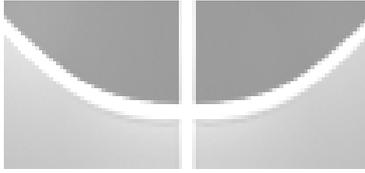


Universidade de Brasília
Departamento de Ciências Fisiológicas
Pós-graduação em Biologia Animal

**Bioacumulação de
microcistina originária de
Microcystis aeruginosa
em girinos de
*Rana catesbeiana***

Veronica Morais Aurélio da Silva

2006



Universidade de Brasília-UnB
Pós-graduação em Biologia Animal - BioAni
Departamento de Ciências Fisiológicas - CFS

Bioacumulação de
Microcistina Originária de
Microcystis aeruginosa
em Girinos de
Rana catesbeiana

Veronica Morais Aurélio da Silva

Orientador: Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção de grau de mestre em Biologia Animal.

Brasília – DF, Maio de 2006.



Dissertação de Mestrado

Veronica Moraes Aurélio da Silva

Título:

"Bioacumulação de microcistina originária de *Microcystis aeruginosa* em girinos de *Rana catesbeiana*"

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior
Presidente/Orientador
(Universidade de Brasília)

Prof. Dr. Renato José Reis Molica
Membro Titular Externo
(Universidade Federal Rural de Pernambuco)

Prof. Dr. César Koppe Grisólia
Membro Titular Interno
(Universidade de Brasília)

Brasília, 30 de maio de 2006.

*À meus amados pais Leandro e
Marta, e aos meus verdadeiros e
amados amigos.*

Força

A força não provém de uma capacidade física e sim de uma vontade indomável.

Mahatma Gandhi

Agradecimentos

Primeiramente a DEUS, presente em todos os instantes plácidos e turbulentos de minha vida.

Aos meus pais Leandro e Marta e minha irmã Sara, por todo o conhecimento de vida, pelo incondicional apoio e compreensão, e principalmente por todo amor a mim dedicado.

Ao professor Osmino, pelo aprendizado e orientação compartilhados ao longo dessa jornada.

À professora Maria Fernanda e seus estagiários Eveline, Rhaul e Renan, pelo acompanhamento e conhecimentos transferidos.

Aos professores Carlos Schwartz, Elizabeth Schwartz e Antônio Sebben pelos conhecimentos passados.

Às amigas e companheiras de laboratório Solange, Ludmila, Thalita, Carol Mayumi, Carla, Camila, Edelin que por diversas vezes foram meu apoio, minha luz e minha alegria nos momentos de reflexão e tristeza.

Aos amigos queridos Natan, Flávio Dourado, Daniel, Fábio e Geraldino, pela companhia, compreensão e apoio ao longo dessa jornada.

Aos colegas Leandro Ambrosio, Rafael Laia e Flávio pelos momentos de descontração e apoio.

Aos funcionários do Laboratório de Toxinologia, Washington e Cesinha, pela amizade, carinho, respeito e ajuda incondicionais.

À coordenação do programa de Pós-graduação em Biologia Animal.

<i>Índice de Abreviaturas</i>	x
<i>Índice de Figuras</i>	xiii
<i>Resumo</i>	xvi
<i>Abstract</i>	xvii
<i>Introdução</i>	01
1 – Qualidade de água	01
2 – Cianobactérias e cianotoxinas	04
3 – Intoxicação em animais e bioacumulação	11
<i>Objetivos</i>	15
<i>Material e Métodos</i>	16
1 – Cultivo de cianobactérias e obtenção de animais experimentais	16
1.1 – Cultivo de cianobactérias	16
1.2 – Obtenção e manutenção de animais experimentais	17
2 – Caracterização da linhagem NPLJ-4 de <i>Microcystis aeruginosa</i>	17
2.1 – Análises em HPLC	17
2.1.1 – Extração e semipurificação	17
2.1.2 – Fracionamento em sistema de HPLC	18
2.2 – Análises em espectrômetro de massa	20
3 – Experimentação	21
3.1. – Exposição dos girinos de <i>Rana catesbeiana</i> às células de <i>M. aeruginosa</i>	21
3.2. – Exposição dos girinos de <i>R. catesbeiana</i> ao extrato de <i>M. aeruginosa</i>	22

4 – Quantificação de Microcistina	24
4.1 - Análises de tecidos por HPLC	24
4.2 - Curva padrão e limite de detecção	25
5 – Microscopia de luz	26
Resultados	28
1 – Implementação do cultivo	28
2 – Caracterização das cianotoxinas produzidas	29
2.1 – PDA-HPLC	29
2.2 – Espectrometria de massa	32
2.3 – Curva de calibração e limite de detecção	38
3 – Análises por meio de HPLC dos extratos animais	40
3.1 – Exposição de girinos de <i>R. catesbeiana</i> ao cultivo de células de <i>M. aeruginosa</i>	40
3.2 – Exposição de girinos de <i>R. catesbeiana</i> ao extrato do cultivo de <i>M. aeruginosa</i>	52
4 – Análises por Microscopia de luz	64
4.1 – Exposição de girinos de <i>R. catesbeiana</i> às células de <i>M. aeruginosa</i>	65
4.1.1 – Análises Histológicas de Fígado	65
4.1.2 – Análises Histológicas de Trato Gastrointestinal (TGI)	73
4.1.3 – Análises Histológicas de Músculo	80
4.2 – Exposição de girinos de <i>R. catesbeiana</i> ao extrato de <i>M. aeruginosa</i>	88
4.2.1 – Análises Histológicas de Fígado	88
4.2.2 – Análises Histológicas de Trato Gastrointestinal (TGI)	96
4.2.3 – Análises Histológicas de Músculo	103

<i>Discussão</i>	111
1 – Caracterização das cianotoxinas da linhagem NPLJ-4	111
2 – Análises por meio de HPLC dos extratos animais	115
2.1 – Análises dos extratos de órgão e tecidos de girinos de <i>R. catesbeiana</i> as células de <i>M. aeruginosa</i>	115
2.2 – Análises dos extratos de órgãos e tecido de girinos de <i>R. catesbeiana</i> ao extrato do cultivo de <i>M. aeruginosa</i>	121
3 – Microscopia de Luz	122
3.1 – Exposição de girinos de <i>R. catesbeiana</i> ao cultivo de <i>M. aeruginosa</i>	124
3.1.1 – Análises Histológicas de Fígado	124
3.1.2 – Análises Histológicas de Trato Gastrointestinal (TGI)	125
3.1.3 – Análises Histológicas de Músculo	126
3.2 – Exposição de girinos de <i>R. catesbeiana</i> ao extrato de cultivo de <i>M. aeruginosa</i>	127
3.2.1 – Análises Histológicas de Fígado	127
3.2.2 – Análises Histológicas de Trato Gastrointestinal (TGI)	128
3.2.3 – Análises Histológicas de Músculo	129
3.3 - Comparação entre os efeitos obtidos nos diferentes tratamentos adotados e regeneração	130
<i>Conclusão</i>	131
<i>Referências bibliográficas</i>	132
<i>Anexos</i>	147

Índice de Abreviaturas

IQA	índice da qualidade das águas
OD	oxigênio dissolvido
DQO	demanda bioquímica de oxigênio
pH	potencial de hidrogênio iônico
MCYST(s)	microcistina(s)
NOD(s)	nodularina(s)
MCYST-LR	microcistina – leucina ² e argina ⁴
MCYST-RR	microcistina – arginina ² e argina ⁴
[D-Leu] MCYST-LR	microcistina [D-Leu] ¹ - leucina ² arginina ⁴
PSP	paralytic shellfish poison
MeAsp	D-eritro-β-metil ácido aspártico
Mdha	N-metildehidroalanina
Adda	(2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienóico
ATP-dependentes	adenosina trifosfato dependentes
PP1	proteína fosfatase do tipo 1
PP2A	proteína fosfatase do tipo 2A
PP3A	proteína fosfatase do tipo 3A
PP6	proteína fosfatase do tipo 6
PP2B	proteína fosfatase do tipo 2B
PP2C	proteína fosfatase do tipo 2C
PP7	proteína fosfatase do tipo 7
PP1C	proteína fosfatase do tipo 1C
PP2Ac	proteína fosfatase do tipo 2Ac

GST	glutathione-S-transferase
GSH	glutathione
GST-P	glutathione-S-transferase na forma placentar
MCYST-LR-GSH	conjugado enzimático de microcistina-LR e glutathione
ROS	reactive oxygen species
TNF- α	tumoral necrosis factor – alfa
c-jun	proto-oncogene nuclear de proteína AP-1
jun B	proto-oncogene homólogo B
jun D	proto-oncogene homólogo D
c-fos	proto-oncogene nuclear
fos B	proto-oncogene regulador de proteína AP-1
fra-1	fos-related antigen 1
K-ras 12	códon de proteína ligante a GTP no cromossomo 12
DNA	ácido desoxi ribonucléico
MAP quinases	mitogen activated protein kinase
NPLJ-4	linhagem de cianobactéria <i>Microcystis aeruginosa</i> utilizada no presente estudo
ASM-1	meio de cultura para fitoplâncton
PDA-HPLC	photo diode array high pressure liquid chromatography
UV	emissão ultravioleta
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
MALDI TOF/TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
MS	(mass spectrometry) ionização simples
MS/MS	(mass spectrometry) fragmentação
M+H ⁺	massa ionizada do composto
M	molar

mM	milimolar
nM	nanomolar
g	grama
mg	miligrama
µg	micrograma
pg	picograma
L	litro
mL	mililitro
µL	microlitro
cm	centímetro
mm	milímetro
nm	nanômetro
d	dia
h	hora
min	minuto
s	segundo
Da	dalton
°C	grau Celsius
rpm	rotações por minuto
i.p.	intraperitonal
Tr	tempo de retenção
r ²	significância
Is	índice de similaridade
TGI	trato gastrointestinal
DF	Distrito Federal

Índice de Figuras

Figura 1	Estruturas moleculares de algumas cianotoxinas melhor estudadas atualmente.	5
Figura 2	Cultivo unialgal em diferentes estágios de crescimento implementado no Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília (LTx-UnB).	27
Figura 3	Cromatograma no sistema de HPLC referente ao extrato purificado do cultivo da linhagem NPLJ-4 implementado no LTx-UnB.	28
Figura 4	Espectrogramas de absorção na faixa de 200-300nm referentes a MCYST.	29
Figura 5	Análise de espectroscopia de massa MS (A) e MS/MS (B) referente ao pico da [D-Leu] MCYST-LR (1037, 63 Da).	30
Figura 6	Estrutura molecular referente a [D-Leu] MCYST-LR.	31
Figura 7	Análise de espectroscopia de massa mostrando o pico “A” da figura 3 referente a uma ainda não caracterizada MCYST produzida pela linhagem NPLJ-4.	32
Figura 8	Análise de espectroscopia de massa mostrando o pico referente a uma provável variante desmetil [D-Leu] MCYST-LR (1023, 62 Da).	33
Figura 9	Análise de espectroscopia de massa mostrando o pico “D” da figura 3 referente a um isômero de massa de uma ainda não caracterizada MCYST produzida pela linhagem NPLJ-4.	34
Figura 10	Análise de espectroscopia de massa mostrando o pico referente a uma possível variante desmetil de [D-Leu] MCYST-LR (1023, 69 Da).	35
Figura 11	Curva de calibração de [D-Leu] MCYST-LR em sistema de HPLC.	36
Figura 12	Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos controles referentes ao tratamento com células intactas de <i>M. aeruginosa</i>	39
Figura 13	Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos expostos por 2 dias às células intactas de <i>M. aeruginosa</i> .	40
Figura 14	Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos expostos por 4 dias às células intactas de <i>M. aeruginosa</i> .	41
Figura 15	Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos expostos por 6 dias às células intactas de <i>M. aeruginosa</i> .	42
Figura 16	Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos expostos por 8 dias às células intactas de <i>M. aeruginosa</i> .	43
Figura 17	Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos expostos por 10 dias às células intactas de <i>M. aeruginosa</i> .	44
Figura 18	Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos após 2 dias sem exposição às células intactas de <i>M. aeruginosa</i> .	45
Figura 19	Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos após 4 dias sem exposição às células intactas de <i>M. aeruginosa</i> .	46
Figura 20	Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos após 6 dias sem exposição às células intactas de <i>M. aeruginosa</i> .	47
Figura 21	Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos após 8 dias sem exposição às células intactas de <i>M. aeruginosa</i> .	48
Figura 22	Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos após 10 dias sem exposição às células intactas de <i>M. aeruginosa</i> .	49

Figura 23	Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos controles.	51
Figura 24	Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos tratados por 3 dias com células rompidas de <i>Microcystis aeruginosa</i> .	52
Figura 25	Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos tratados por 6 dias com células rompidas de <i>M. aeruginosa</i> .	53
Figura 26	Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos tratados por 9 dias com células rompidas de <i>M.aeruginosa</i> .	54
Figura 27	Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos tratados por 12 dias com células rompidas de <i>M. aeruginosa</i> .	55
Figura 28	Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos tratados por 15 dias com células rompidas de <i>M. aeruginosa</i> .	56
Figura 29	Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos após 3 dias sem exposição a células rompidas de <i>M. aeruginosa</i> .	57
Figura 30	Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos após 6 dias sem exposição a células rompidas de <i>M. aeruginosa</i> .	58
Figura 31	Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos após 9 dias sem exposição a células rompidas de <i>M. aeruginosa</i> .	59
Figura 32	Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos após 12 dias sem exposição a células rompidas de <i>M. aeruginosa</i> .	60
Figura 33	Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos após 15 dias sem exposição a células rompidas de <i>M. aeruginosa</i> .	61
Figura 34	Cortes transversais de fígado de girino controle e exposto por 2 dias ao cultivo de <i>M. aeruginosa</i> .	63
Figura 35	Cortes transversais de fígado de girino exposto por 4 e 6 dias ao cultivo de <i>M. aeruginosa</i> .	65
Figura 36	Cortes transversais de fígado de girino exposto por 8 e 10 dias ao cultivo de <i>M. aeruginosa</i> .	67
Figura 37	Cortes transversais de fígado de girino em recuperação após 6 dias sem contato com cultivo de <i>M. aeruginosa</i> .	69
Figura 38	Cortes longitudinais de TGI de girino controle e exposto por 2 dias ao cultivo de <i>M. aeruginosa</i> .	71
Figura 39	Cortes longitudinais de TGI de girino exposto por 4 e 6 dias ao cultivo de <i>M. aeruginosa</i> .	73
Figura 40	Cortes longitudinais de TGI de girino exposto por 8 e 10 dias ao cultivo de <i>M. aeruginosa</i> .	75
Figura 41	Cortes longitudinais de TGI de girino exposto por 10 dias ao cultivo de <i>M. aeruginosa</i> e 6 dias sem exposição (recuperação).	77
Figura 42	Cortes transversais de músculo de girino controle em diferentes aumentos.	79
Figura 43	Cortes transversais de músculo de girino expostos por 2 e 4 dias a células de <i>M. aeruginosa</i> .	81
Figura 44	Cortes transversais e longitudinais de músculo de girino expostos por 6 e 8 dias a células de <i>M. aeruginosa</i> .	83
Figura 45	Cortes transversais de músculo de girino expostos por 10 dias a células de <i>M. aeruginosa</i> e 10 dias sem exposição (recuperação) em diferentes aumentos.	85

Figura 46	Cortes transversais de fígado de girino controle e exposto por 03 dias ao extrato do cultivo referente a <i>M.aeruginosa</i> .	87
Figura 47	Cortes transversais de fígado de girino exposto por 6 e 9 dias ao extrato do cultivo de <i>M. aeruginosa</i> .	89
Figura 48	Cortes transversais de fígado de girino exposto por 12 e 15 dias ao extrato do cultivo de <i>M. aeruginosa</i> .	91
Figura 49	Cortes transversais de fígado de girino em recuperação após 03 e 15 dias sem contato com o extrato de cultivo de <i>M. aeruginosa</i> .	93
Figura 50	Cortes longitudinais de TGI de girino controle e exposto por 3 dias ao extrato do cultivo de <i>M. aeruginosa</i> .	95
Figura 51	Cortes longitudinais de TGI de girino exposto por 06 e 09 dias ao extrato do cultivo de <i>M. aeruginosa</i> .	97
Figura 52	Cortes longitudinais de TGI de girino exposto por 12 e 15 dias ao extrato do cultivo de <i>M. aeruginosa</i> .	99
Figura 53	Cortes transversais de TGI de girino em recuperação após 03 e 15 dias sem contato com o extrato de cultivo de <i>M. aeruginosa</i> .	101
Figura 54	Cortes transversais de músculo de girino controle e exposto por 03 dias em diferentes aumentos.	103
Figura 55	Cortes transversais de músculo de girino expostos por 06 e 09 dias ao extrato do cultivo de <i>M. aeruginosa</i> .	105
Figura 56	Cortes transversais e longitudinais de músculo de girino expostos por 12 e 15 dias ao extrato do cultivo de <i>M. aeruginosa</i> .	107
Figura 57	Cortes transversais de músculo de girino sem exposição (recuperação) após 03 e 15 dias em diferentes aumentos.	109
Figura 58	Estrutura molecular da microcistina-LR.	111
Figura 59	Estrutura molecular referente a [D-Leu] MCYST-LR.	113

Resumo

A água corresponde a um recurso renovável de maior importância para a sobrevivência de toda a flora e fauna do planeta.

Esse recurso vem se tornando cada vez mais escasso à medida que a população, a indústria e a agricultura se expandem. Assegurar a quantidade bem como a qualidade da água disponível para o consumo da flora e fauna é uma das prioridades do ser humano. Em todo o mundo é crescente o número de lagos, lagoas e reservatórios que estão sujeitos a processos de acidificação e/ou eutrofização, que levam ao crescimento excessivo de microrganismos como algas e cianobactérias.

As alterações causadas pelo crescimento desordenado desses microrganismos influenciam na qualidade de água, podendo atingir vários graus de intensidade, variando desde uma poluição visual com as florações, até a morte de outros organismos por bioacumulação e intoxicação, inclusive o homem.

O presente estudo teve por objetivo avaliar a ocorrência de bioacumulação de cianotoxina microcistina (MCYST) proveniente da linhagem NPLJ-4 de *Microcystis aeruginosa* em larvas de *Rana catesbeiana*, bem como seus efeitos histopatológicos.

Para detectar a presença de MCYST nas amostras de cultivo unialgal da linhagem NPLJ-4, músculo, fígado e trato gastrointestinal (TGI) de girinos foi utilizado sistema de PDA-HPLC. A caracterização das cianotoxinas presentes no cultivo foi realizada por meio de espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF). A avaliação histopatológica das amostras de músculo, fígado e TGI foram realizadas por microscopia de luz.

Os resultados de PDA-HPLC e espectrometria de massa sugerem a caracterização de 3 das 5 variantes detectadas de MCYST produzidas pela linhagem NPLJ-4, sendo a mais abundante a [D-Leu] MCYST-LR. As análises cromatográficas referentes aos órgãos e tecidos dos girinos sugerem que esses animais não realizam bioacumulação ou então que esse sistema não é adequado para detectar baixas quantidades de microcistina. Contudo os resultados de histopatologia evidenciaram a ação citotóxica desse composto em músculo, fígado e TGI.

Mais estudos devem ser realizados, visando, principalmente, o desenvolvimento de novas técnicas de detecção de cianotoxinas.

Abstract

Water corresponds to one of the most important resources renewed for the survival of all the flora and fauna on this planet.

This resource is becoming scarce nowadays, as population, industry and agriculture expand. The guaranty of amount as well as quality of the available water for flora and fauna consumption is one of the priorities of the human being. In the whole world it is increasing the number of lakes, lagoons and reservoirs that are subject to processes of acidification and/or eutrophisation that lead to excessive growth of microorganisms as algae and cyanobacteria.

Alterations caused by the disordered growth of these microorganisms influence in the water quality and can reach diverse degrees of intensity, varying since a visual pollution with blooms until death of other organisms caused by bioaccumulation and poisoning, which include man also.

The present study has for objectives evaluate the occurrence of bioaccumulation of the cyanotoxin microcystin (MCYST) deriving from *Microcystis aeruginosa* in larvae of *Rana catesbeiana*, as well as its histopathological effect.

PDA-HPLC system was used to detect the presence of MCYST in samples of unialgal culture of the NPLJ-4 strain, muscle, liver and gastrointestinal treatment (TGI) of *R. catesbeiana*. The characterization of the cyanotoxins present in culture was carried out by mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF). The histopathological evaluation of samples of muscle, liver and TGI had been realized by light microscopy.

The PDA-HPLC and mass spectrometry results suggest the characterization of 3 of the 5 variants detected of MCYST produced by NPLJ-4 strain, which the most abundant is the [D-Leu] MCYST-LR. The chromatographic analyses relative to organs and tissue of *R. catesbeiana* larvae suggest that these animals do not bioaccumulate or may be this system was not adjusted to detect low amounts of microcystin. However the histopathological results had evidenced the cytotoxic action of this compound at muscle, liver and TGI.

More studies must be carried out, aiming new techniques of cyanotoxin detection.

1 – Qualidade de água

A água corresponde a um recurso renovável da maior importância para a sobrevivência de toda a flora e fauna do planeta, pois possui múltiplas aplicações, e representou uma fonte primordial para o surgimento da vida como conhecemos hoje.

Quase toda a água do planeta está concentrada nos oceanos. Apenas uma pequena fração (menor que 3%) está em terra e a maior parte desta está sob a forma de gelo e neve ou abaixo da superfície (água subterrânea). Só uma fração muito pequena (menos que 1%) de toda a água terrestre está diretamente disponível ao homem e aos outros organismos, sob a forma de lagos e rios, ou como umidade presente no solo, na atmosfera e como componente dos mais diversos organismos (Esteves, 1998).

A água potável em boas condições de consumo vem se tornando cada vez mais escassa à medida que a população, a indústria e a agricultura se expandem. Assegurar a quantidade, bem como a qualidade da água disponível para o consumo da flora e fauna, é uma necessidade de sobrevivência humana.

Em todo o mundo é crescente o número de lagos, lagoas e reservatórios que estão sujeitos a processos de eutrofização; ou seja, estão expostos ao grande aporte de nutrientes, principalmente derivados de fosfato, que levam ao crescimento excessivo de microrganismos como algas e cianobactérias. Esses processos são geralmente seguidos por morte e degradação microbiológica de microrganismos e animais em quantidade, consumindo grande parte do oxigênio dissolvido na água, piorando as condições para a vida aquática (Margalef, 1983; Esteves, 1998).

Desta maneira, tornou-se clara a necessidade de uma abordagem integrada. Expectativas socioeconômicas devem se harmonizar com as expectativas

ambientais, de modo que os centros humanos, os centros de produção de energia, as indústrias, os setores agrícola, florestal, de pesca e de vida silvestre possam coexistir.

A adoção de programas direcionados à prevenção da poluição são mais indicados que à utilização de técnicas de remoção de contaminantes da água poluída, uma vez que a tecnologia de purificação é cara e complexa, principalmente à medida que o número de contaminantes aumenta.

Visto a importância dos recursos ligados à água, diversos estudos analisam os parâmetros físicos, químicos e microbiológicos presentes na mesma por meio de análises laboratoriais. Estes caracterizam a qualidade da água e são classificados em grupos que abordam fatores estéticos (cor, odor ou sabor), ecológicos (pH, porcentagem de oxigênio dissolvido e produtividade) e fisiológicos (toxicidade e patogenicidade) (Branco, 1991).

Dentre os parâmetros relacionados ao monitoramento da qualidade de águas, nove compõem o Índice da Qualidade das águas (IQA): oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DQO), coliformes termotolerantes, temperatura, pH da água, nitrogênio total, fósforo total, sólidos totais e turbidez (Chorus & Bartram, 1999).

Os microrganismos desempenham diversas funções de fundamental importância para a qualidade das águas. Participam das diversas transformações da matéria nos ciclos biogeoquímicos, como o do nitrogênio (N), fósforo (P), enxofre (S), mercúrio (Hg), carbono (C) e da água.

Outro aspecto de grande relevância em termos de qualidade biológica da água é a presença de agentes patogênicos e a transmissão de doenças.

A detecção dos agentes patogênicos, principalmente bactérias, protozoários e vírus, em uma amostra de água é extremamente difícil, em razão de suas baixas concentrações. Portanto, a determinação da potencialidade de um corpo d'água ser portador de agentes causadores de doenças pode ser feita de forma indireta, através dos organismos indicadores de contaminação por coliformes termotolerantes (Chorus & Bartram, 1999).

A degradação do padrão de qualidade da água representa um problema crescente na atualidade, afetando desde de reservatórios destinados ao consumo de animais e homens, como também atingindo aqueles relacionados a áreas de recreação. Dentre os fatores que influenciam os padrões de qualidade da água potável, os mais relevantes para a saúde pública são representados pela contaminação de microrganismos como as bactérias e cianobactérias, sendo que estas últimas representam um problema crescente (Bell & Codd, 1994; Carmichael *et al.*, 1996; Bouaïcha, 2001; Magalhães *et al.*, 2001).

Na interpretação de todos os fatores que estabelecem a qualidade da água, devem ser levados em consideração, os fatores meteorológicos e o eventual período de lançamentos poluidores e das vazões, visto que esses fatores mudam ao longo do tempo.

2 - Cianobactérias e Cianotoxinas

As cianobactérias são microrganismos procarióticos fotossintetizantes que apresentam grande capacidade de colonização de diversos habitats, estando presentes desde ambientes aquáticos, com variados índices de salinidade, àqueles terrestres, incluindo regiões temporariamente congeladas na Antártida (Carmichael *et al.*, 1990; Yoo *et al.*, 1995; Hitzfeld *et al.*, 2000).

De acordo com taxonomia atual, existem 150 gêneros de cianobactérias, com cerca de 2000 espécies, e pelo menos 40 delas já foram identificadas como sendo produtoras de toxinas, estas representadas principalmente por *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, e *Radiocystis* (Carmichael, 1994; Bouaïcha, 2001; Haider *et al.*, 2003; Lombardo *et al.*, 2006).

Embora nem toda floração de cianobactéria produza compostos tóxicos (Brittain *et al.*, 2000), alguns autores sugerem um papel ecológico para as cianotoxinas como as microcistinas (MCYSTs) e nodularinas (NODs), que podem exercer funções semelhantes a moléculas mensageiras ou armas biológicas (Christoffersen, 1996; Rohrlack *et al.*, 1999; Kaebernick & Neilan 2001).

Outra hipótese sugere que esses compostos estão relacionados à comunicação intra-específica (*quorum sense*). O que permitiria uma comunicação dentro das colônias e florações ou “blooms”, estabelecendo estratégias para aquisição de nutrientes e exposição à luz dentro do habitat. Estudo recente abordando a influência de luminosidade nas concentrações de MCYST intra e extracelular evidenciou uma possível comunicação entre as células da colônia (Dittmann *et al.*, 2001).

Outros estudos sugerem que a função desses compostos esteja relacionada à proteção contra incidência de luz, concentrações intracelulares de metais ou o armazenamento de nitrogênio (Shi *et al.*, 1996; Utkilen & Gjølme, 1995; Kaebernick *et al.*, 2000; Dittmann *et al.*, 2001).

Além dos estudos que sugerem funções específicas das cianotoxinas para as cianobactérias, a avaliação de contaminação de mananciais e reservatórios por esses

microrganismos desempenha um papel fundamental na qualidade de água em diversas regiões do mundo (Haider *et al.*, 2003; Haddad Jr. *et al.*, 2004). Seja pela atuação física como a colmatação de filtros em estações de tratamento ou pela liberação de toxinas solúveis na água (Kotak *et al.*, 1994).

Quanto à liberação de toxinas, os compostos solubilizados na água podem ser classificados em categorias distintas relacionadas aos efeitos tóxicos desencadeados nos organismos afetados. Esses podem assumir caráter agudo ou crônico, dependendo do tempo de exposição, quantidade e natureza da toxina produzida. Definidas por características químicas e efeitos gerados, as cianotoxinas podem ser agrupadas em neurotoxinas, citotoxinas gerais e hepatotoxinas (Carmichael, 1994; Haider *et al.*, 2003). (Figura 1).

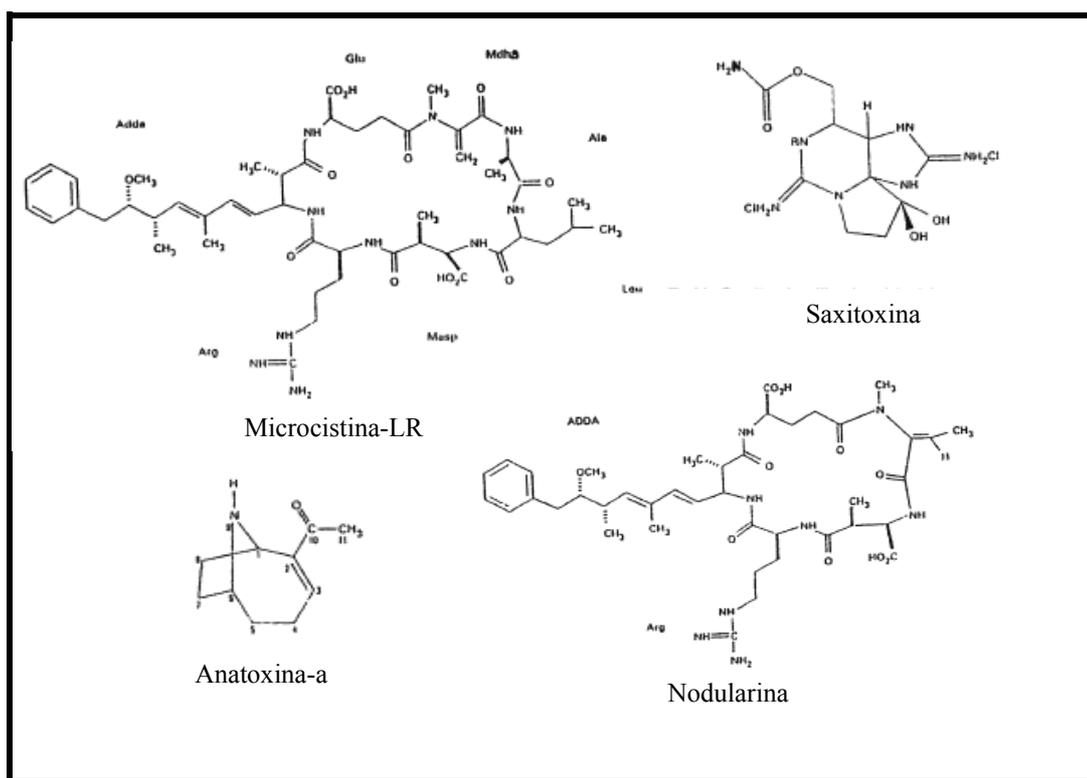


Figura 1. Estruturas moleculares de algumas cianotoxinas melhor estudadas atualmente. São exemplos de hepatotoxinas a microcistina-LR e a nodularina. Saxitoxina e anatoxina-a são representantes do grupo das neurotoxinas. (Modificadas a partir de Haider *et al.*, 2003).

As neurotoxinas são representadas por alcalóides (anatoxina-a e saxitoxinas ou PSP) ou ésteres (anatoxina-a (S)) e, são caracterizadas pelo mecanismo de interrupção da sinalização entre neurônios e músculos, podendo levar a morte do indivíduo por asfixia ou parada respiratória (Haider *et al.*, 2003).

As citotoxinas gerais são constituídas por alcalóides, lipopolissacarídeos e peptídeos e atuam sobre vários tecidos, podendo também ocasionar processos alérgicos relacionados com a dose de exposição (Carmichael & Falconer, 1993).

A maioria dos envenenamentos por cianobactérias envolve hepatotoxicose aguda causada por um grupo de alcalóides (cilindrospermopsina) e peptídeos cíclicos (MCYSTs e NODs) de baixo peso molecular estruturalmente similares, as hepatotoxinas.

As hepatotoxinas são representadas por alcalóides e peptídeos cíclicos cuja massa molecular varia geralmente entre 800 e 1100 Da (Botes *et al.*, 1982 (B)). A maioria desses compostos é hidrofílica e incapaz de penetrar diretamente através das membranas dos eucariotos, sendo necessária para a interiorização, transportadores ATP-dependentes, como transportadores de sais orgânicos. Essa dependência restringe as áreas de ação das hepatotoxinas aos órgãos e tecidos que apresentam esses canais, como o fígado e rins (Runnegar & Falconer, 1982; Eriksson *et al.*, 1990 (A); Runnegar *et al.*, 1991).

A síntese de MCYSTs e NODs é similar (Moore *et al.*, 1991, Rinehart *et al.*, 1994), apresentando produção não-ribossomal intermediada por complexos multi-enzimáticos, policetados sintetases e polipeptídeos sintetases (Tillet *et al.*, 2000).

A estrutura das hepatotoxinas da família das MCYSTs foi identificada em 1982 a partir de extratos de *Microcystis aeruginosa*, e em 1999 cerca de 40 gêneros foram caracterizados como produtores de MCYSTs por Chorus & Bartram. Desde o primeiro relato, novas MCYSTs estão sendo identificadas (Botes *et al.*, 1982 (A); Honkanen *et al.*, 1994; Luukkainen *et al.*, 1994; Lee & Chou, 2000; Matthiensen *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001) e muitas mais, provavelmente o serão no futuro devido à variedade de modificações estruturais da molécula.

Esses heptapeptídeos apresentam uma estrutura geral característica,

representada pelos seguintes resíduos: ciclo-(D-alanina₁-X₂-D-MeAsp₃-Z₄-Adda₅-D-glutamato₆-Mdha₇). Onde X e Z representam L-aminoácidos variáveis, D-MeAsp corresponde a D-eritro-β-metil ácido aspártico e Mdha equivale a N-metildehidroalanina. Adda representa um aminoácido exclusivo de cianobactérias caracterizado por: (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienóico (Botes *et al.* 1982 (B); Moore *et al.*, 1991, Rinehart *et al.*, 1994; Sivonen, 1996).

As variações estruturais mais frequentes nas moléculas de MCYST ocorrem nas posições dois e quatro, resultados de substituições de L-aminoácidos e desmetilações de resíduos nas posições três e sete. A nomenclatura atual adotada baseia-se nas variações dos L-aminoácidos das moléculas, como em microcistina – LR, em que L corresponde a leucina e R a arginina (Carmichael *et al.*, 1988).

O modo pelo qual essas toxinas atuam sobre a homeostase celular é a alteração nos processos de sinalização da fosforilação. Nas células existem vários sítios que são controlados de forma reversível que podem sofrer a ação da microcistina (Felix *et al.*, 1990; Mulkey *et al.*, 1993; Mumby & Walter, 1993).

As hepatotoxinas são internalizadas nos hepatócitos através dos receptores dos ácidos biliares (Falconer, 1991). Uma vez dentro da célula, promovem a desorganização dos filamentos intermediários e de actina, polímeros protéicos componentes do citoesqueleto do hepatócito (Runnegar & Falconer, 1986).

Microcistinas são inibidoras potentes dos resíduos de serina e treonina das proteínas fosfatases PP1, PP2A e PP3A e PP6 mas não das PP2B, PP2C e PP7 (MacKintosh *et al.*, 1990; Honkanen *et al.*, 1990; MacKintosh & MacKintosh, 1994; Toivola & Eriksson, 1999).

Foi comprovado *in vitro* que as MCYSTs interagem com as proteínas fosfatases em um nível molecular (Runnegar *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1996; Bagu *et al.*, 1997), podendo ocorrer ligações covalentes entre a cianotoxina e os resíduos de cisteína-273 (Cys-273) da PP1C e de cisteína-266 (Cys-266) da PP2Ac, via o terminal N-metil dehidroalanina (Goldberg *et al.*, 1995; MacKintosh *et al.*, 1995; Campos *et al.*, 1996), e interações não covalente relacionadas a inibição da atividade enzimática, que é

mediada pelo sítio hidrofóbico Adda da seqüência das MCYSTs e íons de hidrogênio (Namikoshi *et al.*, 1989; Rudolph-Böhner *et al.*, 1994).

A ação direta das MCYSTs nas membranas celulares foi evidenciada como uma inibição de síntese protéica seguida por uma mobilização de glicose-6-fosfato (Claeysens *et al.*, 1993, Claeysens *et al.*, 1995). Ocorrendo também uma queda de glutatona após administração dessa cianotoxina, enquanto que as concentrações de glicose e cálcio citoplasmático em hepatócitos aumentavam (Runnegar *et al.*, 1991).

O transporte de vesículas pela membrana, que é mediado por microtúbulos, é bastante prejudicado por essas toxinas. Ghosh e colaboradores em 1995 mostraram que o colapso dos filamentos de actina do citoesqueleto ocorre em hepatócitos de ratos. Os danos causados no citoesqueleto podem causar alterações nas ligações das proteínas-G e fosfolipases C (Macias-Silva & Garcia-Sainz, 1994), reduzindo o *turnover* dessas proteínas nos hepatócitos de ratos. Naseem e colaboradores em 1991 mostraram o aumento de prostaglantinas nos hepatócitos de ratos e propuseram uma liberação de ácido araquidônico por meio do metabolismo de fosfatidilinositol. Ao inibir as proteínas fosfatases, as MCYSTs ativam a fosforilase A (Runnegar *et al.*, 1995), o que explicaria a diminuição de glicogênio no fígado (Meriluoto *et al.*, 1989; Miura *et al.*, 1991).

Análises ultraestruturais e patológicas mostram necroses centrolobulares, destruição do endotélio sinusoidal, ruptura dos canais biliares, perda das microvilosidades, formação de vacúolos nos hepatócitos e necrose dos mesmos (Hooser *et al.*, 1989; Eriksson *et al.*, 1990 (B); Ito *et al.*, 1997). Sintomas subagudos de intoxicação com MCYST são representados por diarreia, vômito, piloereção, fraqueza e palidez (Bell & Codd, 1994).

Estudos avaliando o estresse oxidativo em ratos relataram um aumento nas concentrações de sorbitol desidrogenase e lactato desidrogenase após o tratamento com MCYSTs, foi observado também que os animais apresentam danos nas mitocôndrias que parecem estar relacionados com as lesões celulares. Os resultados sugerem que o estresse oxidativo está associado a hepatotoxicidade das cianobactérias (Ding *et al.*, 1998).

As cianotoxinas cíclicas demonstram atividades promotoras de tumor por meio de vias ATP-dependentes como descrito por Fujiki & Suganuma em 1999. Estudos anteriores evidenciaram que extratos de cianobactérias ou MCYST-LR dissolvida na água promovem tumores na pele de ratos e camundongos (Fujiki *et al.*, 1989), ocorrendo paralelamente a isso um aumento nas taxas de glutathione-S-transferase na forma placentar (GST-P) no fígado de ratos submetidos à injeção intraperitoneal (i.p.) de MCYST-LR e NOD após pré-tratamento com dietilnitrosamina, evidenciando um possível efeito genotóxico (Fujiki, 1992; Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992; Ohta *et al.*, 1994).

Estudos com hepatócitos de ratos demonstrando o efeito carcinogênico de NOD, quando foi relatada a indução de expressão de TNF- α e genes como c-jun, jun B, jun D, c-fos, fos B, fra-1 após tratamento com esses composto (Ohta *et al.*, 1994; Sueoka *et al.*, 1997). Mutações no códon K-ras 12 em linhagem RSA (Suzuki *et al.*, 1998) e fragmentação aleatória e degradação do DNA foram induzidos após injeções i.p. de MCYST-LR em camundongos, e em culturas de células BHK (baby hamster kidney cells) e fibroblastos embrionários de camundongos, ação provavelmente atribuída à ativação de endonucleases (Rao & Bhattacharya, 1996; Rao *et al.*, 1998).

Além desses efeitos, a atividade promotora de tumor das MCYSTs pode estar relacionada também a inibição de PP2A, visto que essa fosfatase é um regulador negativo das proteínas quinases com atividade mitogênica (MAP quinases) que atuam em processos de proliferação celular e inibição de apoptose, fatores diretamente ligados à formação de tumores (Hunter, 1995; Holmstrom *et al.*, 1998).

Experimentos avaliando a ação teratogênica de MCYSTs em embriões de peixes (*Oryzias latipes*) por meio de microinjeções, mostraram os efeitos da toxina na formação hepática dos animais, como a hipertrofia do fígado e hemorragia hepática, também evidenciadas nos embriões não eclodidos (Jacquet *et al.*, 2004).

Estudos com embriões não eclodidos de *Xenopus laevis* expostos a MCYSTs não relataram efeitos teratogênicos nem inibição do crescimento nos estágios posteriores ao tratamento. Acredita-se que a ausência de inibição das proteínas fosfatases não é atribuída a uma insensibilidade ou resistência do animal à toxina, visto que são relatados efeitos dose-dependentes em cultura de células (Fischer & Dietrich,

2000), mas sim a uma impermeabilidade da MCYST a membrana coriônica, sugerindo que a intoxicação deve ser realizada por via oral (Fischer & Dietrich, 2000).

Relatos de toxicidade renal de MCYSTs em diferentes sistemas celulares (Khan *et al.*, 1996), e *in vivo* em peixes e anfíbios (Rabergh *et al.*, 1991; Kotak *et al.*, 1996; Fischer & Dietrich, 2000), e mamíferos (Nobre *et al.*, 1999; Nobre *et al.*, 2001; Milutinovic *et al.*, 2002) foram comprovados com efeitos no córtex e medula do órgão. Acredita-se que a atuação da toxina na fosfolipase 2A e cicloxigenase está relacionada a esses efeitos citotóxicos (Nobre *et al.*, 2001).

3 - Intoxicação em animais e bioacumulação

Registros de ocorrência de florações tóxicas datam de vários séculos, sendo talvez o relato mais antigo realizado no Antigo Egito: “Morreram os peixes do Nilo, e o rio tornou-se tão infecto que os egípcios não podiam beber de suas águas. Houve sangue em todo o Egito.” (Êxodo 7:20-21). Atualmente, pesquisadores egípcios ainda relatam a ocorrência de florações tóxicas de *Oscillatoria (Planktothrix) agardii*, em canais de irrigação, e *Oscillatoria tenuis*, não produtora de toxinas, em algumas regiões do rio Nilo utilizadas ainda como área de recreação, fonte de consumo e pesca (Brittain *et al.*, 2000; Mohamed, 2002).

Em 1833, J.C.Hald relatou a ocorrência de florações tóxicas no lago Vesijarvi na Finlândia, onde o gado e peixes morreram após o consumo de florações, fato recorrente nos dias atuais e caracterizado por casos de intoxicação de gado de corte por cianobactérias da espécie *O. agardii* (Höger, 2003).

O primeiro registro de gastro-enterite ocasionado por cianobactérias ocorreu em 1931, em cidades próximas ao rio Ohio (EUA), onde baixos índices pluviométricos causaram a formação de uma floração de cianobactérias (Höger, 2003).

Casos de intoxicação por cianotoxinas cujas complicações culminaram em morte de seres humanos ocorreram no Brasil. O consumo de água contendo florações de *Anabaena* e *Microcystis* na represa de Itaparica foram responsáveis por 2000 casos de gastro-enterite, cujas complicações podem ter culminado em 88 mortes, principalmente de crianças (Teixeira *et al.*, 1993). E o mais trágico de todos os casos já documentados, ocorreu no centro de hemodiálise de Caruaru, Pernambuco, em 1996. (Jochimsen *et al.*, 1998; Pouria *et al.*, 1998). Nesse ano, 123 pacientes renais crônicos, após serem submetidos a sessões de hemodiálise, apresentaram um quadro clínico compatível com uma grave hepatotoxicose. Desses 123 pacientes intoxicados, 60 vieram a falecer no período de 10 meses após o início dos sintomas. As análises laboratoriais confirmaram a presença de MCYSTs e cilindrospermopsina no carvão ativado do sistema de purificação de água da clínica, e foi detectada MCYST em amostras de sangue e fígado dos pacientes intoxicados. A histopatologia evidenciou

necrose de hepatócitos, juntamente com ruptura de regiões e apoptose (Carmichael *et al.*, 1996; Carmichael *et al.*, 2001; Azevedo *et al.*, 2002).

Estudos relacionando a incidência de câncer de fígado na China com populações que consumiam água tratada e aquelas que utilizavam água de reservatórios contaminados por florações de cianobactérias sugerem uma correlação entre o aumento nos casos de câncer e a presença de cianotoxinas na água consumida (Yu, 1989; Harada *et al.*, 1996; Ueno *et al.*, 1996).

Além de eventos ocorridos em regiões urbanas, as florações também são comuns em áreas rurais, como locais de criação de gado. Onde ocorrem registros de intoxicação ou morte de animais como ovelhas (Done & Bain, 1993; Van Halderen *et al.*, 1995), gado bovino (Fitzgerald & Poppenga, 1993; Orr *et al.*, 2001; Orr *et al.*, 2003) e porcos (Chemgappa *et al.*, 1989).

Devido à ação antropogênica, até localidades menos degradadas e de preservação estão sujeitas à florações de cianobactérias. Relatos de intoxicação de fauna nativa por esses compostos foram feitos em estudos no Quênia, onde se evidenciou a ação prejudicial das cianotoxinas na densidade da população de flamingos (Krientiz *et al.*, 2003). Outras localidades como Nishinomiya no Japão (Matsunaga *et al.*, 1999) e Liège na Bélgica (Wirsing *et al.*, 1998) apresentaram mortalidade de pássaros nativos relacionada a uma provável intoxicação por cianotoxinas.

Os problemas associados a cianobactérias têm aumentado, especialmente em áreas onde o crescimento populacional é desordenado. Contudo, não existem no mundo, relatos oficiais de mortes humanas por consumo oral de cianotoxinas, isto porque os seres humanos evitam o consumo de água contendo florações de cianobactérias, e a ingestão de altas concentrações de cianotoxina livre dissolvida na água seria necessária para levar a óbito um ser humano adulto.

Estudos específicos abordando a intoxicação de animais e do homem por cianotoxinas têm sido realizados com maior frequência, dada a necessidade de compreensão dos mecanismos de intoxicação, manutenção dos recursos hídricos e dos ocorrentes casos de intoxicação, culminando algumas vezes em morte (Carmichael *et al.*, 2001; Pietsch *et al.*, 2001; Azevedo *et al.*, 2002).

Juntamente aos estudos realizados que comprovam a ocorrência de intoxicação por cianotoxinas, pesquisas têm sido desempenhadas com o intuito de averiguar a bioacumulação em diversos patamares da cadeia alimentar.

Análises de zooplâncton confirmaram a capacidade desses organismos em acumular MCYST. Essa constatação reforça a possibilidade de danos ao longo de toda a cadeia alimentar, visto que sua base apresenta organismos que acumulam cianotoxinas (Mohamed 2001; Ferrão-Filho *et al.*, 2002).

Pesquisas que avaliam a ocorrência e as taxas de bioacumulação em diversas espécies de moluscos têm fornecido dados referentes à acumulação e eliminação das cianotoxinas do organismo desses animais (Prepas *et al.*, 1997; Sipiã *et al.*, 2002; Vanderploeg *et al.*, 2001; Pires *et al.*, 2004).

Estudos realizados duas espécies de peixes têm demonstrado a bioacumulação de microcistina no fígado e músculo desses animais, representando um risco para outros organismos, inclusive o homem que os utiliza os como fonte de alimento (Amorim & Vasconcelos, 1999; Magalhães *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2004; Xiao-Yu *et al.*, 2004).

Resultados obtidos a partir de estudos com peixes (Tencalla *et al.*, 1994; Magalhães *et al.*, 2001; Magalhães *et al.*, 2003) e crustáceos (Magalhães *et al.*, 2003) mostram taxas de acumulação de MCYST na musculatura e órgãos, sendo estas representadas por valores correspondentes a 15 vezes àquele permitido pela Organização Mundial da Saúde (Chorus & Bartram, 1999).

Estudo recente com *Tilapia rendalli* em condições laboratoriais avaliou taxas de acumulação e depuração de MCYST ratificando a bioacumulação, bem como fornecendo os primeiros indícios de taxa de excreção dessa toxina (Soares *et al.*, 2004).

Análises histopatológicas de tecidos de animais, como pequenos mamíferos, peixes e invertebrados, submetidos ao tratamento com MCYST vêm sendo utilizados com frequência, visto que os mesmo podem ser utilizados para a caracterização de diagnósticos dessa cianotoxina em humanos, além de fornecer dados para o conhecimento dos processos envolvidos nos mecanismos de ação (Rabergh *et al.*, 1991; Palikova *et al.*, 2004; Xiao-Yu *et al.*, 2004).

Em razão da bioacumulação de cianotoxinas por várias espécies de animais, estes podem ser utilizados como bioindicadores, organismos ou comunidades que respondem à poluição ambiental, alterando suas funções vitais ou acumulando toxinas.

Os anfíbios representam uma proposta interessante de estudo como bioindicadores, pois estão em contato com o ar, a água e o solo e são os primeiros a desaparecer quando o ambiente entra em desequilíbrio (Duellman & Trueb, 1994; Venturino *et al.*, 2003), e apresentam ainda no estágio larval diversas formas de alimentação que variam desde animais filtradores até aqueles carnívoros (Duellman & Trueb, 1994).

