

**Rodrigo de Cássio da Silva**

**Avaliação da toxicidade da cilindropermopsina  
(cianotoxina) em *Hoplias malabaricus* (traíra): estudos *in vivo* e *in vitro*.**

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR  
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA).



**Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
2013**

**RODRIGO DE CÁSSIO DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA CILINDROSPERMOPSINA  
(CIANOTOXINA) EM *HOPLIAS MALABARICUS* (TRAÍRA): ESTUDOS  
*IN VIVO* E *IN VITRO*.**

Tese de doutorado submetida à Universidade  
Federal do Rio de Janeiro visando a obtenção do  
grau de doutor em ciências biológicas (biofísica).

**Orientadora: Dra. Valéria Freitas de Magalhães**  
**Co-orientador: Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro**

**Universidade Federal do Rio de Janeiro**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho**

**2013**

Silva, Rodrigo de Cássio

Avaliação da toxicidade da cilindrospermopsina (cianotoxina) em *Hoplias malabaricus* (traíra): estudos *in vivo* e *in vitro*. Rio de Janeiro, 2013.

xvi+144 p.

Tese de doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho / Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica).  
2013

Orientadora: Dra. Valéria Freitas de Magalhães  
Co-orientador: Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

1. Cianotoxina. 2. Peixe. 3. Biomarcadores. 4. Estresse oxidativo. 5. Hepatócitos. I. Magalhães, Valéria Freitas de II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). III. Título.

**Avaliação da toxicidade da cilindrospermopsina (cianotoxina)  
em *Hoplias malabaricus* (traíra): estudos *in vivo* e *in vitro*.**

**Rodrigo de Cássio da Silva**

**Orientadora: Valéria Freitas de Magalhães**

**Co-orientador: Ciro A. O. Ribeiro**

Tese submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências.

**Aprovada por:**

---

**Dra. Valéria Freitas de Magalhães  
(Presidente e Orientadora)**

---

**Dr. José Lailson Brito**

---

**Dr. Jayme da Cunha Bastos**

---

**Dr. Jean Remy Davee Guimarães**

---

**Dr. Raquel Moraes Soares (Revisora)**

**Rio de Janeiro, 28 de fevereiro de 2013.**

## **Dedicatória**

*Para*

Minhas Tias Glairdes (*in memoriam* / 1950 - 2011) e Durvalina  
*Por toda uma vida e por me ensinarem que o sofrimento e a dor são passageiros...*

À minha MÃE Maria das Graças  
*Pelo seu incondicional e ilimitado amor e pelo meu caráter...*

Ao meu PAI Raimundo Oliveira  
*Pelos princípios de respeito e coragem...*

Ao meu AMOR Juliana Staub  
*Pelo companheirismo e Por fazer com que TUDO valesse a pena...*

À minha Família  
*Por eu saber que sempre estarão “lá” quando eu voltar...*

Aos meus MESTRES Valéria, Ciro e Francisco “Chico”  
*Parafraseando Isaac Newton: “Se vi mais longe, foi por estar apoiado sobre ombros de gigantes”...*

À todos meu MUITO OBRIGADO.

*Rodrigo de Cássio da Silva*

## AGRADECIMENTOS

Nesse momento importante da minha vida, muitas pessoas foram meu alicerce para eu continuar a difícil jornada. Nesta lista, provavelmente, faltarão alguns que fizeram parte, mas que, por simples esquecimento (fato corriqueiro no final de tese), eu acabei por não citar, o que não significa que não foram importantes. A elas, meus sinceros agradecimentos.

Agradeço à Deus e meu guia espiritual por nunca me deixarem sucumbir.

Agradeço à CAPES pela bolsa e ao CNPq e FAPERJ pelo fomento à pesquisa.

Agradeço aos meus orientadores:

Valéria Freitas de Magalhães pelo carinho, PACIÊNCIA, amor quase materno e todos os anos de ensinamentos. Por ter me mostrado a vida científica.

Ciro Ribeiro pelo carinho, amizade, apreço, companheirismo e pelas infinitas ajudas no decorrer dos experimentos e escrita da tese.

Francisco “Chico” Filipak Neto por toda genialidade, simplicidade e humildade em me ensinar o que hoje sei sobre essa temática estudada.

Agradeço à profa Dra Raquel Moraes Soares pela excelente revisão deste manuscrito e pelo carinho.

