dúvida a pessoa mais importante a me manter focado, por ouvir e me

acompanhar sempre com um sorriso no rosto e um “vai dar tudo certo” nos olhos: Tudo a nosso favor!

A todos que de alguma forma, estiveram presente ao meu lado e contribuíram para a realização deste trabalho ou mesmos aos que passaram pela minha vida deixando algum sorriso e um sinal de positivo.

A todos, novamente, meu muito obrigado!

*“A teimosia transforma as grandes barreiras em pequenos obstáculos e constrói os grandes vencedores.”*

*Albertino Fernandes*

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução</b> .....	1
1.1 Eutrofização do ambiente aquático dulcícola.....	1
1.2 Cianobactérias.....	2
1.3 Microcistinas.....	4
1.3.1 Mecanismo de ação das microcistinas.....	7
1.3.2 Efeitos deletérios da presença de microcistinas em peixes.....	9
1.3.3 Microcistinas e saúde humana.....	11
1.4 O uso de biomarcadores em estudos ecotoxicológicos.....	12
1.5 A espécie <i>Hoplias malabaricus</i> (Bloch, 1974).....	15
1.6 Justificativa.....	16
<b>2 Objetivos</b> .....	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
<b>3 Materiais e Métodos</b> .....	19
3.1 Extração, identificação e quantificação de microcistinas.....	19
3.2 Peixes e delineamento experimental.....	20
3.3 Extração, <i>clean-up</i> e quantificação de microcistinas no fígado e músculo branco para as variantes MC-RR e MC-YR.....	22
3.4 Biomarcador genético.....	24
3.4.1 Ensaio do cometa.....	24
3.5 Biomarcadores fisiológicos.....	25
3.5.1 Biometria e índice hepato-somático.....	25
3.5.2 Parâmetros hematológicos.....	25
3.5.2.1 Hematócrito.....	25
3.5.2.2 Número total de eritrócitos.....	25
3.5.2.3 Hemoglobina total.....	26
3.5.2.4 Índices hematimétricos.....	26
3.5.2.5 Bilirrubina plasmática.....	26
3.6 Biomarcadores bioquímicos.....	26

3.6.1	Proteína total .....	27
3.6.2	Atividade das fosfatases e transaminases.....	27
3.6.2.1	Atividade específica da fosfatase de serina/treonina (PP1).....	27
3.6.2.2	Atividade específica da fosfatase de serina/treonina (PP2A) .....	27
3.6.2.3	Determinação das fosfatases alcalinas e fosfatases ácidas.....	28
3.6.2.4	Atividade das transaminases de alanina e aspartato .....	28
3.6.3	Metabólicos intermediários .....	29
3.6.3.1	Amônia .....	29
3.6.3.2	Lactato.....	29
3.6.3.3	Piruvato .....	29
3.6.3.4	Glicose.....	30
3.6.3.5	Aminoácidos livres.....	30
3.6.3.6	Glicogênio.....	30
3.6.4	Biomarcadores do estresse oxidativo (enzimático e não-enzimático) .	31
3.6.4.1	Etoxiresorufina-O-desetilase .....	31
3.6.4.2	Superóxido dismutase .....	31
3.6.4.3	Catalase .....	32
3.6.4.4	Glutaciona peroxidase.....	32
3.6.4.5	Glutaciona S-transferase.....	32
3.6.4.6	Glutaciona redutase .....	32
3.6.4.7	Glutaciona .....	33
3.6.4.8	Proteínas carboniladas .....	33
3.6.4.9	Peroxidação lipídica das membranas .....	34
3.7	Biomarcadores morfológicos .....	34
3.7.1	Análises da histomorfologia hepato-biliar e histopatologia de fígado ..	35
3.7.2	Histoquímica para glicogênio.....	36
3.7.3	Análise ultraestrutural de hepatócitos.....	36
3.7.4	Imunomarcção nuclear para antígeno de proliferação celular .....	37
3.8	Análises estatísticas .....	38
<b>4</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>39</b>
4.1	Microcistinas presentes no extrato bruto .....	39
4.2	Exposição aguda .....	40

4.2.1	Acumulação de microcistinas nos tecidos .....	40
4.2.2	Comprometimento morfofuncional hepático .....	43
4.2.3	Alterações metabólicas e parâmetros hematológicos.....	54
4.2.4	Desintoxicação de microcistinas e estresse oxidativo .....	60
4.2.5	Proliferação celular hepática.....	63
4.3	Exposição crônica.....	67
4.3.1	Acumulação de microcistinas nos tecidos .....	67
4.3.2	Comprometimento morfofuncional hepático .....	68
4.3.3	Alterações metabólicas e parâmetros hematológicos.....	79
4.3.4	Desintoxicação de microcistinas e estresse oxidativo .....	82
4.3.5	Proliferação celular hepática.....	85
<b>5</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>106</b>
<b>7</b>	<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>108</b>
<b>8</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>137</b>

## Lista de Figuras

**Figura 1.** Floração de cianobactérias na represa de Salto Grande (Americana, SP) em abril de 2014, decorrente de processo de eutrofização em água de recreação e geração de energia. Fonte: ([www.folha.uol.com.br/cotidiano/2014](http://www.folha.uol.com.br/cotidiano/2014)).

**Figura 2.** Aspecto geral da colônia de *Radiocystis fernandoi* evidenciando as células em alinhamento radial. Escala = 50  $\mu\text{m}$ . (Fonseca et.al., 2011)

**Figura 3.** Estrutura química das microcistinas. Adaptado de Luca et al., 2010.

**Figura 4.** Representação esquemática do mecanismo molecular da toxicidade de microcistinas (MC). Após entrar na célula pelo sistema de transportadores orgânicos iônicos (OATs), MCs se liga especificamente com as proteínas fosfatases de serina/treonina (PP1 e PP2A), inibindo-as e levando a uma cascata de eventos responsáveis pelos efeitos citotóxicos e genotóxicos em células animais. Adaptado de Valério et al. (2010).

**Figura 5.** Representação esquemática da estrutura do fígado. Fígado normal (A) e após a ação da microcistina (B). As setas brancas indicam acúmulo de sangue entre os sinusoidais em B. Adaptado de Carmichael (1994).

**Figura 6.** Exemplar de *Hoplias malabaricus*, traíra. (Foto: Marcelo G. Paulino).

**Figura 7.** Representação do cromatograma de MRM das variantes de MC-RR e MC-YR nos tempos de retenção de 24,3 minutos e 30,5 minutos, respectivamente.

**Figura 8.** Cromatograma de identificação de microcistinas no extrato da cianobactéria *Radiocystis fernandoi* (cepa R28). Linha vermelha – Mistura padrão de MC-RR, MC-YR e MC-LR. Linha preta – branco da coluna (solvente). Linha azul – Extração 1 (E1) e linha verde – Extração 2 (E2). Setas indicam presença de outras variantes no extrato bruto.  $\lambda = 240 \text{ nm}$ .

**Figura 9.** Cromatogramas do experimento de monitoramento de reações múltiplas (MRM) do fígado de *Hoplias malabaricus* 12h e 96h após injeção intraperitoneal com microcistina presente no extrato bruto de *Radiocystis fernandoi*. (A) grupo controle 12h; (B) grupo MC 12h.; (C) Grupo controle 96 horas e (D) Grupo MC 96h. As setas indicam ausência de MC nos tempos de retenção para as variantes MC-RR (24,3 min) e MC-YR (30,5 min) nos grupos controles. cps = contagem por segundo.

**Figura 10.** Cromatogramas do experimento de monitoramento de reações múltiplas (MRM) do músculo branco de *Hoplias malabaricus* 12h e 96h após injeção intraperitoneal com microcistina presente no extrato bruto de *Radiocystis fernandoi*. (A) grupo controle 12h; (B) grupo MC 12h; (C) Grupo controle 96 horas e (D) Grupo MC 96h. As setas indicam ausência de MC nos tempos de retenção

para as variantes MC-RR (24,3 min) e MC-YR (30,5 min) nos grupos controles. cps = contagem por segundo.

**Figura 11.** Fígado de *Hoplias malabaricus*. (A) Aspecto macroscópico do fígado de peixes dos grupos controles; (B e C) Aspecto do fígado dos peixes dos grupos expostos após 12h e 96h ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (\*) destaca a coloração amarelada do fígado (B) e setas indicam áreas avermelhadas sugerindo áreas hemorrágicas (em C).

**Figura 12.** Atividade (média  $\pm$  E.P.M.) das proteínas fosfatases de serina/treonina em fígado de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Atividade da fosfatase PP1 e (B) da fosfatase PP2A.

**Figura 13.** Atividade plasmática (média  $\pm$  E.P.M.) das proteínas fosfatases no plasma de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Fosfatases ácidas e (B) Fosfatases alcalinas. (\*) Indica diferença ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle; (#) indica diferença ( $p < 0,05$ ) entre os períodos de exposição.

**Figura 14.** Arquitetura hepática de *Hoplias malabaricus* do grupo controle. Setas indicam hepatócitos com formatos poligonais e núcleos esféricos com presença de nucléolos. V = Vasos sanguíneos. Coloração: Azul de toluidina e fucsina básica. Escala = 20  $\mu$ m.

**Figura 15.** Arquitetura hepática e histomorfologia hepato-biliar de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Aspecto normal do fígado de peixes dos grupos controle; (B) Seta pontiaguda indica alteração na morfologia do hepatócito e seta redonda mostra hiperemia nos sinusóides em peixes expostos às MC. (C) morfologia dos ductos biliares de peixes dos grupos controle e (D) morfologia dos ductos biliares dos peixes expostos às MC; asteriscos indicam hepatócitos com normal morfologia; seta indica arredondamento na morfologia do hepatócito. RAH – Ramo Artéria Hepática; VPH – Veia Portal Hepática; DB – Ductos Biliares; S – Sinusóides. Coloração: azul de toluidina e fucsina básica. Escala 20  $\mu$ m.

**Figura 16.** Alterações histopatológicas do fígado de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Setas indicam alterações nucleares e asterisco indica alteração na morfologia celular; (B) Setas pontiagudas mostram degeneração citoplasmática e a seta redonda, hipertrofia do hepatócito. Em (C) setas indicam inclusões citoplasmáticas; (D) seta aponta regiões com hiperemia nos sinusóides. S = sinusóides. Coloração: azul de toluidina e fucsina básica. Escala = 20  $\mu$ m.

**Figura 17.** Micrografia eletrônica de fígado de *Hoplias malabaricus* do grupo controle da exposição aguda. (A e B) Hepatócitos com morfologia normal; presença de grande estoque de glicogênio e lipídeos; (C) organelas intracelulares organizadas na região perinuclear e (D) núcleo com presença de nucléolo e pouca heterocromatina. Setas tracejadas indicam a junção entre hepatócitos e

seta contínua, os lisossomos. Seta de cabeça redonda mostra os poros da membrana nuclear. H = hepatócitos; N = núcleo; Li = lipídeos; Gli = glicogênio; n = núcleo de células epiteliais; mi = mitocôndrias; RER = retículo endoplasmático rugoso; nu = nucléolo.

**Figura 18.** Micrografia eletrônica de alterações intracelulares em fígado de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A a D) Hepatócitos arredondados e dissociados com aumento do espaço extracelular e sinusóides. Asterisco indica núcleos hipertrofiados e setas contínuas alterações nucleares como degeneração e granulação do nucléolo. As setas tracejadas mostram inclusões eletro-densas no citoplasma e seta de cabeça redonda, evidencia perda da estrutura celular com rompimento da membrana plasmática. H = hepatócitos; N = núcleo; Li = lipídeos; Gli = glicogênio; n = núcleo de células epiteliais; Si = sinusóide; CG = complexo de Golgi; nu = nucléolo.

**Figura 20.** Micrografia eletrônica de alterações intracelulares em fígado de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Hipertrofia de mitocôndrias e perda visível das cristas; (B) desorganização das organelas citoplasmáticas e núcleo periférico; (C) Degeneração celular, rompimento da membrana (seta redonda) e (D) degeneração nuclear. As setas pontiagudas indicam alteração do RER e setas tracejadas evidenciam dilatação e alteração na disposição de mitocôndrias e do complexo de Golgi. N = núcleo; mi = mitocôndrias; RER = retículo endoplasmático rugoso; n.ce = núcleo de células endoteliais; CG = complexo de Golgi; e = eritrócito.

**Figura 20.** Micrografia eletrônica de alterações intracelulares em fígado de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Hipertrofia de mitocôndrias e perda visível das cristas; (B) desorganização das organelas citoplasmáticas e núcleo periférico; (C) Degeneração celular, rompimento da membrana (seta redonda) e (D) degeneração nuclear. As setas pontiagudas indicam alteração do RER e setas tracejadas evidenciam dilatação e alteração na disposição de mitocôndrias e do complexo de Golgi. N = núcleo; mi = mitocôndrias; RER = retículo endoplasmático rugoso; n.ce = núcleo de células endoteliais; CG = complexo de Golgi; e = eritrócito

**Figura 21.** Histoquímica PAS-positivo para glicogênio hepático de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A e B) grupos controles (12 horas e 96 horas, respectivamente); setas indicam o glicogênio no hepatócito. (C) grupo microcistina após 12 horas e (D) grupo microcistina após 96 horas da i.p; setas indicam a degradação parcial ou total do glicogênio no hepatócito. (E e F) grupo controle e grupo microcistina score PAS-positivo (12 horas e 96 horas, respectivamente). (\*) mostra a diferença ( $p < 0.05$ ) entre do grupo microcistina em relação ao respectivo controle. VPH = veia portal hepática; DB = ducto biliar. Escala = 20  $\mu$ m.

**Figura 22.** Danos hepáticos médios ( $\pm$  E.P.M.). (A) Lipoperoxidação níveis equivalentes à malondialdeído (MDA) em fígado e (B) níveis de proteínas carboniladas em fígado de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. C = grupo controle; MC = grupo microcistina.

**Figura 23.** Ensaio cometa em células do fígado de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Grupo controle 12 e 96h; (B) grupo expostos às MCs por 12h. (C) Grupo expostos por 96 horas. Setas indicam os danos no DNA evidenciados pela cauda do cometa. Coloração: Brometo de etídeo. Aumento 400x.

**Figura 24.** Escore médio ( $\pm$  E.P.M.) do ensaio cometa no fígado de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. C = grupo controle e MC = grupo microcistinas.

**Figura 25.** Porcentagem de núcleos PCNA-positivos em hepatócitos de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

**Figura 26.** Núcleos PCNA-positivos em hepatócitos de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Grupo Controle e (B) grupo microcistina. Setas pontiagudas indicam núcleos de hepatócitos PCNA-positivo; seta redonda indica núcleo PCNA-positivo para outros grupos celulares. Asterisco mostra hepatócitos sem marcação. S = sinusóides. Escala = 20  $\mu$ m.

**Figura 27.** Núcleos PCNA-positivos em hepatócitos de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Grupo Controle e (B) grupo microcistina. Setas pontiagudas indicam núcleos de hepatócitos PCNA-positivo; seta redonda indica núcleo PCNA-positivo para outros grupos celulares. Asterisco mostra hepatócitos sem marcação. S = sinusóides. Escala = 20  $\mu$ m.

**Figura 28.** Cromatogramas do experimento de monitoramento de reações múltiplas (MRM) do fígado e músculo de *Hoplias malabaricus* 30 dias após injeção intraperitoneal com microcistina presente no extrato bruto de *Radiocystis fernandoi*. (A) Fígado do grupo controle; (B) Fígado do grupo MC. Em (C) Músculo do grupo controle e (D) Músculo do grupo MC. As setas indicam ausência de MC no tempo de retenção para as variantes MC-RR (24,3 min) e MC-YR (30,5 min). cps = contagem por segundo.

**Figura 29.** Valores médios ( $\pm$  D.P.) da concentração de microcistinas MC-RR e MC-YR acumuladas no fígado de *Hoplias malabaricus* 30 dias após injeção intraperitoneal com microcistina presente no extrato bruto de *Radiocystis fernandoi*. (n=3 pools).

**Figura 30.** Fígado de *Hoplias malabaricus* 30 dias após injeção intraperitoneal com o extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas (A) Aspecto

macroscópico do fígado de peixes do grupo controle; (B) Aspecto do fígado dos peixes do grupo injetado com extrato bruto. Seta indica área avermelhada e salientada no tecido hepático.

**Figura 31.** Atividade plasmática (média  $\pm$  E.P.M.) das proteínas fosfatases no plasma de *Hoplias malabaricus* após 30 dias de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Atividade da fosfatase PP1 e (B) da fosfatase PP2A. (\*) Indica diferença ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle.

**Figura 32.** Atividade plasmática (média  $\pm$  E.P.M.) das proteínas fosfatases de *Hoplias malabaricus* após 30 dias de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Fosfatases ácidas e (B) Fosfatases alcalinas.

**Figura 33.** Arquitetura hepática de *Hoplias malabaricus* do grupo controle. Seta indica núcleo esférico e nucléolos evidentes. Os asteriscos indicam estrutura poligonal dos hepatócitos. S = sinusóides. Coloração: Azul de toluidina e fucsina básica. Escala = 20  $\mu$ m.

**Figura 34.** Arquitetura hepática e histomorfologia hepato-biliar de *Hoplias malabaricus* após 30 dias de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Aspecto normal do fígado de peixes do grupo controle; (B) Alteração do parênquema hepático dos peixes expostos às MC. (C) morfologia dos ductos biliares de peixes do grupo controle e (D) morfologia dos ductos biliares dos peixes expostos às MC. Asteriscos indicam hepatócitos com normal morfologia; setas indicam arredondamento na morfologia do hepatócito. DB = Ductos Biliares; S = Sinusóides. Coloração: Azul de toluidina e fucsina básica. Escala 20  $\mu$ m.

**Figura 35.** Alterações histopatológicas do fígado de *Hoplias malabaricus* após 30 dias de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Seta indica tecido fibroso no tecido hepático e asterisco apontam os hepatócitos; (B) setas contínuas indicam alterações nucleares e seta redonda alteração na morfologia do hepatócito. (C) hiperemia indicada pelas setas e (D) estrelas indicam centro de melano-macrófagos. Coloração: (A) Tricromio de Masson e (B-C-D) Azul de toluidina e fucsina básica. Escala = 20  $\mu$ m.

**Figura 36.** Micrografia eletrônica de fígado de *Hoplias malabaricus* do grupo controle da exposição crônica. (A) Hepatócitos com morfologia normal; seta contínua indica a junção entre as células e setas tracejadas mostram o espaço de Disse. (B) Disposição perinuclear das organelas intracelulares; seta indica presença de lisossomo. (D) seta indica a membrana celular do hepatócito em contato com células endoteliais e (D) mitocôndria e complexo de Golgi. H = hepatócitos; N = núcleo; ce = células epiteliais; mi = mitocôndrias; RER = retículo endoplasmático rugoso; nu = nucléolo; CG = complexo de Golgi.

**Figura 37.** Micrografia eletrônica de alterações intracelulares em fígado de *Hoplias malabaricus* após 30 dias de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis*

*fernandoi* contendo microcistinas. (A a F) Ausência de delimitação celular visível e desorganização intracelular. Note a fragmentação e posição espiral do RER com hipertrofia de mitocôndrias. Setas contínuas mostram células de Kupffer; setas tracejadas células endoteliais e setas redondas miofibroblastos. H = hepatócitos; N = núcleo; mi = mitocôndrias; RER = retículo endoplasmático rugoso; nu = nucléolo.

**Figura 38.** Histoquímica PAS-positivo para glicogênio hepático de *Hoplias malabaricus* após 30 dias de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Grupo controle; setas indicam PAS-positivo no hepatócito. (B) Grupo microcistina PAS-positivo; (C) Score para o glicogênio PAS-positivo. (\*) mostra a diferença ( $p < 0.05$ ) entre do grupo microcistina em relação ao respectivo controle. DB = ducto biliar. Escala = 20  $\mu\text{m}$ .

**Figura 39.** Valores médios ( $\pm$  E.P.M.) de danos hepáticos. (A) Lipoperoxidação do fígado em níveis equivalentes à malondialdeído (MDA) e (B) níveis de proteínas carboniladas em fígado de *Hoplias malabaricus* após 30 dias de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. C = grupos controle; MC = grupos microcistinas. (\*) Indica diferença ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle.

**Figura 40.** Ensaio cometa em células do fígado de *Hoplias malabaricus* após 30 dias de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Grupo controle e (B) grupo exposto às MC. Setas indicam os danos no DNA evidenciados pela cauda do cometa. Coloração: Brometo de etídeo. Aumento 400x.

**Figura 41.** Escore médio ( $\pm$  E.P.M.) do ensaio cometa em fígado de *Hoplias malabaricus* após 30 dias de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. C = grupo controle e MC = microcistinas. (\*) Indica diferença ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle.

**Figura 42.** Porcentagem de núcleos PCNA-positivos em hepatócitos de *Hoplias malabaricus* após 30 dias de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

**Figura 43.** Núcleos PCNA-positivos em hepatócitos de *Hoplias malabaricus* após 30 dias de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Grupo Controle e (B) grupo microcistina. Setas pontiagudas indicam núcleos de hepatócitos PCNA-positivo; seta redonda indica núcleo PCNA-positivo para outros grupos celulares. Asterisco mostram hepatócitos sem marcação. S = sinusóides; M = Centros de melano-macrófagos. Escala = 20  $\mu\text{m}$ .

## Lista de Tabelas

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

**Tabela 2.** Alterações histopatológicas em fígado e fator de importância em relação ao órgão e organismo, de acordo com Bernet et al. (1999).

**Tabela 3.** Quantificação de microcistinas presentes no extrato bruto de *Radiocystis fernandoi*, cepa R28.

**Tabela 4.** Média ( $\pm$  D.P.) de microcistinas acumuladas no fígado e músculo de *Hoplias malabaricus* 12h (C12 e MC12) e 96h (C96 e MC96) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

**Tabela 5.** Valores ( $\pm$  E.P.M.) dos parâmetros plasmáticos de hepatotoxicidade de *Hoplias malabaricus* 12h (C12 e MC12) e 96h (C96 e MC96) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. ALT – Alanina Aminotransferase; AST – Aspartato Aminotransferase; BD – Bilirrubina Direta; BT – Bilirrubina Total.

**Tabela 6.** Índice de lesão ( $IL_{org}$ ) histopatológica média no fígado de *Hoplias malabaricus* 12h (C12 e MC12) e 96h (C96 e MC96) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

**Tabela 7.** Valores médios ( $\pm$  E.P.M.) dos parâmetros biométricos e índice hepato-somático (IHS) de *Hoplias malabaricus* 12h (C12 e MC12) e 96h (C96 e MC96) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

**Tabela 8.** Valores médios ( $\pm$  E.P.M.) dos parâmetros metabólicos do fígado de *Hoplias malabaricus* 12h (C12 e MC12) e 96h (C96 e MC96) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

**Tabela 9.** Valores médios ( $\pm$  E.P.M.) dos parâmetros metabólicos do músculo branco de *Hoplias malabaricus* 12h (C12 e MC12) e 96h (C96 e MC96) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

**Tabela 10.** Valores médios ( $\pm$  E.P.M.) dos parâmetros metabólicos do plasma de *Hoplias malabaricus* 12h (C12 e MC12) e 96h (C96 e MC96) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

**Tabela 11.** Valores médios ( $\pm$  E.P.M.) dos parâmetros hematológicos de *Hoplias malabaricus* 12h (C12 e MC12) e 96h (C96 e MC96) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

**Tabela 12.** Parâmetros de biotransformação e sistemas antioxidantes (Média  $\pm$  E.P.M.) em fígado de *Hoplias malabaricus* 12h (C12 e MC12) e 96h (C96 e MC96) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

**Tabela 13.** Valores médios ( $\pm$  E.P.M.) dos parâmetros plasmáticos de hepatotoxicidade de *Hoplias malabaricus* 30 dias (C30 e MC30) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. ALT – Alanina Aminotransferase; AST – Aspartato Aminotransferase; BD – Bilirrubina Direta; BT – Bilirrubina Total

**Tabela 14.** Índice de lesão ( $IL_{org}$ ) histopatológica média no fígado de *Hoplias malabaricus* 30 dias (C30 e MC30) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

**Tabela 15.** Valores médios ( $\pm$  E.P.M.) dos parâmetros biométricos e índice hepato-somático (IHS) de *Hoplias malabaricus* 30 dias (C30 e MC30) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

**Tabela 16.** Valores médios ( $\pm$  E.P.M.) dos parâmetros metabólicos do fígado, músculo branco e plasma de *Hoplias malabaricus* 30 dias (C30 e MC30) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

**Tabela 17.** Valores médios ( $\pm$  E.P.M.) dos parâmetros hematológicos de *Hoplias malabaricus* 30 dias (C30 e MC30) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

**Tabela 18.** Parâmetros de biotransformação e sistemas antioxidantes (média  $\pm$  E.P.M.) em fígado de *Hoplias malabaricus* 30 dias (C30 e MC30) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

## Símbolos e Abreviaturas

MCs = Microcistinas

Mdha = N-metildehidroalanina

ADDA = (-S, -E)-3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid

OATPs = Polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos

PP1 = Proteína fosfatase de serina/treonina do tipo 1

PP2A = Proteína fosfatase de serina/treonina do tipo 2A

CaMKII = Cálcio calmodulina-dependente proteína quinase II

ERO = Espécies reativas de oxigênio

NADPH = Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

DNA = Ácido desoxirribonucleico

DNA-PK = DNA-dependente da proteína quinase

Bcl-2 = Família genes pró-apoptóticos

NeK2 = Proteína quinase de serina/treonina

MAPKs = Proteínas quinases ativadas por mitógenos

Ca<sup>+2</sup> = Íon Cálcio

DL<sub>50</sub> = Dose letal em 50% dos indivíduos

i.p. = Intraperitoneal

OMS = Organização Mundial de Saúde

Hct = Hematócrito

Hb = Hemoglobina

RBC = *Red blood cells* – Eritrócito

VCM = Volume corpuscular médio

HCM = Hemoglobina corpuscular média

CHCM = Concentração de hemoglobina corpuscular média

IHS = Índice hepato-somático

EROD = 7-etoxiresorufina-O-desetilase

CYP1A = Família das enzimas P450

SOD = Superóxido dismutase

CAT = Catalase

GPx = Glutathione peroxidase

GR = Glutathione redutase

GSH = Glutathione

PC = Proteínas carboniladas

LPO = Peroxidação lipídica

ALT = Alanina-aminotransferase

AST = Aspartato-aminotransferase

FAC = Fosfatases ácidas

FAL = Fosfatases alcalinas

CLAE-UV = Cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta visível

CaCO<sub>3</sub> = Carbonato de cálcio

EA = Exposição aguda

EC = Exposição crônica

NaCl = Cloreto de sódio

MC-LR<sub>eq</sub> = Microcistina LR equivalente

GTA = Glutaraldeído

MeOH = Metanol

SPE = Extração de fase sólida

CLAE-EM = Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas

*m/z* = razão massa/carga

ES<sup>+</sup> = *Eletrospray* modo positivo

MRM = Monitoramento de reações múltiplas

FIA = Injeção de fluxo

CUR = Cortina de gás

CAD = Gás de colisão

GS1 e GS2 = Gás nebulizador

LQ = Limite de quantificação

LD = Limite de detecção

EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético

DMSO = Dimetilsulfóxido

NaOH = Hidróxido de sódio

BT = Bilirrubina total

BD = Bilirrubina direta

BSA = Albumina de soro bovino  
DTT = Ditioneitol  
 $MnCl_2$  = Cloreto de manganês  
pNPP = p-nitrofenilfosfato  
EGTA = Tetra etilenoglicol  
 $MgCl_2$  = Cloreto de magnésio  
LDH = Lactato desidrogenase  
MDH = Malato desidrogenase  
NAD = Nicotinamida adenina dinucleotídeo  
TCA = Ácido tricloroacético  
KOH = Hidróxido de potássio  
 $H_2SO_4$  = Ácido sulfúrico  
 $CuSO_4$  = Sulfato de cobre  
HCl = Ácido clorídrico  
 $H_2O_2$  = Peróxido de hidrogênio  
 $K_2SO_4$  = Sulfato de potássio  
XOD = Xantina oxidase  
KCN = Cianeto de potássio  
CDNB = 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno  
GSSG = Glutathiona oxidada  
NDA = Naftalenedicarboxialdeído  
DNPH = Dinitrofenilhidrazina  
TBARS = *thiobarbituric acid-reactive substances*  
MDA = Malondialdeído  
TBA = Ácido tiobarbitúrico  
MET = Microscopia eletrônica de transmissão  
 $IL_{org}$  = Índice da lesão no órgão  
Fi = Fator de importância histopatológica  
Sc = *Score*  
PAS = Periódico de Schiff  
 $OsO_4$  = Tetróxido de ósmio  
Cu = Cobre  
PCNA = Proliferação celular

ZnSO<sub>4</sub> = Sulfato de zinco

TBS-T = Tampão tris-salino com triton

GAMPO = *Goat anti-mouse peroxidase conjugated*

TB = Tampão tris

DAB-Ni = 3,3'-diaminobenzidina + Sulfeto níquel amoniacal

E1 = Extrato de microcistina da exposição aguda

E2 = Extrato de microcistina da exposição crônica

RER = Retículo endoplasmático rugoso

C12 = Controle do grupo 12 horas

MC12 = Grupo microcistina 12 horas

C96 = Controle do grupo 96 horas

MC96 = Grupo microcistina 96 horas

C30 = Controle do grupo 30 dias

MC30 = Grupo microcistina 30 dias

Caco-2 = Células de carcinoma coloretal humano

CMMs = Centros de melano-macrófagos

TGF-β = *Transforming growth factor beta*

TNF-α = *Tumor necrosis factor alpha*

GS-X = ATPase S-conjugados de glutationa

O<sub>2</sub> = Oxigênio

LPS = Lipopolissacarídeos

LOOH = Hidroperóxido de lipídeos

## Resumo

A eutrofização do ambiente aquático favorece as florações de cianobactérias e afeta a biota devido à alteração organoléptica da água e a liberação de toxinas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de microcistinas contidas no extrato bruto da cianobactéria *Radiocystis fernandoi* (cepa R28) no peixe *Hoplias malabaricus* quanto ao grau de comprometimento estrutural e funcional do fígado, o potencial de acumulação no músculo e possível risco para a saúde humana. Traíras foram injetadas intraperitonealmente com  $100 \mu\text{g MC-LR}_{\text{eq}} \text{kg}^{-1}$  seguindo 2 protocolos experimentais: (i) exposição aguda com a aplicação de uma única dose do extrato bruto e avaliação após 12 e 96h e (II) exposição crônica com dose injetada a cada 72h durante 30 dias. Biomarcadores genotóxicos, bioquímicos, fisiológicos e morfológicos foram utilizados para avaliar a ação das toxinas, danos estruturais e ultraestruturais, mecanismos de desintoxicação no fígado e alterações no metabolismo energético. A cepa R28 produziu majoritariamente as variantes MC-RR e MC-YR evidenciando potencial hepatotóxico. A MC-YR acumulou no fígado após exposição aguda e crônica e a MC-RR apenas após exposição crônica. Não ocorreu acúmulo de MC no músculo. O potencial de acumulação das variantes (MC-RR e MC-YR) depende da sua concentração, sistema de defesa do organismo para sua depuração e da biomagnificação. A exposição aguda e crônica causou inibição da atividade da proteína fosfatase de serina/treonina do tipo PP2A, aumento da atividade da alanina e aspartato aminotransferases e bilirrubina direta no plasma evidenciando danos hepáticos. Macroscopicamente ocorreu alteração da massa, cor e textura do fígado; microscopicamente a morfologia dos hepatócitos e as organelas intracelulares foram alteradas e ocorreu dilatação dos sinusóides e hiperemia. Após 30 dias, a frequência de alterações aumentou e o fígado apresentou tecido fibroso descaracterizando a arquitetura do parênquima hepático. As alterações no metabolismo intermediário como glicose, glicogênio hepático, piruvato e lactato em fígado, músculo e plasma evidenciaram aumento da demanda energética e estresse fisiológico. Além disso, ocorreu ativação do sistema de biotransformação de fase I e alterações no sistema antioxidante celular. Sinais de recuperação morfofuncional do fígado foram observados após 96 horas de exposição (dose única) a MC, mas não após 30 dias e não houve sinais de regeneração celular. Danos no DNA também foram observados em células hepáticas. As alterações bioquímicas e estrutura do fígado evidenciaram comprometimento funcional do órgão. Em conclusão, as microcistinas presentes no extrato bruto da cianobactéria *R. fernandoi* (cepa R28) associadas a outras substâncias presentes no extrato podem comprometer a saúde e sobrevivência do animal.

**Palavras-chave:** Microcistinas, biomarcadores, estresse-oxidativo, bioacumulação, danos hepáticos, cianobactérias.

## Abstract

Eutrophication of the aquatic environment favors cyanobacteria blooms and affects the biota due to organoleptic water changing and the release of toxins. The objective of this study was to evaluate the effect of microcystin contained in the crude extract of the cyanobacteria *Radiocystis fernandoi* (R28 strain) in the fish *Hoplias malabaricus* assessing the degree of structural and functional impairment of the liver, the accumulation potential in muscle and risk to human health. Traíras were injected intraperitoneally with  $100 \mu\text{g MC-LR}_{\text{eq}} \text{ kg}^{-1}$  following two experimental protocols: (i) acute exposure with the application of a single dose of the crude extract and evaluation after 12 and 96 hours and (II) chronic exposure in which a dose was injected every 72 hours during 30 days. Genotoxic, biochemical, physiological and morphological biomarkers were used to evaluate the action of toxins, structural and ultrastructural damage in the liver, the detoxification mechanisms and changes in energy metabolism. The R28 strain produced mainly the MC-RR and MC-YR showing hepatotoxic potential. In the liver there was accumulation of MC-YR after acute and chronic exposure and MC-RR and MC-RR only after chronic exposure. There was not MC accumulation in muscle. The accumulation of the variants (MC-RR and MC-YR) depends on the concentration and the body's defense system for depuration and biomagnification. Acute and chronic exposure caused inhibition of the serine protein phosphatase / threonine type of PP2A activity, increased alanine aminotransferase and aspartate activity and direct bilirubin in plasma indicating liver damage. Macroscopically occurred changes in the color, texture and liver mass; microscopically the morphology of hepatocytes and intracellular organelles were altered and there were dilated sinusoids and hyperemia. After 30 days, the frequency of changes increase, and fibrous tissue disrupted the architecture of hepatic tissue. Changes in intermediary metabolism as glucose, liver glycogen, pyruvate and lactate showed increased energy demand and physiological stress. Moreover, there was activation of phase I of the biotransformation system and alterations in cellular antioxidant systems. Morphological signs of recovery in the liver were observed after 96 hours (single dose) to MC, but not after 30 days and no signs of cell regeneration. DNA damage were observed as well. The biochemical changes and liver structure showed functional impairment of the liver. In conclusion, the microcystin present in the crude extract of cyanobacteria *R. fernandoi* (R28 strain) combined with other substances in the extract may compromise the health and survival of the animal.

**Keywords:** Microcystins, biomarkers, stress-oxidative, bioaccumulation, liver damage, cyanobacteria.

---

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Eutrofização do ambiente aquático dulcícola**

O aumento da população e a consequente intensificação das atividades agrícolas cujos resíduos, em grande parte, são carregados a rios e lagos e reservatórios associado à má gestão dos recursos hídricos, tem contribuído com o crescente aumento da eutrofização dos ambientes aquáticos (Wetzel, 1993). A eutrofização tem sido reconhecida como um problema ambiental mundial desde o século XX, sendo que a porcentagem de recursos dulcícolas eutrofizados aumentou abruptamente a partir dos anos 50 (Andrade, 2007). Apesar das atividades antropogênicas acelerarem o processo de eutrofização, este também ocorre naturalmente nesses ambientes de uma forma bastante lenta, mantendo certo equilíbrio do ecossistema (Andrade, 2007).

A eutrofização pode ser definida como uma resposta biológica ao aumento da quantidade de nutrientes (especialmente nitrogênio e fósforo) e/ou matéria orgânica em um ecossistema aquático, resultando em uma maior produção primária e diminuição das propriedades físico-químicas da água. Dentre a comunidade fitoplanctônica em ambientes eutrofizados está o desenvolvimento de cianobactérias, cuja ocorrência tem sido bem documentada tanto nos ecossistemas boreais, temperados, como nos subtropicais e tropicais (Havens, 2008). Em ambientes tropicais, além do aporte de nutrientes, condições favoráveis de pH entre 6 e 9, temperaturas entre 25 e 30°C e elevada luminosidade favorecem o crescimento desordenado de cianobactérias (Sant'Anna et al., 2008).

As cianobactérias se destacam dos demais componentes fitoplâncton por serem mais resistentes às condições ambientais desfavoráveis, por possuírem necessidades nutricionais relativamente simples e capacidade de se posicionar na coluna d'água de forma a receber mais luminosidade e nutrientes para o seu desenvolvimento (Chorus, 2001). Entretanto, as florações de cianobactérias (Figura 1) trazem inúmeras consequências indesejáveis ao ambiente aquático, tais como, diminuição da transparência da massa hídrica, alteração da qualidade organoléptica da água, depleção da concentração de oxigênio dissolvido e possível ocorrência de toxinas na água (Codd, 2000).



**Figura 1.** Floração de cianobactérias na represa de Salto Grande (Americana, SP) em abril de 2014, decorrente de processo de eutrofização em água de recreação e geração de energia. Fonte: ([www.folha.uol.com.br/cotidiano/2014](http://www.folha.uol.com.br/cotidiano/2014)).

A ocorrência de florações de cianobactérias adquire maior gravidade quando toxinas são produzidas e liberadas na água, uma vez que os recursos hídricos dulcícolas são essenciais para o abastecimento público, para a produção de alimentos e atividades recreacionais. De acordo com Msagati et al. (2006), a produção de toxinas é diretamente relacionada à intensidade de luz e qualidade da água, de forma que, quanto maior a intensidade luminosa e concentrações de nutrientes presentes, maior o crescimento dos microrganismos e favorecimento da produção de toxinas.

## **1.2 Cianobactérias**

As cianobactérias, também conhecidas como algas azuis, são microrganismos procariontes com características celulares próprias, mas com sistema fotossintetizante semelhante ao das algas (vegetais eucariontes). Das

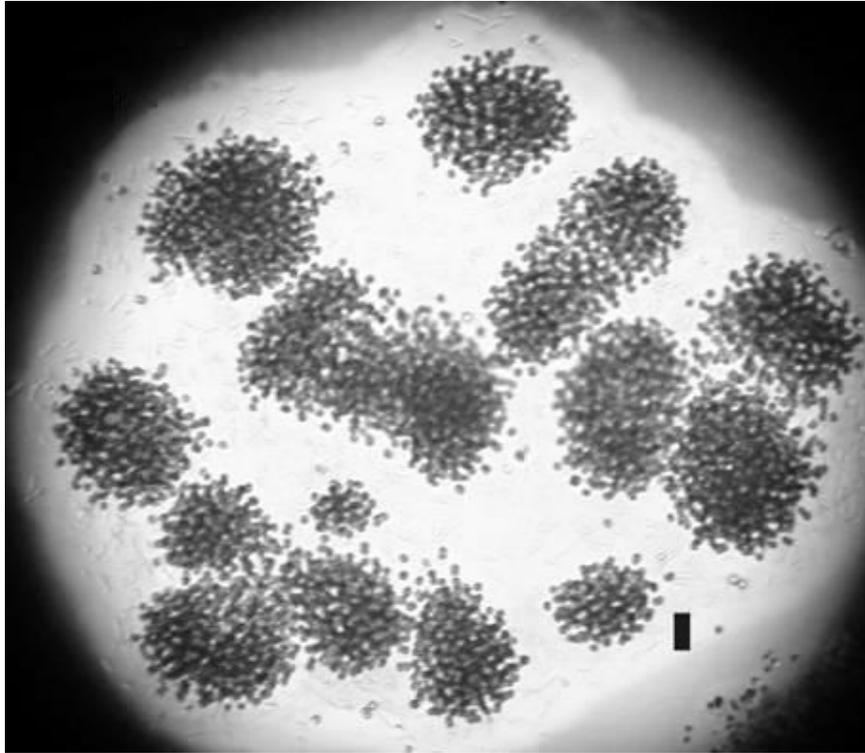
---

espécies de cianobactérias encontradas, aproximadamente 70% produzem toxinas, sendo que mais de um tipo de toxina pode ser produzida por uma única espécie (Soares et al., 2004). As toxinas são acumuladas no interior da célula (toxina intracelular), como forma de defesa contra competidores e predadores sem que ocorra liberação da mesma enquanto a célula está viva; a liberação da toxina para o ambiente ocorre principalmente após a morte celular e lise da cianobactéria.

Os principais gêneros de cianobactérias produtoras de toxinas são: *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, entre outras. Dentre as toxinas produzidas encontram-se as neurotoxinas (anotoxinas e saxitoxinas); dermatotoxinas (lipopolissacarídeos) e hepatotoxinas (microcistinas, nodularinas e cilindrospermopsina) que causam reações adversas aos organismos que se contaminam e até morte de animais e seres humanos (Azevedo et al., 2006). As cianobactérias tóxicas mais frequentes em florações são representadas pelos gêneros *Microcystis*, *Anabaena* e *Cylindrospermopsis*, entretanto, nas últimas décadas o gênero *Radiocystis* tem sido encontrado em florações de cianobactérias em regiões tropicais e subtropicais tanto quanto *Microcystis* (Sant'Anna et al., 2008). O gênero *Radiocystis* foi descrito por Skuja (1948) e é morfologicamente semelhante à *Microcystis*, exceto pela disposição radial das células em suas colônias (Figura 2); conteúdo celular com visíveis aerótopos e divisão celular sucessiva em apenas um plano (Fonseca et al., 2011; Pereira et al., 2012).

Há relativamente poucas descrições sobre a toxicidade de *Radiocystis* na literatura, entretanto, estudos recentes sobre a detecção, isolamento e identificação da espécie *Radiocystis fernandoi* descrevem essa espécie como uma nova linhagem tóxica de cianobactéria (Azevedo et al., 1994; Domingos et al., 1999; Vieira et al., 2003; Carvalho et al., 2004; Lombardo et al., 2006; Fonseca et al., 2011) cujas cianotoxinas produzidas tem sido identificadas como as da classe das microcistinas (Vieira et al., 2003). Borges et al., (2008) estudaram florações de cianobactérias em regiões subtropicais no Brasil, onde a espécie *R. fernandoi* representou mais de 70% do total da biomassa de todas as cianobactérias identificadas. O sucesso do desenvolvimento dessa espécie tem

sido atribuído à rusticidade em que se enquadram os gêneros *Microcystis* e *Sphaerocavum* (Reynolds et al., 2002).



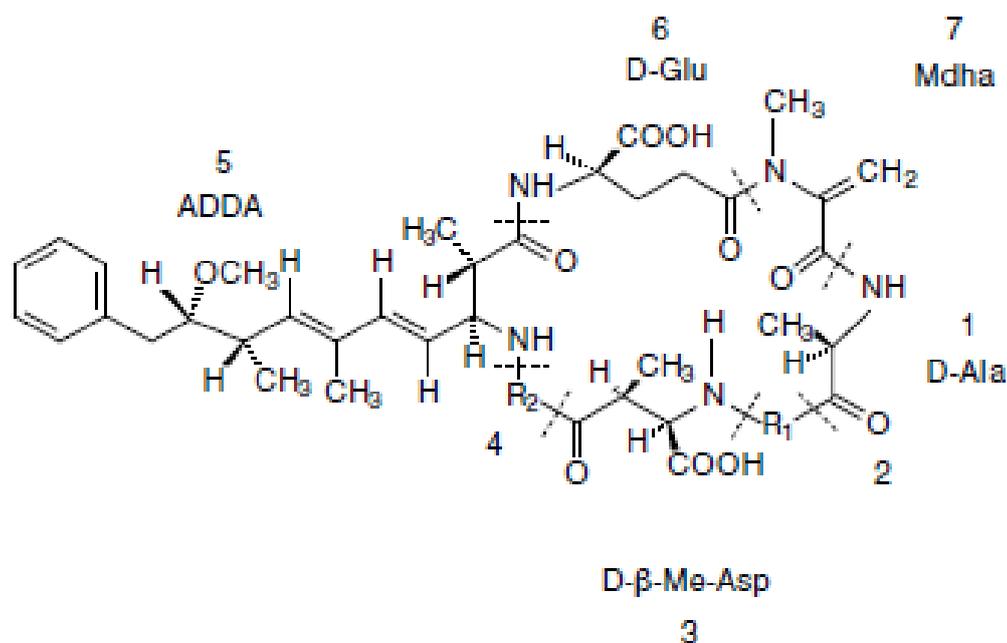
**Figura 2.** Aspecto geral da colônia de *Radiocystis fernandoi* evidenciando as células em alinhamento radial. Escala = 50  $\mu\text{m}$ . (Fonseca et.al., 2011)

### 1.3 Microcistinas

As microcistinas (MCs) pertencem à classe das hepatotoxinas, são altamente solúveis em água, extremamente estáveis e resistentes à temperatura, hidrólise química e oxidação. A concentração das MCS dissolvidas no ambiente aquático pode variar desde 'traços' até a 1,8 mg L<sup>-1</sup>, imediatamente após a floração (Svrcek e Smith, 2004), porém, concentrações de até 44 mg L<sup>-1</sup> já foram relatadas em barragens no Rio Grande do Sul, Brasil (Leão, 2008). A meia vida das MC é de aproximadamente três semanas em pH 1 e 40°C e, em ambiente natural, pode ser acima de 10 semanas (Harada et al., 1996).

Estruturalmente, as MCS são heptapeptídeos monocíclicos (Figura 3) que apresentam quatro aminoácidos fixos, sendo D-alanina (posição 1), ácido D-metilaspartico (posição 3), ácido D-glutâmico (posição 6), Mdha (N-

metildehidroalanina; posição 7); um aminoácido específico ADDA (3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-acido dienoico; posição 5) e dois L-aminoácidos variáveis na posição 2 (R1) e 4 (R2).



**Figura 3.** Estrutura química das microcistinas. Adaptado de Luca et al., 2010.

As MCs possuem mais de 80 variantes estruturais identificadas (Babica et al., 2006). A combinação de dois L-aminoácidos é o que determina a diferença estrutural entre as variantes de MCs (Tabela 1). A maioria das variantes apresentam aminoácidos hidrofóbicos na posição 2 e hidrofílicos na posição 4, sendo que as mais tóxicas são aquelas com combinações mais hidrofóbicas, como por exemplo, MC-LR, MC-LA, MC-YR; e as menos tóxicas com combinações mais hidrofílicas, destacando-se a MC-RR. A diferença de toxicidade entre uma variante e outra pode chegar a ser de 6 até 10 vezes (Falconer, 2005; Coral, 2012).

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

<b>Microcistinas</b>	<b>Posição 4 (Y)</b>	<b>Posição 2 (X)</b>
MC-LR	Leucina	Arginina
MC-RR	Arginina	Arginina
MC-YR	Tirosina	Arginina
MC-LA	Leucina	Alanina
MC-LL	Leucina	Leucina
MC-LY	Leucina	Tirosina
MC-AR	Alanina	Arginina

Cianobactérias podem produzir muitas MCs simultaneamente, embora somente uma ou duas delas sejam dominantes em uma linhagem. Alguns táxons tem um número de MCs dominantes em comum, como a *Anabaena*, *Microcystis* e *Planktothrix (Oscillatoria)*, entretanto, há evidências de apenas uma variante de MC que é típica para exatos táxons de cianobactérias (WHO, 1999). O potencial tóxico de *R. fernandoi* foi demonstrado por Vieira e colaboradores (2003) e Lombardo e colaboradores (2006), que identificaram a variante MC-LR como principal constituinte, além de mais três classes aleatórias de toxinas para essa espécie (Fonseca et al., 2011).

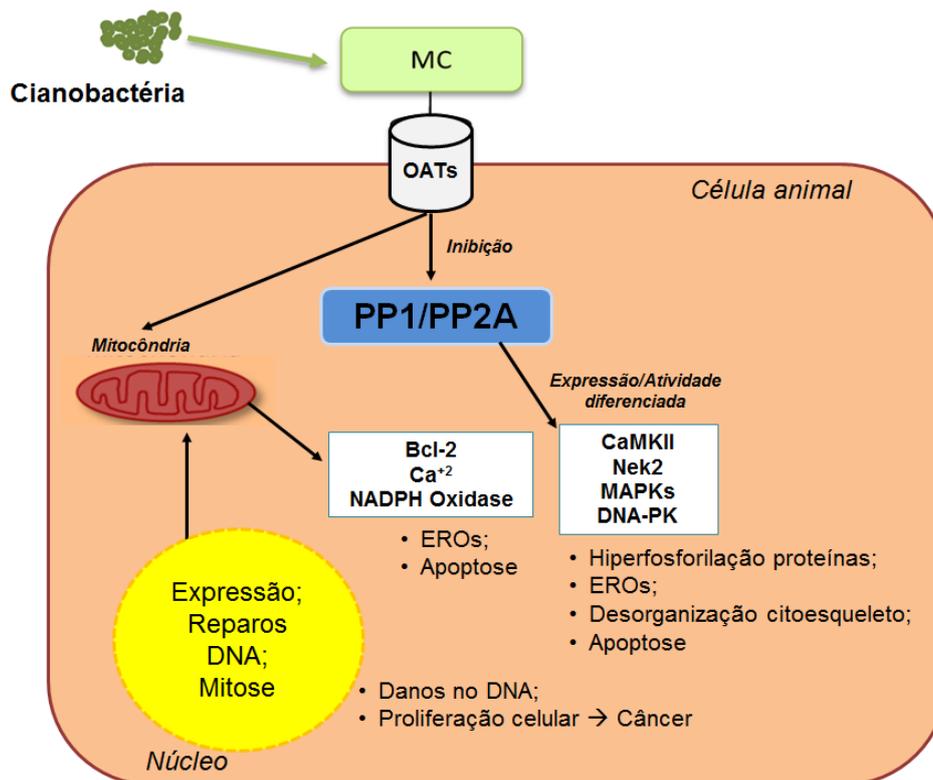
Em relação as MCs purificadas/isoladas, cada variante é caracterizada por diferente grau de hepatotoxicidade (Buratti et al., 2013). Por exemplo, as variantes MC-LR e MC-RR diferem apenas em um aminoácido na sua constituição e essa mudança resulta em uma toxicidade 10 vezes maior entre elas (Funari e Testai, 2008). Muitas investigações ecotoxicológicas tem primariamente focado em efeitos de MCs isoladas (Wiegand e Pflugmacher, 2005), e dessa forma, o papel de outras variantes e compostos presentes no extrato bruto de cianobactérias em florações não são profundamente explorados (Koski et al., 1999; Palikova et al., 2007; Yang et al., 2012). O extrato bruto do conteúdo celular pode evidenciar a toxicidade das MCs de forma mais próxima da realidade em ambiente natural (Hao et al., 2008).