O uso de larvas de girinos para avaliar os efeitos citotóxicos e a bioacumulação das MCYSTs é inovador, sendo encontrados apenas poucos estudos que avaliam a teratogênese e mutagenêse induzida por exposição a MCYSTs com esses animais (Fischer & Dietrich, 2000; Dvorakova *et al.*, 2002). Não existem estudos sobre a resistência e/ou a capacidade de acumulação de cianotoxinas em larvas de anfíbios anuros, conhecidos popularmente como girinos

1 - Gerais

1. Colaborar para a caracterização das variantes de microcistina-LR produzidas pela linhagem NPLJ-4 de *Microcystis aeruginosa*;
2. Contribuir para o entendimento dos processos de intoxicação e eliminação de uma variante de microcistina-LR em anfíbios anuros;
3. Obter dados sobre os efeitos citotóxicos da variante de microcistina-LR em diferentes órgãos e tecidos de anfíbios anuros.

2 - Específicos

1. Caracterizar as MCYSTs produzidas pela linhagem NPLJ-4 de *M. aeruginosa*;
2. Identificar e quantificar por meio de sistema de cromatografia de alta eficiência (PDA-HPLC) as concentrações de MCYST, quando presentes, em fígado, músculo e trato gastrointestinal dos animais expostos ao tratamento com célula e extrato de *M. aeruginosa*;
3. Avaliar a histopatologia dos tecidos e órgãos por meio de microscopia de luz causada pela exposição a células íntegras e extrato de *M. aeruginosa*.

1 - Cultivo de cianobactérias e obtenção de animais experimentais

1.1 - Cultivo de cianobactérias

A linhagem de *Microcystis aeruginosa* (NPLJ-4) foi cedida gentilmente pelo Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias – Instituto de Biofísica Carlos Chaga Filho-UFRJ, coordenado pela Dra. Sandra Azevedo.

As células de cianobactérias foram inicialmente obtidas a partir do cultivo montado no Laboratório de Análise de Água (LAA) do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da UnB. Para isso, foram realizados cultivos unialgais da espécie *M. aeruginosa* linhagem NPLJ-4, em meio ASM-1 descrito em Zagatto & Aragão em 1992. Os frascos contendo as culturas foram mantidos em uma estufa com temperatura controlada a $23 \pm 2^\circ\text{C}$, intensidade luminosa de $22\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ e um fotoperíodo de 12h. A cultura foi mantida sob aeração contínua, para manutenção das células em suspensão, e o crescimento algáceo foi acompanhado através de contagem celular ao microscópio de luz com auxílio de câmara de Neubauer.

1.2 - Obtenção e manutenção de animais experimentais

Foram adquiridos comercialmente em ranário do entorno de Brasília 140 girinos de rã touro norte americana (*Rana catesbeiana*).

Os animais utilizados foram divididos, acondicionados e aclimatados em aquários de 90 litros (30cm X 60cm X 50cm), devidamente termostatizados a 25°C e oxigenados por meios de bombas submersas. Os animais permaneceram no período de aclimatação por 20 dias, com um fotoperíodo de 12h.

2 – Caracterização da linhagem NPLJ-4 de *Microcystis aeruginosa*

2-1 – Análises em PDA-HPLC

2.1.1 - Extração e semipurificação

Como a linhagem NPLJ-4 de *Microcystis aeruginosa* não foi bem estudada quanto à caracterização das microcistinas (MCYSTs) produzidas pela mesma, foi feita a caracterização das diferentes cianotoxinas presentes por meio de PDA-HPLC e espectrometria de massa para os estudos propostos nesse projeto.

Um volume de 1 (um) litro de cultivo após 15 dias de crescimento foi

centrifugado por 15 minutos a 6000 rpm para concentração de células e subsequente secagem por liofilização. O material liofilizado foi pesado e fracionado em frascos contendo 1 (um) grama de células.

2.1.2 - Fracionamento em sistema de PDA-HPLC

Para os procedimentos de extração e concentração foram consultadas diferentes metodologias como analisadas por Meriluoto em 1997 e Lawton e colaboradores em 2001, sendo adotada a extração seriada com metanol 100% e concentração por meio de cartuchos C₁₈.

Para a caracterização das toxinas produzidas pela linhagem NPLJ-4 de *M. aeruginosa* uma fração de 1 (um) grama foi homogeneizada e extraída em metanol 100% na proporção de 1g de amostra para 20mL de solvente por 3 (três) vezes com duração de 40 minutos cada. A referida fração foi então submetida à filtração a vácuo, em membrana de fibra de vidro com 1,2micra de porosidade, seca em rotavapor e ressuspensa em 10mL de água deionizada para posterior aplicação em cartucho C₁₈.

O extrato aquoso foi semipurificado em fase sólida, utilizando-se cartuchos C₁₈ previamente ativados com 50mL de metanol 100% e 50mL água deionizada. A amostra foi aplicada em cartucho, e este foi submetido a uma lavagem com 100mL de água destilada, fração a qual foi descartada. A fração contendo a toxina foi eluída com 100mL de metanol 100%, seca em rotavapor e ressuspensa em 2mL de água deionizada. Essa fração foi mantida congelada até o momento da análise em PDA-HPLC.

Para a análise da toxina por cromatografia líquida, foi utilizado um

sistema de alta eficiência com detecção por foto-diodo (PDA-HPLC) (Shimadzu série LC-10A), a amostra foi filtrada em filtro de polietileno GV Millex com 0,22micra de poro e diâmetro de 3mm (Millipore) e coluna de fase reversa C₁₈ coluna Synergi 4μ Fusion-RP 80 (150 x 4,60mm; Phenomenex). A cromatografia foi realizada sob condições isocráticas com fase móvel de 20mM formiato de amônio, pH 5,0 e acetonitrila (7:3, v:v) por 20 minutos. O volume de injeção foi de 20μl, fluxo de 1mL/min, detecção a 238nm e o espectro de absorção de cada pico foi analisado entre 200-300nm.

O sal formiato de amônio foi escolhido em detrimento ao acetato de amônio devido ao primeiro ser mais volátil, o que facilitou as análises realizadas por meio de espectrometria de massa, além de aquele ter apresentado uma melhor separação das MCYSTs presentes no extrato bruto.

A identificação das toxinas produzidas pela linhagem NPLJ-4 foi realizada por comparação da fração cromatográfica com o padrão de MCYST-LR (SIGMA, CO), observando o tempo de retenção no sistema de cromatografia e ao índice de similaridade dos espectrogramas de MCYST na faixa de absorbância de 200 a 300nm.

2.2 – Análises em espectrômetro de massa

As cinco frações referentes as variantes de MCYST-LR produzidas pela linhagem NPLJ-4 de *M. aeruginosa* identificadas na análise por PDA-HPLC foram fragmentadas em sistema de espectrometria de massa - MALDI TOF/TOF.

Uma massa equivalente a 100mg de cada amostra liofilizada foi dissolvida em água nanopura, e misturada em uma solução saturada de uma matriz constituída por ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico na proporção de 1:3. Essa mistura foi depositada em uma placa do tipo Anchorchip com 600 mm e deixada secar a temperatura ambiente.

As fragmentações tiveram suas massas moleculares exatas determinadas utilizando um espectrômetro de massa MALDI TOF/TOF UltraFlex II (Bruker Daltonics, Alemanha) utilizando calibração externa sob modo de operação refletido e positivo. Os espectrogramas foram obtidos a uma frequência de 50 Hz sendo resultado do acúmulo de 200 disparos de laser a uma intensidade de até 30% da configuração padrão.

3 – Experimentação

3.1 - Exposição dos girinos de *Rana catesbeiana* às células de *Microcystis aeruginosa*

Foram utilizados 70 animais acondicionados em aquário de capacidade de 90 litros, utilizando um volume igual a 84 litros devidamente termostatizado a 25°C e oxigenado por meio de bombas submersas.

O aquário recebeu 840mL de meio de cultivo contendo células de *M. aeruginosa* no final da fase do crescimento exponencial, determinada por contagem de células ao microscópio de luz com auxílio de câmara de Neubauer (15 dias após repique, cerca de 10^7 células por mL de meio). Ao final a concentração de células no aquário foi equivalente a 10^5 células por mililitro.

A cada 2 (dois) dias foi realizada a troca de água, adicionando-se novamente o mesmo volume de meio de cultura contendo células de *M. aeruginosa*, visando a manutenção da concentração de células em contato com os animais.

Um volume equivalente a 10% do volume total do aquário foi retirado e centrifugado a 6000 rpm por 15 minutos para verificar a existência de células. Quando ocorreu formação de pellet, o mesmo foi ressuspensão em um volume de 1 (um) mililitro e analisado em Câmara de Neubauer para contagem de células remanescentes. O restante da água presente no aquário foi colocado em contato com hipoclorito de sódio por um período de 24 horas e então descartado.

Durante o experimento, 5 (cinco) indivíduos foram retirados a cada 2 (dois) dias do aquário e sacrificados com uso de lidocaína 2% em pomada administrada diretamente sobre a pele dos animais, que foram separados em dois grupos, o primeiro constituído por 3 (três) indivíduos destinados à quantificação e bioacumulação de MCYST por PDA-HPLC e o segundo por 2 (dois) reservados às análises histopatológicas por microscopia de luz. Em seguida porções de trato gastrointestinal

(TGI), fígado e musculatura foram retirados.

Os 40 animais restantes foram removidos para outro aquário livre de células de *M. aeruginosa*. Durante os 10 dias seguintes, 5 (cinco) indivíduos foram retirados a cada 2 (dois) dias do aquário e sacrificados com uso de lidocaína 2% em pomada, sendo esses separados em dois grupos, um constituído por 3 (três) indivíduos destinados a análises quanto à eliminação de MCYST por PDA-HPLC e outro formado por 2 (dois) animais reservados às análises histopatológicas por microscopia de luz para verificação de possíveis regenerações.

O grupo controle foi composto por animais que não foram expostos em nenhum momento ao cultivo, e foram retirados indivíduos seguindo as mesmas condições dos animais tratados.

Os animais utilizados nessa fase do experimento foram alimentados com ração própria fornecida pelo ranário, que foi oferecida nos mesmos períodos de troca de água ao longo do tratamento e durante a etapa de regeneração.

3.2 - Exposição dos girinos de *Rana catesbeiana* ao extrato de *Microcystis aeruginosa*

Nessa fase foram utilizados 70 animais, igualmente acondicionados como na fase anterior, que foram submetidos ao extrato do cultivo.

O extrato foi obtido por meio de filtração a vácuo em membrana de fibra de vidro com 1,2micra de porosidade de frações do cultivo equivalentes a um volume de 840mL de cultivo bruto. O material retido no filtro foi ressuspenso em 50mL de água

destilada, e submetido a rompimento por ultra-som visando o rompimento das células e conseqüente eliminação das toxinas. As frações de extrato foram mantidas em geladeira em abrigo de luz para evitar uma possível degradação da cianotoxina até o momento de utilização.

A cada 3 (dias) dias foi realizada a troca de água, adicionando-se novamente o mesmo volume de extrato de cultura de *M. aeruginosa*, visando a manutenção da concentração de toxina em contato com os animais. O descarte da água contendo extrato de células do cultivo foi realizado após um período de 2 (dois) dias de exposição a hipoclorito de sódio.

Durante essa fase do experimento, 5 (cinco) indivíduos foram retirados a cada 3 (três) dias dos aquários e sacrificados com uso de lidocaína 2% em pomada administrada diretamente sobre a pele dos animais, que foram separados em dois grupos, o primeiro constituído por 3 (três) indivíduos destinados à quantificação e bioacumulação de MCYST por PDA-HPLC e o segundo por 2 (dois) reservados às análises histopatológicas por microscopia de luz. Em seguida porções de trato gastrointestinal (TGI), fígado e musculatura foram retirados.

Os 40 animais restantes foram removidos para outro aquário livre de células de *M. aeruginosa*. Durante os 15 dias seguintes, 5 (cinco) indivíduos foram retirados a cada 3 (três) dias do aquário e sacrificados com uso de lidocaína 2% em pomada, sendo esses separados em dois grupos, um constituído por 3 (três) indivíduos destinados a análises quanto à eliminação de MCYST por PDA-HPLC e outro formado por 2 (dois) animais reservados às análises histopatológicas por microscopia de luz para verificação de possíveis regenerações.

O grupo controle foi composto por animais que não foram expostos em nenhum momento ao cultivo. Foram retirados indivíduos seguindo as mesmas condições dos animais tratados.

Os animais utilizados nessa fase do experimento foram alimentados com ração própria fornecida pelo ranário, que foi oferecida nos mesmos períodos de troca de água ao longo do tratamento e durante a etapa de regeneração.

4 - Quantificação de MCYST

4.1 – Análises de tecidos por PDA-HPLC

Cada amostra de órgão e tecido foi pesada, macerada e extraída durante 24h em metanol 100% na proporção de 1g de amostra para 20mL de metanol por 2 (duas) vezes. Os extratos foram submetidos à centrifugação a 6000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi seco em rotavapor, e ressuspenso em 10mL de água deionizada para posterior aplicação em cartucho C₁₈.

Os procedimentos para purificação das amostras em cartuchos C₁₈ e identificação por cromatografia de alta eficiência (PDA-HPLC) foram os mesmos realizados para a caracterização das MCYSTs mencionados anteriormente, exceto pelo uso de acetato de amônio (20mM, pH 5,0 e acetonitrila (7:3, v:v)) em detrimento ao formiato de amônio. Foi mantido o uso de acetato de amônio para a quantificação de MCYST nos extratos de tecidos devido à ampla utilização do mesmo nas bibliografias consultadas para a realização do presente estudo.

As amostras que apresentaram frações cromatográficas no tempo de retenção semelhante ao padrão de MCYST e índice de similaridade (Is) do espectro entre 200-300nm, variando entre 0,95 a 1,00, foram consideradas positivas para a presença da toxina.

A quantificação do total acumulado nos tecidos foi realizada por meio de uma curva padrão relacionando concentração do padrão de MCYST e área do pico no sistema de cromatografia.

4.2 – Curva padrão e limite de detecção

Para a confecção da curva padrão referente à fração predominante de cianotoxina produzida pela linhagem NPLJ-4 de *M. aeruginosa*, foi utilizada uma amostra liofilizada de cultivo, que foi purificada e concentrada seguindo a mesma metodologia mencionada anteriormente para a caracterização das MCYSTs produzidas pela referida linhagem.

Para a análise em PDA-HPLC foi adotada a mesma metodologia para a caracterização da linhagem NPLJ-4, pois o formiato de amônio apresentou melhor definição dos picos referentes às cianotoxinas, e também por ser um sal mais volátil, facilitando as análises de espectrometria de massa.

O pico predominante do extrato do cultivo de *M. aeruginosa* foi coletado manualmente, liofilizado e ressuspenso em 100µL de água deionizada. O método de quantificação foi adaptado a partir de Lai e colaboradores em 2001, utilizando um espectrofotômetro UV- visível (Jasco; V- 530).

Após a quantificação, a amostra foi liofilizada e diluída em 100µL de água deionizada por 5 (cinco) vezes de forma a obter as seguintes massas: 45,24µg, 13,12µg; 6,56µg; 3,28µg; 1,64µg. Essas frações foram aplicadas em triplicata em PDA-HPLC, sendo utilizada a fase móvel de quantificação de cianotoxina (acetato de amônio 20mM, pH 5,0 e acetonitrila (7:3, v:v)).

Após obtenção das áreas dos picos relacionados às respectivas concentrações, foi construído um gráfico, e por meio de regressão linear foram obtidos a equação de reta e o respectivo valor de significância r^2 .

O limite de detecção adotado para a realização do experimento foi correspondente a metade do menor valor da curva de calibração.

5 - Microscopia de luz

Foram confeccionadas lâminas histológicas para avaliação do efeito das toxinas na morfologia do fígado, trato intestinal e músculo segundo Behmer e colaboradores em 1976.

O material obtido após dissecação foi imediatamente fixado por um período de 12 (doze) horas em formalina 10% em um volume 20 (vinte) vezes maior que o peso. Após a fixação, o reagente foi substituído por álcool 70% caso o procedimento não tenha sido realizado no mesmo dia. E a fim de proceder à desidratação, o material foi submetido a consecutivos banhos de 1 (uma) hora de duração cada em solução alcoólica, com concentrações crescentes equivalentes a: 80, 90, 100 e 100%.

A diafanização foi realizada pela imersão do material por 1 (uma) hora em solução de etanol/xileno (1:1, v:v) seguida por 3 (três) banhos de xileno 100% com duração de 40 minutos cada. Em seguida, o material foi infiltrado com parafina e mantido em estufa a 56-58°C. Para uma otimização da técnica, foram necessários 3 (três) banhos com parafina de 1 (uma) hora de duração cada. A montagem dos blocos foi realizada com o posicionamento do material entre traves de metal e posterior preenchimento com parafina.

Após solidificação, o bloco de parafina foi fixado sobre suportes de madeira e seccionado em cortes de 5µm de espessura, sendo estes então transferidos para um banho a 37°C para facilitar a adesão dos mesmos às lâminas histológicas. As lâminas foram mantidas por 12 (doze) horas em estufa a 35°C para secagem.

O material foi corado utilizando-se a metodologia de coloração hematoxilina e eosina (HE). Para isso, o material foi submetido a um novo processo de diafanização, passando por 3 (três) banhos de xileno 100% de 1 (um) minuto cada.

Após a diafanização, o material foi hidratado por meio de banhos com duração de 1 (um) minuto cada em concentrações decrescentes de álcool etílico: 100,

95, 90, 80 e 70%. Para finalizar o processo de hidratação, as lâminas foram lavadas em banho de água destilada com duração de 1 (um) minuto.

A coloração por hematoxilina foi realizada por meio de imersão do material por 2 (dois) minutos nesse corante, seguido de lavagem em água destilada. O mesmo procedimento foi realizado para a coloração em eosina.

Após a lavagem em água, as lâminas foram desidratadas, seguindo os procedimentos inversos da hidratação, finalizando com 3 (três) banhos de xileno 100% com duração de 1 (um) minuto cada.

As lamínulas foram fixadas utilizando Bálsamo do Canadá, e o material foi seco em estufa a 30-40°C por 24 horas.

Foi realizado o registro fotográfico do material em diferentes aumentos para posterior análise e ilustração.

1 – Implementação do cultivo

A implementação e consolidação do banco de cultura unialgal referente a *Microcystis aeruginosa* foram realizadas com sucesso no Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília (Figura 2).

Como mencionado na seção de Material e Métodos, a cada 15 dias, o cultivo alcançava o número adequado de células para o uso. Sendo esse equivalente a 10^7 células por mililitro de cultura.



Figura 2. Cultivo unialgal em diferentes estágios de crescimento implementado no Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília (LTx-UnB).

2 – Caracterização das cianotoxinas produzidas

2.1 – PDA-HPLC

Segundo Soares *et al.* (2004), a linhagem NPLJ-4 referente a *M. aeruginosa* isolada na Lagoa de Jacarepaguá, Rio de Janeiro apresenta 04 variantes de MCYST, sendo a MCYST-LR a mais abundante.

Contudo, as análises realizadas no Laboratório de Toxinologia na Universidade de Brasília (LTx-UnB) sugerem que essa linhagem em estudo produz não quatro, mas cinco variantes de MCYST, as quais foram isoladas por sistema de PDA-HPLC e submetidas à espectrometria de massa.

O cromatograma referente a todos os picos de MCYST produzidos pela linhagem NPLJ-4 está representado na figura 3, bem como seus respectivos espectrogramas de absorção na faixa de 200-300nm. O pico “C” corresponde a MCYST predominante no extrato obtido a partir do cultivo bruto, que corresponde a 89,81 % da MCYST total produzida pela linhagem em estudo.

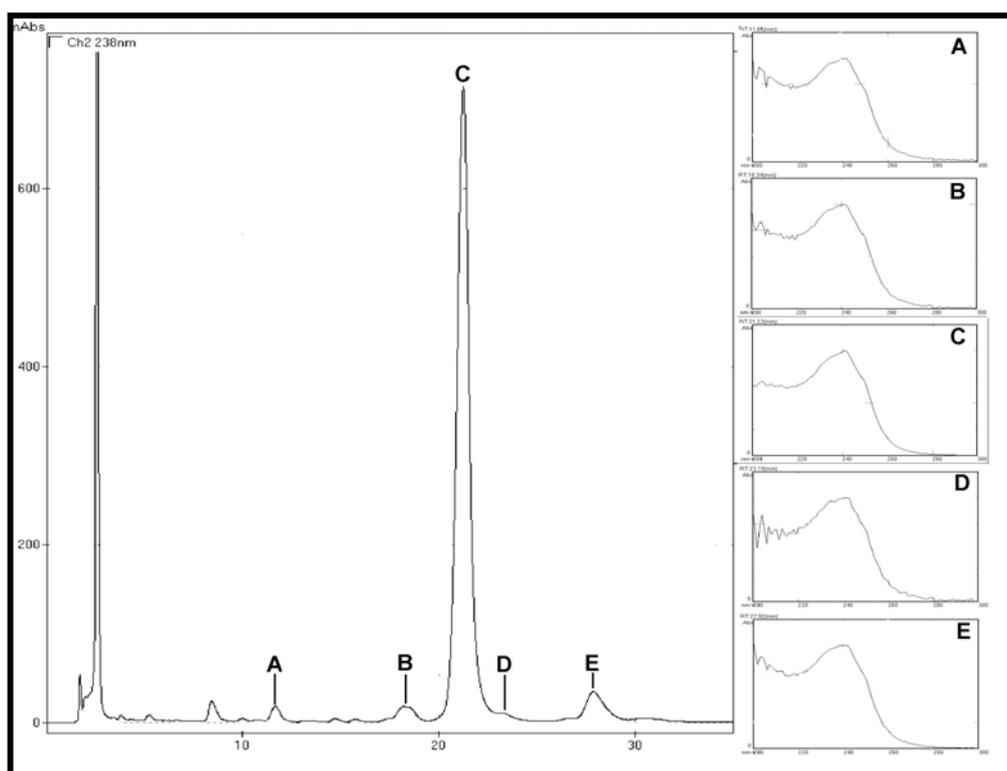


Figura 3. Cromatograma no sistema de HPLC referente ao extrato purificado pelo cultivo da linhagem NPLJ-4 implementado no LTx-UnB e seus espectrogramas de absorção na faixa de 200-300nm das frações cromatográficas referentes a microcistina. Metodologia vide material e métodos.

A comparação dos tempos de retenção juntamente com espectrogramas na faixa de 200-300nm é essencial para uma identificação positiva para algumas microcistinas com padrões disponíveis. Contudo ressaltamos que isoladamente os espectrogramas servem para demonstrar a presença dessa classe de toxinas, pois a forma de absorção entre os valores de 200 a 300nm é única e característica desse grupo.

Quando comparada com a MCYST-LR comercial (SIGMA, CO) o espectrograma da fração mais abundante obteve índice de similaridade de 0,9986. Somente se diferenciando em modificações sutis nos vales e picos do espectrograma.

Estão representados na figura 4 os espectrogramas de absorção na faixa de 200-300nm alusivos ao padrão comercializado de MCYST-LR (SIGMA, CO) e ao pico da MCYST produzida pela linhagem em estudo.

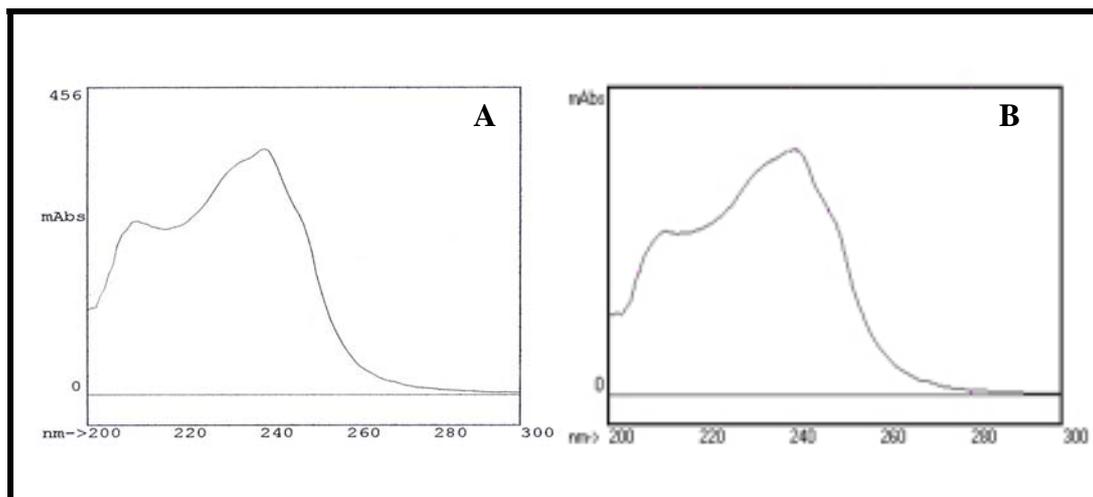


Figura 4. Espectrogramas de absorção na faixa de 200-300nm referentes a MCYST. Em (A) tem-se o padrão comercial SIGMA, CO e em (B) o extrato do cultivo implementado no Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília (LTx-UnB).

2.2 – Espectrometria de massa

As 05 (cinco) MCVSTs produzidas pela linhagem NPLJ-4 foram isoladas pelo sistema de HPLC e submetidas à espectrometria de massa, sendo que a fração correspondente ao pico predominante (pico “C”, figura 3) apresentou um componente de massa MS (A) e MS/MS (B) em 1037,63 Da ($M+H^+$) (Figura 5).

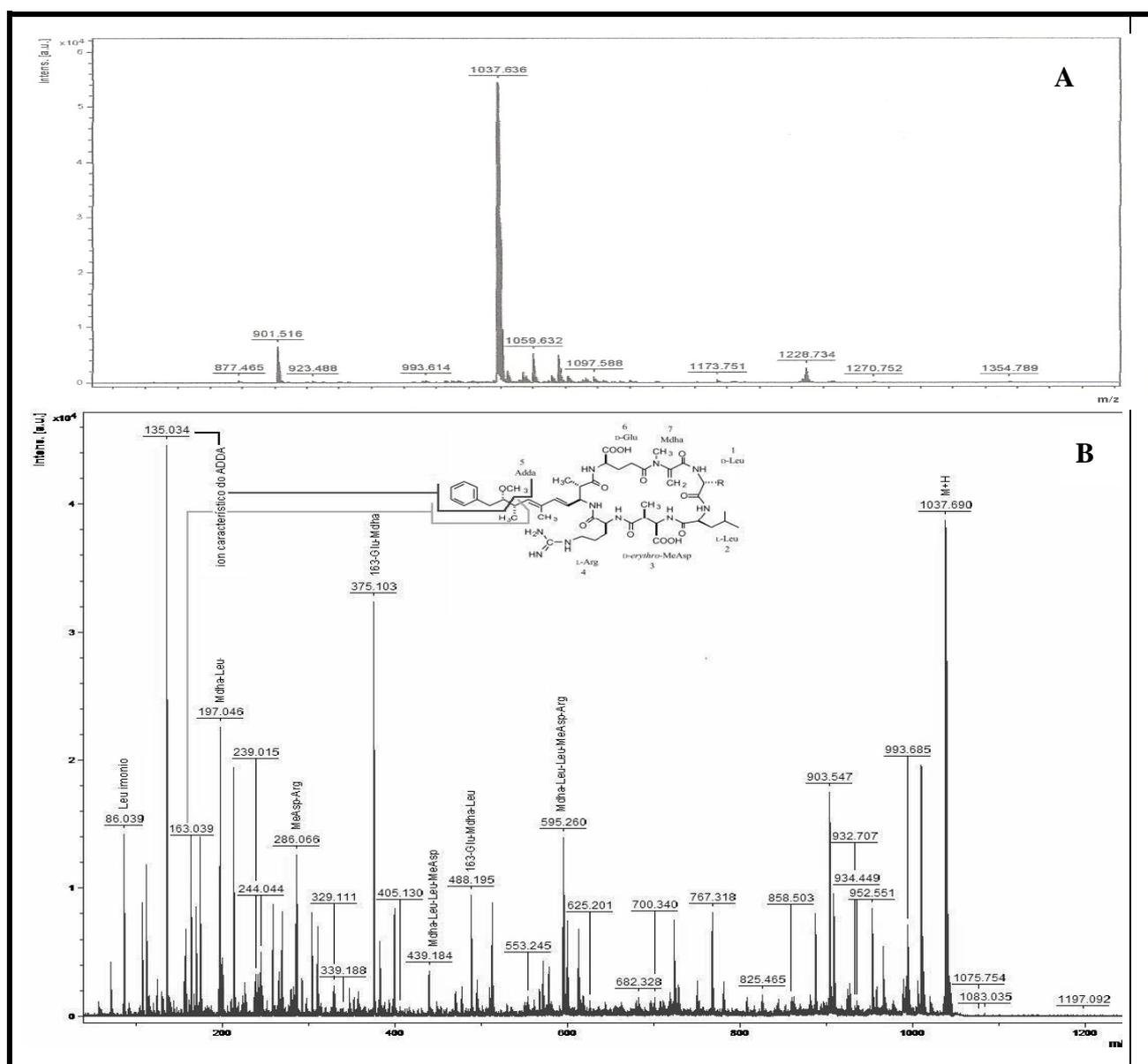


Figura 5. Análise de espectroscopia de massa MS (A) e MS/MS (B) referente ao pico predominante observado no cultivo implementado no LTx-UnB alusivo a [D-Leu] MCVST-LR (1037, 63 Da).

Os dados e a identificação das demais MCVYSTs produzidas pela linhagem NPLJ-4, referentes à espectrometria de massa, estão representados a seguir (Figuras 7 a 10).

A figura 7 mostra o espectrograma de massa MS (A) e MS/MS (B) da fração cromatográfica “A”, vide figura 3. Essa fração apresentou dois componentes de massa significativos, o primeiro equivalente a 1071,64 e o segundo 1085,64Da ($M+H^+$), cuja identificação não foi alcançada. Sugerimos que essa fração representa um isômero de massa de uma MCVYST, cuja identidade ainda não foi comprovada, bem como uma variável metilada (1085,64Da ($M+H^+$)).

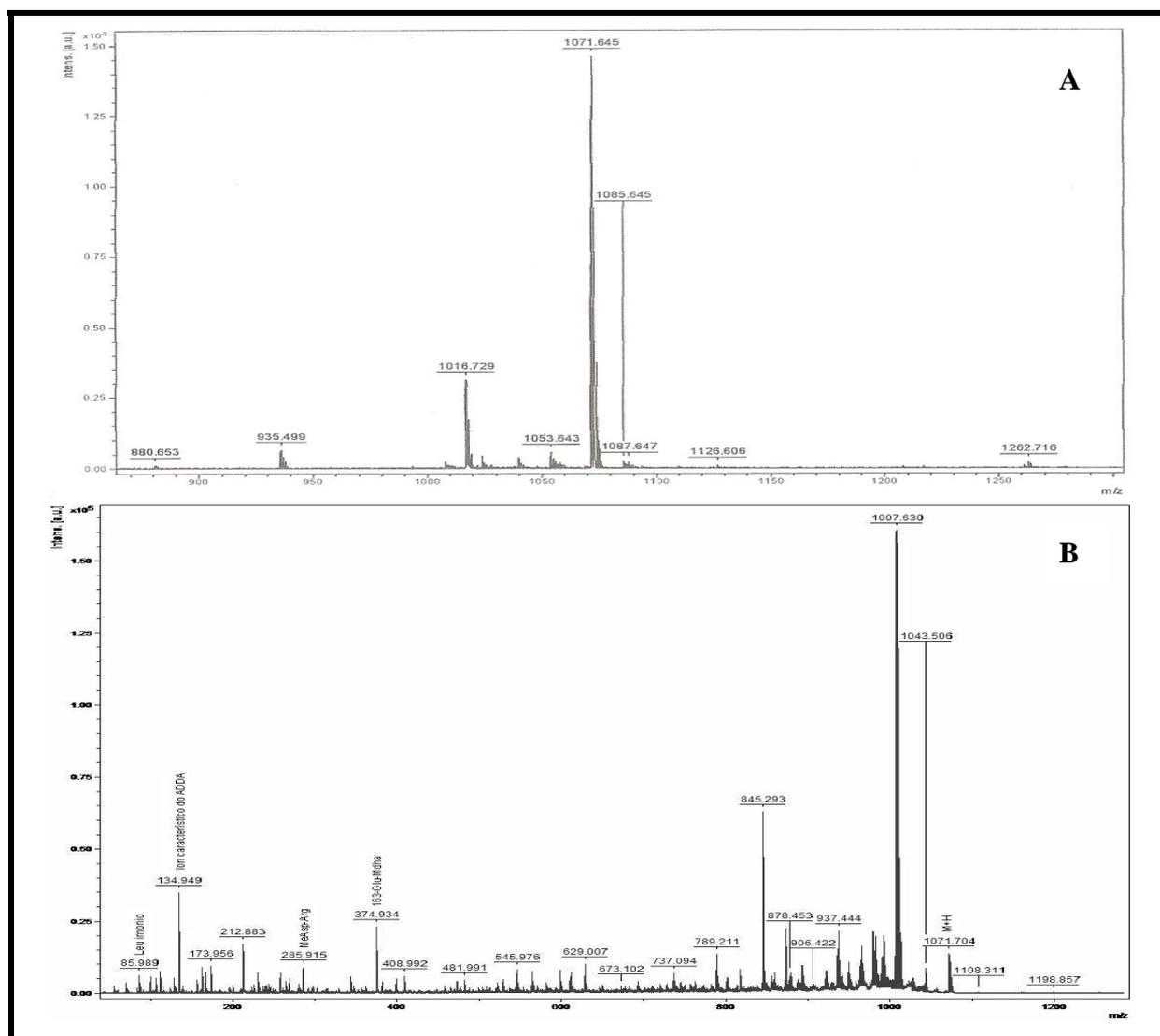


Figura 7. Análise de espectroscopia de massa mostrando o pico “A” da figura 3 referente a uma MCVYST ainda não caracterizada produzida pela linhagem NPLJ-4. Em (A) espectrograma de massa MS e em (B) MS/MS.

A figura 8 mostra o espectrograma de massa MS (A) e MS/MS (B) da fração cromatográfica “B” da figura 3. Essa fração apresentou um componente de massa em 1023,62 Da ($M+H^+$) que sugerimos representar um isômero de massa de uma variante desmetil da [D-Leu] MCYST-LR. Está presente também um pico significativo referente a MCYST ainda não caracterizada (1071, 61 Da ($M+H^+$)).

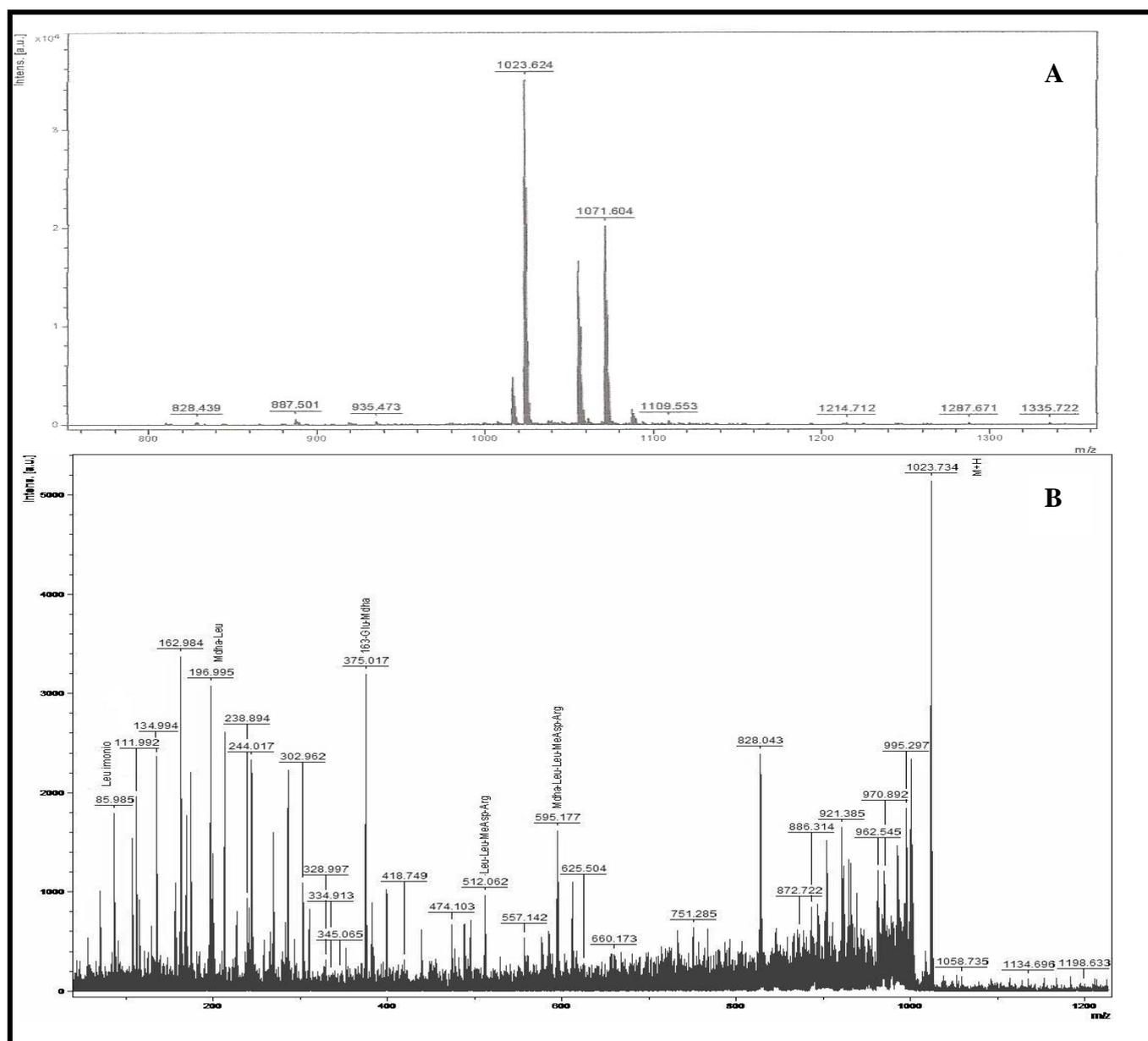


Figura 8. Análise de espectroscopia de massa mostrando o pico referente a uma provável variante equivalente a desmetil [D-Leu] MCYST-LR (1023, 62 Da) observado no extrato bruto do cultivo implementado no LTx-UnB. Em (A) espectrograma de massa MS e em (B) MS/MS.

A figura 9 mostra o espectrograma de massa MS (A) e MS/MS (B) da fração cromatográfica “D”, vide figura 3. Essa fração apresentou dois componentes de massa significativos, o primeiro equivalente a 1071,64 e o segundo 1085,64Da ($M+H^+$), cuja identificação não foi alcançada. Sugerimos que essa fração não está pura, e apresenta duas MCYSTs ainda não caracterizadas.

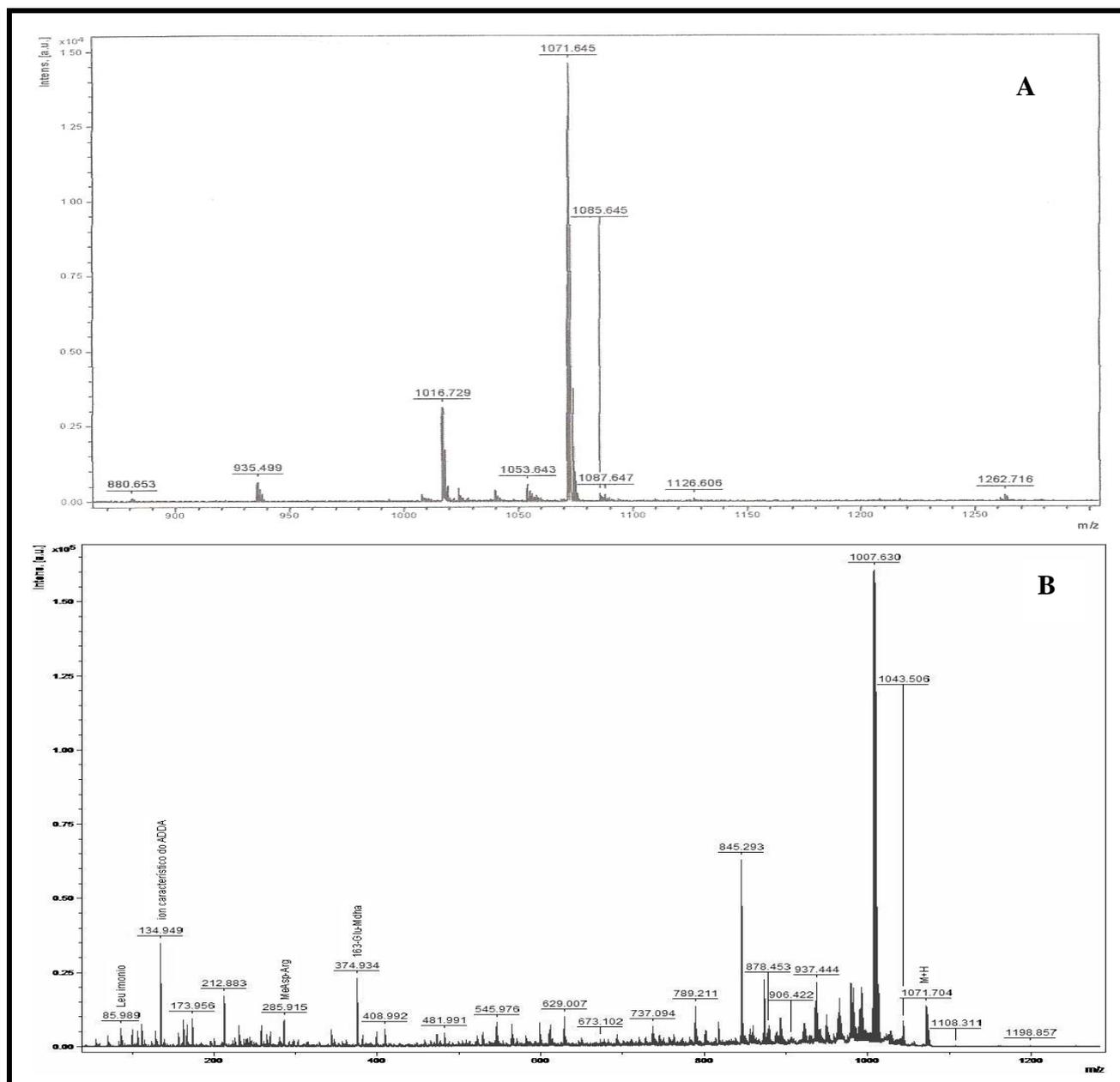


Figura 9. Análise de espectroscopia de massa mostrando o pico “D” da figura 3 referente a uma MCYST ainda não identificada produzida pela linhagem NPLJ-4. Em (A) espectrograma de massa MS e em (B) MS/MS.

A figura 10 representa o espectrograma de massa MS (A) e MS/MS (B) da fração “E”, vide figura 3. Essa fração apresentou um componente de massa em 1023,69Da ($M+H^+$) que sugerimos representar um isômero de massa de uma variante desmetil da [D-Leu] MCYST-LR.

Um segundo componente de massa está presente e é característico a [D-Leu] MCYST-LR (1037,69Da ($M+H^+$)).

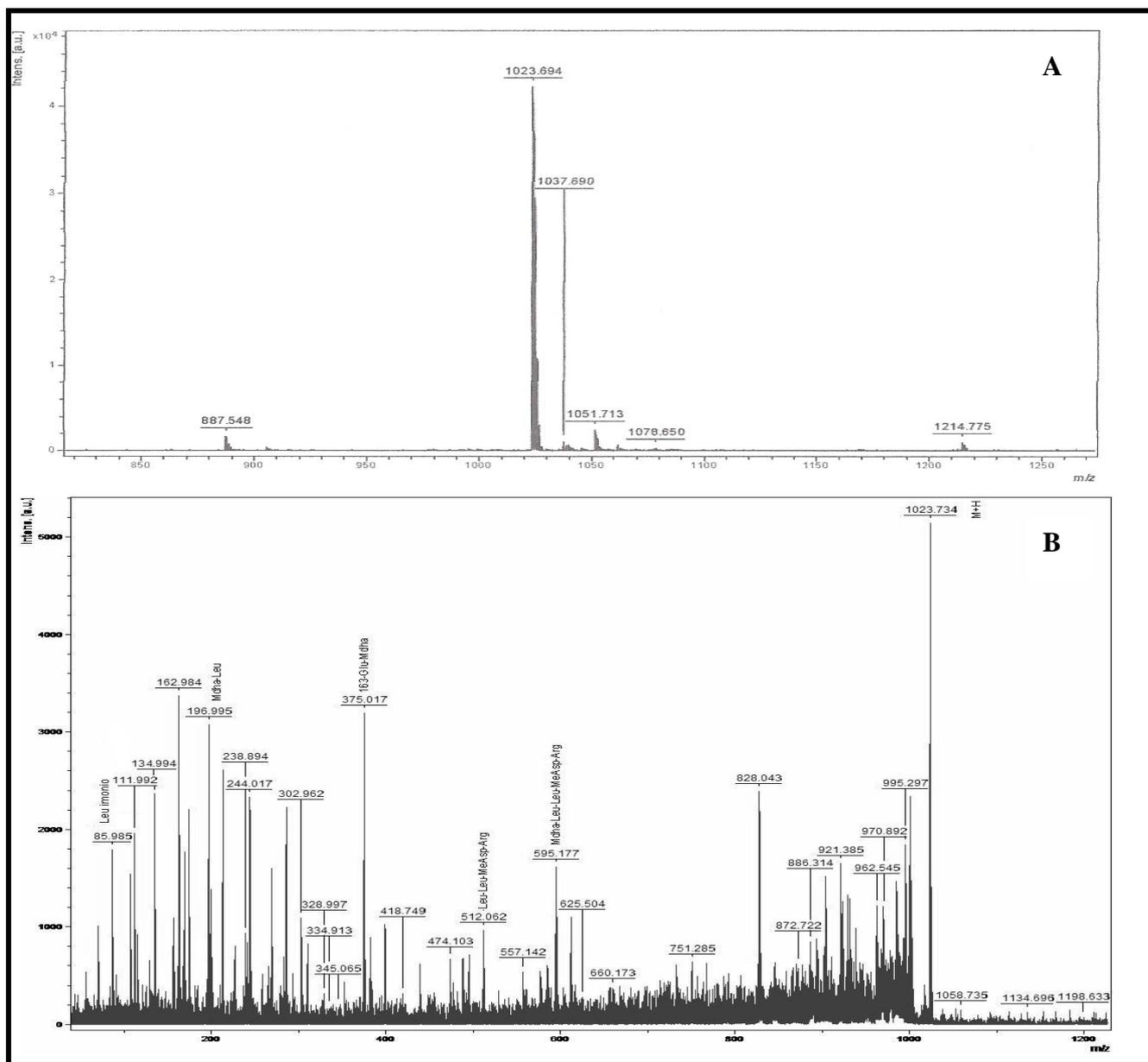


Figura 10. Análise de espectroscopia de massa mostrando o pico referente a uma possível variante desmetil de [D-Leu] MCYST-LR (1023, 69 Da) observado no extrato bruto do cultivo implementado no LTx. Em (A) espectrograma de massa MS e em (B) MS/MS.

2.3 – Curva de calibração e limite de detecção

A partir dos valores obtidos por meio das análises cromatográficas foi elaborada uma curva de calibração para MCVYST. As análises foram realizadas em triplicata seguindo as massas estabelecidas na metodologia apresentada anteriormente. Os dados obtidos possibilitaram a montagem da equação da reta, bem como o valor de significância (r^2). (Figura 11).

Com base nos valores adotados para a confecção da curva, tomou-se como limite de quantificação do método de análise o valor referente à metade do menor ponto da equação da reta, ou seja, o valor equivalente a $0,82\mu\text{g}/100\mu\text{L}$.