Agradeço a banca: professores Jean Remy, Jayme Bastos, José Lailson, Mauro Rebelo e Reinaldo Bozelli por entender esse momento, pelas proveitosas contribuições que darão ao trabalho e pela paciência que tiveram em lê-lo.

Agradeço ao Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, e todos os seus membros estão e que se foram (sem exceção), me reservo o direito de não citar nomes para não ser injusto. Todos foram, são e serão importantes na minha carreira. Agradecimento especial à professora Sandra Azevedo pelo crédito dado ao meu trabalho durante todos esses anos.

Agradeço ao LABTOX (UFPR) aonde cheguei e fui recebido de braços abertos por todos. Fiz amigos pra toda vida. Um agradecimento especial aos amigos: Andressa, “Chico”, “Dani” Dietrich, Heloisa “Ioli” e Samuel “Sami” pelas boas risadas no cultivo e em Paulo Lopes.

Agradecimento especial à professora Sônia Grotzner pelas lâminas e pranchas histológicas, e, principalmente, pelo carinho demonstrado.

Agradecimento a Juan Esquivel (Piscicultura Panamá) pelo apoio logístico nos experimentos *in vivo* e pelo suporte de casa, comida e quase roupa lavada.

Agradecimento e desculpas aos meus amigos pessoais pelos anos de ausência.

Agradeço MUITO minha nova família: Cris Staub, Marcos Staub, Ruy João Staub, Elza Zucon e Adriano Safiano, por tudo que fizeram, ou seja, pelo amor que demonstram por mim.

Muito obrigado.

## RESUMO

A cilindropermopsina é uma cianotoxina que pode ser produzida por diferentes espécies de cianobactérias, e, portanto, sua presença nos corpos d'água é um problema de saúde pública em muitos países. Em mamíferos sua ação é sistêmica, entretanto pouco se sabe sobre sua ação toxicológica em peixes. Por esse fato, o uso de um modelo experimental da fauna tropical – *Hoplias malabaricus* - foi utilizado com este intuito no presente trabalho. A tese foi organizada em três capítulos sendo o primeiro e o segundo com a exposição *in vivo* onde após exposição a uma dose única de CYN (extrato aquoso e toxina purificada) foi avaliado seu acúmulo e danos no cérebro e no tecido muscular após 14 dias. No cérebro e músculo foram observadas alterações significativas na atividade da acetilcolinesterase além de danos oxidativos (peroxidação de lipídios) no cérebro indicando que a CYN é capaz de transpor a barreira hematoencefálica. No Capítulo II, foram avaliados, através de diferentes biomarcadores, além da concentração de CYN no fígado, também os danos através de biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo, danos em macromoléculas e aspectos histopatológicos. As injúrias histopatológicas foram corroboradas por alguns biomarcadores bioquímicos e de danos em macromoléculas como o aumento na concentração de hidroperóxidos e carbonilação de proteínas.. Os ensaios *in vitro* constituíram o terceiro capítulo, onde uma redução na viabilidade celular dos hepatócitos expostos tanto ao extrato quanto a toxina purificada foi observada. As respostas dos diferentes biomarcadores indicaram uma alteração no equilíbrio óxido-redutor dos hepatócitos, a qual foi mais pronunciada nas células expostas ao extrato aquoso. Concluindo, este trabalho apresenta vários aspectos inéditos uma vez que existem poucos dados referentes à toxicologia da CYN em espécies de peixes nativos brasileiros.

**Palavras-chave:** Cianotoxina. Peixe. Biomarcadores. Estresse oxidativo. Hepatócitos.

## ABSTRACT

Cylindrospermopsin is a cyanotoxin which can be produced by different species of cyanobacteria. Therefore their presence in water bodies is a public health concern worldwide. In mammals its action is systemic, but little is known about their toxicity in fish. Thus, the use of an experimental model of native tropical fish - *Hoplias malabaricus* - was used for this purpose in the present work. This thesis is organized into three chapters: the first and the second with exposure *in vivo* where after exposure to a single dose of CYN (aqueous extract and purified toxin) damage and its accumulation in the brain and muscle tissue after 14 days were assessed. In the brain and muscle were no significant changes in the activity of acetylcholinesterase. In addition, oxidative damage (lipid peroxidation) in the brain indicated that CYN is capable to crossing the blood brain barrier. In Chapter II, CYN concentration, biochemical biomarkers of oxidative stress, damage to macromolecules and histopathological aspects were evaluated. Injuries were corroborated by histological and biochemical biomarkers. Some damage to macromolecules, such as increase in the concentration of hydroperoxides and protein carbonylation, were observed. *In vitro* assays constituted the third chapter, in which a reduction in cellular viability of hepatocytes exposed to either extract and purified toxin was observed. The responses of different biomarkers indicated a change in the redox milieu of hepatocytes, which was more pronounced in cells exposed to the aqueous extract. In conclusion, this work presents novel aspects since there are few data regarding the toxicology of CYN in tropical fish species.