### **1.3.1 Mecanismo de ação das microcistinas**

Como as demais hepatotoxinas, as MCs agem mais lentamente quando comparadas às neurotoxinas e dermatotoxinas, causando morte celular entre horas e dias (Azevedo et al., 2006). Após ingestão das cianobactérias, as toxinas são liberadas no estômago e íleo e, uma vez absorvida pela mucosa gástrica ou intestinal, chega via circulação portal ao fígado e por meio de polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATPs), interage com os hepatócitos (Santos e Bracarense, 2008). De fato, a toxicidade das MCs é atribuída à presença do aminoácido ADDA na estrutura, o qual inibe a atividade das fosfatases proteicas de serina/treonina do tipo 1 (PP1) e do tipo 2A (PP2A) essenciais para os processos regulatórios da célula, tais como crescimento, síntese proteica, metabolismo do glicogênio e contração muscular (Honkanen et al., 1990; Toivola e Eriksson, 1999; Guzman et al., 2003; Coral, 2012).

A inibição da atividade da PP1 e PP2A induz uma cascata de eventos que podem alterar o controle da célula, causar citotoxicidade e genotoxicidade (Figura 4). A ativação da Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMKII) pode promover alterações em cascata e induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). O papel das ERO e dos mecanismos relacionados que induzem danos hepáticos pela MC ainda não são completamente entendidos (Valério et al., 2010), mas sabe-se que a MCs também podem aumentar a produção intracelular de ERO pelo aumento da atividade da NADPH oxidase (Tillett et al., 2000) ou diminuir os níveis dos antioxidantes, levando o organismo ao estresse oxidativo e causando danos celular e ao ácido desoxirribonucleico (DNA) (Ding et al., 1998). A genotoxicidade, nesse caso, está associada à inibição dos processos de reparo do DNA pela inibição da proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK) após inibição da PP2A. Adicionalmente, há fosforilação nuclear da fosfoproteína P53, que é o regulador da expressão do *ante* e *pró*-genes apoptóticos. Estes incluem os membros da família Bcl-2 (Bax e Bid) via mitocôndria-dependentes, que também é utilizada como substrato da PP2A e atua como ativador transcripcional no reparo do DNA e apoptose (Weng et al., 2007). Decorrentes da cascata iniciada pela inibição das PP1 e PP2A, as MCs são conhecidas também por ativar a proteína quinase de serina/treonina (NeK2) que participa da progressão mitótica; assim como outras proteínas quinases ativadas

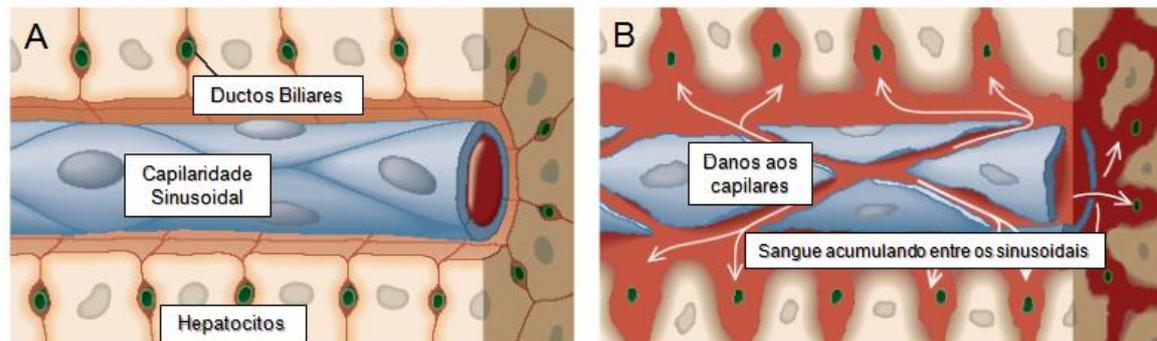
por mitógenos (MAPKs) específicos que regulam a expressão gênica, mitose, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose (Krakstad et al., 2005; Li et al., 2007; Campos et al., 2010).



**Figura 4.** Representação esquemática do mecanismo molecular da toxicidade de microcistinas (MC). Após entrar na célula pelo sistema de transportadores orgânicos iônicos (OATs), MCs se liga especificamente com as proteínas fosfatases de serina/treonina (PP1 e PP2A), inibindo-as e levando a uma cascata de eventos responsáveis pelos efeitos citotóxicos e genotóxicos em células animais. Adaptado de Valério et al. (2010).

A fosforilação de proteínas intracelulares desregula o controle do ciclo celular e altera a forma dos hepatócitos concomitantemente com a perda da arquitetura normal do parênquima hepático (Carmichael, 1994; Falconer e Yeung, 1992; Fischer et al., 2000). A destruição da estrutura interna do órgão tem início com a retração dos hepatócitos, os quais normalmente estão em contato entre si e com os capilares sinusoidais (Figura 5A), afastando-os uns dos outros. Os sinusóides aumentam de volume e com o acúmulo de sangue (Figura 5B), pode

ocorrer hemorragia intra-hepática causando choque hipovolêmico e morte (Carmichael, 1994; Briand et al., 2003; Msagati et al., 2006).



**Figura 5.** Representação esquemática da estrutura do fígado. Fígado normal (A) e após a ação da microcistina (B). As setas brancas indicam acúmulo de sangue entre os sinusoidais em B. Adaptado de Carmichael (1994).

Alguns estudos sugerem ainda que as MCs podem atuar como uma substância promotora de tumor (acelerando o processo de proliferação celular). Estudos com camundongos que recebiam oralmente uma substância cancerígena associada à água contendo MCs desenvolviam tumores maiores aos que consumiam água sem a toxina (Falconer e Buckley, 1989; Falconer, 1991; Vasconcelos, 1995). Variantes específicas como a MC-LR podem atuar como iniciadora de tumor, considerando que a MC-LR pode induzir danos no DNA, seja por interação direta com o DNA ou por mecanismos indiretos através da formação de ERO (Svircev et al., 2010).

### 1.3.2 Efeitos deletérios da presença de microcistina em peixes

Assim como nos demais vertebrados, o fígado nos peixes é o principal órgão alvo das MCs e mesmo em baixas concentrações causam hepatotoxicidade. Além disso, exposição às MCs pode afetar outros órgãos como o intestino, rins, brânquias, sangue, vesícula biliar e músculo (Fischer e Dietrich, 2000).

A mortalidade de peixes em florações de cianobactérias é atribuída a efeitos indiretos, como depleção do oxigênio (Chellappa et al., 2008; Xu et al., 2010) e aumento na concentração de amônia (Bury et al., 1995; Sun et al., 2012) na água. Considerando que as cianobactérias liberam as MCs no ambiente após lise

---

celular (Pavagadhi et al., 2012), os peixes podem ser expostos às toxinas presentes na água durante o processo de respiração (Phillips et al., 1985). Em ambientes aquáticos naturais, peixes são expostos desde níveis mínimos de MCs na água, por longo período, até concentrações de MCs variáveis diariamente chegando a  $140 \mu\text{g L}^{-1}$  como relatado em diferentes regiões no mundo (Jones e Orr, 1994; Christofferson, 1996; Izaguirre et al., 2007; Te e Jin, 2011). A principal via de entrada de MCs em peixes é através da alimentação, dependendo do hábito alimentar (carnívoros; herbívoro e onívoros) intensifica o potencial de acumulação de MCs. Peixes fitoplanctívoros apresentam uma menor concentração de cianotoxinas nos tecidos do que espécies carnívoras, uma vez que conseguem depurar rapidamente as MCs, antes mesmo que sejam absorvidas no intestino. Assim, à medida que aumenta o nível trófico, maior será a quantidade de toxina acumulada (Li et al., 2008). Em peixes fitoplanctívoros e onívoros, o intestino apresenta maior potencial de acumulação de MCs, seguido pelo fígado, rins, músculo e brânquias. Por outro lado, em peixes carnívoros, as MCs acumulam principalmente no fígado e no músculo, sugerindo o risco de acumulação, via cadeia trófica (Xie et al., 2005; Cazenave et al., 2005; Chen et al., 2007). Assim, de acordo com Martins e Vasconcelos (2009) peixes carnívoros são mais sensíveis à MCs devido à alta susceptibilidade do fígado.

Os peixes respondem ao estresse ambiental alterando suas funções metabólicas, o que pode prejudicar o desenvolvimento e crescimento do animal (Bury et al., 1996). O comprometimento do fígado do animal compromete todas as funções de síntese e armazenamento de substâncias energéticas, biotransformação e excreção de metabólitos celulares e xenobióticos. As primeiras manifestações de toxicidade pelas MCs incluem aumento plasmático de enzimas intracelulares, aumento do volume do fígado e sinais típicos de morte celular. Danos hepáticos em mamíferos podem ser observados a partir de 20 minutos de exposição a concentrações letais de MCs. Entretanto, os peixes são mais resistentes à ação das MCs, uma vez que os níveis de MCs detectados nesses animais são muitas vezes superiores aos dos mamíferos (Qu et al., 2011). A sensibilidade dos peixes dependem do habitat, modo de alimentação (Snyder et al., 2002), da concentração de MCs (principalmente em ambientes mais eutrofizados) e do tempo de exposição.

---

Estudos em laboratório têm mostrado que a dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) de MCs via injeção intraperitoneal (i.p.) é diferente da administração via oral. Em camundongos a DL<sub>50</sub> (i.p.) varia de 50 a 1200 µg kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo e a DL<sub>50</sub> oral é 50 a 170 vezes maior (Watanabe et al., 1996; Soares, 2009). Em peixes, como por exemplo, carpas (*Cyprinus carpio* L.), a DL<sub>50</sub> i.p. pode variar de 50 µg kg<sup>-1</sup> até concentrações de 250 µg kg<sup>-1</sup> se administradas oralmente, causando apenas pequenos efeitos hepatotóxicos (Carbis et al., 1996). Há uma dificuldade em determinar a DL<sub>50</sub> oral de MCs para peixes em ambientes naturais, uma vez que os ecossistemas aquáticos são altamente complexos quanto à concentração de MCs e o tempo de exposição que levaria o animal à morte (Carbis et al., 1996).

### 1.3.3 Microcistinas e saúde humana

Embora seres humanos não sejam consumidores primários de cianobactérias, eles podem ser expostos a dosagens sub-letais de MCs através da ingestão de água contaminada, recreação e consumo de pescados (Kuiper-Goodman et al., 1999). Considerando que os níveis de MCs detectados em peixes muitas vezes não são tóxicos para eles, em humanos podem representar níveis acima do recomendado em águas de consumo pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Mohamed e Hussein, 2006).

Não existem muitos relatos oficiais sobre intoxicações humanas letais por MCs, via ingestão oral, porque cianobactérias em elevada densidade na água, conferem a ela aspecto esverdeado e odor desagradável que afastam potenciais utilizadores (Vasconcelos, 1995). Entretanto, no Brasil, houve vários casos de intoxicação por cianotoxinas provenientes da presença de *Microcystis* na água como, por exemplo, a contaminação do reservatório de Itaparica, na Bahia, em 1988, onde 88 pessoas faleceram e mais de 200 foram intoxicadas devido ao consumo da água do reservatório. O caso mais conhecido mundialmente ocorreu em 1996, em Caruaru, Pernambuco, onde 123 pacientes de uma clínica de hemodiálise apresentaram sintomas de hepatotoxicose e 54 vieram a falecer devido à presença de MCs na água de abastecimento da clínica (Azevedo, 1998).

Atualmente, existe uma preocupação mundial quanto ao risco imposto pelas cianobactérias em águas de abastecimento público, refletindo na criação de legislação específica para o controle da qualidade da água em relação ao

---

monitoramento de cianotoxinas. No Brasil, o Ministério da Saúde (portaria 518 de março de 2004) adotou  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  como a concentração máxima de MCs em água de consumo humano seguindo o valor estabelecido pela OMS e incorporados no adendo das Normas para Qualidade da Água Tratada, publicado em 1998 no “*Guideline for Drinking Water Quality*” (WHO, 1998; Chorus e Bartram, 1999; Soares, 2009). Esse valor limite, calculado com base na intoxicação de camundongos (Fawell et al., 1994) e porcos (Falconer et al., 1994), foi determinada sendo a quantidade de ingestão diária tolerável, para a variante potencialmente mais tóxica (MC-LR), de  $0,04 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de massa corpórea.

Em peixes (Tencalla et al., 1994; Magalhães et al., 2001; Magalhães et al., 2003) a acumulação de MCs na musculatura e órgãos correspondem até 15 vezes aquele permitido pela OMS. Considerando que os peixes têm importância fundamental na alimentação humana como fonte de proteínas, principalmente para populações ribeirinhas (Padovani et al., 1995), e que a estabilidade de MCs ao calor e hidrólise química é alta, o consumo de peixes contaminados por MCs pode representar um risco à saúde humana devido a um possível comprometimento da função hepática. Entretanto, é importante ressaltar que o acúmulo de MCs nos músculos é menor do que nas vísceras (Xie et al., 2001, Wang et al., 2010).

#### **1.4 O uso de biomarcadores em estudos ecotoxicológicos**

Biomarcadores são utilizados para identificar e caracterizar um agente potencialmente deletério e monitorar a susceptibilidade ao tóxico a partir de exposições a toxinas, xenobióticos e medicamentos em análises toxicológicas (Amacher et al. 2002). Os biomarcadores podem ser genéticos, bioquímicos, fisiológicos e morfológicos: em células específicas, moléculas, genes, enzimas e hormônios (ROCHE, 2015).

Os biomarcadores genéticos são principalmente utilizados para identificar danos no DNA e nos cromossomos da célula tais como mutações gênicas, aberrações cromossômicas, quebra de fita e aductos de DNA, ou ainda interferência nos mecanismos envolvidos no reparo (Costa, 2011). Há um grande número de testes de mutagenicidade *in vitro* e *in vivo*, no qual os *in vivo* são especialmente relevantes, pois sofrem influência do metabolismo, fatores

---

farmacocinéticos e processos de reparo do DNA (Khrishna e Hayashi, 2000). Dentre eles, o ensaio cometa foi desenvolvido para mensurar a quebra das fitas simples e duplas de DNA (Walker, 1998), tendo a capacidade de detectar danos em células individualizadas produzidas por agentes tóxicos diretamente ou durante o reparo por excisão de aductos de DNA (Speit e Hartmann, 1995; Costa, 2011).

Os biomarcadores fisiológicos e/ou bioquímicos fornecem informações relacionadas a alterações funcionais e metabólicas frente a um contaminante (Amorin, 2003). Dentre os biomarcadores fisiológicos, os componentes celulares e a composição do sangue dos peixes têm sido utilizados como uma indicação de seu bem-estar (Clauss et al., 2008). O hematócrito (Hct), a concentração de hemoglobina (Hb) total e a contagem de eritrócitos (Red blood cells - RBC), assim como os índices hematimétricos (volume corpuscular médio – VCM; hemoglobina corpuscular média – HCM; concentração de hemoglobina corpuscular média – CHCM) são sensíveis a mudanças fisiológicas ocasionadas pelo estresse (Hoar et al., 1992; Clauss et al., 2008). O estresse pode ser definido como uma resposta adaptativa que permite ao peixe enfrentar um agente estressor, de forma a manter a homeostase (Barton, 2002). Dentre os biomarcadores bioquímicos podem ser citados os substratos relacionados ao metabolismo energético, enzimas de biotransformação, as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas e marcadores de danos celulares de estresse oxidativo. As alterações em substratos metabólicos como glicose, glicogênio, lactato, piruvato, proteínas, amônia, entre outros, são biomarcadores do metabolismo energético (Scott e Sloman, 2004). O índice hepato-somático (IHS) é utilizado como um indicativo do estado energético dos peixes (Querol et al., 2002) ou de alterações das condições normais causadas por esteatose ou estresse (Laidley et al., 1988).

Os biomarcadores relacionados à biotransformação incluem numerosos sistemas enzimáticos e diferentes substratos envolvendo duas fases de oxidação (Oliveira, et al., 2014). As reações de fase I são relacionadas à oxidação, redução e hidrólise de agentes tóxicos, que são catalisados principalmente pela citocromo P450, transformando-os em compostos solúveis e facilitando sua excreção desses compostos. Os compostos biotransformados podem também servir como substrato para as reações de fase II, que aumenta a taxa de excreção (Stegeman

---

et al., 1992). A atividade da 7-etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) é um excelente biomarcador para a atividade catalítica da CYP1A (família da P450) (Binelli et al., 2006; Oliveira et al., 2014) e a atividade da enzima glutationa-S-transferase (GST), reação de fase II, é responsável pela conjugação direta da glutationa com o tóxico e frequentemente utilizada como biomarcador de biotransformação (Hodgson et al., 2008).

Considerando que a contaminação aquática é um dos principais responsáveis pelo estresse oxidativo em peixes devido ao aumento de produção de ERO, o sistema antioxidante enzimático que inclui a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx) e a glutationa redutase (GR), e os compostos do sistema antioxidante não enzimático, como a glutationa (GSH), são importantes defesas do organismo contra danos no DNA, oxidação proteica (PC – proteínas carboniladas) e peroxidação lipídica (LPO) (Van der Oost et al., 2003; Prieto et al., 2006).

Sendo o fígado o principal órgão alvo dos contaminantes aquáticos, incluindo as MCs, outros danos podem ser analisados utilizando biomarcadores bioquímicos específicos à ação dessa toxina (Amacher, 2002). Um dos biomarcadores mais estudados da ação das MCs é a atividade das fosfatases PP1 e PP2A (Aoyama et al., 2003). A PP1 tem importante papel em vários processos celulares do ponto de vista genético, farmacológico e bioquímico, levando principalmente a erros na mitose e meiose, integridade celular e no metabolismo do glicogênio (Lin et al., 1999). A PP2A exibe uma sequência homóloga à PP1 e é importante em eventos no início da mitose e inibição da fusão de vesículas endocíticas. A regulação direta da atividade dessas enzimas está associada com a integridade do citoesqueleto (Aoyama et al., 2003).

As lesões hepáticas causadas por MCs podem elevar a concentração de enzimas hepáticas intracelulares no plasma, como as aminotransferases (alanina-aminotransferase – ALT; aspartato-aminotransferase – AST), que são consideradas os melhores biomarcadores de hepatotoxicidade, exibindo baixa frequência de resultados falso-positivos de dano hepático (Amacher, 2002). Entretanto, para uma avaliação apropriada de hepatotoxicidade, recomenda-se utilizar diferentes biomarcadores associados com a atividade da AST e ALT, como a atividade das fosfatases ácidas (FAC) e alcalinas (FAL) e o conteúdo de

---

bilirrubina no plasma (Amacher, 2002; Ramaiah, 2007; Ozer et al., 2008). Alterações nesses biomarcadores não só indicam alterações físicas, mas também alterações no metabolismo do organismo e no processo de biotransformação do contaminante pelo fígado, causando aumento nessas enzimas que catalisam os primeiros passos na digestão do amido e glicogênio (Kaczmarek e Rosenmund, 1977).

Além dos biomarcadores fisiológicos e bioquímicos, os biomarcadores morfológicos merecem destaque, uma vez que auxiliam identificar os órgãos alvo da toxicidade e possíveis mecanismos de ação dos contaminantes a partir de análises macroscópicas e microscópicas do órgão. Na análise macroscópica deve-se considerar a cor, forma, tamanho, consistência e certos aspectos especiais do órgão como peso, odor e distribuição de lesões. As análises microscópicas incluem as alterações histopatológicas e ultraestruturais. Alterações histopatológicas têm sido amplamente utilizadas na avaliação da saúde de peixes frente à exposição aos contaminantes tanto em laboratório como em estudos de campo (Hinton et al., 1992; Schwaiger et al., 1997; Thophon et al., 2003; Flores-Lopes e Malabarba, 2007, Paulino et al., 2014). As alterações hepáticas podem levar a formação de tumores, degeneração do epitélio biliar ou hepatócitos, polimorfismos nucleares, apoptoses, hiperplasias e lesões de estocagens e inflamações (Lawrence e Hemingway, 2003). Além disso, as análises da ultraestrutura dos hepatócitos podem ser evidenciadas por alterações nas organelas celulares e desorganização do citoesqueleto (Wang et al., 2010).

### **1.5 A espécie *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1974)**

A traíra, *Hoplias malabaricus* (Figura 6), é nativa da América do Sul, amplamente distribuída em diversos ambientes aquáticos como lagoas e rios. Há algumas décadas tem sido reintroduzida em alguns reservatórios de hidroelétricas do Brasil para controle biológico de outras espécies por ser carnívora e voraz, apesar de ter hábito sedentário (Monteiro et al., 2013). A espécie tem sido difundida também em pisciculturas em consorciação com tilápias (Furtado, 1995; Andrade et al., 1998) e é um importante recurso pesqueiro (Grosser et al, 1994), uma vez que sua carne possui alto valor nutricional com elevados níveis de

proteínas, ácido palmítico e ácidos graxos poliinsaturados, benéficos à saúde humana (Torres et al., 2012).



**Figura 6.** Exemplar de *Hoplias malabaricus*, traíra. (Foto: Marcelo G. Paulino).

Segundo Bloch (1794), a espécie ocupa a seguinte classificação sistemática:

Classe: Osteichthyes

Subclasse: Actinopterygii

Divisão: Teleostei

Superordem: Acanthopterygii

Ordem: Characiformes

Família: Erythrinidae

Gênero: *Hoplias*

Espécie: *Hoplias malabaricus*

A traíra apresenta ampla plasticidade ecológica (Bialetzki et al., 2002), tornando-se então um interessante modelo para avaliar os efeitos tóxicos diretos e/ou indiretos dos contaminantes, devido a sua alta posição na cadeia trófica (Alves Costa et al., 2007; Monteiro et al., 2013).

## **1.6 Justificativa**

A presença de MCs no ambiente aquático compromete a função hepática em peixes, podendo levar à mortalidade de diferentes espécies. Além disso, as MCs podem se acumular nos tecidos do animal e, indiretamente, afetar a saúde

humana (Xie et al., 2001, Wang et al., 2010). Muitos estudos utilizam variantes de MCs específicas purificadas para avaliar o grau de toxicidade. Entretanto, em florações pode haver mais de um tipo estrutural de MCs. Estudos com extrato bruto tem mostrado efeitos mais severos do que com MCs purificadas (Palikova et al., 2003), além de ser o mais próximo ao encontrado em situações naturais.

Dessa forma, o presente estudo pretende responder às seguintes questões:

- (i) Qual o grau de comprometimento da estrutura do fígado de *H. malabaricus*, e da função hepática após exposição aguda e crônica ao extrato bruto de *R. fernandoi* contendo MCs?
- (ii) Qual o potencial de acumulação de MCs no fígado e músculo após contaminação aguda e crônica ao extrato bruto de *R. fernandoi* contendo MCs e o que poderia refletir para a saúde humana?

---

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos causados por exposição ao extrato bruto da cianobactéria *Radiocystis fernandoi* contendo MCs em traíras (*Hoplias malabaricus*) com ênfase ao comprometimento da função hepática e saúde animal e os riscos para a saúde humana.

### **2.2 Objetivos específicos**

Considerando o objetivo geral do trabalho, os objetivos específicos foram:

- I. Identificar e quantificar as variantes de MC produzidas pela cianobactéria *R. fernandoi* e determinar o potencial de bioacumulação em *H. malabaricus* e o possa refletir ao homem devido o consumo da espécie.
- II. Avaliar os efeitos das microcistinas no fígado e o comprometimento morfofuncional do órgão relacionado às estruturas dos hepatócitos e os processos metabólicos;
- III. Analisar a ativação dos processos de desintoxicação e sistemas antioxidantes e avaliar se ocorre estresse oxidativo no fígado;
- IV. Avaliar se ocorre recuperação do fígado, via imunomarcção de células em proliferação.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Extração, identificação e quantificação de microcistinas.

Cianobactérias, *Radiocystis fernandoi* (cepa R-28), isoladas do reservatório da Hidroelétrica de Furnas, Minas Gerais (20°40'S; 46°19'W), produzidas a partir de uma única linhagem no Laboratório de Ficologia, Departamento de Botânica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) foram cedidas pela Dra. Alessandra Giani. O extrato bruto da cianobactéria foi obtido no Laboratório de Química Orgânica e Produtos Naturais, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) em colaboração com a Dra. Ana Paula Terezan e Dr. João Batista Fernandes.

As extrações foram efetuadas com cianobactérias liofilizadas (E1= 655,08 mg e E2= 2426,00 mg, separadamente) usando metanol (grau HPLC) e água deionizada ( $18 \text{ M } \Omega \text{ cm}^{-1}$ ) como solvente. O procedimento foi realizado em tubos cônicos (TPP®) em 10 ml de metanol:água (80:20, v:v) em Ultra Turrax (IKA – T10) por 1 minuto (processo repetido por três vezes). O extrato bruto foi centrifugado a  $18514 \text{ g}$  ( $18^\circ\text{C}$ ) por 20 minutos (centrífuga Eppendorf 5810R, Alemanha). O sobrenadante foi evaporado em temperatura ambiente em um evaporador de solvente a vácuo e o extrato seco foi então diluído em água deionizada para quantificação e preparações das injeções intraperitoneais ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), levando em consideração a relação da concentração de MC total do extrato e o peso do animal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )

A quantificação de MC no extrato bruto foi realizada com kit ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – Beacon Analytical Systems Inc., EUA) e analisada (em duplicata) em espectrofotômetro (Molecular Devices Spectra, MAX GEMINI X, EUA) a absorvância de  $\lambda = 450 \text{ nm}$ , de acordo com as instruções do fabricante. O extrato bruto foi diluído em água deionizada até obter concentração que se ajustava à curva de calibração do kit ( $0,3 - 2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Os dados da quantificação foram obtidos a partir da curva de calibração do kit (Anexo I).

Para a identificação e quantificação das variantes de MC presentes no extrato bruto foram utilizadas soluções padrões (Sigma-Aldrich, EUA) contendo MC-LR; MC-RR e MC-YR ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , cada variante) ou uma solução padrão (Sigma-Aldrich, EUA) contendo MC-RR ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e MC-YR ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), separadamente. A

---

curva analítica por padronização externa de calibração foi obtida a partir da regressão linear, considerando a área da banda cromatográfica referente a cada concentração das amostras. A linearidade foi obtida através do valor do coeficiente de correlação linear e a precisão intra-dia (repetibilidade) foi expressa pela porcentagem do coeficiente de variação (CV%) das réplicas. A exatidão (expressa em %) foi calculada utilizando a média das concentrações determinadas e o valor médio das concentrações nominais (Anexo II). As análises por cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta visível (CLAE-UV) foram otimizadas a partir de adaptações realizadas por Aranda-Rodrigues et al. (2005), sendo que as condições estabelecidas foram: Coluna analítica C-18 ODS Phenomenex (100 Å, 10 µm ou 100 Å, 5 µm) 150 x 4,6 mm; fase móvel A (água; 0,05% ácido fórmico), fase móvel B (metanol 0,05% ácido fórmico). A eluição fase B (10 a 30% em 10 min; 30 a 55% em 15 minutos; 55 a 100% em 28 min e 100% por 7 min); comprimento de onda  $\lambda = 240$  nm; fluxo de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e volume injetado de 20 µL.

### 3.2 Peixes e delineamento experimental

Sessenta exemplares adultos de traíras, *H. malabaricus* (Massa corpórea  $264 \pm 9,1$  g; comprimento total  $27,5 \pm 0,7$  cm) foram adquiridos na Piscicultura Santa Cândida (Santa Cruz da Conceição, SP) e trazidos para o Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, onde foram mantidas em tanques de 1000 L, durante 30 dias, em fotoperíodo natural (~12:12 horas). Os tanques foram abastecidos com água sem cloro, aeração constante e as seguintes variáveis foram monitoradas e controladas: temperatura -  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ; oxigênio dissolvido - 7.0-7.5 mg L<sup>-1</sup>; pH - 7,1-7,4; condutividade - 125-130 µS cm<sup>-1</sup>; alcalinidade - 35-43 mg L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub> e dureza total - 39-50 mg L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>). Os peixes foram alimentados com filé de peixe a cada 96 horas.

Após aclimação, os peixes foram aleatoriamente divididos (n=10) em tanques experimentais (1000 L) e foram realizados dois protocolos experimentais:

- **Protocolo I:** Exposição aguda (EA) constituída por uma única injeção i.p. para exposição por 12 e 96 horas;
- **Protocolo II:** Exposição crônica (EC) constituída por i.p. a cada 72 horas, para exposição durante 30 dias. Neste protocolo experimental, foi feito um implante de um microchip de biovidro (12 x 2 mm) na cavidade celômica de cada animal

---

(transponder Granel - AnimalTag<sup>®</sup>) para identificação individual dos animais de forma que cada animal recebia a dose de MC correspondente a sua massa corpórea.

Em ambos os protocolos experimentais, todos os períodos experimentais foram constituídos por um grupo controle (C12; C96; C30), que recebiam 0,5 mL de salina fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e um grupo exposto a MC (MC12; MC96; MC30) que recebiam equivalente a 100 µg de MC-LR (MC-LR<sub>eq</sub>) por quilo de massa corpórea (100 µg kg<sup>-1</sup>), diluídos em 0,5 mL de salina fisiológica estéril. Na EA foi utilizado o extrato obtido na E1 enquanto na EC foi utilizado o extrato obtido na E2, sendo que a dose reflete a média da concentração da variação diária durante o período da floração.

Na EA, os peixes foram alimentados com aproximadamente 100 g de filé de peixe por tanque, suspenso 24 horas antes dos experimentos e na EC, os animais receberam alimento a cada 96 horas. O alimento permanecia no tanque por no máximo 3 horas, sendo que o alimento não consumido era removido e descartado.

Ao final de cada protocolo experimental, uma amostra de sangue (1 mL) foi coletada de cada peixe com seringas heparinizadas para análises dos parâmetros hematológicos e obtenção do plasma e, posteriormente, era efetuada a biometria (massa corpórea e tamanho) do exemplar. Em seguida, os animais foram anestesiados com benzocaína (0,1 g L<sup>-1</sup>) e a eutanásia foi realizada por secção medular para obtenção de amostras de fígado e músculo. O fígado foi analisado macroscopicamente quanto aos seguintes parâmetros: cor, odor, tamanho, textura e formato; foi pesado para estimação do IHS e sub-amostrados para análise bioquímica e microscopia de luz e eletrônica de transmissão. As sub-amostras de fígado, amostras de músculo branco e o plasma foram imediatamente armazenados a -80°C para as análises de biomarcadores bioquímicos. Sub-amostras de fígado também foram fixadas em solução de Bouin e em glutaraldeído (GTA) 2,5% (em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4) para as análises de biomarcadores morfológicos.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da UFSCar (Processo n° 026/2012).

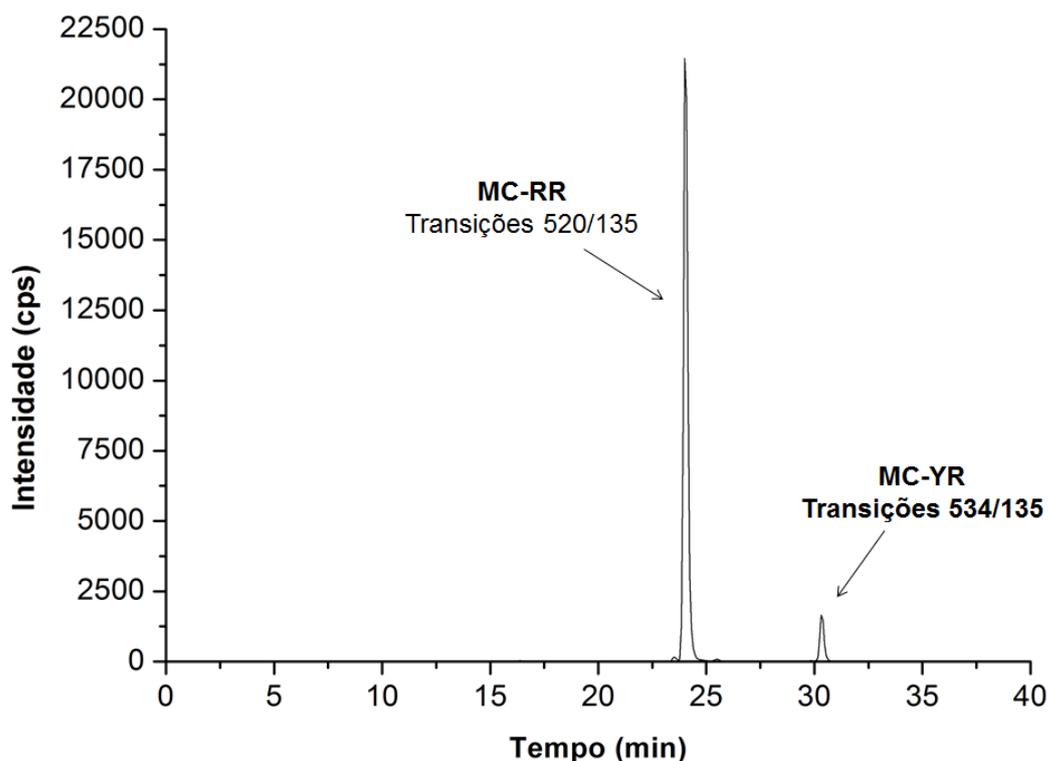
### 3.3 Extração, *clean-up* e quantificação de microcistinas no fígado e músculo branco para as variantes MC-RR e MC-YR.

A extração e *clean-up* dos tecidos seguiu o protocolo estabelecido por Deblois et al. (2011) e Mekebri et al. (2009), com adaptações. A extração de MC de fígado (50 mg) e músculo (100 mg) foi efetuada em 10 mL de metanol (MeOH) e seguida de três extrações com 10 mL de MeOH 80% (MeOH:H<sub>2</sub>O; v:v) com a utilização de um Ultra Turrax por 1 minuto cada. Os extratos de cada tecido foi centrifugado a 18514 g, 18°C, por 20 minutos e os sobrenadantes das extrações foram reunidos e secos em um evaporador de solvente a vácuo (SpeedVac<sup>®</sup>) a temperatura ambiente.

Os extratos foram re-solubilizados em 1 mL de água e submetidos ao *clean-up* com cartuchos de extração de fase sólida (SPE; C-18; 6 mL; 500 mg). Primeiramente, a fase estacionária do cartucho foi ativada com 10 mL de MeOH e condicionada com 20 mL de água acidificada (0,05% de ácido fórmico). Após condicionamento do cartucho, 1 mL do extrato foi aplicado ao cartucho e eluído com água acidificada, MeOH 20 % (v:v, MeOH:H<sub>2</sub>O acidificada), MeOH 75% (v:v, MeOH:H<sub>2</sub>O acidificada) e MeOH acidificado. Em seguida, a fração eluída com MeOH 75% foi seca no evaporador de solvente a vácuo (SpeedVac<sup>®</sup>) a temperatura ambiente. A fração com as MC extraídas foi re-solubilizada em 1 mL de MeOH 50% (MeOH:H<sub>2</sub>O; v:v) e filtrada com filtros de Nylon (0,20 µm).

A quantificação de MC dos tecidos foi realizada em triplicata por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (CLAE-EM), através da construção de curvas analíticas por padronização externa (Anexos III e IV) a partir de transição massa/carga (*m/z*) 520 ([M+2H]<sup>+2</sup>) e 534 ([M+H+Na]<sup>+2</sup>), respectivamente, com outra transição para ambas de *m/z* 135 (fragmento originado do ADDA) como representado na Figura 7. O modo de ionização foi *electrospray* no modo positivo (ES<sup>+</sup>) e o experimento utilizado foi monitoramento de reações múltiplas (MRM). A recuperação do método foi determinada pela adição da mistura de padrões de MC na matriz. A otimização dos parâmetros da fonte de ionização por injeção de fluxo (FIA) foi realizada a partir de uma solução padrão de 500 ng mL<sup>-1</sup> do padrão isolado para MC-YR e MC-RR (Sigma-Aldrich, EUA). A repetibilidade (precisão intra-dia) e a exatidão do método

enquadram-se dentro do intervalo de 85 a 115% estabelecidos pelos guias de validação das agências reguladoras oficiais (US-FDS e ANVISA, 2001).



**Figura 7.** Representação do cromatograma de MRM das variantes de MC-RR e MC-YR nos tempos de retenção de 24,3 minutos e 30,5 minutos, respectivamente.

A injeção de fluxo foi realizada através do acoplamento do CLAE ao espectrômetro de massas para otimização da cortina de gás (CUR), gás de colisão (CAD) e gás nebulizador (GS1 e GS2). As condições após a otimização do FIA foram: Volume de injeção: 20  $\mu\text{L}$ ; Fluxo: 150  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; Fase móvel A: 50% água (0,05% ácido fórmico); Fase móvel B: 50% metanol (0,05% ácido fórmico); CUR (30 psi); CAD (8 psi); GS1 (55 psi) e GS2 (60 psi). As condições do CLAE são as mesmas estão descritas no item 3.1 (para o CLAE-UV) e a coluna utilizada foi C-18 ODS Phenomenex (110  $\text{\AA}$ , 5  $\mu\text{m}$ ) 15 x 0,46 cm. O limite de quantificação (LQ) estabelecido para as análises foi de 20  $\text{ng mL}^{-1}$  para a MC-RR e 50  $\text{ng mL}^{-1}$  para

---

a MC-YR e não ultrapassando o valor de 15% da variabilidade e exatidão nominal. O limite de detecção (LD) para ambas MC foi 10 ng mL<sup>-1</sup>, determinado como a menor concentração em que se observa um sinal três vezes maior que o ruído do detector.

### **3.4 Biomarcador genético**

#### **3.4.1 Ensaio do cometa**

O ensaio do cometa foram realizados em colaboração com a Ms. Emanuele C. Pesenti e a Dra. Marta Margarete Cestari, do Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental, do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Amostras de fígado (~50 mg) foram colocadas em 1 mL de soro bovino fetal (Gibco<sup>®</sup>) e homogeneizadas com um Ultra Turrax (IKA<sup>®</sup> T10) em banho de gelo na ausência de luz direta para a obtenção da suspensão celular. O ensaio Cometa do fígado foi realizado segundo a metodologia proposta por Singh et al., (1988) e modificado por Ferraro et al., (2004). Para a confecção das lâminas foram misturados 10 µL de suspensão celular com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão. Essa mistura foi então disposta sobre uma lâmina de microscopia, previamente coberta com uma fina camada de agarose normal 1,5%. As lâminas foram colocadas em solução de lise (solução de lise estoque: NaCl, 2,5 M; EDTA, 100 mM; Tris, 10 mM; NaOH, 0,8%; N-lauril-sarcocinato, 1%; solução de lise uso: 1 mL Triton X100; 10 mL DMSO; e 89 mL de solução de lise estoque) por 24 horas a 4°C. Em seguida, as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese, onde ficaram por 30 minutos imersas no tampão de eletroforese (300 mM NaOH; 1 mM EDTA; pH>13) para que ocorresse o desenrolamento parcial do DNA. A eletroforese foi realizada a 300 mA, 25V por 25 minutos e, na sequência, as lâminas foram neutralizadas em 0,4 M de Tris, pH 7,5 por 15 minutos; fixadas em etanol absoluto por 5 minutos e coradas com 15 µL de brometo de etídeo (20 mg L<sup>-1</sup>).

O dano no DNA foi classificado de acordo com o comprimento da cauda do cometa formada após a corrida de eletroforese, sendo: 0 (sem dano aparente), 1 (pouco dano), 2 (dano moderado), 3 (dano elevado) e 4 (dano máximo), seguindo a classificação de Collins et al. (1995). Os cometas em que não foram possíveis a visualização da região da cabeça foram desconsiderados da contagem por

---

representarem DNA totalmente fragmentado, característico de células inviáveis. Cem nucleóides de cada lâmina foram analisados utilizando um microscópio de epifluorescência (Leica DFC300 FX, USA) com aumento de 400 vezes. A atribuição de escores de danos foi feita multiplicação o número de cometas encontrados em contagem de cada classe pelo valor da classe correspondente ( $S_{\text{cometa}} = N^{\circ} \text{ cometa} \times \text{classe}$ ).

### **3.5 Biomarcadores fisiológicos**

#### **3.5.1 Biometria e índice hepato-somático.**

A massa corporal foi medida antes e depois da realização de cada protocolo experimental e a massa do fígado de cada animal foi medida pós-exposições. A massa fresca do fígado e a massa do animal foram utilizadas para calcular o IHS de acordo com a seguinte equação (Ratton et al., 2003):

$$\text{HSI (\%)} = [\text{Massa órgão (g)} \times 100] / \text{Massa corpórea (g)}$$

#### **3.5.2 Parâmetros hematológicos**

As amostras de sangue foram utilizadas para a determinação do Hct, RBC, Hb total e índices hematimétricos (VCM; HCM e CHCM). As amostras de sangue foram centrifugadas a uma velocidade de 11235 g a 4°C por 5 minutos para separação do plasma.

##### **3.5.2.1 Hematócrito**

Micro capilares preenchidos com sangue foram centrifugados a 12000 g por 3 minutos em centrífuga de micro-hematócrito (FANEN Centrimicro MOD.211), segundo metodologia de Goldenfa et al. (1971). Um cartão padrão de leitura de Hct foi utilizado e o Hct foi expresso em porcentagem.

##### **3.5.2.2 Número total de eritrócitos**

O número total de eritrócitos (RBC -  $10^6$  células  $\text{mm}^3$ ) foi determinado em 10  $\mu\text{L}$  de sangue adicionado a 2 mL de uma solução de formol-citrato. O RBC foi determinado em câmara de Neubauer utilizando microscópio de luz Olympus BX 51 (aumento de 400x).

### **3.5.2.3 Hemoglobina total**

A concentração de Hb ( $\text{g dL}^{-1}$ ) foi determinada pelo método da cianometemoglobina (Collier, 1944) com diluição de 10  $\mu\text{L}$  de sangue total em 2 mL de solução de Drabkin. A densidade foi mensurada a  $\lambda = 540 \text{ nm}$ , contra um branco contendo apenas solução de Drabkin.

### **3.5.2.4 Índices hematimétricos**

A partir das variáveis hematológicas, foram determinados os índices hematimétricos: o VCM foi calculado como  $\text{Hct} \cdot 1000 / \text{RBC}$  ( $\mu\text{m}^3$ ); a HCM calculada como  $\text{Hb} \cdot 1000 / \text{RBC}$  ( $\text{pg célula}^{-1}$ ) e a CHCM como  $\text{Hb} \cdot 1000 / \text{Hct}$  ( $\text{g dL}^{-1}$ ).

### **3.5.2.5 Bilirrubina plasmática**

A quantificação da concentração de bilirrubina total (BT) e bilirrubina direta (BD) foi realizada utilizando kit comercial para determinação de bilirrubinas da Labtest<sup>®</sup> (ref. 31), comparados com um padrão de bilirrubina ( $10 \text{ mg dL}^{-1}$ ) Labtest<sup>®</sup> (ref. 32). A bilirrubina da amostra plasmática é dosada por diazotização e formação de azobilirrubina vermelha com absorção em  $\lambda = 525 \text{ nm}$ . A bilirrubina direta (ou conjugada) é dosada em meio aquoso, enquanto a total (direta + indireta) é dosada por ação de um solubilizador de ação catalisadora. Os resultados foram expressos em  $\text{mg dL}^{-1}$ .

## **3.6 Biomarcadores bioquímicos**

Dentre os biomarcadores bioquímicos, as análises associadas ao metabolismo intermediário e injúria hepática foram realizadas em colaboração com o Dr. Gilberto Moraes e equipe do Laboratório de Bioquímica Comparativa do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar. A análise do biomarcador de biotransformação, EROD, foi realizada em colaboração com a Dra. Claudia Bueno Reis Martinez e equipe no Laboratório de Ecofisiologia Animal, da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e as análises da atividade específica das fosfatases PP1 e PP2A foram realizadas em colaboração com a Dra. Flavia Bieczynski e Dr. Carlos Marcelo Luquet do Laboratório de Ecotoxicología Acuática, INIBIOMA (CONICET-UNCo), CEAN, Argentina.

### **3.6.1 Proteína total**

O teor da proteína total ( $\text{mg proteína}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ ), do fígado, músculo e plasma, para as todas as análises bioquímicas foi determinado segundo o método de Bradford utilizando coomassie brilliant blue G-250 (Bradford, 1976), adaptado para leitura em microplaca (Dynex Technologies Ltd., MRXTC, UK), conforme descrito por Kruger (1994) e utilizando a albumina bovina ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) como padrão. A absorbância das amostras foi medida a  $\lambda = 595 \text{ nm}$ .

### **3.6.2 Atividade das fosfatases e transaminases**

Para a atividade das fosfatases PP1 e PP2A, amostras de fígado (250 mg) foram homogeneizadas em tampão *stock* (tris 40 mM, KCl 20 mM,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  30 mM, pH8,6) e centrifugados a 12000 g, 4°C por 15 minutos.

Para as fosfatases ácidas e alcalinas e transaminases, o plasma (100  $\mu\text{L}$ ) foi utilizado diretamente no ensaio, enquanto, amostra de fígado (50 mg) e músculo (100 mg) foram homogeneizadas em tampão fosfato (10 mM), tris (20 mM), pH 7,0 em glicerol 50% (v:v); centrifugadas a 5000 g por 3 minutos.

Os sobrenadantes foram utilizados como fonte enzimática para a determinação da atividade das fosfatases e transaminases.

#### **3.6.2.1 Atividade específica da fosfatase de serina/treonina (PP1)**

A atividade da PP1 em fígado foi realizada de acordo o método descrito por Carmichael e An (1999) e adaptado por Bieczynski et al. (2013) utilizando p-nitrofenilfosfato (pNPP) 40 mM como substrato. O volume de 10  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi adicionado em 90  $\mu\text{L}$  de solução de reação (DTT 3 mM, BSA  $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $\text{MnCl}_2$  1,5 mM) e incubado (com agitação constante) por 5 minutos a 20°C. Em seguida foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução acrescido de pNPP e a reação novamente incubada sob agitação por 10 minutos. As leituras (em triplicatas) eram realizadas em micro leitor (Hyperion 2025-050) em intervalos de 10 minutos durante 1 hora a  $\lambda = 405 \text{ nm}$ . Os resultados expressos em  $\text{U mg proteína}^{-1}$ .

#### **3.6.2.2 Atividade específica da fosfatase de serina/treonina (PP2A)**

A atividade da PP2A em fígado foi realizada de acordo com Heresztyn e Nicholson (2001) com adaptações por Bieczynski et al. (2014). Em 10  $\mu\text{L}$  de solução

---

de reação (tampão tris 0,25 M, pH 8,1; EGTA 0,38 mM;  $\text{MnCl}_2$  20 mM, BSA 10 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) foi adicionado o volume de 10  $\mu\text{L}$  de sobrenadante e a reação foi incubada (em agitação constante) durante 5 minutos, a 20°C. Em seguida foram adicionados 180  $\mu\text{L}$  de solução de substrato (tampão tris 0,25 M, pH 8,1;  $\text{MnCl}_2$  20 mM;  $\text{MgCl}_2$  0,2 M; BSA 10 mg  $\text{mL}^{-1}$ ), acrescido de pNPP 60 mM e DTT 20 mM e incubado sob agitação por 10 minutos. As leituras (em triplicatas) foram realizadas em micro leitor (Hyperion 2025-050) em intervalos de 10 minutos durante 1 hora a  $\lambda = 405 \text{ nm}$ . Os resultados expressos em  $\text{U mg proteína}^{-1}$ .

### **3.6.2.3 Determinação das fosfatases alcalinas e fosfatases ácidas**

A atividade da FAL e da FAC foi realizada segundo o método de Bergmeyer e Beach (1983), utilizado tampão de glicina 0,05 M e  $\text{MgCl}$  0,01 M (pH 8,5) para a FAL e tampão citrato de sódio 50 mM (pH 5,0) para a FAC. Ao plasma e sobrenadante do homogeneizado de fígado e músculo eram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de pNPP 120 mM. Após a incubação das amostras (30 min – em banho Maria 37°C), estas foram centrifugadas a 5000  $g$  por 2 minutos e em seguida foi adicionados 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  2 M. As leituras das atividades das fosfatases foram determinadas em  $\lambda = 405 \text{ nm}$  em espectrofotômetro (DU<sup>®</sup> 520, Beckman) e expressas em  $\text{nmol p-nitrofenilfosfato min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ .

### **3.6.2.4 Atividade das transaminases de alanina e aspartato**

A atividade da ALT ( $\text{U mg proteína}^{-1}$ ) e da AST ( $\text{U mg proteína}^{-1}$ ) foram determinadas em fígado, músculo e plasma utilizando kit comercial Labtest<sup>®</sup> (ref. 108 e 109, respectivamente) de acordo com as instruções do fabricante. O princípio da técnica caracteriza na catálise da transferência do grupo amina da alanina (para a ALT do sobrenadante da amostra) ou do ácido aspártico (para a AST do sobrenadante da amostra) com a formação de piruvato e oxalacetato, respectivamente. O piruvato é reduzido a lactato pela ação da lactato desidrogenase (LDH) e o oxalacetato reduzido pela malato desidrogenase (MDH), enquanto a coenzima NADH é oxidada à NAD. A redução da absorbância a  $\lambda = 340 \text{ nm}$ , foi monitorada fotometricamente (DU<sup>®</sup> 520, Beckman) e é diretamente proporcional à atividade da ALT e AST na amostra. Os resultados expressos em  $\text{U mg proteína}^{-1}$ .

---

### **3.6.3 Metabólicos intermediários**

Amostras de fígado (50 mg) ou de músculo branco (100 mg) foram homogeneizadas em Ultra Turrax (IKA® T10) por 1 minuto em banho de gelo com a adição de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 20% (extrato ácido; para determinação de amônia, lactato e piruvato) ou 1 mL de água destilada (extrato neutro; para determinação de glicose, aminoácidos livres e proteínas). Os homogeneizados foram centrifugados por 3 minutos a 12000 g, 4°C. Para as determinações plasmáticas, uma alíquota de plasma (100µL) foi misturada diretamente a 1 mL de TCA 20% ou a 1 mL de água destilada. Nas amostras de fígado e músculo branco (25 mg cada) foram adicionados 250 µL de hidróxido de potássio (KOH) 6N (extrato básico) para determinação da concentração de glicogênio.

#### **3.6.3.1 Amônia**

A amônia ( $\mu\text{mol g tecido}^{-1}$ ) foi determinada segundo Gentzkow e Masen (1942). Nos sobrenadantes dos homogeneizados de fígado, músculo branco e em plasma foi adicionada água destilada para um volume final de 2 mL e em seguida 0,5 mL de reativo de Nessler. A leitura foi realizada em  $\lambda = 420 \text{ nm}$  e comparadas a um padrão de amônia (1 mM).