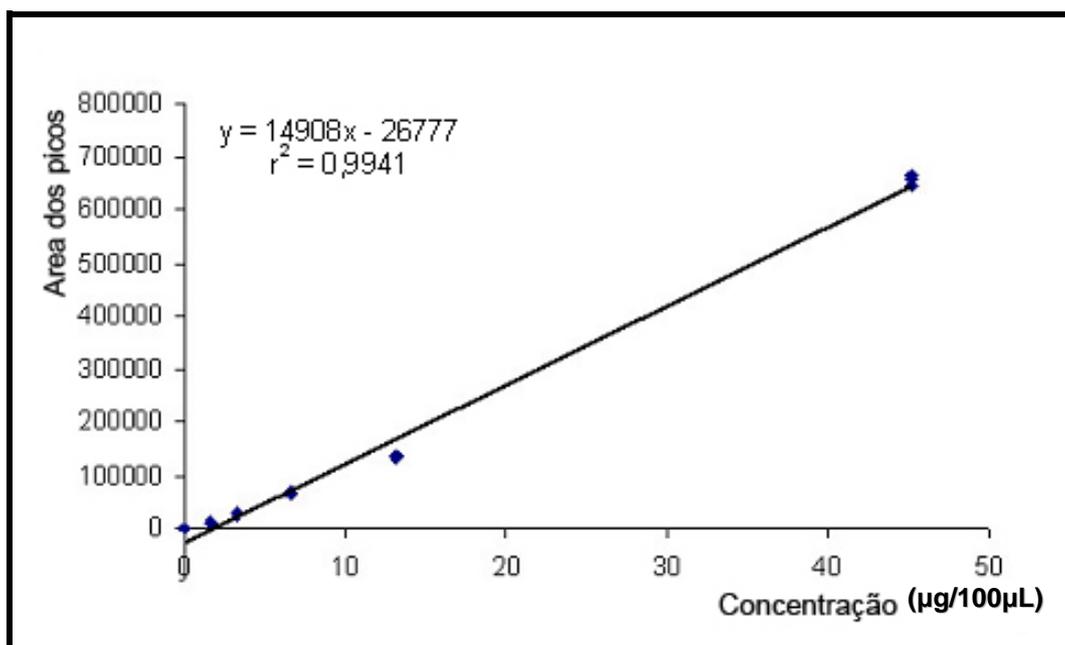


Figura 11. Curva de calibração de [D-Leu] MCVYST-LR em sistema de HPLC, relacionando a área do pico predominante e concentrações predefinidas. Equação de reta equivalente a $y=14908x-26777$, e r^2 igual a 0,9941. O eixo X representa os valores das concentrações, enquanto que o Y apresenta os valores das áreas dos picos obtidos por meio de PDA-HPLC.

A curva de calibração apresentou boa linearidade (r^2 igual a 0,9941), e foi utilizada para medir a concentração da [D-Leu] MCYST-LR tanto no cultivo quanto nos tecidos e órgãos analisados.

A presença de [D-Leu] MCYST-LR foi detectada pelo sistema de HPLC apenas nas amostras de fígado de girino exposto por 02 (dois) dias ao cultivo da linhagem NPLJ-4. Com base na curva padrão construída, foi calculada a concentração de 2,99mg de cianotoxina por grama de tecido fresco de amostra.

Para comparação, foi calculada também a concentração de [D-Leu]-MCYST-LR em amostra de extrato bruto do cultivo, que foi equivalente a 13,05mg de [D-Leu] MCYST-LR por grama de cultivo seco.

3 – Análises por meio de HPLC dos extratos animais

O tempo de troca da água do aquário foi diferenciado entre as fases do experimento devido a turbidez observada ao longo da realização dos mesmos. Na exposição a células íntegras, a água do aquário tornava-se aparentemente limpa no segundo dia, enquanto que na exposição ao extrato de células a água permanecia turva por um período de 3 (três) a 4 (quatro) dias. A avaliação da turbidez da água foi realizada apenas visualmente, não sendo utilizado nenhum método de dosagem de clorofila.

Apesar dos dados obtidos não corresponderem aos esperados, acreditamos que houve ingestão das células, fato comprovado pela coloração do trato gastrointestinal dos animais tratados com células íntegras, que se apresentou esverdeado em todos os sacrifícios realizados.

3.1 – Exposição de girinos de *Rana catesbeiana* ao cultivo de células de *Microcystis aeruginosa*

Para as amostras referentes aos animais controles e os em tratamento foi adotado o tempo de retenção (Tr) para o pico da [D-Leu] MCYST-LR equivalente a 3,73 minutos; enquanto que para àquelas alusivas as amostras de animais em recuperação o Tr foi de 3,26 minutos.

3.1.1 – Grupo controle

Os resultados dos experimentos com o grupo controle de girinos foram os esperados. Em todas as amostras analisadas em PDA-HPLC não foram relatados espectrogramas de absorção semelhantes de [D-Leu] MCYST-LR em frações cromatográficas no mesmo tempo de retenção da referida cianotoxina.

Seguem-se os cromatogramas referentes às amostras de fígado, músculo e TGI de animais controle, bem como o extrato do cultivo unialgal de *M. aeruginosa*. (Figura 12).

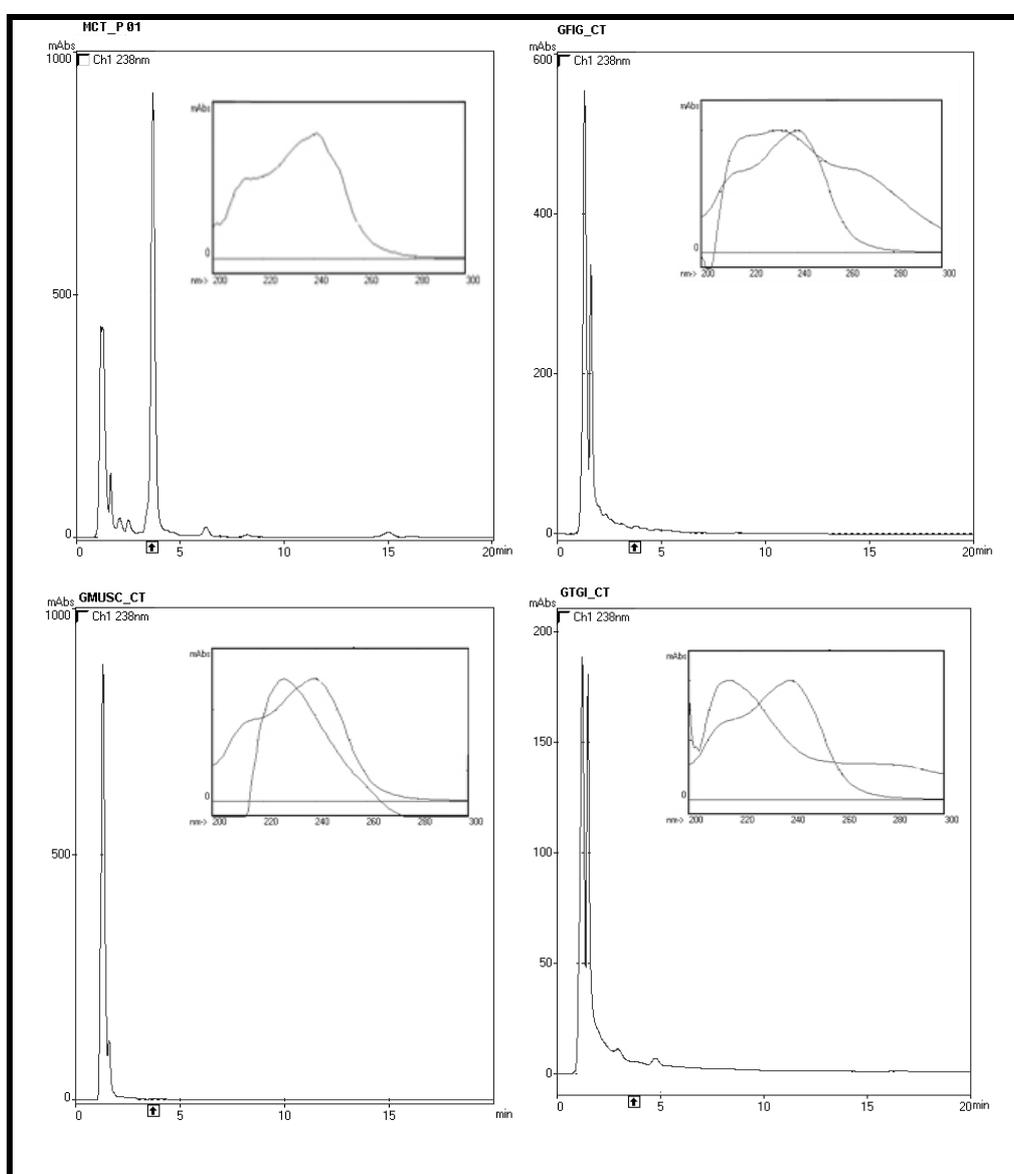


Figura 12. Cromatogramas referentes ao padrão de [D-Leu] MCYST-LR, e aos extratos de órgãos e tecidos de girinos controles referentes ao tratamento com células intactas de *M. aeruginosa*. Está sinalizado com seta no eixo X o tempo de retenção de [D-Leu] MCYST-LR e respectivos espectrogramas, MCT_P01- extrato total de cultivo, GFIG_CT- extrato de fígado, GTGI_CT- extrato de TGI, GMUSC_CT- extrato de músculo.

3.1.2 – Grupo exposto por dois dias ao cultivo de células

Os resultados experimentais referentes ao grupo de girinos expostos às células de *M. aeruginosa* por um período de 02 (dois) dias estão representados nas Figura 13.

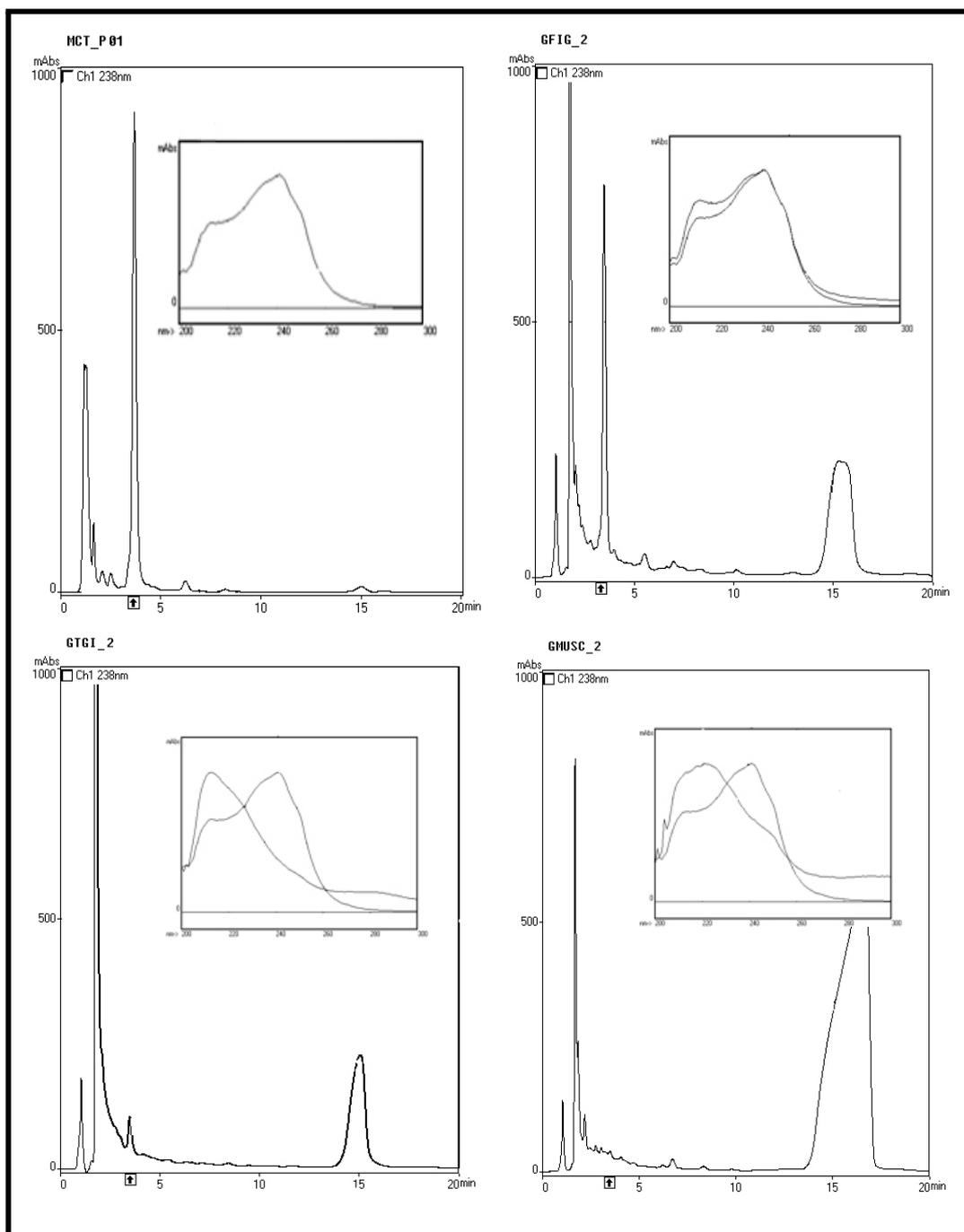


Figura 13. Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos expostos por 2 dias às células intactas de *M. aeruginosa*. Está sinalizado com seta no eixo X o tempo de retenção de [D-Leu] MCYST-LR e respectivos espectrogramas, MCT_P01- extrato total de cultivo, GFIG_2- extrato de fígado, GTGI_2- extrato de TGI, GMUSC_2- extrato de músculo.

3.1.3 – Grupo exposto por quatro dias ao cultivo de células

Os resultados experimentais referentes ao grupo de girinos expostos às células de *M. aeruginosa* por um período de 04 (quatro) dias estão representados nas Figura 14.

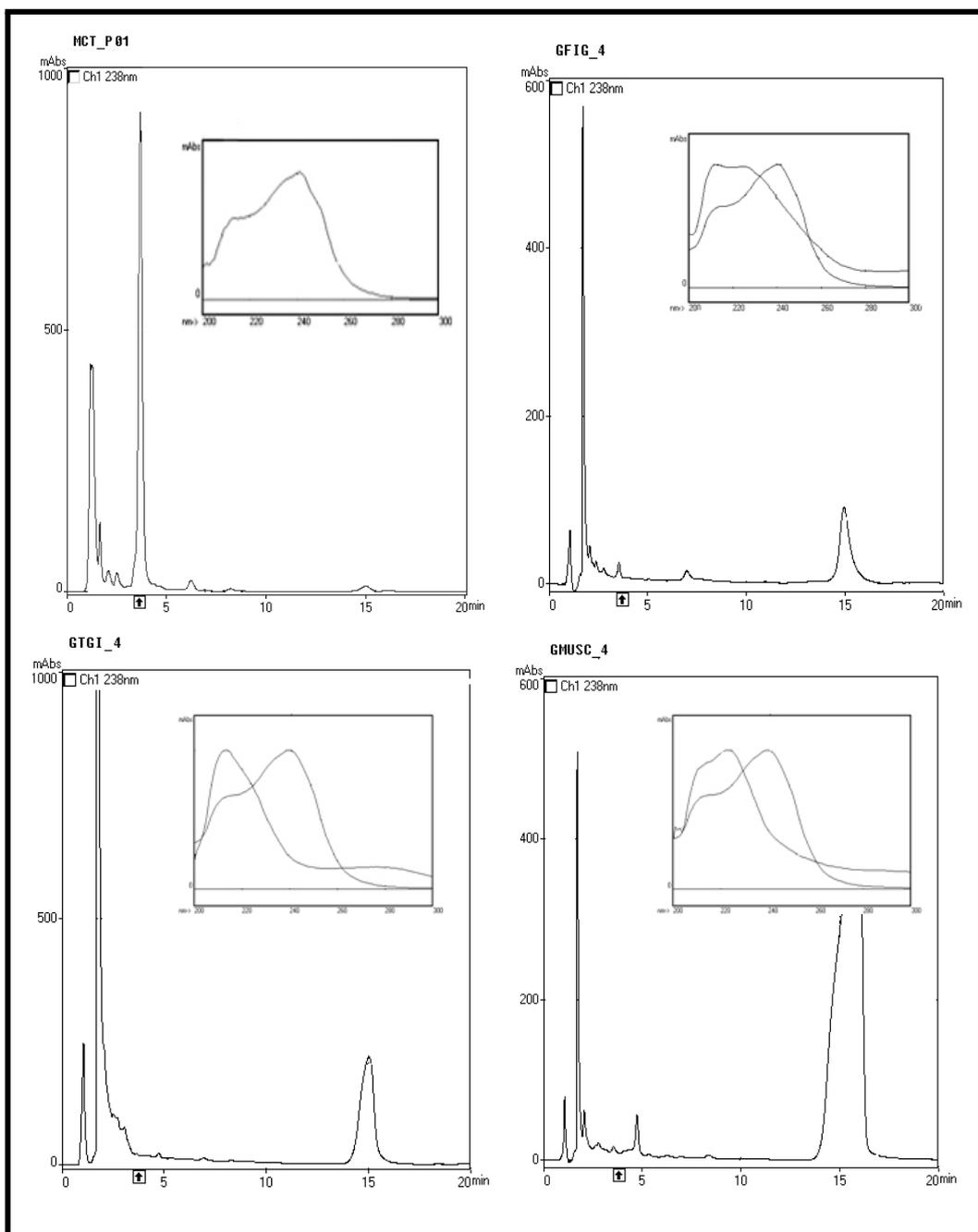


Figura 14. Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos expostos por 4 dias às células intactas de *M. aeruginosa*. Está sinalizado com seta no eixo X o tempo de retenção de [D-Leu] MCYST-LR e respectivos espectrogramas, MCT_P01- extrato total de cultivo, GFIG_4- extrato de fígado, GTGI_4- extrato de TGI, GMUSC_4- extrato de músculo.

3.1.4 – Grupo exposto por seis dias ao cultivo de células

Os resultados experimentais referentes ao grupo de girinos expostos às células de *M. aeruginosa* por um período de 06 (seis) dias estão representados nas Figura 15.

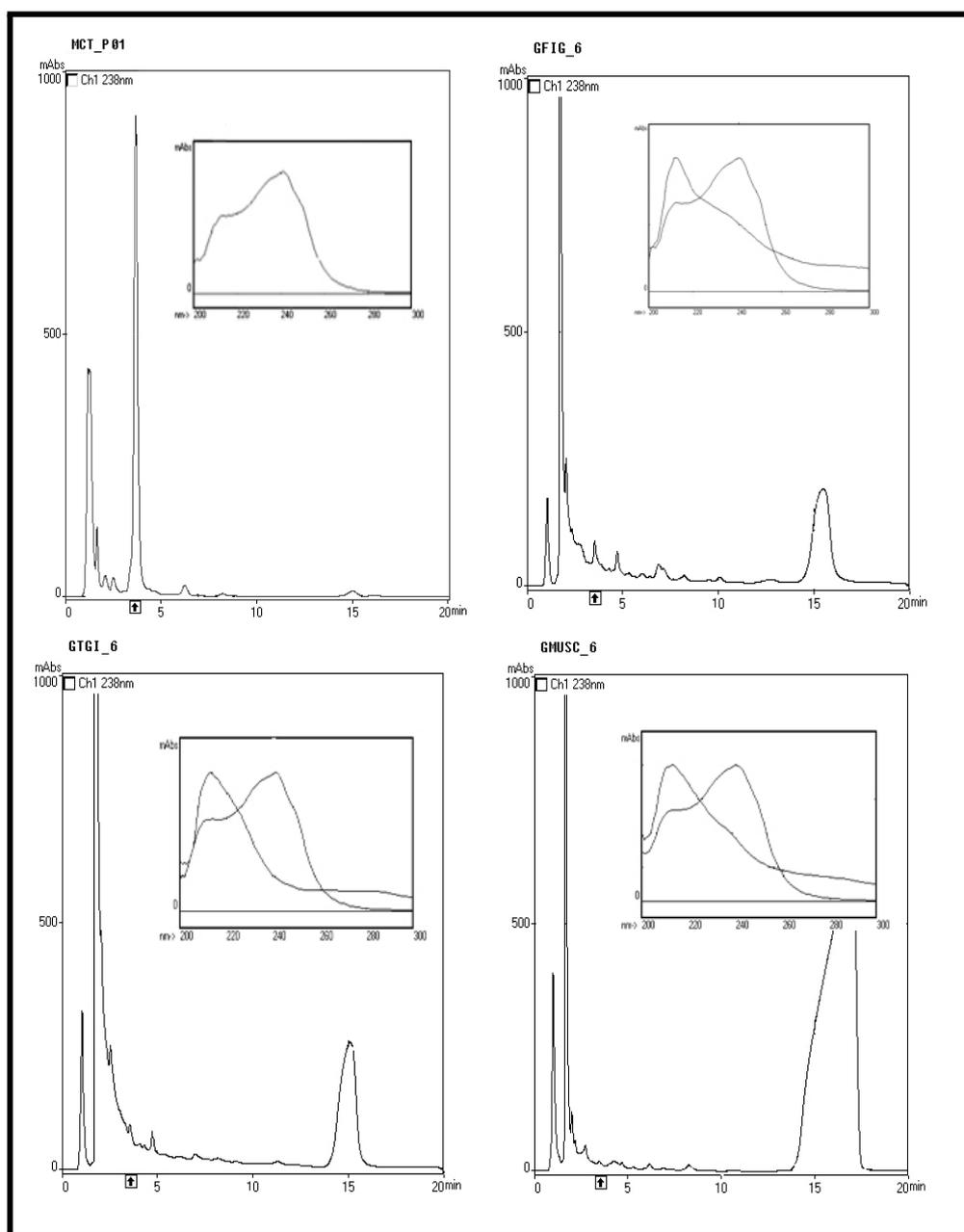


Figura 15. Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos expostos por 6 dias às células intactas de *M. aeruginosa*. Está sinalizado com seta no eixo X o tempo de retenção de [D-Leu] MCVYST-LR e respectivos espectrogramas, MCT_P01- extrato total de cultivo, GFIG_6- extrato de fígado, GTGI_6- extrato de TGI, GMUSC_6- extrato de músculo.

3.1.5 – Grupo exposto por oito dias ao cultivo de células

Os resultados experimentais referentes ao grupo de girinos expostos às células *M. aeruginosa* por um período de 08 (oito) dias estão representados na Figura 16.

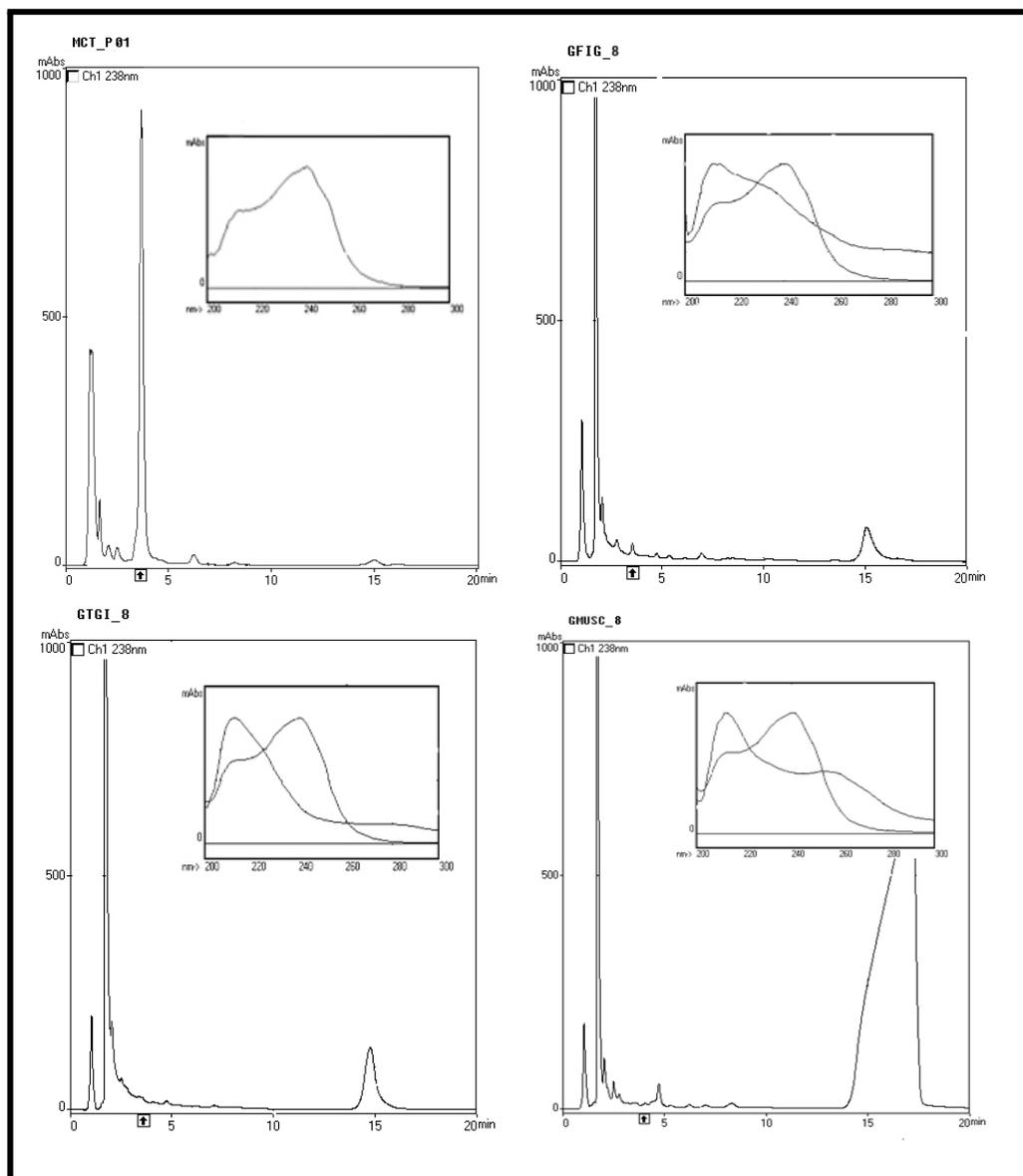


Figura 16. Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos expostos por 8 dias às células intactas de *M. aeruginosa*. Está sinalizado com seta no eixo X o tempo de retenção de [D-Leu] MCYST-LR e respectivos espectrogramas, MCT_P01- extrato total de cultivo, GFIG_8- extrato de fígado, GTGI_8-extrato de TGI, GMUSC_8- extrato de músculo.

3.1.6 – Grupo exposto por 10 dias ao cultivo de células

Os resultados experimentais referentes ao grupo de girinos expostos às células de *M. aeruginosa* por um período de 10 dias estão representados na Figura 17.

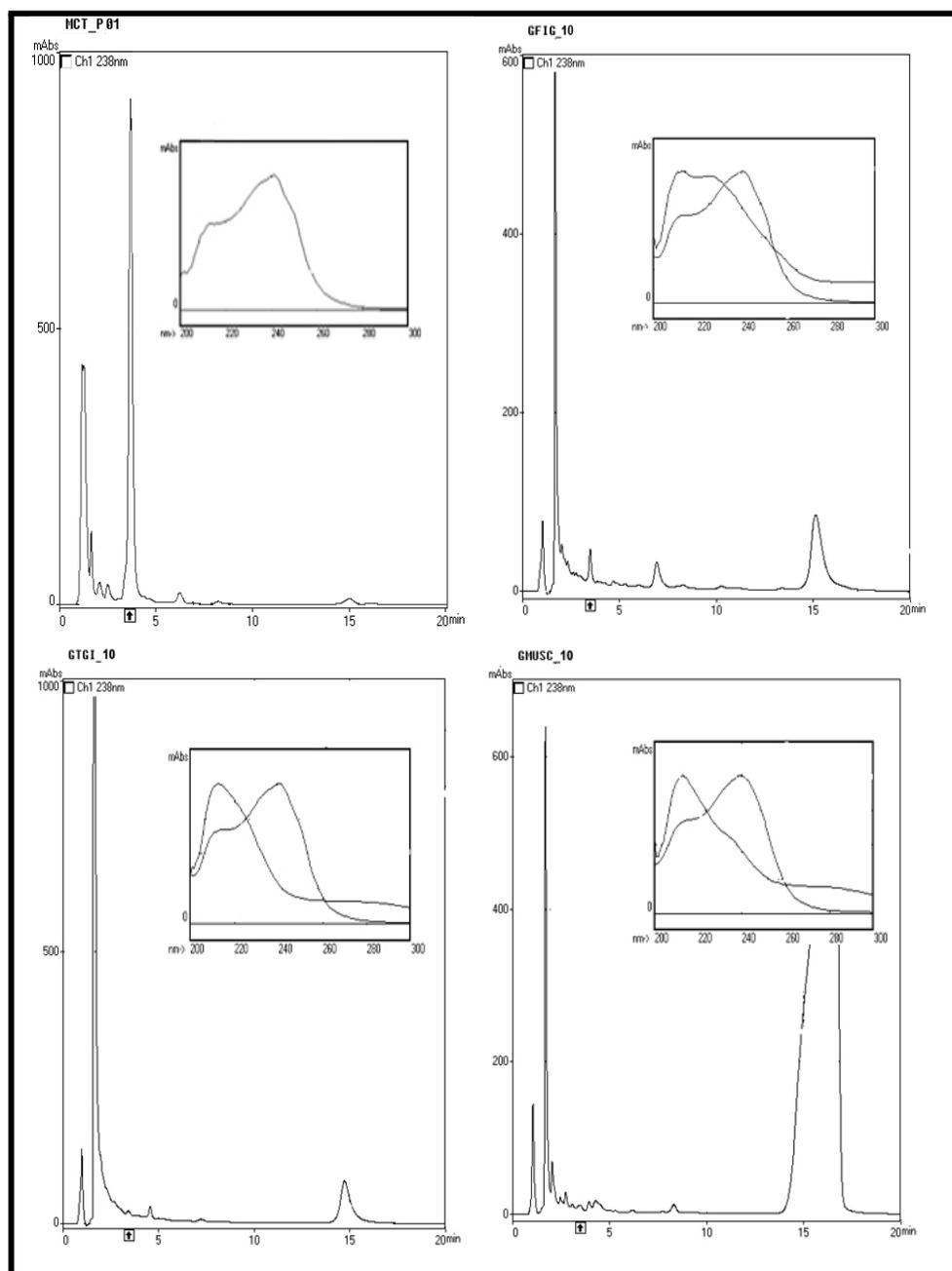


Figura 17. Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos expostos por 10 dias às células intactas de *M. aeruginosa*. Está sinalizado com seta no eixo X o tempo de retenção de [D-Leu] MCYST-LR e respectivos espectrogramas, MCT_P01- extrato total de cultivo, GFIG_10- extrato de fígado, GTGI_10-extrato de TGI, GMUSC_10- extrato de músculo.

3.1.7 – Grupo sem exposição às células por dois dias

Os resultados referentes ao grupo submetido a regeneração após 02 (dois) dias sem exposição às células estão representados na Figura 18.

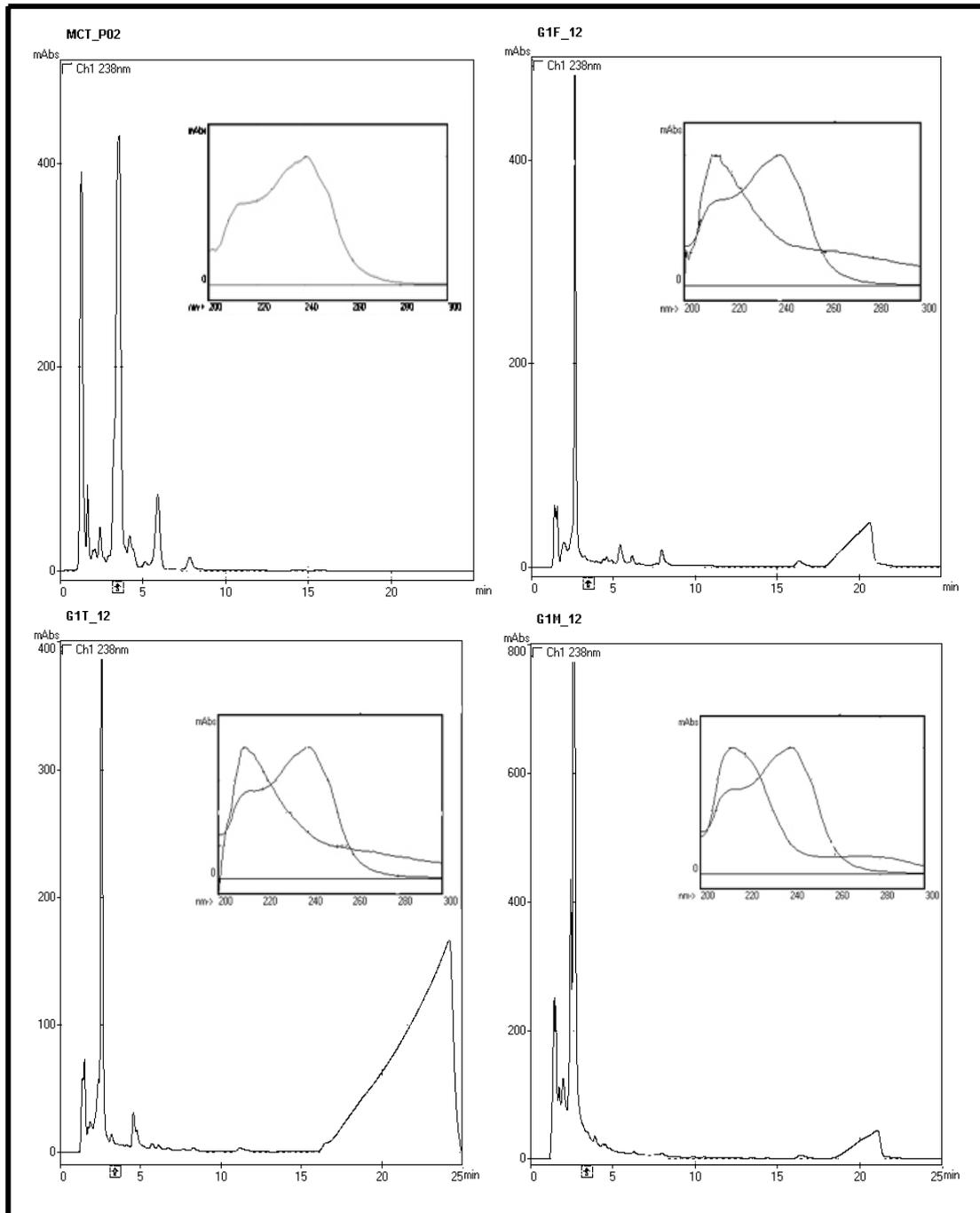


Figura 18. Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos após 2 dias sem exposição às células intactas de *M. aeruginosa*. Está sinalizado com seta no eixo X o tempo de retenção de [D-Leu] MCYST-LR e respectivos espectrogramas, MCT_P02- extrato total de cultivo, G1F_12- extrato de fígado, G1T_12- extrato de TGI, G1M_12- extrato de músculo.

3.1.8 – Grupo sem exposição às células por quatro dias

Os resultados experimentais referentes ao grupo observado por 04 (quatro) dias sem exposição às células estão representados na Figura 19.

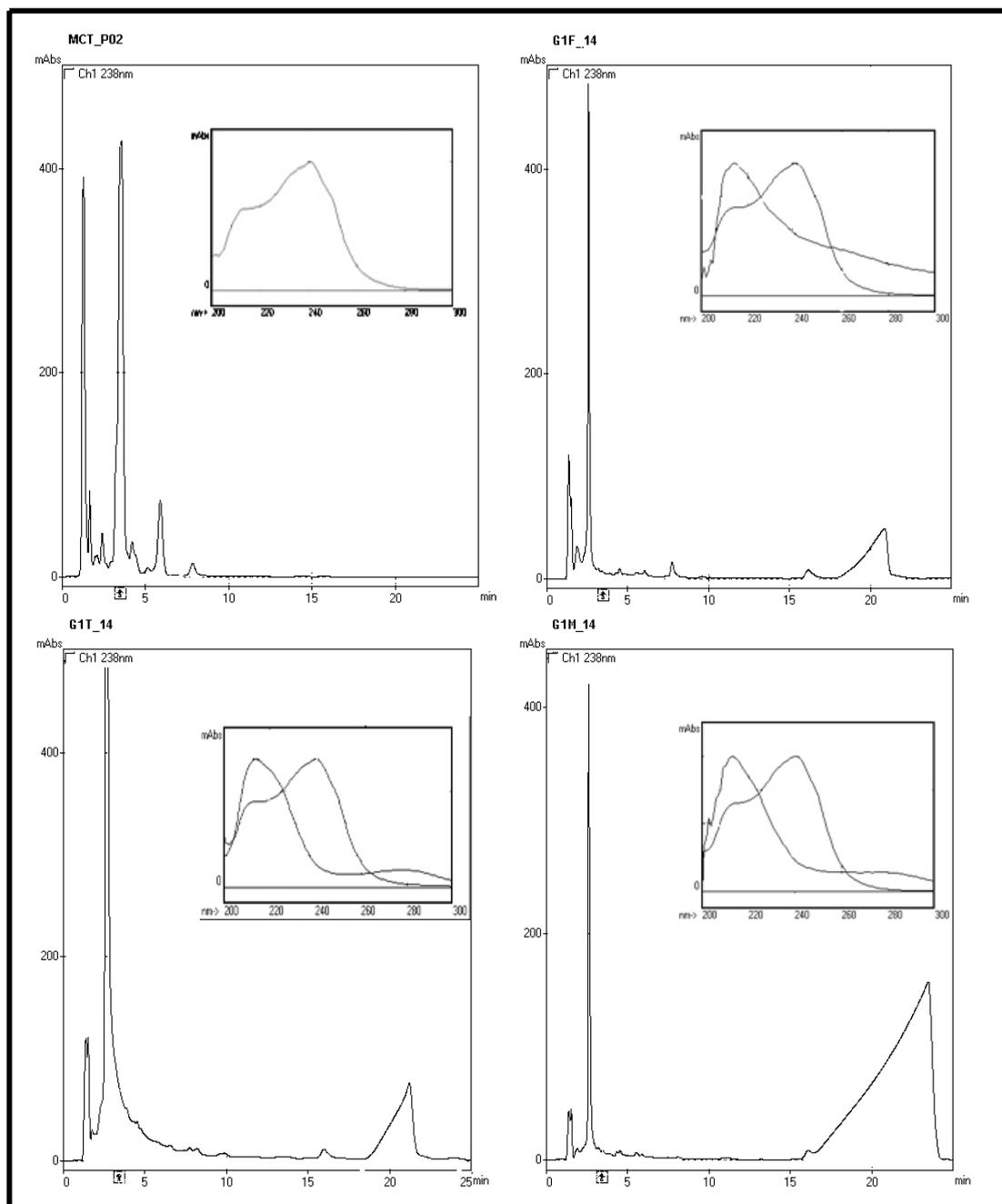


Figura 19. Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos após 4 dias sem exposição às células intactas de *M. aeruginosa*. Está sinalizado com seta no eixo X o tempo de retenção de [D-Leu] MCYST-LR e respectivos espectrogramas, MCT_P02- extrato total de cultivo, G1F_14- extrato de fígado, G1T_14- extrato de TGI, G1M_14- extrato de músculo.

3.1.9 – Grupo sem exposição às células por seis dias

Os resultados experimentais referentes ao grupo observado por 06 (seis) dias sem exposição às células estão representados na Figura 20.

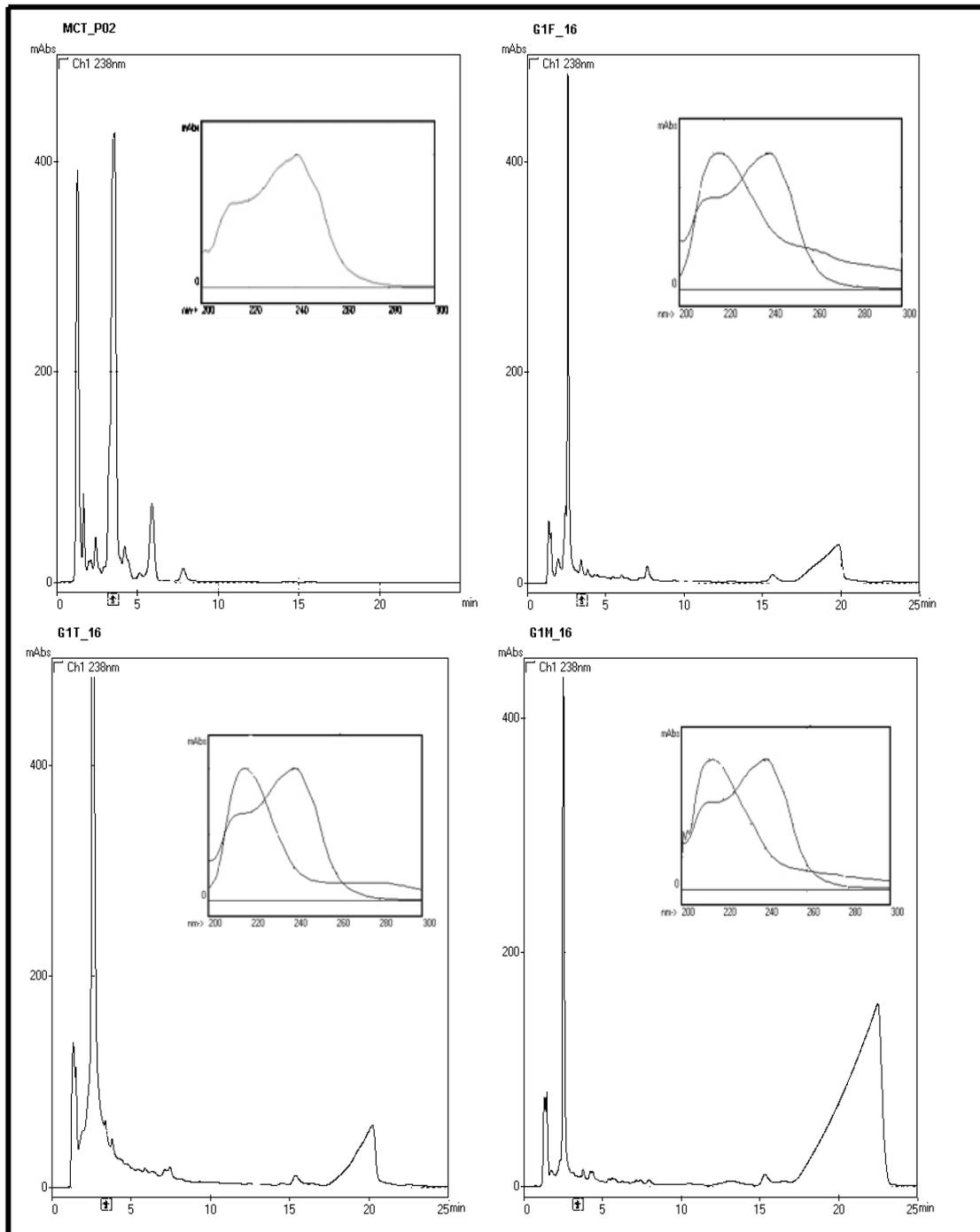


Figura 20. Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos após 6 dias sem exposição às células intactas de *M. aeruginosa*. Está sinalizado com seta no eixo X o tempo de retenção de [D-Leu] MCYST-LR e respectivos espectrogramas, MCT_P02- extrato total de cultivo, G1F_16- extrato de fígado, G1T_16- extrato de TGI, G1M_16- extrato de músculo.

3.1.10 – Grupo sem exposição às células por oito dias

Os resultados experimentais referentes ao grupo observado por 08 (oito) dias sem exposição às células estão representados na Figura 21.

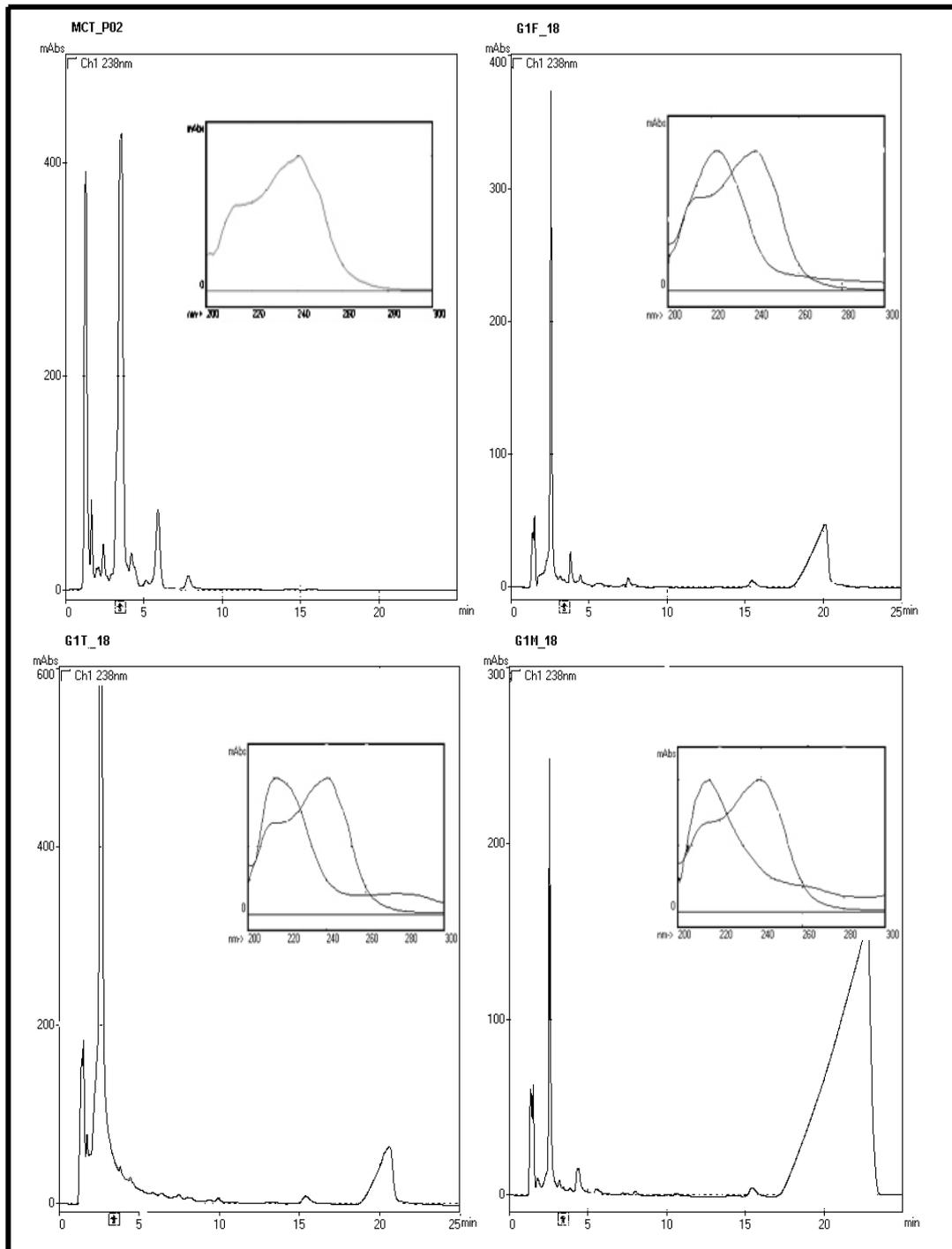


Figura 21. Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos após 8 dias sem exposição às células intactas de *M. aeruginosa*. Está sinalizado com seta no eixo X o tempo de retenção de [D-Leu] MCYST-LR e respectivos espectrogramas, MCT_P02- extrato total de cultivo, G1F_18- extrato de fígado, G1T_18- extrato de TGI, G1M_18- extrato de músculo.

3.1.11 – Grupo sem exposição às células por 10 dias

Os resultados experimentais referentes ao grupo observado por 10 dias sem exposição às células estão representados na Figura 22.

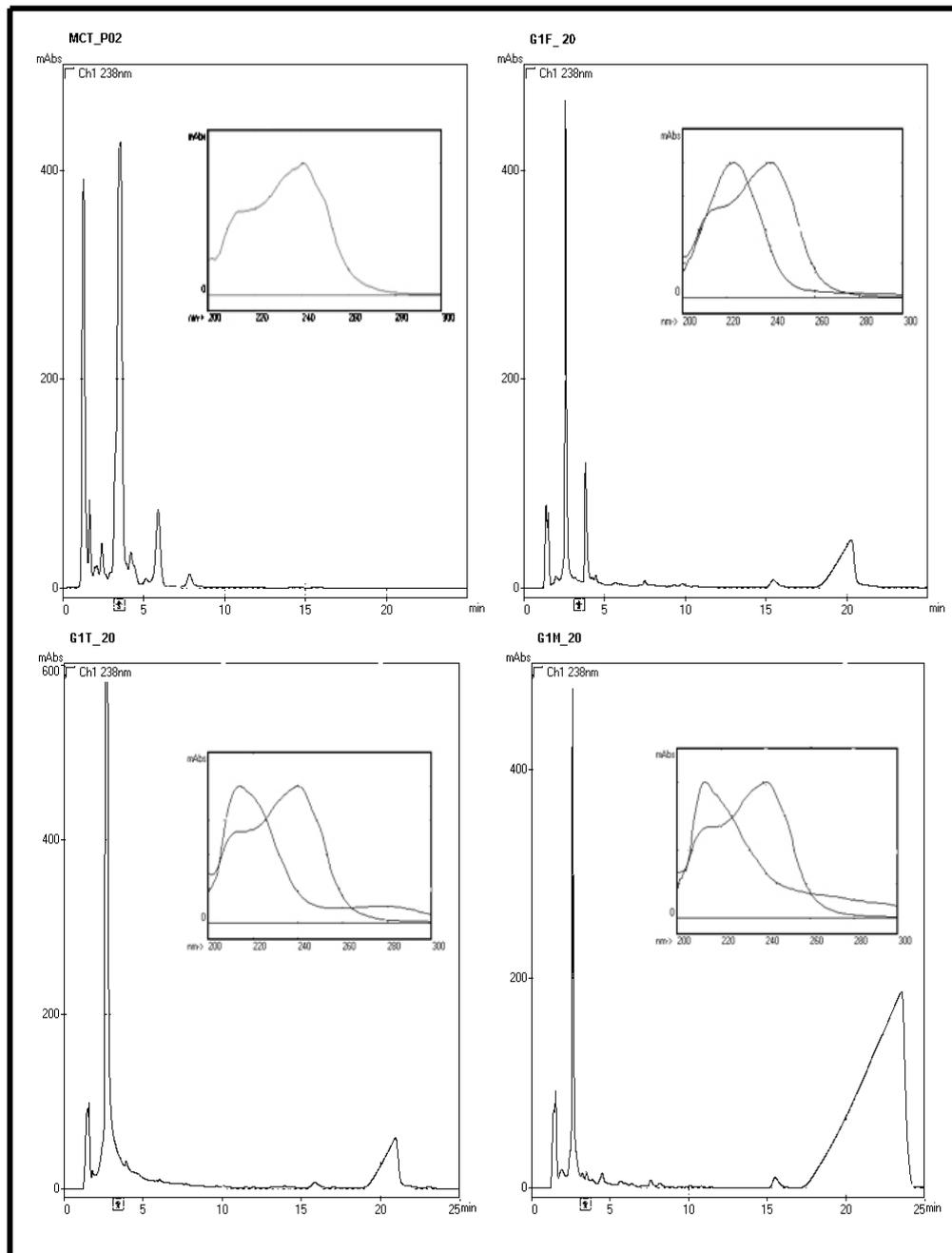


Figura 22. Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos após 10 dias sem exposição às células intactas de *M. aeruginosa*. Está sinalizado com seta no eixo X o tempo de retenção de [D-Leu] MCYST-LR e respectivos espectrogramas, MCT_P02- extrato total de cultivo, G1F_20- extrato de fígado, G1T_20- extrato de TGI, G1M_20- extrato de músculo.