**Keywords:** Cyanotoxin. Fish. Biomarkers. Oxidative stress. Hepatocytes.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- $\beta$ -NADP<sup>+</sup> - Nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato
- CYN – Cilindropermopsina
- CYNp – Cilindropermopsina purificada
- CYNex – Extrato aquoso contendo CYN
- CYP – Citocromo P450
- DDT - diclorodifeniltricloroetano
- EDTA - Ácido etileno diamino tetracético (do inglês *Ethylenediaminetetracetic Acid*)
- ERO – espécie(s) reativa(s) de oxigênio e nitrogênio
- FOX* - do inglês *Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method*
- G6P - D-glucose-6-fosfato
- G6PDH – glucose-6-fosfato desidrogenase
- GPx – glutaciona peroxidase
- GR – glutaciona redutase
- GSH – glutaciona reduzida
- GSSG – glutaciona dissulfeto (glutaciona oxidada)
- GST – glutaciona S-transferase(s)
- LPO – peroxidação lipídica (do inglês *lipid peroxidation*)
- MXR – mecanismo de resistência a multixenobióticos (do inglês *multixenobiotic mechanism resistance*)
- PBS - tampão fosfato salino (do inglês *phosphate buffer saline*)
- PCO – carbonilação de proteínas (do inglês *protein carbonyl content or protein carbonylation*)
- pCO<sub>2</sub> – pressão parcial de CO<sub>2</sub>
- SOD – superóxido dismutase

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Ocorrência da <i>C. raciborskii</i> no planeta..	17
Figura 2 - Estrutura química da molécula de cilindrospermopsina.	18
Figura 3 - Espécimes de <i>Hoplias malabaricus</i> (adultos).	23
Figura 4 - Concentrações de cilindrospermopsina no cérebro de <i>H. malabaricus</i> expostos a uma dose única de CYN.....	37
Figura 5 - Concentrações de cilindrospermopsina no músculo de <i>H. malabaricus</i> expostos a uma dose única de CYN.....	38
Figura 6 - Efeitos sobre a atividade da AChE no cérebro de <i>H. malabaricus</i> .....	39
Figura 7 - Efeitos sobre a atividade da AChE no tecido muscular de <i>H. malabaricus</i> .....	40
Figura 8 - Efeitos sobre a atividade da GST no cérebro de <i>H. malabaricus</i> .....	41
Figura 9 - Efeitos sobre o conteúdo de GSH no cérebro de <i>H. malabaricus</i> .....	41
Figura 10 - Efeitos sobre a concentração de hidroperóxidos lipídicos no cérebro de <i>H. malabaricus</i> .....	42
Figura 11- Concentrações de cilindrospermopsina no fígado de <i>H. malabaricus</i> expostos a uma dose única de CYN.....	58
Figura 12 – Resultados dos biomarcadores bioquímicos no fígado de <i>H. malabaricus</i> .....	64
Figura 13 – Percentuais de alterações hepáticas no grupo controle e nos animais expostos à CYN. ....	65
Figura 14– Fotomicrografias de cortes histológicos do fígado de <i>H. malabaricus</i> expostos a CYN. ....	66
Figura 15 – <i>Score</i> de alterações no fígado de <i>H. malabaricus</i> .....	67
Figura 16– Tanques-rede da Piscicultura Panamá (Paulo Lopes – SC – Brasil).....	79
Figura 17 - Esquema de divisão dos grupos nos ensaios realizados em microplacas de 96 poços. ....	82
Figura 18 - Esquema de divisão dos grupos nos ensaios realizados em microplacas de 24 poços .....	83
Figura 19 - Viabilidade celular estimada através de ensaio com vermelho neutro ( <i>neutral red</i> ) .....	90
Figura 20 - Atividade específica da CAT.....	91
Figura 21 - Atividade específica das SOD.....	91
Figura 22 - Atividade específica da G6PDH.....	92
Figura 23 - Atividade específica da GPx..	92