#### **3.6.3.2 Lactato**

A determinação do lactato ( $\mu\text{mol g tecido}^{-1}$ ) foi realizada segundo Harrower e Brown (1972). Nos sobrenadantes do homogeneizados de fígado, músculo branco e em plasma foram adicionados 20 µL de  $\text{CuSO}_4$  4%, 3,5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e incubados a 100°C por 5 minutos. Após resfriamento em banho de gelo, foram adicionados 80 µL de p-fenilfenol e incubados novamente por 1 hora. Em seguida, novamente era realizada uma incubação a 100°C e após resfriamento das amostras, a absorbância era lida em  $\lambda = 570 \text{ nm}$ , comparando com um padrão de lactato (1 mM).

#### **3.6.3.3 Piruvato**

O piruvato ( $\mu\text{mol g tecido}^{-1}$ ) foi determinado seguindo a metodologia de Lu (1939), onde a um volume de sobrenadante dos homogeneizados de fígado, músculo branco e em plasma foram adicionados 250 µL de dinitrofenilhidrazina

---

0,1% (em HCl 2 N). Após incubação por 30 minutos em banho Maria (37°C), foram adicionados 3 mL de NaOH 1,3 N. As concentrações de piruvato foram determinadas a partir da absorbância da amostra a  $\lambda = 440$  nm comparando com um padrão de piruvato (1 mM).

#### **3.6.3.4 Glicose**

A determinação da glicose foi realizada utilizando um kit comercial Labtest® (ref. 133) de acordo com as instruções do fabricante. A glicose oxidase presente nos homogeneizados das amostras e no plasma (10-20  $\mu$ L) catalisa a oxidação da glicose formando peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) como produto. O  $H_2O_2$  reage com 4-aminoantipirina e fenol formando antipirilquinonimina vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra. As leituras das absorbâncias das amostras foram feitas em espectrofotômetro de microplacas (Termomax®, Molecular Devices) em  $\lambda = 525$  nm comparando com um padrão de glicose (1 mg mL<sup>-1</sup>). Os resultados expressos em  $\mu$ mol g tecido<sup>-1</sup>.

#### **3.6.3.5 Aminoácidos livres**

A determinação dos aminoácidos livres ( $\mu$ mol g tecido<sup>-1</sup>) foi realizada de acordo com Copley (1941). Em uma porção do sobrenadante dos homogeneizados de fígado, músculo e em plasma eram adicionados 2 mL de nihidrina 0,1% (em álcool isopropílico). Os tubos foram vedados e incubados por 40 minutos a 40°C; centrifugados por 2 minutos a 3000 g e lidos em espectrofotômetro em  $\lambda = 570$  nm, contra um padrão de glicina (1 mM).

#### **3.6.3.6 Glicogênio**

A concentração de glicogênio foi determinada pela concentração de açúcares redutores total na amostra, segundo metodologia descrita por Dubois et al. (1956) e adaptada por Bidinotto et al. (1997). Para isso, em porções de músculo branco e fígado (250  $\mu$ L), previamente preparadas em KOH 6 N e incubados a 100°C por 5 minutos, foram adicionados 3 mL de etanol P.A. e 100  $\mu$ L de sulfato de potássio ( $K_2SO_4$ ). Os tubos foram agitados em vortex e o sobrenadante descartado com a inversão do tubo. O precipitado foi re-diluído em 2,5 mL de água destilada e em seguida adicionados 0,5 mL de fenol e 2 mL de  $H_2SO_4$ . As leituras eram realizadas

---

em  $\lambda = 480$  nm contra um padrão de glicose (1mM) e expressas em  $\mu\text{mol}$  de glicosil-glicose  $\text{g tecido}^{-1}$ .

#### **3.6.4 Biomarcadores do estresse oxidativo (enzimático e não-enzimático)**

Amostras de fígado (50 mg) foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 7,8; ou tampão tris-HCl 100 mM, EDTA 2 mM e  $\text{MgCl}_2$  5 mM, pH 7,7 e centrifugadas a 10000 g, 4°C por 10 minutos, para obtenção do sobrenadante, o qual foi utilizado como fonte enzimática para os biomarcadores de desintoxicação, antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

##### **3.6.4.1 Etoxiresorufina-O-desetilase**

A atividade da EROD foi estimada pela taxa de conversão da 7-etoxiresorufina á resorufina, de acordo com o protocolo descrito por Eggens e Galgani (1992) e modificado por Oliveira et al. (2014). A 50  $\mu\text{L}$  de homogeneizado de fígado foi adicionado o meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0); NADPH 2 mM e 7-etoxiresorufina 0,1 mM. A fluorescência resultante da formação da resorufina foi medida durante 30 minutos em intervalos de 1 minuto em  $\lambda = 530$  nm de excitação e  $\lambda = 590$  nm de emissão. Os resultados foram expressos em  $\text{nmol resorufina min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ .

##### **3.6.4.2 Superóxido dismutase**

A atividade da SOD em fígado foi determinada segundo a metodologia descrita por McCord e Fridovich (1969) medidas através da inibição da taxa de redução do citocromo C pelo radical superóxido por meio do sistema xantina/xantina oxidase, onde uma unidade de SOD foi definida como a quantidade necessária para inibir, em 50%, a redução do citocromo C do sistema. Em 5  $\mu\text{L}$  de volume do homogeneizado, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de xantina oxidase (XOD) e 285  $\mu\text{L}$  de solução de reação (tampão fosfato 0,2 M, pH 7,8; xantina 0,5 mM; KCN 0,2 mM; citocromo C 0,1 mM; EDTA 1 mM). As leituras das absorvâncias das amostras foram feitas em  $\lambda = 550$  nm durante 1 minuto em intervalos de 20 segundos. Os resultados foram expressos em  $\text{U SOD min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ .

### **3.6.4.3 Catalase**

A atividade da CAT (U mg proteína<sup>-1</sup>) foi mensurada, segundo a metodologia descrita por Beutler (1975), medidas através do decréscimo contínuo da concentração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em  $\lambda = 240$  nm. A diminuição da absorvância foi registrada em cubeta contendo 1 mL de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contendo 15 mM de tampão (tris 1 M; EDTA 5 mM, pH 8,0) e 10  $\mu$ L do homogeneizado por 1 minuto.

### **3.6.4.4 Glutaciona peroxidase**

A atividade da GPx (U mg proteína<sup>-1</sup>) foi determinada seguindo o método de Beutler (1984), o qual está baseado na oxidação do NADPH. Em 30  $\mu$ L de tampão de reação (Tris 1 M; EDTA 5 mM, pH 7,7) foram adicionados 71  $\mu$ L de água destilada; 6  $\mu$ L de glutaciona reduzida 0,1 M; 30  $\mu$ L de glutaciona redutase (3 UI); 30  $\mu$ L NADPH 2 mM; 114  $\mu$ L de azida sódica 2,6  $\mu$ M e 10  $\mu$ L de amostra de fígado. Após 2 minutos de incubação, foram adicionados aos poços da microplaca, 9  $\mu$ L de solução de T-butil 7 mM. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices) em  $\lambda = 340$  nm, durante 2 minutos com intervalos de 15 segundos entre as leituras.

### **3.6.4.5 Glutaciona S-transferase**

A atividade da GST (U mg proteína<sup>-1</sup>) foi determinada segundo método descrito por Habig e Jakobi (1981), utilizando-se 1-cloro-2-4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato, sendo que uma unidade de GST foi definida como a quantidade de enzima que catalisa 1  $\mu$ M de CDNB por minuto. Em 15  $\mu$ L do sobrenadante foram adicionados 235  $\mu$ L de solução de reação (tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH7,0 acrescido de solução CDNB 0,05 M) e 10  $\mu$ L de GSH 25 mM. As leituras foram realizadas em  $\lambda = 340$  nm, durante 4 minutos com intervalos de 30 segundos.

### **3.6.4.6 Glutaciona redutase**

A atividade da GR em fígado foi determinada segundo Carlberg e Mannervik (1975), a qual foi medida através da redução do NADPH, utilizando a glutaciona oxidada (GSSG) como substrato. Uma unidade de GR foi definida como a

---

oxidação de 1  $\mu\text{M}$  de NADPH  $\text{min}^{-1}$ . Ao meio de reação (tampão fosfato sódio 0,1M, pH7,6; EDTA 5 mM; NADPH 0,1 mM e GSSG 1 mM) foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de homogeneizado das amostras e as leituras das absorbâncias foram realizadas em  $\lambda = 340 \text{ nm}$ . Uma unidade de GR foi definida como a oxidação de 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH  $\text{min}^{-1}$  nessas condições e expressas em mU  $\text{mg}$  proteína $^{-1}$ .

#### **3.6.4.7 Glutathiona**

A concentração de GSH (nmol GSH  $\text{mg}$  proteína $^{-1}$ ) foi determinada utilizando a metodologia descrita por White et al. (2003), a qual foi medida pela conjugação de 2,3 naftalenedicarboxialdeído (NDA) 10 mM ao GSH do sobrenadante da amostra formando um composto fluorescente. Em uma microplaca de fundo cônico foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de homogeneizado de fígado e 100  $\mu\text{L}$  de ácido sulfosalicílico 200 mM (relação v:v). A mistura foi incubada por 20 minutos em temperatura ambiente e em seguida, centrifugado a 10408  $g$  ( $4^{\circ}\text{C}$ ) por 5 minutos. Em uma placa própria para fluorescência, foram pipetadas uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e 180  $\mu\text{L}$  de solução fluorescente (solução tris base 50 mM, pH 10,0; NaOH 500 mM; NDA 10 mM), incubadas por 30 minutos no escuro e em temperatura ambiente. As leituras de fluorescência foram feitas em espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices) em  $\lambda = 472 \text{ nm}$  de excitação e  $\lambda = 528 \text{ nm}$  de emissão contra uma curva padrão de GSH (40 nM).

#### **3.6.4.8 Proteínas carboniladas**

A oxidação proteica foi determinada segundo a metodologia descrita por Levine et al. (1994), sendo que a determinação do conteúdo de PC está baseada na reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH). Em 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de meio de reação (DNPH 10 mM; HCL 2M) ou 500  $\mu\text{L}$  de HCL 2 M aos seus respectivos controle negativo. Em seguida todos os tubos foram incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 90 minutos, seguidos por um banho rápido de gelo. Posteriormente, foram adicionados 700  $\mu\text{L}$  de TCA 28%, misturados em vórtex e centrifugados a 9000  $g$  por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 1 mL de etanol-acetato de etila (1:1) gelado, misturados e centrifugados. O sobrenadante resultante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 500  $\mu\text{L}$  de hidrocloreto de guanidina 6 M,

---

misturados e centrifugados a 9000 g (4°C) por 3 minutos. Em poços de microplaca foram pipetados 200 µL do homogeneizado e seus respectivos controles negativo (em duplicata). A absorbância foi lida em espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices) em  $\lambda = 370$  nm e subtraída da queda do respectivo controle. Os resultados foram expressos em nmol PC mg proteína<sup>-1</sup>.

#### **3.6.4.9 Peroxidação lipídica das membranas**

A LPO foi determinada pelo método de TBARS (*thiobarbituric acid-reactive substances*) que se baseia na reação do malondialdeído (MDA), um composto formado pela oxidação de lipídios, com ácido tiobarbitúrico (TBA) e é dada em equivalentes de MDA (nmol MDA mg proteína<sup>-1</sup>) de acordo com Satoh (1978) e modificações descritas por Wilhelm Filho et al. (2005). A 100 µL de homogeneizado do fígado foram adicionados 600 µL TCA 20% (proporção 1:6; v:v) e centrifugados a 2000 g por 10 minutos a 4°C. Ao sobrenadante foi adicionado ácido sulfúrico 0,05 M e TBA 0,67%. Essa solução foi incubada em banho-maria fervente por 60 minutos e então resfriada em gelo por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado álcool n-butílico e os sobrenadantes centrifugados a 1000 g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram utilizados para leitura da absorbância em espectrofotômetro a  $\lambda = 530$  nm contra um padrão de MDA (250 µM).

### **3.7 Biomarcadores morfológicos**

Amostras de fígado previamente fixadas em GTA durante 24-48 horas foram desidratadas (em série crescente de etanol 50 a 100%) e incluídas em Histoiresina<sup>®</sup> (Leica) para análise em microscopia de luz (ML) e em resina SPURR (EMS - *Low Viscosity Embedding Media*) para análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para ML, secções histológicas (3 µm de espessura) foram obtidas para as análises histopatológicas do fígado e histomorfologia hepato-biliar e coradas com azul de toluidina e fuccina básica. As amostras de fígado previamente fixadas em solução de Bouin (por 24-48 horas) foram desidratadas em séries crescentes em etanol (50 a 100%) e incluídas em parafina histológica. Secções histológicas (6 µm de espessura) foram obtidas para análise de fibrose hepática e imunohistoquímica para marcação de células em proliferação.

---

Todos os cortes histológicos analisados em microscopia de luz foram confeccionados em micrótomo (MICRON HM 360) e analisadas em microscópio de luz (BX 51, Olympus, Denmark) utilizando o software Olympus DP2 – B5W.

### **3.7.1 Análises da histomorfologia hepato-biliar e histopatologia de fígado**

As análises histomorfológicas hepato-biliares foram investigadas concomitantemente às análises histopatológicas, considerando alterações morfológicas visíveis dos ductos e estruturais das células.

A identificação de tecido fibroso no fígado foi realizada com tricrômio de Masson (com azul de anilina), utilizando um kit comercial (EasyPath, ref. EP-11-20013) para tecido conjuntivo, segundo orientações do fabricante. Os cortes foram desparafinizados em xilol e em seguida, hidratadas em série decrescente de etanol (100 – 50%) até água corrente. A coloração final permite identificar a presença de fibrose no tecido hepático corados em azul.

As análises histopatológicas e fibrose do fígado foram classificadas por um escore, dependendo da distribuição da lesão no órgão, onde (1) indica ausência de ocorrência; (2) ocorrência rara; (3) pouca ocorrência; (4) moderada ocorrência; (5) severa ocorrência (lesões difusas), em relação a um fator de importância da lesão que indica como tal alteração afetaria a função do órgão e a possibilidade do peixe à sobrevivência. As alterações estão descritas na Tabela 2, onde (1) representa lesões facilmente reversíveis e com mínima importância patológica; (2) lesões reversíveis quando o agente estressor é neutralizada e então, moderada importância patológica e (3) lesões geralmente irreversíveis e de extrema importância patológica. Para cada alteração foi determinado um índice da lesão no órgão ( $IL_{org}$ ), que é a multiplicação do fator de importância ( $F_i$ ) da lesão pelo valor do escore ( $S_c$ ):  $IL_{org} = F_i \times S_c$ ; e expresso em porcentagem da variação em relação ao grupo controle, como proposto por Bernet et al. (1999), com modificações.

**Tabela 2.** Alterações histopatológicas em fígado e fator de importância em relação ao órgão e organismo, de acordo com Bernet et al. (1999).

<b>Alterações em fígado</b>	<b>Fator de Importância</b>
Acúmulos substâncias intracelulares	1
Alterações nucleares	1
Alteração da arquitetura hepática e estrutura celular	1
Aneurisma	1
Atrofia celular	2
Centros de melano-macrófagos	1
Degeneração citoplasmática	1
Hemorragia	1
Hipertrofia	1
Hiperemia	1
Necrose	3
Fibrose	2

1 = mínima importância patológica; 2 = moderada importância patológica e 3 = extrema importância patológica.

### 3.7.2 Histoquímica para glicogênio

Para a avaliação do glicogênio hepático foi efetuada histoquímica para carboidratos, utilizando ácido periódico de Schiff (PAS) como descrito por Mello e Vidal (1980). O glicogênio (PAS-positivo) foi identificado contra um controle positivo do próprio animal após digestão por diastase ( $\alpha$ -amilase - Sigma-Aldrich). O conteúdo de glicogênio foi semi-quantificado seguindo um gradiente de coloração, segundo descrito por Camargo e Martinez (2007), onde (0) indica nenhum glicogênio; (1) pouco glicogênio; (2) média quantidade de glicogênio e (3) grande quantidade de glicogênio.

### 3.7.3 Análise ultraestrutural de hepatócitos

Amostras fixadas em GTA foram lavadas em solução tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) por três vezes, 10 min cada vez em agitador rotativo (TE-165, Tecnal) e pós-fixadas em OsO<sub>4</sub> 1% por 4 horas. Para remover o excesso do ósmio as amostras foram lavadas novamente em tampão fosfato por 3 vezes como descrito acima e, em seguida, lavadas em solução salina 0,9% com sacarose 10,56% (2 vezes, 15 minutos cada) antes (e depois) da contrastação (em bloco) com acetato de uranila em sacarose 10,56%. O processo de inclusão iniciou-se com a desidratação em série crescente de acetona (30% a 100% - por 10 minutos),

---

acetona-resina (3:1; 1:1; 3:1 – ‘overnight’), embebidas em resina SPURR pura por 2 horas e finalmente incluídas com a mesma resina em moldes de silicone (48-72 h para polimerização). Após inclusão foi feita a trimagem dos blocos selecionando a região a ser observada em MET.

Cortes ultrafinos (60 nm) foram obtidos com o ultramicrotomo (Leica UltraCut R.) e colocados em uma grade de cobre (Specimen Grid 3.05 diameter, 0,8 thickness cooper, 200 mesh T200-Cu). Os cortes foram contrastados em acetato de uranila saturada em etanol 50% e solução de Reynolds (citrato de chumbo) e por fim analisados (estrutura celular e organelas) e fotografados em microscópio eletrônico de transmissão (Philips CM-120).

#### **3.7.4 Imunomarcação nuclear para antígeno de proliferação celular**

Proliferação celular no tecido hepático foi identificada utilizando o anticorpo monoclonal (PC10, Oncogene), específico para o antígeno 36-kDa (não histona) de núcleos em divisão, ou seja, proliferação celular (PCNA).

Após desparafinização e durante o processo de hidratação do tecido, a atividade das peroxidase endógenas foi inibida com solução de MeOH com 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 30 minutos. Após hidratação, as lâminas histológicas foram imersas em solução aquosa de ZnSO<sub>4</sub> 1% a 45°C por 5 minutos para recuperação do antígeno e, em seguida, em água destilada gelada (4°C) por 5 minutos para rompimento das membranas nucleares para permitir a ligação do anticorpo ao antígeno PCNA. Em seguida, as secções foram lavados em tampão tris-salino com triton 0,1% (TBS-T) por 20 minutos e incubadas com o anticorpo primário PCNA PC-10 (diluídos 1:100) em câmara úmida “overnight”.

As secções histológicas foram lavadas novamente em TBS-T por 20 minutos e incubadas durante 1 hora em câmara úmida com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase, GAMPO (*goat anti-mouse peroxidase conjugated*, Milipore) diluído 1:1000. Após incubação, as secções foram lavadas em tampão tris (TB) por 20 minutos e colorado com DAB-Ni 0,5% (3,3'-diaminobenzidina, Sigma-Aldrich) para visualização do complexo formado.

A avaliação da proliferação celular foi realizada segundo descrito por Strefezzi et al. (2010). Os núcleos marcados foram manualmente contados (magnificação de 400x) e expressos em porcentagem de núcleos positivos em

---

1000 núcleos. Foram considerados núcleos positivos todos os núcleos fracamente ou fortemente marcados (tons de cinza a preto) conforme realizados por outros autores (Simões et al., 1994; Abadie et al., 1999; Sakai et al., 2002; Scase et al., 2006), uma vez que a marcação depende do estágio de síntese proteica na célula.

### **3.8 Análises estatísticas**

Os parâmetros analíticos das cromatografias líquida de alta eficiência e quantificação de MC foram avaliados pela análise de variância One-way (ANOVA) através do software Origin Pro 8 e mostrados como média e desvio padrão (média  $\pm$  D.P.).

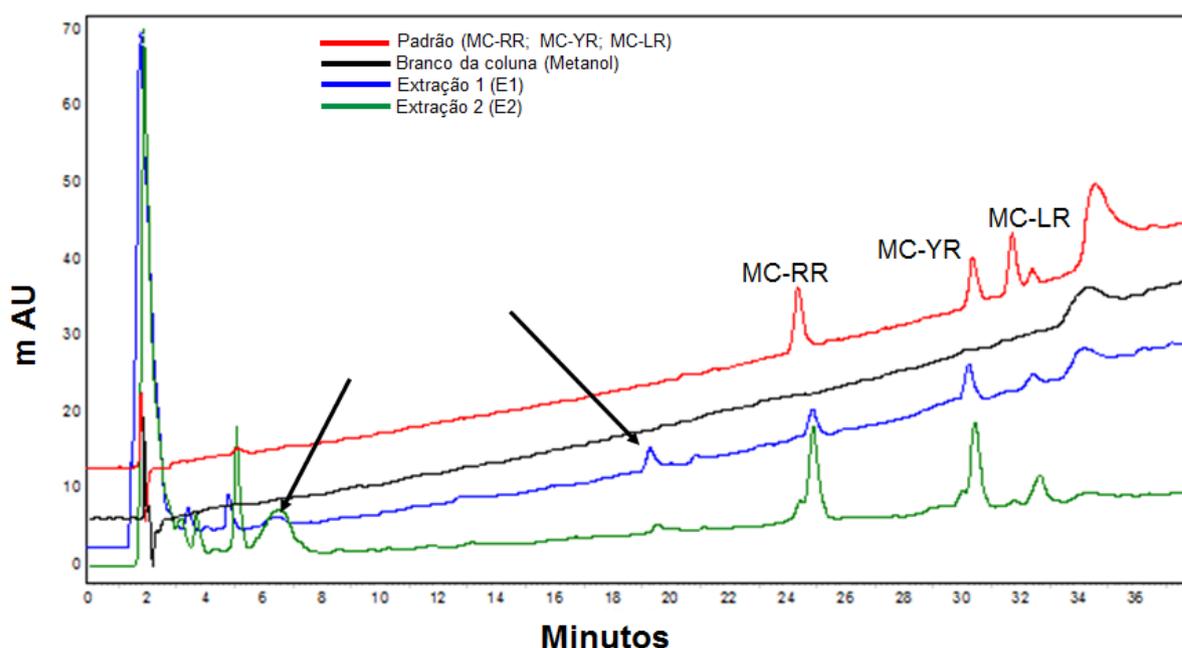
Os demais dados obtidos foram expressos em média  $\pm$  E.P.M. (erro padrão da média). Para os biomarcadores foram aplicados o teste de distribuição normal D'agostino & Pearson (para  $n \geq 8$ ) ou Kolmogorov-Smirnov (para  $n \geq 5$  e  $\leq 7$ ). Para cada parâmetro analisado, as diferenças entre o grupo MC e seu respectivo controle (para cada tempo de exposição), foi aplicado o test-t de Student não-pareado ou seu correspondente não-paramétrico Mann-Whitney, de acordo com os critérios de normalidade, homogeneidade e homocedasticidade. A diferença entre os grupos MC do EA e entre controles foi utilizada o teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni ou seu correspondente não paramétrico Kruskal-Wallis e pós-teste Dunns.

Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prisma 5.0, onde foram considerados diferenças ao nível de 95% de significância ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Microcistinas presentes no extrato bruto

A identificação das MCs do extrato bruto está representada na Figura 8. Comparando o cromatograma do padrão (MC-RR; MC-YR; MC-LR) com os cromatogramas dos extratos, pelo tempo de retenção de cada variante, observou-se que as variantes RR e YR são majoritárias nessa linhagem de cepa (R28), presente em ambas as extrações (E1 e E2). Outras substâncias podem ser observadas em tempos de retenções diferentes, entretanto, em quantidades inferiores. Os dados médios da quantificação das extrações por ELISA e CLAE-UV estão apresentados na Tabela 3.



**Figura 8.** Cromatograma de identificação de microcistinas no extrato da cianobactéria *Radiocystis fernandoi* (cepa R28). Linha vermelha – Mistura padrão de MC-RR, MC-YR e MC-LR. Linha preta – branco da coluna (solvente). Linha azul – Extração 1 (E1) e linha verde – Extração 2 (E2). Setas indicam presença de outras variantes no extrato bruto.  $\lambda = 240$  nm.

**Tabela 3.** Quantificação de microcistinas presentes no extrato bruto de *Radiocystis fernandoi*, cepa R28.

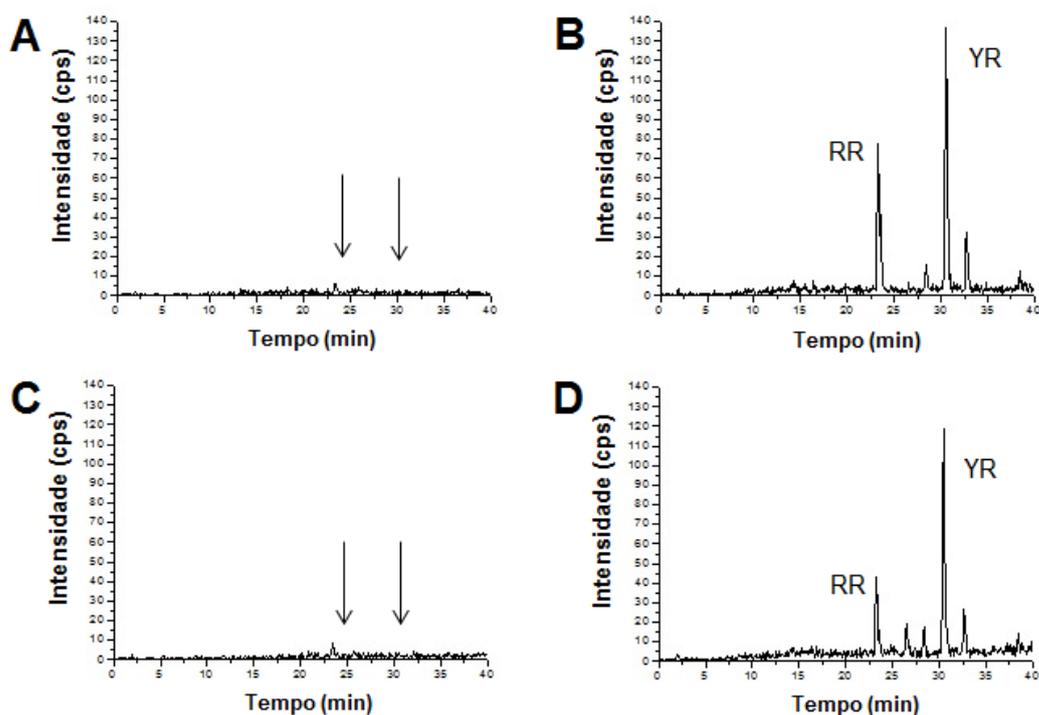
Quantificação de Microcistinas				
Extração	Diluição Final	ELISA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	CLAE-UV ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	
		MC-LR <sub>eq</sub>	MC-RR	MC-YR
E1	6 mL	121,69	27,35	29,36
E2	11 mL	439,92	322,93	206,52

E1 = Extração 1 (655,08 mg cianobactéria); E2= Extração 2 (2426,00 mg cianobactéria); ELISA = *Enzime-Linked Immunosorbent Assay*; CLAE-UV = Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao detector ultravioleta,  $\lambda = 240$  nm.

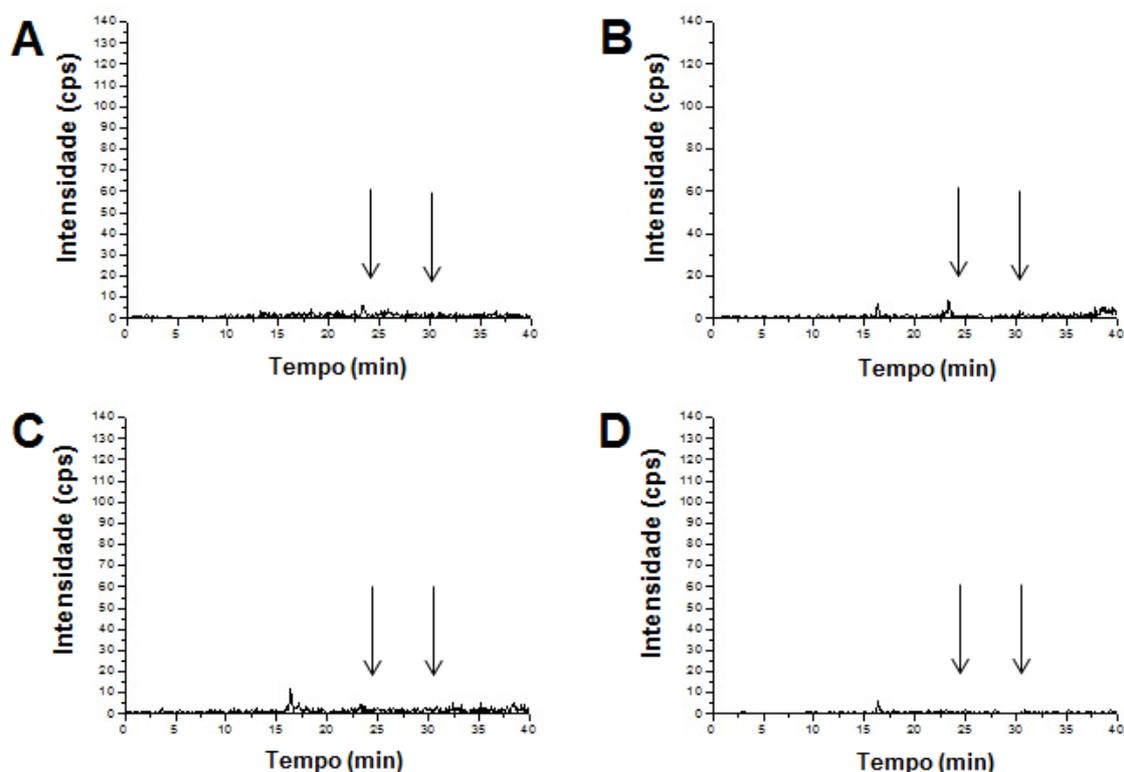
## 4.2 Exposição aguda

### 4.2.1 Acumulação de microcistinas nos tecidos

Os cromatogramas do experimento de MRM obtidos por espectrometria de massas, para a quantificação de MCs em fígado e músculo estão apresentados nas Figuras 9 e 10, respectivamente. A variante MC-RR foi identificada nos extratos de fígado e músculo, mas não foi quantificada por apresentar concentração abaixo do limite de detecção. Não houve acumulação de MCs no músculo branco. A Tabela 4 mostra a quantificação da variante MC-YR no fígado e músculo de *H. malabaricus* 24 e 96 h após injeção de extrato bruto de *R. fernandoi*.



**Figura 9.** Cromatogramas do experimento de monitoramento de reações múltiplas (MRM) do fígado de *Hoplias malabaricus* 12h e 96h após injeção intraperitoneal com microcistina presente no extrato bruto de *Radiocystis fernandoi*. (A) grupo controle 12h; (B) grupo MC 12h.; (C) Grupo controle 96 horas e (D) Grupo MC 96h. As setas indicam ausência de MC nos tempos de retenção para as variantes MC-RR (24,3 min) e MC-YR (30,5 min) nos grupos controles. cps = contagem por segundo.



**Figura 10.** Cromatogramas do experimento de monitoramento de reações múltiplas (MRM) do músculo branco de *Hoplias malabaricus* 12h e 96h após injeção intraperitoneal com microcistina presente no extrato bruto de *Radiocystis fernandoi*. (A) grupo controle 12h; (B) grupo MC 12h; (C) Grupo controle 96 horas e (D) Grupo MC 96h. As setas indicam ausência de MC nos tempos de retenção para as variantes MC-RR (24,3 min) e MC-YR (30,5 min) nos grupos controles. cps = contagem por segundo.

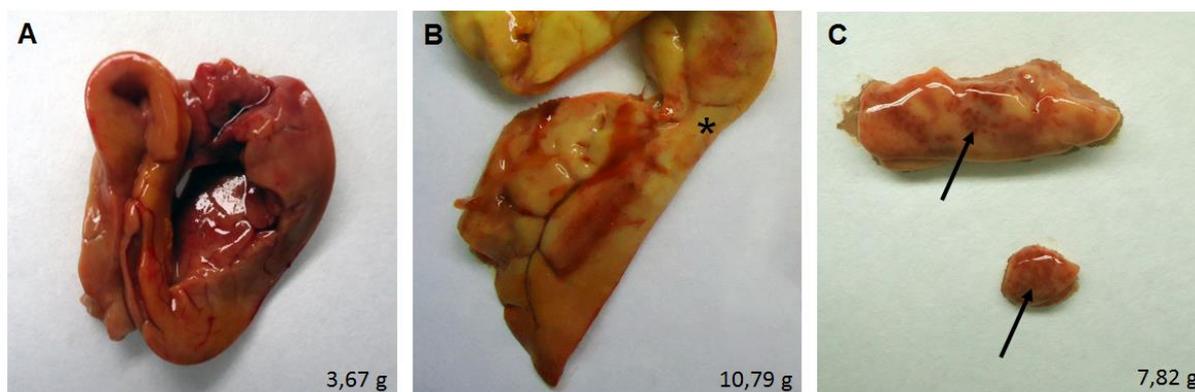
**Tabela 4.** Média ( $\pm$  D.P.) de microcistinas acumuladas no fígado e músculo de *Hoplias malabaricus* 12h (C12 e MC12) e 96h (C96 e MC96) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

Acumulação de Microcistinas				
Grupos	MC-RR (ng mg tecido <sup>-1</sup> )		MC-YR (ng mg tecido <sup>-1</sup> )	
	Fígado	Músculo	Fígado	Músculo
MC12	---	---	135,7 $\pm$ 17, 2	---
MC96	---	---	47,4 $\pm$ 8,8	---

C = grupos controle; MC = grupos microcistinas (n=3 pools); (---) indica ausência de microcistinas ou acúmulo abaixo do limite de detecção no tecido (10 ng mL<sup>-1</sup> extrato<sup>-1</sup>).

#### 4.2.2 Comprometimento morfofuncional hepático

Nenhum peixe morreu durante a EA e nenhuma alteração no comportamento foi observada. Macroscopicamente, os fígados dos peixes dos grupos controles apresentaram aspecto normal quanto à aparência (homogeneidade de cor e coloração marrom-avermelhada) e odor (Figura 11). O fígado dos animais MC12 e MC96 após injeção com extrato bruto de *R. fernandoi* apresentaram anormalidades morfológicas macroscópicas como coloração menos intensa e amarelada e áreas avermelhadas e não foram observadas diferenças entre 12 e 96 h quanto ao aspecto macroscópico dos fígados dos animais contaminados (Fig. 11B e 11C).

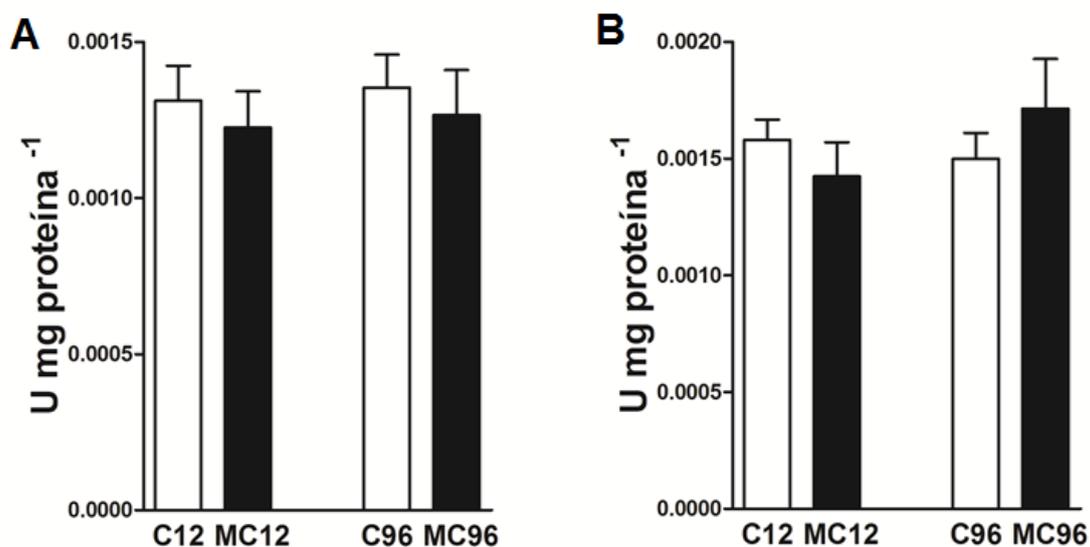


**Figura 11.** Fígado de *Hoplias malabaricus*. (A) Aspecto macroscópico do fígado de peixes dos grupos controles; (B e C) Aspecto do fígado dos peixes dos grupos expostos após 12h e 96h ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (\*) destaca a coloração amarelada do fígado (B) e setas indicam áreas avermelhadas sugerindo áreas hemorrágicas (em C).

Não houve alterações significativas na atividade hepática da PP1 e PP2A 12 e 96 h após injeção i.p. do extrato bruto de *R. fernandoi* comparado aos grupos controles (Figura 12).

Os biomarcadores de hepatotoxicidade estão apresentados na Tabela 5. Após 12 horas, a atividade plasmática da ALT aumentou 524% em relação ao controle, seguido de um aumento 2793% após 96 horas. Não foi possível detectar a atividade plasmática da AST em ambos os grupos amostrais (traços). O

conteúdo de BD aumentou 43% apenas após 96 horas de exposição i.p., enquanto a BT mostrou-se diminuída após 12 horas em relação ao controle e com uma diferença de 108% entre os grupos expostos às MCs. A atividade da FAC plasmática aumentou 93% após 12h e 64% após 96 h da i.p., enquanto nenhuma alteração na atividade da FAL foi observada entre os grupos (Figura 13).

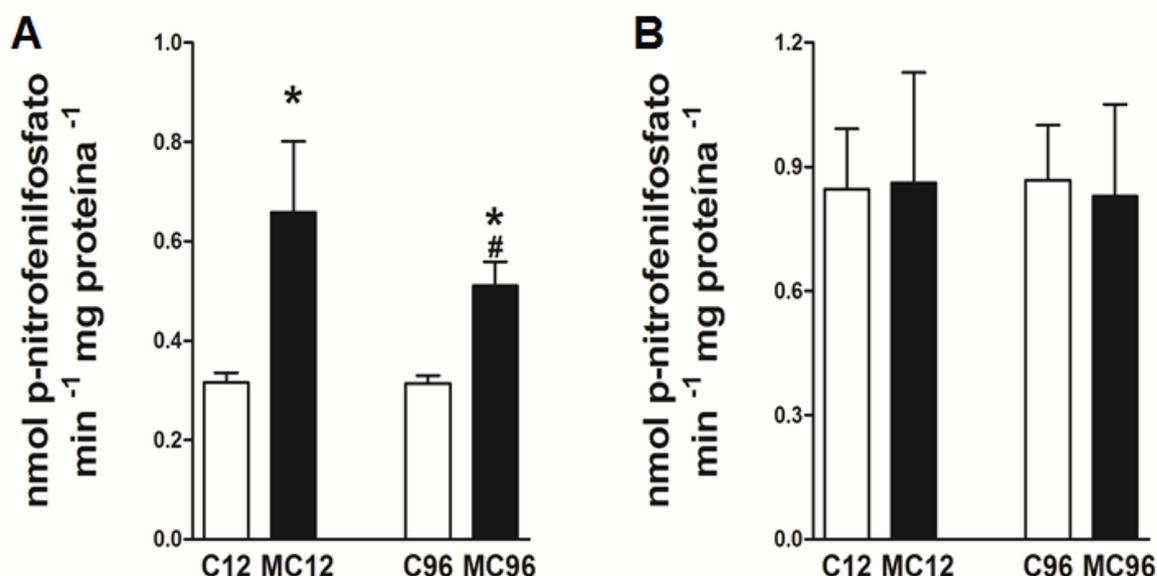


**Figura 12.** Atividade (média  $\pm$  E.P.M.) das proteínas fosfatases de serina/treonina em fígado de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Atividade da fosfatase PP1 e (B) da fosfatase PP2A.

**Tabela 5.** Valores ( $\pm$  E.P.M.) dos parâmetros plasmáticos de hepatotoxicidade de *Hoplias malabaricus* 12h (C12 e MC12) e 96h (C96 e MC96) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. ALT – Alanina Aminotransferase; AST – Aspartato Aminotransferase; BD – Bilirrubina Direta; BT – Bilirrubina Total.

Biomarcadores Plasmático de Hepatotoxicidade				
Grupos	Variáveis			
	ALT nmol min <sup>-1</sup> mg proteína <sup>-1</sup>	AST nmol min <sup>-1</sup> mg proteína <sup>-1</sup>	BD mg dL <sup>-1</sup>	BT mg dL <sup>-1</sup>
C12	0,45 $\pm$ 0,1	---	3,45 $\pm$ 0,2	5,17 $\pm$ 0,6
MC12	2,81 $\pm$ 0,8*	---	3,23 $\pm$ 0,2	3,37 $\pm$ 0,3*
C96	0,48 $\pm$ 0,1	---	3,68 $\pm$ 0,2	5,67 $\pm$ 0,7
MC96	13,89 $\pm$ 4,2*#	---	5,27 $\pm$ 0,5*	7,01 $\pm$ 1,0#

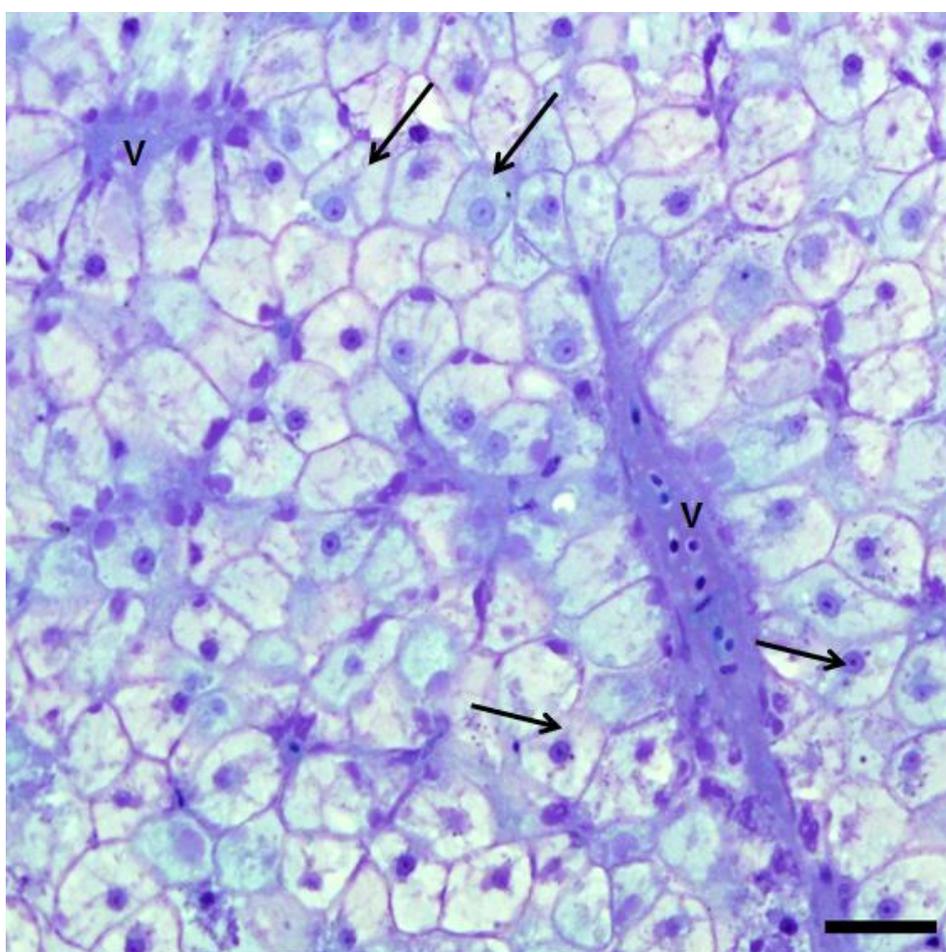
C = grupo controle; MC = grupo microcistina (n=10). (\*) Indica diferença ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle; (#) indica diferença ( $p < 0,05$ ) entre os períodos de exposição.



**Figura 13.** Atividade plasmática (média  $\pm$  E.P.M.) das proteínas fosfatases no plasma de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Fosfatases ácidas e (B)

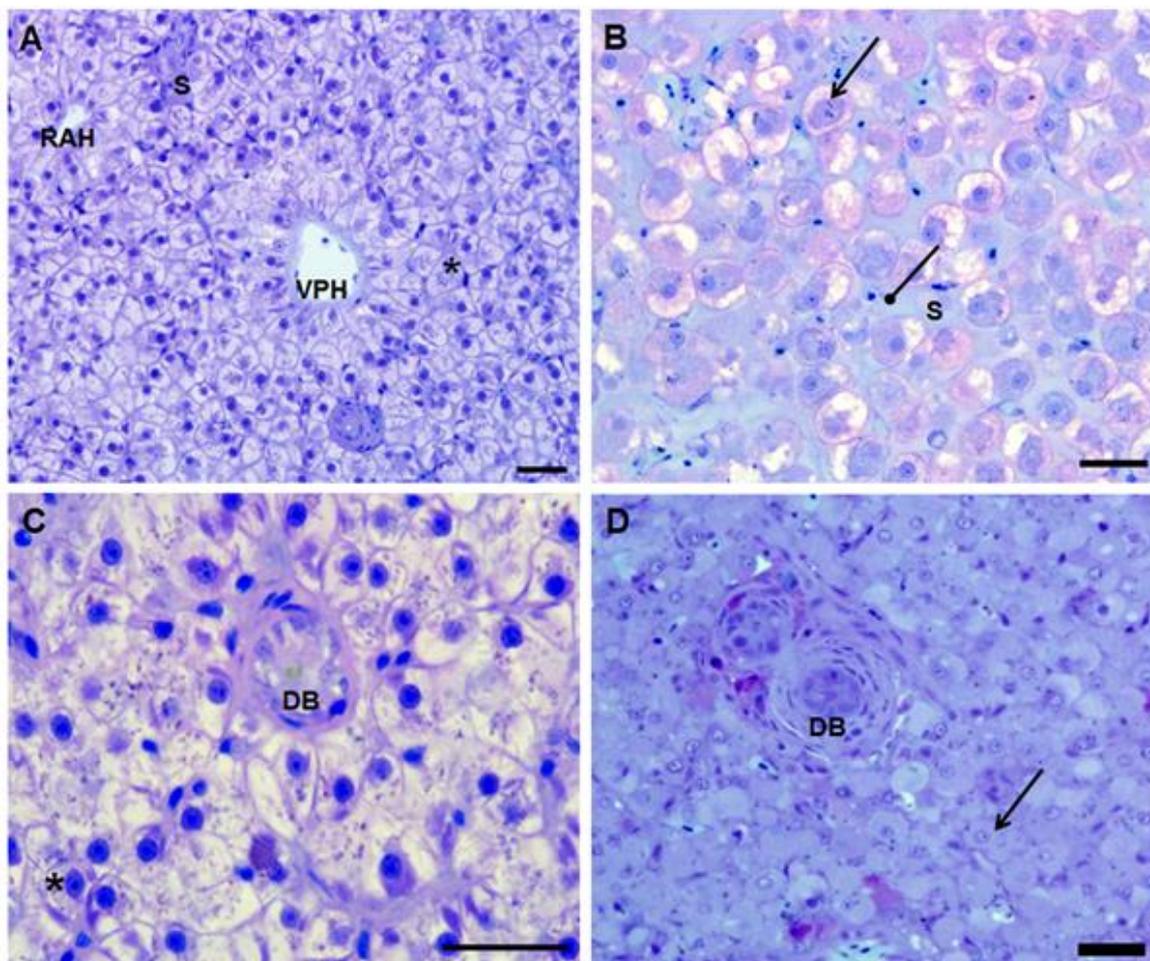
Fosfatases alcalinas. (\*) Indica diferença ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle; (#) indica diferença ( $p < 0,05$ ) entre os períodos de exposição.

O comprometimento da função hepática está relacionado à estrutura da arquitetura hepática e funcionamento dos seus componentes. A Figura 14 detalha a arquitetura hepática padrão dos animais do grupo controle da EA. O parênquima hepático mostrou-se bem homogêneo e com hepatócitos com formatos poligonais e núcleos esféricos e centralizados com presença de nucléolos. Não houve diferença entre a organização celular entre os controles do EA.



**Figura 14.** Arquitetura hepática de *Hoplias malabaricus* do grupo controle. Setas indicam hepatócitos com formatos poligonais e núcleos esféricos com presença de nucléolos. V = Vasos sanguíneos. Coloração: Azul de toluidina e fucsina básica. Escala = 20  $\mu\text{m}$ .

Houve alteração morfológica na arquitetura hepática em relação à morfologia dos hepatócitos após a injeção i.p. (Figura 15). Entretanto, quanto à morfologia celular e formação dos ductos biliares, não houve distinção entre os animais do grupo controle e expostos (Fig. 15C e 15D, respectivamente).



**Figura 15.** Arquitetura hepática e histomorfologia hepato-biliar de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Aspecto normal do fígado de peixes dos grupos controle; (B) Seta pontiaguda indica alteração na morfologia do hepatócito e seta redonda mostra hiperemia nos sinusóides em peixes expostos às MC. (C) morfologia dos ductos biliares de peixes dos grupos controle e (D) morfologia dos ductos biliares dos peixes expostos às MC; asteriscos indicam hepatócitos com normal morfologia; seta indica arredondamento na morfologia do hepatócito. RAH – Ramo Artéria Hepática; VPH – Veia Portal Hepática; DB – Ductos Biliares; S – Sinusóides. Coloração: azul de toluidina e fucsina básica. Escala 20 µm.