Apesar de apresentar frações cromatográficas no mesmo tempo de retenção do padrão de [D-Leu] MCYST-LR, os espectrogramas de absorção na faixa de 200-300nm não apresentaram similaridade satisfatória.

Foi detectada a presença de [D-Leu] MCYST-LR apenas no extrato de fígado com exposição de 2 (dois) dias, como é evidenciado pela superposição dos espectrogramas de absorção na faixa de detalhe da Figura 13 (G-FIG2).

Todas as demais frações cromatográficas que apresentaram o mesmo Tr que [D-Leu] MCYST-LR, porém sem similaridade com o espectrograma de absorção, foram considerados negativos quanto à presença de [D-Leu] MCYST-LR.

3.2 – Exposição de girinos de *Rana catesbeiana* ao extrato de *Microcystis aeruginosa*

Para as amostras referentes aos animais controles, aos em tratamento e àqueles em recuperação foi adotado o tempo de retenção (Tr) para o pico da [D-Leu] MCYST-LR equivalente a 3,78 minutos.

3.2.1 – Grupo controle

Os resultados dos experimentos com o grupo controle de girinos foram os esperados. Em todas as amostras analisadas em PDA-HPLC não foram relatados espectrogramas semelhantes ao de [D-Leu] MCYST-LR em frações cromatográficas no mesmo tempo de retenção da referida cianotoxina.

Seguem-se os cromatogramas referentes às amostras de fígado, músculo e TGI de animais controle, bem como o extrato do cultivo unialgal de *M. aeruginosa*. (Figura 23).

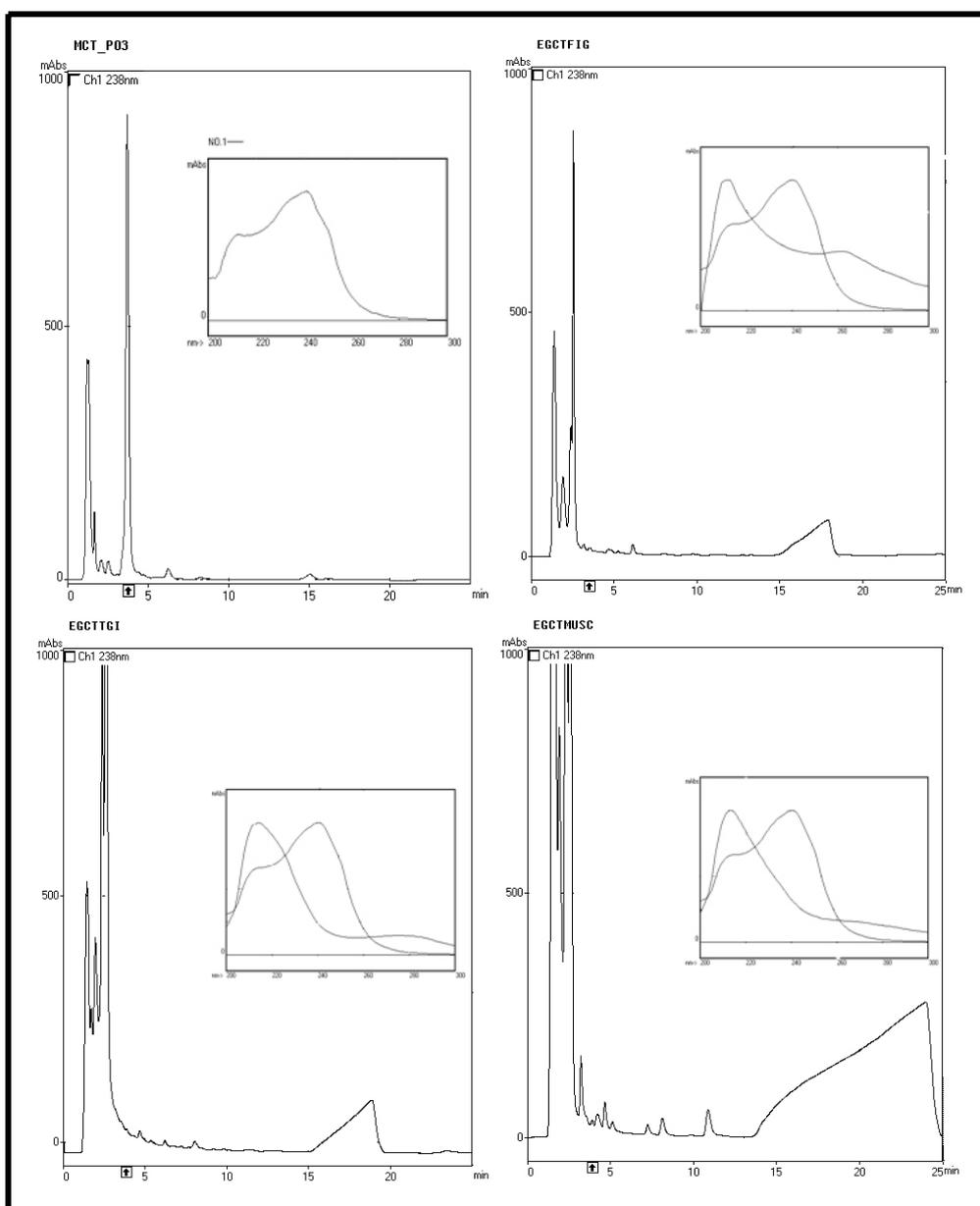


Figura 23. Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos controles. Evidenciado com uma seta no eixo X o tempo de retenção de [D-Leu] MCYST-LR. Em detalhe estão representados os respectivos espectrogramas. MCT_P03- extrato total de cultivo, EGCTFIG- extrato de fígado, EGCTTGI- extrato de TGI, EGCTMUSC- extrato de músculo.

3.2.2 – Grupo exposto por três dias ao extrato de células

Os resultados experimentais referentes ao grupo de girinos tratado com extrato de células de *M. aeruginosa* por um período de 03 (três) dias estão representados nas Figura 24.

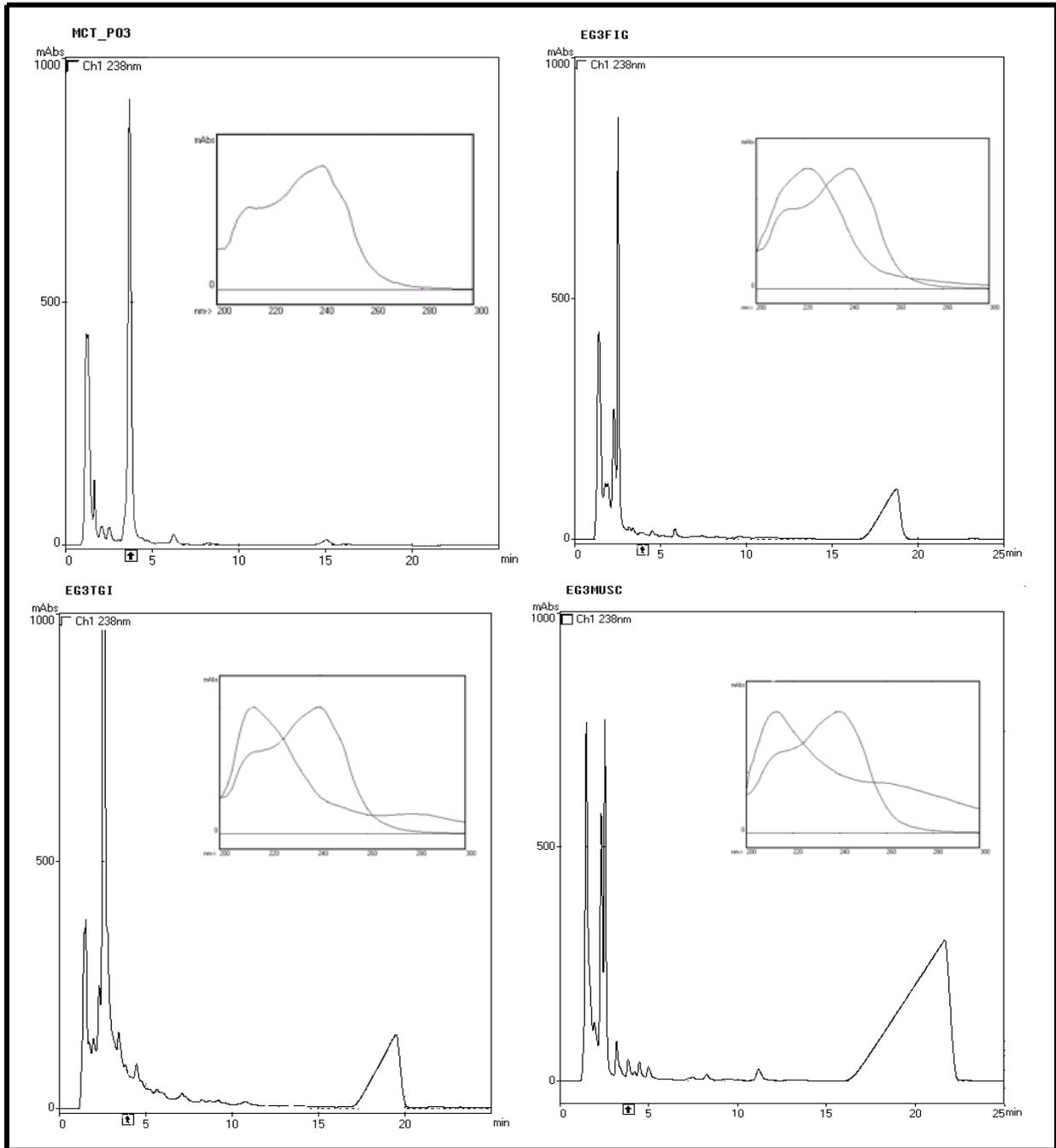


Figura 24. Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos tratados por 3 dias com extrato de *Microcystis aeruginosa*. Evidenciado com uma seta no eixo X o tempo de retenção de [D-Leu] MCYST-LR. Em detalhe estão representados os respectivos espectrogramas. MCT_P03- extrato total de cultivo, EG3FIG- extrato de fígado, EG3TGI- extrato de TGI, EG3MUSC- extrato de músculo.

3.2.3 – Grupo exposto por seis dias ao extrato de células

Os resultados experimentais referentes ao grupo de girinos tratado com extrato de células de *M. aeruginosa* por um período de 06 (seis) dias estão representados nas Figura 25

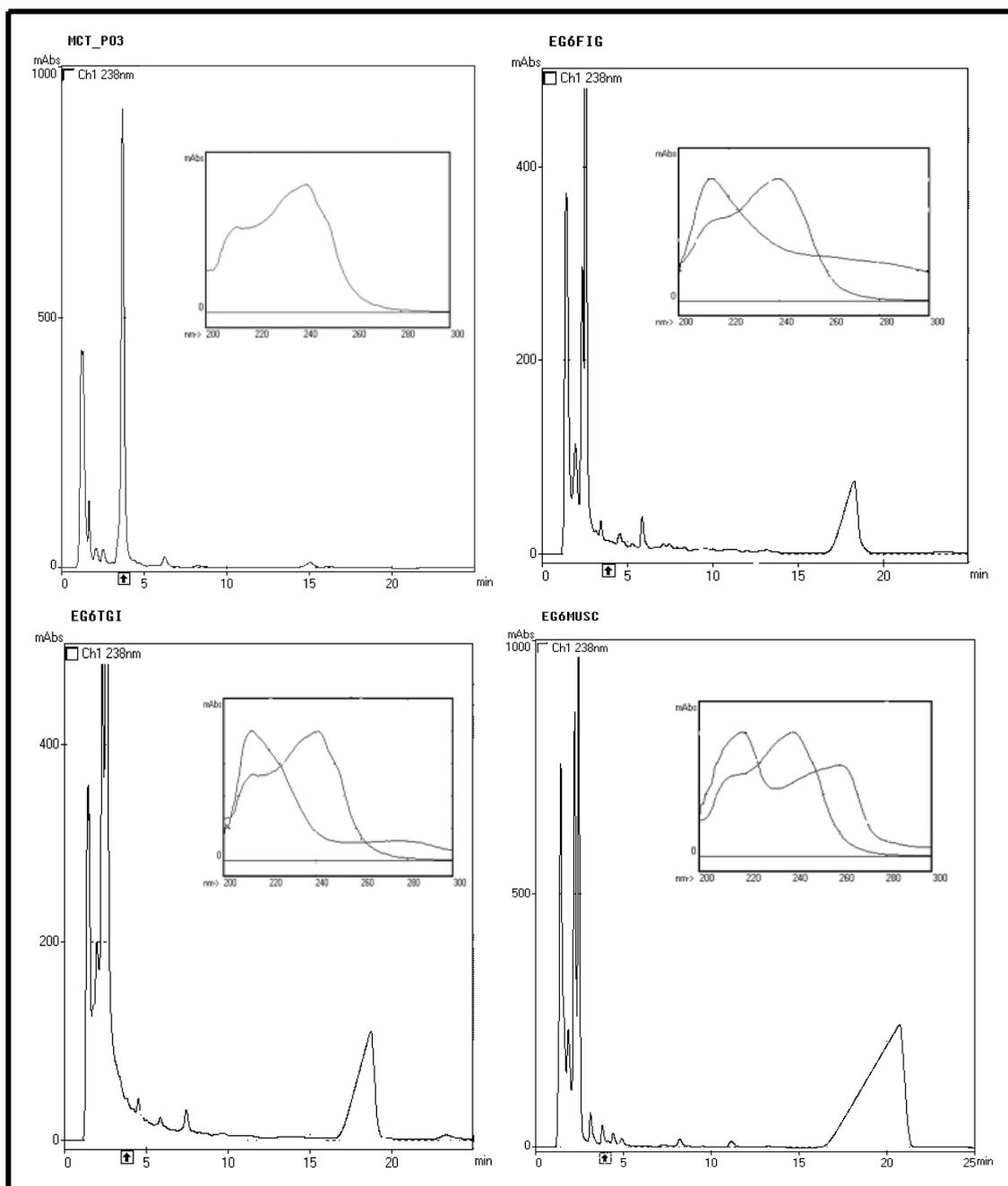


Figura 25. Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos tratados por 6 dias com extrato de *M. aeruginosa*. Evidenciado com uma seta no eixo X o tempo de retenção de [D-Leu] MCVYST-LR. Em detalhe estão representados os respectivos espectrogramas. MCT_P03- extrato total de cultivo, EG6FIG- extrato de fígado, EG6TGI- extrato de TGI, EG6MUSC- extrato de músculo.

3.2.4 – Grupo exposto por nove dias ao extrato de células

Os resultados experimentais referentes ao grupo de girinos tratado com extrato de células de *M. aeruginosa* por um período de 09 (nove) dias estão representados nas Figura 26.

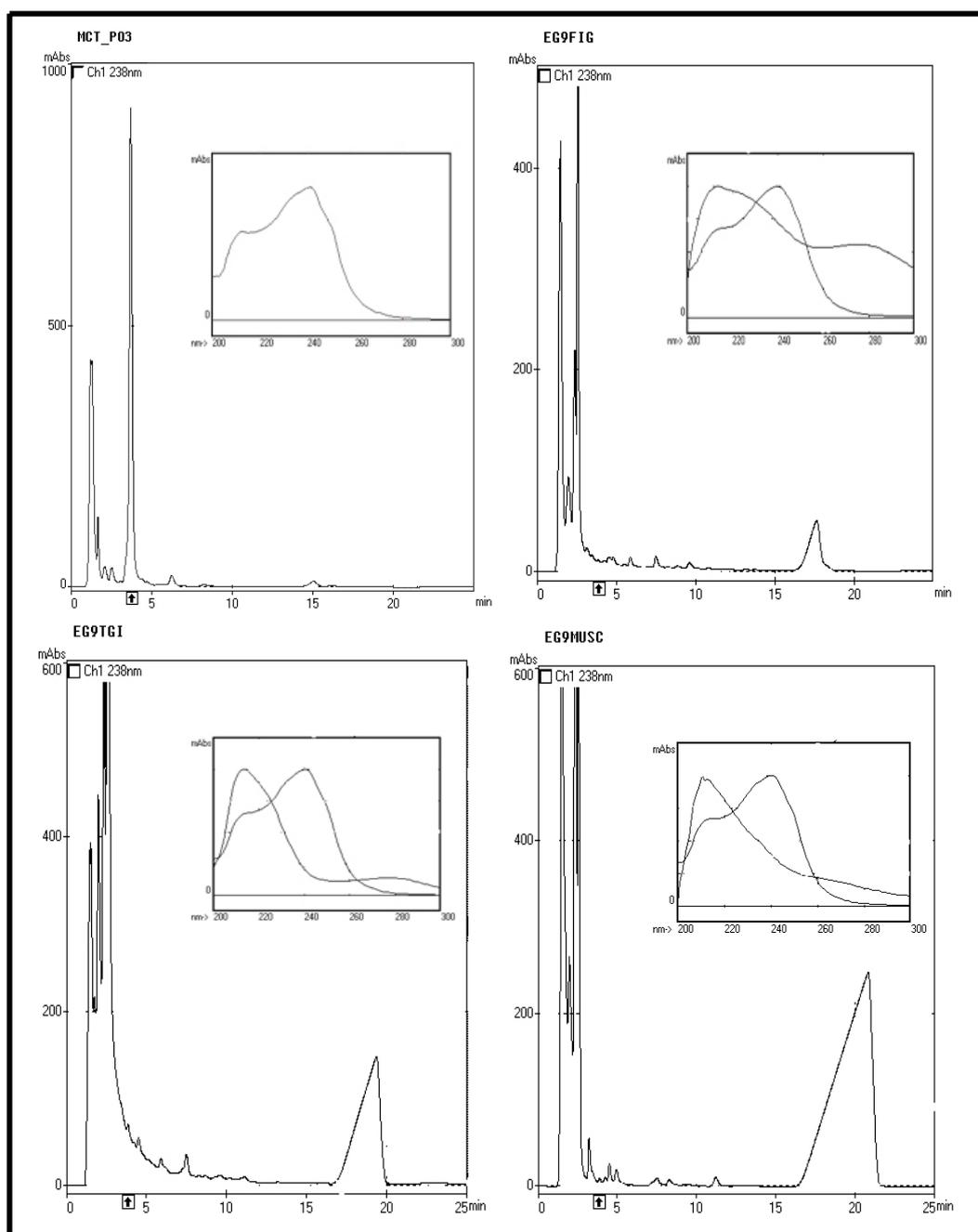


Figura 26. Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos tratados por 9 dias com extrato de *M. aeruginosa*. Evidenciado com uma seta no eixo X o tempo de retenção de [D-Leu] MCYST-LR. Em detalhe estão representados os respectivos espectrogramas. MCT_P03- extrato total de cultivo, EG9FIG- extrato de fígado, EG9TGI- extrato de TGI, EG9MUSC- extrato de músculo.

3.2.5 – Grupo exposto por 12 dias ao extrato de células

Os resultados experimentais referentes ao grupo de girinos tratado com extrato de células de *M. aeruginosa* por um período de 12 dias estão representados nas Figura 27.

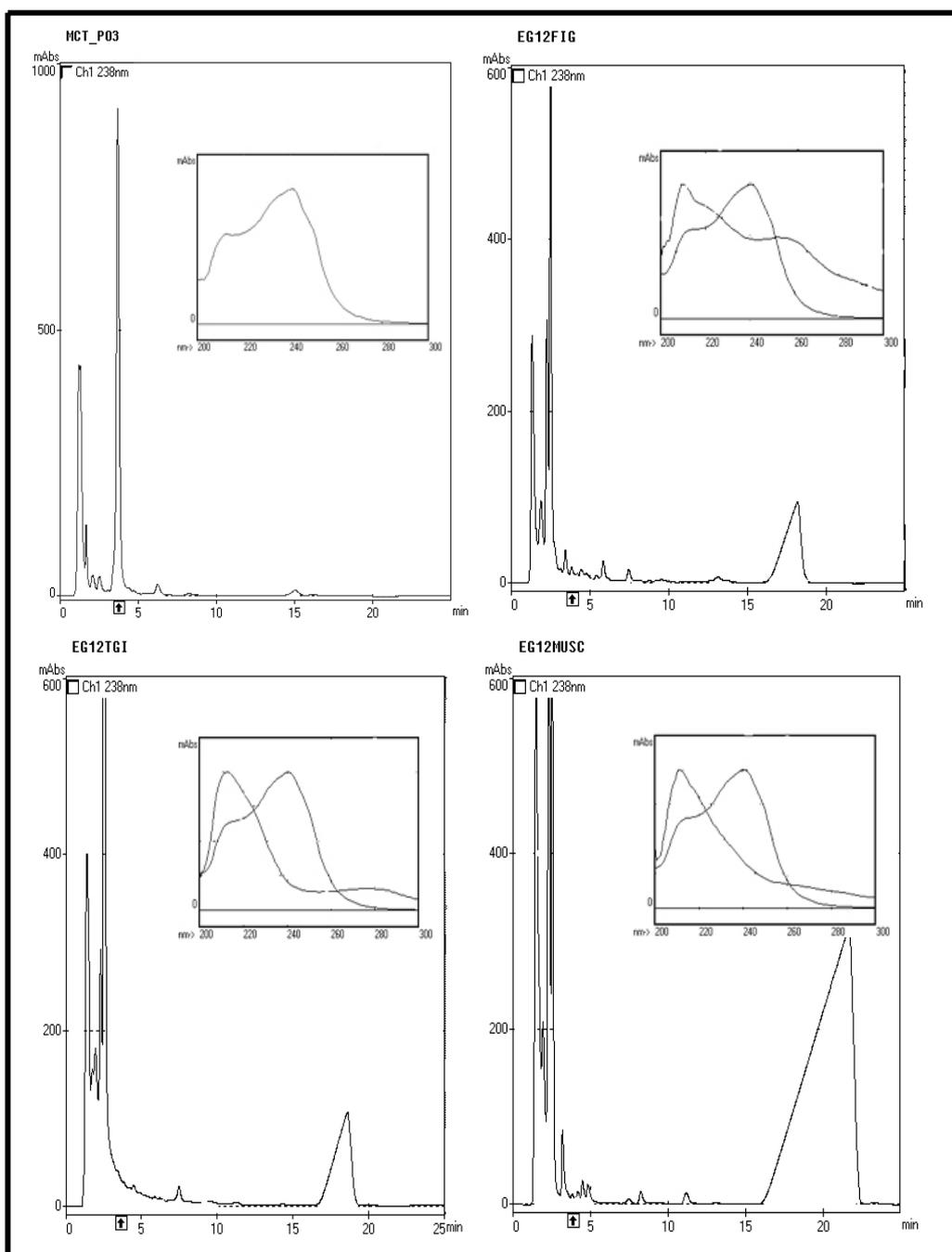


Figura 27. Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos tratados por 12 dias com extrato de *M. aeruginosa*. Evidenciado com uma seta no eixo X o tempo de retenção de [D-Leu] MCYST-LR. Em detalhe estão representados os respectivos espectrogramas. MCT_P03- extrato total de cultivo, EG12FIG- extrato de fígado, EG12TGI- extrato de TGI, EG12MUSC- extrato de músculo.

3.2.6 – Grupo exposto por 15 dias ao extrato de células

Os resultados experimentais referentes ao grupo de girinos tratado com extrato de células de *M. aeruginosa* por um período de 15 dias estão representados nas Figura 28.

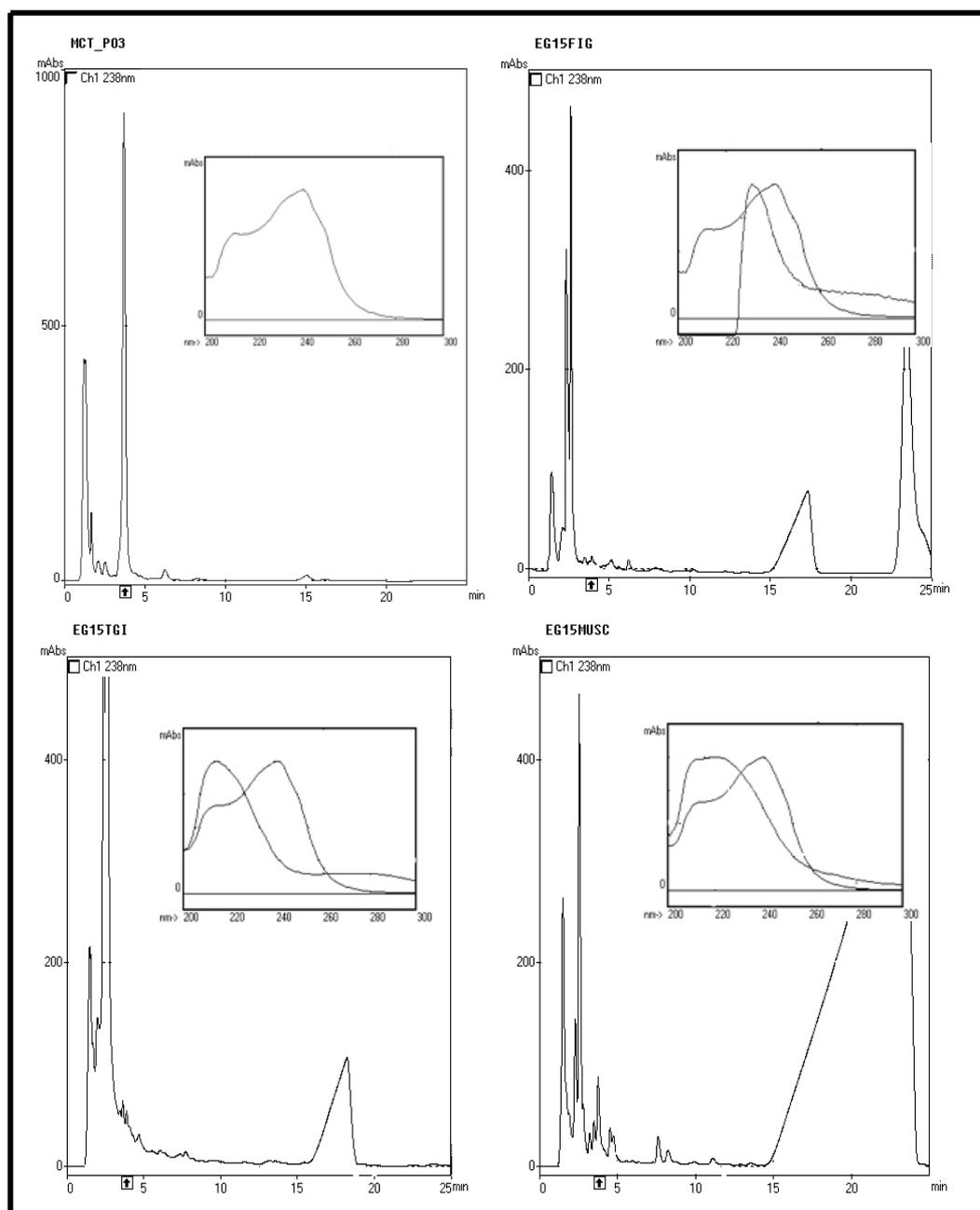


Figura 28. Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos tratados por 15 dias com extrato de *M. aeruginosa*. Evidenciado com uma seta no eixo X o tempo de retenção de [D-Leu] MCYST-LR. Em detalhe estão representados os respectivos espectrogramas MCT_P03- extrato total de cultivo, EG15FIG- extrato de fígado, EG15TGI- extrato de TGI, EG15MUSC- extrato de músculo.

3.2.7 – Grupo sem exposição ao extrato de células por três dias

Os resultados experimentais referentes ao grupo submetido a regeneração após 03 (três) dias sem exposição ao extrato de células estão representadoa Figura 29.

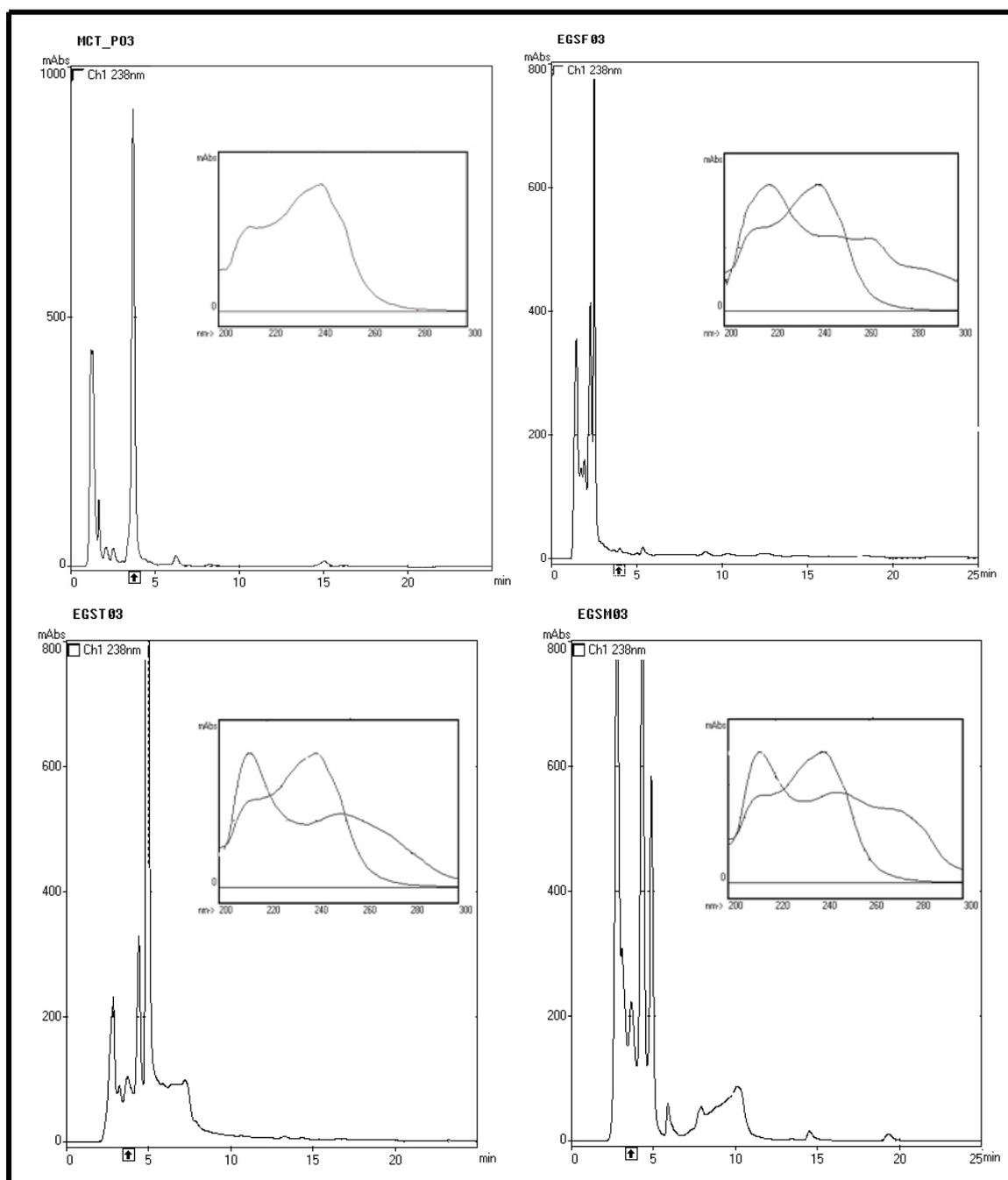


Figura 29. Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos após 3 dias sem exposição ao extrato de *M. aeruginosa*. Evidenciado com uma seta no eixo X o tempo de retenção de [D-Leu] MCYST-LR. Em detalhe estão representados os respectivos espectrogramas. MCT_P03- extrato total de cultivo, EGSF03- extrato de fígado, EGST03-extrato de TGI, EGSM03- extrato de músculo.

3.2.8– Grupo sem exposição extrato de células por seis dias

Os resultados experimentais referentes ao grupo observado por 06 (seis) dias sem exposição ao extrato de células estão representados na Figura 30.

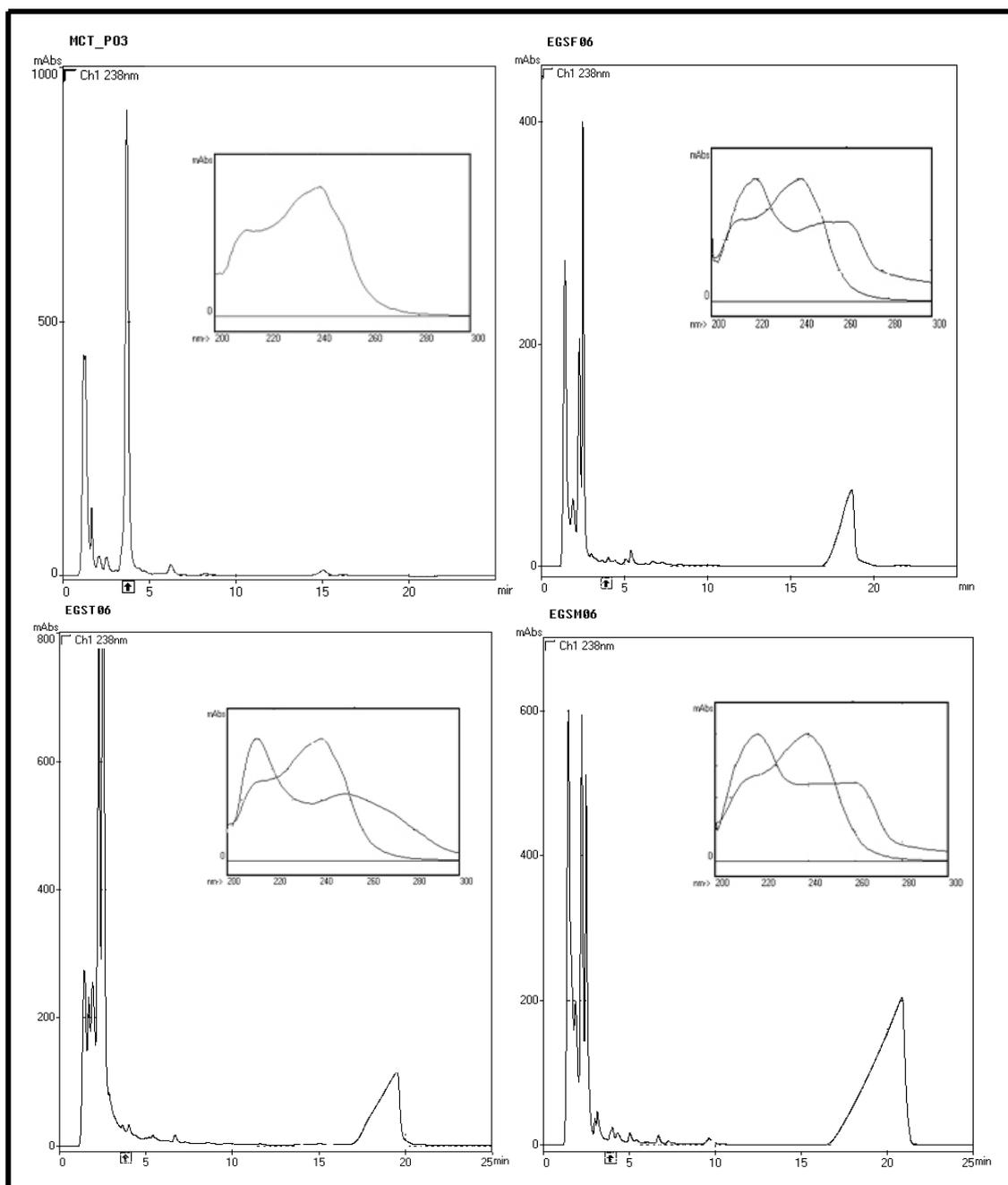


Figura 30. Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos após 6 dias sem exposição ao extrato de *M. aeruginosa*. Evidenciado com uma seta no eixo X o tempo de retenção de [D-Leu] MCYST-LR. Em detalhe estão representados os respectivos espectrogramas. MCT_P03- extrato total de cultivo, EGSF06- extrato de fígado, EGST06-extrato de TGI, EGSM06- extrato de músculo.

3.2.9 – Grupo sem exposição ao extrato de células por nove dias

Os resultados experimentais referentes ao grupo observado por 09 (nove) dias sem exposição ao extrato de células estão representados na Figura 31.

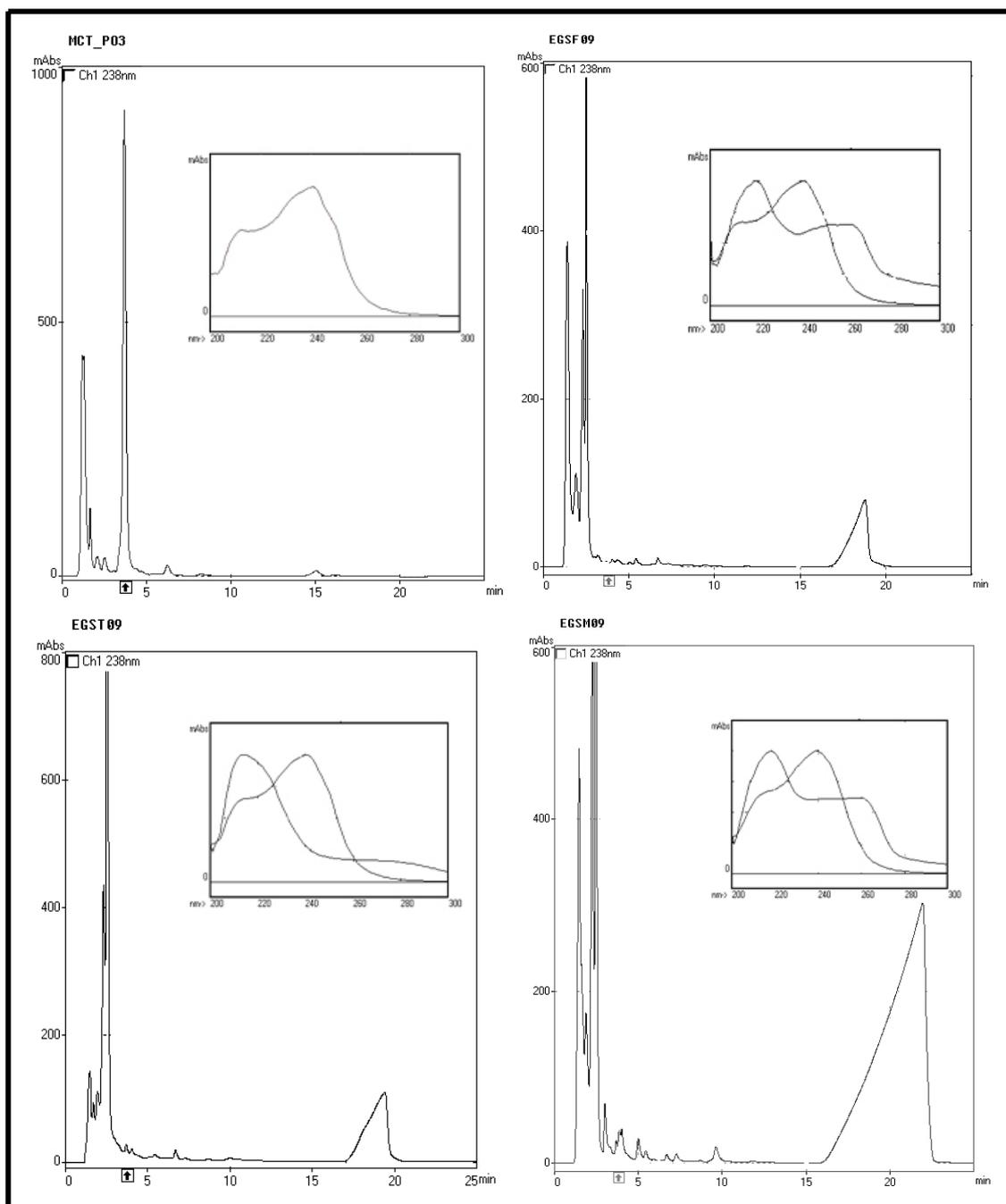


Figura 31. Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos após 9 dias sem exposição ao extrato de *M. aeruginosa*. Evidenciado com uma seta no eixo X o tempo de retenção de [D-Leu] MCVST-LR. Em detalhe estão representados os respectivos espectrogramas. MCT_P03- extrato total de cultivo, EGSF09- extrato de fígado, EGST09- extrato de TGI, EGSM09- extrato de músculo.

3.2.10 – Grupo sem exposição extrato de células por 12 dias

Os resultados experimentais referentes ao grupo observado por 12 dias sem exposição ao extrato de células estão representados na Figura 32.

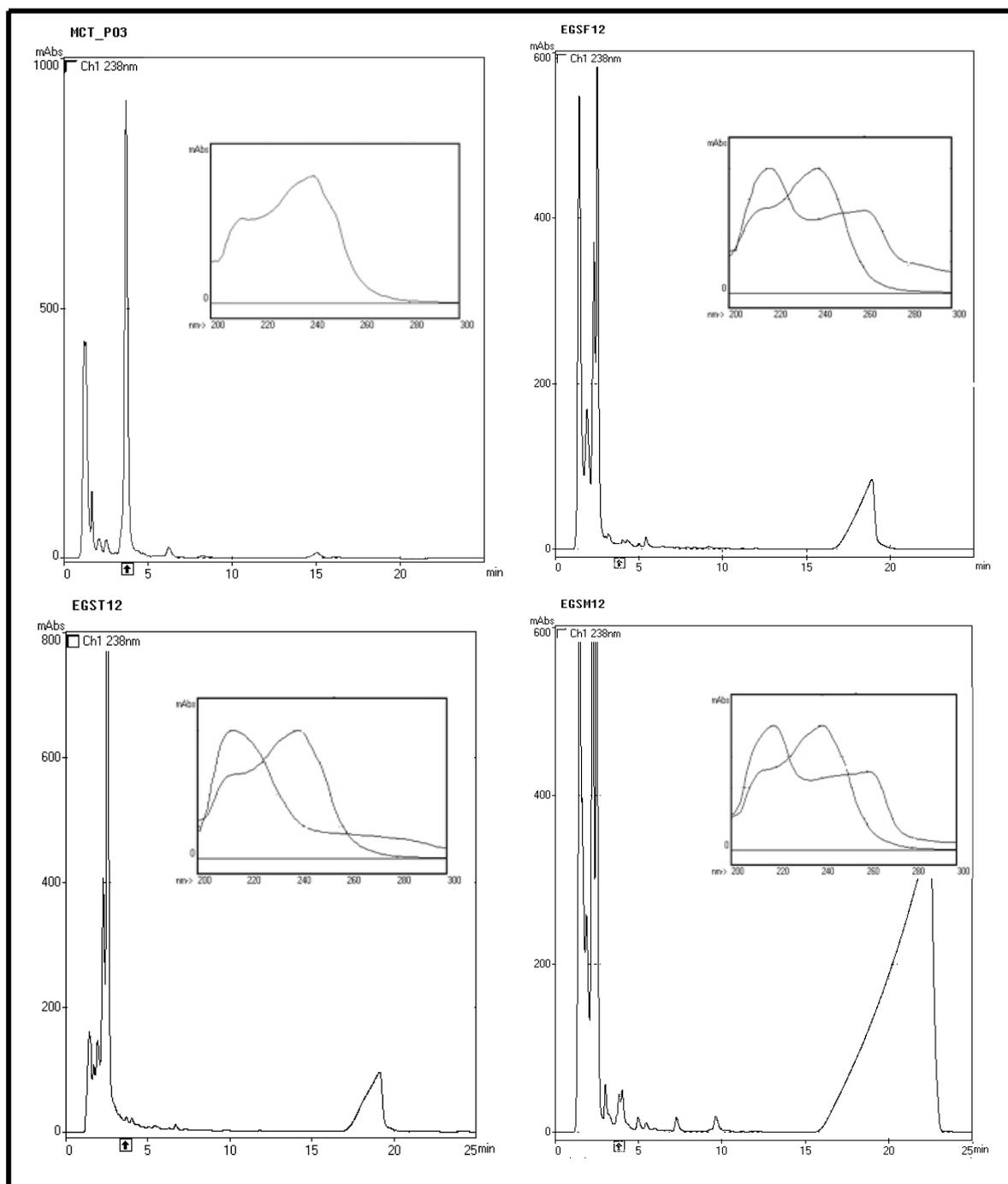


Figura 32. Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos após 12 dias sem exposição ao extrato de *M. aeruginosa*. Evidenciado com uma seta no eixo X o tempo de retenção de [D-Leu] MCVYST-LR. Em detalhe estão representados os respectivos espectrogramas. MCT_P03- extrato total de cultivo, EGSF12- extrato de fígado, EGST12-extrato de TGI, EGSM12- extrato de músculo.

3.2.11 – Grupo sem exposição extrato de células por 15 dias

Os resultados experimentais referentes ao grupo observado por 15 dias sem exposição ao extrato de células estão representados na Figura 33.

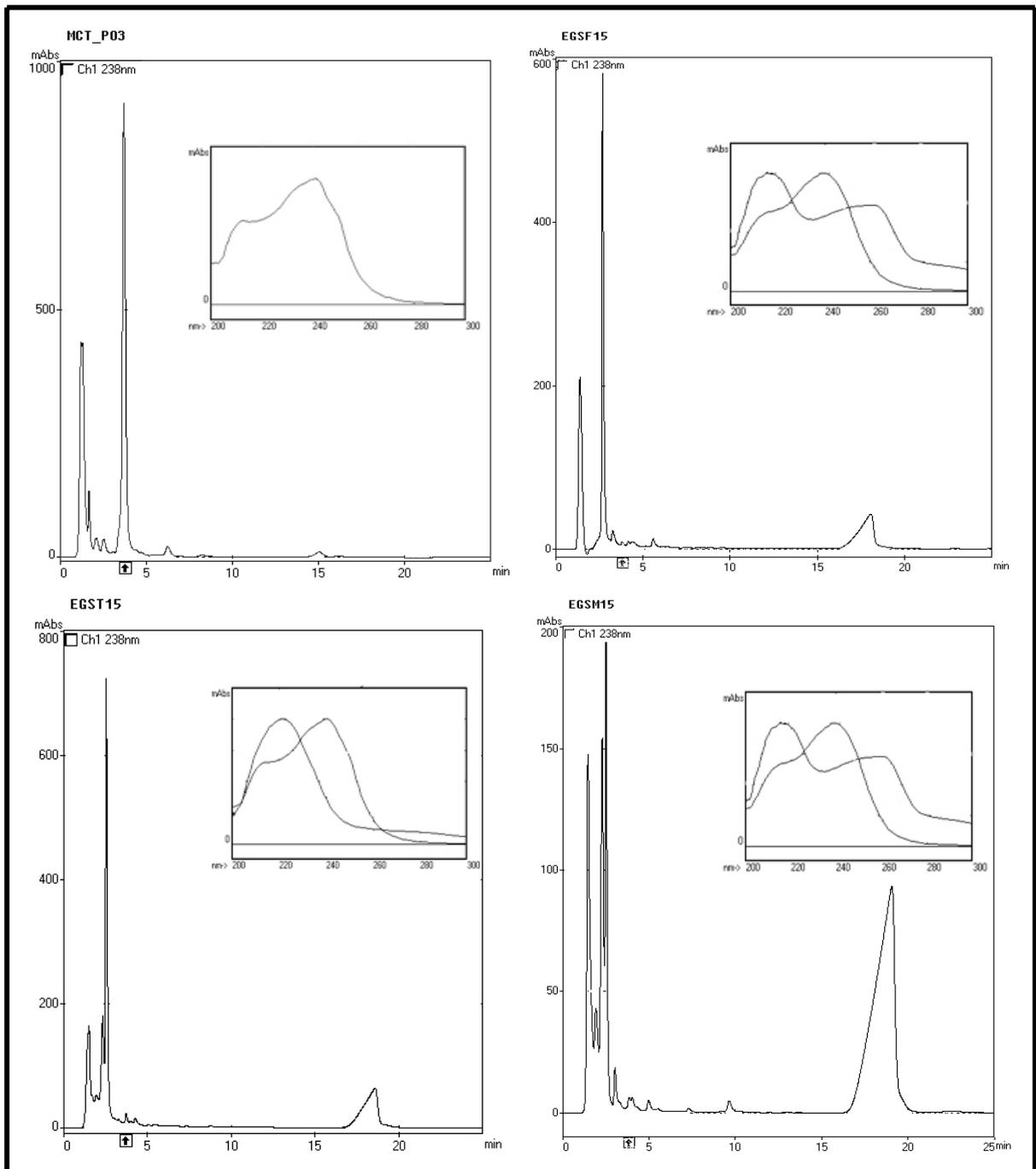


Figura 33. Cromatogramas referentes aos extratos de órgãos e tecidos de girinos após 15 dias sem exposição ao extrato de *M. aeruginosa*. Evidenciado com uma seta no eixo X o tempo de retenção de [D-Leu] MCYST-LR. Em detalhe estão representados os respectivos espectrogramas. MCT_P03- extrato total de cultivo, EGSF15- extrato de fígado, EGST15-extrato de TGI, EGSM15- extrato de músculo.