Figura 24 - Atividade específica da GR. ....	93
Figura 25 - Atividade específica de diferentes isoformas da GST.. ....	94
Figura 26 - Conteúdo de GSH. ....	94
Figura 27 - Peroxidação de lipídios – concentração de hidroperóxidos lipídicos. ....	95
Figura 28 - Carbonilação de proteínas. ....	96
Figura 29 - Produção de espécies reativas de oxigênio.....	96
Figura 30 - Escores de danos ao DNA.....	97
Figura 31 - Proposição de mecanismo alternativo de hepatotoxicidade após exposição à CYN através da formação de EROs, e conseqüente morte celular.....	102
Tabela 1 - Alterações hepáticas em <i>H. malabaricus</i> expostos à CYN. ....	65
Tabela 2 - Percentagem de incidência das classes de dano ao DNA.....	97

# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>15</b>
<b>1. CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS:.....</b>	<b>15</b>
<b>2. CILINDROSPERMOPSINA (CYN): .....</b>	<b>17</b>
<b>3. BIOMARCADORES: .....</b>	<b>21</b>
3.1. BIOMARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO:.....	22
<b>4. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL HOPLIAS MALABARICUS:.....</b>	<b>23</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>26</b>
<b>EFEITOS NEUROTÓXICOS EM HOPLIAS MALABARICUS (TRAÍRA) EXPOSTOS À CILINDROSPERMOPSINA. ....</b>	<b>26</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>26</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	30
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS: .....</b>	<b>31</b>
3.1. CULTIVO DA CEPA DE <i>CYLINDROSPERMOPSIS RACIBORSKII</i> : .....	31
3.2. PURIFICAÇÃO, EXTRAÇÃO E ANÁLISE DA CYN:.....	31
3.3. EXPOSIÇÃO DOS ANIMAIS À CYN: .....	32
3.4. EXTRAÇÃO E ANÁLISE DA CYN NOS TECIDOS: .....	33
3.5. BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS: .....	33
3.5.1. Avaliação da atividade da Acetilcolinesterase (AChE):.....	33
3.5.2. Avaliação da atividade global das isoformas da GST: .....	34
3.5.3. Avaliação dos conteúdos de GSH: .....	34
3.5.4. Avaliação da peroxidação de lipídios (LPO): .....	35
3.5.5. Quantificação de proteínas totais: .....	35
3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS:.....	36
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
4.1 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CYN NO CÉREBRO:.....	37
4.2. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CYN NO MÚSCULO: .....	38
4.3. ANÁLISES BIOQUÍMICAS: .....	39
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>47</b>
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>48</b>
<b>HEPATOTOXICIDADE DA CILINDROSPERMOPSINA EM HOPLIAS MALABARICUS. ....</b>	<b>48</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>48</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>52</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	52
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	52

<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>53</b>
3.1. BIOMARCADORES DE DESEQUILÍBRIO E DANO OXIDATIVO:.....	53
3.1.1. Avaliação da atividade da CAT: .....	53
3.1.2. Avaliação da atividade da SOD: .....	54
3.1.3. Avaliação da atividade da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH):.....	54
3.1.4. Avaliação da atividade da GPx: .....	54
3.1.5. Atividade da glutathiona redutase (GR): .....	55
2.1.6. Avaliação da atividade global das isoformas da glutathiona S-transferase (GST):.....	55
3.1.7. Avaliação dos conteúdos de GSH: .....	55
3.1.8. Avaliação da peroxidação lipídica (LPO):.....	56
3.5.9. Avaliação da carbonilação de proteínas (PCO): .....	56
3.1.10. Quantificação de proteínas totais: .....	56
3.2. BIOMARCADORES HISTOPATOLÓGICOS: .....	57
3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS OBTIDOS: .....	57
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
4.1. CONCENTRAÇÃO DE CYN NO FÍGADO:.....	58
4.2. BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS: .....	58
4.3. BIOMARCADORES HISTOPATOLÓGICOS: .....	64
<b>5. DISCUSSÃO: .....</b>	<b>68</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>73</b>