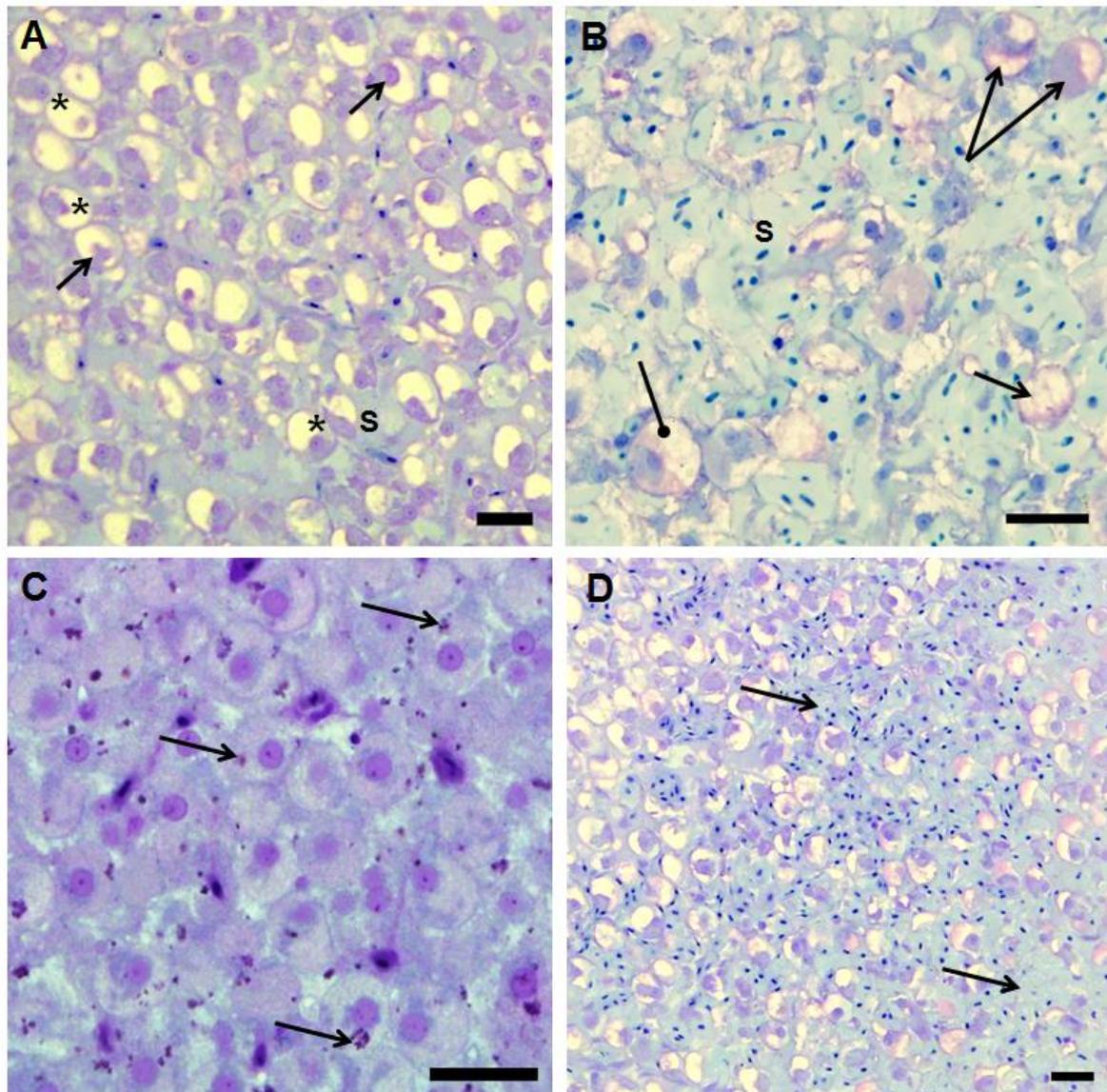
O  $IL_{org}$  médio do fígado está apresentado na Tabela 6. Após 12 horas da i.p., um acúmulo de substâncias intracelulares aumentou 61% em relação ao grupo controle. No EA, alteração da arquitetura hepática e celular aumentou 114% após 12 horas e 113% após 96 horas, assim como hipertrofia dos hepatócitos (206% e 259%, respectivamente) e alterações nucleares (104% e 69%, respectivamente). O grupo exposto às MCs por 96 horas apresentou um aumento de 50% de degeneração citoplasmática e 54% de hiperemia.

As principais patologias encontradas no fígado após a EA ( $\geq 40\%$  da variação do controle) em fígado estão representadas na Figura 16.

**Tabela 6.** Índice de lesão ( $IL_{org}$ ) histopatológica média no fígado de *Hoplias malabaricus* 12h (C12 e MC12) e 96h (C96 e MC96) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

<b>Índice de Lesão Histopatológica</b>						
<b>Alterações</b>	<b>C12</b>	<b>MC12</b>	<b>%</b>	<b>C96</b>	<b>MC96</b>	<b>%</b>
• Acúmulos de substâncias intracelulares	2,1	3,4	61	2,0	1,7	15
• Alteração da arquitetura celular e hepática	2,3	5,0	114	2,2	4,7	113
• Alteração nuclear	4,9	10,0	104	5,2	8,8	69
• Aneurisma	1,0	1,0	0	1,0	1,0	0
• Atrofia celular	2,4	3,2	31	2,4	2,4	0
• Centros de melano-macrófagos	1,3	1,3	0	1,3	1,4	8
• Degeneração citoplasmática	2,8	2,7	3	2,6	3,9	50
• Hemorragia	1,0	1,1	10	1,0	1,0	0
• Hipertrofia celular	1,1	3,4	206	1,1	3,9	254
• Hiperemia	2,4	3,2	31	2,4	3,7	54
• Necrose	4,3	4,2	3	4,2	5,1	21
• Fibrose	4,0	4,5	12	4,0	4,6	15

% do grupo MC em relação ao grupo controle.



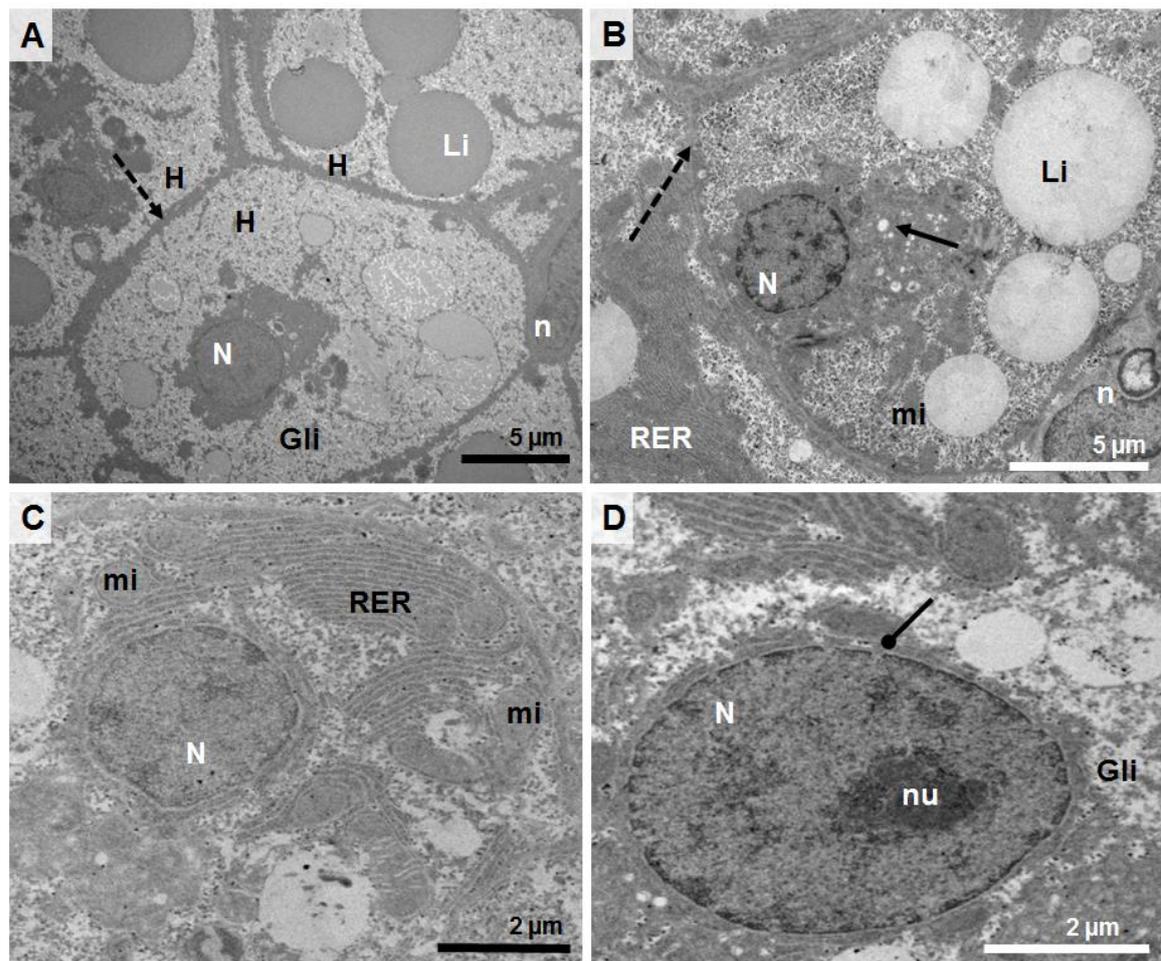
**Figura 16.** Alterações histopatológicas do fígado de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Setas indicam alterações nucleares e asterisco indica alteração na morfologia celular; (B) Setas pontiagudas mostram degeneração citoplasmática e a seta redonda, hipertrofia do hepatócito. Em (C) setas indicam inclusões citoplasmáticas; (D) seta aponta regiões com hiperemia nos sinusóides. S = sinusóides. Coloração: azul de toluidina e fucsina básica. Escala = 20  $\mu\text{m}$ .

---

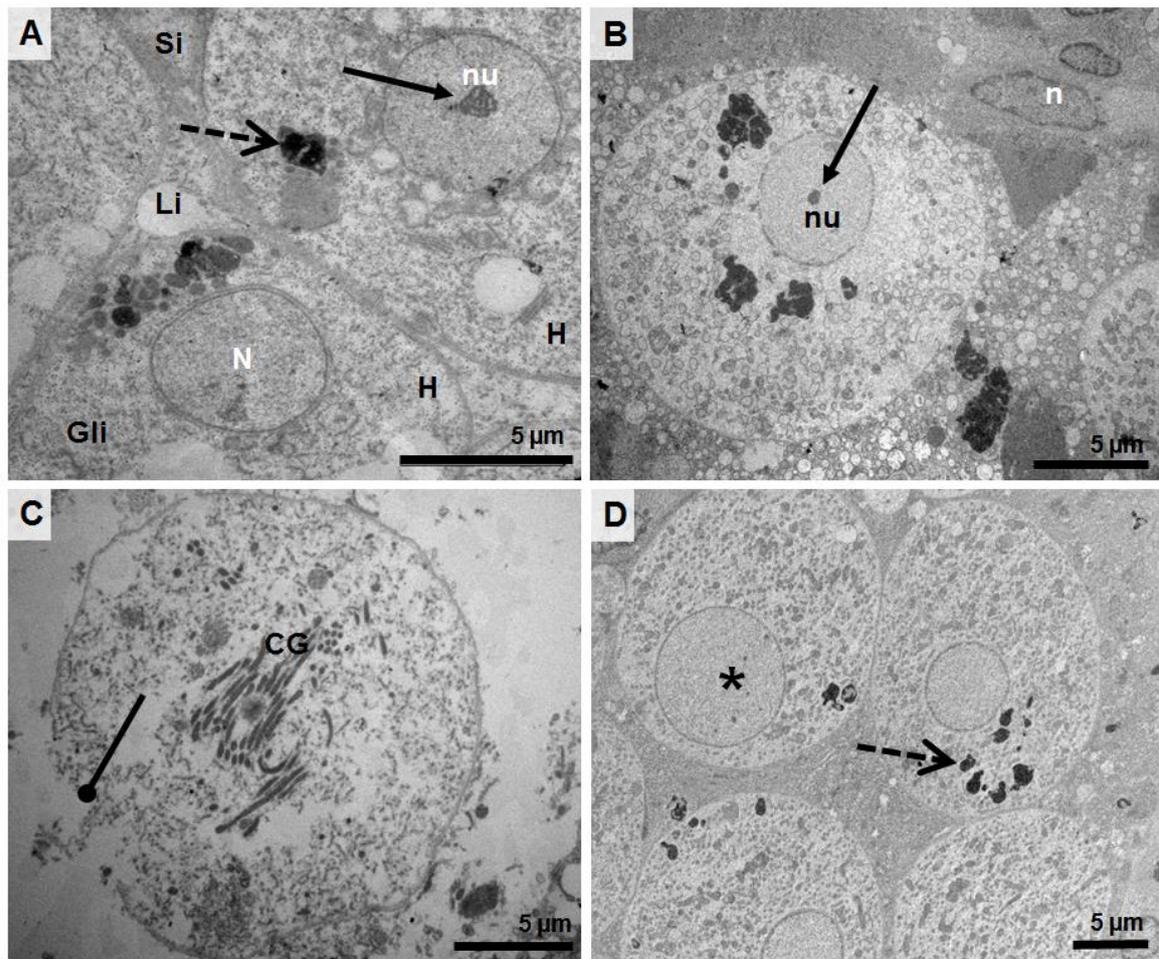
Quando analisados por microscopia eletrônica de transmissão, os hepatócitos dos animais do grupo controle apresentaram morfologia normal caracterizada por células poligonais fortemente unidas entre si por desmossomas e núcleo esférico, abundante retículo endoplasmático rugoso (RER) organizado paralelamente ao redor do núcleo e glicogênio e lipídeos, poucos lisossomos, complexo de Golgi e vacúolos visíveis e mitocôndrias distribuídas pelo citoplasma. Os núcleos dos hepatócitos apresentaram membranas intactas e, em vários deles, os nucléolos eram visíveis (Figura 17).

Nos peixes expostos às MC, os hepatócitos perderam a forma hexagonal e junções celulares ocorrendo a dissociação das células. Intensa desorganização citoplasmática foi comum em muitos hepatócitos como a presença de grânulos eletro-densos, hipertrofia nuclear e ausência de nucléolos e dilatação do complexo de Golgi (Figura 18). As reservas de lipídeos e glicogênio estavam reduzidas e várias organelas estavam desorganizadas mostrando degeneração citoplasmática, vacúolos e lisossomos (com ou sem presença de corpos mielínicos) e perda do retículo endoplasmático. O RER apresentou dilatação e espaçamento dos túbulos, ou estavam totalmente dispersos ou difusos (Figura 19). Houve modificação nas estruturas das mitocôndrias e do complexo de Golgi ao redor do núcleo de hepatócitos alterados (Figura 20).

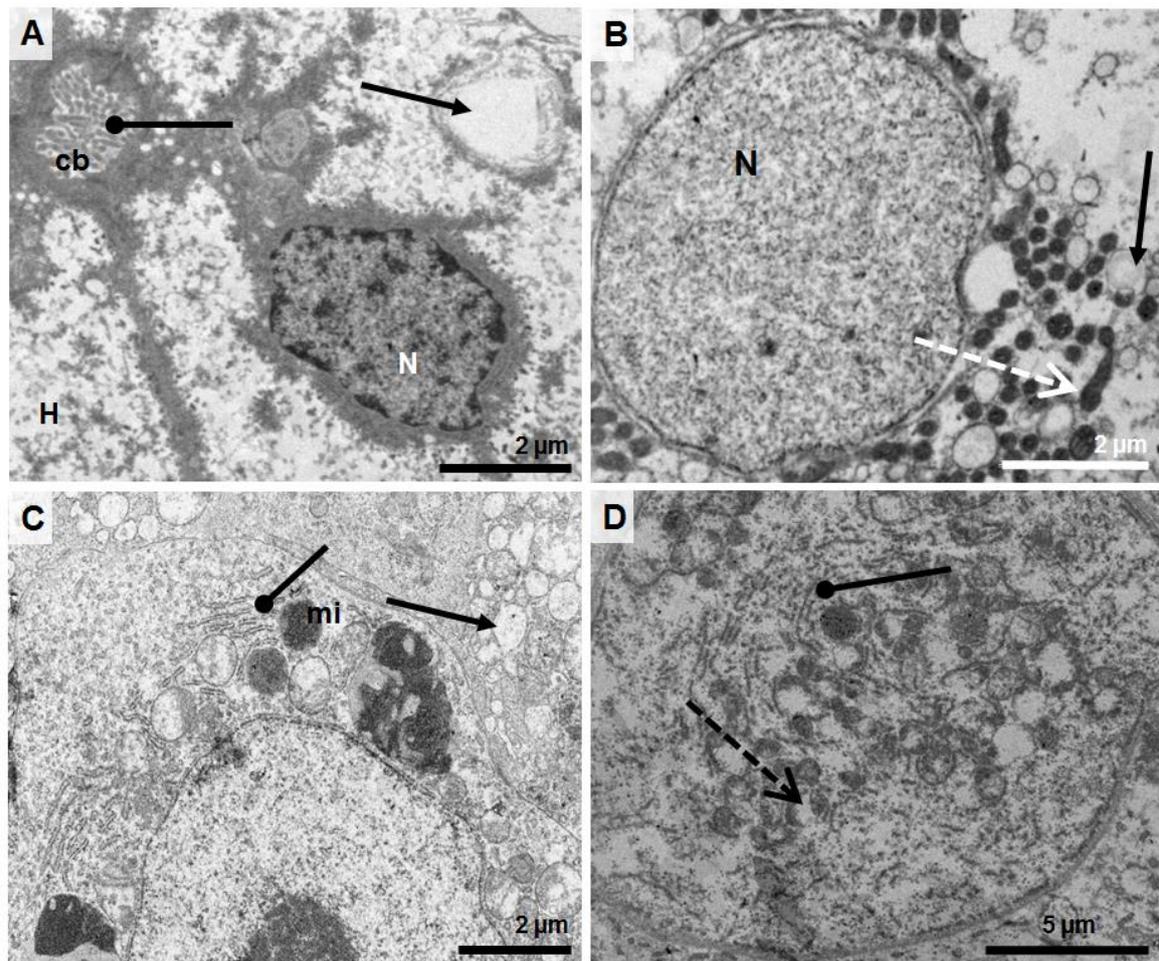
Não foram observadas diferenças na organização intracelular dos hepatócitos dos animais tratados com MCs entre 12 e 96 h.



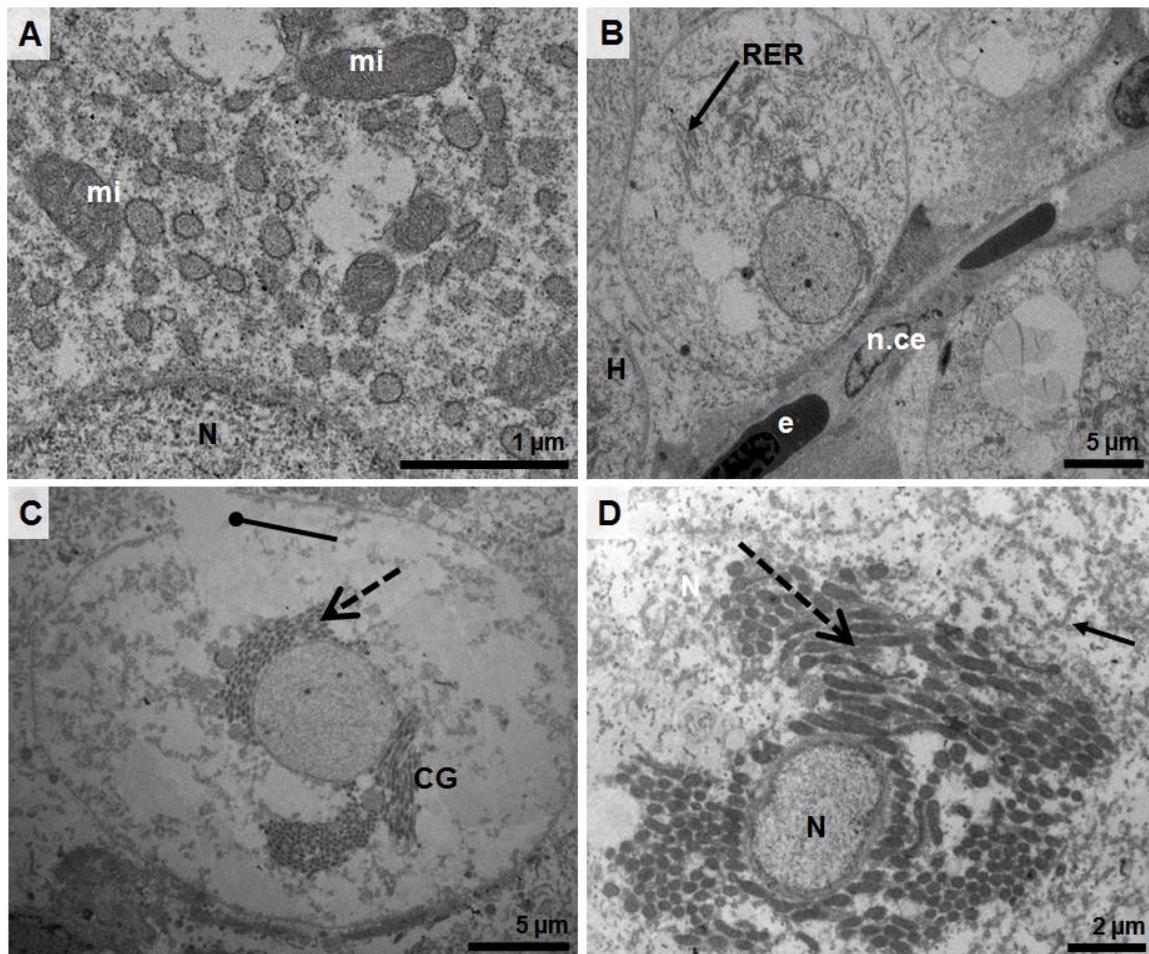
**Figura 17.** Micrografia eletrônica de fígado de *Hoplias malabaricus* do grupo controle da exposição aguda. (A e B) Hepatócitos com morfologia normal; presença de grande estoque de glicogênio e lipídeos; (C) organelas intracelulares organizadas na região perinuclear e (D) núcleo com presença de nucléolo e pouca heterocromatina. Setas tracejadas indicam a junção entre hepatócitos e seta contínua, os lisossomos. Seta de cabeça redonda mostra os poros da membrana nuclear. H = hepatócitos; N = núcleo; Li = lipídeos; Gli = glicogênio; n = núcleo de células epiteliais; mi = mitocôndrias; RER = retículo endoplasmático rugoso; nu = nucléolo.



**Figura 18.** Micrografia eletrônica de alterações intracelulares em fígado de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A a D) Hepatócitos arredondados e dissociados com aumento do espaço extracelular e sinusóides. Asterisco indica núcleos hipertrofiados e setas contínuas alterações nucleares como degeneração e granulação do nucléolo. As setas tracejadas mostram inclusões eletro-densas no citoplasma e seta de cabeça redonda, evidencia perda da estrutura celular com rompimento da membrana plasmática. H = hepatócitos; N = núcleo; Li = lipídeos; Gli = glicogênio; n = núcleo de células epiteliais; Si = sinusóide; CG = complexo de Golgi; nu = nucléolo.



**Figura 19.** Micrografia eletrônica de alterações intracelulares em fígado de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Alteração no formato nuclear, ausência de nucléolo e heterocromatina na região periférica nuclear; seta redonda indica as projeções da membrana celular no canalículo biliar e seta contínua vacuolização no citoplasma. (B; C e D) Alteração no formato e disposição das organelas intracelulares: mitocôndrias (setas tracejadas); RER (setas redondas) e lisossomos ou vacúolos com presença de corpos mielínicos. H = hepatócitos; N = núcleo; mi = mitocôndrias; cb = canalículo biliar.



**Figura 20.** Micrografia eletrônica de alterações intracelulares em fígado de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Hipertrofia de mitocôndrias e perda visível das cristas; (B) desorganização das organelas citoplasmáticas e núcleo periférico; (C) Degeneração celular, rompimento da membrana (seta redonda) e (D) degeneração nuclear. As setas pontiagudas indicam alteração do RER e setas tracejadas evidenciam dilatação e alteração na disposição de mitocôndrias e do complexo de Golgi. N = núcleo; mi = mitocôndrias; RER = retículo endoplasmático rugoso; n.ce = núcleo de células endoteliais; CG = complexo de Golgi; e = eritrócito.

#### 4.2.3 Alterações metabólicas e parâmetros hematológicos

A massa corpórea final dos animais não variou em relação à massa inicial durante a EA, entretanto a massa hepática do grupo MCs aumentou 96 horas após a injeção do extrato bruto contendo microcistinas em relação ao grupo controle e, conseqüentemente, o IHS aumentou 70% para esse grupo (Tabela 7).

**Tabela 7.** Valores médios ( $\pm$  E.P.M.) dos parâmetros biométricos e índice hepatossomático (IHS) de *Hoplias malabaricus* 12h (C12 e MC12) e 96h (C96 e MC96) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

<b>Parâmetros Biométricos</b>				
	<b>C12</b>	<b>MC12</b>	<b>C96</b>	<b>MC96</b>
Massa corporal inicial (g)	251,1 $\pm$ 35,0	247,4 $\pm$ 33,2	254,8 $\pm$ 39,5	237,2 $\pm$ 23,1
Massa corporal final (g)	243,5 $\pm$ 31,3	242,2 $\pm$ 31,9	245,0 $\pm$ 34,9	222,0 $\pm$ 34,9
Massa hepática (g)	4,78 $\pm$ 1,1	6,19 $\pm$ 1,16	4,67 $\pm$ 1,0	7,27 $\pm$ 1,0*
IHS (%)	1,86 $\pm$ 0,4	2,74 $\pm$ 0,5	1,95 $\pm$ 0,4	3,33 $\pm$ 0,4*

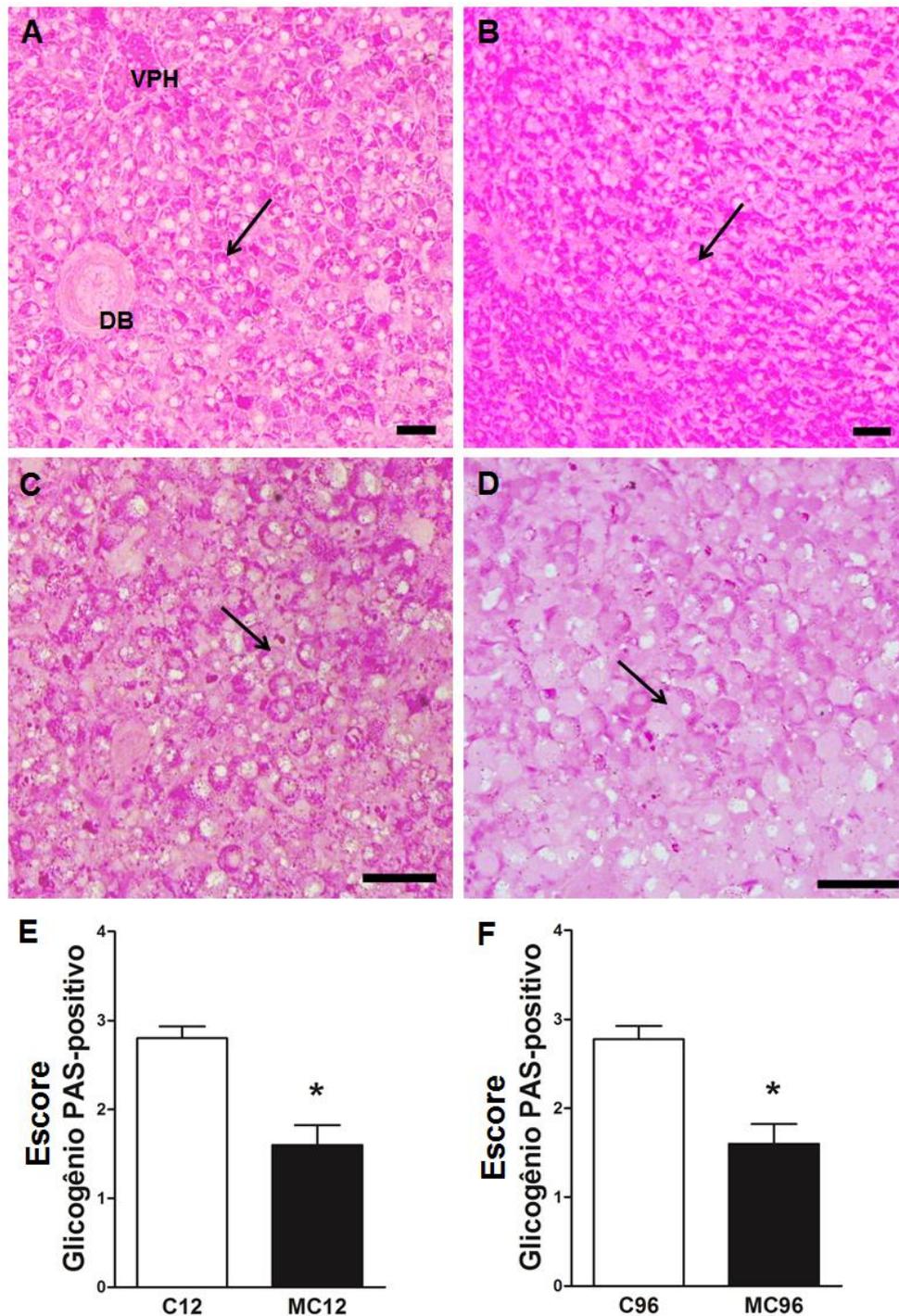
C = grupo controle; MC = grupo microcistina (n=10). (\*) Indica diferença ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle

A avaliação semi-quantitativa do glicogênio hepático utilizando-se de um escore PAS-positivo está apresentada na Figura 21. Houve uma diminuição do glicogênio nos hepatócitos após ambos os períodos da EA. Os parâmetros metabólicos do fígado, músculo branco e plasma estão apresentados nas Tabelas 8, 9 e 10, respectivamente.

No fígado, o lactato diminuiu 45% após 12 h e o piruvato diminuiu 50% e 52%, respectivamente em 12 e 96 h após injeção de MCs. A concentração de amônia aumentou 55% em 96 h e o glicogênio diminuiu 51% e 56% após 12 e 96 h após injeção MC (Tabela 8) corroborando com a análise semi-quantitativa da histoquímica do glicogênio (Figuras 21E e 21F).

A atividade hepática da ALT diminuiu 31% após as 96 horas, entretanto, após as 12 horas da EA, a diminuição da AST (31% - 12 h) foi acompanhado pela diminuição da atividade da AST (38% - 96 h). Não houve alteração significativa nos demais metabólitos no fígado (Tabela 8).

Em músculo branco, houve aumento da glicogênese após 12 horas (31%) e 96 horas (69%), provavelmente em resposta do aumento da glicose (42% após 12 horas e 120% após 96 horas) no tecido após o EA. O aumento da glicose no músculo difere entre os grupos microcistinas (Tabela 9).



**Figura 21.** Histoquímica PAS-positivo para glicogênio hepático de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A e B) grupos controles (12 horas e 96 horas, respectivamente); setas indicam o glicogênio no hepatócito. (C) grupo microcistina após 12 horas e (D) grupo microcistina após 96 horas da i.p; setas indicam a degradação parcial ou total do glicogênio no hepatócito. (E e F) grupo controle e grupo microcistina score PAS-positivo (12 horas e 96 horas, respectivamente). (\*) mostra a diferença ( $p < 0.05$ ) entre do grupo microcistina em relação ao respectivo controle. VPH = veia portal hepática; DB = ducto biliar. Escala = 20  $\mu$ m.

**Tabela 8.** Valores médios ( $\pm$  E.P.M.) dos parâmetros metabólicos do fígado de *Hoplias malabaricus* 12h (C12 e MC12) e 96h (C96 e MC96) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

<b>Metabolismo - Fígado</b>				
<b>Variáveis</b>	<b>C12</b>	<b>MC12</b>	<b>C96</b>	<b>MC96</b>
<i>Intermediário</i>				
Amônia ( $\mu\text{mol g tecido}^{-1}$ )	9,5 $\pm$ 0,8	12,49 $\pm$ 1,2	9,6 $\pm$ 0,8	15,0 $\pm$ 1,3*
Piruvato ( $\mu\text{mol g tecido}^{-1}$ )	1,22 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,03*	1,25 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,3*
Lactato ( $\mu\text{mol g tecido}^{-1}$ )	12,7 $\pm$ 1,0	6,9 $\pm$ 0,8*	12,3 $\pm$ 1,0	10,0 $\pm$ 1,0
Aminoácidos ( $\mu\text{mol g tecido}^{-1}$ )	33,8 $\pm$ 3,6	47,5 $\pm$ 7,2	36,8 $\pm$ 4,3	37,3 $\pm$ 0,8
Proteína (mg proteína $^{-1}$ g tecido $^{-1}$ )	5,2 $\pm$ 0,4	5,0 $\pm$ 0,2	5,1 $\pm$ 0,4	4,2 $\pm$ 0,1
Glicose ( $\mu\text{mol g tecido}^{-1}$ )	144,5 $\pm$ 8,8	147,3 $\pm$ 18,0	136,5 $\pm$ 11,2	165,9 $\pm$ 17,5
Glicogênio ( $\mu\text{mol glicosil-glicose g tecido}^{-1}$ )	287,8 $\pm$ 49,3	140,7 $\pm$ 36,2*	274,6 $\pm$ 45,4	119,1 $\pm$ 31,1*
<i>Enzimático</i>				
AST (U mg proteína $^{-1}$ )	2,18 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,1*	2,1 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1*
ALT (U mg proteína $^{-1}$ )	1,57 $\pm$ 0,1	1,58 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,1*
FAL (nmol p-nitrofenilfosfato min $^{-1}$ mg proteína $^{-1}$ )	19,0 $\pm$ 2,3	16,6 $\pm$ 1,3	18,5 $\pm$ 2,0	17,8 $\pm$ 1,1
FAC (nmol p-nitrofenilfosfato min $^{-1}$ mg proteína $^{-1}$ )	56,6 $\pm$ 5,8	46,3 $\pm$ 4,4	55,1 $\pm$ 5,4	56,3 $\pm$ 4,3

C = grupo controle; MC = grupo microcistina (n=10). (\*) mostra a diferença (p<0.05) entre do grupo microcistina em relação ao respectivo controle.

**Tabela 9.** Valores médios ( $\pm$  E.P.M.) dos parâmetros metabólicos do músculo branco de *Hoplias malabaricus* 12h (C12 e MC12) e 96h (C96 e MC96) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

<b>Metabolismo – Músculo Branco</b>				
<b>Variáveis</b>	<b>C12</b>	<b>MC12</b>	<b>C96</b>	<b>MC96</b>
<i>Intermediário</i>				
Amônia ( $\mu\text{mol g tecido}^{-1}$ )	10,2 $\pm$ 0,1	11,4 $\pm$ 0,6	10,2 $\pm$ 0,1	13,6 $\pm$ 1,0*
Piruvato ( $\mu\text{mol g tecido}^{-1}$ )	0,4 $\pm$ 0,04	0,5 $\pm$ 0,04	0,49 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,03
Lactato ( $\mu\text{mol g tecido}^{-1}$ )	29,6 $\pm$ 1,1	31,5 $\pm$ 1,2	29,7 $\pm$ 1,0	31,8 $\pm$ 0,8
Aminoácidos ( $\mu\text{mol g tecido}^{-1}$ )	26,8 $\pm$ 1,3	28,3 $\pm$ 1,2	36,8 $\pm$ 4,3	37,3 $\pm$ 0,8
Proteína (mg proteína $^{-1}$ g tecido $^{-1}$ )	2,7 $\pm$ 0,2	3,2 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,1
Glicose ( $\mu\text{mol g tecido}^{-1}$ )	6,4 $\pm$ 0,4	9,1 $\pm$ 0,8*	6,8 $\pm$ 0,5	15,0 $\pm$ 1,9 <sup>#</sup>
Glicogênio ( $\mu\text{mol glicosil-glicose g tecido}^{-1}$ )	4,8 $\pm$ 0,5	6,3 $\pm$ 0,3*	5,26 $\pm$ 0,6	8,9 $\pm$ 1,5*
<i>Enzimático</i>				
AST (U mg proteína $^{-1}$ )	0,63 $\pm$ 0,08	0,62 $\pm$ 0,06	0,7 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,07
ALT (U mg proteína $^{-1}$ )	0,08 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,005	0,09 $\pm$ 0,01	0,1 $\pm$ 0,007
FAL (nmol p-nitrofenilfosfato min $^{-1}$ mg proteína $^{-1}$ )	17,3 $\pm$ 1,5	13,7 $\pm$ 1,3	19,3 $\pm$ 2,2	18,9 $\pm$ 0,6
FAC (nmol p-nitrofenilfosfato min $^{-1}$ mg proteína $^{-1}$ )	4,7 $\pm$ 0,3	3,9 $\pm$ 0,2	4,6 $\pm$ 0,3	4,8 $\pm$ 0,2

C = grupo controle; MC = grupo microcistina (n=10). (\*) mostra a diferença ( $p < 0,05$ ) entre do grupo microcistina em relação ao respectivo controle. (#) indica diferença ( $p < 0,05$ ) entre os períodos de exposição.

No plasma aumentou a concentração de glicose (G), lactato (L) e piruvato (P) após 12 h e 96 h (G-1070% e 2390%, L- 33% e 47% e P -100 e 20%, respectivamente). Não houve alteração na concentração de aminoácidos livres, mas as concentrações de proteínas plasmáticas diminuíram 26% e 12% respectivamente após 12 h e 96 h em relação aos controles e a concentração de amônia aumentou 1560% após 12 horas e 3550% após 96 h (Tabela 10).

**Tabela 10.** Valores médios ( $\pm$  E.P.M.) dos parâmetros metabólicos do plasma de *Hoplias malabaricus* 12h (C12 e MC12) e 96h (C96 e MC96) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

<b>Metabolismo - Plasma</b>				
<b>Variáveis</b>	<b>C12</b>	<b>MC12</b>	<b>C96</b>	<b>MC96</b>
<i>Intermediário</i>				
Amônia ( $\mu\text{mol mL plasma}^{-1}$ )	0,3 $\pm$ 0,01	5,0 $\pm$ 0,5*	0,2 $\pm$ 0,01	7,3 $\pm$ 1,2*
Piruvato ( $\mu\text{mol mL plasma}^{-1}$ )	0,1 $\pm$ 0,004	0,2 $\pm$ 0,01*	0,15 $\pm$ 0,003	0,18 $\pm$ 0,007*
Lactato ( $\mu\text{mol mL plasma}^{-1}$ )	1,24 $\pm$ 0,06	1,65 $\pm$ 0,03*	1,2 $\pm$ 0,05	1,8 $\pm$ 0,1*
Aminoácidos ( $\mu\text{mol mL plasma}^{-1}$ )	6,43 $\pm$ 0,5	7,0 $\pm$ 0,2	6,3 $\pm$ 0,5	6,5 $\pm$ 0,5
Proteína (mg proteína $^{-1}$ mL plasma $^{-1}$ )	41,0 $\pm$ 1,3	30,2 $\pm$ 4,3*	40,4 $\pm$ 1,3	35,3 $\pm$ 1,6*
Glicose ( $\mu\text{mol mL plasma}^{-1}$ )	3,2 $\pm$ 0,3	37,5 $\pm$ 4,4*	3,0 $\pm$ 0,3	74,8 $\pm$ 14,7*#

C = grupos controle; MC = grupo microcistina (n=10). (\*) mostra a diferença ( $p < 0.05$ ) entre do grupo microcistina em relação ao respectivo controle. (#) indica diferença ( $p < 0,05$ ) entre os períodos de exposição.

Os valores médios dos parâmetros hematológicos dos animais do grupo C e MCs estão mostrados na Tabela 11. Não houve diferença significativa do Hct e RBC nos grupos C e MCs, mas ocorreu diminuição da concentração de Hb (59% em 12 horas; 29% em 96 horas) o que resultou em diminuição dos índices

hematimétricos HCM (27% em 12 horas; 36% em 96 horas) e CHCM (34% em 12 horas; 30% em 96 horas) nos grupos MC.

**Tabela 11.** Valores médios ( $\pm$  E.P.M.) dos parâmetros hematológicos de *Hoplias malabaricus* 12h (C12 e MC12) e 96h (C96 e MC96) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

<b>Parâmetros Hematológicos</b>				
	<b>C12</b>	<b>MC12</b>	<b>C96</b>	<b>MC96</b>
<i>Parâmetros</i>				
HCT (%)	26,7 $\pm$ 0,9	25,9 $\pm$ 0,5	27,05 $\pm$ 0,8	27,50 $\pm$ 0,9
RBC ( $10^4$ células mm <sup>3</sup> )	202,6 $\pm$ 8,9	173,2 $\pm$ 9,4	196,4 $\pm$ 7,3	205,9 $\pm$ 16,3
Hb (g dL <sup>-1</sup> )	4,76 $\pm$ 0,3	3,3 $\pm$ 0,1*	4,84 $\pm$ 0,3	3,42 $\pm$ 0,2*
<i>Índices Hematimétricos</i>				
VCM ( $\mu\text{m}^3$ )	129,6 $\pm$ 4,4	152,8 $\pm$ 8,0	130,3 $\pm$ 3,9	132,2 $\pm$ 8,8
HCM (pg célula <sup>-1</sup> )	26,5 $\pm$ 3,4	19,1 $\pm$ 0,6*	26,9 $\pm$ 3,1	17,1 $\pm$ 1,0*
CHCM (g dL <sup>-1</sup> )	18,8 $\pm$ 2,1	12,4 $\pm$ 0,6*	19,7 $\pm$ 1,9	13,7 $\pm$ 0,2*

C = grupos controle; MC = grupos microcistinas. (\*) Indica diferença ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle.

#### 4.2.4 Desintoxicação de microcistinas e estresse oxidativo

A Tabela 12 mostra os valores médios da atividade da EROD, enzima de biotransformação fase 1, e GST, enzima de biotransformação de fase II, da SOD, CAT, GPx e GR, enzimas do sistema antioxidante celular e a concentração de GSH, antioxidante não-enzimático, dos animais dos grupos controle e dos grupos MCs (injetados com extrato bruto de *R. fernandoi*). A atividade da EROD aumentou 200% e 400% após 12 e 96h, respectivamente após injeção i.p. de extrato bruto de *R. fernandoi*. Por sua vez, a atividade da GST diminuiu 37% e 38%, respectivamente, após 12 e 96h. A atividade da SOD (51% em 12 h e 58% em 96 h) e a da GPx 46% em 12h e 34%, em 96h) diminuíram sugerindo uma inibição do sistema antioxidante enzimático.

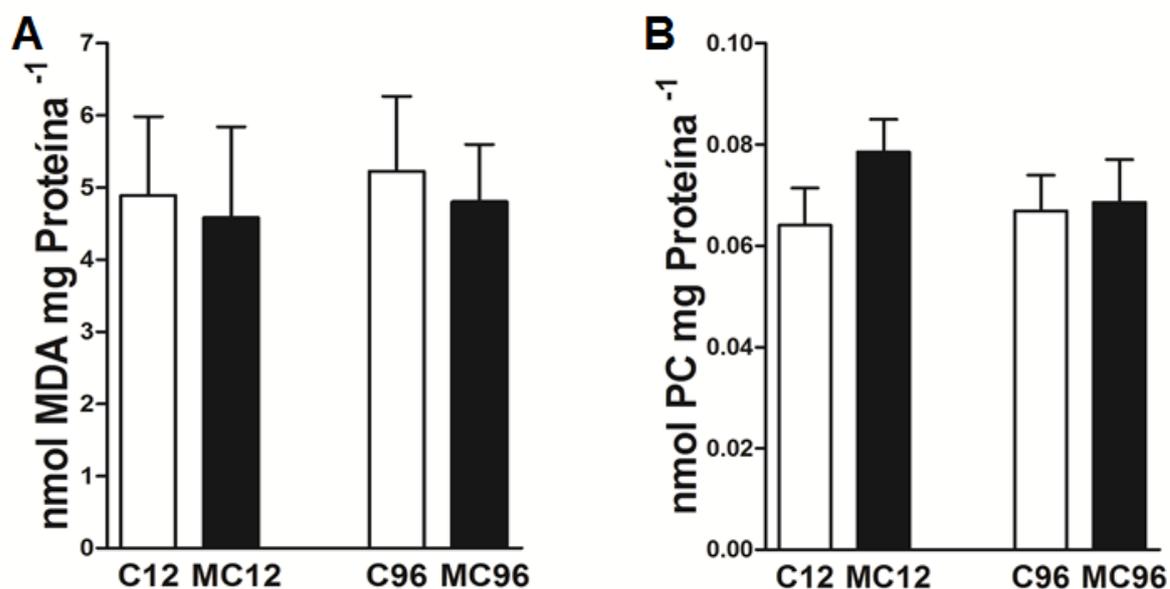
**Tabela 12.** Parâmetros de biotransformação e sistemas antioxidantes (Média  $\pm$  E.P.M.) em fígado de *Hoplias malabaricus* 12h (C12 e MC12) e 96h (C96 e MC96) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

<b>Biotransformação e Sistemas Antioxidantes Hepáticos</b>				
	<b>C12</b>	<b>MC12</b>	<b>C96</b>	<b>MC96</b>
<i>Biotransformação</i>				
EROD (nmol resorufina min <sup>-1</sup> mg proteína <sup>-1</sup> )	0,01 $\pm$ 0,003	0,03 $\pm$ 0,007*	0,01 $\pm$ 0,001	0,05 $\pm$ 0,01*
GST (U mg proteína <sup>-1</sup> )	30,8 $\pm$ 2,7	19,2 $\pm$ 2,1*	29,4 $\pm$ 2,8	18,2 $\pm$ 1,7*
<i>Sistema Enzimático</i>				
SOD (U SOD min <sup>-1</sup> mg proteína <sup>-1</sup> )	61,8 $\pm$ 4,1	29,8 $\pm$ 5,4*	66,3 $\pm$ 5,7	27,6 $\pm$ 6,5*
CAT (U mg proteína <sup>-1</sup> )	169,9 $\pm$ 14,0	152,8 $\pm$ 16,3	168,9 $\pm$ 12,6	165,9 $\pm$ 10,9
GPX (U mg proteína <sup>-1</sup> )	41,7 $\pm$ 4,7	22,3 $\pm$ 2,4*	40,2 $\pm$ 26,3	26,3 $\pm$ 2,3*
GR (mU mg proteína <sup>-1</sup> )	8,0 $\pm$ 0,9	9,7 $\pm$ 1,4	8,3 $\pm$ 0,9	11,5 $\pm$ 1,4
<i>Sistema Não Enzimático</i>				
GSH (nmol GSH mg proteína <sup>-1</sup> )	130,0 $\pm$ 20,3	125,7 $\pm$ 18,7	150,3 $\pm$ 27,3	119,5 $\pm$ 11,6

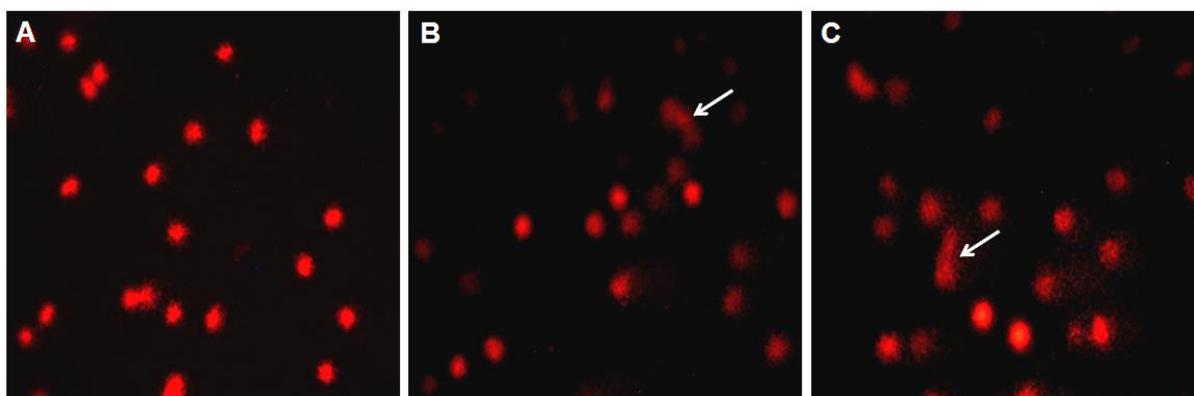
C = grupos controle; MC = grupo microcistina (n=10). (\*) Indica diferença (p<0,05) em relação ao grupo controle

Em relação aos danos, não foram observadas diferenças na lipoperoxidação quando analisados os níveis equivalentes de MDA ou danos oxidativos em proteínas em ambos os grupos da EA (Figura 22).

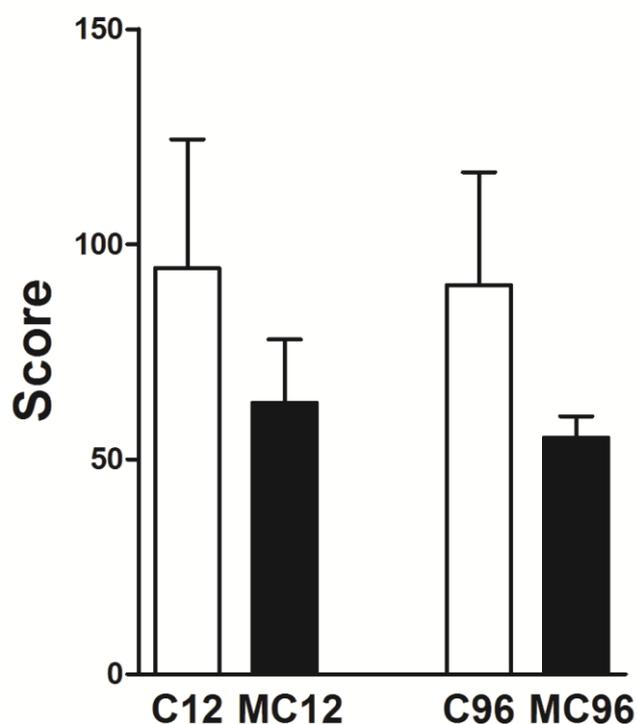
Os resultados do ensaio cometa em fígado de *H. malabaricus* expostos á microcistina contidas no extrato bruto estão representado na Figura 23. Após a EA, não houve diferenças no escore em relação aos controles (Figura 24).



**Figura 22.** Danos hepáticos médios ( $\pm$  E.P.M.). (A) Lipoperoxidação níveis equivalentes à malondialdeído (MDA) em fígado e (B) níveis de proteínas carboniladas em fígado de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. C = grupo controle; MC = grupo microcistina.



**Figura 23.** Ensaio cometa em células do fígado de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Grupo controle 12 e 96h; (B) grupo expostos às MCs por 12h. (C) Grupo expostos por 96 horas. Setas indicam os danos no DNA evidenciados pela cauda do cometa. Coloração: Bromo de etídeo. Aumento 400x.

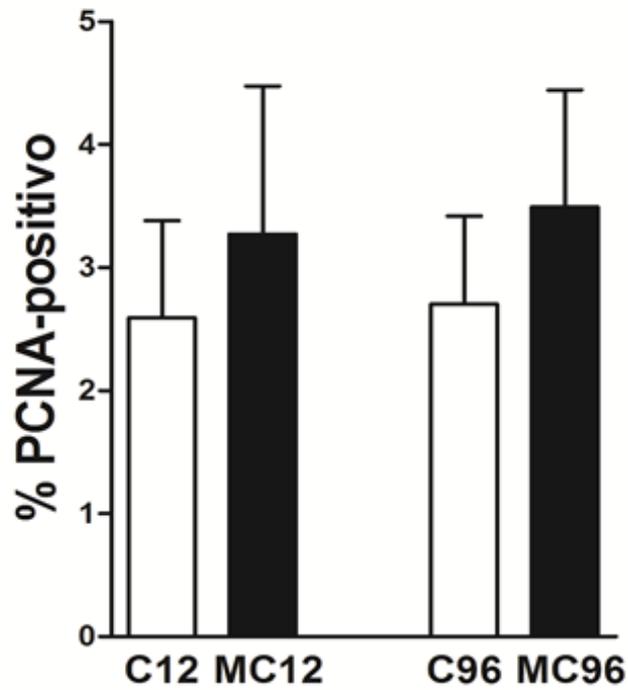


**Figura 24.** Escore médio ( $\pm$  E.P.M.) do ensaio cometa no fígado de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. C = grupo controle e MC = grupo microcistinas.