Apesar de apresentar frações cromatográficas no mesmo tempo de retenção do padrão de [D-Leu] MCYST-LR em alguns cromatogramas, os espectrogramas de absorção na faixa de 200-300nm não apresentaram similaridade satisfatória. Todas as frações cromatográficas que apresentaram o mesmo Tr que [D-Leu] MCYST-LR, porém sem similaridade entre os espectrogramas de absorção foram considerados negativos quanto à presença de cianotoxina.

Não houve similaridade entre os espectrogramas de absorção referentes às amostras de fígado, TGI e músculo e a [D-Leu] MCYST-LR.

4 – Análises por Microscopia de luz

Foi observado em todo trato gastrointestinal dos animais sacrificados uma coloração verde, que ratifica a ingestão de células de *M. aeruginosa*.

Houve uma significativa variação no tamanho do fígado dos animais expostos tanto a células íntegras quanto ao extrato *M. aeruginosa*. Este órgão apresentou hipertrofia crescente e relacionada ao tempo de exposição, aproximando-se ao tamanho dos animais controles ao final do período de regeneração. Modificações na coloração e textura do fígado também foram notadas, sendo caracterizadas por variação de tonalidade vermelho escuro e textura firme a tons ocre e aspecto quebradiço ao final do tempo de exposição, voltando a uma coloração mais avermelhada ao final do período de regeneração.

4.1 - Exposição de girinos de *Rana catesbeiana* às células de *Microcystis aeruginosa*

4.1.1 – Análises Histológicas de Fígado

A análise das lâminas histológicas evidenciou as estruturas mais atingidas pela ação da [D-Leu] MCYST-LR. A figura 34 mostra as estruturas do fígado do grupo controle e daqueles expostos por dois dias às células de *M. aeruginosa*.

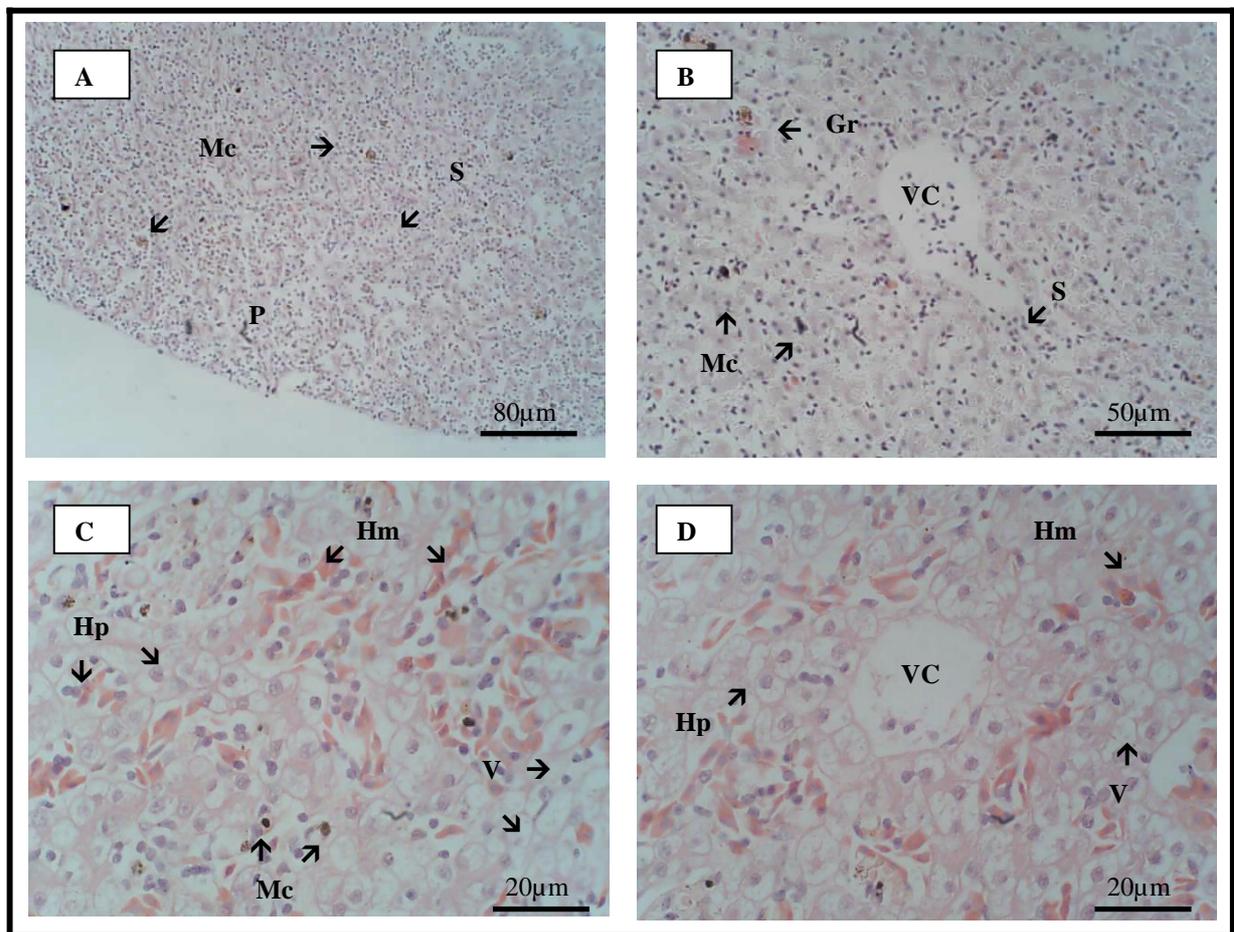


Figura 34. Cortes transversais de fígado de girino controle e exposto por 2 dias ao cultivo de *M. aeruginosa* A – Visão da periferia do órgão de animal controle (aumento de 10X), B – Veia central do órgão em animal controle (aumento de 20X), C – Visão em aumento de 40X de uma hemorragia no órgão de animal exposto por 2 dias e D – Veia central e hemorragia em animal exposto por 2 dias (aumento de 40X). P – Periferia do órgão, S – Sinusóide, Mc – Macrófagos, Gr – Granulócitos, VC – Veia Central, Hm – Hemácias, Hp – Hepatócitos, V- Vacúolos.

A figura 34 (A) apresenta uma visão geral da estrutura do órgão de girino controle, evidenciando os capilares sinusóides íntegros margeados por fileiras de hepatócitos bem corados. Em (B) tem-se uma visão da uma veia central do fígado controle mostrando a ocorrência de poucos granulócitos e alguns macrófagos. É possível ver também o ponto onde ocorre a comunicação entre a veia central e um capilar sinusóide.

Nas fotos (C) e (D) da figura 34 estão representados cortes de fígado de animais exposto por 2 (dois) dias ao cultivo de cianobactérias. Em (C) é visível uma hemorragia, que é comprovada pela presença de hemácias fora dos sinusóides. A [D-Leu] MCYST-LR age nas hemácias deixando-as com aparência fusiforme. Por sua vez, os hepatócitos apresentam vacúolos, sugerindo uma fase inicial no processo de apoptose já no início do experimento. Em (D) está evidenciada uma veia central com endotélio quase ausente, nota-se também que a veia perdeu as comunicações com os capilares sinusóides. Novamente, é observada a ocorrência de hemorragia e hepatócitos em apoptose caracterizados por núcleos pinocítios citoplasma vacuolizado.

A figura 35 evidencia as principais modificações ocasionadas pela ação da [D-Leu] MCYST-LR no fígado do grupo exposto por 4 (quatro) dias (fotos (A) e (B)) e 6 (seis) dias (fotos (C) e (D)) ao cultivo de *M. aeruginosa*.

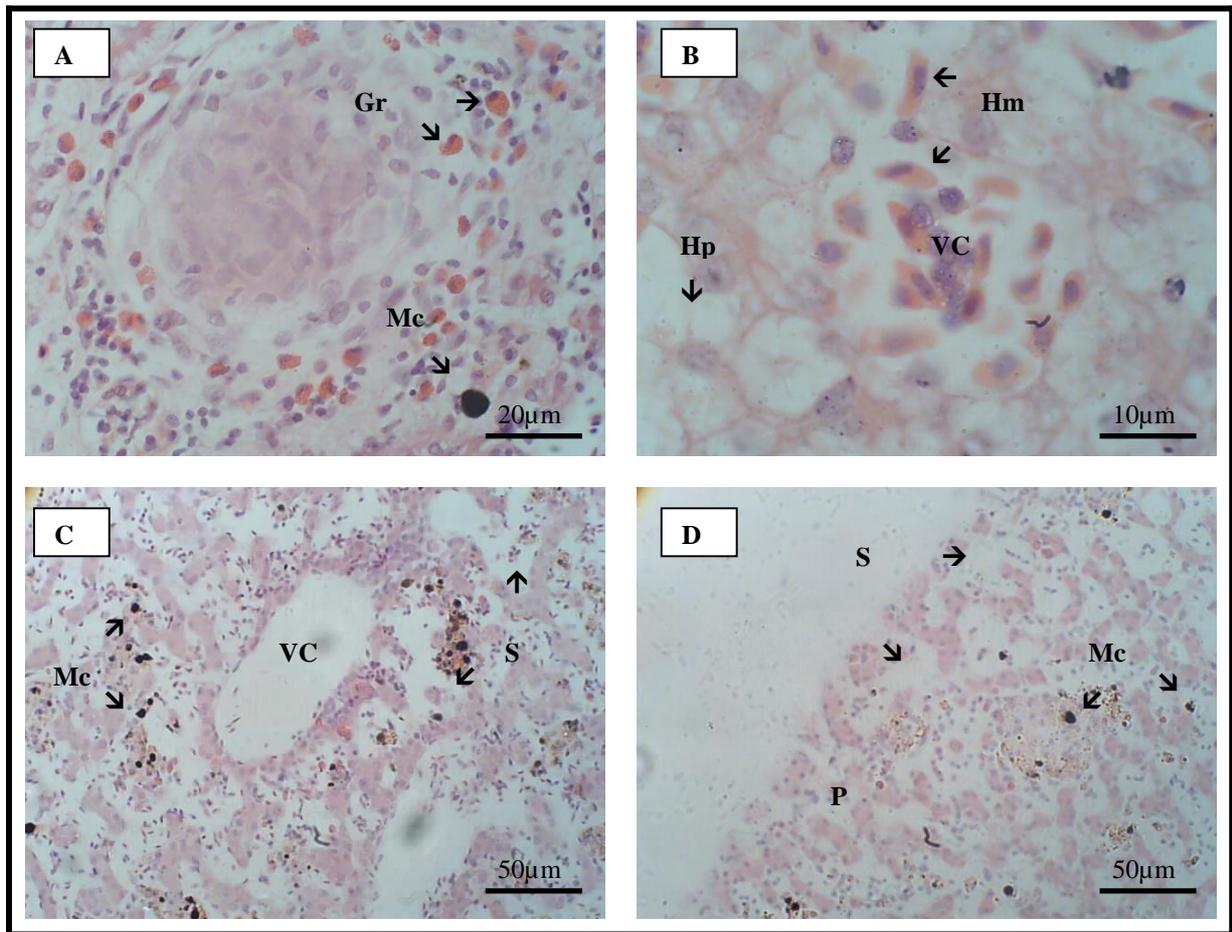


Figura 35. Cortes transversais de fígado de girino exposto por 4 e 6 dias ao cultivo de *M. aeruginosa*. A – Veia central desestruturada e granulócitos (40X), B – Visão de hemorragia e hepatócitos vacuolizados expostos por 4 dias (100X), C – Veia central com endotélio danificado e sinusóides dilatados em aumento de 20X após exposição por 6 dias e D – Visão periférica do órgão (20X). Gr – Granulócitos, Mc – Macrófagos, H – Hemácias, Hp – Hepatócitos, VC – Veia Central, S – Sinusóides, P – Periferia do órgão.

A figura 35 (A) apresenta uma visão de uma veia central danificada com hepatócitos soltos em sua luz. Ocorre um aumento significativo de granulócitos, geralmente margeando os vasos do órgão. Em (B) tem-se uma visão de uma veia central contendo hemácias fusiformes e hepatócitos em sua luz. É evidente um aumento de vacuolização dos hepatócitos.

Em (C) é visível o endotélio danificado da veia central, bem como o aumento no calibre dos capilares sinusóides, devido à perda da estrutura dos hepatócitos. Há um aumento no número de macrófagos que se unem formando células polinucleadas. Em (D) tem-se uma visão da periferia do órgão, evidenciando a perda de estrutura ocasionada pelo aumento do calibre dos capilares sinusóides.

São evidenciadas na figura 36 as modificações mais significativas ocasionadas pela ação da [D-Leu] MCYST-LR no fígado do grupo exposto por 8 (oito) e 10 dias ao cultivo de *M. aeruginosa*.

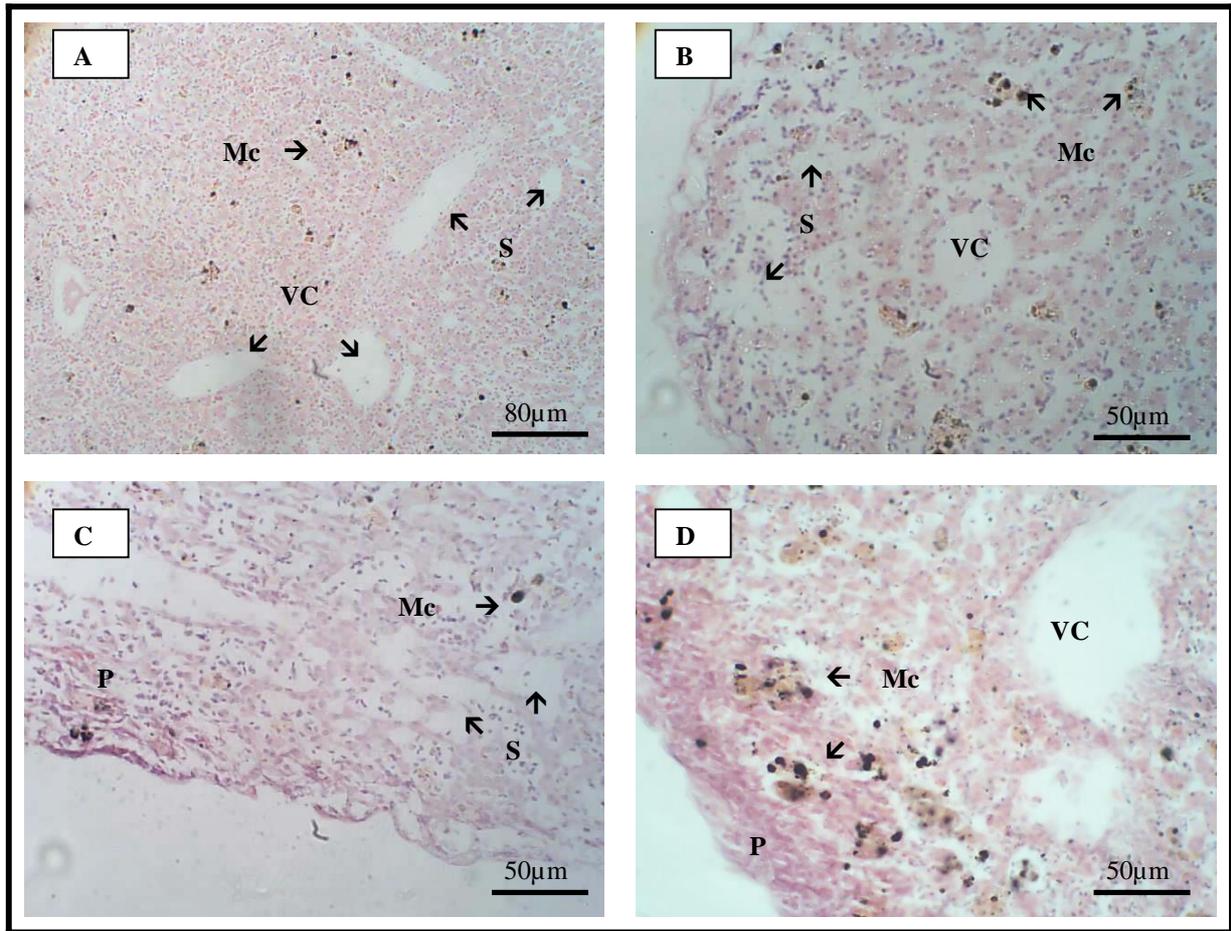


Figura 36. Cortes transversais de fígado de girino exposto por 8 e 10 dias ao cultivo de *M. aeruginosa*. A - Veias central desestruturada e sinusóides dilatados após exposição por 8 dias (10X) , B - Visão periférica do órgão exposto por 8 dias em aumento de 20X, C - Visão periférica do órgão e sinusóides dilatados após exposição por 10 dias (20X) e D - Visão periférica de órgão exposto por 10 dias (20X). Mc - Macrófagos, S - Sinusóides, VC - Veia Central, P - Periferia do órgão.

Uma visão geral do órgão é mostrada na figura 36 (A), evidenciando as veias central e capilares sinusóides dilatados. Não ocorre mais comunicação entre a luz das veias e os sinusóides. Em (B) tem-se uma visão geral do órgão mostrando uma veia central com endotélio danificado e sinusóides dilatados. A camada externa de tecido conjuntivo do órgão se apresenta frouxa. No interior do órgão ocorre um aumento no número de macrófagos.

Nas fotos (C) (D) é evidenciada a periferia necrosada dos órgãos composta por hepatócitos mortos, bem como grandes aglomerados de macrófagos formando células polinucleadas.

A figura 37 representa cortes do material referente aos girinos em processo de recuperação, estando estes sem contato como cultivo de cianobactérias por um período de 6 (seis) dias.

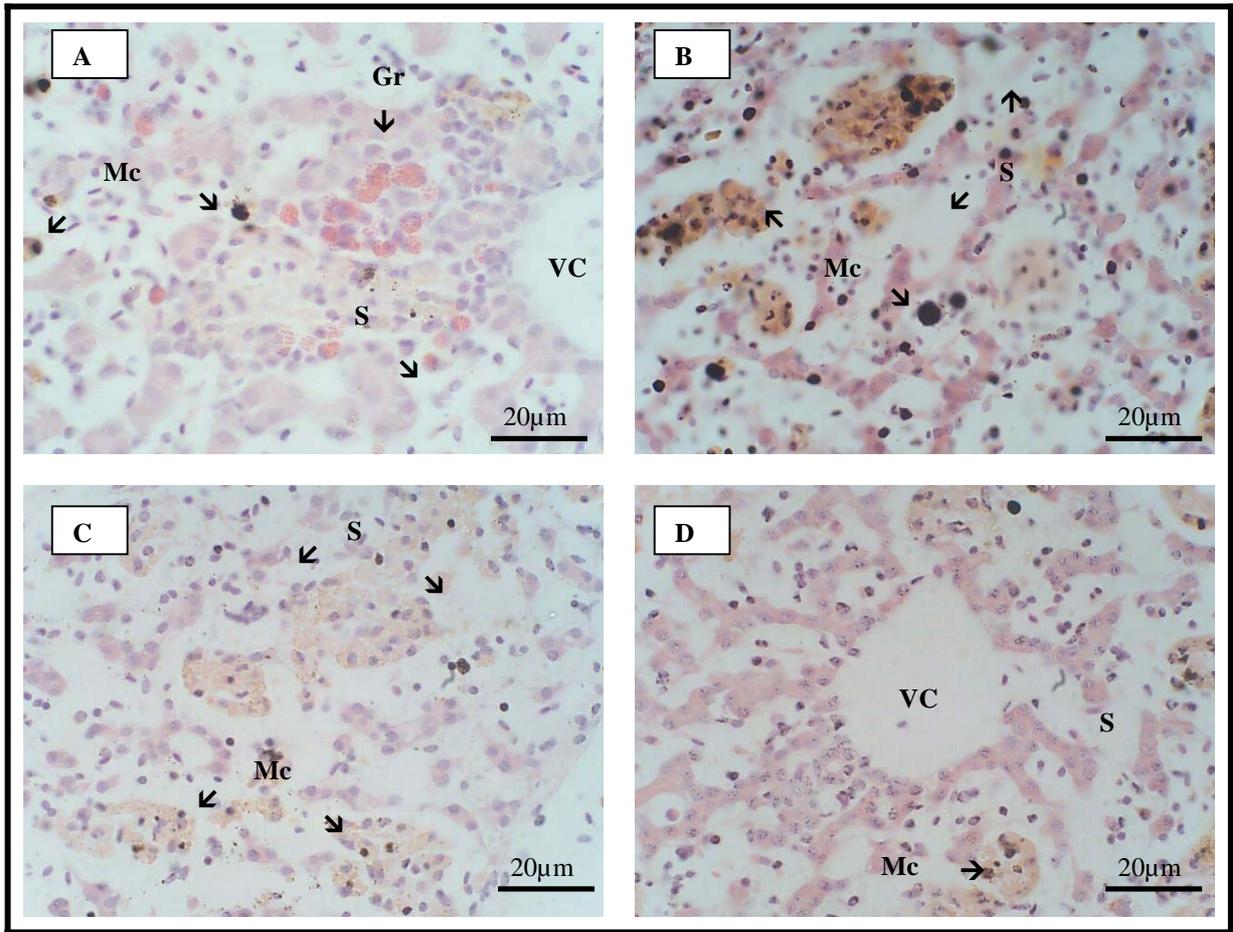


Figura 37. Cortes transversais de fígado de girino em recuperação após 6 dias sem contato com cultivo de *M. aeruginosa*. A - Veia central sem comunicação com sinusóides e granulócitos (40X), B - Sinusóides deformados em aumento de 40X, C - Sinusóides dilatados e hemorragia em aumento de 40X e D - Veia central com endotélio rompido e sinusóides dilatados (40X). Mc - Macrófagos, Gr - Granulócitos, VC - Veia Central, S - Sinusóides.

A figura 37 (A) apresenta o fígado em recuperação após a exposição à células de *M. aeruginosa*, evidenciando uma visão de uma veia central sem comunicação com os capilares sinusóides dilatados que a circundam. A presença de macrófagos e granulócitos é significativa ainda nesse período da regeneração. Em (B) tem se uma visão de muitos capilares sinusóides deformados e macrófagos formando aglomerados de células polinucleadas.

Em (C) e (D) são visíveis ainda os danos causados aos capilares sinusóides bem como as veias centrais. Há um aumento significativo no número de macrófagos devido ao número de hepatócitos mortos.

A recuperação é evidenciada principalmente em três aspectos: a coloração intensificada e uniforme, os limites celulares (contorno e núcleo), e por último, o restabelecimento do endotélio dos vasos sanguíneos.

4.1.2 – Análises Histológicas de Trato Gastrointestinal (TGI)

Foram montadas pranchas a partir das amostras de TGI, focando as estruturas mais atingidas pela ação da [D-Leu] MCYST-LR. A figura 38 evidencia as estruturas normais de TGI do grupo controle (fotos (A) e (B)), bem como aquele composto por indivíduos expostos por 2 (dois) dias ao cultivo (fotos (C) e (D)).

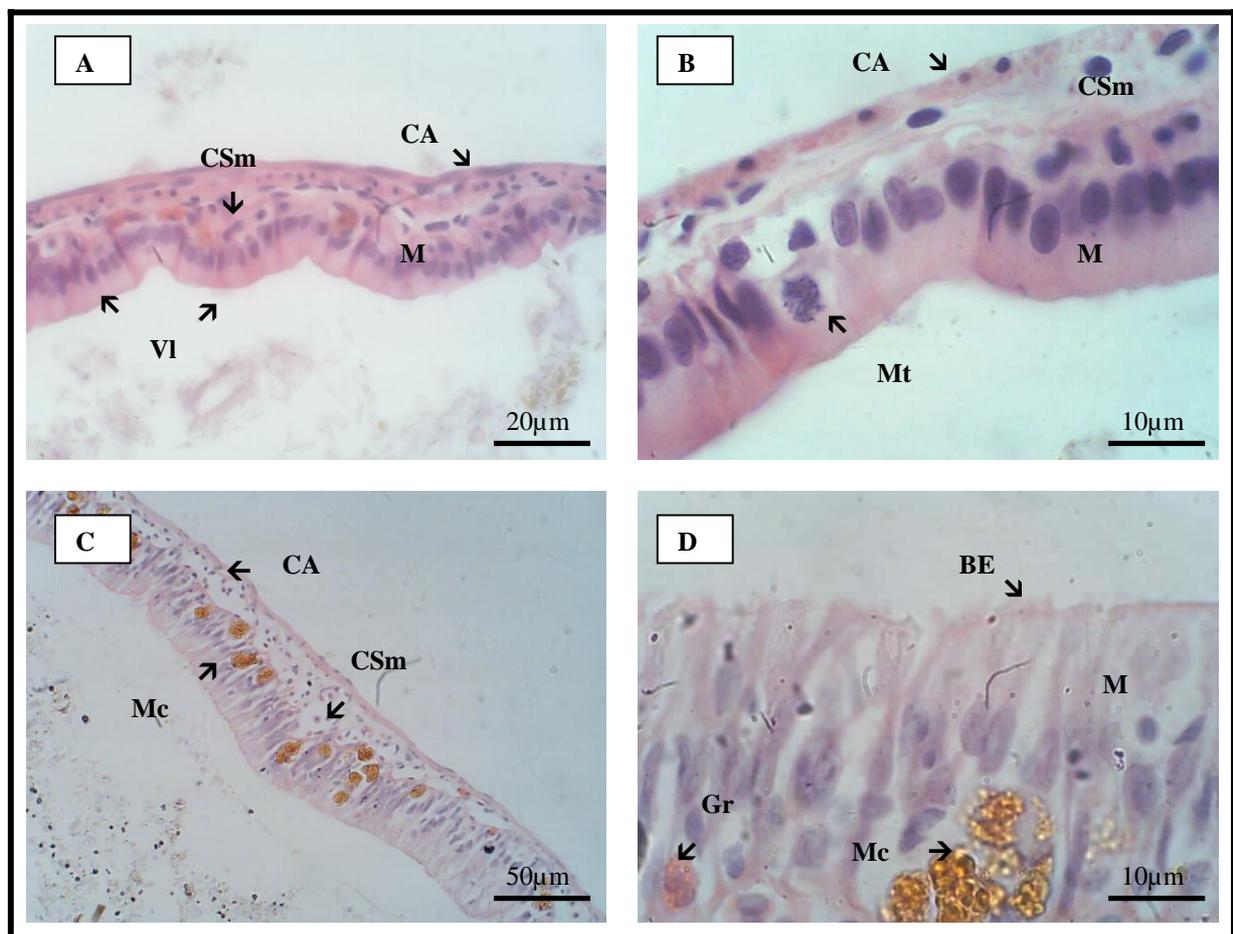


Figura 38. Cortes longitudinais de TGI de girino controle e exposto por 2 dias ao cultivo de *M. aeruginosa*. A - Vilosidades do órgão de animal controle em um aumento de 40X, B – Camadas do órgão em animal controle (100X), C – Visão em aumento de 20X de órgão de animal exposto por 2 dias e D – Visão bordadura estriada das células absorptivas do órgão exposto por 2 dias (100X). CSm – Camada Submucosa, CA – Camada Adventícia, VI – Vilosidades, M – Mucosa, Mt – Mitose, Mc – Macrófagos, Gr – Granulócitos, BE – Bordadura Estriada.

A figura 38 (A) e (B) apresentam uma visão geral da estrutura do órgão de girino controle, evidenciando as camadas que o compõe. Destaca-se a morfologia das células epiteliais pavimentosas da camada serosa e o epitélio cilíndrico simples da Mucosa, ambos formados por células bem coradas, homogêneas e com núcleo bem definido. A camada da submucosa de tecido conjuntivo apresenta células igualmente bem coradas com núcleos bem definidos. Estão presentes ao longo do TGI de girino controle vilosidades bem estruturadas como as representadas em (A).

Na foto (C) e (D) da figura 38 estão representados cortes animais expostos por 2 dias ao cultivo de cianobactérias. Em (C) ocorre um alongamento no ápice das células da mucosa que apresentam grandes vacúolos, ocorre também um aumento no número de granulócitos que migram da camada submucosa em direção a luz do órgão. Em (D) um aumento maior da camada mucosa, evidenciando os vacúolos e uma perda na adesão entre as células que assumem uma forma de afunilada no ápice, e o tecido conjuntivo abaixo delas. Foi observado também falhas na bordadura estriada do epitélio.

Na figura 39 são apresentados cortes de trato gastrointestinal com exposição às células de *M. aeruginosa* por 04 (quatro) e 06 (seis) dias.

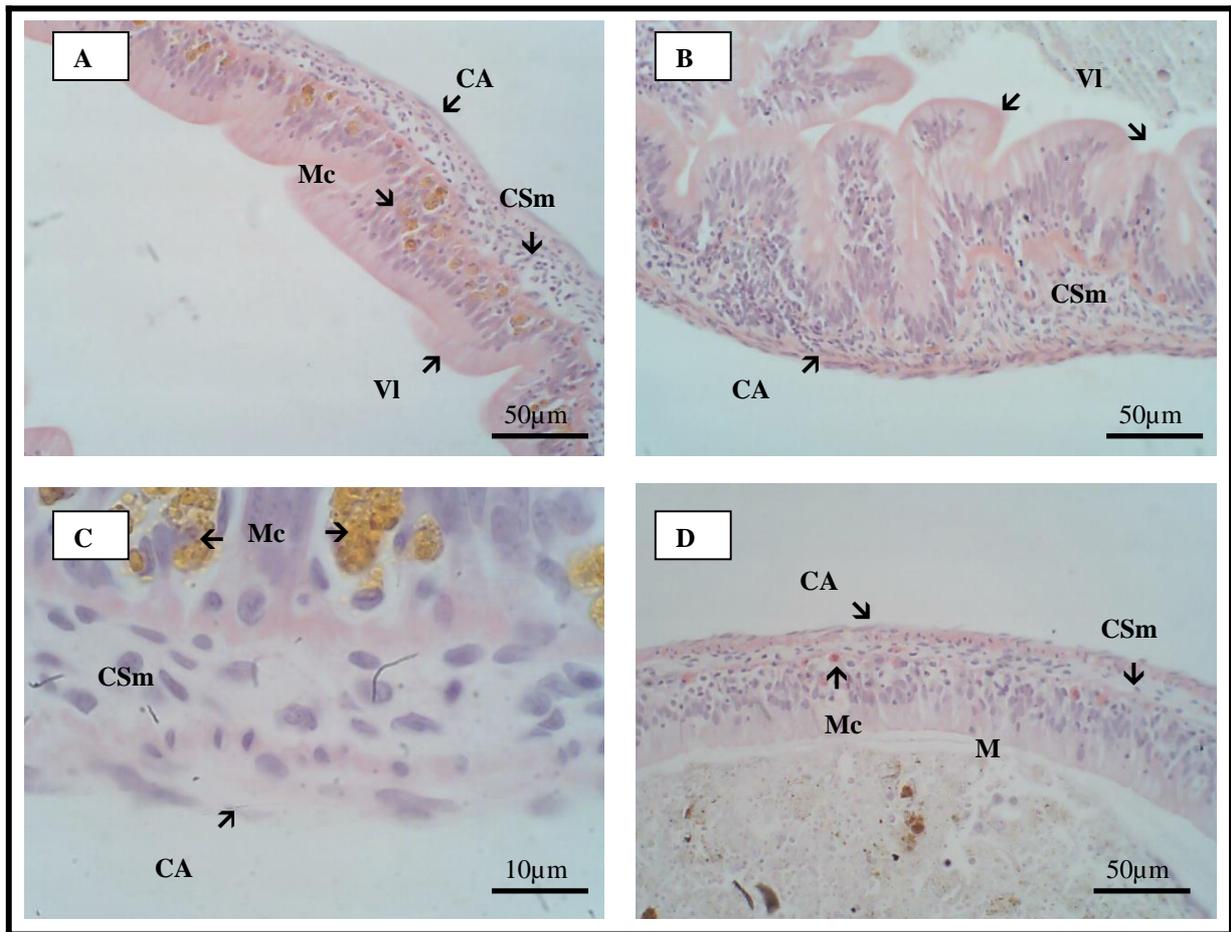


Figura 39. Cortes longitudinais de TGI de girino exposto por 4 e 6 dias ao cultivo de *M. aeruginosa*. A – Vilosidades do órgão de animal exposto por 4 dias (20X), B – Camadas do órgão em animal exposto por 4 dias em aumento de 20X, C – Visão detalhada das camadas do órgão de animal exposto por 4 dias (100X) e D – Visão do órgão de animal exposto por 6 dias (20X). CA – Camada Adventícia, CSM – Camada Submucosa, VI – Vilosidades, Mc – Macrófagos, M – Mucosa.

A figura 39 (A), (B) e (C) evidenciam algumas modificações ocasionadas pela ação da [D-Leu] MCYST-LR no trato gastrointestinal dos girinos expostos por 4 (quatro) dias ao cultivo. As células da mucosa continuam com o aspecto alongado e coloração fraca, granulócitos estão presentes em grande número que se localizam basicamente na camada mucosa. Em destaque as camadas serosa e submucosa (C) que apresentam um aspecto mais difuso e menos corado.

Em (D) um corte de TGI de animal exposto por 6 (seis) dias ao cultivo. Não ocorrem muitas diferenças entre esses dois dias de tratamento quanto à estrutura do órgão, sendo evidente apenas a diminuição do número de granulócitos na mucosa.

São evidenciadas na figura 40 modificações mais significativas ocasionadas pela ação da cianotoxina no TGI do grupo exposto por 8 (oito) dias nas fotos (A), (B) e (C), e 10 dias na foto (D) ao cultivo de *M. aeruginosa*.

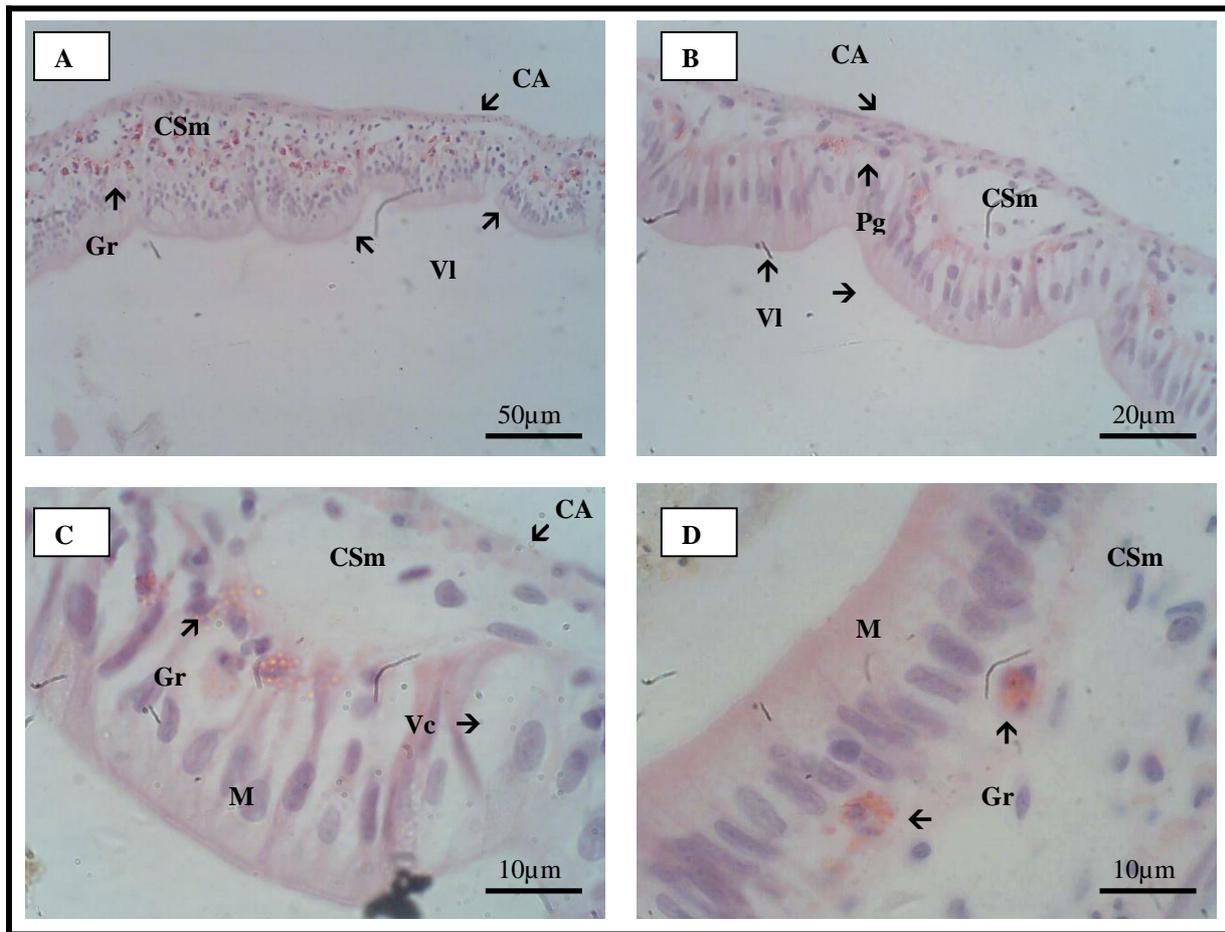


Figura 40. Cortes longitudinais de TGI de girino exposto por 8 e 10 dias ao cultivo de *M. aeruginosa*. A – Vilosidades do órgão de animal exposto por 8 dias em um aumento de 20X, B – Visão de pregas do órgão em animal exposto por 8 dias (40X), C – Visão detalhada das camadas do órgão de animal exposto por 8 dias (100X) e D – Visão das camadas do órgão de animal exposto por 10 dias (100X). CA – Camada Adventícia, CSm – Camada Submucosa, VI – Vilosidades, Gr – Granulócitos, Pg – Pregas, Vc – Vacúolos, M - Mucosa.

Uma visão geral do órgão é apresentada na figura 40 (A), (B) e (C), mostrando o aspecto geral do órgão, que volta a apresentar uma camada submucosa e células da mucosa frouxa com um número maior de vacúolos. A quantidade de granulócitos volta a aumentar na camada mucosa. Em (D), que corresponde ao material de girino exposto por 10 dias, não se nota modificações significativas quando comparado aos resultados de 8 dias de exposição.

A figura 41 representa cortes do material referente aos girinos tratados por um período de 10 dias e por aqueles em processo de recuperação, estando estes sem contato como cultivo de cianobactérias por um período de 6 (seis) dias.

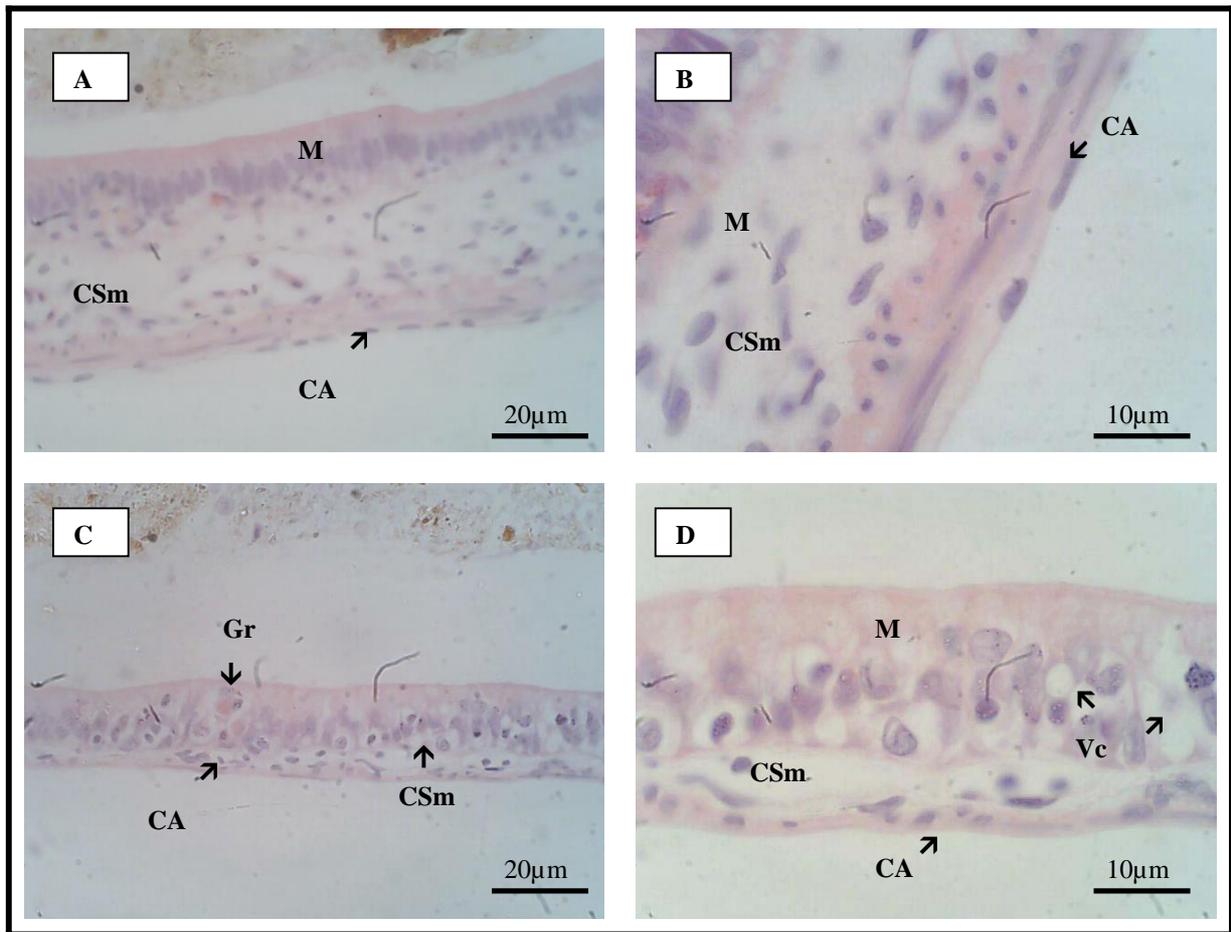


Figura 41. Cortes longitudinais de TGI de girino exposto por 10 dias ao cultivo de *M. aeruginosa* e 6 dias sem exposição (recuperação). A – Camadas do órgão de animal exposto por 10 dias (40X), B – Visão das camadas do órgão em animal exposto por 10 dias (100X), C – Camadas do órgão de animal em recuperação após 6 dias (40X) e D – Camadas do órgão de animal em recuperação após 6 dias (100X). CA – Camada Adventícia, CSm – Camada Submucosa, M – Mucosa, Gr – Granulócitos, Vc – Vacúolos.

Na figura 41 (A) e (B) estão representados cortes de TGI de animais exposto por 10 dias ao cultivo. Não ocorrem significativas modificações na estrutura das células quando comparado aos animais expostos por 6 dias. Em (D), nota-se uma melhora na constituição da camada submucosa, que se apresenta com um aspecto menos frouxo, e ainda ocorrem vacúolos nas células da mucosa.

4.1.3 – Análises Histológicas de Músculo

Foram montadas pranchas das amostras referentes a músculo, enfatizando as estruturas mais atingidas pela ação da [D-Leu] MCVYST-LR. A figura 42 evidencia as estruturas normais de músculo do grupo controle analisado.

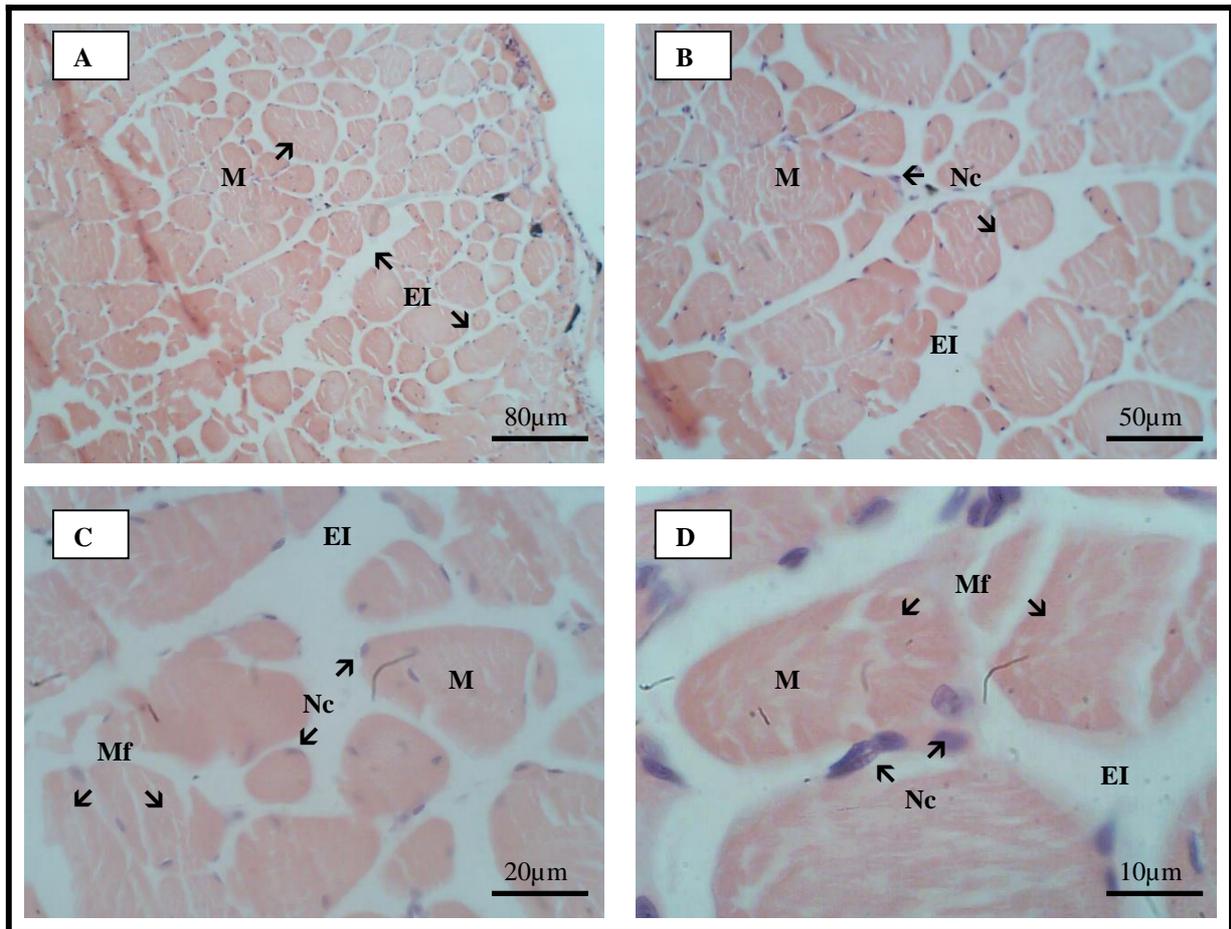


Figura 42. Cortes transversais de músculo de girino controle em diferentes aumentos. A – Visão geral do tecido (10X), B – Visão em aumento de 20X, C – Visão em aumento de 40X evidenciando as fibras musculares e D – Visão em aumento de 100X mostrando os núcleos do miócitos. EI – Espaços Intercelulares, M – Miócitos, Nc – Núcleo, Mf – Miofibrilas.

Nas fotos (A) e (B) tem-se uma visão geral do tecido, evidenciando a organização e as delimitações celulares. A coloração das células é boa, mostrando os núcleos dispostos periféricamente nas células (B).

Em (C) e (D) está evidenciado os espaços intercelulares homogêneos e as fibras musculares que compõe as células.

A figura 43 representa cortes do material referente aos girinos expostos por 2 (dois) dias nas fotos (A), e 4 (quatro) dias fotos (B), (C) e (D) ao cultivo de cianobactéria.