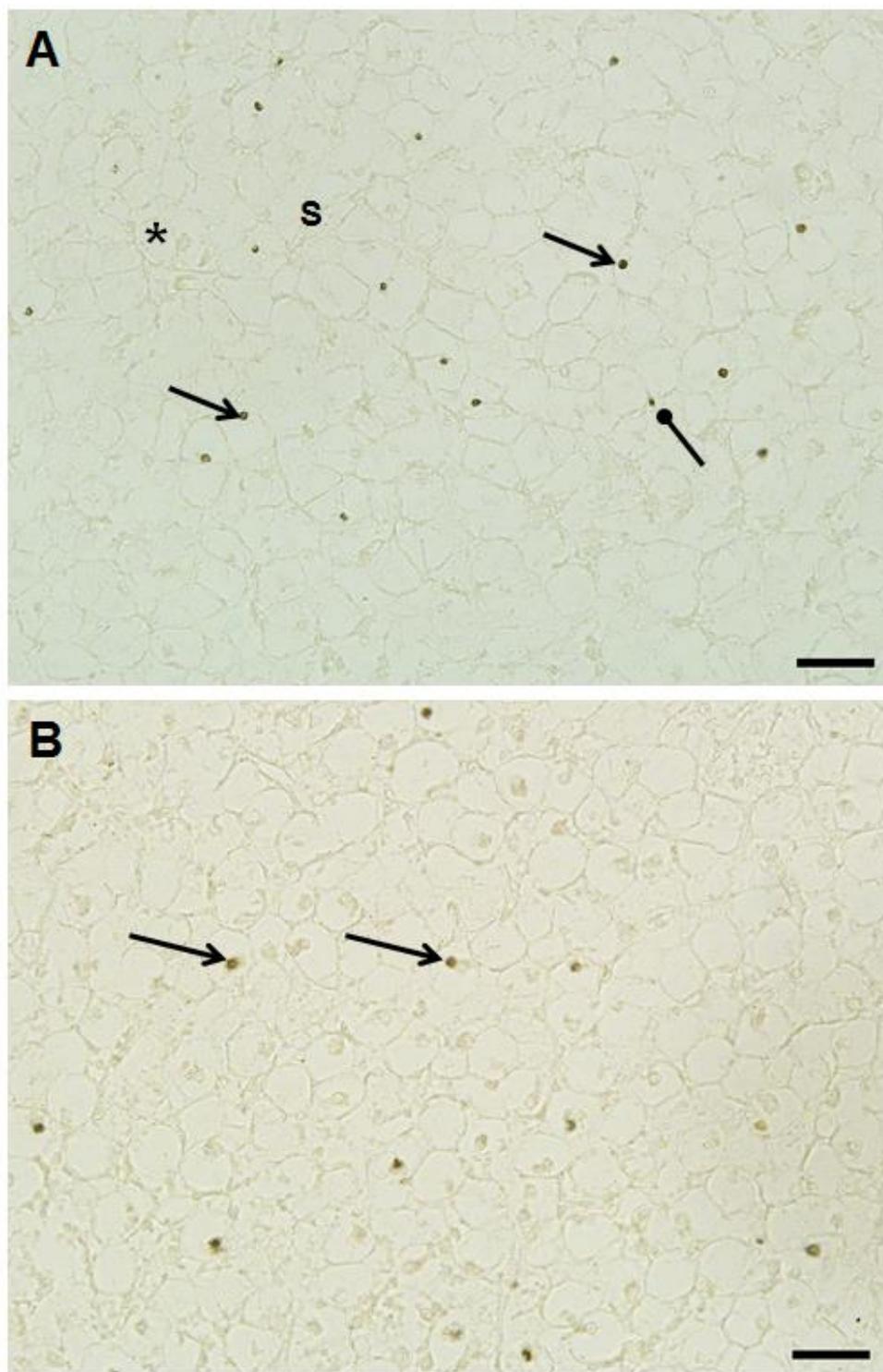
#### 4.2.5 Proliferação celular hepática

Ao tecido lesionado, a capacidade de regeneração hepática não se mostrou efetiva aos animais da EA, não havendo diferença entre o grupo MCs e o respectivo controle, assim como entre os tempos da exposição (Figura 25).

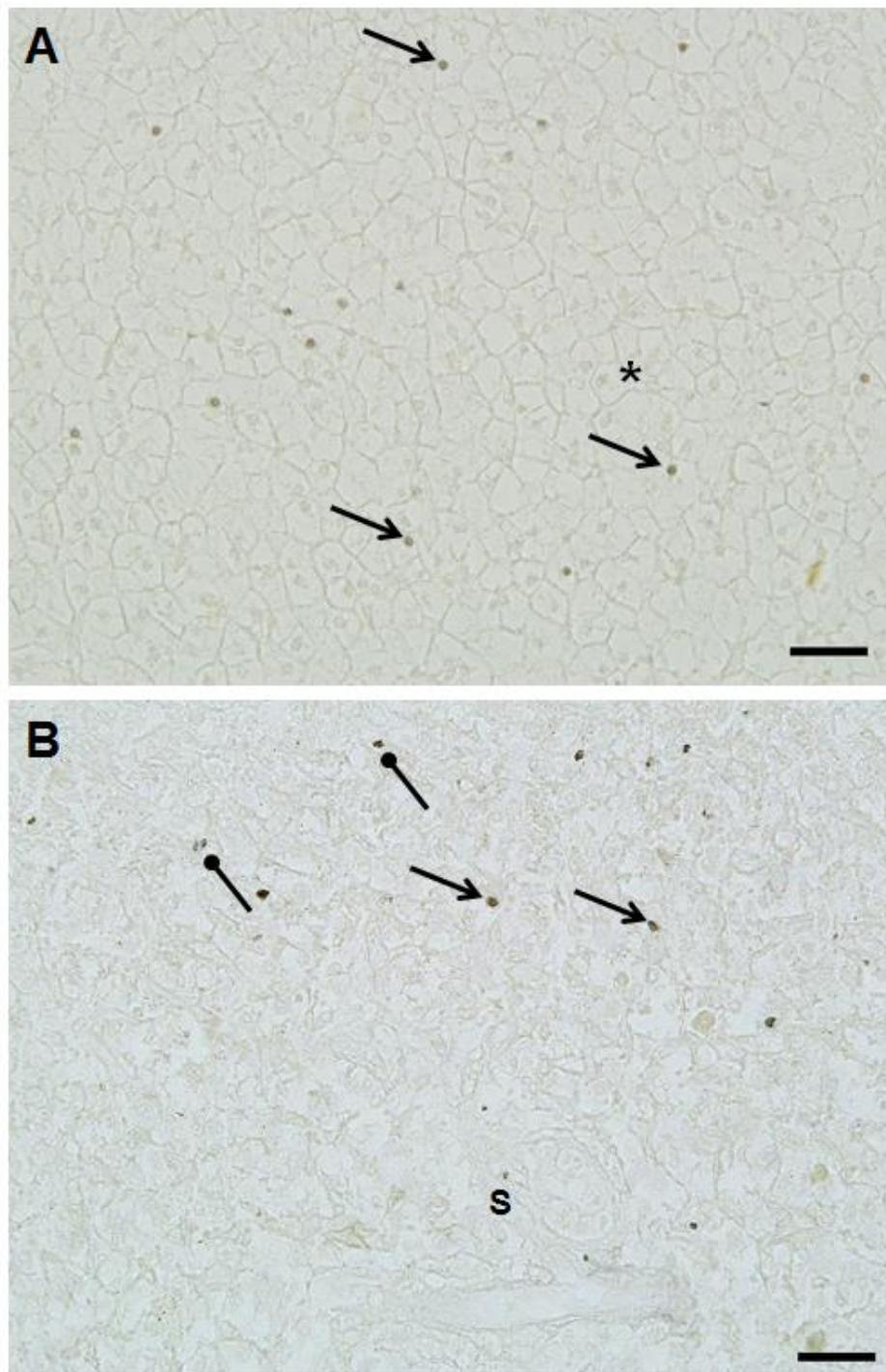
O tecido hepático dos animais expostos não apresentou regiões consideradas “hot-spots”. Os hepatócitos imunomarcados após 12 horas e 96 horas estão apresentados nas Figuras 26 e 27, respectivamente.



**Figura 25.** Porcentagem de núcleos PCNA-positivos em hepatócitos de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.



**Figura 26.** Núcleos PCNA-positivos em hepatócitos de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Grupo Controle e (B) grupo microcistina. Setas pontiagudas indicam núcleos de hepatócitos PCNA-positivo; seta redonda indica núcleo PCNA-positivo para outros grupos celulares. Asterisco mostra hepatócitos sem marcação. S = sinusóides. Escala = 20  $\mu$ m.

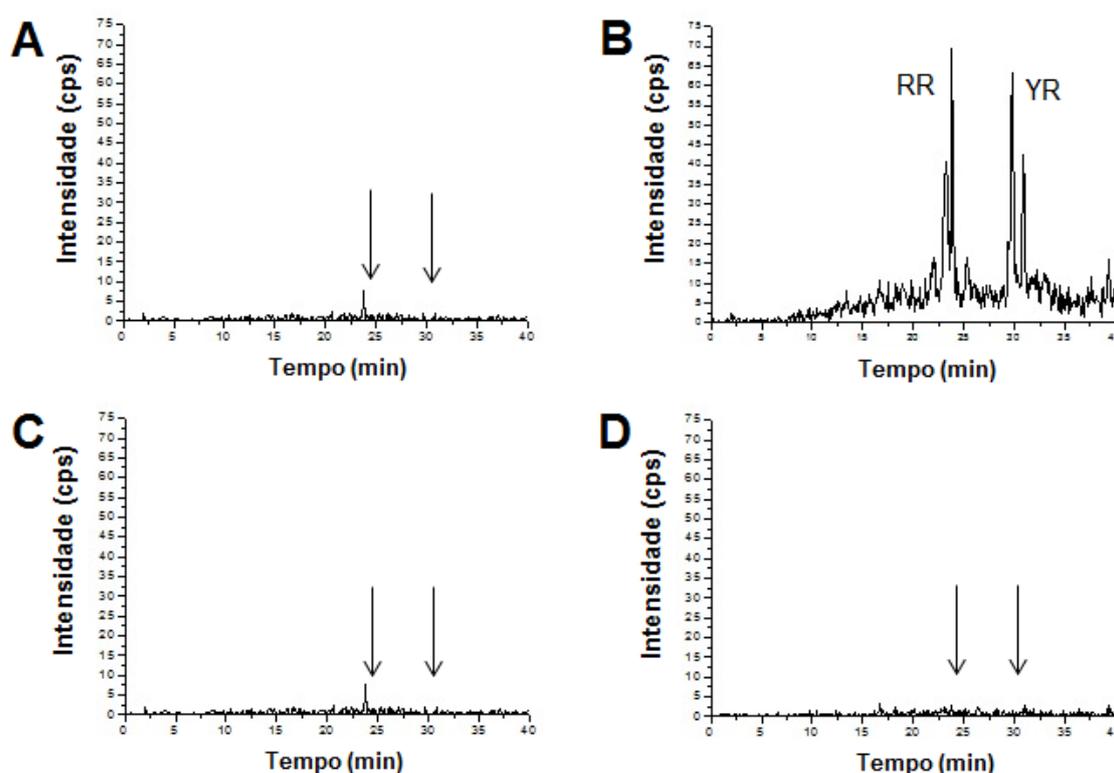


**Figura 27.** Núcleos PCNA-positivos em hepatócitos de *Hoplias malabaricus* após 12h e 96h de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Grupo Controle e (B) grupo microcistina. Setas pontiagudas indicam núcleos de hepatócitos PCNA-positivo; seta redonda indica núcleo PCNA-positivo para outros grupos celulares. Asterisco mostra hepatócitos sem marcação. S = sinusóides. Escala = 20  $\mu$ m.

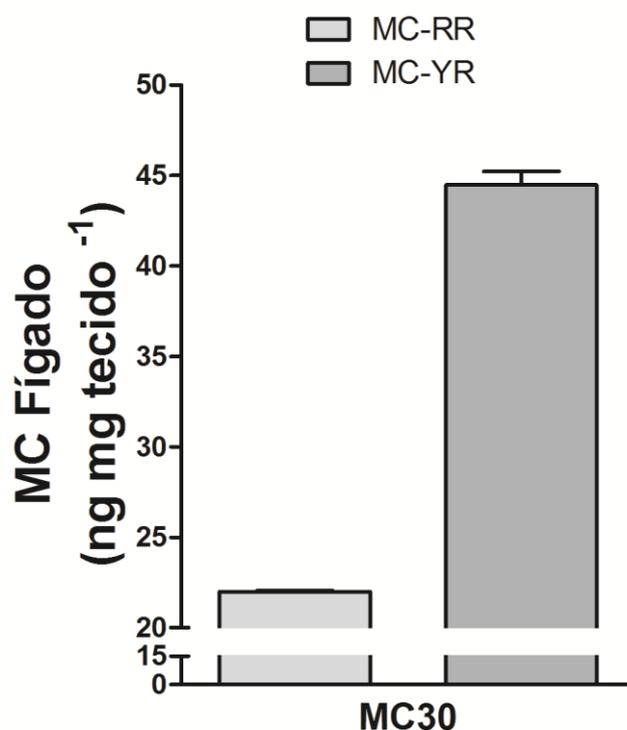
### 4.3 Exposição crônica

#### 4.3.1 Acumulação de microcistinas nos tecidos

Os cromatogramas que representam o acúmulo de MC em fígado e músculo após a EC estão apresentados na Figura 28. Ao final da exposição crônica, não houve acumulação de MCs em músculo branco, mas no fígado houve uma acumulação das variantes MC-RR e MC-YR que estavam presentes nos extratos (Figura 29).



**Figura 28.** Cromatogramas do experimento de monitoramento de reações múltiplas (MRM) do fígado e músculo de *Hoplias malabaricus* 30 dias após injeção intraperitoneal com microcistina presente no extrato bruto de *Radiocystis fernandoi*. (A) Fígado do grupo controle; (B) Fígado do grupo MC. Em (C) Músculo do grupo controle e (D) Músculo do grupo MC. As setas indicam ausência de MC no tempo de retenção para as variantes MC-RR (24,3 min) e MC-YR (30,5 min). cps = contagem por segundo.

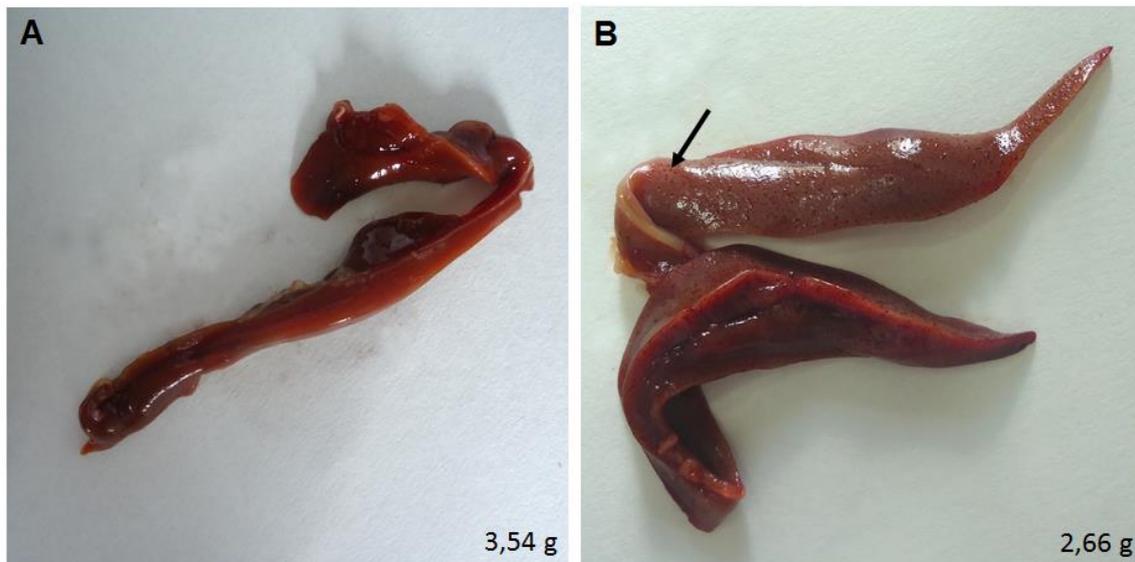


**Figura 29.** Valores médios ( $\pm$  D.P.) da concentração de microcistinas MC-RR e MC-YR acumuladas no fígado de *Hoplias malabaricus* 30 dias após injeção intraperitoneal com microcistina presente no extrato bruto de *Radiocystis fernandoi*. (n=3 pools).

#### 4.3.2 Comprometimento morfofuncional hepático

Nenhum peixe morreu ao longo da EC, porém aumentou o intervalo de procura do alimento e a ingestão de alimento diminuiu quando comparada ao grupo controle.

O aspecto macroscópico do fígado dos peixes após a EC é mostrado na Figura 30. A coloração e odor não apresentaram diferença entre os grupos controle e MCs. Entretanto, o fígado dos peixes expostos ao extrato bruto contendo microcistinas, apresentou uma textura mais rígida quando comparado ao controle e pequenas áreas avermelhadas (Fig. 30B).

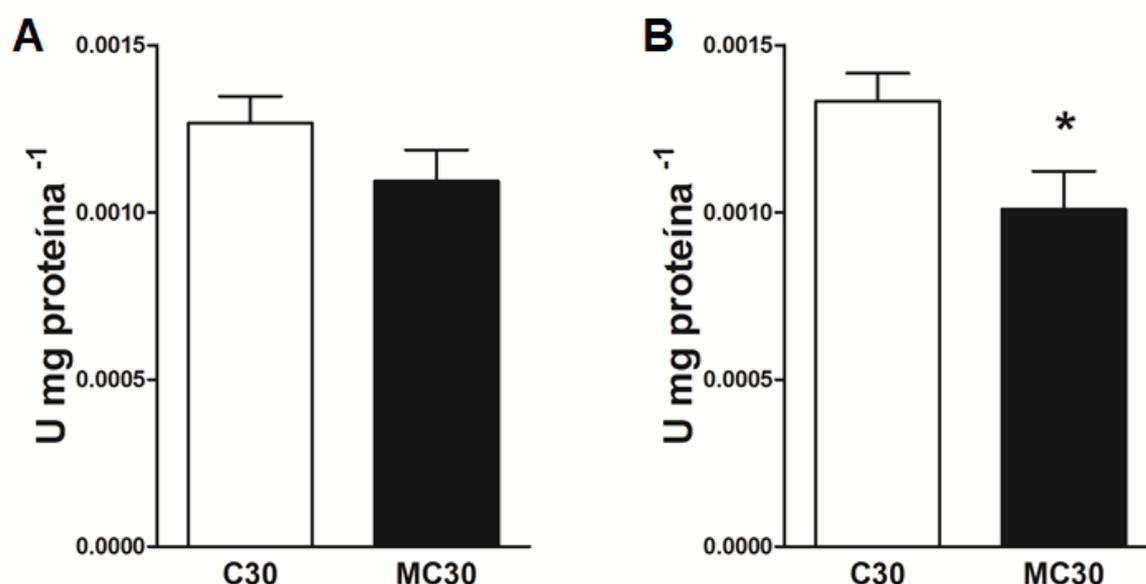


**Figura 30.** Fígado de *Hoplias malabaricus* 30 dias após injeção intraperitoneal com o extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas (A) Aspecto macroscópico do fígado de peixes do grupo controle; (B) Aspecto do fígado dos peixes do grupo injetado com extrato bruto. Seta indica área avermelhada e salientada no tecido hepático.

A atividade hepática das proteínas fosfatases de serina e treonina estão apresentadas na Figura 31. Após 30 dias de exposição às MCs, a atividade da fosfatase do tipo PP1 não apresentou alteração, enquanto a fosfatase do tipo PP2A diminuiu 24% da sua atividade.

Os biomarcadores de hepatotoxicidade estão apresentados na Tabela 13. Após 30 dias, a atividade plasmática da ALT aumentou 118% e a da AST aumentou 900%. O conteúdo de BD aumentou 137% e a BT aumentou 77% quando comparado ao controle.

A atividade plasmática da FAC e da FAL não diferiu do grupo controle (Figura 32).

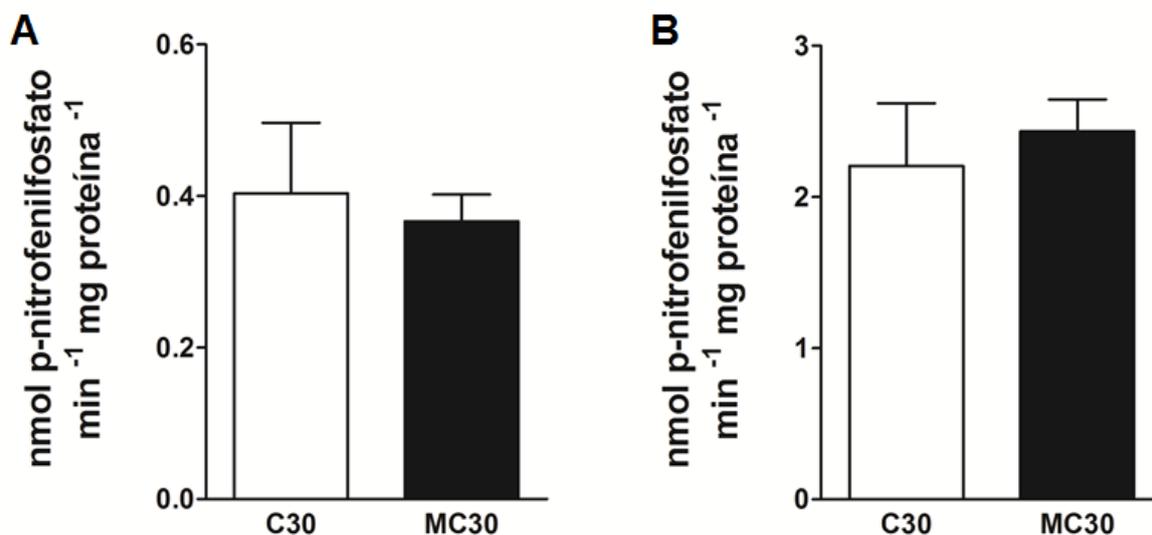


**Figura 31.** Atividade plasmática (média  $\pm$  E.P.M.) das proteínas fosfatases no plasma de *Hoplias malabaricus* após 30 dias de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Atividade da fosfatase PP1 e (B) da fosfatase PP2A. (\*) Indica diferença ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle.

**Tabela 13.** Valores médios ( $\pm$  E.P.M.) dos parâmetros plasmáticos de hepatotoxicidade de *Hoplias malabaricus* 30 dias (C30 e MC30) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. ALT – Alanina Aminotransferase; AST – Aspartato Aminotransferase; BD – Bilirrubina Direta; BT – Bilirrubina Total.

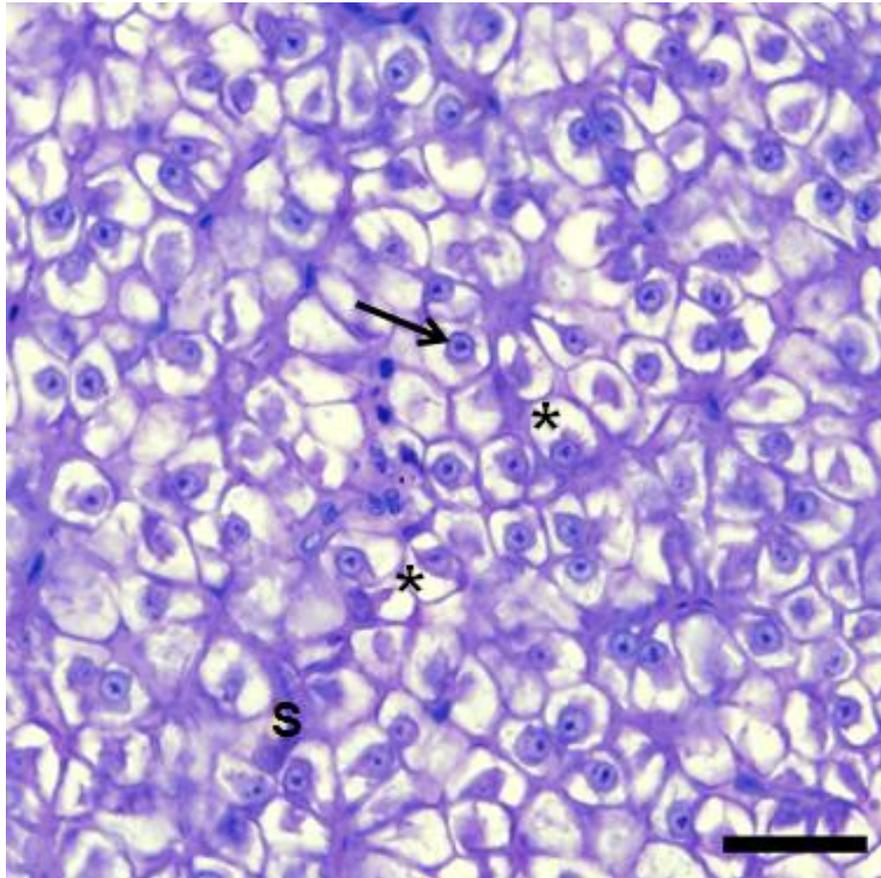
Biomarcadores Plasmático de Hepatotoxicidade				
Grupos	Variáveis			
	ALT nmol min <sup>-1</sup> mg proteína <sup>-1</sup>	AST nmol min <sup>-1</sup> mg proteína <sup>-1</sup>	BD mg dL <sup>-1</sup>	BT mg dL <sup>-1</sup>
C30	3,86 $\pm$ 1,0	4,92 $\pm$ 1,4	0,24 $\pm$ 0,05	1,9 $\pm$ 0,2
MC30	8,45 $\pm$ 1,2*	44,25 $\pm$ 19,6*	0,57 $\pm$ 0,1*	3,4 $\pm$ 0,2*

C = grupo controle; MC = grupo microcistinas (n=10). (\*) Indica diferença ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle.



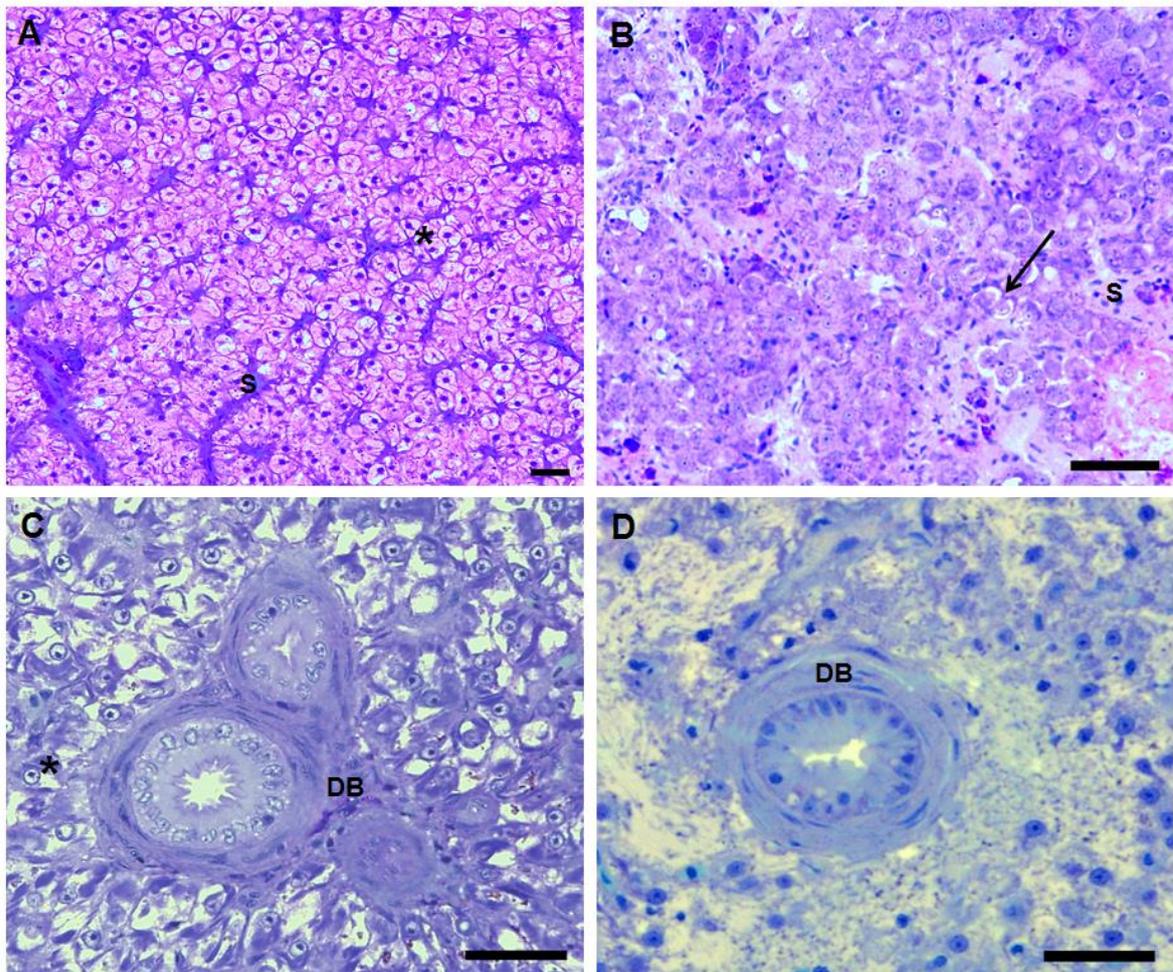
**Figura 32.** Atividade plasmática (média  $\pm$  E.P.M.) das proteínas fosfatases de *Hoplias malabaricus* após 30 dias de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Fosfatases ácidas e (B) Fosfatases alcalinas.

A arquitetura hepática padrão dos animais do grupo controle está detalhada na Figura 33. O parênquima hepático mostrou-se bem homogêneo e com hepatócitos com formatos poligonais, núcleos esféricos e nucléolos evidentes. Sinusóides delgados estavam em contato com os hepatócitos.



**Figura 33.** Arquitetura hepática de *Hoplias malabaricus* do grupo controle. Seta indica núcleo esférico e nucléolos evidentes. Os asteriscos indicam estrutura poligonal dos hepatócitos. S = sinusóides. Coloração: Azul de toluidina e fucsina básica. Escala = 20  $\mu$ m.

A Figura 34 mostra as alterações morfológicas na arquitetura hepática dos animais na EC após os 30 dias de exposição ao extrato bruto contendo MCs. O parênquima hepático apresentou desorganização generalizada na morfologia e arranjo dos hepatócitos. A morfologia e estrutura celular dos ductos biliares não apresentaram alteração entre os animais controle e expostos (Fig. 34C e 34D, respectivamente).



**Figura 34.** Arquitetura hepática e histomorfologia hepato-biliar de *Hoplias malabaricus* após 30 dias de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Aspecto normal do fígado de peixes do grupo controle; (B) Alteração do parênquima hepático dos peixes expostos às MC. (C) morfologia dos ductos biliares de peixes do grupo controle e (D) morfologia dos ductos biliares dos peixes expostos às MC. Asteriscos indicam hepatócitos com normal morfologia; setas indicam arredondamento na morfologia do hepatócito. DB = Ductos Biliares; S = Sinusóides. Coloração: Azul de toluidina e fucsina básica. Escala 20 µm.

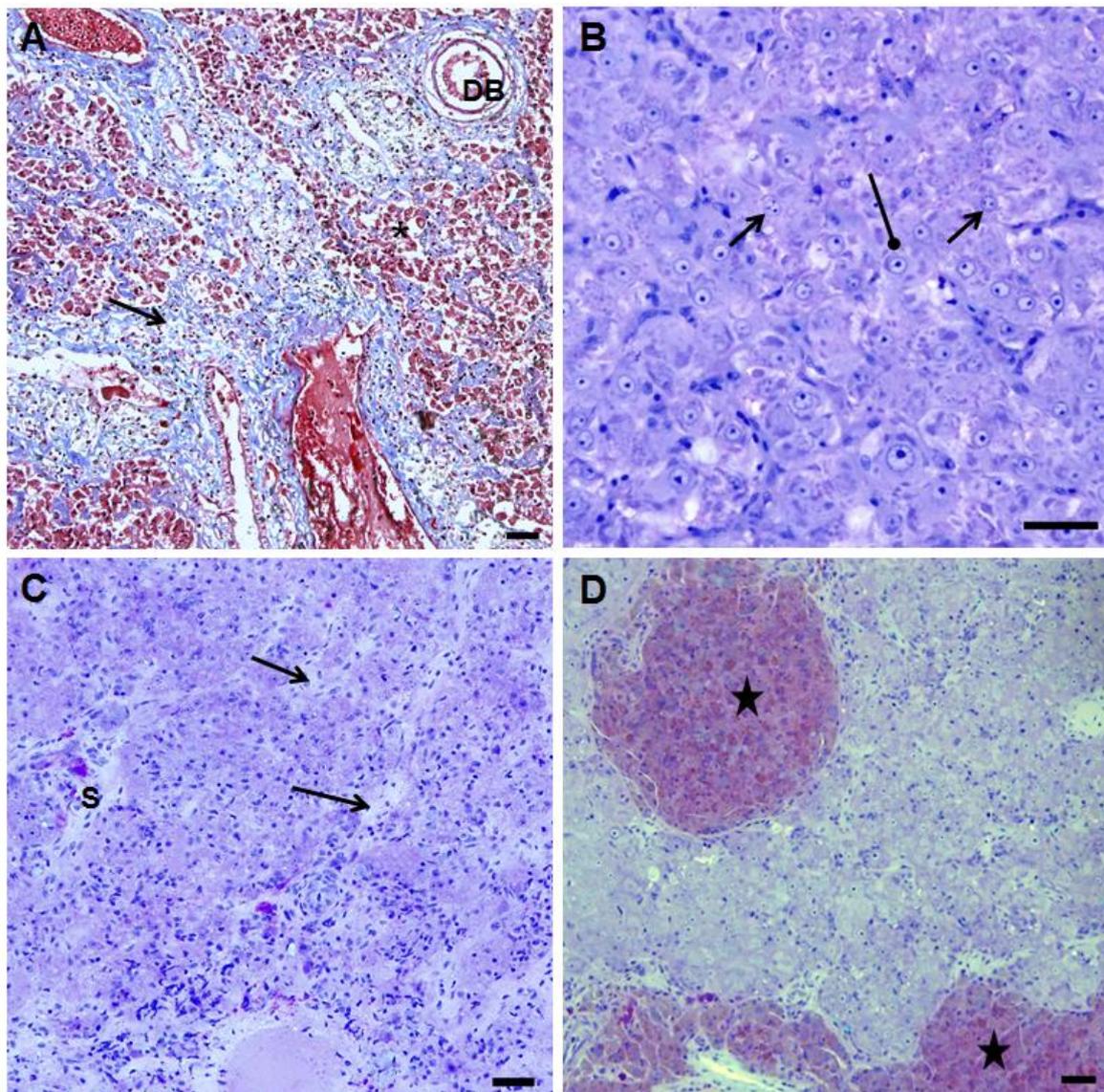
O  $IL_{org}$  médio e a porcentagem de variação do fígado em relação ao grupo controle está apresentado na Tabela 14. Após 30 dias após a injeção i.p., foi observada alteração da arquitetura hepática e celular e o  $IL_{org}$  aumentou 370%. O tecido fibroso no fígado aumentou 74% após a exposição em relação ao controle. As alterações nos núcleos aumentaram 270% e a frequência de centros de melanomacrófagos aumentou 187% em relação ao grupo controle. A resposta hipirêmica diminuiu 45% após a EC.

As principais patologias encontradas ( $\geq 40\%$  da variação do controle) no fígado estão representadas na Figura 35.

**Tabela 14.** Índice de lesão ( $IL_{org}$ ) histopatológica média no fígado de *Hoplias malabaricus* 30 dias (C30 e MC30) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

<b>Índice de Lesão Histopatológica</b>			
<b>Alterações</b>	<b>C30</b>	<b>MC30</b>	<b>%</b>
• Acúmulos de substâncias intracelulares	2,8	1,6	42
• Alteração da arquitetura celular e hepática	1,0	4,7	370
• Alteração nuclear	2,0	7,4	270
• Aneurisma	1,0	1,0	0
• Atrofia celular	2,0	2,0	0
• Centros de melano-macrófagos	1,6	4,6	187
• Degeneração citoplasmática	1,2	1,1	8
• Hemorragia	1,0	1,0	0
• Hipertrofia celular	1,0	1,2	20
• Hiperemia	2,0	1,1	45
• Necrose	3,0	3,0	0
• Fibrose	5,4	9,4	74

% do grupo MC em relação ao grupo controle.

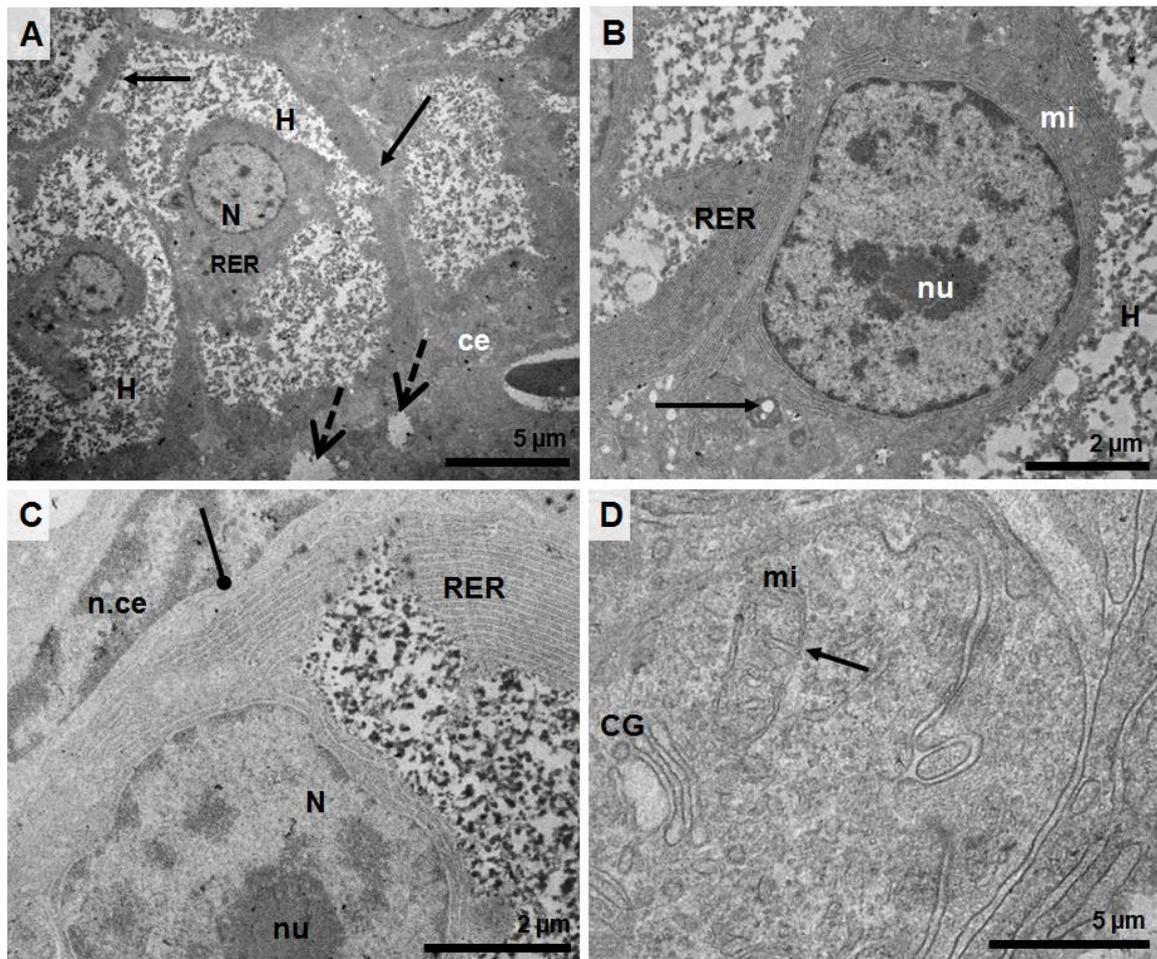


**Figura 35.** Alterações histopatológicas do fígado de *Hoplias malabaricus* após 30 dias de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Seta indica tecido fibroso no tecido hepático e asterisco apontam os hepatócitos; (B) setas contínuas indicam alterações nucleares e seta redonda alteração na morfologia do hepatócito. (C) hiperemia indicada pelas setas e (D) estrelas indicam centro de melano-macrófagos. Coloração: (A) Tricromio de Masson e (B-C-D) Azul de toluidina e fucsina básica. Escala = 20  $\mu$ m.

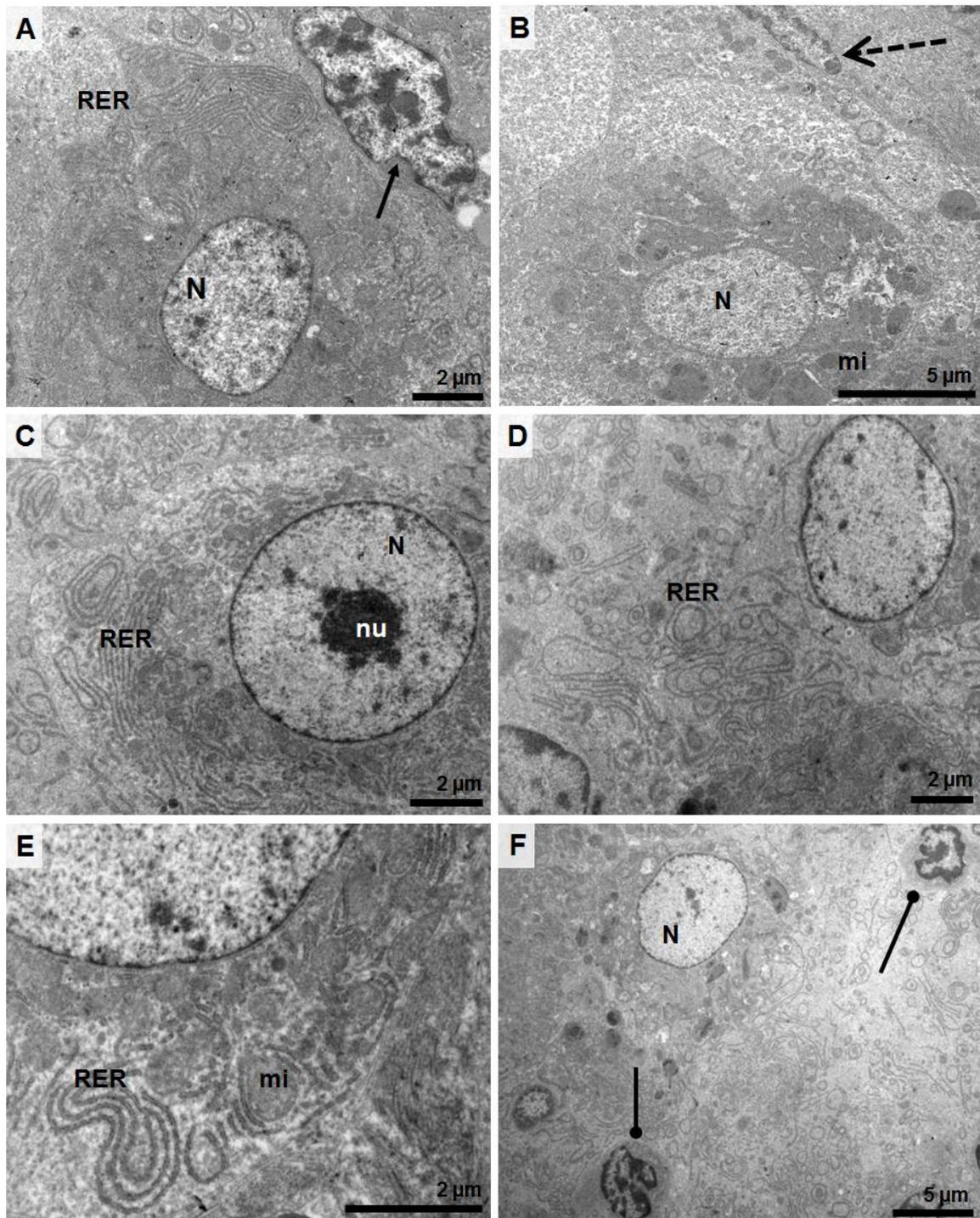
---

A ultraestrutura dos hepatócitos dos animais do grupo controle mostrou morfologia normal com núcleos esféricos e organização intracelular das organelas na região perinuclear. O RER apresentou camadas densas das cisternas e as mitocôndrias distribuídas por todo o citoplasma. Glicogênio estava presente no citoplasma, mas não foram observadas reservas lipídicas (Figura 36).

Após a EC ao extrato bruto foram observadas lesões hepáticas com perda total da estrutura celular e organelas. A delimitação celular pela membrana plasmática associada a células adjacentes desapareceram. Uma grande massa de fibras colágenas estava presente entre os hepatócitos. Vacuolizações, lisossomos ou complexo de Golgi não foram identificados. O RER estava fragmentado, dilatado e apresentava disposição em espiral; as mitocôndrias estavam hipertrofiadas e as cristas mitocondriais não foram observadas (Figura 37).



**Figura 36.** Micrografia eletrônica de fígado de *Hoplias malabaricus* do grupo controle da exposição crônica. (A) Hepatócitos com morfologia normal; seta contínua indica a junção entre as células e setas tracejadas mostram o espaço de Disse. (B) Disposição perinuclear das organelas intracelulares; seta indica presença de lisossomo. (D) seta indica a membrana celular do hepatócito em contato com células endoteliais e (D) mitocôndria e complexo de Golgi. H = hepatócitos; N = núcleo; ce = células epiteliais; mi = mitocôndrias; RER = retículo endoplasmático rugoso; nu = nucléolo; CG = complexo de Golgi.



**Figura 37.** Micrografia eletrônica de alterações intracelulares em fígado de *Hoplias malabaricus* após 30 dias de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A a F) Ausência de delimitação celular visível e desorganização intracelular. Note a fragmentação e posição espiral do RER com hipertrofia de mitocôndrias. Setas contínuas mostram células de Kupffer; setas tracejadas células endoteliais e setas redondas miofibroblastos. H = hepatócitos; N = núcleo; mi = mitocôndrias; RER = retículo endoplasmático rugoso; nu = nucléolo.

### 4.3.3 Alterações metabólicas e parâmetros hematológicos

A massa corpórea, massa hepática e o IHS (média  $\pm$  E.P.M.) dos peixes controle e expostos por 30 dias ao extrato bruto estão apresentados na Tabela 15. A massa corporal inicial dos animais não variou em relação à massa corporal final da EC, mas a massa hepática diminuiu e, conseqüentemente, o IHS diminuiu 31% em relação ao controle.

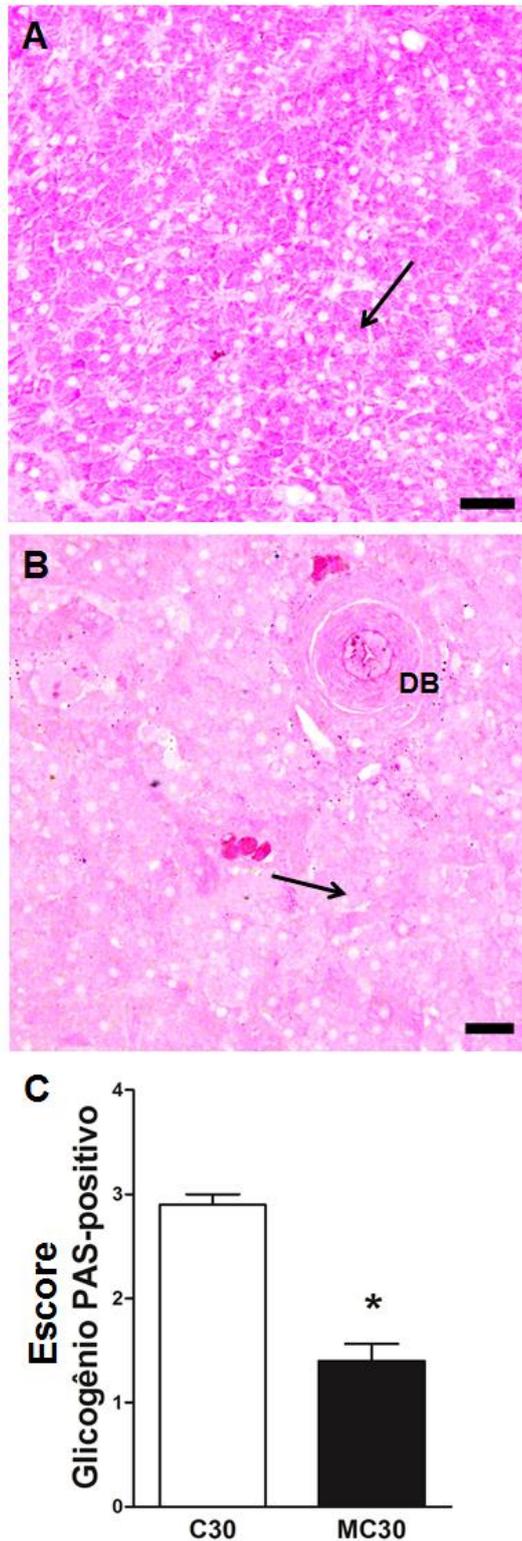
**Tabela 15.** Valores médios ( $\pm$  E.P.M.) dos parâmetros biométricos e índice hepatossomático (IHS) de *Hoplias malabaricus* 30 dias (C30 e MC30) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

<b>Parâmetros Biométricos</b>		
	<b>C30</b>	<b>MC30</b>
Massa corporal inicial (g)	271,4 $\pm$ 13,5	301,9 $\pm$ 20,6
Massa corporal final (g)	279,1 $\pm$ 18,3	300,2 $\pm$ 16,2
Massa hepática (g)	4,19 $\pm$ 0,3	3,0 $\pm$ 0,4*
IHS (%)	1,45 $\pm$ 0,07	0,99 $\pm$ 0,1*

C = grupo controle; MC = grupo microcistina (n=10). (\*) Indica diferença ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle

Os parâmetros metabólicos do fígado, músculo branco e plasma estão apresentados na Tabela 16. No fígado, houve uma diminuição do glicogênio (85%), corroborando com a avaliação semi-quantitativa do glicogênio hepático (Figura 38) e diminuição na concentração de lactato (38%) e piruvato (38%), e glicose (49%) quando comparados ao grupo controle. A atividade da AST diminuiu 60%, enquanto as fosfatases aumentaram a atividade em 83% (FAL) e 116% (FAC).

No musculo branco, uma diminuição do lactato (27%) , enquanto no plasma, houve aumento da concentração de amônia (25%) e diminuição do piruvato (10%) e lactato (2%). Não houve alteração nos parâmetros hematológicos e índices hematimétricos após a EC (Tabela17).