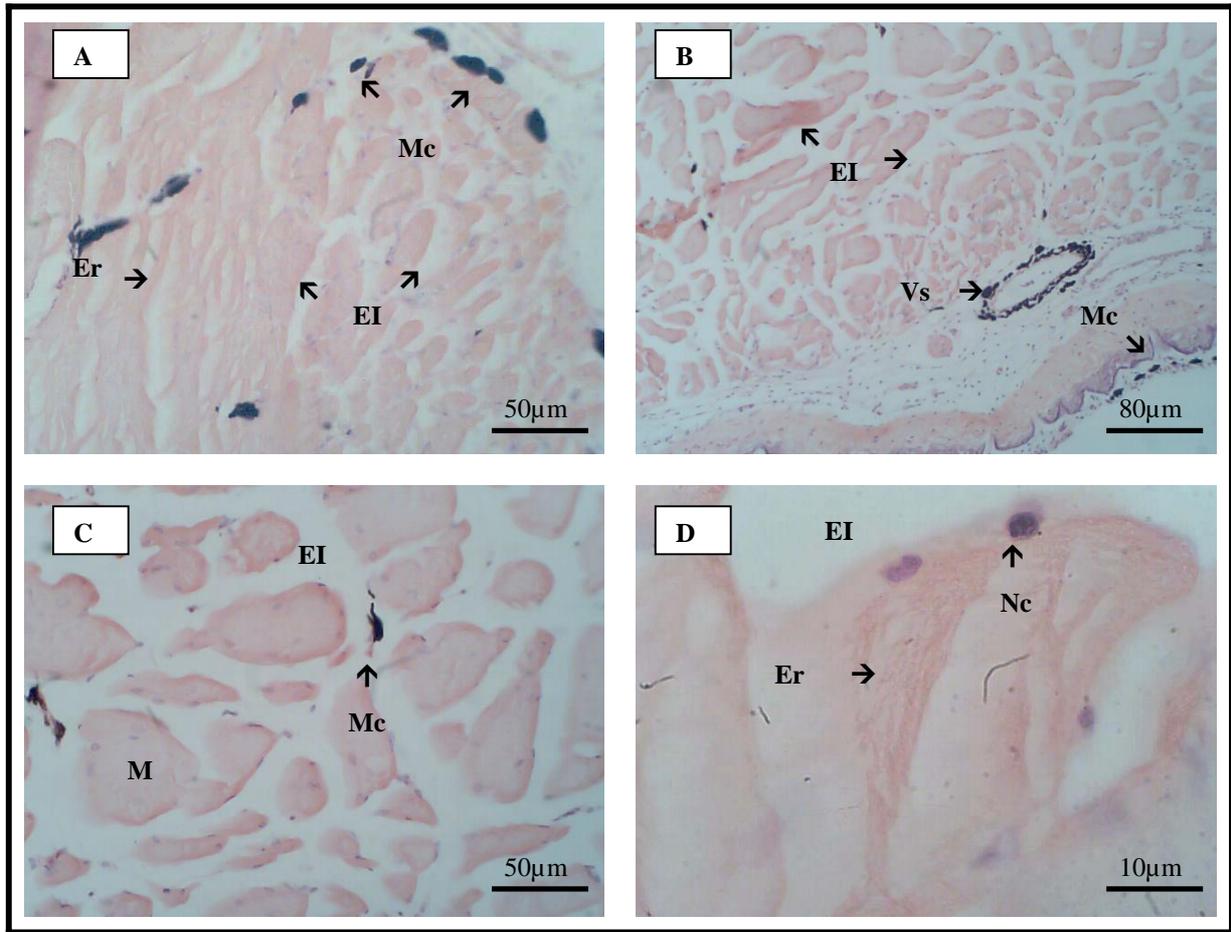


Figura 43. Cortes transversais de músculo de girino expostos por 2 e 4 dias a células de *M. aeruginosa*. A – Corte de tecido exposto por 2 dias ao cultivo em um aumento de 20X, B – Tecido exposto por 4 dias em um aumento de 10X, C – Visão de tecido exposto por 4 dias (20X), D – Corte de tecido exposto por 4 dias em aumento de 100X. EI – Espaços Inercelulares, Mc – Macrófagos, Er – Enrugamento das células, Vs – Vaso, M – Miócitos, Nc - Núcleo.

Em (A) e (B) é evidenciado um maior espaçamento entre os miócitos, que apresentam um aspecto homogêneo, como se as miofibrilas possuíssem uma distribuição difusa no interior da célula. Ocorre um efeito semelhante a enrugamento, como se as células estivessem sobrepostas e o tecido recebe uma acentuada migração de macrófagos que se distribuem ente os espaços intercelulares e vasos.

Nas fotos (C) e (D) são mostrados com mais detalhes as modificações ocorridas nos miócitos, com efeito semelhante a um enrugamento e o aumento dos espaços intercelulares.

A figura 44 representa cortes do material referente aos girinos expostos por 6 (seis) nas fotos (A) e (B), e 8 (oito) dias nas fotos (C) e (D) ao cultivo de cianobactérias.

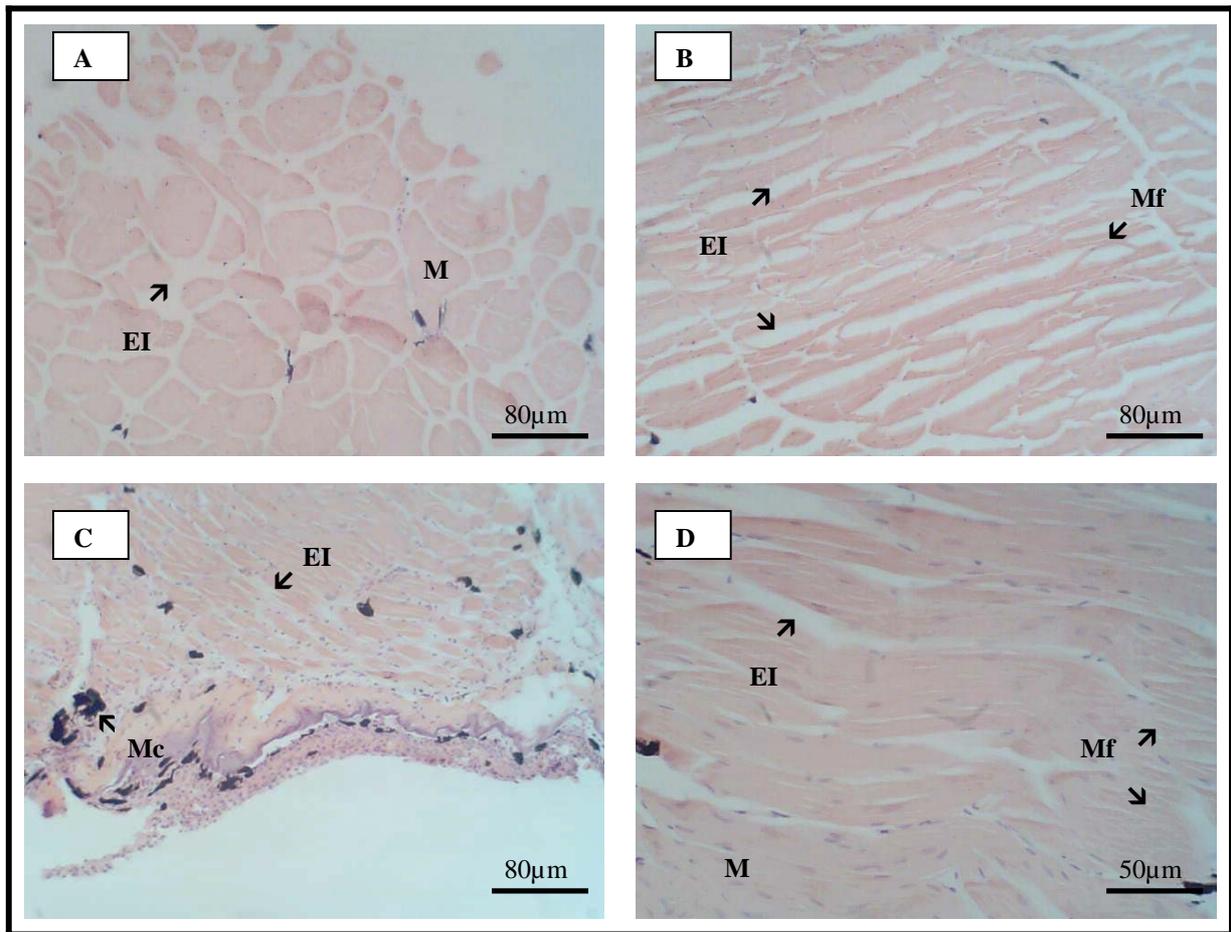


Figura 44. Cortes transversais e longitudinais de músculo de girino expostos por 6 e 8 dias a células de *M. aeruginosa*. A – Corte transversal de tecido exposto por 6 dias (10X), B – Corte longitudinal de tecido exposto por 6 dias em um aumento de 10X, C – Corte transversal de tecido exposto por 8 dias em aumento de 10X, D – Corte longitudinal de tecido exposto por 8 dias em aumento de 20X. EI – Espaços Intercelulares, M – Miócitos, Mf – Miofibrilas, Mc – Macrófagos.

A figura 44 (A) apresenta uma visão geral da estrutura do tecido em corte transversal, evidenciando o aspecto homogêneo das fibras musculares dentro dos miócitos. Em (B) tem-se um corte longitudinal que mostra a feixes de fibras musculares dispersos nas células como se estivessem desfiando. O detalhe da migração de macrófagos no tecido, bem como o aumento dos espaços intercelulares em algumas regiões do tecido, são apresentados em (C).

Em (D), um corte longitudinal evidenciando o espaçamento entre as miofibrilas, que aparentam estar desfiando.

A figura 45 representa cortes do material referente aos girinos tratados por um período de 10 dias e por aqueles em processo de recuperação, estando estes sem contato como cultivo de cianobactérias por um período de 6 (seis) dias.

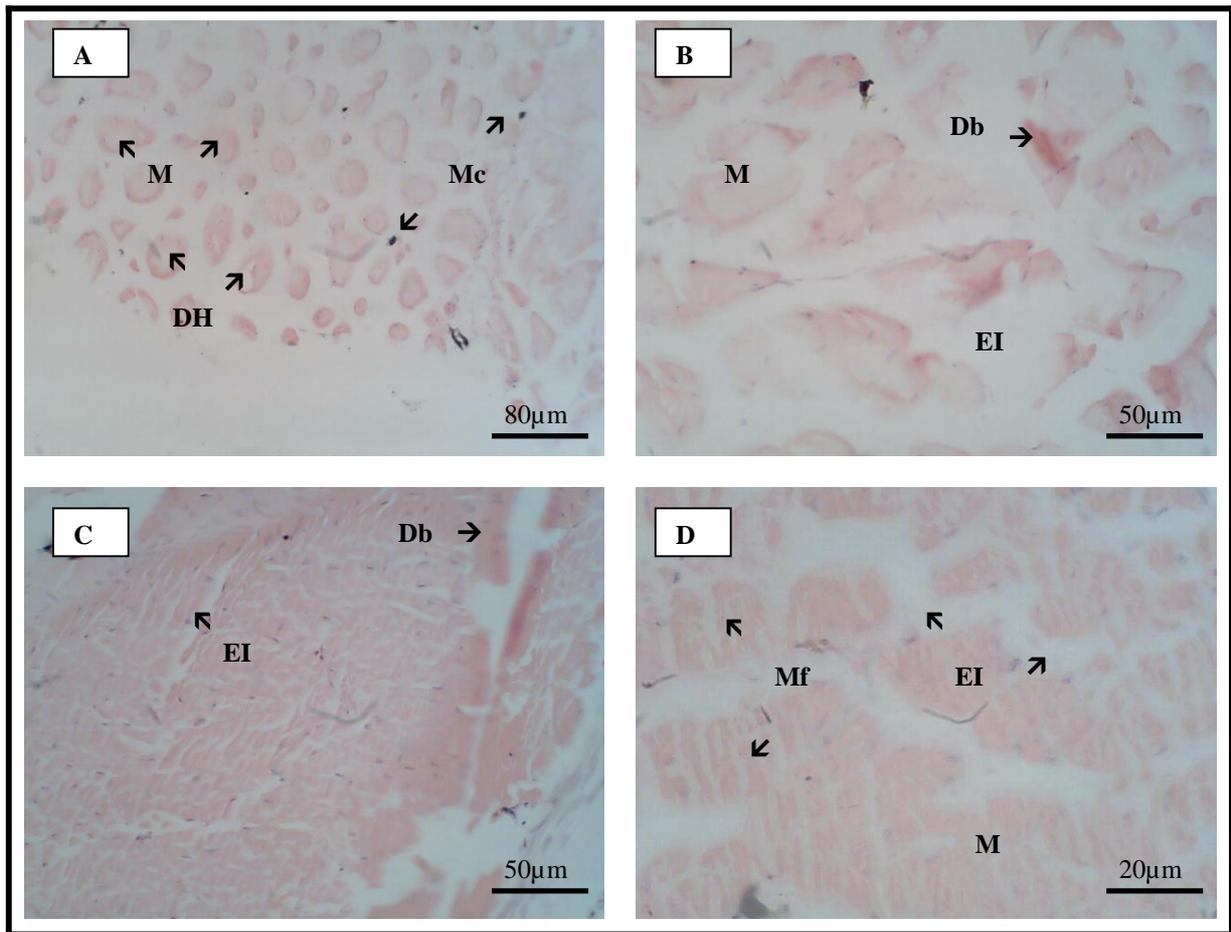


Figura 45. Cortes transversais de músculo de girino expostos por 10 dias a células de *M. aeruginosa* e 10 dias sem exposição (recuperação) em diferentes aumentos. A – Visão de tecido exposto por 10 dias ao cultivo em um aumento de 10X, B – Visão de tecido exposto por 10 dias (20X), C – Visão de tecido em recuperação após 06 dias sem exposição em aumento de 20X, D – Corte de tecido em recuperação após 06 dias sem exposição em aumento de 40X. Mc – Macrófagos, M – Miócito, DH – degradação hialina, EI – Espaços Intercelulares, Db – Dobras, Mf - Miofibrilas.

Nas fotos (A) e (B) da figura 45 fica evidente a ação da [D-Leu] MCYST-LR nos miócitos, que apresentam citoplasma com aspecto homogêneo sem fibras definidas e perda da morfologia celular. Algumas células apresentam vacúolos (A) e dobras com o efeito de enrugamento, ocorre também uma aparente diminuição no número de macrófagos.

As fotos (C) e (D) representam cortes de tecido de animais em recuperação após um período de 6 (seis) dias sem contato com o cultivo, é significativa a melhora do aspecto geral do tecido. As fibras musculares intercelulares voltam a se organizar, devolvendo o aspecto estriado das células e ocorre uma diminuição dos espaços intercelulares, quando comparado aos animais tratados.

4.2 - Exposição de girinos de *Rana catesbeiana* ao extrato de células de *Microcystis aeruginosa*

4.2.1 – Análises Histológicas de Fígado

Foram montadas pranchas das amostras focando as estruturas mais atingidas pela ação da [D-Leu] MCYST-LR. A figura 46 evidencia as estruturas normais de fígado do grupo controle analisado e com três dias de exposição ao cultivo.

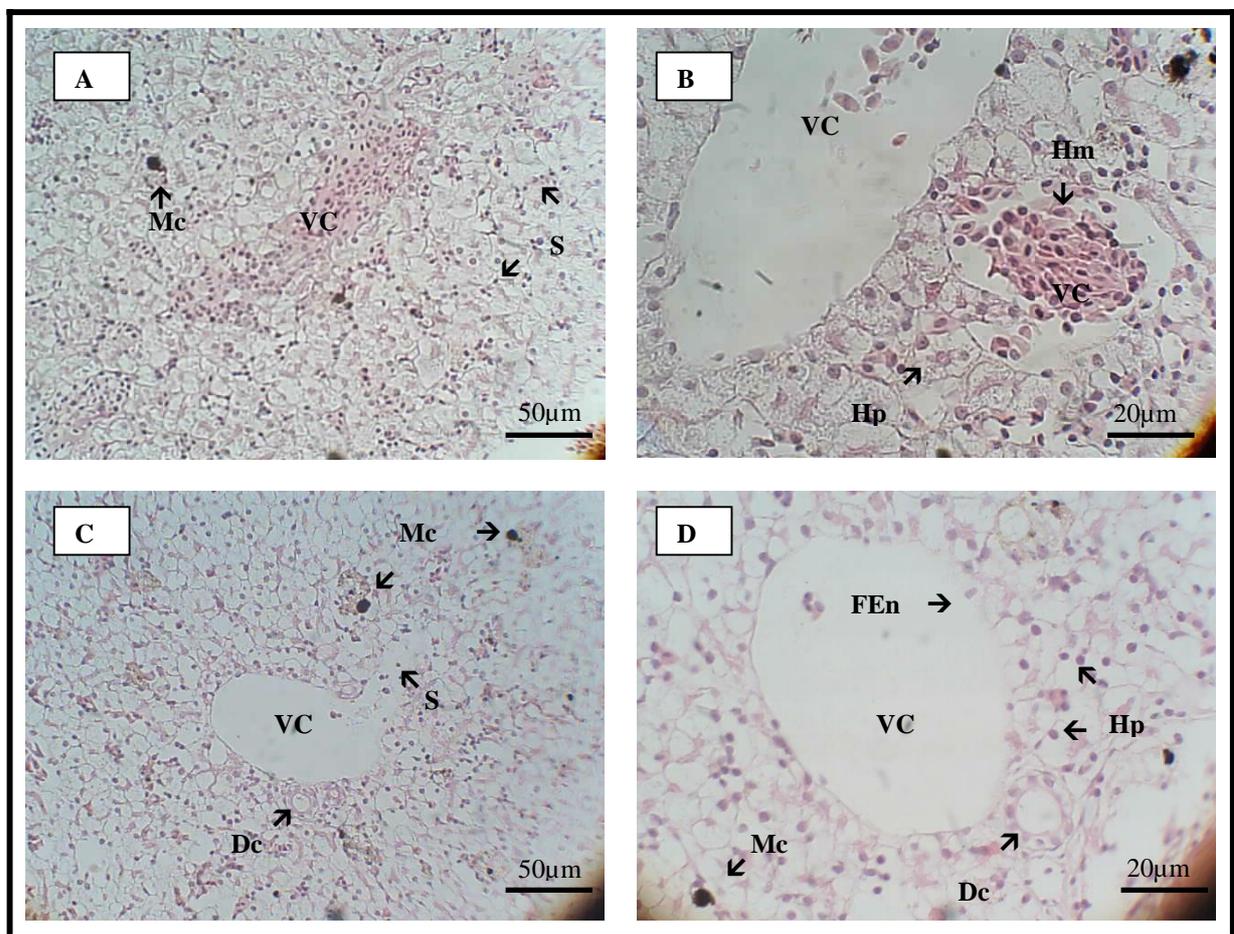


Figura 46. Cortes transversais de fígado de girino controle e exposto por 03 dias ao extrato do cultivo referente a *M.aeruginosa*. (A) – Visão periférica do órgão do animal controle (aumento de 20X), B – Veias centrais do órgão em animal controle (aumento de 40X), C – Visão em aumento de 20X de veia central com sinusóide dilatado em animal exposto por 03 dias e D – Veia central com falha no endotélio em animal exposto por 3 dias (aumento de 40X). Mc – Macrófagos, VC – Veia Central, S – Sinusóide, Hm – Hemácias, Hp – Hepatócitos, Dc - Ducto, FEn – Falha no endotélio.

A figura 46 (A) e (B) evidencia o aspecto íntegro do órgão de girino controle que não apresenta sinusóides dilatados nem veias centrais disformes. Existe uma grande quantidade de sangue nos vasos (congestão), como pode ser observado nos vasos em detalhe. Estão presentes macrófagos em pequenas quantidades, e pode-se verificar a estrutura hexagonal dos hepatócitos que estão bem delimitados, apesar da coloração não ter se fixado bem.

Os cortes representados na figura 46 (C) e (D) evidenciam os primeiros efeitos da cianotoxina em animais expostos por 03 dias, como a chegada de sinusóides dilatados na veia central (C), falhas no endotélio (D) e hepatócitos com núcleo deslocado, algumas vezes aderido à membrana citoplasmática (D). Os ductos presentes no órgão têm aspecto íntegro, com células bem delimitadas.

Em (D) nota-se o aumento de vacúolos no citoplasma dos hepatócitos que é um dos passos iniciais da apoptose celular.

A figura 47 evidencia as principais modificações ocasionadas pela ação da cianotoxina no fígado do grupo exposto por 06 (seis) dias nas fotos (A) e (B) e 09 (nove) dias nas fotos (C) e (D) ao extrato do cultivo de *M. aeruginosa*.

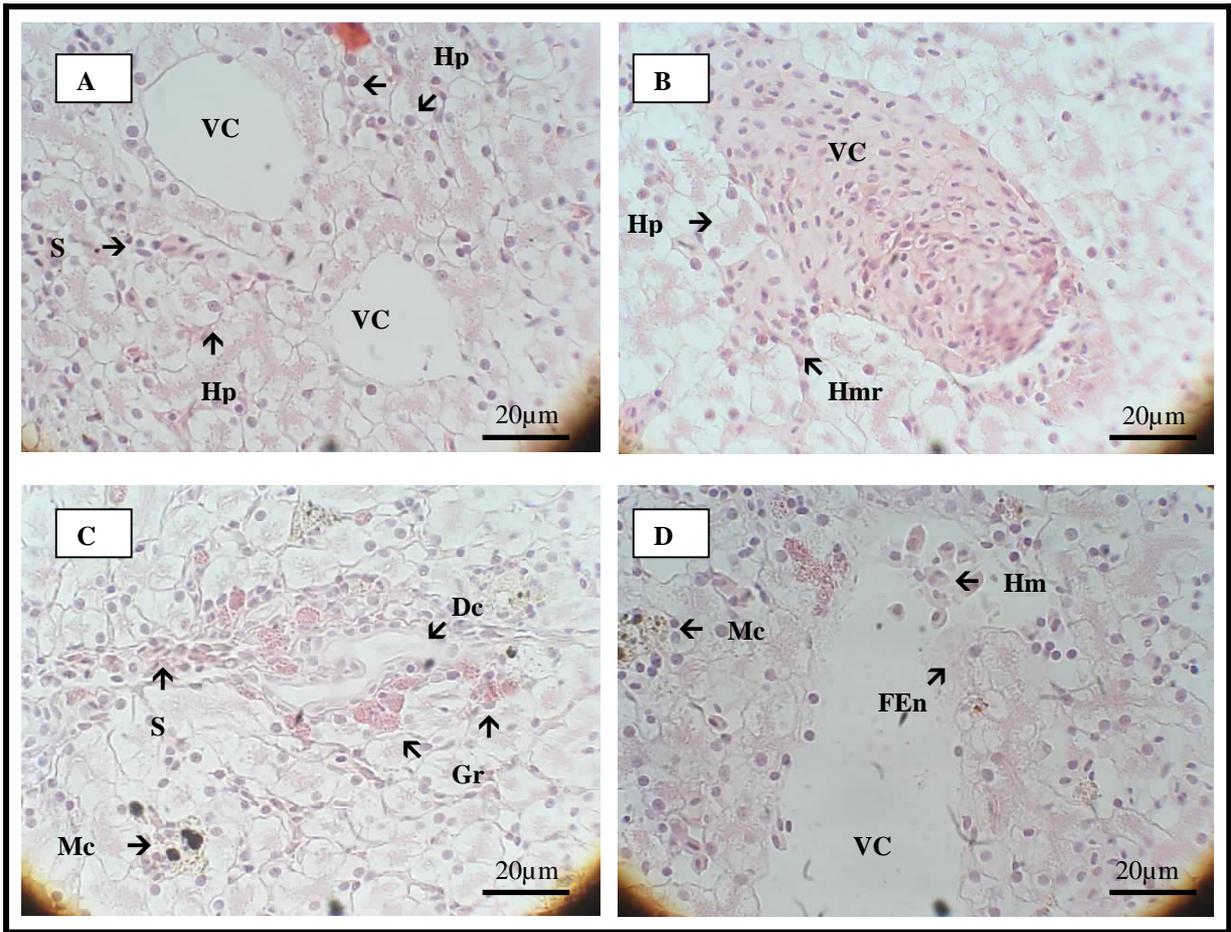


Figura 47. Cortes transversais de fígado de girino exposto por 6 e 9 dias ao extrato do cultivo de *M. aeruginosa*. A – Veias centrais com falha no endotélio (40X), B – Visão de hemorragia em animais expostos por 6 dias (40X), C – Ducto disforme e veia centrolobular com endotélio danificado, hemorragia e granulocitos em aumento de 40X após exposição por 9 dias e D – Visão de veia central com endotélio danificado (40X). VC – Veia Central, S – Sinusóide, Hp – Hepatócitos, Hm – Hemácias, Mc – Macrófagos, Hmr - Hemorragia, Dc – ducto, Gr – Granulócitos, FEn – falha no endotélio.

Na figura 47 (A) pode-se visualizar falhas no endotélio das veias centrais, bem como um princípio de desestruturação das mesmas, que começam a perder a forma. Macrófagos aumentam de tamanho e tornam-se células polinucleadas, os sinusóides apresentam um aspecto disforme que culmina em congestão e hemorragia (B). São visualizados mais hepatócitos com núcleos aderidos a membrana citoplasmática (A) e (B). Em (C) observa-se um ducto disforme com granulócitos em sua periferia, nota-se também um sinusóide dilatado e congestionado. Em (D) um detalhe de falha no endotélio de uma veia central.

Na figura 48 evidenciam-se as modificações mais significativas ocasionadas pela ação da cianotoxina no fígado do grupo exposto por 12 (doze) e 15 (quinze) dias ao extrato do cultivo de *M. aeruginosa*.

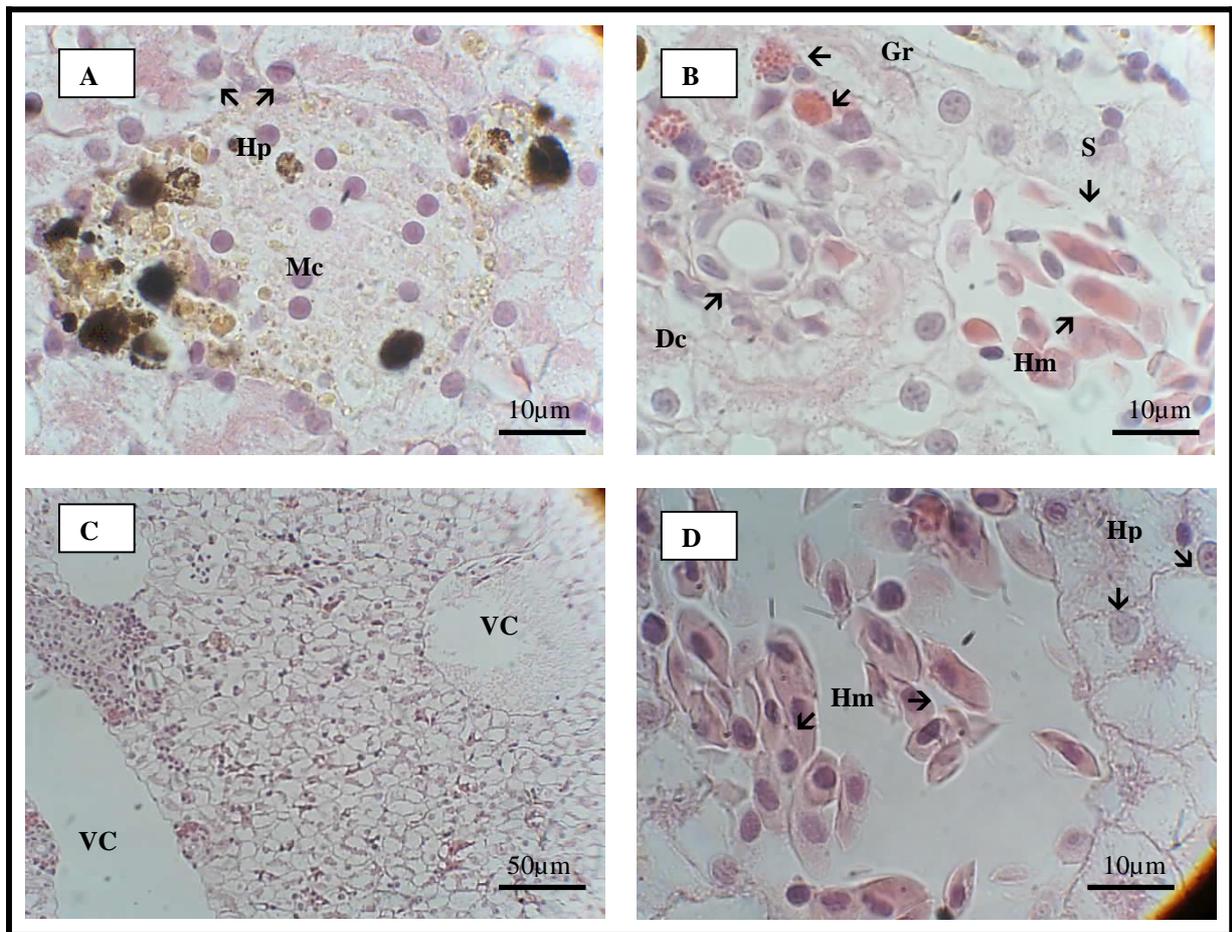


Figura 48. Cortes transversais de fígado de girino exposto por 12 e 15 dias ao extrato do cultivo de *M. aeruginosa*. A – Macrófago gigante (100X) , B – Ducto e veia central com hemácias disformes em animais expostos por 12 dias (100X), C – veia central com endotélio danificado em aumento de 20X após exposição por 15 dias e D – Visão de veia central com hemácias morfologicamente alteradas com micronúcleo (100X). Hp – Hepatócitos, Mc – Macrófagos, Hm – Hemácias, S – Sinusóides, Gr – Granulócitos, Dc – ducto, VC – Veia Central.

Uma visão mais detalhada do órgão é mostrada na figura 48 (A) e (B), evidenciando macrófagos polinucleados e capilares sinusóides dilatados com hemácias morfológicamente alteradas em sua luz. Em (A), o detalhe dos núcleos dos hepatócitos no interior do macrófago e em (B) o aumento no número de granulócitos na periferia do ducto.

Na foto (C) é evidenciada uma visão geral do órgão composta por hepatócitos muito vacuolizados, bem como um enrugamento no endotélio das veias centrais. Não ocorre mais comunicação entre a luz das veias e os sinusóides.

Em (D) um detalhamento de uma veia central com hemácias morfológicamente alteradas em sua luz, e hepatócitos com núcleos deslocados e aderidos à membrana citoplasmática. Algumas hemácias apresentaram micronúcleo.

A figura 49 representa cortes do material referente aos girinos em processo de recuperação, sendo que estes ficaram sem contato como o extrato do cultivo de cianobactérias por um período de 03 (três) e 15 (quinze) dias.

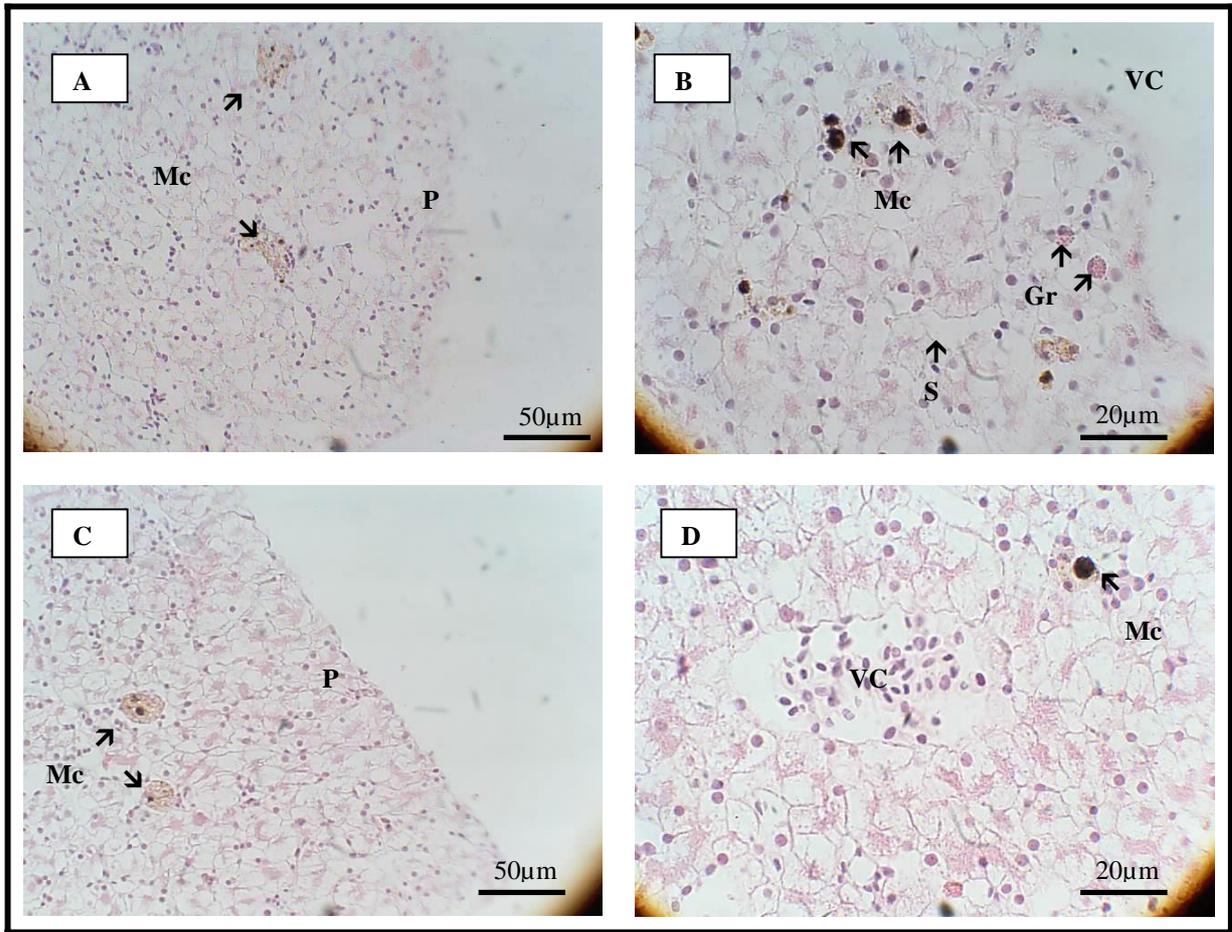


Figura 49. Cortes transversais de fígado de girino em recuperação após 03 e 15 dias sem contato com o extrato de cultivo de *M. aeruginosa*. A – Visão periférica do órgão de animal em recuperação de 03 dias (20X), B – Macrófagos e granulócitos em animais sem exposição por 03 dias (40X), C – Periferia do órgão mostrando macrófagos em aumento de 20X após 15 dias sem exposição e D – Visão de veia centrolobular enrugada (40X). P – Periferia do órgão, Mc – Macrófagos, Gr – Granulócitos, S – Sinusóide, VC – Veia Central.

Na figura 49 (A) uma visão geral do órgão que apresenta periferia necrosada e macrófagos polinucleados. Ocorrem ainda sinusóides dilatados e hepatócitos muito vacuolizados. Em (B), um detalhe de uma veia central com falha no endotélio e macrófagos e granulócitos que diminuem de tamanho, mas continuam presentes em grande número.

Nas fotos (C) e (D) uma comparação de regiões similares as das fotos (A) e (B), evidenciando uma melhora na estrutura da periferia do órgão (C) quando comparado a (A), apesar de ainda apresentar hepatócitos vacuolizados. A figura (C) também mostra uma melhor definição dos limites da luz da veia central, bem como uma diminuição no tamanho dos macrófagos.

4.2.2 – Análises Histológicas de Trato Gastrointestinal (TGI)

Foram montadas pranchas a partir das amostras de TGI, focando as estruturas mais atingidas pela ação da [D-Leu] MCYST-LR. A figura 50 evidencia as estruturas normais de TGI do grupo controle (fotos (A) e (B)) analisado e dos indivíduos expostos por 3 (três) dias ao cultivo (fotos (C) e (D)).

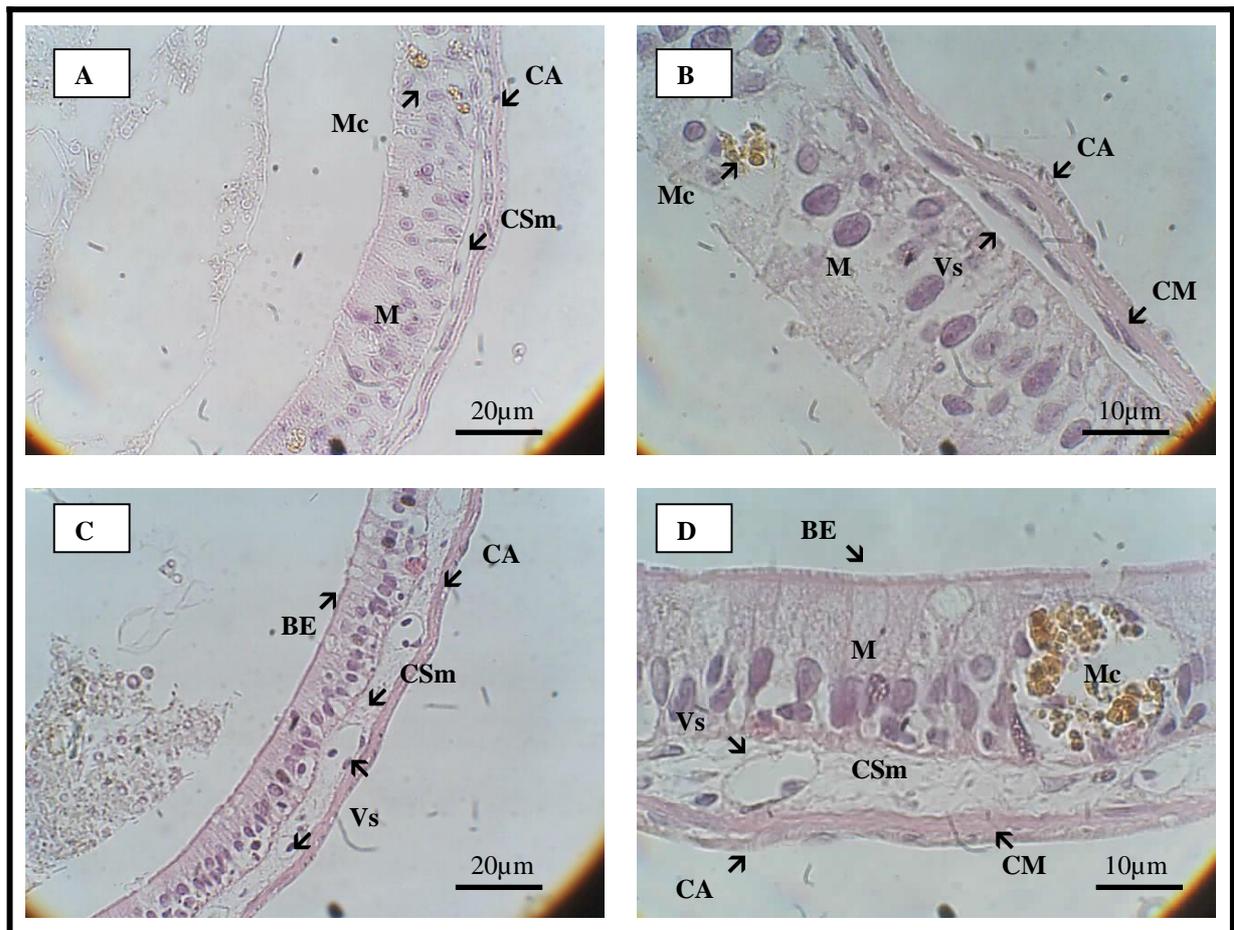


Figura 50. Cortes longitudinais de TGI de girino controle e exposto por 3 dias ao extrato do cultivo de *M. aeruginosa*. A – Integridade das camadas do órgão de animal controle em um aumento de 40X, B – Camadas do órgão em animal controle (100X), C – Visão em aumento de 40X de órgão de animal exposto por 3 dias e D – Visão bordadura estriada das células absorvitivas do órgão exposto por 3 dias (100X). CA – Camada Adventícia, CSm – Camada Submucosa, M – Mucosa, Mc – Macrófago, Vs – Vaso, BE – Bordadura Estriada, CM – Camada Muscular.

A figura 50 ((A) e (B)) apresenta uma visão geral da estrutura do órgão de girino controle, evidenciando as camadas que o compõe. Destaca-se a morfologia do epitélio pavimentoso da camada serosa e o epitélio cilíndrico simples da mucosa, ambos formados por células bem coradas, homogêneas e com núcleo bem definido. A camada da submucosa apresenta células igualmente bem coradas com núcleos bem definidos. É evidente a camada muscular, bem corada e definida (B).

Na foto (C) e (D) da figura estão representados cortes de animais expostos por 3 dias ao extrato do cultivo de *M. aeruginosa*. Em (C) estão visíveis diversos vasos na camada da submucosa. Em detalhe bem aparente, a bordadura estriada das células absorvitivas. Em (D) um aumento maior da camada mucosa, evidenciando macrófago polinucleado e bordadura estriada das células.

A figura 51 evidencia as principais modificações ocasionadas pela ação da [D-Leu] MCYST-LR no trato gastrointestinal do grupo exposto por 06 (seis) dias (fotos (A) e (B)), e 09 (nove) dias (fotos (C) e (D)) ao extrato do cultivo de *M. aeruginosa*.

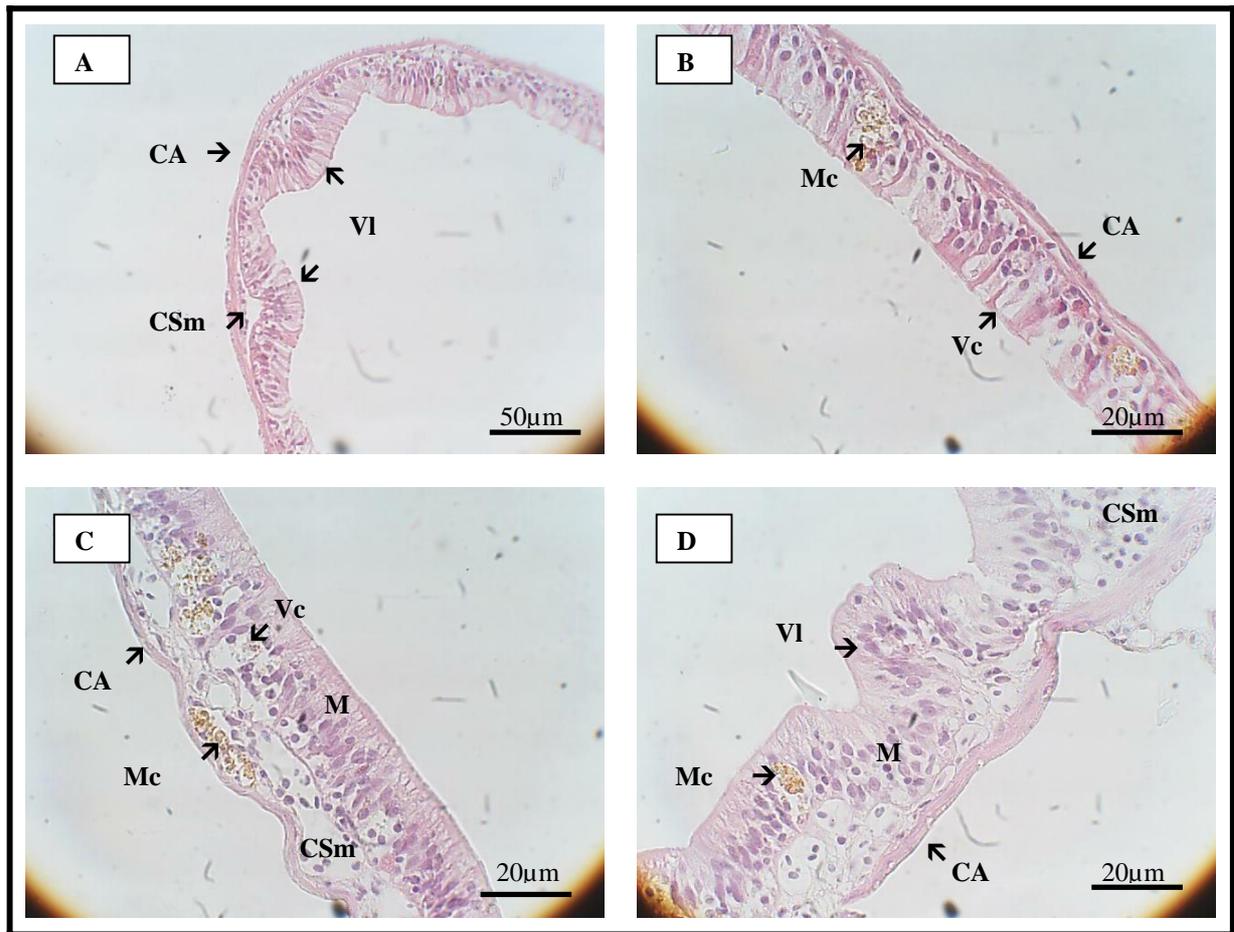


Figura 51. Cortes longitudinais de TGI de girino exposto por 06 e 09 dias ao extrato do cultivo de *M. aeruginosa*. A – Vilosidades e alongamento das células em aumento de 20X, B – Vacúolos e perda de adesão células (40X), C – Visão em aumento de 40X de órgão de animal exposto por 09 dias e D – Vilosidades e vasos do órgão de animal exposto por 09 dias (40X). CA – Camada Adventícia, CSm – Camada Submucosa, VI – Vilosidades, Mc – Macrófago, Vc- Vacúolo, M – Mucosa.

A figura 51 ((A) e (B)) evidencia algumas modificações ocasionadas pela ação da [D-Leu] MCYST-LR no trato gastrointestinal dos girinos expostos por 06 (seis) dias ao extrato do cultivo. As células epiteliais da mucosa apresentam um aspecto alongado e alguns vacúolos em seus ápices. Estão presentes macrófagos polinucleados, e deformações nas células absorvitivas indicam perda de adesão.

Em (C) e (D) um corte de TGI de animal exposto por 09 (nove) dias ao extrato de cultivo. Não ocorrem muitas diferenças entre esses dois tratamentos quanto à estrutura do órgão, sendo evidente apenas o aumento do número e tamanho de macrófagos na camada da submucosa, bem como um espessamento da mesma.

São evidenciadas na figura 52 modificações mais significativas ocasionadas pela ação da [D-Leu] MCYST-LR no TGI do grupo exposto ao extrato do cultivo de *M. aeruginosa* por 12 (doze) dias (fotos (A) e (B)), e 15 (quinze) dias (foto (C) e (D)).

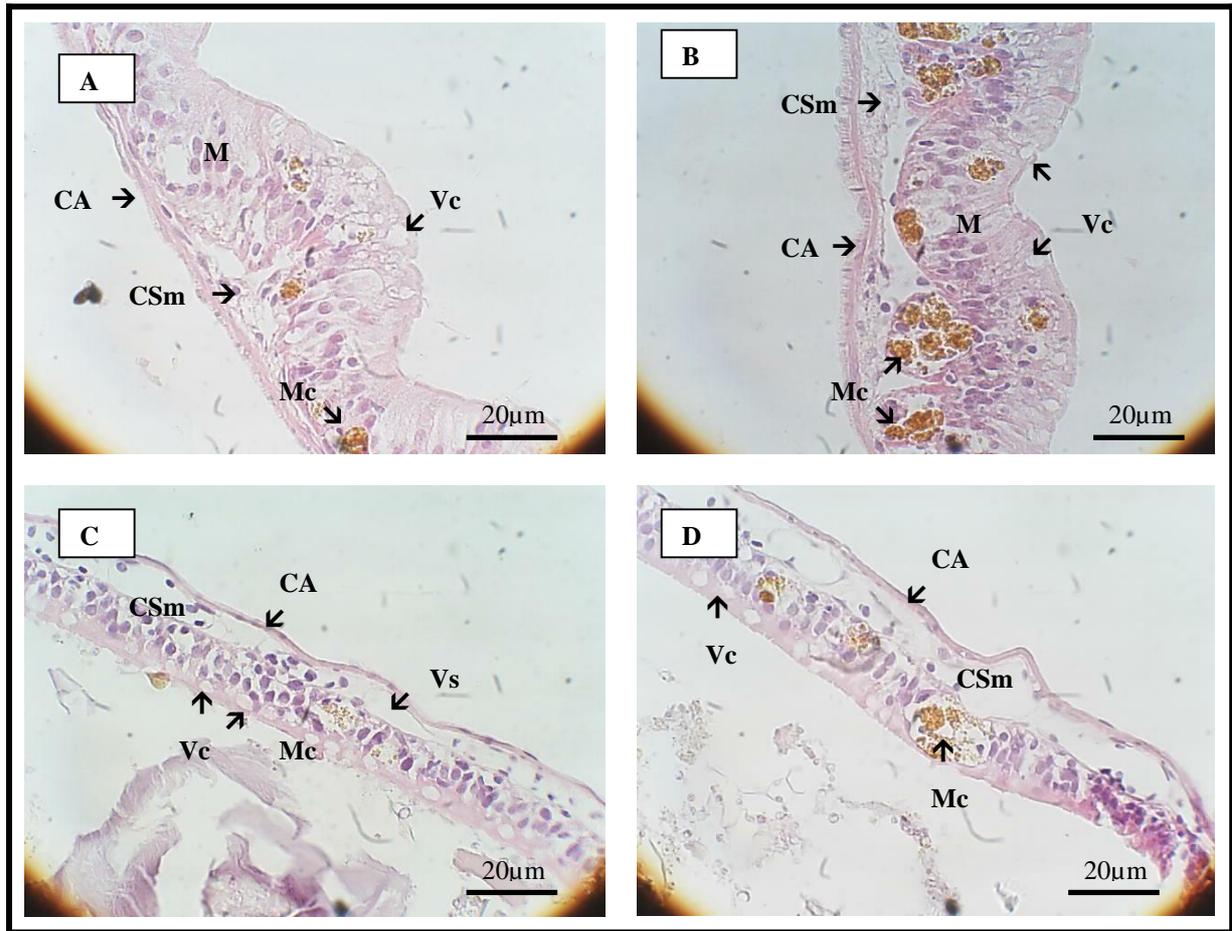


Figura 52. Cortes longitudinais de TGI de girino exposto por 12 e 15 dias ao extrato do cultivo de *M. aeruginosa*. A – Vilosidade e alongamento das células em aumento de 40X, B – Vacúolos e perda de adesão células, macrófagos (40X), C – Visão em aumento de 40X de órgão de animal exposto por 15 dias e D – Vacúolos e vasos do órgão de animal exposto por 15 dias (40X). CA – Camada Adventícia, CSm – Camada Submucosa, M –Mucosa, Mc – Macrófago, V- Vacúolos, Vs - Vaso.

Uma visão geral do órgão é apresentada na figura 52 ((A) e (B)), mostrando os danos causados na mucosa, aumento no número de macrófagos polinucleados, deformações nas células absorptivas que mostram perda de adesão e delimitação e uma diminuição na espessura da camada da submucosa que dificulta a definição das camadas.

Nas fotos (C) e (D) a quantidade de macrófagos se mantém apesar do tamanho das células diminuir. Em (D), nota-se um espessamento na camada da submucosa, voltando também a tornar-se evidente os vasos sanguíneos na mesma. Contudo a ocorrência de vacúolos na mucosa ainda é expressiva.

A figura 53 representa cortes do material referente aos girinos em processo de recuperação, estando estes sem contato com o extrato do cultivo de *M. aeruginosa* por um período de 03 (três) dias ((A) e (B)), e 15 (quinze) dias ((C) e (D)).

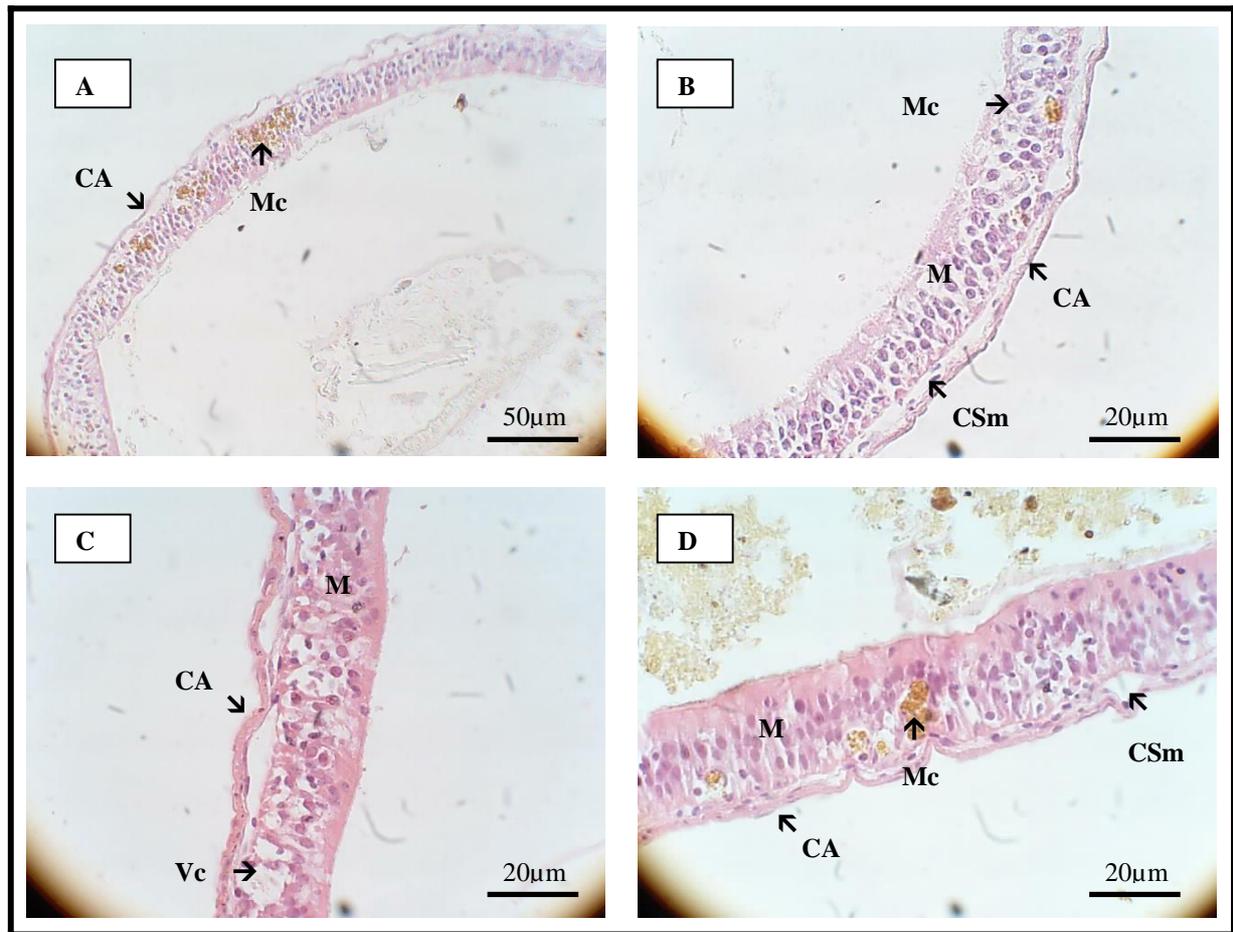


Figura 53. Cortes transversais de TGI de girino em recuperação após 03 e 15 dias sem contato com o extrato de cultivo de *M. aeruginosa*. A – Visão periférica do órgão de animal em recuperação de 03 dias (20X) , B – Perda de adesão e delimitação de células absorptivas em animais sem exposição por 03 dias (40X), C – Estrutura das camadas com células melhor delimitadas 40X após 15 dias sem exposição e D – Camadas melhor definidas com células absorptivas melhor estruturadas (40X). CA – Camada Adventícia, Mc – Macrófago, M – Mucosa, CSm – Camada Submucosa, Vc- Vacúolo.

Uma visão geral do órgão é mostrada na figura 53 ((A) e (B)), evidenciando a continuidade dos danos descritos anteriormente.

Nas fotos (C) e (D) a quantidade e o tamanho dos macrófagos diminuem. A adesão e delimitação das células absorptivas ainda é limitada Os vasos sanguíneos se mantêm estreitos, bem como a parede, como um todo, se apresenta delgada.

4.2.3 – Análises Histológicas de Músculo

Foram montadas pranchas das amostras referentes a músculo enfatizando as estruturas mais atingidas pela ação da [D-Leu] MCYST-LR. A figura 54 evidencia as estruturas normais de músculo do grupo controle analisado e do grupo tratado por 03 dias com o extrato do cultivo de cianobactéria.

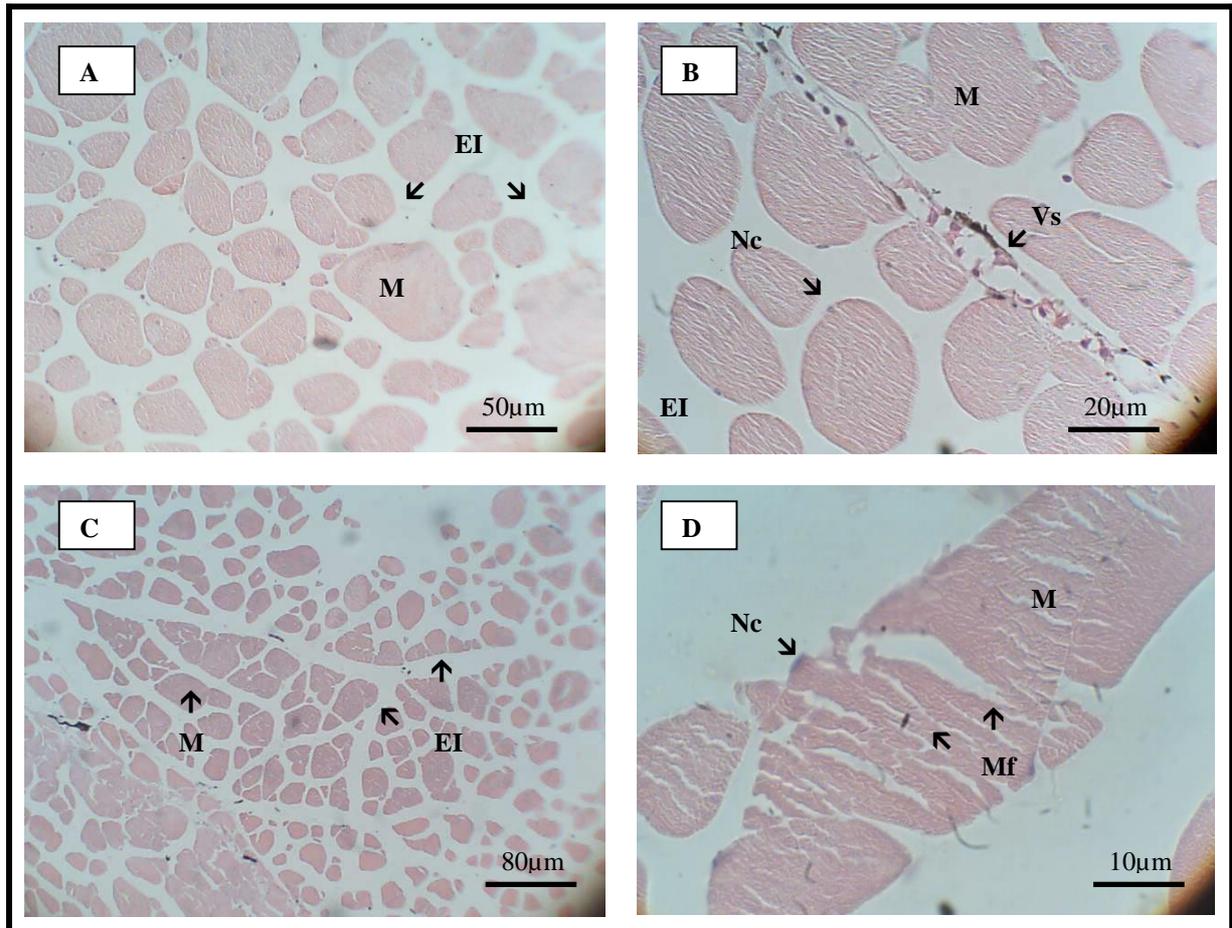


Figura 54. Cortes transversais de músculo de girino controle e exposto por 03 dias em diferentes aumentos. A – Visão geral do tecido (20X), B – Visão em aumento de 40X, C – Visão em aumento de 10X evidenciando as fibras musculares e D – Visão em aumento de 100X mostrando os núcleos do miócitos. EI – Espaços Intercelulares, M – Miócitos, Nc – Núcleo, Vs – Vaso, Mf – Miofibrilas.

Nas fotos (A) e (B) observa-se uma visão geral do tecido de animal controle, evidenciando a organização e as delimitações celulares. A coloração das células é boa, mostrando os núcleos dispostos periféricamente nas células e vaso sanguíneo em (B). Os espaços intercelulares são homogêneos e as fibras musculares que compõe as células estão unidas.

A figura 54 (C) e (D) representa cortes do material referente aos girinos expostos por 3 (três) dias ao extrato do cultivo de *M. aeruginosa*. Em (C) é evidenciado um maior espaçamento entre as fibras que apresentam um aspecto homogêneo. Em (D) ocorre um efeito semelhante a um processo de perda de adesão intercelular, como se as células estivessem desfiadas, os núcleos apresentam coloração fraca.

A figura 55 representa cortes do material referente aos girinos expostos por 06 (seis) dias (fotos (A) e (B)), e 09 (nove) dias (fotos (C) e (D)) ao extrato do cultivo de *M. aeruginosa*.

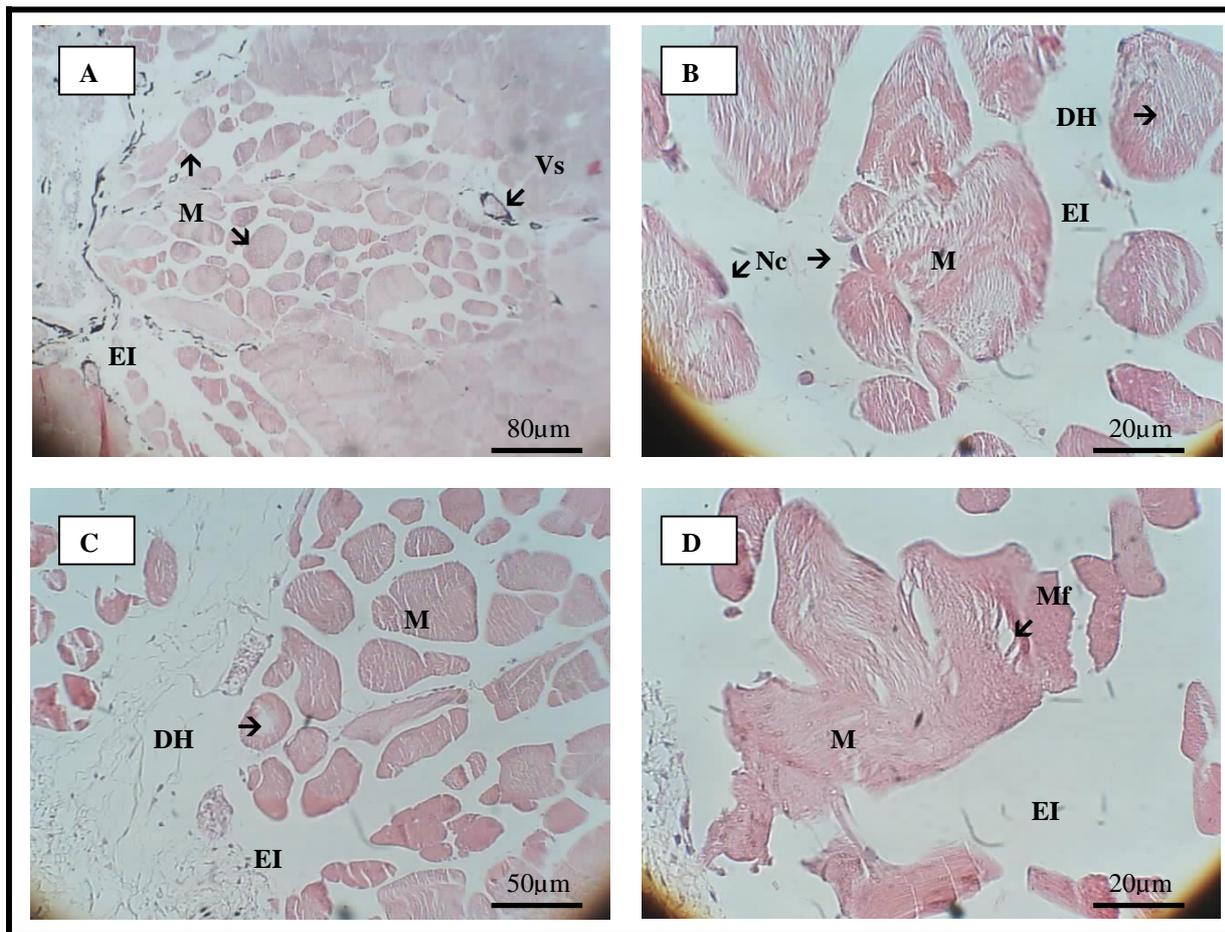


Figura 55. Cortes transversais de músculo de girino expostos por 06 e 09 dias ao extrato do cultivo de *M. aeruginosa*. A – Corte de tecido exposto por 03 dias ao extrato do cultivo em um aumento de 10X, B – Tecido exposto por 03 dias em um aumento de 40X, C – Visão de tecido exposto por 09 dias (20X), D – Corte de tecido exposto por 09 dias em aumento de 40X. EI – Espaços Intercelulares, M – miócitos, Vs – Vaso, Nc – Núcleo, DH – Degradação Hialina, Mf – Miofibrilas

A figura 55 (A) apresenta uma visão geral da estrutura do tecido em corte transversal, evidenciando o aspecto homogêneo das fibras musculares e um vaso circundado por macrófagos. Em (B) um detalhe mostrando os feixes de fibras musculares dispersos. Os núcleos apresentam coloração fraca. Em (C), uma visão geral do tecido com detalhe para a ocorrência de degradação, bem como o aumento dos espaços intercelulares em algumas regiões do tecido. Em (D) detalhe em maior aumento.

A figura 56 representa cortes do material referente aos girinos expostos por 12 (doze) (fotos (A) e (B)), e 15 (quinze) dias (fotos (C) e (D)) ao extrato do cultivo de *M. aeruginosa*.

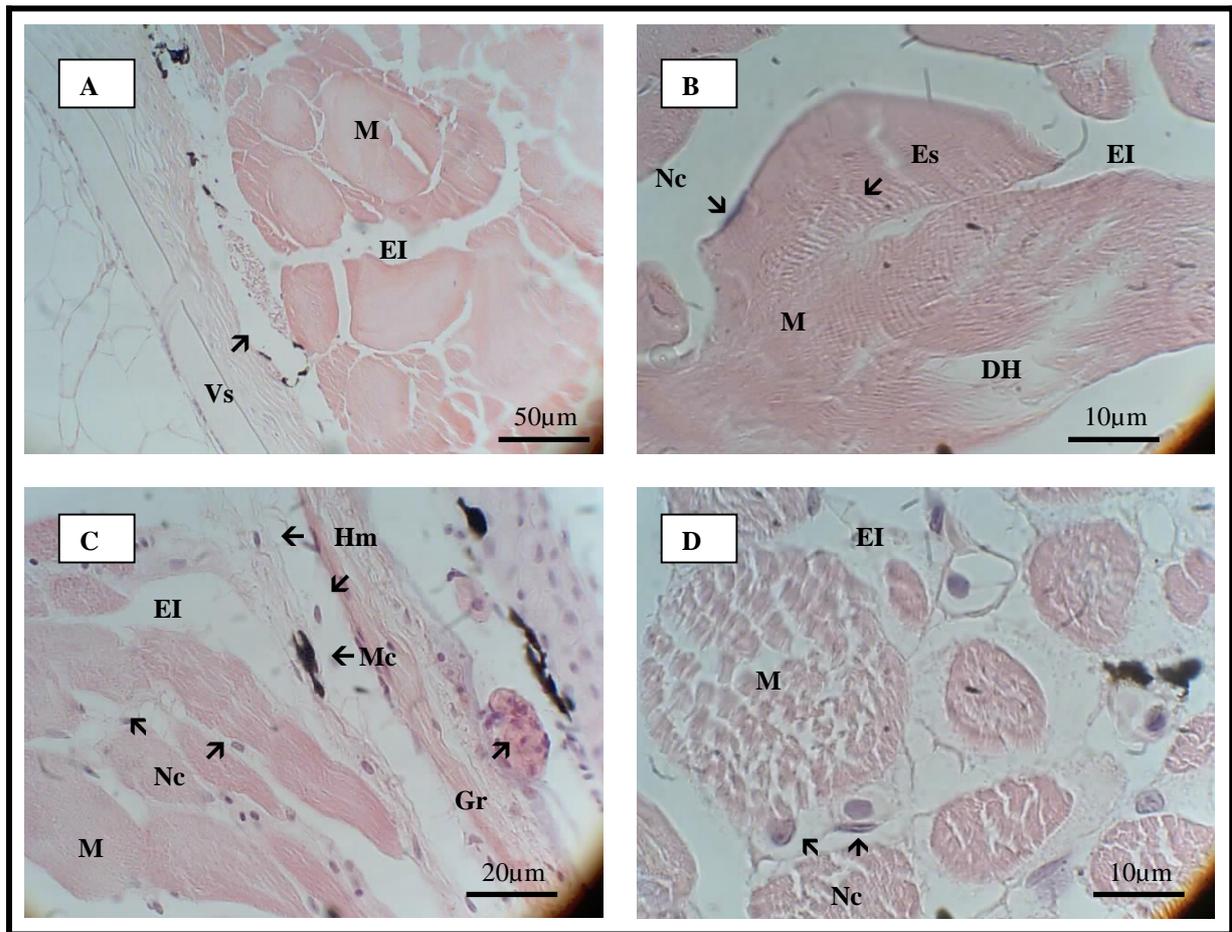


Figura 56. Cortes transversais e longitudinais de músculo de girino expostos por 12 e 15 dias ao extrato do cultivo de *M. aeruginosa*. A – Corte transversal de tecido exposto por 12 dias (20X), B – Corte longitudinal de tecido exposto por 12 dias em um aumento de 100X, C – Corte longitudinal de tecido exposto por 15 dias em aumento de 40X, D – Corte transversal de tecido exposto por 15 dias em aumento de 100X. EI – Espaços Intercelulares, M – Miócitos, Vs – Vaso, Nc – Núcleo, Es – Estrias, DH – Degradação Hialina, Hm – Hemácias, Gr – Granulócitos, Mc – Macrófagos.

A figura 56 (A) apresenta uma visão geral da estrutura do tecido em corte transversal, evidenciando o aspecto homogêneo e um vaso fracamente delimitado. Em (B) um detalhe do núcleo apresentando coloração fraca e evidenciando feixes de fibras musculares dispersos, contudo é visível a estrutura das estrias das fibras musculares.

Em (C) uma visão geral do tecido com detalhe para a presença de hemácias, evidenciando uma hemorragia, bem como macrófagos e granulócitos no conjuntivo que circunda o tecido. Em (D) evidencia-se a célula com coloração fraca com núcleos arredondados e cromatina frouxa.

A figura 57 representa cortes do material referente aos girinos submetidos ao processo de recuperação, estando estes sem contato como o extrato do cultivo de cianobactérias por um período de 03 (três) e 15 (quinze) dias.

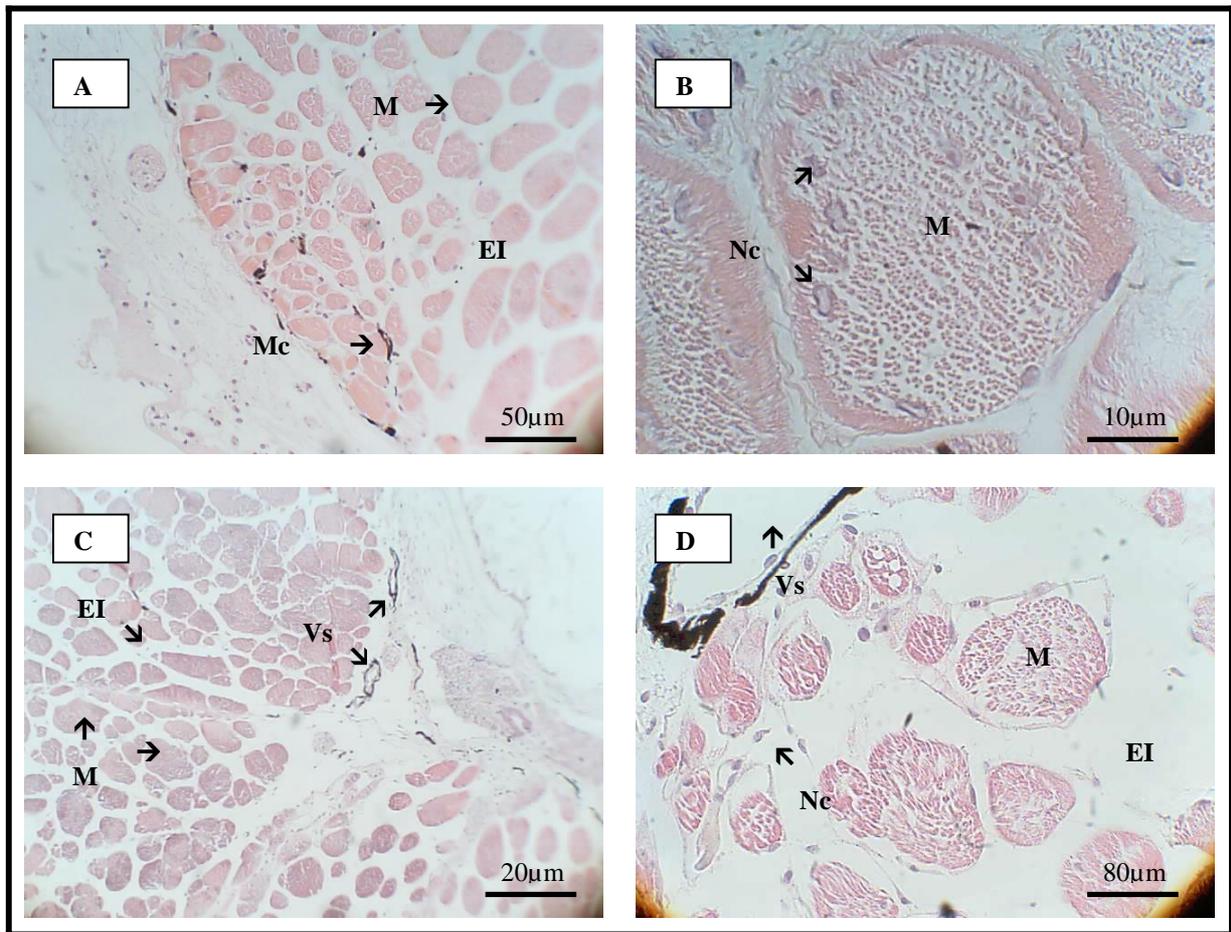


Figura 57. Cortes transversais de músculo de girino sem exposição (recuperação) após 03 e 15 dias em diferentes aumentos. A – Visão de tecido em recuperação após 03 dias sem exposição ao cultivo em um aumento de 20X, B – Visão de tecido em recuperação após 03 dias (100X), C – Visão de tecido em recuperação após 15 dias sem exposição em aumento de 40X, D – Corte de tecido em recuperação após 15 dias sem exposição em aumento de 10X. EI – Espaços Intercelulares, M – Miócitos, Mc – Macrófagos, Nc - Núcleo, Vs – Vaso.

Na foto (A) da figura 57 fica evidente a ação da [D-Leu] MCYST-LR na musculatura estriada. Os espaços intercelulares ainda são pronunciados, e ocorre um aumento no número de macrófagos no conjuntivo entre as fibras musculares. Em (B) um detalhe de corte transversal do tecido mostrando os espaços entre as fibras, bem como os núcleos com cromatina frouxa e pouco corada.

Em (C) uma visão geral do tecido que aparenta uma melhora estrutural, diminuindo os espaços intercelulares e a presença de vasos no conjuntivo, apesar das células ainda mostrarem um aspecto homogêneo.

Na foto (D), pode-se observar um vaso circundado por macrófagos e danos, como o aumento do espaço intercelular, a diminuição do calibre das fibras musculares e o aspecto enrugado e desfiado da musculatura.

1 – Caracterização das cianotoxinas da linhagem NPLJ-4

A MCYST apresenta uma estrutura básica de ciclo-(D-alanina¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-glutamato⁶-Mdha⁷), em que X e Z representam L-aminoácidos variáveis, D-MeAsps corresponde a D-eritro-β-metil ácido aspártico e Mdha equivale a N-metildehidroalanina. Adda representa um aminoácido exclusivo de cianobactérias caracterizado por: (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienóico (Botes *et al.* 1982 (B); Moore *et al.*, 1991, Rinehart *et al.*, 1994; Sivonen, 1996). (Figura 58).

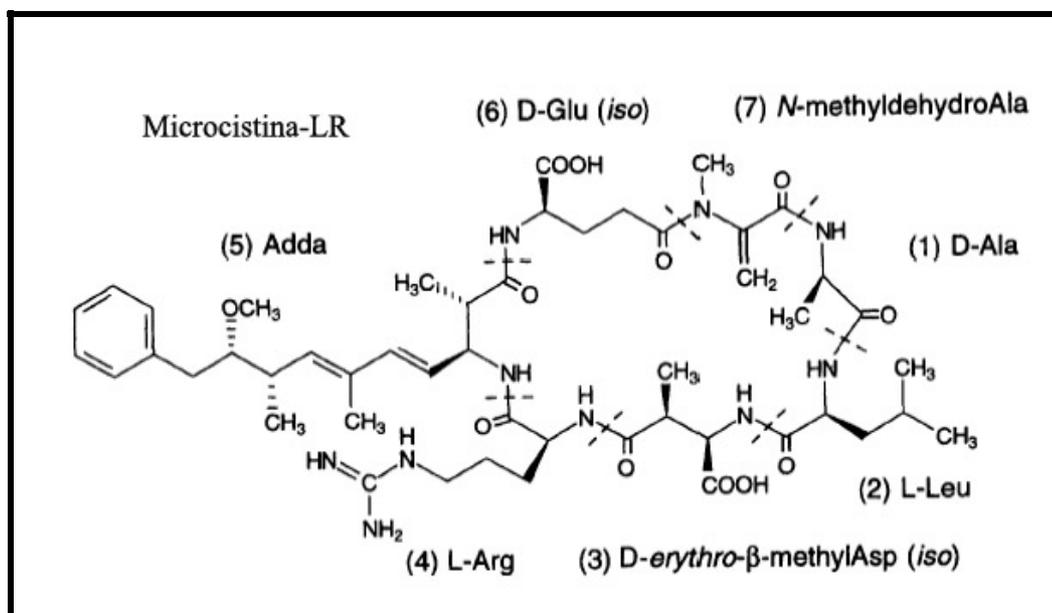


Figura 58. Estrutura molecular da Microcistina-LR. Adaptado de Höger, 2003.

Foram encontradas 05 (cinco) variações de MCYST na linhagem NPLJ-4. A produção de diferentes variáveis pela mesma linhagem de cianobactéria foi anteriormente registrada (Watanabe *et al.*, 1988; Luukkainen *et al.*, 1994; Vasconcelos *et al.*, 1996; Brittain *et al.*, 2000; Lee & Chou, 2000; Fastner *et al.*, 2001; Oudra *et al.*, 2001; Barco *et al.*, 2004), mostrando que essas toxinas apresentam modificações pós-traducionais como desmetilações, acilações e variações entre isômeros, que alteram e potencializam a ocorrência de novas estruturas referentes a essa cianotoxina (Namikoshi *et al.*, 1992; Brittain *et al.* 2000; Oudra *et al.*, 2001; Barco *et al.*, 2004).

Apesar de ser comum a ocorrência de desmetilações e acilações nas moléculas de MCYSTs, ainda não foi esclarecida a função dessas moléculas, havendo, entretanto, teorias que propõe que elas sejam armas biológicas, moléculas mensageiras (Christoffersen *et al.*, 1996; Rohrlack *et al.*, 1999; Kaebernick & Neilan, 2001), ou que auxiliariam na manutenção hierárquica dentro dos habitats que esses microrganismos ocupam (Tillet *et al.*, 2000).

O primeiro relato de produção da variante [D-Leu] MCYST-LR por *Microcystis aeruginosa* se deu no Brasil, quando Matthiensen e colaboradores (2000) detectaram essa variante como sendo a mais abundante em uma floração ocorrida no estuário da Lagoa dos Patos em Dezembro de 1996.

Uma segunda descrição da mesma variante de MCYST ocorreu no Lago Pakowki no Canadá, após estudos que tentavam identificar a causa de mortes de pássaros recorrentes desde 1995 (Park *et al.*, 2001).

Para elucidar a estrutura e seqüência dessa variante de MCYST-LR foram realizados estudos por meio de HPLC, espectrometria de massa e ressonância nuclear magnética. As análises dos dados obtidos por esses estudos definiram este composto como tendo um componente de massa em 1037,6 (M+H⁺) e apresentando a estrutura equivalente a um heptapeptídeo cíclico (-Leu¹-Leu²-d-Masp³-l-Arg⁴-Adda⁵-d-Glu⁶-Mdha⁷) cuja fórmula molecular corresponde a C₅₂ H₈₀O₁₂N₁₀. (Matthiensen *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001). A única diferença estrutural entre a variante [D-Leu] MCYST-LR e a MCYST-LR é a substituição de uma Alanina (Ala) por uma Leucina (Leu) na posição 1 da molécula, o que acarreta a diferença na massa molecular de 42 unidades de

massa desses compostos, em que o primeiro apresenta m/z equivalente a 1037,6 (M+H⁺) e o segundo 995 (M+H⁺) (Park *et al.*, 2001). (Figura 59).

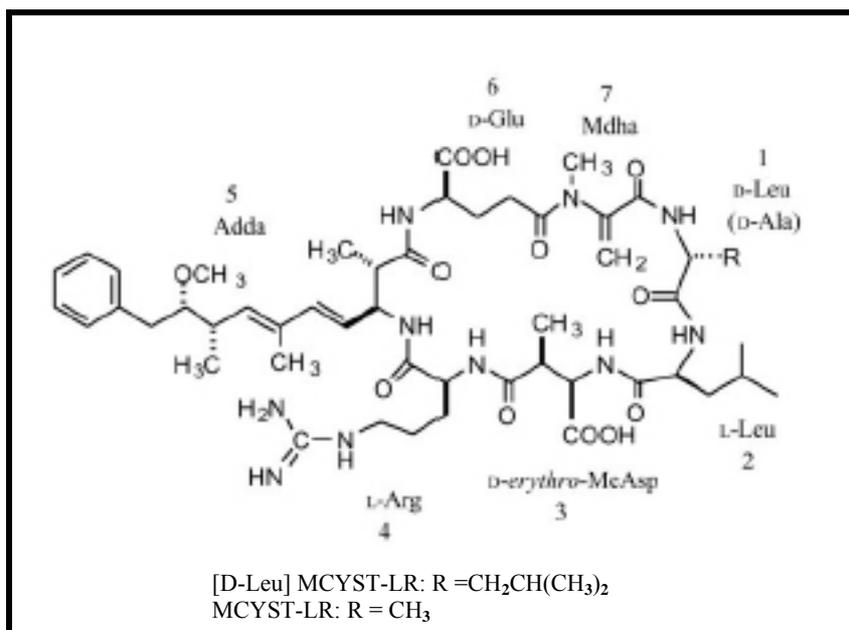


Figura 59. Estrutura molecular referente a [D-Leu] MCYST-LR. Estrutura retirada com modificações de Park *et al.*, 2001.

Além das análises para esclarecer a estrutura molecular da [D-Leu] MCYST-LR estudos foram realizados para avaliar a toxicidade desta cianotoxina. Foram feitos bioensaios com injeções intra-peritoniais em camundongos e PPIA que comprovaram os efeitos previamente descritos para MCYST-LR (Matthiensen *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001).

A dose letal mínima determinada pelo bioensaio em camundongos foi de 100 µg/kg (peso fresco) para MCYST-LR e [D-Leu] MCYST-LR, evidenciando a toxicidade dessa variante de MCYST (Matthiensen *et al.*, 2000).

A cinética de inibição da atividade de proteína fosfatase *in vitro* das duas toxinas purificadas no estudo realizado por Matthiensen e colaboradores em 2000 apresentou valores próximos de IC₅₀ equivalentes a 4,43 nM para a [D-Leu] MCYST-LR e 3,12 nM para MCYST-LR, confirmando resultados anteriores obtidos com MCYST-LR em estudos realizados por MacKintosh e colaboradores em 1990.

A presença dos fragmentos com massa equivalente a 595,260Da (Mdha-Leu-Leu-MeAsp-Arg) e 512,062Da (Leu-Leu-MeAsp-Arg) nos espectrogramas de massa referentes aos Picos A (1023Da) e B (1037Da) demonstram a presença de duas Leucinas nas posições 1 e 2, sugerindo assim a presença de [D-Leu] MCYST-LR (Matthiensen *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001).

Somente os picos referentes aos componentes de massa 1071Da do Pico A, 1023Da do Pico B e 1037Da do Pico C foram fragmentados, pois acreditamos que estes sejam isômeros de massa, e a fragmentação dos mesmos não forneceria mais informações.

2 – Análises por meio de HPLC dos extratos animais

2.1 – Análises dos extratos de órgão e tecidos de girinos de *R. catesbeiana* expostos às células de *M. aeruginosa*

2.1.1- Grupos Expostos

Foi detectada a presença de MCYST apenas no extrato de fígado de girino com exposição de 2 (dois) dias. Três hipóteses podem ser levantadas com base na bibliografia analisada: a formação de compostos conjugados de MCYST-glutathione e MCYST-cisteína, um baixo limite de detecção do sistema de HPLC e a não bioacumulação de cianotoxina pelos animais.

Formação de conjugado e oxidação da toxina

As enzimas glutathione transferases (GSTs) representam uma família de proteínas estruturalmente similares e relacionadas aos processos de desintoxicação presentes em todos os seres vivos incluindo bactérias, vertebrados e plantas. Essas proteínas catalizam reações entre GSH e um grande número de compostos endógenos (espécies de oxigênio reativo-ROS) ou exógenos (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) que apresentam sítios eletrofilicos. Essas proteínas apresentam polimorfia gênica significativa que pode ser dividida em três variantes principais, o alelo nulo que não apresenta atividade, o heterozigoto que expressa baixa atividade, e o homozigoto dominante que determina a produção de proteínas que capacitam o organismo à resistência e capacidade de recuperação rápidas (Miller *et al.*, 2001; Strange *et al.*, 2001; Carletti *et al.*, 2003).

Acredita-se que a família das GST-transferases está envolvida em diversos processos de desintoxicação causados por xenobióticos, e também àqueles relacionados à resistência aos quimioterápicos do câncer, inseticidas, herbicidas e antibióticos (Miller *et al.*, 2001; Strange *et al.*, 2001; Carletti *et al.*, 2003).

Estudos sugerem a formação de conjugados de MCYST-glutathione e MCYST-cisteína em fígado de animais expostos a esta toxina, originando um composto mais polar, que seria mais facilmente eliminado pelo organismo (Pflugmacher *et al.*, 1998; Pietsch *et al.*, 2001). Sugere-se que após a formação desse conjugado, o mesmo é transportado para os rins e intestino para excreção. (Ito *et al.*, 2002).

A formação do conjugado de glutathione (GSH) e MCYST-LR é sintetizada enzimaticamente por meio da glutathione-S-transferase solúvel (GSTs), e foi relatada sua ação nos processos de desintoxicação em diferentes organismos aquáticos como plantas (*Ceratophyllum demersum*), invertebrados (*Dreissena polymorpha*, *Daphnia magna*), ovas de peixes e peixes (*Danio rerio*) (Pflugmacher *et al.*, 1998; Pietsch *et al.*, 2001). Acredita-se que a formação desse conjugado MCYST-GSH seja a primeira etapa no processo de desintoxicação de cianotoxinas em organismos aquáticos. (Pflugmacher *et al.*, 1998).

Em outro estudo é relatado que hepatócitos expostos a MCYST apresentaram um aumento inicial de GSH, seguido de uma redução em seus níveis celulares, sugerindo que o papel da GSH na conjugação inicial à MCYST, pode provocar um aumento na síntese de GSH, que é possivelmente ativado pela transcrição de glutamilsteína sintetase (Gehring *et al.*, 2004).

Outros autores correlacionam a exposição a MCYST e desintoxicação ao aumento no estresse oxidativo em cultura de hepatócitos de ratos, em peixe da espécie *Corydoras paleatus* e no tecido do caranguejo *Chasmagnathus granulatus*, fato comprovado pelo aumento nas taxas de consumo do oxigênio, alteração do metabolismo de glicogênio no fígado de *C. paleatus* e no hepatopâncreas de *C. granulatus*, e inibição de GST em todos os órgãos de *C. paleatus* (Ding *et al.*, 1998; Cazenave *et al.*, 2006 e Dewes *et al.*, in press).

Sendo a GSH uma das principais substâncias não enzimáticas relacionadas a antioxidação, e estando presente na primeira fase de proteção contra espécies de oxigênio reativo (ROS), a conjugação de MCYST e GSH representaria uma depleção de GSH intracelular, promovendo o aumento no estresse oxidativo.

Todos esses fatores abordados nos estudos acima dificultariam a identificação de MCYST presente nos tecidos, tanto pela ausência de padrão para o conjugado MCYST-GSH em análises de HPLC, quanto pela possibilidade dos girinos em estudos apresentarem altas taxas de eliminação de MCYST.

Limite de detecção da técnica de HPLC

O limite de detecção do método provavelmente é superior a quantidade de MCYST acumulada nos tecidos, o que inviabiliza a visualização da mesma nas análises de HPLC. Resultados semelhantes foram obtidos por Magalhães e colaboradores (2001), ao avaliar a bioacumulação de MCYST em *Tilapia rendalli* utilizando o método ELISA na detecção da cianotoxina em músculo, e HPLC nas amostras de fitoplâncton e demais tecidos. As análises de músculo foram positivas para a presença de MCYST, enquanto que em algumas amostras de víscera e fígado a toxina não foi detectada.

Como observado no trabalho de Magalhães *et al.*, 2001, ocorrem diferenças à sensibilidade do método, evidenciando que análises utilizando ELISA são mais sensíveis, apesar de algumas vezes apresentarem resultados cruzados ou falsos positivos (Oudra *et al.*, 2001; Lei *et al.*, 2004).

Em outro estudo, Magalhães *et al.*, 2003 realizaram a detecção de MCYST presentes nas amostras de água, peixe e crustáceos por meio de ELISA e obtiveram resultados positivos de bioacumulação em todas as amostras. Soares e colaboradores em 2004 avaliaram a acumulação e depuração de MCYST em *Tilapia rendalli* apenas por meio de ELISA e detectaram a referida cianotoxina em todas as amostras. Além do ELISA, técnicas de HPLC e espectrometria de massa foram eficazes na detecção de MCYST em fígado de carpas com tratamento intraperitoneal (Li *et al.*, 2005).

Cazenave e colaboradores em 2005 realizaram estudos de absorção, distribuição tecidual e acumulação de MCYST-RR em tecidos e órgãos de peixes adotando técnicas de HPLC ratificadas por espectrometria de massa e obtiveram resultados positivos de detecção.

Estudos de dinâmica de diferentes MCYSTs (MCYST-LR e MCYST-RR) em carpas prateadas utilizando técnicas de HPLC evidenciaram diferenças na

detecção entre as amostras de tecidos analisados. Fato explicado pelos autores como sendo uma diferença na absorção de MCYSTs nos diferentes tecidos (Xie *et al.*, 2004).

Cieslinski em 2003 recomenda que a técnica da cromatografia líquida de alta eficiência pode ser utilizada para análises de uma varredura preliminar da MCYST em uma amostra, contudo deve ser utilizada, preferencialmente associada à espectrometria de massa, pois permite a separação e identificação simultânea de MCYSTs presentes em uma amostra (Cieslinski, 2003).

Uma outra alternativa para se detectar concentrações menores seria a adoção de espectrometria de massa que apresenta um limite de detecção mais sensível que o HPLC. Contudo, para este estudo não houve a possibilidade de utilizar técnicas cruzadas (HPLC+ELISA) devido à indisponibilidade de padrão para imunodeteção.

Não bioacumulação da cianotoxina pelos animais

A taxa de eliminação pelos girinos pode ser alta, o que suprimiria a níveis baixos a concentração de [D-Leu] MCYST-LR nos órgãos e tecido analisados.

Estudos analisando a dinâmica de diferentes MCYSTs (MCYST-LR e MCYST-RR) em carpas prateadas utilizando técnicas de HPLC evidenciaram diferenças de detecção entre as amostras de tecidos analisados (Xie *et al.*, 2004).

Sugerimos que os girinos não bioacumulam MCYST, apesar dos dados referentes a histopatologia comprovarem a ação citotóxica nos órgãos e tecidos analisados. Provavelmente esses animais apresentam uma taxa de eliminação alta e eficientes estratégias fisiológicas como a formação de conjugados MCYST-glutathione e MCYST-cisteína sugeridas por Pflugmacher *et al.*, 1998; Pietsch *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2002; Gehringer *et al.*, 2004 ou oxidação da toxina (Ding *et al.*, 1998; Cazenave *et al.*, 2006 e Dewes *et al.*, in press).

2.2 – Análises de órgãos e tecido de girinos de *R. catesbeiana* expostos ao extrato do cultivo de *M. aeruginosa*

2.2.2- Grupos Expostos

Não foi detectada a presença de [D-Leu] MCYST-LR em nenhum extrato de órgão ou tecido analisado (Figuras 24 a 33). As mesmas hipóteses que justificam a não detecção no material anterior podem ser empregadas para a esta fase do experimento.

3 – Microscopia de Luz

As hepatotoxinas são internalizadas nos hepatócitos através dos receptores dos ácidos biliares (Falconer, 1991). Uma vez dentro da célula, promovem a desorganização dos filamentos intermediários e de actina (Runnegar *et al.*, 1986), por meio de processos inibidores de resíduos de serina e treonina das proteínas fosfatases PP1, PP2A e PP3A e PP6 (MacKintosh *et al.*, 1990; Honkanen *et al.*, 1994; Toivola & Eriksson, 1999).

Foi comprovado *in vitro* que as MCYSTs interagem com proteínas fosfatases em um nível molecular (Zhang *et al.*, 1996; Bagu *et al.*, 1997), ligando-se covalentemente a cisteína-273 (Cys-273) da PP1C e cisteína-266 (Cys-266) da PP2Ac via o terminal N-metil dehidroalanina (Goldberg *et al.*, 1995; MacKintosh *et al.*, 1995; Campos *et al.*, 1996). Essa inibição da atividade enzimática foi observada como sendo resultado de uma interação não covalente, que é mediada pelo sítio hidrofóbico Adda da seqüência das MCYSTs e íons de hidrogênio. (Namikoshi *et al.*, 1989; Rudolph-Böhner *et al.*, 1994).

A ação direta das MCYSTs nas membranas celulares foi evidenciada como uma inibição de síntese protéica, seguida por uma mobilização de glicose-6-fosfato (Claeysens *et al.*, 1993, Claeysens *et al.*, 1995). Ocorre também uma depleção nas taxas de glutatona após administração dessa cianotoxina, enquanto que as concentrações de glicose e cálcio citoplasmático em hepatócitos aumentavam. (Runnegar *et al.*, 1991). Foi observado também que o estresse oxidativo está associado a hepatotoxicidade das MCYSTs, como relatado em estudos realizados com ratos tratados com MCYST que apresentaram lesões celulares provavelmente ocasionados por danos nas mitocôndrias (Ding *et al.*, 1998, Cazenave *et al.*, 2005; Dewes *et al.*, in press).

Ghosh *et al.*, (1995) mostraram o colapso dos filamentos de actina do citoesqueleto ocorrem em hepatócitos de rato, que segundo Macias-Silva & Garcia-Sainz (1994), pode causar alterações nas ligações das proteínas-G e fosfolipases C, reduzindo o *turnover* dessas proteínas nos hepatócitos desses animais.

Estudos para avaliar os efeitos carcinogênicos de NOD, relataram a indução de expressão de TNF- α e genes relacionados a proliferação e controle da apoptose celular (Ohta *et al.*, 1994; Sueoka *et al.*, 1997). Além desses efeitos, a atividade promotora de tumor das hepatotoxinas, em especial as MCYSTs, pode estar relacionada também a inibição de PP2A, visto que essa fosfatase é um regulador negativo das proteínas quinases com atividade mitogênica (MAP quinases) que atuam em processos de proliferação celular e inibição de apoptose, fatores diretamente ligados à formação de tumores (Hunter *et al.*, 1995; Holmstrom *et al.*, 1998).

Mutações no códon K-ras 12 em linhagem RSA (Suzuki *et al.*, 1998) e fragmentação aleatória e degradação do DNA foram induzidos após injeções i.p. de MCYST-LR em camundongos, e exposição de culturas de células BHK (baby hamster kidney cells) e fibroblastos embrionários de camundongos a toxina, ação provavelmente atribuída à ativação de endonucleases (Rao & Bhattacharya, 1996; Rao *et al.*, 1998).

Experimentos avaliando a ação teratogênica de MCYSTs em embriões de peixes (*Oryzias latipes*) por meio de microinjeções, mostraram os efeitos da toxina na formação hepática dos animais, como a hipertrofia do fígado e hemorragia hepática, também evidenciadas nos embriões não eclodidos (Jacquet *et al.*, 2004).

Estudos com embriões não eclodidos de *Xenopus laevis* expostos a MCYSTs não relataram efeitos teratogênicos nem inibição do crescimento nos estágios posteriores ao tratamento. Acredita-se que a ausência de inibição das proteínas fosfatases não seja atribuída a uma insensibilidade ou resistência do animal à toxina, visto que são relatados efeitos dose-dependentes em cultura de células (Fischer & Dietrich, 2000), mas sim a uma impermeabilidade da membrana coriônica a MCYST, sugerindo que a intoxicação deve ser realizada por via oral (Fischer & Dietrich, 2000).