**Figura 38.** Histoquímica PAS-positivo para glicogênio hepático de *Hoplias malabaricus* após 30 dias de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Grupo controle; setas indicam PAS-positivo no hepatócito. (B) Grupo microcistina PAS-positivo; (C) Score para o glicogênio PAS-positivo. (\*) mostra a diferença ( $p < 0.05$ ) entre do grupo microcistina em relação ao respectivo controle. DB = ducto biliar. Escala = 20  $\mu\text{m}$ .

**Tabela 16.** Valores médios ( $\pm$  E.P.M.) dos parâmetros metabólicos do fígado, músculo branco e plasma de *Hoplias malabaricus* 30 dias (C30 e MC30) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

<b>Metabolismo Intermediário</b>						
<b>Variáveis</b>	<b>Fígado</b>		<b>Músculo</b>		<b>Plasma</b>	
	<b>C30</b>	<b>MC30</b>	<b>C30</b>	<b>MC30</b>	<b>C30</b>	<b>MC30</b>
<i>Intermediário</i>						
Amônia ( $\mu\text{mol g tecido}^{-1}$ ou $\mu\text{mol mL plasma}^{-1}$ )	12,0 $\pm$ 0,7	10,7 $\pm$ 0,5	7,8 $\pm$ 0,2	7,9 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,02	0,5 $\pm$ 0,02*
Piruvato ( $\mu\text{mol g tecido}^{-1}$ ou $\mu\text{mol mL plasma}^{-1}$ )	1,8 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,05*	0,4 $\pm$ 0,003	0,5 $\pm$ 0,02	0,38 $\pm$ 0,005	0,34 $\pm$ 0,1*
Lactato ( $\mu\text{mol g tecido}^{-1}$ ou $\mu\text{mol mL plasma}^{-1}$ )	18,1 $\pm$ 0,9	11,2 $\pm$ 0,7*	32,7 $\pm$ 0,9	23,8 $\pm$ 2,9*	0,60 $\pm$ 0,03	0,59 $\pm$ 0,03
Aminoácidos ( $\mu\text{mol g tecido}^{-1}$ ou $\mu\text{mol mL plasma}^{-1}$ )	35,5 $\pm$ 1,8	30,7 $\pm$ 2,5	29,1 $\pm$ 1,7	30,3 $\pm$ 1,7	9,7 $\pm$ 0,4	8,8 $\pm$ 0,3
Proteína ( $\text{mg proteína}^{-1}$ g tecido $^{-1}$ mg mL plasma $^{-1}$ )	9,4 $\pm$ 0,6	10,0 $\pm$ 0,5	3,0 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,2	19,3 $\pm$ 3,3	22,4 $\pm$ 2,0
Glicose ( $\mu\text{mol g tecido}^{-1}$ ou $\mu\text{mol mL plasma}^{-1}$ )	52,7 $\pm$ 2,4	26,8 $\pm$ 1,7*	4,7 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,3	5,0 $\pm$ 0,3	4,6 $\pm$ 0,3
Glicogênio ( $\mu\text{mol glicosil-glicose g tecido}^{-1}$ )	955,2 $\pm$ 80,4	138,9 $\pm$ 28,3*	16,9 $\pm$ 1,0	15,4 $\pm$ 0,7	---	---
<i>Enzimático</i>						
AST (U mg proteína $^{-1}$ )	1,0 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,05*	1,2 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,08	<i>	<i>
ALT (U mg proteína $^{-1}$ )	0,7 $\pm$ 0,09	0,8 $\pm$ 0,1	0,07 $\pm$ 0,01	0,1 $\pm$ 0,03	<i>	<i>
FAL(nmol p-nitrofenilfosfato min $^{-1}$ mg proteína $^{-1}$ )	18,77 $\pm$ 1,4	33,38 $\pm$ 2,4*	0,6 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,09	<i>	<i>
FAC(nmol p-nitrofenilfosfato min $^{-1}$ mg proteína $^{-1}$ )	18,5 $\pm$ 1,1	40,1 $\pm$ 3,3*	2,8 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,3	<i>	<i>

(\* ) Indica diferença ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle; (#) indica diferença ( $p < 0,05$ ) entre os períodos de exposição; <i> dados já informados na seção 4.3.2.

**Tabela 17.** Valores médios ( $\pm$  E.P.M.) dos parâmetros hematológicos de *Hoplias malabaricus* 30 dias (C30 e MC30) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

<b>Parâmetros Hematológicos</b>		
	<b>C30</b>	<b>MC30</b>
<i>Parâmetros</i>		
HCT (%)	26,5 $\pm$ 0,9	23,7 $\pm$ 1,3
RBC ( $10^4$ células $\text{mm}^3$ )	203,5 $\pm$ 6,5	194,2 $\pm$ 12,1
Hb ( $\text{g dL}^{-1}$ )	7,2 $\pm$ 0,4	7,2 $\pm$ 0,2
<i>Índices Hematimétricos</i>		
VCM ( $\mu\text{m}^3$ )	132,2 $\pm$ 5,3	123,2 $\pm$ 2,9
HCM ( $\text{pg célula}^{-1}$ )	36,1 $\pm$ 2,6	36,0 $\pm$ 1,3
CHCM ( $\text{g dL}^{-1}$ )	27,4 $\pm$ 2,3	29,27 $\pm$ 0,9

C = grupo controle; MC = grupo microcistina (n=10).

#### 4.3.4 Desintoxicação de microcistinas e estresse oxidativo

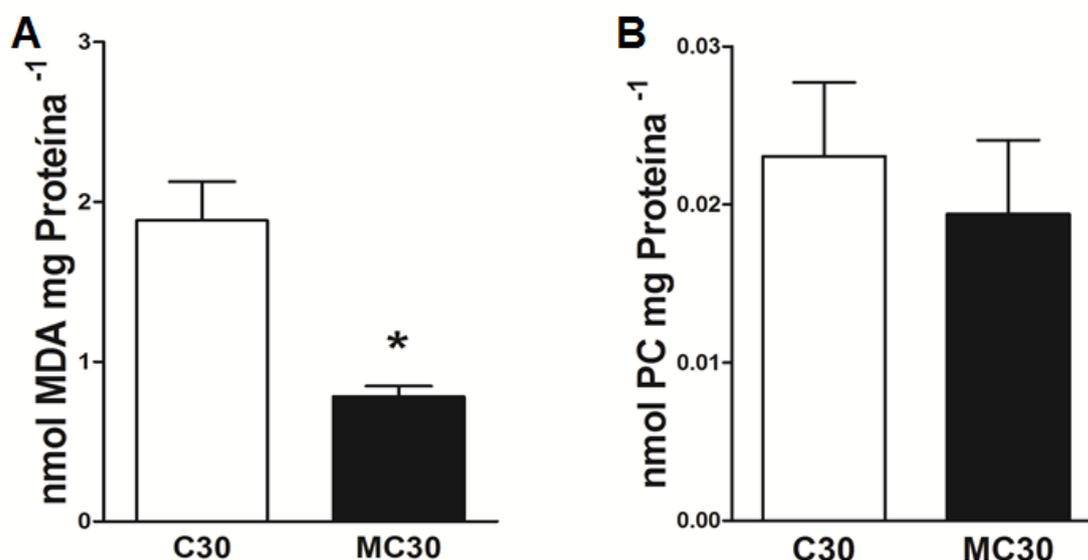
Os parâmetros de biotransformação e defesas antioxidantes do fígado estão representados na Tabela 18. A ESC às MCs aumentou a atividade da EROD em 185%, enquanto a atividade da GST diminuiu 42%. Em relação ao sistema antioxidante, a atividade da SOD e da CAT aumentou (31% e 68%, respectivamente). A atividade da GPx diminuiu 58% e os níveis de GSH 78%.

Em relação à lipoperoxidação, os níveis de MDA equivalentes diminuíram 61% e não foram observados danos oxidativos em proteínas no tecido hepático (Figura 39). Os danos genéticos estão apresentados na Figura 40. Após a ESC, o score do ensaio cometa em fígado de animais expostos a MC aumentou 72% em relação ao grupo controle (Figura 41).

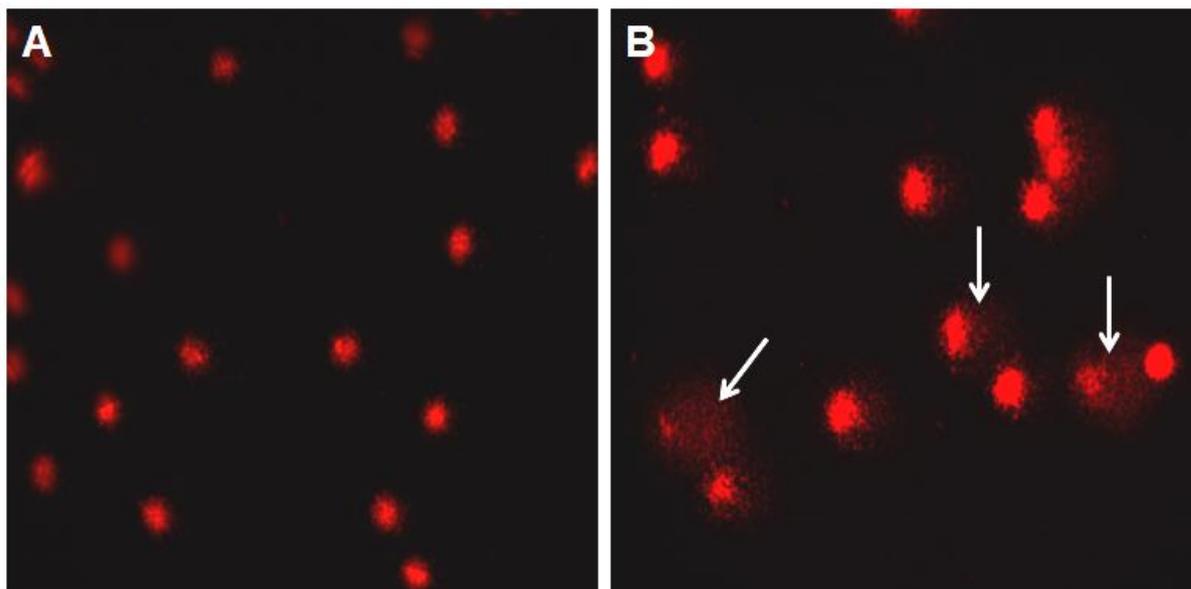
**Tabela 18.** Parâmetros de biotransformação e sistemas antioxidantes (média  $\pm$  E.P.M.) em fígado de *Hoplias malabaricus* 30 dias (C30 e MC30) após exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.

<b>Biotransformação e Sistemas Antioxidantes Hepáticos</b>		
	<b>C30</b>	<b>MC30</b>
<i>Biotransformação</i>		
EROD (nmol resorufina min <sup>-1</sup> mg proteína <sup>-1</sup> )	0,007 $\pm$ 0,001	0,02 $\pm$ 0,03*
GST (U mg proteína <sup>-1</sup> )	25,3 $\pm$ 1,9	14,5 $\pm$ 0,9*
<i>Sistema Enzimático</i>		
SOD (U SOD min <sup>-1</sup> mg proteína <sup>-1</sup> )	54,4 $\pm$ 2,2	71,6 $\pm$ 3,8*
CAT (U mg proteína <sup>-1</sup> )	77,2 $\pm$ 4,4	130,3 $\pm$ 16,3*
GPX (U mg proteína <sup>-1</sup> )	33,1 $\pm$ 4,3	13,7 $\pm$ 1,1*
GR (mU mg proteína <sup>-1</sup> )	8,2 $\pm$ 0,6	7,4 $\pm$ 0,6
<i>Sistema Não Enzimático</i>		
GSH (nmol GSH mg proteína <sup>-1</sup> )	82,4 $\pm$ 10,8	18,0 $\pm$ 2,1*

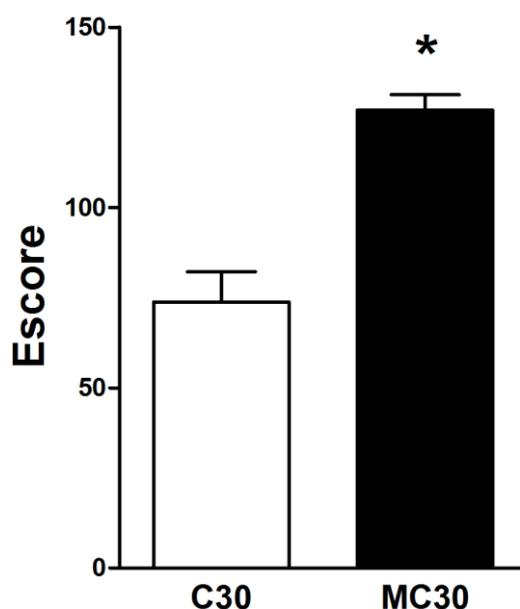
C = grupos controle; MC = grupos microcistinas (n=10). (\*) Indica diferença (p<0,05) em relação ao grupo controle.



**Figura 39.** Valores médios ( $\pm$  E.P.M.) de danos hepáticos. (A) Lipoperoxidação do fígado em níveis equivalentes à malondialdeído (MDA) e (B) níveis de proteínas carboniladas em fígado de *Hoplias malabaricus* após 30 dias de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. C = grupos controle; MC = grupos microcistinas. (\*) Indica diferença (p<0,05) em relação ao grupo controle.



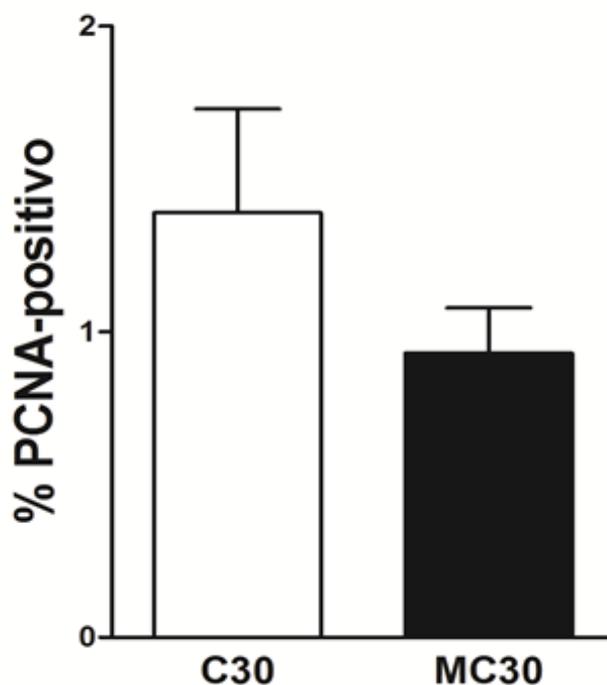
**Figura 40.** Ensaio cometa em células do fígado de *Hoplias malabaricus* após 30 dias de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Grupo controle e (B) grupo exposto às MC. Setas indicam os danos no DNA evidenciados pela cauda do cometa. Coloração: Brometo de etídeo. Aumento 400x.



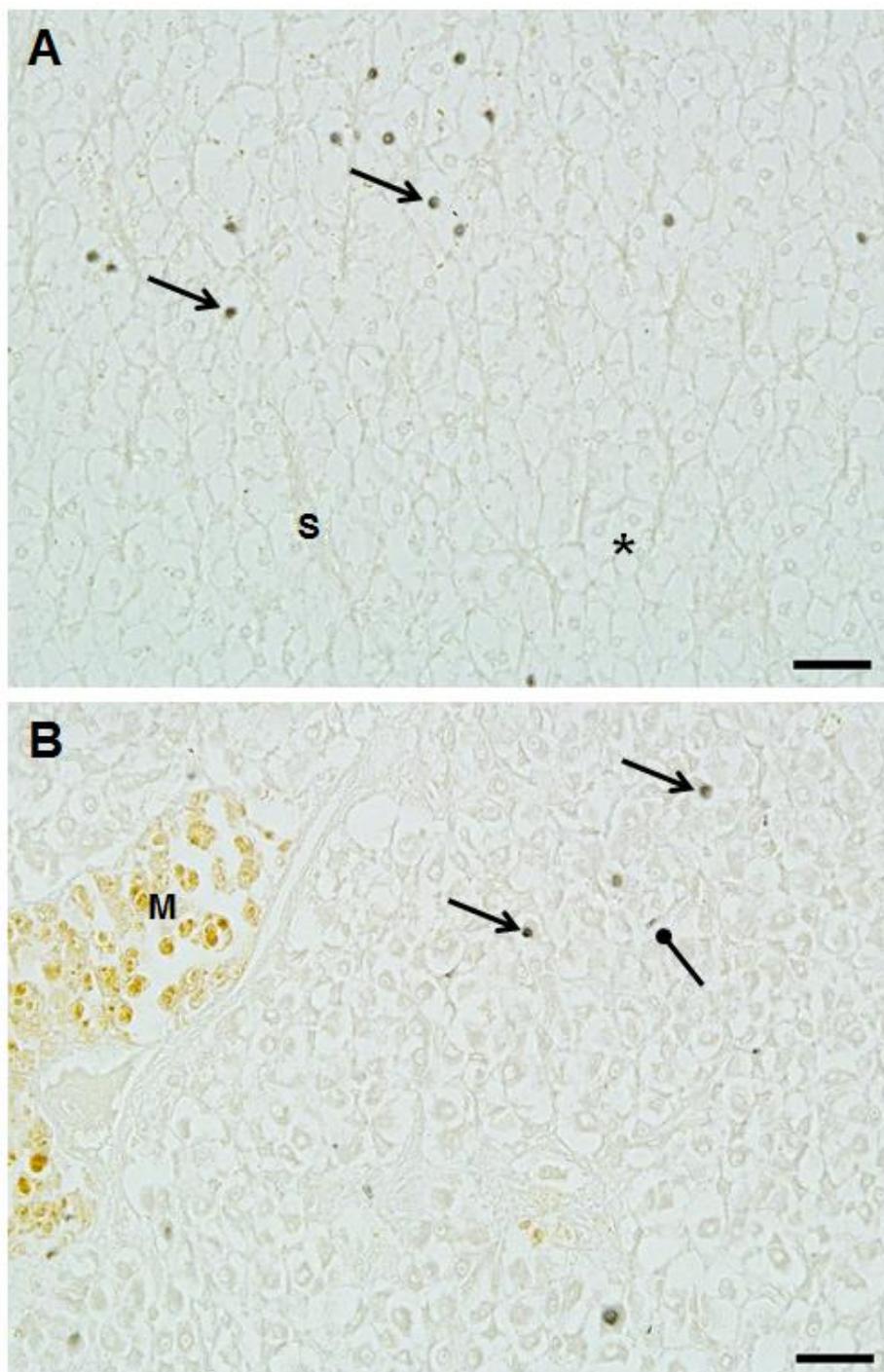
**Figura 41.** Escore médio ( $\pm$  E.P.M.) do ensaio cometa em fígado de *Hoplias malabaricus* após 30 dias de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. C = grupo controle e MC = microcistinas. (\*) Indica diferença ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle.

#### 4.3.5 Proliferação celular hepática

Apesar de serem observadas lesões no fígado dos animais expostos a MC após o ESC, não houve diferença na proliferação celular entre os animais controle e MC (Figura 42). O tecido hepático dos animais expostos não apresentou *hot-spots* e os hepatócitos marcados estão apresentados na Figura 43.



**Figura 42.** Porcentagem de núcleos PCNA-positivos em hepatócitos de *Hoplias malabaricus* após 30 dias de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas.



**Figura 43.** Núcleos PCNA-positivos em hepatócitos de *Hoplias malabaricus* após 30 dias de exposição ao extrato bruto de *Radiocystis fernandoi* contendo microcistinas. (A) Grupo Controle e (B) grupo microcistina. Setas pontiagudas indicam núcleos de hepatócitos PCNA-positivo; seta redonda indica núcleo PCNA-positivo para outros grupos celulares. Asterisco mostram hepatócitos sem marcação. S = sinusóides; M = Centros de melano-macrófagos. Escala = 20  $\mu$ m.

---

## 5 DISCUSSÃO

Cianobactérias, embora morfológicamente simples, são quimicamente complexas e produzem diversos compostos, dentre os quais as MCs (Pereira et al., 2012). Fatores ambientais como a intensidade de luz influenciam a variabilidade dos aminoácidos na posição 2 e 4 da estrutura molecular da MCs (Welker e Von Dohren, 2006), levando à formação de variantes de MCs, dentre as quais as variantes MC-LR, MC-YR e MC-RR são as mais comuns em florações de cianobactérias. Em geral, em florações algumas variantes de MCs são encontradas e, dentre elas, poucas são dominantes (Welker et al., 2004). Embora diferentes cepas de *R. fernandoi* possam produzir diferentes variantes majoritárias de MCs dependendo das condições de luz (Lombardo et al., 2006; Pereira et al., 2012), os frequentes relatos da ocorrência dessa espécie em água potável nas regiões tropicais como Indonésia e Sri Lanka (Komárek e Komárková-Legnerová, 1993) e regiões brasileiras como Minas Gerais (Jardim et al., 2001, Pereira et al., 2012), Pará (Lombardo et al., 2006), Goiás (Bessa et al., 2001) e São Paulo (Agujaro e Lussari, 2001) despertam a atenção dos pesquisadores sobre sua toxicidade.

A toxicidade das MCs aos vertebrados é variante-específica, complexa e pode envolver diversos fatores como dose, tempo de exposição, via de entrada, alvos biológicos e metabolização. As características hidrofílicas ou hidrofóbicas da molécula resultam em mudanças toxicocinéticas e potencial de acumulação nos organismos (Stotis et al., 2000). Estudos têm evidenciado que dentre as MCs mais encontradas, a MC-LR é a mais tóxica, seguida da MC-YR e MC-RR (Gupta et al., 2003). Em linhagem de células de carcinoma coloretal humano (Caco-2), estudos mostraram que a MC-LR e MC-YR apresentaram toxicidade similares *in vitro* ( $MC-YR \geq MC-LR > MC-RR$ ), mas diferiram *in vivo*, na qual a toxicidade da  $MC-LR > MC-YR > MC-RR$  sugerindo que os congêneres não apresentam o mesmo perfil tóxico e que os mecanismos de ação envolvem vias e órgãos diferentes (Puerto et al., 2009). Apesar da baixa hepatotoxicidade, a MC-RR é amplamente encontrada em florações e especialmente levada a todos os órgãos pela sua alta hidrofiliidade (Wu et al., 2013). Poucos estudos focam quantitativamente a MC-RR ou seus possíveis metabolitos conjugados conhecidos (MC-RR/GSH e MC-RR/Cisteína) em tecidos animais devido à alta polaridade,

---

baixa concentração de alvos analíticos, matrizes biológicas complexas e ligações covalentes com proteínas (Wu et al., 2010). Dessa forma, a toxicidade da MC-RR e das outras variantes, muitas vezes é expressa utilizando fatores de conversão MC-LR<sub>eq</sub> (Wolf e Frank, 2002).

Embora não se pode excluir que no extrato bruto pode haver outras substâncias que poderia induzir, atenuar ou simular efeitos da toxicidade, as análises para a identificação das MCs presentes na cianobactéria *R. fernandoi*, cepa R28, mostra a presença majoritária da MC-RR, seguida da variante MC-YR; ausência da MC-LR e traços de outras substâncias não identificadas corroborando os estudos de Pereira et al. (2012). O perfil toxicocinético das MCs contidas no ambiente ou extrato bruto pode variar consideravelmente entre as diferentes espécies. De uma forma geral, a exposição ao extrato bruto exerce efeitos mais próximos aos que são encontrados no ambiente, em função de simular efeitos indiretos e diretos das MC e dos conteúdos intracelulares que podem conter na célula de cianobactérias. Exposições de longo prazo com sucessivas doses podem refletir com maior realidade a captação de MC durante a floração, independente a via de entrada da toxina no organismo. Mamíferos parecem ser mais suscetíveis às toxinas que os peixes (Zhang et al., 2013). Por exemplo, a LD<sub>50LR</sub> i.p. em camundongos é aproximadamente 50-60 µg kg<sup>-1</sup> (Carmichael et al., 1988), enquanto para carpas (*Cyprinus carpio*) aumenta para 300-550 µg kg<sup>-1</sup> (Rabergh et al., 1991); 400-500 µg kg<sup>-1</sup> em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Kotak et al, 1996) e em torno de 1500 µg kg<sup>-1</sup> em percas (*Pera fluviatilis*) (Ibelings et al., 2005).

Nesse estudo optamos preparar as dosagens do extrato bruto baseados na conversão da quantidade de MC-LR<sub>eq</sub> presente, uma vez que o intuito fosse expor os peixes ao conteúdo celular da cianobactéria, simulando o mais próximo de uma exposição ambiental. Não há concentrações ou doses letais de MCs no ambiente para peixes, ao passo que alguns estudos avaliam apenas a toxicidade de MCs presentes no extrato bruto de cianobactérias através de fatores de conversão MC-LR<sub>eq</sub> (Wolf e Frank, 2002). Normalmente esse fator de conversão é baseado a partir da DL<sub>50</sub> estabelecida para roedores, variando os coeficientes de 0,1 a 0,2 para MC-RR e de 0,4 a 1,0 para a MC-YR (Wolf e Frank, 2002; Li et al, 2008). Em peixes, a sensibilidade à toxina depende principalmente dos hábitos

---

alimentares. Fitoplanctívoros são o grupo de peixes mais susceptíveis à intoxicação, uma vez que se alimenta diretamente de cianobactérias e tem uma maior capacidade de metabolização das toxinas, diferentemente de peixes com outros hábitos alimentares (onívoros, detritívoros e carnívoros) (Li et al., 2008).

O acúmulo de MCs em diferentes órgãos da biota aquática tem sido relatado em peixes nas últimas décadas (Rabergh et al., 1991; Williams et al., 1997; Pflugmacher et al., 1998; Lawrence e Menard, 2001; Magalhães et al., 2003; Soares et al., 2004; Xie et al., 2005; Amé et al., 2010). Independente da rota de exposição, a acumulação só é efetiva quando a absorção é mais rápida que o processo de depuração (Gutiérrez-Praena et al., 2013). Deblois et al. (2008) investigando o potencial de acumulação de MCs em *O. niloticus* em dois reservatórios brasileiros mostrou que as tilápias apresentaram maior concentração de MCs no fígado do que no músculo. Entretanto, quando as tilápias foram expostas via oral por 31 dias, Deblois e colaboradores (2011) notaram que primariamente as MCs se acumularam no estômago, seguido pelo fígado e estando ausente no músculo, sugerindo uma correlação entre via de captação e potencial de acumulação órgão-dependente.

De acordo com Dietrich e Hoeger (2005), o acúmulo de MCs em um tecido assim como seu efeito tóxico são mediados não só pela capacidade de metabolização, mas também pela presença/ausência e tipo de expressão das OATPs. O acúmulo de MCs no músculo varia dependendo do potencial de depuração da espécie, da concentração de MCs captada, o tempo exposto e local de exposição (campo ou laboratório). Carpas (*Hypophthalmichthys molitrix*) expostas oralmente (80 dias) a *Microcystis viridis*, mostrou acúmulo de MCs apenas no intestino, fígado e sangue (40º dia) e quando retirada a MCs da alimentação, por mais 40 dias, a taxa acumulativa diminuía nesses tecidos na medida em que o organismo conseguia depurar as toxinas (Xie et al., 2004). Segundo Xie et al. (2005) que estudaram a distribuição nos órgãos e a acumulação de MCs em diversos grupos de peixes, os carnívoros tendem a acumular mais MCs em fígado e músculo, seguidos pelos onívoros, fitoplanctívoros e herbívoros. Dessa forma, a bioacumulação de MCs em músculo poderia ser atribuída mais aos processos de biomagnificação, a qual a MCs

---

bioconcentrada é aumentada através de sucessivas interações tróficas (Kinneer, 2010).

O acúmulo da MC-YR no fígado de *H. malabaricus* durante a EA e EC pode estar associado às características lipofílicas da molécula e/ou metabolização mais lenta. A variante MC-RR detectada no fígado após ambas as exposições e quantificada apenas na EC pode ser atribuída, como enfatizado por Wu et al. (2013), às características mais hidrofílicas da molécula que a tornam mais facilmente metabolizada ou eliminada do fígado. Em carpas (*Hypophthalmichthys molitrix*), alimentada durante 40 dias com uma miustura contendo MC-LR e MC-RR, a MC-RR absorvida foi totalmente eliminada (Xie et al., 2004).

Grande parte das MC-RR permanece ligada às proteínas e substratos como fosfatases, GSH e cisteína (Zhang et al., 2010). As ligações de MCs com as fosfatase PP1 e PP2A envolvem ligações reversíveis em primeira instância e posteriormente, em um período de horas, em ligações covalentes e irreversíveis (Craig et al., 1996). Esse fato sugere que a MC-RR se liga às fosfatases e/ou a substratos e possivelmente são metabolizadas pelo fígado diminuindo a quantidade acumulada. Uma correlação entre o acúmulo no fígado e rins (Wu et al., 2013) sugere que a MC-RR tende a ser rapidamente transportada para os rins por sistemas seletivos de transporte e excretada (Dietrich e Hoeger, 2005). Em contrapartida, a capacidade de metabolização de MC-YR em *H. malabaricus* não diferiu nas duas formas de exposição, exposição aguda e exposição crônica, uma vez que a concentração de MCs acumulada no fígado foi similar nos dois protocolos experimentais.

Nas condições experimentais deste estudo não houve acúmulo no músculo branco de traíras, demonstrando uma eficácia na depuração dessas MCs. Entretanto, não é possível assegurar que a ingestão de traíras expostas às MCs não coloque em risco a saúde humana associada ao consumo dessa espécie de peixe. Injeções i.p., como utilizada no presente estudo, não são análogas às exposições de campo uma vez que a toxina é absorvida mais rapidamente e é diferentemente metabolizada (Ibelings e Havens, 2007). É importante enfatizar que são necessários novos estudos para uma detalhada avaliação de risco e entender mais sobre o potencial de contaminação da espécie, em diferentes vias de captação e em diferentes períodos de eutrofização.

---

O mecanismo de ação tóxica da MCs está associado às inibições específicas das proteínas fosfatases PP1 e PP2A, que interagem com a região ADDA da molécula das MCs (Barford e Keller, 1994; Goldberg et al., 1995). No atual estudo, a homologuidade da PP1 e PP2A foi observada após o EA e EC, entretanto, após 30 dias a atividade da PP1 hepática mostrou apenas uma tendência de inibição, a qual foi observada para a PP2A hepática, indicando uma recuperação da atividade enzimática. Esta recuperação pode ser atribuída a alguns fatores: excreção biliar de MCs (Hitzfeld, et al., 1999); ligações reversíveis com as proteínas fosfatases ou covalentes à glutationa (Kondo et al., 1996) ou por uma nova síntese de enzima por parte do tecido hepático ainda funcional, na tentativa de conter o desequilíbrio (Tencalla e Dietrich, 1997). Após a recuperação da atividade das fosfatases, essas alterações morfológicas ainda eram evidentes.

A PP1 tem um importante papel em vários processos celulares tais como mitose, meiose, integridade celular e no metabolismo do glicogênio (Lin et al., 1999; Aoyama et al., 2003). A PP2A representa 1% das proteínas celulares totais e exibe uma sequência homóloga com a PP1, sendo importante na regulação de eventos durante o início da mitose e inibição da fusão de vesículas endocíticas. A atividade desta enzima, juntamente com a PP1, participa da motilidade celular, diferenciação e citocinese e da regulação da proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (Harrison et al., 1999; Aoyama et al., 2003; Xing et al., 2006). A inibição da PP1 e PP2A altera as fosforilações de proteínas celulares envolvidas na transdução de sinais, resultando em uma cascata de eventos que levariam a célula a apoptose ou necrose (Gehring, 2004; Buratti et al., 2013). Estudos de Tencalla e Dietrich (1997), Fischer et al. (2000) e Malbrouck et al. (2004), mostraram que a inibição de fosfatases hepática tem correlação com a concentração de MCs, sendo evidente após 1 hora de exposição e apresentando uma recuperação da atividade em aproximadamente 72 horas, quando a concentração de MCs do tecido diminuía.

Em traíras, a inibição da PP2A após 30 dias de exposição parece implicar em menor recuperação da atividade das fosfatases possivelmente atribuído ao acúmulo das MCs no fígado e as sucessivas doses administradas. Alguns estudos em mamíferos e peixes têm mostrado que a inibição das fosfatases ocorre de maneira dose-dependente (Cohen et al., 1988; Runnegar et al., 1993), o

---

que corrobora a hipótese de interação de inibição das fosfatases com ligações reversíveis e taxas de excreção, via bile, após ligações covalentes com a GSH (Runnegar et al., 1999).

A ação tóxica da MCs pode levar ao comprometimento funcional do fígado (Li et al., 2013; Mitsoura et al., 2013; Molina et al., 2005). O aumento contínuo da atividade da ALT plasmática em 12 e 96 h em *H. malabaricus* corrobora que há um aumento tempo-dependente da atividade plasmática da ALT plasmática em vertebrados (Vajcova et al., 1998; Navratil et al., 1998; Guzman, 1999; Solter et al., 2000; Li et al., 2004; Giannuzzi et al., 2011). Uma diminuição da atividade hepática das transaminases poderia justificar o aumento da atividade no plasma (Solter et al., 2000), entretanto, o aumento da atividade plasmática da ALT após exposição crônica não corrobora com essa afirmação.

A ALT, enzima que atua no metabolismo de aminoácidos e na gliconeogênese, é o melhor biomarcador para hepatotoxicidade, exibindo baixa frequência de resultados falso-positivos para dano hepático (Amacher, 2002). Juntamente a esse biomarcador, a combinação da atividade da AST, FAC e FAL plasmática, bem como às concentrações de bilirrubinas, são confiáveis biomarcadores bioquímicos de função hepática diminuindo resultados falso-positivos (Ozer et al., 2008; Saraceni, 2001). Embora sendo um importante biomarcador clínico de danos hepatocelulares em exposição aguda, a atividade plasmática da ALT pode ser mascarada em exposições crônicas e não está associada à intensidade do dano.

A AST é primariamente encontrada no coração, seguido do cérebro, músculo e fígado e por ser menos específica é associada aos resultados falso-positivos da atividade da ALT à confirmação do dano hepático (Ozer et al., 2008). No presente estudo a baixa atividade da AST plasmática após a EA suporta a hipótese da ação hepatotóxica aguda das MCs, uma vez que aumento na atividade plasmática destas transaminases poderia ser resultante de injúria extra-hepática. Entretanto, de maneira aguda ou crônica a atividade da AST aumentou sugerindo que as MCs podem causar danos a outros grupos celulares, como os miócitos. Dessa forma, o estudo das fosfatases ácidas e alcalinas e bilirrubinas, concomitantemente às transaminases é uma forma mais adequada para avaliar danos hepáticos em exposições prolongadas (Solter et al., 2000).

---

Em peixes, a FAC ocorre em fígado, rins, brânquias, músculo, intestino e eritrócitos (Motta, 2000). O aumento da atividade plasmática da FAC após 12 e 96 horas em traíras corrobora os dados na literatura sugerindo a injúria celular. A alta atividade da FAC no plasma de tilápias (*Oreochromis sp*) expostos à MCs na água ou injeções i.p. poderia estar associada a injúrias hepáticas (Molina et al., 2005; Atencio et al., 2008a). Fosfatases são hidrolases que promovem o balanço entre a fosforilação e desfosforilação de proteínas e no plasma a atividade dessas enzimas é utilizada como biomarcadores da integridade das membranas que são responsáveis por transportes ou funções absorptivas. Em traíras, após 96h e 30 dias, o aumento da concentração de BT e BD no plasma sem o aumento da atividade da FAL, é evidência de danos hepatocelulares uma vez que as análises histológicas não mostraram alteração do sistema biliar. A atividade da FAL plasmática está relacionada à obstrução da passagem da bile (Jyothi e Narayan, 1999) e concomitantemente com as concentrações de bilirrubinas tornam-se importantes biomarcadores de doenças ou lesões hepato-biliares, quando comprovadas não serem originárias da destruição demasiada de eritrócitos ou colestase (Saraceni, 2001; Ramaiah, 2007). Para ser excretada na bile, a bilirrubina tem que estar na sua forma conjugada às ligandinas (bilirrubina direta) (Ozer et al., 2008).

Como consequência de alterações bioquímica causadas pelas MCs, alterações morfológicas são visíveis nos hepatócitos (Ríos et al., 2013). A aparência amarelada do fígado das traíras expostas às MCs, após a EA, foi similar aos achados de Molina et al. (2005) e as áreas avermelhadas indicaram focos hemorrágicos no órgão. Após a EC, a coloração do fígado não foi alterada, mas o órgão apresentou aspecto fibroso e pontos avermelhados com aspecto de grânulos evidenciando alterações morfológicas.

Em geral, o fígado dos teleósteos não apresentam hepatócitos arranjados em cordões como nos mamíferos, mas dispostos em placas circundadas por sinusóides e canalículo biliares (Vicentini et al., 2005), e ausência de lóbulos e espaços portais clássicos (Flores-Lopes e Malabarba, 2007). As traíras apresentaram uma estrutura hepática semelhante à de outros teleósteos, com arranjo normal do parênquima hepático, hepatócitos poligonais com núcleos centrais e nucléolos proeminentes, sistema sinusoidal e sistema biliar íntegro.

---

Lesões nos ductos ou proliferação celular no epitélio dos ductos em exposições às MCs são descritas na literatura (Fournie e Courtney, 2002; Ferreira et al. 2010). Entretanto, na traíra, a integridade do sistema de excreção biliar quanto à morfologia dos ductos e canalículos sugere eficiência na depuração de MCs livres presentes nos hepatócitos, via conjugação a outros substratos e excreção pela bile (Mohamed e Hussein, 2006).

A perda do formato dos hepatócitos após a exposição pode estar relacionada a alterações no citoesqueleto e dissociação entre os hepatócitos causando desarranjo do parênquima hepático. Esses resultados corroboram os resultados encontrados por muitos autores após toxicidade aguda por MCs em peixes (Runnegar et al., 1993; Khan et al., 1995; Fischer e Dietrich, 2000; Bischoff e Dabvt, 2001; Li et al., 2008; Ferreira et al., 2010; Hou et al., 2015) e inclusive em mamíferos expostos de forma aguda às MCs (Ito et al., 1997; Hooser, 2000; Guzman et al., 2003). Li et al. (2008) observaram desarranjo no parênquima hepático em carpas após 1 hora de exposição i.p. com 200 ou 500  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de MC-LR<sub>eq</sub>, associados a leve hemorragia por lesões nos capilares sinusóides e hipertrofia dos hepatócitos. Esses resultados corroboram os nossos, após 12 h da injeção intraperitoneal. Embora nenhuma hemorragia tenha sido observada após 96 h, grande dilatação dos sinusóides acarretou em aumento do fluxo de sangue (hiperemia) após a EA. Kotak et al. (1996) sugerem ser rara hemorragia no fígado de peixes, ao passo que outros estudos têm relatado a ocorrência de lesão nos sinusóides e proeminente hemorragia após exposição às MCs (Ito et al., 1997; Runnegar et al., 1999; Li et al., 2008; Ferreira et al., 2010; Hou et al., 2015). Não há evidências que o rompimento dos sinusóides seja efeito direto da MCs. Dessa forma, sugere-se que é uma consequência a partir da ação da toxina na morfologia do hepatócito. Esse processo pode induzir processos inflamatórios que contribuiriam para o choque que levaria a morte do animal (Wickstom et al., 1996; Soares, 2009).

Outras lesões da exposição à MCs em *H. malabaricus* tais como hipertrofia celular, vacuolização e degeneração citoplasmática, condensação ou perda do citoplasma e inclusões intracelulares diversas, corroboram os achados de outros autores para diferentes espécies de peixes (Li et al., 2004; Li et al., 2005; Ernst et al., 2006; Trinchet et al., 2011; Marie et al., 2012). Essas alterações foram

---

consideradas por Li et al. (2008) como sendo uma resposta aguda às MCs dose-tempo-dependente tanto em exposições em laboratório quanto em campo. Vacuolizações, condensações citoplasmáticas, assim como grânulos intracelulares podem resultar em alterações metabólicas relacionadas à armazenagem, transporte e desintoxicação (Taylor e Simkiss, 1989; Pacheco e Santos 2002; Trinchet et al., 2011).

Segundo Fischer e Dietrich (2000), as patologias são progressivas e difusas entre 1 a 24 horas. Outros autores sugerem uma recuperação hepática após 48 h, como observado em carpas (*Hypophthalmichthys nobilis*) e paulistinha (*Danio rerio*) após injeção i.p. (Li et al., 2008; Hou et al., 2015). Com exceção de hepatócitos hipertrofiados, leve recuperação estrutural foi observada após 96 horas da injeção i.p. sugerindo relação com o processo de depuração da toxina. Após exposições crônicas ambientais com  $17 \mu\text{g L}^{-1}$  de MCs, carpas (*H. molitrix*) apresentaram danos progressivos seguidos de uma recuperação após o estágio final da floração quando as concentrações de MCs passaram para  $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$  (Li et al., 2008). Diferentemente de exposições crônicas ambientais, as traíras expostas por 30 dias que recebiam injeções i.p. a cada 72 h desenvolveram patologias progressivas e nenhuma evidência de recuperação.

Algumas patologias foram mais frequentes após a exposição ao extrato bruto por 96 h, como a degeneração citoplasmática e a necrose focal em hepatócitos. A necrose já foi reportada em alguns estudos de toxicidade aguda (Malbrouck et al., 2003; Djediat et al., 2010). Entretanto, necrose tem sido observada principalmente após exposições crônicas (Malbrouck et al., 2003; Paliková et al., 2004; Ernst et al., 2007; Djediat, 2011; Hou et al., 2015), relacionada à lesão progressiva a partir da inibição das fosfatases PP1 e PP2A, decorrente de alterações nucleares como, por exemplo, cromatina marginal ou desintegrada, ausência de núcleo, picnose ou ausência de nucléolo (Fischer e Dietrich, 2000; Li et al., 2005; Ernst et al., 2006; Hou et al., 2015).

A necrose pode também estar relacionada ao aumento da resposta inflamatória e formação de centros de melano-macrófagos (CMMs) (Schmalz et al., 2002). Dessa forma, a porcentagem aumentada de CMMs em relação ao grupo controle após a EC nas traíras sugere resposta imune em relação às MCs, como observado por Djediat e colaboradores (2010) em *Oryzias latipes* após

---

exposição a MC-LR, uma vez que no presente estudo não foi observada necrose focal no órgão não sendo possível então relacionar os CMMs à necrose. A detecção imunohistoquímica de MCs em macrófagos no fígado e rim sugere que os CMMs podem fagocitar MCs via vesículas que englobam as variantes mais lipofílicas para neutralizar a toxicidade (Biagianti-Risbourg e Bastide, 1995).

As alterações celulares hepáticas após a EC foram similares às da EA e, além disso, intensas áreas de fibrose gerou desorganização estrutural do tecido hepático. A fibrose hepática pode ocorrer após várias doenças crônicas no fígado, uma vez que o tecido possui vários elementos celulares capazes de sintetizar e depositar os componentes da matriz extracelular (fibroblastos, miofibroblastos e até os próprios hepatócitos), sendo a célula de Ito o principal. Esta é uma célula armazenadora de vitamina A, que sob a ação das citosinas fibrogênicas (TGF- $\beta$ ; TNF- $\alpha$ ; produzidas por macrófagos e linfócitos) se diferencia em miofibroblasto e fibroblasto, se engajando na ativa síntese dos elementos da matriz (colágenos, elastina, etc.) (Andrade, 2005). O tecido hepático pode aumentar a fibrogênese na necessidade do organismo ou promover a fibrólise a partir do momento em que o tecido está em excesso. A plasticidade pode levar a recuperação do tecido, caso o animal depure a toxina ou esteja livre dela no ambiente (Andrade, 2005).

Após inibição das fosfatases, há grande hiperfosforilação de proteínas intracelulares, principalmente dos filamentos intermediários, microfilamentos de actina e microtúbulos essenciais para a regulação e organização da estrutura celular (Khan et al., 1995; Dawson, 1998; Bischoff e Dabvt, 2001) que pode resultar nas inúmeras patologias observadas nos animais intoxicados por MCs. A alteração na morfologia do hepatócito neste estudo evidencia uma desordem no citoesqueleto como um efeito tóxico das MCs já nas primeiras 12 horas de contaminação. Proliferação de lisossomos, vacúolos e corpos mielínicos presentes nos hepatócitos confirmam lesões celulares causadas pelas MCs e possível mecanismo de “turnover” celular (Pichardo et al., 2005; Li et al., 2008; Braunbeck, 1998). Condensação ou dilatação de mitocôndrias, fragmentação e vesiculação do retículo endoplasmático rugoso (RER) como observado em traíras tem sido bem descritos para roedores e peixes após contaminação por MCs (Rabergh et al., 1991; Bingsheng et al., 1993; Bury et al., 1997; Li et al., 2001; Li et al., 2005; Li et al., 2014) e sugere deficiência de produção de energia pelas

---

mitocôndrias e possível alteração das funções celulares que pode levar a morte celular. (Wallace e Starkov, 2000; Maioli, 2012).

As alterações nucleares em ambos os protocolos experimentais corroboram os resultados descritos por Wang e colaboradores (2010) em *Danio rerio* expostos a 20 µg MC-LR L<sup>-1</sup> após exposição crônica que juntamente com fragmentação da membrana nuclear, ausência de nucléolos e diminuição da eucromatina/heterocromatina (Li et al., 2001; Batista et al., 2003; Li et al., 2005) podem evidenciar processo de morte celular por apoptose (Fladmark et al., 1999; Li et al., 2001; Lankoff et al., 2004). Esses estudos histopatológicos têm mostrado que a severidade das lesões do tecido hepático, progredindo para necrose total pode ser uma das principais causas da morte dos peixes contaminados com MCs em relação ao choque hipovolêmico relatado em mamíferos (Li et al., 2004).

Carpas alimentadas com células de cianobactéria (50 µg MC-LR<sub>eq</sub> kg<sup>-1</sup>) durante 28 dias mostraram dilatações das cisternas, rompimento e membranas espirais concêntricas do RER (corpos de mielina) (Li et al., 2004) semelhantes ao encontrado em *H. malabaricus* após i.p. por 30 dias. As figuras de mielina são formadas devido a uma ampla variedade de agentes, como drogas, toxinas, vírus e irradiação e representam alterações degenerativas do retículo endoplasmático ou, segundo Kallenbach (1984), estão relacionadas à alta concentração de cálcio intracelular e a ativação da cálcio-calmodulina. Li et al. (2005) atribuíram essas alterações como degenerações progressivas dose-tempo-dependentes, o que poderia resultar em grande perda da funcionalidade fisiológica. Nestes espaços intermembranas estão localizadas enzimas envolvidas no metabolismo energético (citocromo c), como a creatina quinase, adenilato ciclase e proteínas regulatórias da viabilidade celular, como os fatores indutores de apoptose (Frey e Mannella, 2000).

Os peixes são particularmente sensíveis às contaminações ambientais. Além da estimativa à mortalidade e nítidas alterações morfológicas, as MC podem alterar os processos fisiológicos e bioquímicos aos acessarem os órgãos dos animais (Agrahari et al., 2007). Considerando que o sangue é uma via importante de transporte ou na excreção de MCs, em traíras, a diminuição da concentração de Hb, HCM e a CHCM pode indicar anemia normocítica nos animais expostos, como também observado por Beasley et al. (2000) em suínos e por Zhang et al.

---

(2011) em coelhos, após exposição a MCs e também podem estar relacionados com uma possível hemorragia intra-hepática (LeClaire et al., 1995). A HCM e a CHCM diminuída nos peixes expostos a microcistinas têm correlação com o quadro causado pela diminuição na concentração de Hb e atestam que o quadro anêmico também é hipocrômica (Naoum, 2011).

Em geral, o fígado dos peixes realiza funções vitais, essenciais à homeostasia do organismo e são capazes de estocar grandes quantidades de glicogênio. A variação na quantidade desse polissacarídeo pode ser evidenciada pelo índice hepato-somático (Hoar e Randall, 1971) de forma que o IHS é utilizado como um indicativo do estado energético dos peixes (Querol et al., 2002) ou alterações das condições normais causadas por esteatose ou estresse (Laidley et al., 1988). No presente estudo, as MCs presentes no extrato bruto geraram um quadro hepatocelular, indicando um aumento da demanda energética na presença da MC, diminuindo o índice glicêmico dos peixes. Entretanto, o IHS aumentou após 96 horas de exposição e isso pode estar relacionado ao aumento do fluxo de sangue nos sinusóides, que poderia elevar a massa do fígado do animal corroborando com os achados histológicos. Essa hiperemia é um sinal clássico de intoxicação aguda por MCs (Carmichael, 1994) podendo levar o animal a morte por choque hipovolêmico ou isquemia hepática. Embora alguns autores não tenham observados alterações no IHS (Ernst et al., 2006), Ibrahim e colaboradores (2012) demonstraram resultados similares ao atual estudo após injeção i.p. crônica, no qual houve significativo decréscimo no IHS de *O. niloticus* após 10 dias de exposição com extrato contendo MC-LR e por sua vez estar relacionado a utilização das reservas energéticas na demanda metabólica. Segundo He et al. (2012), o processo de eliminação da toxina leva o animal ao estresse e alteração metabólica.

O glicogênio hepático é um estoque emergencial de energia prontamente utilizada aos primeiros sinais de estresse (Christiansen e Klungsoyr, 1987). Em *H. malabaricus*, a glicogenólise hepática após a EA elevou os níveis da glicose plasmática evidenciando sinais clássicos de estresse fisiológico do animal, a qual aparentemente transportada ao tecido muscular para glicogênese. Após 30 dias, apesar da glicogenólise e a diminuição dos níveis de glicose hepática, uma compensação metabólica é sugerida via ciclo de Cori, convertendo lactato

---

muscular à glicose a ser utilizada no fígado. A diminuição do glicogênio e as alterações na concentração dos metabólitos (principalmente lactato e piruvato) indicam ajustes para suprir a demanda de energia (Barbosa et al., 2003).

Os carboidratos são a primeira e imediata fonte energética nos vertebrados, entretanto, peixes utilizam primariamente proteínas para produzir energia (Thipathi e Verma, 2003). Embora não tenha ocorrido alteração na concentração de aminoácidos livres e proteínas no fígado e músculo branco pode-se inferir a ocorrência de proteólise nesses tecidos devido ao aumento da concentração de amônia, principalmente no plasma. As aminotransferases são enzimas-chave na conversão de proteínas a fontes energéticas, principalmente no fígado, responsável pela manutenção da glicose corporal (Oluah, 1999). A diminuição da atividade das transaminases hepáticas está associada aos danos hepáticos, uma vez que houve aumento dessas enzimas no plasma.