Relatos de toxicidade renal de MCYSTs foram comprovados em diferentes sistemas celulares (Khan *et al.*, 1996) e *in vivo* em peixes (Rabergh *et al.*, 1991; Kotak *et al.*, 1996; Fischer e Dietrich, 2000) e mamíferos (Hooser *et al.*, 1989, Nobre *et al.*, 1999; Nobre *et al.*, 2001; Milutinovic *et al.*, 2002). Sendo caracterizados efeitos no córtex e medula do órgão, ações sugeridas pela atuação da toxina na fosfolipase 2A e ciclooxigenase (Nobre *et al.*, 2001).

3.1 - Exposição de girinos de *R. catesbeiana* às células de *M. aeruginosa*

3.1.1 - Análises Histológicas de Fígado

Foi observada hipertrofia do fígado relacionada ao tempo de exposição dos animais às células de *M. aeruginosa*, que durante período de regeneração diminuiu, aproximando-se ao tamanho do fígado dos animais. Resultados semelhantes foram obtidos em estudo com camundongos da linhagem BALB/c submetidos a injeções i.p. de MCYST (Shen *et al.*, 2003).

Modificações na coloração e textura do fígado também foram notadas, sendo caracterizadas por variação de tonalidade vermelho escuro e textura firme a tons ocre e aspecto quebradiço ao final do tempo de exposição, voltando a uma coloração mais avermelhada ao final do período de regeneração.

As análises histológicas realizadas no fígado dos girinos expostos às células de *M. aeruginosa* evidenciaram os efeitos hepatotóxicos da [D-Leu] MCYST-LR. Foi observada uma desestruturação da periferia do órgão, evidenciando que o aporte principal da toxina ocorreu da periferia para o centro, contrário aos resultados relatados por Ito e colaboradores (2001). Esse fato contraditório pode ser explicado pela forma de aporte de sangue no fígado dos girinos de *R. catesbeiana*, que não é centralizado em um grande vaso, mas sim em vasos de menor calibre distribuídos pelo parênquima do órgão.

A perda de adesão celular e alargamento de sinusóides são justificadas pela ação inibidora da fosfatases da cianotoxina (Eriksson *et al.*, 1990 (B); Ohta *et al.*, 1992; Runnegar *et al.*, 1995), e são relatadas estudos com ratos (Solter *et al.*, 1998) e camundongos (Ito *et al.*, 2001). A hemorragia observada no fígado (Figura 34 C e D) de girinos expostos à células de *M. aeruginosa*, causada pela desestruturação dos capilares sinusóides, foi anteriormente relatada por Shen *et al.* em 2003.

Além dos efeitos citados anteriormente, modificações na estrutura das hemácias e alterações morfológicas nas veias centrolobulares, foram observadas ao longo do experimento. Sugerimos que os efeitos observados nas hemácias são explicados pela ação inibidora de fosfatases da MCYST (Macias-Silva & Garcia-Sainz, 1994; Ghosh *et al.*, 1995).

3.1.2 - Análises Histológicas de Trato Gastrointestinal (TGI)

As análises histológicas realizadas nos tratos gastrointestinais dos girinos expostos ao cultivo de *M. aeruginosa* evidenciaram os efeitos diretos da [D-Leu] MCYST-LR nas paredes do órgão. Esses relatos complementam os efeitos citotóxicos restritos a mucosa do trato gastrointestinal de camundongos observados por Ito *et al.*, 2001, e a detecção de MCYST no epitélio e tecido conjuntivo das vilosidades (Botha *et al.*, 2004; Huynh-Delerme *et al.*, 2005).

O aumento cíclico de granulócitos e macrófagos ao longo da exposição sugere períodos de regeneração em determinados instantes do experimento. Esse fato pode ser explicado pela descamação natural do intestino que deve ocorrer a cada 2 ou 3 dias. Estudos avaliando a proliferação de células do sistema imune em camundongos (linhagem BALB/c) expostos intraperitonealmente a MCYST sugerem que a toxina não influencia no número de células (Shen *et al.*, 2003), o que contradiz os resultados obtidos com girinos expostos às células de *M. aeruginosa*.

Os danos causado na mucosa podem ser justificados pela ação inibidora da fosfatases da cianotoxina (Eriksson *et al.*, 1990 (B); Ohta *et al.*, 1992; Runnegar *et al.*, 1995) que desestabiliza o citoesqueleto da células culminando na perda de adesão e em alterações morfológicas das mesmas (Macias-Silva & Garcia-Sainz, 1994; Ghosh *et al.*, 1995).

Falhas na bordadura estriada do epitélio do TGI foram observadas nesse experimento, de acordo com relatos de perda das microvilosidades encontrados por Hooser *et al.*, 1989.

3.1.3 - Análises Histológicas de Músculo

As análises histológicas realizadas nos tecidos dos girinos expostos ao cultivo de *M. aeruginosa* evidenciaram os efeitos citotóxicos da [D-Leu] MCYST-LR nas fibras musculares estriadas.

O aspecto geral observado pode ser explicado pela ação inibidora de fosfatases da hepatotoxina anteriormente comprovada por Falconer (1991) e Lambert *et al.*, (1994).

Foi evidenciada também a desestabilização do citoesqueleto dos miócitos que perderam a forma, aumentando assim os espaços intercelulares, ação mencionada também por Dawson (1998) e Haider *et al.*, (2003).

As análises do tecido de girinos submetidos a recuperação mostram uma regeneração do tecido, caracterizada pela reestruturação das fibras, e um aumento no número de macrófagos, evidenciando a tentativa de recuperação tecido degenerado como foi relatado por Gehringer *et al.*(2004).

Os efeitos citotóxicos da [D-Leu] MCYST-LR podem ser extrapolados para esse tecido, deixando evidente a ação direta no citoesqueleto das células como mencionado em estudos propostos por Macias-Silva & Garcia-Sainz (1994) e Ghosh *et al.*, (1995) com hepatócitos.

3.2 - Exposição de girinos de *R. catesbeiana* ao extrato de *M. aeruginosa*

3.2.1 - Análises Histológicas de Fígado

Foi observada, igualmente ao tratamento com células de *M. aeruginosa*, uma hipertrofia do fígado de girinos expostos a MCYST livre. Resultados semelhantes foram obtidos em estudo com camundongos da linhagem BALB/c submetidos a injeções i.p. de MCYST (Shen *et al.*, 2003).

Foram relatadas também modificações na coloração e textura do fígado, sendo caracterizadas por variação de tonalidade vermelho escuro e textura firme a tons ocre e aspecto quebradiço ao final do tempo de exposição, voltando a uma coloração mais avermelhada ao final do período de regeneração.

Os danos causados nos animais expostos ao extrato de *M. aeruginosa* foram semelhantes aos observados naqueles tratados com células íntegras, sendo entretanto, mais lentos e severos. Sugere-se, a partir desses dados, que girinos de *Rana catesbeiana* apresentam um processo de desintoxicação rápido e uma regeneração lenta, devido aos danos causados pela exposição a [D-Leu] MCYST-LR que apresentou efeitos tão tóxicos quanto os já relatados para MCYST-LR.

Os efeitos observados como, a perda de adesão celular e rompimento de sinusóides obtidos no presente estudo, são justificadas pela ação inibidora da fosfatases da cianotoxina (Eriksson *et al.*, 1990 (B); Ohta *et al.*, 1992; Runnegar *et al.*, 1995), e são relatadas estudos com ratos (Solter *et al.*, 1998) e camundongos (Ito *et al.*, 2001).

Ocorrência de necrose do tecido hepático, desestabilização do endotélio sinusoidal e formação de vacúolos nos hepatócitos observada com maior intensidade na exposição ao extrato de *M. aeruginosa*, ratifica os resultados obtidos em estudos anteriores (Hooser *et al.*, 1989; Eriksson *et al.*, 1990 (B); Ito *et al.*, 1997), e comprovam a citotoxicidade de [D-Leu] MCYST-LR.

A observação de hemácias com micronúcleo no fígado de girino exposto a [D-Leu] MCYST-LR livre, é um importante relato da genotoxicidade desse composto, e foi anteriormente descrito em camundongos tratados com injeções i.p. de MCYST (Rao & Bhattacharya, 1996; Rao *et al.*, 1998).

3.2.2 - Análises Histológicas de Trato Gastrointestinal (TGI)

Apesar de não ter sido encontrado vestígios no TGI dos animais expostos a MCYST livre, sugere-se que a via principal de exposição foi via oral, visto que os animais apresentaram lesões semelhantes às observadas no tratamento com células, justificando a ação da toxina sobre o órgão.

As lesões no TGI de girinos expostos ao extrato de células foram mais expressivas e duradouras, resultados que podem ser justificados pelo aumento no tempo e contato direto com a [D-Leu] MCYST-LR, visto que a toxina estava livre na água.

Foi possível identificar lesões e desorganização das camadas, principalmente mucosa, mesmo no período de recuperação dos animais após 15 dias sem contato com a [D-Leu] MCYST-LR. Fato característico a uma intoxicação por composto de ação rápida e intensa, e anteriormente relatado por Hooser *et al.* em 1989.

3.2.3 - Análises Histológicas de Músculo

Os efeitos no músculo dos animais expostos ao extrato do cultivo foram mais intensos quando comparados com aqueles expostos às células íntegras, provavelmente pelo aumento no tempo de exposição de 10 para 15 dias.

Os danos se mantiveram até o período de recuperação e em alguns animais foram detectados danos expressivos, como deformidade de miócitos (Falconer, 1991; Lambert *et al.*, 1994; Dawson, 1998; Haider *et al.*, 2003; Ohta *et al.*, 1992; Runnegar *et al.*, 1995) e presença de degradação hialina pronunciada, mesmo após 15 dias sem contato com o extrato de células (Figura 57 (C) e (D)).

Os efeitos citotóxicos da [D-Leu] MCYST-LR podem ser extrapolados para o músculo, deixando evidente a ação direta no citoesqueleto das células, como mencionado em estudos propostos por Macias-Silva & Garcia-Sainz, (1994) e Ghosh e colaboradores (1995) com hepatócitos.

3.3 - Comparação entre os efeitos obtidos nos diferentes tratamentos adotados e regeneração

Em ambos os casos, as alterações na organização e morfologia das amostras de órgãos e tecido expostos às células e ao extrato foram basicamente as mesmas, estando centralizadas na desestabilização do citoesqueleto como ação direta da inibição de proteínas fosfatases pela cianotoxina (Eriksson *et al.*, 1990 (B); Honkanen *et al.*, 1990; MacKintosh *et al.*, 1990; Falconer, 1991; Macias-Silva & Garcia-Sainz, 1994; Honkanen *et al.*, 1994; Ghosh *et al.*, 1995 e Toivola & Eriksson, 1999).

A bibliografia analisada ratifica, em sua maioria, os efeitos citotóxicos observados nesse estudo de exposição de girinos a [D-Leu] MCYST-LR, anteriormente relatados em diversos tipos celulares (Falconer, 1991; Lambert *et al.*, 1994; Ito *et al.*, 1997; Dawson, 1998; Solter *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 2002 e Haider *et al.*, 2003), com exceção de Tencalla e colaboradores (1994) que relata danos causados apenas em fígado de *Oncorhynchus mykiss*.

O prolongamento dos danos é também resultado da chegada da toxina ao intestino após a passagem pelo fígado e posterior eliminação na bile sob a forma de um conjugado MCYST-GSH (Gehring *et al.*, 2004).

A observação de micronúcleos nas hemácias de girinos expostos ao extrato de *M. aeruginosa* é nova, e ratifica os resultados anteriores de genotoxicidade em camundongos submetidos a injeções i.p. de MCYST que apresentaram fragmentação e degradação do DNA (Rao & Bhattacharya, 1996; Rao *et al.*, 1998).

Estudos avaliando os efeitos de células íntegras de *M. aeruginosa* e MCYST livre dissolvida na água por períodos mais longos de exposição podem ser realizados para avaliar melhor os efeitos a longo prazo, visto que em bibliografia analisada não foi encontrado um estudo comparando os efeitos da exposição à células e MCYST livre em girinos de *R. catesbeiana*.

Conclusão

- I. Os estudos realizados nessa pesquisa permitem extrapolar os efeitos citotóxicos da hepatoxina para outros tecidos, como músculo e TGI. Deixando evidente que a ação direta no citoesqueleto não ocorre apenas nos hepatócitos.
- II. Para uma detecção mais sensível de MCYST em órgãos e tecidos é sugerida a aplicação simultânea de técnicas como PDA-HPLC e espectrometria de massa
- III. Com base nos resultados de PDA-HPLC e histologia, sugere-se que girinos de *Rana catesbeiana* apresentam um processo de desintoxicação rápido, contudo a regeneração desses animais é lenta, devido aos danos causados pela exposição a [D-Leu] MCYST-LR que apresentou efeitos tão tóxicos quanto os já relatados para MCYST-LR.
- IV. Sugerimos que a [D-Leu] MCYST-LR apresenta efeito genotóxico, devido à observação de micronúcleos em hemácias presentes no fígado de girinos expostos ao extrato de *Microcystis aeruginosa*.
- V. Os girinos são bons bioindicadores para avaliação de citotoxicidade, visto que os resultados histopatológicos observados foram similares aos relatados em bibliografia.

Referências Bibliográficas

- AMORIM A., VASCONCELOS V. Dynamics of microcystins in the mussels *Mytilus galloprovincialis*. **Toxicon**, 37: 1041-1052. 1999.
- AZEVEDO S.M.F.O., CARMICHAEL W.W., JOCHIMSEN E.M., RINEHART K.L., LAU S., SHAW G.R., EAGLESHAM G.K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicology**, 181-182: 441-446. 2002.
- BARCO M., FLORES C., RIVERA J., CAIXACH J. Determination of microcystin variants and related peptides present in a water bloom of *Planktothrix (Oscillatoria) rubescens* in a Spanish drinking water reservoir by LC/ESI-MS. **Toxicon**, 44: 881-886. 2004.
- BAGU J.R., SYKES B.D., CRAIG M.M., HOLMES C. A molecular basis for different interactions of marine toxins with protein phosphatase-1 - Molecular models for bound motuporin, microcystins, okadaic acid, and calyculin A. **Journal of Biological Chemistry**, 272: 5087-5097. 1997.
- BEHMER O.A., FREITAS NETO A.G., TOLOSA E.M.C. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo, SP. **Edart**, 241 p. 1976.
- BELL S., CODD G. Cyanobacterial toxins and human health. **Reviews in Medical Microbiology**, 5: 256-264. 1994.
- BOUAÏCHA, N. Impact Sanitaire des Toxines de Cyanobactéries en Milieu d'eau Douce. **Revue Française des Laboratoire**, 336: 39-46. 2001.
- BOTES D.P., KRUGER H., VILJOEN C.C. Isolation and characterization of four toxins from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon**, 20: 945-954. 1982 (A).
- BOTES D.P., VILJOEN C.C., KRUGER H., WESSELS P.L., WILLIAMS D.H. Configuration assignments of the amino acid residues and the presence N-methyldehydroalanine in toxins from the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon**, 20: 1037-1042. 1982 (B).
- BOTHA N., VAN de VENTER M., DOWING T.G., SHEPARD E.G., GEHRINGER M.M. The effect of intraperitoneally administered microcystin-LR on the gastrointestinal tract of BALB/c mice. **Toxicon**, 43: 251-254. 2004.
- BRANCO C.W. A comunidade fitoplanctônica e a qualidade da água no Lago Paranoá,

- Brasília, DF, Brasil. **Tese de doutorado, Univ. Brasília**, p. 341, 1991.
- BRITTAIN S., MOHAMED Z.A., WANG J., LEHMANN V.K., CARMICHAEL W.W., RINEHART KL. Isolation and characterization of microcystins from a river Nile strain of *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont. **Toxicon**, 38: 1759-1771. 2000.
- CAMPOS M., FADDEN P., ALMS G., QIAN Z., HAYSTEAD T.A.J. Identification of protein phosphatase-1-binding proteins by microcystin- biotin affinity chromatography. **Journal of Biological Chemistry**, 271: 28478-84. 1996.
- CARLETTI E., DE LUCA A., URBANI A., SACCHETTA P, DI ILIO C. Sigma-class glutathione transferase from *Xenopus laevis*: molecular cloning, expression, and site-directed mutagenesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 419: 214–221. 2003.
- CARMICHAEL W.W., BEASLEY V., BUNNER D.L., ELOFF J.N., FALCONER I., GORHAM P., HARADA K-I., KRISHNAMURTHY T., MIN-JUAN Y., MOORE R.E., RINEHART K., RUNNEGAR M., SKULBERG O.M., WATANABE M. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). **Toxicon**, 26 (11): 971-973. 1988.
- CARMICHAEL W.W., MAHMOOD N.A, HYDE E.G. Natural toxins from cyanobacteria. In: Marine Toxins, Origin, Structure, and Molecular Pharmacology, vol ACS Symposium Series 418 (Hall S, Strichartz G, eds). Washington, DC: **American Chemical Society**, 87-106. 1990.
- CARMICHAEL W.W., FALCONER I.R. Diseases related to freshwater blue-green algal toxin, and control measures. In: Falconer, I.R., ed. **Algal toxins in seafood and drinking water**. London, Academic Press, p. 187-209, 1993.
- CARMICHAEL W.W. The toxins of cyanobacteria. **Sci. Am.**, New York, 270: 64-70. 1994.
- CARMICHAEL W.W., AZEVEDO S.M.F.O., LAU S., RINEHART K.L., JOCHIMSEN E.M., HOLMES C.E.M., SILVA Jr J.B. Analysis for microcystins involved in an outbreak of liver failure and death of human at a hemodialysis center Caruaru, Pernambuco-Brazil. **IV Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia**, p. 85-86. 1996.
- CARMICHAEL W.W., AZEVEDO S.M.F.O., AN J.S., MOLICA R.J., JOCHIMSEN E.M., LAU S., RINCH K.L., SHAW G.R., EAGLESHAM G.K. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environ.**

- Health Perspect.**, 109: 663–668. 2001.
- CAZENAVE J., WUNDERLIN D.A, BISTONI M.A., AMÉ M.V., KRAUSE E., PFLUGMACHER WIEGAND C. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*. A field and laboratory study. **Aquatic Toxicology**, 75 178–190. 2005.
- CAZENAVE J., BISTONI M.A., PESCE S.F., WUNDERLIN D.A. Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. **Aquatic Toxicology**, 76: 1–12. 2006.
- CHEMGAPPA M.M., PACE L.W., McLAUGHLIN B.G. Blue-green algae (*Anabaena spiroides*) toxicosis in pigs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 194: 1724-1725. 1989.
- CHORUS I., BARTRAM J. Toxic Cyanobacteria in Water – A guide to their public health consequences, monitoring and management. **WHO**, 1999.
- CHRISTOFFERSEN K. Effect of microcystin on growth of single species and on mixed natural populations of heterotrophic nanoflagellates. **Natural Toxins**, 4: 215-220. 1996.
- CIESLINSKI A.H. Ocorrência de microcistinas em mananciais utilizados para o abastecimento público e de centros de hemodiálise no Brasil. **Dissertação de mestrado**, Universidade de Brasília. 2003.
- CLAEYSSSENS S., CHEDEVILLE A., LAVOINNE A. Inhibition of protein phosphatases activates glucose-6-phosphatase in isolated rat hepatocytes. **FEBS Letters**, 315: 7-10. 1993.
- CLAEYSSSENS S., FRANÇOIS A., CHEDEVILLE A., LAVOINNE A. Microcystin-LR induced an inhibition of protein synthesis in isolated rat hepatocytes. **Biochemistry Journal**, 306: 693-696. 1995.
- DAWSON R.M. The Toxicology of microcystins. **Toxicon**, 36(7): 953-962. 1998.
- DEWES L.J., SANDRINI J.Z., MONSERRAT J.M., YUNES J.S. Biochemical and physiological responses after exposure to microcystins in the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Brachyura). **Ecotoxicology and Environmental Safety** In Press, Corrected Proof.
- DING W.X., SHEN H.M., ZHU H.G., ONG C.N. Studies on oxidative damage induced by cyanobacteria extract in primary cultured rat hepatocytes. **Environmental Research, Section A**, 78: 12-18. 1998.

- DITTMANN E., ERHARD M., KAEBERNICK M., SCHELER C., NEILAN B.A., VON DOHREN H., BORNER T. Altered expression of two light-dependent genes in a microcystin- lacking mutant of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. **Microbiology**, 147: 3113-3119. 2001.
- DONE S.H., BAIN M. Hepatic necrosis in sheep associated with ingestion of blue-green algae. **Veterinary Record**, 133: 600. 1993.
- DVORAKOVA D., DVORAKOVA K., BLAHA L., MARSALEK B., KNOTKOVA Z. Effects of cyanobacterial biomass and purified microcystins on malformations in *Xenopus laevis*: teratogenesis assay (FETAX). **Environ Toxicol**, 17(6): 547-55. 2002.
- DUELLMAN W.E., TRUEB L. Biology of Amphibians. **The Johns Hopkins University Press**, Baltimore and London, 1994.
- ERIKSSON J.E., GRÖNBERG L., NYGARD S., SLOTTE J.P., MERILUOTO J.A.O. Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1025: 60-66. 1990 (A).
- ERIKSSON J.E., TOIVOLA D., MERILUOTO J.A.O., KARAKI H., HAN Y.G., HARTSHORNE D. Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 173: 1347-1353. 1990 (B).
- ESTEVEZ F.A. Fundamentos de limnologia. **Ed. Interciencia**, 2^a ed. 602p. 1998.
- FALCONER IR. Tumor promoting and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria environmental toxicology and water quality: **An International Journal**, 6: 77-184. 1991.
- FASTNER J., ERHARD M., DÖHREN, H. Determination of Oligopeptide Diversity within a Natural Population of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) by Typing Single Colonies by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **Applied and environmental microbiology**, Nov. 2001, 5069–5076. 2001.
- FELIX M.A., COHEN P., KARSENTI E. Cdc2 H1 kinase is negatively regulated by a type 2A phosphatase in the *Xenopus* early embryonic cell cycle: evidence from the effects of okadaic acid. **EMBO Journal**, 9: 675-83. 1990.
- FERRÃO-FILHO A.S., SUZUKI B.K., AZEVEDO S.M.F.O. Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community. **Aquatic Toxicology**, 59: 201–208. 2002.

- FISCHER W.J., DIETRICH D.R. Toxicity of the cyanobacterial cyclic heptapeptide toxins microcystin-LR and -RR in early life-stages of the African clawed frog (*Xenopus laevis*). **Aquatic Toxicology**, 49: 189–198. 2000.
- FITZGERALD S.D., POPPENG R.H. Toxicosis due to microcystin hepatotoxins in three Holstein heifers. **Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation**, 5: 651-653. 1993.
- FUJIKI H., SUGANUMA M., YOSHIZAWA S., KANAZAWA H., SUGIMURA T., MANAM S., KAHN S.M., JIANG W., HOSHINA S., WEINSTEIN I.B. Codon 61 mutations in the c-Harvey-ras gene in mouse skin tumors induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene plus okadaic acid class tumor promoters. **Molecular Carcinogenesis**, 2: 184-187. 1989.
- FUJIKI H. Is the inhibition of protein phosphatase 1 and 2A activities a general mechanism of tumor promotion in human cancer development? **Molecular Carcinogenesis**, 5: 91-94. 1992.
- FUJIKI H., SUGANUMA M. Unique features of the okadaic acid activity class of tumor promoters. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. 125: 150-155. 1999.
- GEHRINGER M.M., SHEPHARD E.G., DOWNING T.G, WIEGAND C., NEILAN B.A. An investigation into the detoxification of microcystin-LR by the glutathione pathway in Balb/c mice. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 36: 931–941. 2004.
- 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**, 376: 745-753. 1995.
- GHOSH S., KHAN S.A., WICKSTROM M., BEASLEY V. Effects of microcystin-LR on actin and the actin-associated proteins alpha-actinin and talin in hepatocytes. **Natural Toxins**, 3: 405-414. 1995.
- HADDAD Jr. V., GARRONE NETO D., DE PAULA NETO J.B., MARQUES F.P.L., BARBARO K.C. Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 84 envenoming in humans and some enzymatic activities of the venom. **Toxicon**, 43(3): 287-294. 2004.
- HAIDER S., NAITHANI V., VISWANATHAN P.N., KAKKAR P. Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern. (Review). **Chemosphere**, 52: 1-21. 2003.

- HARADA K., OSHIKATA M., UCHIDA H., SUZUKI M., KONDO F., SATO K., UENO Y., YU S.Z., CHEN G., CHEN G.C. Detection and identification of microcystins in the drinking water of Haimen City, China. **Natural Toxins**, 4: 277-83. 1996.
- HITZFELD B., HÖGER S., DIETRICH D. Cyanobacterial Toxins: Removal during drinking water treatment, and risk assessment. **Environmental Health Perspectives**, 108: 113-122. 2000.
- HÖGER, S.J. Problems during drinking water treatment of cyanobacterial-loaded surface waters: Consequences for human health. Tese de doutorado, **Univ. Konstanz Gefördert, Germany**. 208 p. 2003.
- HOLMSTROM T.H., CHOW S.C., ELO I., COFFEY E.T., ORRENUIS S., SISTONEN L., ERIKSSON J.E. Suppression of Fas/APO-1-mediated apoptosis by mitogen-activated kinase signaling. **Journal of immunology**, 160: 2626-2636. 1998.
- 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. **Journal of Biological Chemistry**, 265: 19401-19404. 1990.
- HONKANEN R.E., CODISPOTI B.A., TSE K., BOYNTON A.L. Characterization of natural toxins with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatases. **Toxicon**, 32: 339-350. 1994.
- HOOSER S.B., BEASLEY V.R., LOVELL R.A., CARMICHAEL W.W., HASCHEK W.M. Toxicity of microcystin-LR, a cyclic heptapeptide from *Microcystis aeruginosa*, to rats and mice. **Veterinary Pathology**, 26: 246-252. 1989.
- HUNTER T. Protein kinases and protein phosphatases: The Ying and Yang of protein phosphorylation and signalling. **Cell**, 80: 225-236. 1995.
- HUYNH-DELERME C., EDERY M., HUET H., PUISEUX-DAO S., BERNARD C., FONTAINE J.J., CRESPEAU F., DE LUZE A. Microcystin-LR and embryo-larval development of medaka fish, *Oryzias latipes*. I. Effects on the digestive tract and associated systems. **Toxicon**, 46: 16-23. 2005.
- ITO E., KONDO F., HARADA K-I. Hepatic necrosis in a aged mice by oral administration of microcystin-LR. **Toxicon**, 36 (2): 231-239. 1997.
- ITO E., KONDO F., HARADA K-I. Intratracheal administration of microcystin-LR, and its distribution. **Toxicon**, 39 265-271. 2001.

- ITO, E.; TAKAI, A.; KONDO, F.; MASUI, H.; IMANISHI, S.; HARADA, K.I.
Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compounds. **Toxicon**, 40: 1017-1025. 2002.
- JACQUET C., THERMES V., LUZE de A., PUISEUX-DAO S., BERNARD C., JOLY J.-S., BOURRAT F., EDERY M. Effects of microcystin-LR on development of medaka fish embryos (*Oryzias latipes*). **Toxicon**, 43: 141–147. 2004.
- JAKOBI C., RINEHART K.L., NEUBER R., MEZ K., WECKESSER J. Cyanopeptolin SS, a disulphated depsipeptide from a water bloom: Structural elucidation and biological activities. **Phycologia**, 35: 111-116. 1996.
- JOCHIMSEN E.M., CARMICHAEL W.W., AN J.S., CARDO D.M., COOKSON S.T., HOLMES C.E., ANTUNES M.B., DE MELO FILHO D.A., LYRA T.M., BARRETO V.S., AZEVEDO S.M., JARVIS W.R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil [published erratum appears in **N Engl J Med** 1998 Jul 9; 339(2): 139]. **New England Journal of Medicine**, 338: 873-878. 1998.
- KAEBERNICK M., NEILAN B.A., BORNER T., DITTMAN E. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. **Applied and Environmental Microbiology**, 66: 3387-3392. 2000.
- KAEBERNICK M., NEILAN B.A. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. **FEMS Microbiology Ecology**, 35: 1-9. 2001.
- KHAN S.A., WICKSTROM M., HASCHEK W., SCHAEFFER S., GHOSH S., BEASLEY V. Microcystin-LR and kinetics of cytoskeletal reorganization in hepatocytes, kidney cells, and fibroblasts. **Natural Toxins**, 4: 206-214. 1996.
- KOTAK B.G., PREPAS E.E., HRUDEY S.E. Blue-green algal toxins in drinking water supplies-research in Alberta. **North Am. Lake Managem. Soc.**, 14: 37-40. 1994.
- KOTAK B.G., SEMALULU S., FRITZ D.L., PREPAS E.E., HRUDEY S.E., COPPOCK R.W. Hepatic and renal pathology of intraperitoneally administered microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicon**, 34(5): 517-525. 1996.
- KRIENTIZ L., BALLOT A., KOTUT K., WIEGAND C., PÜTZ S., METCALF J.S., CODD G.A., PFLUGMACHER S. Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya. **FEMS Microbiology Ecology**, 43: 141-148. 2003.

- LAI R., LIU H., LEE W.H., ZHANG Y. A novel Bradykinin-related peptide from skin secretions of toad *Bombina maxima* and its precursor containing six identical copies of the final product. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 286: 259–263. 2001.
- LAMBERT T.W., BOLAND M.P., HOLMES C.F.B, HRUDEY S.E. Quantification of the microcystin hepatotoxins in water at environmentally relevant concentrations with the protein phosphatase bioassay. **Environ. Sci. Technol.**, 28(4): 753-755. 1994.
- LAWTON L.A., EDWARDS C. Purification of microcystins. **Journal of Chromatography A**, 912: 191–209. 2001.
- LEE T-H., CHOU H-N. Isolation and identification of seven microcystins from a cultures M.TN-2 strain of *Microcystis aeruginosa*. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, 41: 197-202. 2000.
- LEI L, WU Y., GAN N., Song L. An ELISA-like time-resolved fluorescence immunoassay for microcystin detection. **Clinica Chimica Acta**, 348: 177–180. 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**, 46: 533–545. 2005.
- LOMBARDO M., PINTO F.C.R., VEIRA 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 feernandoi* (*Chroococcales*, *Cyanobacteriae*): A Brazilian toxic cyanobacterium. **Toxicon**, 47: 560-566. 2006.
- LUUKKAINEN R., NAMIKOSHI M., SIVONEN K., RINEHART K.L, NIEMELA S.I. Isolation and identification of 12 microcystins from four strains and two bloom samples of *Microcystis* spp.: Structure of a new hepatotoxin. **Toxicon**, 32 (1): 133-139. 1994.
- MACIAS-SILVA M., GARCIA-SAINZ J.A. Inhibition of hormone-stimulated inositol phosphate production and disruption of cytoskeletal structure. Effects of okadaic acid, microcystin, chlorpromazine, W7 and nystatin. **Toxicon**, 32: 105-12. 1994.
- MacKINTOSH C., BEATTIE K.A., KLUMPP S., COHEN P., CODD G.A. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A from both mammals higher plants. **FEBS Letters**, 264:

189-192. 1990.

- MacKINTOSH C., MacKINTOSH R.W. The inhibition of protein phosphatases by toxins: implications for health and an extremely sensitive rapid bioassay for toxin detection. In: Detection methods for cyanobacterial toxins, vol 149 (Codd G.A., Jefferies T.M., Keevil C.W., Potter E., eds). Cambridge, UK: **The Royal Society of Chemistry**, 90-99. 1994.
- MacKINTOSH R.W., DALBY K.N., CAMPBELL D.G., COHEN P.T., COHEN P., MacKINTOSH C. The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. **FEBS Letters**, 371: 236-240. 1995.
- MAGALHÃES V.F., SOARES R.M., AZEVEDO S.M.F.O. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. **Toxicon**, 39: 1077-1085. 2001.
- MAGALHÃES V.F., MARINHO M.M., DOMINGOS P., OLIVEIRA A.C., COSTA S.M., AZEVEDO L.O., AZEVEDO S.M.F.O. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). **Toxicon**, 42(3): 289-295. 2003.
- MARGALEF R. Limnologia. Barcelona, **Ed. Omega**. 1010p, 1983.
- MATSUNAGA H., HARADA K.I., SENMA M., ITO Y., YASUDA N., USHIDA S., KIMURA Y. Possible cause of unnatural mass death of wild birds in a pond in Nishinomiya, Japan: sudden appearance of toxic cyanobacteria. **Natural Toxins**, 7: 81-84. 1999.
- MATTHIENSEN A., BEATTIE K.A., YUNES J.S, KAYA K., CODD, G.A. [D-Leu¹] Microcystin-LR, from the cyanobacterium *Microcystis* RST 9501 and from a *Microcystis* bloom in the Patos Lagoon estuary, Brazil. **Phytochemistry**, 55: 383-387. 2000.
- MERILUOTO J.A.O., SANDSTROM A., ERICKSSON J.E., REMAUD G., CRAIG A.G., CHATTOPADHYAYA J. Structure and toxicity of a peptide hepatotoxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. **Toxicon**, 27: 1021-1034. 1989.
- MERILUOTO J.A.O. Chromatography of microcystins. **Analytica Chimica Acta**, 352: 277-298. 1997.
- MILLER M.C. 3rd, MOHRENWEISER H.W., BELL D.A. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. **Toxicology Letter**, 120 (1-3): 269-80. 2001.

- MILUTINOVIC A., SEDMAK B., HORVAT-ZNIDARSIC I., SUPUT D. Renal injuries induced by chronic intoxication with microcystins. **Cellular and Molecular Biology Letters**, 7: 139-141. 2002.
- MIURA G.A., ROBINSON N.A., LAWRENCE W.B., PACE J.G. Hepatotoxicity of microcystin-LR in fed and fasted rats. **Toxicol**, 29: 337-46. 1991.
- MOHAMED Z.A. Accumulation of cyanobacterial hepatotoxins by *Daphnia* in some Egyptian irrigation canals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 50: 4-8. 2001.
- MOHAMED Z.A. Allelopathic activity of *Spirogyra* sp.: stimulation bloom formation and toxin production by *Oscillatoria agardhii* in some irrigation canals, Egypt. **Journal of Plankton Research**, 24: 137-141. 2002.
- MOORE R.E., CHEN J.L., MOORE B.S., PATTERSON G.M.L. Biosynthesis of microcystin-LR. Origin of the carbons in the ADDA and Masp units. **Journal of the American Chemical Society**, 113: 5083-5084. 1991.
- MULKEY R.M., HERRON C.E., MALENKA R.C. An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. **Science**, 261: 1051-1055. 1993.
- MUMBY M.C., WALTER G. Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. **Physiological reviews**, 73: 673-99. 1993.
- NAMIKOSHI N., RINEHART K., DAHLEM A., BEASLEY V., CARMICHAEL W.W. Total synthesis of Adda, the unique C20 amino acid of cyanobacterial hepatotoxins. **Tetrahedron Letters**, 30: 4349-4352. 1989.
- NAMIKOSHI M., SIVONEN K., EVANS W.R., CARMICHAEL W.W., SUN F., ROUHIAINEN L., LUUKKAINEN R., RINEHART K.L. Two new L-serine variants of microcystins-LR and -RR from *Anabaena* sp. strains 202 A1 and 202 A2. **Toxicol**, 30: 1457-1464. 1992.
- NASEEM S., MEREISH K., SOLOW R., HINES H. Microcystin-induced activation of prostaglandin synthesis and phospholipid metabolism in rat hepatocytes. **Toxicology in vitro**, 5: 341-345. 1991.
- NISHIWAKI-MATSUSHIMA R., OHTA T., NISHIWAKI S., SUGANUMA M., KOHYAMA K., ISHIKA W.A.T., CARMICHAEL W.W., FUJIKI H. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, 18(1): 420-424. 1992.

- NOBRE A.C.L., JORGE M.C.M., MENEZES D.B., FONTELES M.C., MONTEIRO H.S.A. Effects of microcystin-LR in isolated perfused rat kidney. **Brazilian Journal of Medical & Biological Research**, 32: 985-988. 1999.
- NOBRE A.C.L., COELHO G.R., COUTINHO M.C., SILVA M.M., ANGELIM E.V., MENEZES D.B., FONTELES M.C., MONTEIRO H.S. The role of phospholipase A(2) and cyclooxygenase in renal toxicity induced by microcystin-LR. **Toxicon**, 39: 721-724. 2001.
- OHTA T., SUEOKA E., IIDA N., KOMORI A., SUGANUMA M., NISHIWAKI R., TATEMATSU M., KIM S.J., CARMICHAEL W.W., FUJIKI H. Nodularin, a potent inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A, is a new environmental carcinogen in male F344 rat liver. **Cancer Research**, 54: 6402-6406. 1994.
- ORR P.T., JONES G.J., HUNTER R.A., BERGER K., De PAOLI D.A., ORR C.L.A. Ingestion of *M. aeruginosa* by dairy cattle and the implications for microcystin contamination of milk. **Toxicon**, 39: 1847-1854. 2001.
- ORR P.T., JONES G.J., HUNTER R.A., BERGER K. Exposure of beef cattle to sub-clinical doses of *Microcystis aeruginosa*: toxin bioaccumulation, physiological effects and human health risk assessment. **Toxicon**, 41: 613-620. 2003.
- LOUDRA B., LOUDIKI, M., SBIYYAA B., MARTINS R., VASCONCELOS V., NAMIKOSHI, N. Isolation, characterization and quantification of microcystins (heptapeptides hepatotoxins) in *Microcystis aeruginosa* dominated bloom of Lalla Takerkoust lake reservoir (Morocco). **Toxicon**, 39:1375-1381. 2001.
- PALÍKOVÁ M., NAVRÁTIL S., TITHÝ F., STERBA F., MARSÁLEK B., BLÁHA L. Histopathology of carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae exposed to cyanobacteria extract. **ACTA vet**, 73: 253-257. 2004.
- PARK H., NAMIKOSHIU M., BRITTAIN S.M., CARMICHAEL W.W, MURPHY T. [D-Leu] MCYST-LR, a new MCYST isolated from waterbloom in Canadian prairie lake. **Toxicon**, 39: 855-862. 2001.
- PFLUMACHER S., WIEGAND C., OBEREMM A., BEATTIE, K.A., KRAUSE E., CODD G.A., STEINBERG C.E.W. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1425: 527-533. 1998.
- PIETSCH J., BORNMANN K., SCHMIDT W. Relevance of Intra- and Extracellular Cyanotoxins for Drinking Water Treatment. **Oral presentation on the occasion**

of the annual meeting of the Water Chemistry Division in the German Chemical Society, 2001.

- PIRES L.M.D., KARLSSON K.M., MERILUOTO J.A.O., KARDINAAL E., VISSER P.M., SIEWERTSEN K., VAN DONK E., IBELINGS B.W. Assimilation and depuration of microcystin-LR by the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. **Aquatic Toxicology**, 69: 385–396. 2004.
- POURIA S., ANDRADE A., BARBOSA J., CAVALCANTI R., BARRETO V., WARD C., PREISER W., POON G., NEILD G., CODD G. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **Lancet**, 352: 21-26. 1998.
- PREPAS E.E., KOTAK B.G., CAMPBELL L.M., EVANS J.C., HRUDEY S.E., HOLMES C.F.B. Accumulation and elimination of cyanobacterial hepatotoxins by the freshwater clam *Anodonta grandis simpsoniana*. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 54: 41-46. 1997.
- RABERGH C.M.I., BYLUND G., ERIKSSON J.E. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio L.*). **Aquatic Toxicology**, 20: 131-146. 1991.
- RAO P.V.L., BHATTACHARYA R. The cyanobacterial toxin microcystin-LR induced DNA damage in mouse liver in vivo. **Toxicology**, 114: 29-36. 1996.
- RAO P.V.L., BHATTACHARYA R., PARIDA M.M., JANA A.M., BHASKAR A. Freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UTEX 2385) induced DNA damage in vivo and in vitro. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 5: 1-6. 1998.
- RINEHART K.L., NAMIKOSHI M., CHOI B.W. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). **Journal of Applied Phycology**, 6: 159-176. 1994.
- ROHRLACK T., DITTMANN E., HENNING M., BÖNER T., KOHL J.G. Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, 65: 737-9. 1999.
- RUDOLPH-BÖHNER S., MIERKE D.F., MORODER L. Molecular structure of the cyanobacterial tumor-promoting microcystins. **FEBS Letters**, 349: 319-323. 1994.

- RUNNEGAR M.T.C., FALCONER I.R. The in vivo and in vitro biological effects of the peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **South African Journal of Science**, 78: 363-366. 1982.
- RUNNEGAR M.T.C., FALCONER I.R. Effect of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. **Toxicon**, 24(2): 109-115. 1986.
- RUNNEGAR M.T.C., GERDES R.G., FALCONER I.R. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. **Toxicon**, 29: 43-51. 1991.
- RUNNEGAR M.T.C, BERNDT N., KONG S.M., LEE E.Y., ZHANG L. In vivo and in vitro binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 216: 162-169. 1995.
- SIPIÄ V.O., KANKAANPÄÄ H.T., PFLUGMACHER S., FLINKMAN J., FUREY A., JAMES K.J. Bioaccumulation and Detoxication of Nodularin in Tissues of Flounder (*Platichthys flesus*), Mussels (*Mytilus edulis*, *Dreissena polymorpha*), and Clams (*Macoma balthica*) from the Northern Baltic Sea. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 53: 305-311. 2002.
- SIVONEN K. Cyanobacterial toxins and toxin production. **Phycologia**, 35: 12-24. 1996.
- SHEN P.P., ZHAO S.W., ZHENG W.J., HUA Z.C., SHI Q., LUI Z.T. Effects of cyanobacteria bloom extract on some parameters of immune function in mice. **Toxicology Letters**, 143: 27-/36. 2003.
- SHI L., CARMICHAEL W.W., MILLER I. Immuno-gold localization of hepatotoxins in cyanobacterial cells. **Archives of Microbiology**, 163: 7-15. 1996.
- SOARES R.M., MAGALHÃES V.F., AZEVEDO S.M.F.O. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxin) in *Tilapia rendalli* (*Cichilidae*) under laboratory conditions. **Aquatic Toxicology**, 70: 1-10. 2004.
- SOLTER P.F., WOLLENBERG G.K., HUANG X., CHU F.S., RUNNEGAR M.T. Prolonged sublethal exposure to the protein phosphatase inhibitor Microcystin-LR results in multiple dose-dependent hepatotoxic effects. **Toxicological Sciences**, 44: 87-96. 1998.
- STRANGE R.C., SPITERI M.A., RAMACHANDRAN S., FRYER A.A. Glutathione-S-transferase family of enzymes. **Mutation Research**, 482: 21-26. 2001.
- SUEOKA E., SUEOKA N., OKABE S., KOZU T., KOMORI A., OHTO T.,

- SUGANUMA M., KIM S.J., LIM I.K., FUJIKI H. Expression of the tumor necrosis factor alpha gene and early response genes by nodularin, a liver tumor promoter, in primary cultured rat hepatocytes. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, 123: 413-419. 1997.
- SUZUKI H., WATANABE M., WU Y., SUGITA T., KITA K., SATO T., WANG X.L., TANZAWA H., SEKIYA S., SUZUKI N. Mutagenicity of microcystin-LR in human RSa cells. **International Journal of Molecular Medicine**, 2: 109-112. 1998.
- TEIXEIRA M., COSTA M., CARVALHO V., PEREIRA M., HAGE E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, 27: 244-253. 1993.
- TENCALLA F.G., DIETRICH D.R., SCHLATTER C. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, 30: 215-224. 1994.
- TILLET D., DITTMANN E., ERHARD M., VON DÖHREN H., BÖRNER T., NEILAN B. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. **Chemistry & Biology**, 7: 753-764. 2000.
- TOIVOLA D.M., ERIKSSON J.E. Toxins affecting cell signalling and alteration of cytoskeletal structure. **Toxicology in vitro**, 13: 521-530. 1999.
- UENO Y., NAGATA S., TSUTSUMI T., HASEGAWA A., WATANABE M.F., PARK H.D., CHEN G.C., CHEN G., YU S.Z. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. **Carcinogenesis**, 17: 1317-1321. 1996.
- UTKILEN H., GJOLME N. Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, 61: 797-800. 1995.
- VAN HALDEREN A., HARDING W.R., WESSELS J.C., SCHNEIDER D.J., HEINE E.W., VAN der MERWE J., FOURIE J.M. Cyanobacterial (blue-green algae) poisoning of livestock in the western Cape Province of South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**, 66: 260-264. 1995.
- VANDERPLOEG H.A., JAMES R., LIEBIG J.R., CARMICHAEL W.W., AGY M.A., JOHNGEN T.H., FAHNENSTIEL G.L., NELEPA T.F. Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) selective filtration promoted toxic *Microcystis* blooms in Saginaw

- Bay (Lake Huron) and Lake Erie. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 58: 1208-1221. 2001.
- VASCONCELOS V.M., SIVONEN O.K., EVANS W.R., CARMICHAEL W.W., NAMIKOSHI, M. Hepatotoxic microcystin diversity in cyanobacterial blooms collected in Portuguese freshwaters. **Water Research**, 30 (10): 2377-2384. 1996.
- VENTURINO A., ROSENBAUM E., CABALLERO DE CASTRO A., ANGUIANO O.L., GAUNA L., FONOVICH DE SCHROEDER T., PECHEN DE D'ANGELO A.M. Biomarkers of effect in toads and frogs. **Biomarkers**, 8: 167-187. 2003.
- WATANABE M.F., OISHI S., HARADA K., MATSUURA K., KAWAI H. SUZUKI A.M. Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacteria (blue-green algae). **Toxicon**, 26 (2): 1017-1025. 1988.
- WIRSING B., HOFFMANN L., HEINZE R., KLEIN D., DALOZE D., BRAEKMAN J.C., WECKESSER J. First report on the identification of microcystin in a water bloom collected in Belgium. **Systematic and Applied Microbiology**, 21: 23-7. 1998.
- YOO R.S., CARMICHAEL W.W., HOEHN R.C., HRUDEY S.E. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins: a resource guide. **AWWA Research Foundation an American Water Works Association**, 1995.
- YU S.Z. Drinking water and primary liver cancer. In: Primary liver cancer (TANG Z.Y., WU M.C., XIA S.S., eds). New York: **China Academic Publishers/Springer**, 30-37. 1989.
- XIAO-YU L., IK-KYO C., JUNG-IN K., JIN-AE, J. Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio L.*) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. **Toxicon**, 44: 821–827. 2004.
- 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. **Environmental Pollution**, 127:431–439. 2004.
- ZAGATTO P.A., ARAGÃO M.A. Desenvolvimento e implantação de metodologias para diagnóstico e biomonitoramento de ambientes aquáticos. **Companhia de Tecnologia de saneamento ambiental (CETESB)**. 1992.
- ZHANG L., ZHANG Z., LONG F., LEE E.Y. Tyrosine-272 is involved in the inhibition of protein phosphatase-1 by multiple toxins. **Biochemistry**, 35: 1606-1611. 1996.

Soluções

Solução de paraformaldeído a 10% (Estoque)

10g de paraformaldeído

90mL de água destilada

Colocar os 10g de paraformaldeído em cerca de 80mL de água; aquecer até no máximo 60°C sob agitação em capela até ficar uma solução leitosa. Neste momento, gotejar hidróxido de sódio até clarificar a solução (transparente). Completar o volume para 100mL.

Solução de paraformaldeído 4% (solução de uso):

Tamponamento em tampão fosfato de sódio, pH 7,2-7,4.

Meio de Cultura para cianobactérias ASM-1

Solução Estoque A

Reagentes	mol/L	Massa em 1L
NaNO ₃	0,1M	8,5g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,01M	2,45g
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0,01M	2,05g
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,01M	1,45g

Solução Estoque B

Reagentes	mol/L	Massa em 1L
KH ₂ PO ₄	0,06M	8,16g
Na ₂ HPO ₄	0,05M	7,098g

Solução Estoque C

Reagentes	mol/L	Massa em 1L
H ₃ BO ₃	0,4M	24,8g
MnCl ₂ . 4 H ₂ O ou MnSO ₄ . H ₂ O	0,07M	13,9g 11,83g
FeCl ₃ . 6 H ₂ O ou FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,04M	10,8g 11,11g
ZnCl ₂ ou ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,02M	2,73g 5,75g
CoCl ₂ . 6 H ₂ O ou CoSO ₄ . 7 H ₂ O	0,0008M	0,19g 0,225g
CuCl ₂ ou CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,00008M	0,011g 0,02g

Solução Estoque D

Reagentes	mol/L	Massa em 1L
EDTA Na ₂	0,05M	16,81g

Para preparar 1L de meio de cultura

Volumes	Soluções
20,0 mL	Solução A
2,0 mL	Solução B
0,1 mL	Solução C
0,4 mL	Solução D

Completar o volume com água deionizada q.s.p.
Corrigir o pH entre 7,0 - 8,0 (usar NaOH 1M)