O decréscimo dos níveis hepáticos de transaminases, também observadas em traíras, poderia afetar a atividade metabólica da célula e a capacidade do fígado em metabolizar aminoácidos para produção de energia (Solter et al., 2000). Esse fato poderia explicar a diminuição do glicogênio e alteração de metabólitos na via glicolítica. Sabe-se que fosfatases ácidas e alcalinas também são requeridas aos processos de autólise, metabolismo de carboidrato, sínteses proteica e enzimática (Agrahari e Gopal, 2009) e o aumento das atividades das fosfatases hepáticas após a EC possivelmente indicam a conversão dos intermediários fosforilados através das membranas celulares durante o metabolismo.

O aumento da demanda energética no metabolismo de compostos tóxicos contribui na formação exacerbada de ERO e pode intensificar o potencial toxicológico de xenobióticos (Chovanec et al., 2003). O processo de desintoxicação de um composto, a partir de sua captação, tem sido explicado em três fases (Omiecinski et al., 2011). A fase I envolve transformação do composto por oxidações e hidroxilações, para que os compostos sejam conjugados na fase II ou excretados diretamente na fase III, por transportadores de membranas (Klaassen e Aleksunes, 2010). Malbrouck et al. (2006) sugerem que MCs no fígado de ratos podem ter sido excretadas diretamente na fase III por transportadores do tipo GS-X (ATPase S-conjugados de glutatona) e Sahin e

---

colaboradores (1996) consideram que MCs poderia ser excretada diretamente, via excreção biliar, sem utilizar os processos de biotransformação.

Em traíras, após a EA e EC, a atividade hepática aumentada da EROD pode estar relacionada à biotransformação da toxina e/ou maior demanda energética requerida pelo animal com o aumento da redução do O<sub>2</sub> pela P450 resultando em produção de radical superóxido e peróxido de hidrogênio (Fang et al., 2002). O estresse fisiológico é um dos fatores que podem afetar a atividade da EROD em peixes (Whyte et al., 2000; para revisão). Entretanto Wang e colaboradores (2006) mostraram que a expressão da CYP1A em fígado de tilápias após a exposição a MC-LR não foi induzida, o que pode reforçar a hipótese da desintoxicação direta de MCs na fase II e em outras vias.

Os danos teciduais causados por MCs no hepatopâncreas de caranguejos (Pinho et al. 2005); em fígado de tilápias (Jos et al., 2005), carpas (Rabergh et al., 1991) e camundongos (Gehring et al., 2003) foram atribuídos ao aumento das ERO que induziu aumento do metabolismo aeróbio celular favorecendo assim a degradação de glicogênio e liberação da glicose. A produção intracelular de ERO ou depleção dos sistemas de desintoxicação e sistemas de defesas antioxidantes podem levar o organismo ao estresse oxidativo (Zhao et al., 2009). A biotransformação de MCs na fase I tem sido pouco estudada. Em aves (*Coturnix japonica*), a atividade da EROD no coração e cérebro aumentou quando expostas oralmente ao extrato de cianobactérias contendo MCs na água ingerida (Pasková et al., 2008; Paskerová et al., 2012).

A GST é considerada a primeira via de desintoxicação das microcistinas na fase II (Ito et al., 2002), catalisando a conjugação de MCs com a GSH para ser eliminada (Pavagadhi e Balasubramanian, 2013). Em traíras, a atividade da GST diminuiu após a EA e EC em relação aos controles, sugerindo uma inibição da enzima pela ação das MCs associadas aos efeitos modulatórios causados por lipopolissacarídeos (LPS), como descrito na literatura para microalgas, macrófitas, ovos e embriões de peixes expostos a MC-LR (Pietsch et al., 2001; Best et al., 2002). É importante notar que os LPS presentes na parede celular das cianobactérias são conhecidos por inibirem significativamente a atividade da GST, como mecanismos de defesa da cianobactéria para evitar a conjugação da GST com a MCs da própria célula (Best et al., 2002). Em extratos de cianobactérias, a

---

toxicidade por MCs tem que ser cuidadosamente avaliadas, sendo esse o maior desafio científico. A interpretação tem que ser correlacionada com estudos utilizando MCs isoladas (Paresková et al., 2012). Vale ressaltar que o extrato bruto pode conter outros compostos a serem biotransformados pelo citocromo P450 produzindo diferentes metabolitos, que competem com substratos utilizados, por exemplo, pela GST (Egaas et al., 1999).

O aumento da atividade da GST hepática tem sido associado à exposição às MCs (Wiegand et al., 1999; Pietsch et al., 2001; Malbrouck et al., 2003; Li et al., 2005; Adamovsky et al., 2007; Bieczynski et al., 2013; Hou et al., 2015). Entretanto, diferentes respostas tem sido descrita em peixes, incluindo ausência de alteração (Li et al., 2003; Hou et al., 2015) e inibição da enzima (Best et al., 2002; Cazenave et al., 2006). Pavagadhi et al. (2012) após exposição crônica (15 d) de MCs dissolvida na água, em *Danio rerio*, comparou os efeitos da MC-LR e MC-RR e atribuíram a atividade da GST à variante-específica, no qual a atividade aumentava após exposição com a MC-LR e inibia após exposição a MC-RR.

Em *H. malabaricus* os níveis de GSH hepática após a EA não foram alterados sugerindo correlação à concentração de toxinas e que a desintoxicação de MCs após exposição aguda poderia não causar declínio dos seus níveis basais, como foi proposto por Liu et al., 2004 e por Li e colaboradores (2008). A concentração da GSH intracelular é um balanço entre o uso para a metabolização da MCs inicialmente usado pela GST e nova síntese desses tripeptídeos (Li et al., 2010). Em peixes, as respostas intracelulares de GSH têm sido divergentes provavelmente pelas diferentes vias de captação das MCs, tempos de exposição e características do tecido contaminado (Wang et al., 2010). Adicionalmente, o metabolismo da glicose via ciclo das pentoses, tem um papel crucial no fornecimento e produção de NADH, mantendo normal a conversão da GSH para GSSG e então um estado redox normal na célula (Fang et al., 1991).

A diminuição da GSH no fígado de traíras após a EC pode ser explicada pelo aumento da utilização da GSH e seus conjugados nos processos de desintoxicação das MCs ou degradação a partir da conjugação MC-GSH, tornando a MCs solúvel e rapidamente excretada sem a ação da GST, como proposto por Kondo et al. (1992). A supressão da GSH pode resultar em toxicidade generalizada principalmente após exposição crônica (Adamovsky et al.,

---

2007). Em camundongos, a exposição crônica à MCs via alimentação diminuiu os níveis de GSH hepático e após ausência das MCs, os níveis voltaram aos valores basais mostrando uma variação da GSH durante a exposição (Sedan et al., 2010). Li e colaboradores (2014) demonstraram que a conjugação da MC-RR com a GSH é altamente reversível, evidenciado por MC-RR livres principalmente na circulação, rim e intestino de ratos sugerindo que os conjugados MC-RR-GSH formado no fígado liberam as MC-RR em outros órgãos para serem eliminados.

O estresse oxidativo após exposição às MCs é caracterizado pelo aumento na formação de ERO ou depleção dos sistemas de defesas antioxidantes causando danos em membranas, proteínas e DNA (Qiu et al., 2009; Sun, et al., 2011). Após 12h e 96h, em traíras, a atividade da SOD nas traíras diminuiu indicando uma inibição da enzima como mostrado em tilápias por Prieto et al. (2007) em camundongos (Sedan et al., 2010). A SOD geralmente é ativada em exposições agudas com MCs *in vitro* (Li et al., 2003) e *in vivo* (Li et al., 2010), uma vez que tem alta afinidade pelo ânion superóxido, degradando-o em peróxido de hidrogênio, ativando assim a atividade de outras enzimas como a CAT e GPx (Prieto et al., 2006). Recentes estudos também tem mostrado um comportamento dualístico na atividade as SOD em relação às MCs, e isso possivelmente tem relação à produção de ERO, às respostas tempo-dependente (Li et al., 2010), dose-dependente (Pavagadhi et al., 2012) e vias de exposição das MCs.

A produção de ERO em exposições prolongadas parece ser de fato aumentada, como observado nesse estudo, indicando ativação do sistema SOD-CAT para eficaz diminuição da ERO (Jos et al., 2005; Pavagadhi et al., 2012). Concomitantemente, o ânion superóxido pode ser eliminado pela ação do citocromo c, na conversão do radical a oxigênio (Fang et al., 2002) e por outros compostos como manitol, carotenoides, ubiquinonas e bilirrubinas (Lawler et al., 2002), diminuindo ou alterando a atividade do sistema antioxidante.

A diminuição da atividade da GPx após a EA e EC nas traíras pode ser atribuída à inibição direta ou indireta de MCs ou constituintes do extrato bruto. A diminuição da expressão gênica da enzima após exposição às MCs foram relatadas por Malandrakis et al. (2014) e também poderia estar relacionado à deficiência de selênio (Rover-Junior et al., 2001), uma vez que a GPx apresenta um resíduo de cisteína contendo um selênio covalentemente ligado o que poderia

---

refletir na diminuição da atividade da enzima. A GPx, e a GR são importantes enzimas que participam do sistema de defesa antioxidante, promovendo a remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroperóxido de lipídeos (LOOH) (Jos et al., 2005). As respostas desses biomarcadores são divergentes na literatura após exposição com MCs e a atividade hepática pode aumentar e diminuir entre 24 e 72h variando de acordo com a dose e tempo de exposição (Cazenave et al., 2006; Prieto et al., 2006).

Nas traíras não houve danos em membranas, evidenciados pela inalterada LPO após a EA e diminuição dos níveis de MDA após a EC, sugerindo eficientes mecanismos de desintoxicação, sistemas antioxidantes e mecanismos de reparos. A LPO é o principal biomarcador que indica o dano decorrente do estresse oxidativo e inúmeros estudos tem mostrado que a LPO é elevada após exposição por MCs (Jos et al., 2005; Atencio et al., 2009). A rápida ação das enzimas antioxidantes em células hepáticas, *in vitro*, impede à indução de LPO nas membranas (Ding et al., 2001; Bouaicha e Maatouk, 2004), entretanto *in vivo*, a não alteração de lipoperoxidação após captação de MCs são raramente observadas (Blaha et al., 2004; Li et al., 2005; Prieto et al., 2006).

Cazenave et al. (2006) mostrou uma diminuição da LPO em fígado de *C. paleatus*, assim como observado por Gehringer e colaboradores (2004) em ratos, as quais foram atribuídas ao aumento do sistema antioxidante. Hou et al. (2015), relatou que entre 1 a 48 horas, a LPO aumentou nos tecidos de paulistinha após injeção i.p. com MC-LR e após 7 dias de exposição os níveis voltaram aos valores basais indicando uma recuperação das membranas. A recuperação das membranas pode ser explicada pela ativação de fosfolipases do tipo A2, associadas às lipoproteínas importantes na manutenção e substituição dos produtos da LPO nas membranas (Raha e Robinson, 2000; Soares et al., 2009). Nas traíras, alterações hepáticas devido ao aumento do tecido fibroso após a EC e possível redução de hepatócitos poderia explicar a diminuição da LPO nessa condição experimental.

A oxidação em proteínas (via proteínas carboniladas, PC) é outro biomarcador – menos explorado – que caracteriza danos pelo excesso de ERO intracelular (Paresková et al., 2012). Em traíras, no presente estudo, esse tipo de dano não foi induzido no fígado sugerindo que a LPO é, de fato, o biomarcador

---

mais sensível para danos resultante de ERO para a biota aquática, reforçando a hipótese proposta por Atencio et al. (2008b) após avaliar a carbonilação de proteínas em rins e fígado de *Tinca tinca*, após exposição à MCs. Shi et al., (2015) concluiu que o estresse oxidativo em peixes não é devido ao efeito direto da MCs mas está relacionado aos mecanismos secundários aos efeitos da toxina, como produção de ERO e desintoxicação. O dano oxidativo em proteínas é pouco estudado em toxicidade por MCs. Em fígado de tilápias após exposição com a MC-LR por 24 e 72 horas, Prieto et al. (2007) observaram aumento de proteínas carboniladas em 24h e diminuição após 72h sugerindo uma correlação à quantidade de ERO depurada.

Há grandes evidências que os danos no DNA são claramente induzidos pelo aumento de formação de ERO (Zegura et al., 2011; para revisão). Neste estudo, após exposição crônica ao extrato bruto contendo MCs, houve um aumento de ERO e do sistema antioxidante de defesa, que poderia estar relacionado aos danos genotóxicos observados. Em geral, hepatotoxicidade por MCs, associada com o estresse oxidativo, *in vivo* (Wang et al., 2000) e *in vitro* (Chen et al., 2005), é considerado o principal fator para danos no DNA, que conseqüentemente induziria a célula à apoptose (Pavan da Silva et al., 2011; Ibrahem et al., 2012). Testes genotóxicos, *in vitro*, mostraram que a MC-LR induz mutações gênicas, quebra do DNA e presença de micronúcleos em mamíferos e humanos (Gaudin et al., 2008) e testes *in vivo* demonstram que a MC-LR induz danos no DNA em células hepáticas (Rao et al., 1998; Gaudin et al., 2008). Entretanto o mecanismo que levaria ao dano ainda não é claro, mas parece ser dose-dependente e tipo celular-dependente (Dias et al., 2014).

Pavan da Silva e colaboradores (2011) mostraram que o extrato de MCs causou genotoxicidade em tilápias (*O. niloticus*) devido ao estresse oxidativo celular. Os danos observados em traíras após a EC não são observados após EA, o que sugere uma rápida ativação do mecanismo de reparação principalmente pela DNA-polimerase (Alberts et al., 2002). Em exposições crônicas, Ibrahem e colaboradores (2012) observaram que a fragmentação do DNA aumentava de maneira tempo-dependente.

Ainda, há evidências que MCs (principalmente a MC-LR) seja causadora de carcinogenicidade em vertebrados. Santos e colaboradores (2007) relataram que

---

em *O. niloticus* a marcação imunohistoquímica para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) foi aumentada nos hepatócitos após duas vias de exposição com MCs (imersão na água e injeção i.p.). Segundo os autores esse estímulo à proliferação de hepatócitos pode ser considerado um estímulo a uma promoção de tumor. Em traíras não houve aumento na proporção de hepatócitos PCNA-positivo em relação aos respectivos controles e não foram identificadas regiões PCNA-positivas no tecido hepático, mesmo após severas alterações celulares observadas após a EC, que indicariam presença de regeneração no tecido lesado ou proliferação exacerbada promotora de tumores. Considerando que o hepatócito é uma célula altamente diferenciada que raramente se divide, a sua capacidade de replicação não é perdida. A regeneração deveria induzida logo após destruição/remoção do parênquima hepático, para que a massa fosse restaurada (hiperplasia compensatória) (Jesus et al.,2000).

---

## 6 CONCLUSÕES

No presente trabalho, a exposição de *H. malabaricus* ao extrato bruto de *R. fernandoi* contendo MCs ( $100 \mu\text{g MC-LR}_{\text{eq}} \text{kg}^{-1}$ ) por 12 horas e 96 horas (exposição aguda) e, por exposição crônica durante 30 dias com injeções i.p. a cada 72 h, permitiu concluir que:

1. As principais variantes de MCs produzidas pela cepa R28 de *R. fernandoi*, MC-RR e MC-YR, classificam como uma cepa tóxica e causam hepatotoxicidade para *H. malabaricus*, entretanto, não causa mortalidade nas condições testadas.
2. A variante MC-RR não se acumulou no fígado em exposição aguda, o que sugere metabolização e/ou excreção mais rápida do que a MC-YR, mas o acúmulo parece ser tempo-dose-dependente uma vez que após exposições crônicas houve acúmulo de ambas as MC.
3. Embora não tenha ocorrido acúmulo no músculo é prematuro afirmar que o consumo de traíra contaminada com MCs seja seguro. Estudos com diferentes doses e tempo de exposição e, inclusive, forma de exposição são ainda necessários para qualificar quão seguros é a ingestão de traíras contaminadas com MC.
4. A toxicidade das MC foi comprovada no fígado de traíras indicando danos hepatocelulares, mas não comprometendo o sistema de excreção biliar.
5. As alterações macroscópicas e desorganização do parênquima hepático, principalmente em hepatócitos, em ambas as exposições, revelaram um quadro patológico que pode estar relacionado à inibição das fosfatases e sistema imune que, progressivamente, poderiam levar à necrose tecidual.
6. O sistema de desintoxicação pelo fígado foi alterado após EC, o que foi evidenciado principalmente pelo aumento da atividade da EROD e inibição da

atividade da GST, sugerindo outros mecanismos de desintoxicação do tecido hepático.

7. As ERO formadas, diretamente ou indiretamente pelas MCs e às substancia do extrato bruto, não levaram à lipoperoxidação e/ou oxidação de proteínas. O sistema antioxidante de defesa enzimático e não enzimático foi induzido e eficaz ao combate das ERO.
8. As MCs causam aumento da demanda energética o que foi evidenciado pelo aumento da glicose no plasma e diminuição de glicogênio no fígado com preservação do metabolismo proteico. Por outro lado, os danos hepáticos provavelmente influenciaram a diminuição dos metabólitos envolvidos no metabolismo energético, principalmente após 30 dias.
9. Em poucas horas, as MC podem comprometer de forma dose-tempo-dependente a função hepática de *Hoplias malabaricus*. Todavia, parece haver uma recuperação entre 12 e 96 horas após a injeção i.p. com o extrato bruto contendo MCs, mas não em peixes expostos continuamente.

---

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADIE J.J.; AMARDEILH M.A.; DELVERDIER M.E. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.215, p.1629-1634, 1999.
- ADAMOVSKY, O.; KOPP, R.; HILSCHEROVA, K.; BABICA, P.; PALIKOVÁ, M.; PASKOVÁ, V.; NAVRÁTIL, S.; MARSALEK, B.; BLAHA, L. microcystin kinetics (bioaccumulation and elimination) and biochemical responses in common carp (*Cyprinus carpio*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) exposed to toxic cyanobacterial blooms. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.26, p.2687–2693, 2007.
- AGUJARO, F.L.; LUSSARI, F.J. Florações de cianobactérias potencialmente tóxicas nas bacias dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá-Estado de São Paulo-Brasil, in: Seminário Latino-Americano sobre cianobactérias tóxicas: Qualidade da água e saúde pública. Rio de Janeiro, RJ. 6p., 2001.
- AGRAHARI, S.; PANDEY, K.C.; GOPAL, K. Biochemical alteration induced by monocrotophs in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pest. Biochem. Physiol.*, v.88, p.268-272, 2007.
- AGRAHARI, S.; GOPAL, K. Fluctuations of certain biochemical constituents and markers enzymes as a consequence of monocrotophos toxicity in the edible freashwater fish, *Channa punctatus*. *Pest. Biochem. Physiol.*, v.94, p.5-9, 2009.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition, New York: Garland Science, 1392p., 2002.
- ALVES COSTA J.R.; MELA M.; DA SILVA DE ASSIS H.C.S.; PELLETIER E.; RANDIA M.A.; DE OLIVEIRA RIBEIRO C.A. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.67, p.82–88, 2007.
- AMACHER, D.E. A toxicologist's guide to biomarkers of hepatic response. *Hum. Exp. Toxicol.*, v.21, p.253–262, 2002.
- AMÉ, M.V.; GALANTI, N.L.; MENONE, M.L.; GERPE, M.S.; MORENO, V.J.; WUNDERLIN, D.A. Microcystin–LR, –RR, –YR and –LA in water samples and fishes from a shallow lake in Argentina. *Harmf. Algae*, v.9, p.66–73, 2010.
- AMORIM, L.C.A. O uso dos biomarcadores na avaliação da exposição ocupacional a substâncias químicas. *Rev. Bras. Med. Trab.*, v.1, p.124-132, 2003.
- ANDRADE, D.R.; VIDAL, M.V.J.; SHIMODA, E. Criação do trairão *Hoplias lacerdae*. Universidade Estadual do Norte Fluminense-UENF, 32p., 1998.

- 
- ANDRADE, M.S.B. Avaliação de efeitos citotóxicos, morfológicos e ultraestruturais de microcistinas em células vero. Tese de doutorado. Universidade do Porto. Porto, Portugal. 73p., 2007.
- ANDRADE, Z.A. Regressão da fibrose hepática. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.38, p.514-520, 2005.
- AOYAMA, H.; SILVA, T.M.A.; MIRANDA, M.A.; FERREORA, C.V.F. Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas Hiroshi Aoyama\*, Telma Maria Araújo Silva, Márcio André Miranda e Carmen Veríssima Ferreira. Quim. Nova, v.26, p.896-900, 2003.
- ARANDA-RODRIGUEZ, R.; TILLMANN, A.; BENOIT, F.M.; PICK, F.R.; HARVIE, J.; SOLENAIA, L. Pressurized liquid extraction of toxins from cyanobacterial cells. Environ. Toxicol., v.20, p.390-396, 2005.
- 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.*). Toxicol. Pathol., v.36, p.449-458, 2008a.
- ATENCIO, L.; MORENO, I.; JOS, A.; PICHARDO, S.; MOYANO, R.; BLANCO, A.; CAMEAN, A.M. Dose-dependent antioxidant responses and pathological changes in tenca (*Tinca tinca*) after acute oral exposure to *Microcystis* under laboratory conditions. Toxicon, v.52, p.1–12, 2008b.
- ATENCIO, L.; MORENO, I.; JOS, A.; PRIETO, A.I.; MOYANO, R.; BLANCO, A.; CAMEAN, A.M. Effects of dietary selenium on the oxidative stress and pathological changes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a microcystin-producing cyanobacterial water bloom. Toxicon, v.53, p.269–282, 2009.
- AYOAMA, H.; SILVA, T.M.A.; MIRANDA, M.A., FERREIRA, C.V. Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas Quim. Nova, Vol. 26, p.896-900, 2003.
- AZEVEDO, S.M.F.O.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W.; NAMIKOSHI, M. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. J. Appl. Phycol., v.6, p.261–265, 1994.
- AZEVEDO, S.M.F.O. Toxinas de cianobactérias: causas e consequências para a saúde pública. Medicina On-line, v.1 Ano 1. n.3, 1998. In: Brandão, E.T.P. Cianobactérias e saúde pública no Brasil. Dissertação de mestrado. Universidade de Lisboa. Lisboa, Portugal, 76p., 1998.
- AZEVEDO, S.M.F.O.; VASCONCELOS, V.M. Toxinas de cianobactérias: causas e consequências para a saúde pública. In: Zagatto, P.A.; Bertoletti, E.

- 
- Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações. São Carlos: RiMA, p.433-452, 2006.
- BABICA, P.; BLÁHA, L.; MARSALEK, B. Exploring the natural role of microcystins: a review of effects on photoautotrophic organisms. *J. Phycol.*, v.42, p.9-20, 2006.
- BARBOSA, R.C.C.; GUIMARÃES, S.B.; VASCONCELOS, P.R.C.; CHAVES, C.R.; VASCONCELOS, P.R.L. Efeitos metabólicos aa glutamina em ratos submetidos à queimadura por água fervente (escaldadura). *Acta Cir. Bras.*, v.18, p.537-541, 2003.
- BARFORD, D.; KELLER, J. Co-crystallization of the catalytic subunit of the serine/threonine specific protein phosphatase 1 from human in complex with microcystin-LR. *J. Molecular Biol.*, v.235, p.763-766, 1994.
- BARTON, B.A. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integ. Comp. Biol.*, v.42, p.517-525, 2002.
- BATISTA, T.; DE SOUSA, G.; SUPUT, J.S.; RAHMANI, R.; ŠUPUT, D. Microcystin-Ir causes the colapse of actin filaments in primary human hepatocytes. *Aquat. Toxicol.*, v.65, p.85-91, 2003.
- BEASLEY, V.R.; LOVELL, R.A.; HOLMES, K.R.; WALCOTT, H.E.; SCHAEFFER, D.J.; WALCOTT, H.E.; SCHAEFFER, D.J. Microcystin-LR decreases hepatic and renal perfudion, and causes circulatory shoch, severe hypoglycemia, and terminal hyperkalemia in intravascularly dosed swine. *J. Toxicol. Environ. Health*, v.61, p.281–303, 2000.
- BERGMEYER, H.U.; BEACH, W.D. *Methods of enzymatic analysis. Vol I Fundamentals.* Weinhein Deerfield Beach, Florida-Basel. 3.ed. 579p.,1983.
- BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Diseas.*, v.22, p.25-34, 1999.
- BESSA, M.R.R.N.; NOGUEIRA, I.S.; SILVA, K.D.; NABOUT, J.C. Ocorrência de cianobactérias potencialmente tóxicas no Estado de Goiás, In: *Seminário Latino-Americano sobre cianobactérias tóxicas: Qualidade da água e saúde pública.* Rio de Janeiro, RJ. 6p., 2001.
- BEST, J.H.; PFLUGMACHER, S.; WIEGAND, C.; EDDY, F.B.; METCALF, J.S.; CODD, G.A. Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of MC-LR, on glutathione S-transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.*, v.60, p.223–231, 2002.
- BEUTLER, E. *Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods.* Grune & Straton, New York, USA., p.112-114, 1975.

- 
- BEUTLER, E. Red cell metabolism: A manual of biochemical a methods . Grune & Strawn, New York, USA., 3 ed., 1984.
- BIAGIANTI-RISBOURG, S.; BASTIDE, J. Hepatic perturbation induced by an herbicide (atrazine) in juveniles grey mullet *Liza ramada* (Mugilidae, teleostei): an ultrastructure study. *Aquat. Toxicol.*, v.31, p.217–229,1995.
- BIALETZKI A.; NAKATANI K.; SANCHES P.; BAUMGARTNER, G. Spatial and temporal distribution of larvae and juveniles of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) in the upper Parana river floodplain, Brazil. *Braz. J. Biol.*, v.62, p.211–222, 2002.
- BIDINNOTO, P.M.; MORAES, G.; SOUZA, R.H.S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical fresh water fish: a procedure for field determination of microsamples. *Bol. Tec. CEPTA*, v.10, p.53-60, 1997.
- BIECZYNSKI, F.; BIANCHI, V.A.; LUQUET, C.M. Accumulation and biochemical effects of microcystin-LR on the Patagonian pejerrey (*Odontesthes hatcheri*) fed with the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. *Fish. Physiol. Biochem.*, v.39, p.1309-1321, 2013.
- BIECZYNSKI, F.; DE ANNA, J.S.; PIREZ, M.; BRENA, B.M.; VILLANUEVA, S.S.M.; LUQUET, C.M. Cellular transport of microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) across the intestinal wall: Possible involvement of multidrug resistance-associated proteins. *Aquat. Toxicol.*, v.154, p.97–106, 2014.
- BINELLI, A.; RICCIARDI, F.; RIVA, C.; PROVINI, A., New evidences for old biomarkers: effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere.*, v.62, p.510–519, 2006.
- BINGSHENG, Z.; LIHONG, X.; YONGYUAN, Z.; YING, X. The effect of microcystin-LR on the liver ultrastructure of grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. Annual Report of State Key Laboratory for Freshwater Ecology and Biotechnology of China n°1992, p.97–105, 1993.
- BISCHOFF, D.V.M.; DABVT, M.S. The toxicology of microcystin-LR: Ocorrence, toxicokinetics, toxicodynamics, diagnosis and tratment. *Vet. Hum. Toxicol.*, v.43. p.294-297, 2001.
- BLAHA, L.; KOPP, R.; SIMKOVA, K.; MARES, J. Oxidative stress biomarkers are modulated in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) exposed to microcystin-producing cyanobacterial water bloom. *Acta. Vet. Brno.*, v.73, p.477–482, 2004.
- BORGES, P.A.F.; TRAIN, S.; RODRIGUES, L.C. Estrutura do fitoplâncton em curto período de tempo, em um braço do reservatório de Rosana (ribeirão do Corvo, Paraná, Brasil). *Acta Scientiarum [Biol Sci]*, v.30, p.57–65. 2008.

- BOUAICHA, N.; MAATOUK, I. Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicol. Lett.*, v.148, p.53–63, 2004.
- BURATTI, F.M.; SCARDALA, S.; FUNARI, E.; TESTAI, E. The conjugation of microcystin-RR by human recombinant GST's and hepatic cytosol. *Toxicol. Lett.*, v.219, p.231-238, 2013.
- BURY, N.; EDDY, F.; CODD, G. The effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*: the cyanobacterial hepatotoxin in MC-LR, and ammonia on growth rate and ionic regulation of brown trout, *J. Fish Biol.*, v.46, p.1042–1054, 1995.
- BURY, N.R.; EDDY, F.B.; CODD, G.A. Stress responses of brown trout, *Salmo Trutta* L., to the cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, v.11, p.187-193, 1996.
- BURY, N.R.; MCGEER, J.C.; EDDY, F.B.; CODD, G.A. Liver damage in brown trout, *Salmo trutta* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following administration of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR via the dorsal aorta. *J. Fish Dis.*, v.20, p.209–215, 1997.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v.72, p.248-254, 1976.
- BRAUNBECK, T. Cytological alterations in fish hepatocytes following in vivo and in vitro sublethal exposure to xenobiotics-structural biomarkers of environmental contamination. In *Fish Ecotoxicology*. BRAUNBECK, T.; HINTON, D.E.; STREIT, B., Eds. Birkhäuser, Basel. p.61–40,1998.
- BRIAND, J.-F.; JACQUET, S.; BERNARD, C. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Vet. Res.*, v.34, p. 361-377, 2003.
- CAMARGO, M.M.P.; MARTINEZ, C.B.R. Histopathology of gills, kidney and liver of a neotropical fish caged in an urban stream. *Neotrop. Ichthyol.*, v.5, p.327-336, 2007.
- CAMPOS, A.; VASCONCELOS, V. Molecular mechanisms of Microcystin toxicity in animal cells. *Int.J. Mol. Sci.*, v.11, 268–287, 2010.
- CARBIS, C.R.; RAWLIN, G.T.; MITCHELL, G.F.; ANDERSON, J.W.; McCAULEY, I. The histopathology of carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to microcystins by gavage, immersion and intraperitoneal administration. *J. Fish Diseases.*, v.19, p.199-207, 1996.

- 
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, v.250, p.5475-5480, 1975.
- CARMICHAEL, W.W.; BEASLEY, V.; BUNNER, D.L.; ELOFF, J.N.; FALCONER, I.; GORHAM, P.; HARADA, K.; KRISHNAMURTHY, T.; YU, M.J.; MOORE, R.E. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon. Off. J. Int. Soc. Toxinol.*, v.26, p.971–973, 1988.
- CARMICHAEL, W.W. The toxins of cyanobacteria. *Sci. American*, v. 270, p.64-72, 1994.
- CARMICHAEL, W.W.; AN, J. Using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and a protein phosphatase inhibition assay (PPIA) for the detection of microcystins and nodularins. *Nat Toxins*, v.7, p.377–385, 1999.
- CARVALHO, L.R.; SANT'ANNA, C.L.; DOGO, C.R.; PIMENTA, A.M.C.; BEMQUERER, M.P.; KIYOTA, S. Cyanobacterial diversity and detection of dissolved microcystin-LR in the water of billings and guarapiranga reservoirs, SP, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*, v.24, Suppl. 3–84, p.15–16, 2004.
- CAZENAVE, J.; WUNDERLIN, D. A.; BISTONI, M. A.; AMÉ, M. V.; KRAUSE, E.; PFLUGMACHER, S.; WIEGAND, C. Uptake, Tissue Distribution and Accumulation of Microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*. *Aquat. Toxicol.*, v.75, p.178–190, 2005.
- CAZENAVE, J.; BISTONI, M.L.A.; PESCE, S.F.; WUNDERLIN, A. Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquat. Toxicol.*, v.76, p.1–12, 2006.
- CHELLAPPA, N.T.; CHELLAPPA, S.L.; CHELLAPPA, S. Harmful phytoplankton blooms and fish mortality in a eutrophicated reservoir of Northeast Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v.51, p.833–841, 2008.
- CHEN, T.; WANG, Q.; CUI, J.; YANG, W.; SHI, Q.; HUA, Z.; JI, J.; SHEN, P. Induction of apoptosis in mouse liver by microcystin-LR. *Mol. Cell Proteomics*, v.4, p.958–974, 2005.
- CHEN, J.; XIE, P.; ZHANG, D.; LEI, H. In situ studies on the distribution patterns and dynamics of microcystins in a Biomanipulation Fish-Bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Environ. Pollut.*, v.147, p.150–157, 2007.
- CHORUS, I.; BARTRAM, J. Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health, monitoring and management, Londres: Spon Press, 416p., 1999.
- CHORUS, I. Cyanotoxins. Occurrence, causes and consequences. 1° ed., Springer-Verlag, Heidelberg, Alemanha. 357p, 2001.

- CHOVANEC, A.; HOFER, R.; SCHIEMER, F. Fish as bioindicators. In: MARKERT, B.A.; BREURE, A.M.; ZECHMEISTER, H.G. (Eds.), *Bioindicators and Biomonitoring*. Elsevier Science Ltd, p.639-675, 2003.
- CHRISTIANSEN, C.; KLUNGSOYR, L. Metabolic utilization of nutrients and the effects of insulin in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.88, p.701-711, 1987
- CHRISTOFFERSON, K. The effect of microcystin on growth of single species and on mixed natural populations of heterotrophic nanoflagellates. *Nat. Toxins*, v.4, p.215–220, 1996.
- CLAUSS, T.M.; DOVE, A.D.M.; ARNOLD, J.E. Hematologic disorders of fish. *Vet. Clin. Exot. Anim.*, v.11, p.445-703, 2008.
- CODD, G.A. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecol. Eng.*, v.16, p.51-60, 2000.
- COHEN, P.S.; ALEMANY, S.; HEMMINGS, B.A.; RESINK, T.J.; STRALFORS, P.; TUNG H.Y.L. Protein phosphatase 1 and protein phosphatase 2A from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol.*, v.159, p.390–408, 1988.
- COLLIER, H.B. The standardization of blood hemoglobin determinations. *Can. Med. Assoc. J.*, v.50, p.550-552, 1944.
- COLLINS, A.R.; AI-GUO, M.; DUTHIE, S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidine) in human cells. *Mutat. Res.*, v.336, p.69-77, 1995.
- COPLEY, N.G. Alloxan and ninhydrin. *Analytic.*, v.66, p.492-493, 1941.
- CORAL, L.A. Avaliação da pré-ozonização no controle de cianobactérias e degradação de microcistinas. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 216p., 2012.
- COSTA, P.M. Avaliação do efeito tóxico de sulfato de alumínio e sulfato de cobre em bioensaio de contaminação subcrônica via trófica no bioindicador *Rhamdia quelen* (siluriforme). Tese de doutorado. Curitiba. Universidade Federal do Paraná. 117p., 2011.
- CRAIG, M.; LUU, H.A.; MECREADY, T.; WILLIAMS, D.E.; ANDERSEN, R.J.; HOLMES, C.F.B. Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporin and microcystins with type-1 and 2A protein phosphatases. *Biochem. Cell. Biol.*, v.74, p.569–578, 1996.
- DAWSON, R.M. The toxicology of microcystins. *Toxicon*, v.36, p.953-962, 1998.
- DEBLOIS, C.P.; ARANDA-RODRIGUEZ, R.; GIANI, A.; BIRD, D.F. Microcystin accumulation in liver and muscle of tilapia in two large Brazilian hydroelectric reservoirs. *Toxicon*, v.51, p.435–448, 2008.

- DEBLOIS, C.P.; GIANI, A.; BIRD, D.F. Experimental model of microcystin accumulation in the liver of *Oreochromis niloticus* exposed subchronically to a toxic bloom of *Microcystis* sp. *Aquat. Toxicol.*, v.103, p.63-70, 2011.
- DIAS, E.; LOURO, H.; PINTO, M.; SANTOS, T.; ANTUNES, S.; PEREIRA, P.; SILVA, M.J. Genotoxicity of microcystin-Lr in in vitro and in vivo experimental models. *BioMed Research International*, 9 p., Article ID 949521, 2014.
- DIETRICH, D.R.; HOEGGER, S.J. Guidance values for microcystin in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algae supplements): a reasonable or misguided approach? *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.203, p.273–289, 2005.
- DING, W.X.; SHEN, H.M.; SHEN, Y.; ZHU, H.G.; ONG, C.N. Microcystic cyanobacteria causes mitochondrial membrane potential alteration and reactive oxygen species formation in primary cultured rat hepatocytes. *Environ. Health Persp.*, v.106, p.409–413, 1998.
- DING, W.X.; SHEN, H.M.; ONG, C.N. Critical role of reactive oxygen species formation in microcystin-induced cytoskeleton disruption in primary cultured hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health*, v.64, p.507–519, 2001.
- DJEDIAT, C.; MALÉCOT, M.; LUZE, A.; BERNARD, C.; PUISEUX-DAO, S.; EDERY, M. Localization of microcystin-LR in medaka fish tissues after cyanotoxin gavage. *Toxicol.*, v.55, p.531–535, 2010.
- DJEDIAT, C.; MOYENGA, D.; MALÉCOT, M.; COMTE, K.; YEPREMIAN, C.; BERNARD, C.; PUISEUX DAO, S.; EDERY, M. Oral toxicity of the microcystin containing cyanobacterium *Planktothrix agardhii* to the medaka fish (*Oryzias latipes*). *Toxicol.*, v.58, p.112–122, 2011.
- DOMINGOS, P.; RUBIM, T.K.; MOLICA, R.J.R.; AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W. First report of microcystin production by phytoplanktonic cyanobacteria isolated from a northeast Brazilian drinking water supply. *Environ. Toxicol.*, v.14, p.31–35, 1999.
- DUBOIS, M.; GILES, K.A.; HAMILTON, J.K.; ROBERTS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, v.28, p.350-358, 1956.
- EGAAS, E.; SANDVIK, M.; FJELD, E.; KALLQVIST, T.; GOKSOYR, A.; SVENSEN, A. Some effects of the fungicide propiconazole on cytochrome P450 and glutathione S-transferase in brown trout (*Salmo trutta*). *Comp. Biochem. Physiol.*, v.122, p.337–344, 1999.
- EGGENS, M.L.; GALGANI, F. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flat fish: fast determination within a fluorescence plate-reader. *Mar. Environ. Res.*, v.33, p.213–221, 1992.

- 
- ERNST, B.; HOEGER, S.J.; O'BRIEN, E.; DIETRICH, D.R.; Oral toxicity of the microcystin-containing cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in European whitefish (*Coregonus lavaretus*). *Aquat. Toxicol.*, v.79, p.31–40, 2006.
- ERNST, B.; HOEGER, S.J.; O'BRIEN, E.; DIETRICH, D.R. Physiological stress and pathology in European whitefish (*Coregonus lavaretus*) induced by subchronic exposure to environmentally relevant densities of *Planktothrix rubescens*. *Aquat. Toxicol.*, v.82, p.15–26, 2007.
- FALCONER, I.R.; BUCKLEY, T.H. Tumor promotion by *Microcystis* sp. a blue-green alga occurring in water supplies. *Med. J. Aust*, v.150, p.351, 1989.
- FALCONER I.R., 1991. Tumor promotion and liver injury by oral consumption of cyanobacteria. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, v.6, p.177-184, 1991.
- FALCONER, I.R.; YEUNG, D.S.K. Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by microcystis toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins. *Chem. Biol. Interact.*, v.81, p.181–196, 1992.
- FALCONER, I.R.; BURCH, M.D.; STEFFENSEN, D.A.; CHOICE, M.; COVERDALE, O.R. Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, v.9, p.131-139, 1994.
- FALCONER, I.R. Cyanobacterial toxins of drinking water supplies: *Cylindrospermopsis* and *Microcystis*. Boca Raton London, New York, Washington, D.C.: CRC Press, 2005.
- FANG, Y.Z. Effect of ionizing radiation on superoxide dismutase in vitro and in vivo. In: Fang YZ, ed. Beijing: Atomic Energy Press, *Advances in free radical biology and medicine*. Vol. 1, 1991.
- FANG, Y.Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.*, v.18, p.872-879, 2002.
- FAWELL, J.K.; JAMES, C.P.; JAMES, H.A. Toxins from blue-green algae: toxicological assessment of microcystin-LR and a method for its determination in water. Medmenham, Marlow, Bucks, Water Research Centre, p.1-46, 1994.
- FERRARO, M.V.; FENOCCHIO, A.S.; MANTOVANI, M.S.; CESTARI, M.M.; RIBEIRO, C.A.O. Mutagenic effects of tributyltin (TBT) and inorganic lead (PbII) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the Comet Assay, Piscine Micronucleus and Chromosome Aberrations tests, *Genet. Mol. Biol.* v.27. p.103-107, 2004.
- FERREIRA, M.F.N.; OLIVEIRA, V.M.; OLIVEIRA, R.; CUNHA, P.V.; GRISOLIA, C.K.; PIRES JUNIOR, O.R. Histopathological effects of [D-Leu1]Microcystin-LR

variants on liver, skeletal muscle and intestinal tract of *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844). *Toxicon*, v.55, p.1255–1262, 2010.

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*) *Toxicol. Sci.*, v.54, p.365–373, 2000.

FLADMARK, K.E.; BRUSTUGUN, O.T.; HOVLAND, R.; BØE, R.; GJERTSEN, B.T.; ZHIVOTOVSKY, B.; DØSKELAND, S.O. Ultrarapid caspase-3 dependent apoptosis induction by serine/threonine phosphatase inhibitors. *Cell Death Dif.*, v.6, p.1099-1108, 1999.

FLORES-LOPES, F.; MALABARA, L.R. Alterações histopatológicas observadas no fígado do lambari *Astyanax jacuhiensis* (COPE, 1894) (Teleostei, Characidae) sob influência de efluentes petroquímicos biociências, Porto Alegre, v.15, p.166-172, 2007.

FONSECA, I.A.; MANIGLIA, T.C.; RODRIGUES, L.; PRIOLI, A.J.; PRIOLI, S.M.A.P. Identificação do gene *mcyA* em florações naturais de *Radiocystis fernandoi*, em um tributário do reservatório de Rosana, Brasil. *Acta Scientiarum. [Biol. Sci.]*, v.33, p.319-324, 2011.

FOURNIE, J.W.; COURTNEY, L.A. Histopathological evidence of regeneration following hepatotoxic effects of the cyanotoxin microcystin-LR in the hardhead catfish and gulf killifish. *J. Aquat. Anim. Health*, v.14, p.273–280, 2002.

FREY, T.G.; MANNELLA, C.A. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.*, v.25, p.319–324, 2000.

FURTADO, J.F.R. *Piscicultura: uma alternativa rentável*. Ed. Agropecuária. São Paulo, 180p. 1995.

FUNARI, E.; TESTAI, E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Critical Reviews in Toxicology*, v.38, p.97–125, 2008.

GAUDIN, J.; HUET, S.; JARRY, G.; FESSARD, V. In vivo DNA damage induced by the cyanotoxin microcystin-LR: comparison of BioMed Research International intra-peritoneal and oral administrations by use of the comet assay. *Mutat. Res.*, v.652, p.65–71, 2008.

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

- GEHRINGER, M.M. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a 535 dualistic response. *FEBS Lett.*, v.557, p.1–8. 2004.
- GEHRINGER, M.M.; SHEPHARD, E.G.; DOWNING, T.G.; WIEGAND, C.; NEILAN, B.A. An investigation into the detoxification of microcystin-LR by the glutathione pathway in BALB/C mice. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v.36, p.931–941, 2004.
- GENTZKOW, C.J.; MASEN, J.M. An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. *J. Biol. Chem.*, v.143, p.531-544, 1942.
- GIANNUZZI, L.; SEDAN, D.; ECHENIQUE, R.; ANDRINOLO, D. Na acute case of intoxication with cyanobacteria and cyanotoxins in recreational water in Salto Grande dam, Argentina. *Mar. Drugs*, v.9, p. 2164-2175, 2011.
- GOLDBERG, J.; HUANG, H.B.; KWON, Y.G.; GREENGARD, P.; NAIRN, A.C.; KURIYAN, J. Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature*, v.376, p.745-753, 1995.
- GOLDENFA, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Amer. J. Clin. Pathol.*, v.56. p.35-39, 1971.
- GROSSER, K.M.; KOCH, W.R.; DRÜGG-HAHN, S. Ocorrência e distribuição de peixes na Estação Ecológica do Taim, Rio Grande do Sul, Brasil (Pisces, Teleostomi). *Iheringia, Série Zoologia*, Porto Alegre, v.77, p.89-98, 1994.
- GUPTA, N.; PANT, S.C.; VIJAYARAGHAVAN, R.; RAO, P.V. Comparative toxicity evaluation cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystins variants (LR, RR, YR) in mice. *Toxicology*, v.188, p.285–96, 2003.
- GUTIERREZ-PRAENA, D.; JOS, A.; PICHARDO, S.; MORENO, I.M.; CAMEAN, A.M. Presence and bioaccumulation of microcystins and cylindrospermopsin in food and the effectiveness of some cooking techniques at decreasing their concentrations: A review. *Food Chem. Toxicol.*, v.53, p.139–15, 2013.
- GUZMAN, R.E.; SOLTER, P.F. Hepatic oxidative stress following prolonged sublethal microcystin LR exposure. *Toxicol. Pathol.*, v.27, p.582–588, 1999.
- GUZMAN, R.E.; SOLTER, P.F.; RUNNEGAR, M.T. Inhibition of nuclear protein phosphatase activity in mouse hepatocytes by the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Toxicon*, v.41, p.773-781, 2003.
- HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol.* v.77, p.398–405, 1981.
- HAO, L.; XIE, P.; GUANGYU, L.; QIAN, X.; LI, H. The effect of cyanobacterial crude extract on the transcription of GST mu, GST kappa and GST rho in

- different organs of goldfish (*Carassius auratus*) *Aquat. Toxicol.*, v.90, p.1-7, 2008.
- HARADA K.I.; TSUJI K; WATANABE M.F. Stability of microcystins from cyanobacteria. III. Effect of pH and temperature. *Phycologia*, v.35, p.83-88, 1996.
- HARRISON, S.; PAGE, C. P.; SPINA, D. Airway nerves and protein phosphatases. *Gen. Pharmacol.*, v.32, 287-298, 1999.
- HARROWER, J.R.G.; BROWN, C.H. Blood lactic acid. A micromethod adapted to field collection of microliter samples. *J. Appl. Physiol.*, v.32, p.224-228, 1972.
- HAVENS, K. E. Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems. In: HUDNELL, H. K. (Ed.). *Cyanobacterial harmful algal blooms: State of the science and research needs*. New York: Springer, v.619: *Advances in experimental medicine and biology*, p.733-748, 2008.
- HE, J.; CHEN, J.; WU, L.; LI, G.; XIE, P. Metabolic response to oral microcystin-LR exposure in the rat by NMR-based metabolomic study. *J. Proteome Res.*, v.11, p.5934-5946, 2012.
- HERESZTYN, T.; NICHOLSON, B.C. Determination of cyanobacterial hepatotoxins indirectly in water using a protein phosphatase inhibition assay. *Water Res.*, v.35, p.3049–3056, 2001.
- HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.R.; HAWKINS, W.E.; HENDRICKS, J.D.; MURCHELANO, R.A.; OKIHIRO, M.S. Histopathologic biomarkers. In: Hugget, R., R. Kimerle, P. Mehrle & H. Bergman (Eds.). *Biomarkers – biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*. Boca Raton, Lewis Publishers, p.155-195, 1992.
- HITZFELD, B.; FISCHER, W.; ERIKSSON, J.; MIKHAILOV, A.; TENCALLA, F.; DIETRICH, D.R. Toxins of cyanobacteria in fish: immunohistochemical and immunocytochemical localization in livers and hepatocytes of rainbow trout. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v.359, p.R159, 1999.
- HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. *Fisch Physiology*. New York, Academic Press. 457p., 1971.
- HOAR, W.S.; RANDALL, D.L.; FARREL, A.P. (eds) *Fish Physiology*. Vol XII, parte B. *The Cardiovascular system*, San Diego: Academic press, 474p., 1992.
- HODGSON, E.; DAS, P.C.; CHO, T.M.; ROSE, R.L. Phase metabolism of toxicants and metabolic interactions. In: Smart, R.C.; Hodgson, E. (Eds.), *Molecular and Biochemical Toxicology*, 4 ed. John Wiley & Sons, New Jersey, p.173–204, 2008.

- 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. *J. Biol. Chem.* v.265, p.19401-19404, 1990.
- HOOSER, S.B. Fulminant hepatocyte apoptosis in vivo following microcystin-LR administration to rats. *Toxicol. Pathol.*, v.28, p.726–733, 2000.
- HOU, J.; LI, L.; XUE, T.; LONG, M.; SU, Y.; WU, N. Hepatic positive and negative antioxidant responses in zebrafish after intraperitoneal administration of toxic microcystin-LR. *Chemosphere*, v.120, p.729–736, 2015.
- IBELINGS, B.; BRUNING, K.; DE JONGE, J.; WOLFSTEIN, K.; PIRES, L.; POSTMA, J.; BURGER, T. Distribution of microcystins in a lake foodweb: no evidence for biomagnification. *Microb. Ecol.*, v.49, p.487–500, 2005.
- IBELINGS, B.W.; HAVENS K.E. Cyanobacterial toxins: a qualitative meta-analysis of concentrations, dosage and effects in freshwater, estuarine and marine biota, in: *International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms (ISOC-HAB)*, H.H. Kenneth, Ed. p.685-744, 2007.
- IBRAHEM, M.D.; KHAIRY, H.M.; IBRAHIM, M.A. Laboratory exposure of *Oreochromis niloticus* to crude microcystins (containing microcystin-LR) extracted from Egyptian locally isolated strain (*Microcystis aeruginosa* Kutzing): biological and biochemical studies. *Fish Physiol. Biochem.*, v.38, p.899–908, 2012.
- ITO, E.; KONDO, F.; HARADA, K. Hepatic necrosis in aged mice by oral administration of microcystin-LR. *Toxicon*, v.35, p.231–239, 1997.
- ITO, E.; TAKAI, A., KONDO, F.; MASUI, H.; IMANISHI, S.; HARADA, K. Comparison of Protein Phosphatase Inhibitory Activity and Apparent Toxicity of Microcystins and Related Compounds. *Toxicon*, v.40, p.1017-1025, 2002.
- IZAGUIRRE, G.; JUNGBLUT, A.D.; NEILAN, B.A. Benthic cyanobacteria (Oscillatoriaceae) that produce microcystin-LR, isolated from four reservoirs in Southern California. *Water Res.*, v.41, p.492–498, 2007.
- JARDIM, F.A.; FONSECA, Y.M.F.; VIANNA, L.N.L.; AZEVEDO, S.M.F.O.; CISCOTTO, P.H.C. Primeira ocorrência de cianobactérias tóxicas em um reservatório da COPASA-Minas Gerais-Brasil. *Bios, Cadernos do Departamento de Ciências Biológicas da PUC Minas*, v.9, p.83–91, 2001.
- JESUS, R.P.; WAITZBERG, D.L.; CAMPOS, F.G. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. *Ver. Ass. Med. Brasil.*, v.46, p.242-54, 2000.
- JONES, G.J.; ORR, P.T. Release and degradation of microcystin owing algicide treatment of *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined

- by HPLC and protein phosphate inhibition assay. *Water Res.*, v.28, p.871–876, 1994.
- JOS, A.; PICHARDO, S.; PRIETO, A.I.; REPETTO, G.; VASQUEZ, C.M.; MORENO, I.; CAMÉAN, A.M. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.*, v.72, p.261–271, 2005.
- JYOTHI, B.; NARAYAN, G. Certain pesticide-induced carbohydrate metabolic disorders in the serum of freshwater fish *Clarias batrachus* (Linn.). *Food Chem. Toxicol.*, v.37, p.417-421, 1999.
- KACZMAREK, M.J.; ROSENMUND, H. The action of human pancreatic and salivary isoamylases on starch and glycogen. *Clin. Chim. Acta.*, v.79, p.69–73, 1977.
- KALLENBACH, R.J. Endoplasmic reticulum whorls as a source of membranes for early cystater formation in parthenogenetically stimulated sea urchin eggs. *Cell Tissue Res.*, v.236, p.237-244, 1984.
- KHAN, S.A.; GHOSH, S.; WICKSTROM, M.; MILLER, L.A.; HESS, R.; HASCHEK, W.M.; BEASLEY, V.R. Comparative pathology of microcystin-LR in cultured hepatocytes, fibroblasts, and renal epithelial cells. *Nat. Toxins*, v.3, p.119-128, 1995.
- KHRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res.*, v.455, p.155-166, 2000.
- KINNEAR, S. Cylindrospermopsin: a decade of progress on bioaccumulation research. *Mar. Drugs*, v.8, p.542–564, 2010.
- KLAASSEN, C.D.; ALEKSUNES, L.M. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol. Rev.*, v.62, p.1–96, 2010.
- KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ, J. *Radiocystis fernandoi*, a new plantic cyanoprokariotic species from tropical freshwater reservoirs. *Preslia*, v.65, p.355–357, 1993.
- KONDO, F., IKAI, Y., OKA, H., OKUMURA, M., ISHIKAWA, N., HARADA, K.I., MATSUURA, K., MURATA, H., SUZUKI, M. Formation, characterization and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. *Chem. Res. Toxicol.*, v.5, p.591-596, 1992.
- KONDO, F.; MATSUMOTO, H.; YAMADA, S.; ISHIKAWA, N.; ITO, E.; NAGATA, S.; UENO, Y.; SUZUKI, M.; HARADA, K. Detection and identification of metabolites of microcystins formed in vivo in mouse and rat livers. *Chem. Res. Toxicol.*, v.9, p.1355–1359, 1996.

- 
- KOSKI, M.; ENGSTROM, J.; VIITASALO, M. Reproduction and survival of the calanoid copepod *Eurytemora affinis* fed with toxic and non-toxic cyanobacteria. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, v.186, p.187–197, 1999.
- KOTAK, B.; ZURAWELL, R.; PREPAS, E.; HOLMES, C. Microcystin-LR concentration in aquatic food web compartments from lakes of varying trophic status. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v.53, p.1974–1985, 1996.
- KRAKSTAD, C.; HERFINDAL, L.; GJERTSEN, B.T.; BOE, R.; VINTERMYR, O.K.; FLADMARK, K.E.; DOSKELAND, S.O. CaM-kinase-dependent commitment to microcystin-induced apoptosis is coupled to cell budding, but not to shrinkage or chromatin hypercondensation. *Cell Death Differ.*, v.13, p.1191–1202, 2005.
- KRUGER, N.J. The Bradford method for protein quantification. *Methods Mol. Biol.*, v.32, p.9–15, 1994.
- KUIPER-GOODMAN, T.; FALCONER, I.R.; FITZGERALD, J. Human health aspects. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water*. E and F.N. Spon, London, p.113–153, 1999.
- LAIDLEY, C.W.; WOO, P.T.K.; LEATHERLAND, J.F. The stress-response of rainbow trout to experimental infection with the blood parasite *Cryptobia salmositica* Katz, 1951. *J. Fish Biol.*, v.32, p.253-261, 1988.
- LANKOFF, A.; KRZOWSKI, Ł.; GŁĄB, J.; BANASIK, A.; LISOWSKA, H.; KUZEWSKI, T.; GÓŹDŹ, S.; WÓJCIK, A. DNA damage and repair in human peripheral blood lymphocytes following treatment with microcystin-LR. *Mut. Res.*, v.559, p.131-142, 2004.
- LAWLER, J.M.; BARNES, W.S.; WU, G.; SONG, W.; DEMAREE, S. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.290, p.47-52, 2002.
- LAWRENCE, J.F.; MENARD, C. Determination of microcystins in blue-green algae, fish and water using liquid chromatography with ultraviolet detection after sample clean-up employing immunoaffinity chromatography. *J. Chromatogr.*, v.922, p.111–117, 2001.
- LAWRENCE, A.J.; HEMINGWAY, K.L. *Effects of Pollution on Fish: Molecular Effects and Population Response*. Oxford: Blackwell Publishing, 342p. 2003.
- LEÃO, J.C. Efeitos bioquímicos e fisiológicos da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* sobre o poliqueto *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae). Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande, 111p. Rio Grande (RS), 2008.
- LeCLAIRE, R.D.; PARKER, G.W.; FRANZ, D.R. Hemodynamic and colorimetric changes induced by microcystin-LR in the rat. *J. Appl. Toxicol.*, v.15, p.303-311, 1995.

- 
- LEVINE, R.L.; WILLIAMS, J.A.; STADTMAN, E.P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.*, v.233, p.346–357, 1994.
- LI, X.Y.; LIU, Y.D.; SONG, L.R. Cytological alterations in isolated hepatocytes from common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to microcystin-LR. *Environ. Toxicol.*, v.16, p.517–522, 2001.
- LI, X.; LIU, Y.; SONG, L.; LIU, J.S.H. Responses of antioxidante systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. *Toxicon*, v.42, p.85-89, 2003.
- LI, X.Y.; CHUNG, I.K.; KIM, J.I.; LEE, J.A. Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicon*, v.44, p.821-7, 2004.
- LI, L.; XIE, P.; CHEN, J. In vivo studies on toxin accumulation in liver and ultrastructural changes of hepatocytes of the phytoplanktivorous bighead carp i.p.-injected with extracted microcystins. *Toxicon*, v.46, p.533–545, 2005.
- LI, X.Y.; CHUNG, I.K.; KIM, J.I.; LEE, J.A. Oral exposure to *Microcystis* increases activity-augmented antioxidant enzymes in the liver of loach (*Misgurnus mizolepis*) and has no effect on lipid peroxidation. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, v.141, p.292–296, 2005.
- LI, M.; SATINOVER, D.L.; BRAUTIGAN, D.L. Phosphorylation and functions of inhibitor-2 family of proteins. *Biochemistry*, v.46, p.2380–2389, 2007.
- LI, L.; XIE, P.; GUO, L.; KE, Z. ZHOU, Q.; LIU, Y.; QIU, T. Field and laboratory studies on pathological and biochemical characterization of microcystin-induced liver and kidney damage in the phytoplanktivorous bighead carp. *Sci. World J.*, v.8, p.121-137, 2008.
- LI, L.; XIE, P.; GUO, L. Antioxidant response in liver of the phytoplanktivorous bighead carp (*Aristichthys nobilis*) intraperitoneally-injected with extracted microcystins. *Fish Physiol. Biochem.*, v.36, p.165–172, 2010.
- LI, X.; MA, J.; FANG, Q.; LI, Y. Transcription alterations of microRNAs, cytochrome P4501A1 and 3A65, and AhR and PXR in the liver of zebrafish exposed to crude microcystins. *Toxicon*, v.73, p.17-22, 2013.
- LI, L.; CHEN, J.; XIE, P.; HE, J.; GUO, X.; TUO, X.; ZHANG, W.; WU, L. Rapid conversion and reversible conjugation of glutathionedetoxification of microcystins in bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Aquat.Toxicol.*, v.147, p.18–25, 2014.

- 
- LIN, Q.; BUCKLER IV, E. S.; MUSE, S. V.; WALKER, J. C. Molecular evolution of type 1 serine/threonine protein phosphatases. *Mol. Phyloge. Evol.*, v.12, p.57-66, 1999.
- LIU, H.; WANG, X.R.; ZHANG, J.F.; SHEN, H. Effects of copper and its complex compound (Cu-EDTA) on the glutathione system of liver in *Carassius auratus*. *J. Nanjing Univ.*, v.40, p.356–361, 2004.
- LOMBARDO, M.; PINTO, F.C.R.; VIEIRA, J.M.S.; HONDA, R.Y.; PIMENTA, A.M.C.; BEMQUERER, M.P.; CARVALHO, L.R.; KIYOTA, S. Isolation and structural characterization of microcystin-LR and three minor oligopeptides simultaneously produced by *Radiocystis fernandoi* (Chroococcales, Cyabobacteriae): A Brazilian toxic cyanobacterium. *Toxicon*, v.47, p.560-566, 2006.
- LU, G.D. The metabolism of piruvic acid in normal and vitamin B-deficient state. I. A rapid specific and sensitive method for the estimation of blood pyruvate. *Biochem. J.*, v.33, p.249-254, 1939.
- LUCA, S.J.; PEGORER, M.G.; LUCA, M.A. Oxidação de microcistinas-LR em águas pelo íon ferrato (VI). *Eng. Sanit. Ambient.*, v.15, p.5-10, 2010.
- MAGALHAES, V.F.; SOARES, R.M.; AZEVEDO, S.M.F.O. Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (RJ, Brazil): Ecological implication and human health risk. *Toxicon*, v.39, p.1077–1108, 2001.
- MAGALHAES, V.F.; MARIHO, M.M.; DOMINGOS, P.; OLIVEIRA, A.C.; COSTA, S.M.; AZEVEDO, L.O.; AZEVEDO, S.M.F.O. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon*, v.42, p.289–295, 2003.
- MAIOLI, M.A. et al. Cytotoxicity of monocrotaline in isolated rat hepatocytes: Effects of dithiothreitol and fructose. *Toxicon*, v.57, p.1057–1064, 2011.
- MALANDRAKIS, E.E.; EXADACTYLOS, A.; DADALI, O.; GOLOMAZOU, E.; KLAOUDATOS, S.; PANAGIOTAKI, P. Molecular cloning of four glutathione peroxidase (GPx) homologs and expression analysis during stress exposure of the marine teleost *Sparus aurata*. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.*, v.168, p.53–61, 2014.
- MALBROUCK, C.; TRAUSSCH, G.; DEVOS, P.; KESTEMONT, P. Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, v.135, p.39-48, 2003.
- MALBROUCK, C.; TRAUSSCH, G.; DEVOS, P.; KESTEMONT, P. Effect of microcystin-LR on protein phosphatase activity in fed and fasted juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Toxicon*, v.43, p.295–301, 2004.

- MALBROUCK, C.; KESTEMONT, P. Effects of microcystins on fish. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.25, p.72–86, 2006.
- MARIE, B.; HUETA, H.; MARIE, A.; DJEDIAT, C.; PUISEUX-DAO, S.; CATHERINEA, A.; TRINCHET, I.; EDERY, M. Effects of a toxic cyanobacterial bloom (*Planktothrix agardhii*) on fish: Insights from histopathological and quantitative proteomic assessments following the oral exposure of medaka fish (*Oryzias latipes*). *Aquat.Toxicol.*, v.114–115, p.39–48, 2012.
- MARTINS, J.C.; VASCONCELOS, V.M. Microcystins Dynamics in Aquatic Organisms. *J. Toxicol. Environ. Health*, v.12, p.65-82, 2009.
- McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, v.244, p.6049-6055, 1969.
- MEKEBRI, A.; BLONDINA, G.J.; CRANE, D.B. Method validation of microcystins in water and tissue by enhanced liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, v.1216, p.3147–3155, 2009.
- MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. *Práticas de biologia celular*. São Paulo, Edgar Blücher. 69p., 1980.
- MITSOURA, A.; KAGALOU, I.; PAPAIOANNU, N.; BERILLIS, P.; MENTE, E.; PAPADIMITRIOU, T. The presence of microcystins in fish *Cyprinus carpio* tissues: a histopathological study. *Inter. Aquat. Res.*, p.5-8. 2013.
- MOHAMED, Z.A.; HUSSEIN, A.A. Depuration of microcystins in tilapia fish exposed to natural populations of toxic cyanobacteria: A laboratory study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.63, p.424–429, 2006.
- MOLINA, R.; MORENO, I.; PICHARDO, S.; JOS, A.; MOYANO, R.; MONTERDE, J.G.; CAMEÁN, A. Acid and alkaline phosphatase activities and pathological changes induced in tilapia fish (*Oreochromis sp.*) exposed subchronically to microcystins from toxic cyanobacterial blooms under laboratory conditions. *Toxicon*, v.46, p.725-735, 2005.
- MONTEIRO, D.A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. Dietary intake of inorganic mercury: Bioaccumulation and oxidative stress parameters in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology*, v.22, p.446-456, 2013.
- MOTTA, V.T. *Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações*, 3ª ed, vol.9, Porto Alegre: Editora Médica Missayu, 388p. 2000.
- MSAGATI, T.A.M.; SIAME, B.A.; SHUSHU, D.D. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquat. Toxicol.*, v.78, p.382-397, 2006.

- 
- NAVRATIL, S.; PALIKOVA, M.; VAJCOVA, V. The effects of pure microcystin-LR and biomass of blue-green algae on blood indices of carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta Vet. Brno, v.67, p.273-279, 1998.
- NAOUM, P.C. Diagnóstico diferencial das anemias microcíticas e hipocrômicas. RBAC, v.43, p.160-162, 2011.
- OLIVEIRA, L.; SILVA, S.M.C.P.; MARTINEZ, C.B.R. Assessment of domestical and fill leachate toxicity to the Asian clam *Corbicula fluminea* via biomarkers. Ecotoxicol. Environ. Saf., v.103, p.17-23, 2014.
- OLUAH, N.S. Plasma aspartate aminotransferase activity in the catfish *Clarias albopunctatus* exposed to sublethal zinc and mercury. Bull. Environ. Contam. Toxicol., v.63, p.343-349, 1999.
- OMIECINSKI, C.J.; VANDEN HEUVEL, J.P.; PERDEW, G.H.; PETERS, J.M. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. Toxicol. Sci., v.120, p.49-75, 2011.
- OZER, J.; RATNER, M.; SHAW, M.; BAILEY, W.; SCHOMAKER, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. Toxicology, v.245, p.194-205, 2008.
- PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). Ecotoxicol. Environ. Saf., v.53, p.331-347, 2002.
- PADOVANI, C.R.; FORSBERG, B.R.; PIMENTEL, T.P. Contaminação mercurial em peixes do rio madeira: resultados e recomendações para o consumo humano. Rev. Acta Amazônica. v.25, p.127-136, 1995
- PALIKOVA, M.; NAVRÁTIL, S.; MARSÁLEK, B.; BLÁHA, L. Toxicity of crude extract of cyanobacteria for embryos and larvae of carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta Vet. Brno, v.72, p.437, 2003.
- PALIKOVA, M.; NAVRATIL, S.; TICHY, F.; STERBA, F.; MARSÁLEK, B.; BLAHA, L. Histopathology of carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae exposed to cyanobacteria extract. Acta. Vet. Brno., v.73, p.253-257, 2004.
- PALIKOVA, M.; KREJCI, R.; HILSCHEROVA, K.; BABICA, P.; NAVRATIL, S.; KOPP, R.; BLAHA, L. Effect of different cyanobacterial biomasses and their fractions with variable microcystin content on embryonal development of carp (*Cyprinus carpio* L.). Aquat. Toxicol., v.81, p.312-318, 2007.
- PARESKOVÁ, H.; HILSCHEROVÁ, K.; BLÁHA, L. Oxidative stress and detoxification biomarker responses in aquatic freshwater vertebrates exposed to microcystins and cyanobacterial biomass. Environ. Sci. Pollut. Res., v.19, p.2024-2037, 2012.

- 
- PASKOVA, V.; ADAMOVSKY, O.; PIKULA, J.; SKOCOVSKA, B.; BAND'OUCHOVA, H.; HORAKOVA, J.; BABICA, P.; MARSALEK, B.; HILCHEROVA, K. Detoxification and oxidative stress responses along with microcystins accumulation in Japanese quail exposed to cyanobacterial biomass. *Sci. Total Environ.*, v.398, p.34–47, 2008.
- PAULINO, M.G.; BENZE, T.P.; SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; SAKURAGUI, M.M.; FERNANDES, J.B.; FERNANDES, M.N. The impact of organochlorines and metals on wild fish living in a tropical hydroelectric reservoir: bioaccumulation and histopathological biomarkers. *Sci.Total Environ.*, v.497-498, p.293-306, 2014.
- PAVAGADHI, S.; GONG, Z.; HANDE, M.P.; DIONYSIOU, D.D.; CRUZ, A.; BALASUBRAMANIAN, R. Biochemical response of diverse organs in adult *Danio rerio* (zebrafish) exposed to sub-lethal concentrations of microcystin-LR and microcystin-RR: A balneation study. *Aquat. Toxicol.*, v.109, p.1-10, 2012.
- PAVAGADHI, S.; BALASUBRAMANIAN, R. Toxicological evaluation of microcystins in aquatic fish species: Current knowledge and future directions. *Aquat. Toxicol.*, v.142–143, p.1–16, 2013.
- PAVAN DA SILVA, R.R.; PIRES, O.R.; GRISOLIA, C.K. Genotoxicity in *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) induced by *Microcystis spp* bloom extract containing microcystins. *Toxicon*, v.58, p.259–264, 2011.
- PEREIRA, D.A.; PIMENTA, A.D.C., GIANI, A. Profiles of toxic and non-toxic oligopeptides of *Radiocistis fernandoii* (Cyanobacteria) exposed to three different light intensities. *Microbiol. Res.*, v.167. p.413-421, 2012.
- PFLUGMACHER, S.; WIEGAND, C.; OBEREMM, A.; BEATTIE, K.A.; KRAUSE, E.; CODD, G.A.; STEINBERG, C. Identification of an enzymatically-formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR. The first step of detoxication. *Biochem. Biophys. Acta*, v.1425, p.527–533, 1998.
- PHILLIPS, M.J.; ROBERTS, R.J.; STEWART, J.A.; CODD, G.A. The toxicity of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Diseases.*, v.8, p.339-344, 1985.
- PICHARDO, S.; JOS, A.; ZURITA, J.L.; SALGUERO, M.; CAMEAN, A.M.; REPETTO, G. The use of the fish cell lines RTG-2 and PLHC-1 to compare the toxic effects produced by microcystins LR and RR. *Toxicol. In Vitro*, v.19, p.865–873, 2005.
- PIETSCH, C.; WIEGAND, C.; AMÉ, M.V.; NICKLISCH, A.; WUNDERLIN, D.; PFLUGMACHER, S. The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: Evidence for cyanobacterial toxin–modulating factors. *Environ. Toxicol.*, v.16, p.535–542, 2001.

- PINHO, G.L.L.; ROSA, C. M.; MACIEL, F.E.; BIANCHINI, A.; YUNES, J.S.; PROENÇA, L.A.O.; MONSERRAT, J.M. Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.61, p.353-360, 2005.
- PRIETO, A.I.; JOS, Á.; PICHARDO, S.; MORENO, I.; CAMEÁN, A.M. Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*). *Aquat. Toxicol.*, v.77, p.314–321, 2006.
- PRIETO, A.I.; PICHARDO, S.; JOS, A.; MORENO, I.; CAMEÁN, A.M. Time-dependent oxidative stress response after acute exposure to toxic cyanobacterial cells containing microcystins in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.*, v.84, p.337–345, 2007.
- PUERTO, M.; PICHARDO, S.; JOS, A.; CAMEÁN, A.M. Comparison of the toxicity induced by microcystin-RR and microcystin-YR in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. *Toxicol.*, v.54, p.161–169, 2009.
- QIU, T.; XIE, P.; LIU, Y.; LI, G.; XIONG, Q.; HAO, L.; LI, H. The profound effects of microcystin on cardiac antioxidant enzymes, mitochondrial function and cardiac toxicity in rat. *Toxicology*, v.257, p.86-94. 2009.
- QU, X.; ZHANG, K.; CUI, Z.; ZHANG, Y.; JIANG, J.; FENG, L.; LIU, Q. Construction and analysis of liver suppression subtractive hybridization library of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) intraperitoneally injected with microcystin-LR. *Aquat. Toxicol.*, v.105, p.151-156, 2011.
- QUEROL, M.V.M.; QUEROL, E.; GOMES, N.N.A.. Fator de condição gonadal, índice hepatossomático e recrutamento como indicadores do período de reprodução de *Loricariichthys platymetopon* (Osteichthyes, Loricariidae), bacia do rio uruguaí médio, Sul do Brasil. *Iheringia, Sér. Zool.*, v.92, p.79-84, 2002.
- 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.). *Aquat. Toxicol.*, v.20, p.131–145, 1991.
- RAHA, S.; ROBINSON, B.H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem. Sci.*, v.25, p.502-508, 2000.
- RAMAIAH, S.K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food Chem. Toxicol.*, v.45, p.1551–1557, 2007.
- RAO, P.V.; BHATTACHARYA, R.; PARIDA, M.M.; JANA, M.M.; BHASKAR, A.S.B. Freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UTEX 2385) induced DNA damage in vivo and in vitro. *Environ.Toxicol..Pharmacol.*, v.5, p.1–6, 1998.

- RATTON, F.T.; BAZZOLI, N.; SANTOS, B.G. Reproductive biology of *Apareiodon affinis* (Pisces: Parodontidae) in the Furnas reservoirs, Minas Gerais, Braz. J. Appl. Ichthyol., v.19, p.387–390, 2003.
- REYNOLDS, C.S.; HUSZAR, V.; KRUK, C.; NASELLI-FLORES, L.; MELO, S. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. J. Plankton Res., v.24, p.417-428, 2002.
- RÍOS, V.; MORENO, I.; PRIETO, A.I.; PUERTO, M.; GUTIERREZ-PRAENA, D.; SORIA-DIAS, M.E.; CAMEÁN, A.M. Analysis of MC-LR and MC-RR in tissue from freshwater fish (*Tinca tinca*) and crayfish (*Procambarus clarkii*) in tench ponds (Cáceres, Spain) by liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS). Food Chem. Toxicol., v.57, p.170-178, 2013.
- ROCHE. Biomarcadores, o que são? Disponível em: <[http://www.roche.pt/portugal/index.cfm/investigacao\\_ps/novos-desafios---biomarcadores/](http://www.roche.pt/portugal/index.cfm/investigacao_ps/novos-desafios---biomarcadores/)>, 2015.
- ROVER-JUNIOR, L.; HOEHR, N.F.; VELLASCO, A.P.; KUBOTA, L.T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. Quim. Nova, v.24, p.112-119, 2001.
- RUNNEGAR, M.T.; KONG, S.; BERNDT, N. Protein phosphatase inhibition and in vivo hepatotoxicity of microcystins. Am. J. Physiol., v.265, p.G224–G230, 1993.
- RUNNEGAR, M.; SEWARD, D.J.; BALLATORI, N.; CRAWFORD, J.M.; BOYER, J.L. Hepatic Toxicity and Persistence of ser/thr Protein Phosphatase Inhibition by Microcystin in the Little Skate *Raja erinacea*. Toxicol. Appl. Pharmacol., v.161, p.40–49, 1999.
- SAHIN, A.; TENCALLA, F.G.; DIETRICH, D.R.; NAEGELI, H. Biliary excretion of biochemically active cyanobacteria (blue-green algae) hepatotoxins in fish. Toxicology, v.106, p.123–130, 1996.
- SAKAI H.; NODA A.; SHIRAI N.; IIDAKA T.; YANAI T.; MASEGI T. Proliferative activity of canine mast cell tumours evaluated by bromodeoxyuridine incorporation and Ki-67 expression. J. Comp. Pathol., v.127, p.233-238, 2002.
- SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.; T.P.; WERNER, V.R.; DOGO, C.R.; RIOS, F.R.; CARVALHO, L.R. Review of toxic species of cyanobacteria in Brazil. Algal. Studies, v.126, p.251-265, 2008.
- SANTOS, A.P.M.E.; HASHIMOTO, E.H.; HASEGAWA, M.; KAMOGAE, M.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; SABINO, M.; UENO, Y.; HARADA, K.I.; HIROOKA, E.Y.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Immuno-histopathology of acute microcystin contamination in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). In: international iupac symposium on mycotoxins and phycotoxins, p.12, 2007.

- 
- SANTOS, A.P.M.E.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Hepatotocidade associada à microcistina. *Semina: Ciências Agrárias*, v.29, p.417-430, 2008.
- SATOH, K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin.Chim. Acta.*, v.90, p.37-43, 1978.
- SCASE T.J.; EDWARDS D.; MILLER J.; HENLEY W.; SMITH K.; BLUNDEN A.; MURPHY S. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. *J. Vet. Int. Med.*, v.20, p.151-158, 2006.
- SARACENI, C.P. Vigilância das Hepatites Virais: A Experiência de Vargem Grande Paulista, 1997-1999. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo. 56p., 2001.
- SCHMALZ, W.F.; HERNANDEZ JR., A.D.; WEIS, P. Hepatic histopathology in two populations of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Mar. Environ. Res.*, v.54, p.539-542, 2002.
- SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopatological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recov.*, v.6, p.75-86, 1997.
- SCOTT, G.T.; SLOMAM, K.A. The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.*, v.68, p.369-392, 2004.
- SEDAN, D.; ANDRINOLO, D.; TELESE, L.; GIANNUZZI, L.; ALANIZ, M.J.T.; MARRA, C.A. Alteration and recovery of the antioxidant system induced by sub-chronic exposure to microcystin-LR in mice: Its relation to liver lipid composition. *Toxicon*, v.55, p.333-342, 2010.
- SHI, Y.; JIANG, J.; SHAN, Z.; BU, Y.; DENG, Z.; CHENG, Y. Oxidative stress and histopathological alterations in liver of *Cyprinus carpio* L. induced by intraperitoneal injection of microcystin-LR. *Ecotoxicology*, v.24, p.511-519, 2015.
- SIMOES J.P.C.; SCHONING P.; BUTINE M. Prognosis of canine mast cell tumors: A comparison of three methods. *Vet. Pathol.*, v.31, p.637-647, 1994.
- SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L.A. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, v.175, p.184-191, 1988.
- SKUJA, H. Taxonomie des phytoplanktons einiger seen in Uppland, Schweden. *Symb. Bot. Uppsal.*, v.9, p.1-399, 1948.
- SNYDER, G.S.; GOODWIN, A.E.; FREEMAN, D.W. Evidence that channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) mortality is not linked to ingestion of the hepatotoxin MC-LR. *J. Fish. Diseases.*, v.25, p.275-285, 2002.

- SOARES, R.M.; MAGALHÃES, V.F.; AZEVEDO, S.M. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.*, v.70, p.1-10, 2004.
- SOARES, R.M. Toxicologia de cianotoxinas: microcistinas as estrelas do tema. *Oecol. Bras.*, v.13, p.259-271, 2009.
- SOLTER, P.; LIU, Z.; GUZMAN, R. Decreased hepatic ALT synthesis is an outcome of subchronic microcystin-LR Toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.164, p.216–220, 2000.
- SPEIT, G.; HARTMANN, A. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis*, v.10, p.555-559, 1995.
- STEGEMAN, J.J.; BROWER, M.; DIGIULIO, R.T.; FÓRLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M., VAN VELD, P.A. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect, 1992. In: HUGGETT, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE, P.P.; BERGMAN, H.L. (Eds.). *Biomarkers. Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, p.235–335, 1992.
- STOTIS, R.S.; NAMIKOSHI, M.; HASCHEK, W.M.; RINEHART, K.L.; CARMICHAEL, W.W., DAHLEM, A.M., BEASLEY, V.R., Structural modifications imparting reduced toxicity in microcystins from *Microcystis spp.* *Toxicon*, v.31, p.783-789, 2000.
- STREFEZZI, R.F.; KLEEB, S.R.; XAVIER, J.G.; DIAS, J.L.C. Avaliação da proliferação celular como indicador prognóstico para mastocitomas cutâneos caninos *Pesq. Vet. Bras.*, v.30, p.559-565, 2010.
- SUN, H.; YANG, W.; CHEN, Y.; YANG, Z. Effect of purified microcystin on oxidative stress of silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* larvae under different ammonia concentrations. *Biochem. Syst. Ecol.*, v.39, p.536–543, 2011.
- SUN, H.; LU, K.; MINTER, E.J.A.; CHEN, Y.; YANG, Z.; MONTAGNES, D.J. Combined effects of ammonia and microcystin on survival, growth, antioxidant responses, and lipid peroxidation of bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* larvae. *J. Hazard. Materials*, v.22, p.213– 219, 2012.
- SVIRCEV, Z.; BALTIC, V.; GANTAR, M.; JUKOVIC, M.; STOJANOVIC, D.; BALTIC, M. Molecular aspects of microcystin-induced hepatotoxicity and hepatocarcinogenesis. *J. Toxicol. Environ. Health*, v.28, p.39-59, 2010.
- SVRCEK, C.; SMITH, D.W. Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. *J. Environ. Eng. Sci.*, v.3, p.155-185, 2004.

- TAYLOR, M.G.; SIMKISS, K. Structural and analytical studies on metal ion-containing granules. In: MANN, S.; WEBB, J.; WILLIAMS, R.J.P. (eds) *Biominerilization, chemical and biochemical perspectives*, Weinhein, Alemanha, v.13, p.427-460, 1989.
- TE, S.H.; JIN, K-Y.H.H. The dynamics of cyanobacteria and microcystin production in a tropical reservoir of Singapore. *Harmf. Algae*, v.10, p.319–329, 2011.
- TENCALLA, F.G.; DIETRICH, D.R.; SCHLATTER, C. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.*, v.30, p.215-224, 1994.
- TENCALLA, F.; DIETRICH, D. Biochemical characterization of microcystin toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicon*, v.35, p.583-595, 1997.
- THIPATHI, G.; VERNA, P. Pathway-specific response to cortisol in the metabolism of catfish. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem Mol. Biol.*, v.136, p.463-71, 2003.
- THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAN, E.S.; POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; JARIKHUAN, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer* in acute and subchronic cadmium exposure. *Environ. Pollut.*, v.121, p.307-320, 2003.
- TILLET, D.; DITTMANN, E.; ERHARD, M.; VON DÖHREN, H.; BÖRNER, T.; NEILAN, B.A. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem. Biol.*, v.7, p.753–764, 2000.
- TOIVOLA, D.M.; ERIKSSON, J.E. Toxins affecting cell signaling and alteration of cytoskeletal structure. *Toxicol. in Vitro*, v.13, p.521-530, 1999.
- TORRES, L.M.; ZAMBIAZI, R.C.; CHIATTONE, P.V.; FONSECA, T.P.; COSTA, C.S. Composição em ácidos graxos de traíra (*Hoplias malabaricus*) e pintadinho (sem classificação) provenientes da Região Sul do Rio Grande do Sul e Índia Morta no Uruguai. *Ciências Agrárias*, v.33, p.1047-1058, 2012.
- TRINCHET, I.; DJEDIAT, C.; HUET, H, DAO, S.P.; EDERY, M. Pathological modifications following sub-chronic exposure of medaka fish (*Oryzias latipes*) to microcystin-LR. *Reprod.Toxicol.*, v.32, p.329– 340, 2011.
- US-FDA - United States Food and Drug Administration. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. 2001, Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>. Acesso 09 abril de 2015

- 
- VAJCOVA, V.; NAVRATI, S.; PALIKOVA, M. The effect of intraperitoneally applied pure microcystin-LR on haematological, biochemical and morphological indices of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.). Acta Vet. Brno, v.67, p.281–287, 1998.
- VALÉRIO, E.; CHAVES, S.; TENREIRO, R. Diversity and impact of prokaryotic toxins on aquatic environments: a review. Toxins, v.2, p.2359-2410, 2010.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assesment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol., v.13, p.57–149, 2003.
- VASCONCELOS, V.M. A eutrofização de rios ibéricos. Propostas para a sua monitorização. Resumos do 1º Congresso Ibérico de Contaminação e Toxicologia Ambiental. Coimbra, Portugal, 1995.
- VASCONCELOS, V.M.; SIVONEN, K.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W.; NAMIKOSHI, M. Isolation and characterization of microcystins (heptapeptide hepatotoxins) from Portuguese strains of *Microcystis aeruginosa* Kutz emend Elekin. Arch. Hydrobiol., v.134, p.295-305, 1995.
- VICENTINI, C.A.; FRANCESCHINI-VICENTINI, I.B.; BOMBONATO, M.T.S.; BERTOLUCCI, B.; LIMA, S.G.; SANTOS, A.S. Morphological study of the liver in the teleost *Oreochromis niloticus*. Int. J. Morphol., v.23, p.211-216, 2005.
- VIEIRA, J.M.S.; AZEVEDO, M.T.P.; AZEVEDO, S.M.F.O.; HONDA, R.Y.; CORREA, B. Microcystin production by *Radiocystis fernandoi* (chroococcales, cyanobacteria) isolated from a drinking water reservoir in the city of Belém, PA, Brazilian amazonia region. Toxicon, v.42, p.709–713. 2003.
- WALKER, C. H. Biomarker Strategies to Evaluate the Environmental Effects of Chemicals. Environmental Health Perspectives, v 106, Supplement 2, April 1998.
- WALLACE, K.B.; STARKOV, A.A. Mitochondrial targets of drug toxicity. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., v.40, p.353-388, 2000.
- WANG, W.; FURNEAUX, H.; CHENG, H.; CALDWELL, M.C.; HUTTER, D.; LIU, Y.; HOLBROOK, N.; GOROSPE, M. HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light. Mol. Cell Biol., v.20, p.760–769, 2000.
- WANG, L.; LIANG, X-F.; LIAO, W-Q.; LEI, L-M.; HAN, B-P. Structural and functional characterization of microcystin detoxification-related liver genes in a phytoplanktivorous fish, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Comp. Biochem. Physiol., v.144, p.216–227, 2006.
- WANG, M.; CHAN, L.L.; MENGZI, S.; HONG, H.; WANG, D. Proteomic Analysis of Hepatic Tissue of Zebrafish (*Danio rerio*) Experimentally Exposed to Chronic Microcystins-LR. Toxicol. Sci., v.113, p.60-69. 2010.

- WATANABE, M.F.; HARADA, K.-I.; CARMICHAEL, W.W. & FUJIKI, H. Toxic Microcystis. CRC Press, Inc., New York. 262p., 1996.
- WELKER, M.; BRUNKE, M.; PREUSSEL, K.; LIPPERT, I.; VON DÖHREN, H. Diversity and distribution of Microcystis (cyanobacteria) oligopeptides chemotypes from natural communities studied by single mass spectrometry. Microbiology, v.150, p.1785–1796. 2004.
- WELKER, M.; VON DÖHREN, H. Cyanobacterial peptides: nature's own combinatorial biosynthesis. FEMS. Microbiol. Rev., v.30, p.530–63, 2006.
- WENG, D.; LU, Y.; WEI, Y.; LIU, Y.; SHEN, P. The role of ROS in microcystin-LR-induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice. Toxicology, v.232, p.15–23, 2007.
- WETZEL, R.G. Limnologia. Fundação Calouste Gulbenkian, 2º ed., 696p., Lisboa, 1993.
- WICKSTROM, M.; HASCHEK, W.; HENNINGSEN, G.; MILLER, L.A.; WYMAN, J.; BEASLEY, V. Sequential ultrastructural and biochemical changes induced by microcystin-LR in isolated perfused rat livers. Nat.Toxins, v.4, p.195-205, 1996.
- WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S.; OBEREMM, A.; MEEMS, N.; BEATTIE, K.A.; STEINBERG, C.E.W.; CODD, G.A. Uptake and effects of microcystin-LR on detoxication enzymes of early life stages of the zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol., v.4, p.89–95, 1999.
- WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. Toxicol. Appl. Pharmacol., v.203, p.201-218, 2005.
- WILHELM FILHO, D.; TORRES, M. A.; ZANIBONIFILHO, E.; PEDROSA, R. C. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). Aquaculture, v.244, p.349-357, 2005.
- WILLIAMS, D.E.; DAWE, S.C.; MICHAEL, L.K.; ANDERSEN, R.J.; CRAIG, M., HOLMES, C.F.B. Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, *Mytilus edulis*, and in vivo evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues. Toxicol., v.35, p.1617–1625, 1997.
- WHYTE, J.J.; JUNG, R.E.; SCHMITT, C.J.; TILLITT, D.E. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. Crit. Rev. Toxicol., v.30, p.347-570, 2000.
- WHITE, C.C. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate–cysteine ligase activity. Anal. Biochem., v.318, p.175–180, 2003.

- WHO – World Health Organization. Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR in Drinking-water. Quality Originally published in Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Addendum to Vol. 2. Geneva, 18p., 1998
- WHO – World Health Organization. Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, New Fetter Lane, London EC4P 4EE, 400p., 1999.
- WOLF, H.U.; FRANK, C. Toxicity assessment of cyanobacterial toxin mixtures. *Environ. Toxicol.*, v.17, p.395–399, 2002.
- WU, L.; XIE, P.; CHEN, J.; ZHANG, D.; LIANG, G. Development and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay for the simultaneous quantitation of microcystin-RR and its metabolites in fish liver. *J. Chromatogr.*, v.1217, p.1455–1462, 2010.
- WU, I.; WANG, Q.; TAO, M.; CHEN, J.; MA, Z.; XIE, P. Preliminary study of the distribution and accumulation of GSH/Cys metabolites of hepatotoxic microcystins-RR in common carp from a lake with protracted cyanobacterial bloom (Lake Taihu, China). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v.90, p.382–386, 2013.
- XIE P.; LIU, J.K. Practical success of biomanipulation using filter-feeding fish to control cyanobacteria blooms: a synthesis of decades of research and application in a subtropical hypereutrophic lake. *Sci. World J.*, v.1, p.337–356, 2001.
- XIE, L.; XIE, P.; OZAWA, K.; HONMA, T.; YOKOYAMA, A.; PARK, H.-D. Dynamics of microcystins-LR and -RR in the phytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment. *Environ. Pollut.*, v.127, p.431–439, 2004.
- XIE, L.; XIE, P.; GUO, L., LI, L.; MIYABARA, Y.; PARK, H.-D. Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic lake Chaohu, China. *Environ. Toxicol.*, v.20, p.293–300, 2005.
- XING, Y.; XU, Y.; CHEN, Y.; JEFFREY, P. D.; LIN, Z.; LI, Z.; STRACK, S.; STOCK, J. B.; SHI, Y. Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins. *Cell*, v.127, p.341–353, 2006.
- XU, Y.; WANG, G.; YANG, W.; LI, R. Dynamics of the water bloom forming *Microcystis* and its relationship with physicochemical factors in Lake Xuanwu (China). *Environ. Sci. Pollut Res.*, v.17, p.1581–1590, 2010.
- YANG, Z.; LU, K.; CHEN, Y.; MONTAGNES, D.J. The interactive effects of ammonia and microcystin on life-history traits of the cladoceran *Daphnia magna*: synergistic or antagonistic? *PLoS One*, v.7, e32285, 2012.

ZEGURA, B.; STRASER, A.; FILIPIC, M. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins – a review. *Mutat. Res.*, v.727, p.16–41, 2011.

ZHANG, D.; XIE, P.; CHEN, J. Effects of temperature on the stability of microcystins in muscle of fish and its consequences for food safety. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v.84, p.202–207, 2010.

ZHANG, X.; XIE, P.; LI, D.; SHI, Z.; WANG, J.; YUAN, G.; ZHAO, Y.; TANG, R. Anemia induced by repeated exposure to cyanobacterial extracts with explorations of underlying mechanisms. *Environ. Toxicol.*, v.26, p.472-479, 2011.

ZHANG, W.; LIANG, G.; WU, L.; TUO, X.; WANG, W.; CHEN, J.; XIE, P.; Why mammals more susceptible to the hepatotoxic microcystins than fish: evidences from plasma and albumin protein binding through equilibrium dialyses. *Ecotoxicology*, v.22, p.1012-1019, 2013.

ZHAO, Y.; XIE, P.; ZHANG, X. Oxidative stress response after prolonged exposure of domestic rabbit to a lower dosage of extracted microcystins. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v.27, p.195–199, 2009.

## 8 ANEXOS

**Anexo I.** Curva de calibração do kit ELISA para microcistinas para a extração E1 e E2.

Curva de calibração – kit ELISA para microcistinas						
Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Abs.1	Abs.2	Média	DP	CV (%)	%B/B <sub>0</sub>
<i>Extrato - E1</i>						
0	1,270	1,310	1,292	0,030	2,35	100
0,3	0,875	0,809	0,833	0,034	4,07	64,5
0,5	0,678	0,714	0,696	0,025	3,66	53,89
1,0	0,512	0,553	0,533	0,029	5,44	41,23
2,0	0,399	0,404	0,402	0,0035	0,88	31,09
<i>Extrato – E2</i>						
0	1,394	1,393	1,394	0,0006	0,04	100
0,3	0,928	0,875	0,902	0,026	2,94	64,69
0,5	0,708	0,663	0,686	0,023	3,28	49,19
1,0	0,502	0,478	0,490	0,012	2,45	35,16
2,0	0,321	0,348	0,402	0,013	4,03	24,0

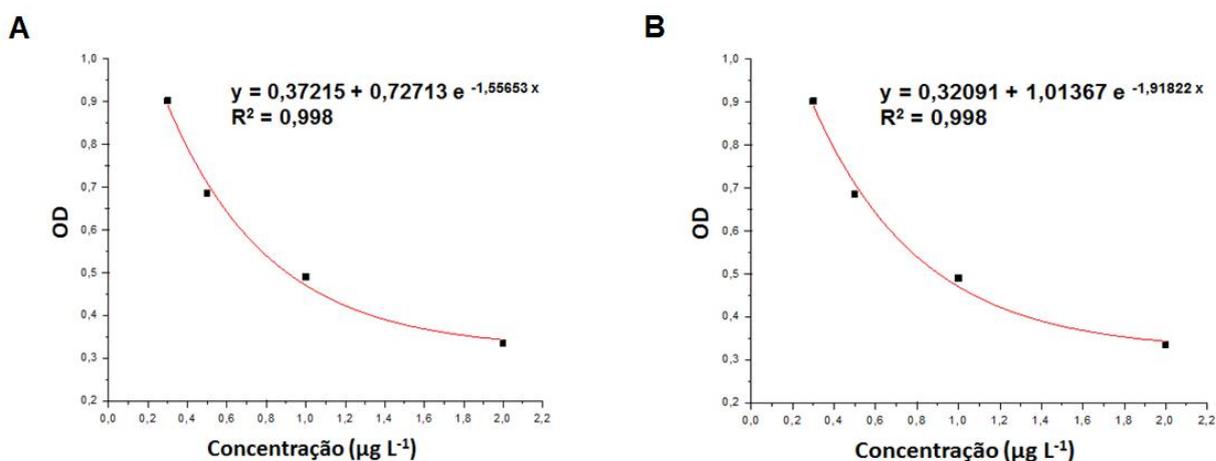
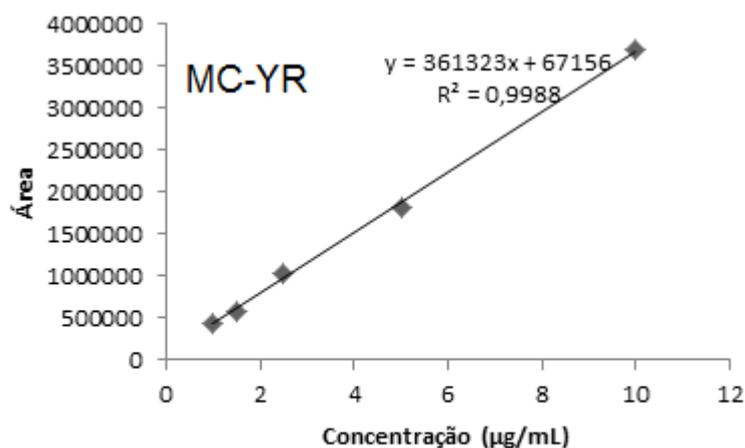
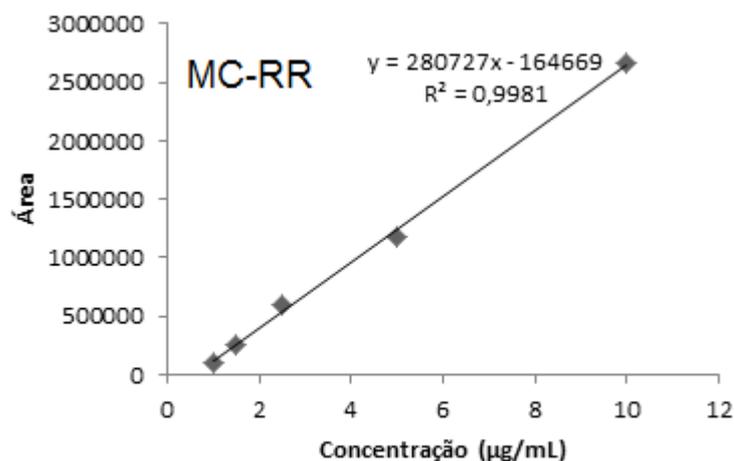


Figura: (A) curva para E1 e (B) curva para a E2.

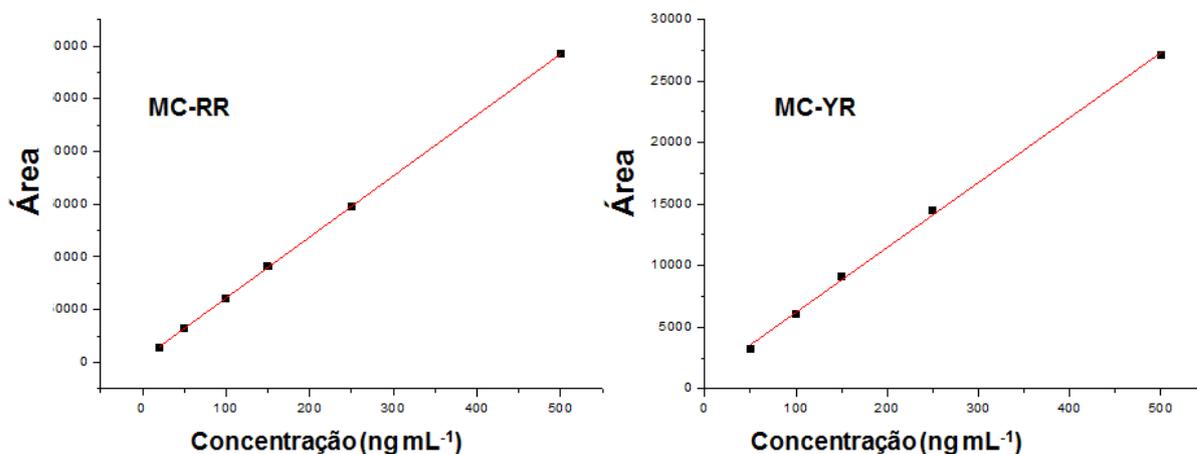
**Anexo II.** Curvas analíticas por padronização externa, repetibilidade (precisão intra-dia) e exatidão para as variantes MC-RR e MCYR em CLAE-UV.



### Repetibilidade e Precisão do Método – E1 e E2

Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Repetibilidade (CV, %)	Exatidão (%)
<i>Variante RR</i>		
10,0	10,29	100,5
5,0	9,12	96,03
2,5	4,92	109,4
1,5	3,81	98,54
1,0	10,56	93,51
<i>Variante YR</i>		
10,0	11,4	100,04
5,0	13,28	97,46
2,5	7,03	107,61
1,5	1,64	93,46
1,0	5,27	100,47

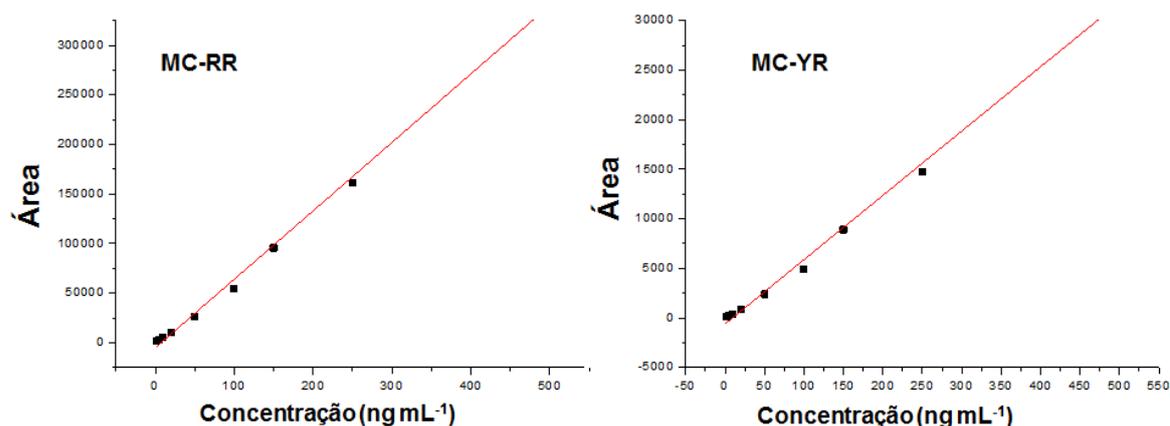
**Anexo III.** Curva de calibração dos padrões MC-RR e MC-YR (repetibilidade intra-dia) pela transição da relação massa:carga ( $m/z$ ) 520 ( $[M+2H]^{+2}$ ) e 534 ( $[M+H+Na]^{+2}$ ), respectivamente, com a transição para ambas de  $m/z$  135 por CLAE-EM para o Protocolo Experimental I.



### Repetibilidade e Precisão do Método – E1

Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	Repetibilidade (CV, %)	Exatidão (%)
<i>Variante RR</i>		
500	1,94	99,77
250	1,41	99,68
150	2,77	101,32
100	2,51	99,73
50	3,83	101,85
20	1,82	91,59
<i>Variante YR</i>		
500	2,66	99,19
250	2,39	102,88
150	3,11	103,09
100	2,98	98,29
50	4,79	87,82

**Anexo IV.** Curva de calibração dos padrões MC-RR e MC-YR (repetibilidade intra-dia) pela transição da relação massa:carga ( $m/z$ ) 520 ( $[M+2H]^{+2}$ ) e 534 ( $[M+H+Na]^{+2}$ ), respectivamente, com a transição para ambas de  $m/z$  135 por CLAE-EM para o Protocolo Experimental II.



### Repetibilidade e Precisão do Método – E2

Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	Repetibilidade (CV, %)	Exatidão (%)
<i>Variante RR</i>		
500	2,60	101,71
250	1,79	96,42
150	2,00	97,11
100	18,96	86,61
50	4,50	91,91
20	1,94	114,37
<i>Variante YR</i>		
500	4,70	102,20
250	5,14	94,61
150	0,57	97,49
100	9,95	85,00
50	9,30	92,53
20	10,25	110,98

*“Seja um incentivador de pessoas, o mundo já tem críticos demais.”*

*(Autor desconhecido)*