## **CAPÍTULO III.....74**

### **EFEITOS *IN VITRO* DA CILINDROSPERMOPSINA NO AMBIENTE REDOX DE HEPATÓCITOS DE *HOPLIAS MALABARICUS*.....74**

<b>RESUMO .....</b>	<b>74</b>
<b>1. INTRODUÇÃO:.....</b>	<b>75</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>78</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	78
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	78
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS: .....</b>	<b>79</b>
3.1. OBTENÇÃO, MANUTENÇÃO E CUIDADO COM OS ANIMAIS: .....	79
3.2. ISOLAMENTO E CULTIVO DOS HEPATÓCITOS DE <i>H. MALABARICUS</i> : .....	80
3.3. DESENHO EXPERIMENTAL PARA REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS:.....	82
3.4. ANÁLISES BIOQUÍMICAS:.....	84
3.4.1. Avaliação da viabilidade celular: .....	84
3.4.2. Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs):.....	85
3.4.3. Avaliação da atividade da Catalase (CAT): .....	85
3.4.4. Avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD):.....	86
3.4.5. Avaliação da atividade da Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH): .....	86
3.4.6. Avaliação da atividade da Glutathiona peroxidase (GPx): .....	86
3.4.7. Avaliação da atividade da Glutathiona redutase (GR): .....	87
3.4.8. Avaliação da atividade total das isoformas GST: .....	87
3.4.9. Avaliação dos conteúdos de GSH: .....	87
3.4.10. Avaliação da LPO: .....	87
3.4.11. Avaliação da carbonilação de proteínas (PCO):.....	88
3.4.12. Ensaio cometa: .....	88
3.4.13. Quantificação de proteínas totais: .....	89
3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS: .....	89
<b>4. RESULTADOS: .....</b>	<b>90</b>
4.1. VIABILIDADE CELULAR: .....	90
4.2. ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DAS CAT, SOD, G6PDH, GPX, GR E GST:.....	90

4.3. CONTEÚDO DE GSH: .....	94
4.4. PEROXIDAÇÃO DE LÍPIDIOS (LPO) E CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS (PCO): .....	95
4.5. DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS):.....	96
4.6. ENSAIO COMETA:.....	96
<b>5. DISCUSSÃO: .....</b>	<b>98</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>109</b>
<b>CONCLUSÕES FINAIS .....</b>	<b>114</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>117</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>129</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>131</b>

# INTRODUÇÃO GERAL

## 1. CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS:

Estima-se que as cianobactérias habitem o planeta Terra a aproximadamente 2.8 bilhões de anos (SCHOPF e PACKER, 1987). Estes micro-organismos (procariontes fotossintetizantes) possuem características variadas em relação ao ambiente que habitam (ambientes marinhos e dulcícolas, fontes termais, desertos polares e ambientes hipersalinos), assim como em relação as suas formas celulares que podem ser coloniais, filamentosas ou unicelulares (CHORUS e BARTRAM, 1999).

A proliferação excessiva das cianobactérias, fenômeno comumente conhecido como floração ou “*bloom*”, pode ser ocasionada por diferentes agentes, entretanto os principais estão ligados à fatores antrópicos diretos (lançamento de esgotos domésticos e industriais em corpos d’água aumentando o aporte de nutrientes, por exemplo) ou indiretos (mudanças climáticas principalmente àquelas relacionadas ao aquecimento global) (VON SPERLING et al., 2008; SINHA et al., 2012). Tais florações podem ser extremamente prejudiciais para estes ecossistemas já que muitas espécies de cianobactérias são potencialmente produtoras de moléculas tóxicas (cianotoxinas) que podem causar efeitos danosos em animais e humanos (CARMICHAEL et al., 1998).

Existem diversos relatos de intoxicação humana relacionados a florações de cianobactérias na Austrália, Inglaterra, China, África do Sul (CHORUS e BARTRAM, 1999), e no Brasil onde já foi constatada uma correlação epidemiológica entre a floração de cianobactérias no Reservatório de Itaparica, Bahia, e a morte de 88 pessoas entre 2000 intoxicadas no ano de 1988 (TEIXEIRA et al., 1993), além do caso de Caruarú (CARMICHAEL et al., 2001), o qual será descrito posteriormente.

As cianotoxinas podem ser classificadas de acordo com seu órgão-alvo em mamíferos. As mais conhecidas são as microcistinas e nodularias, que são peptídeos cíclicos primariamente de ação hepatotóxica (CARMICHAEL et al., 1998). As saxitoxinas que são alcalóides de ação neurotóxica (CHORUS e BARTRAM, 1999). As cilindrospermopsinas que são alcalóides de ação generalista, e por isso classificada como citotóxica (OHTANI et al., 1992), o alvo de nosso estudo a sua atividade citotóxica.

Dentre as espécies potencialmente produtoras de cilindrospermopsina, destaca-se a *Cylindrospermopsis raciborskii* (HAWKINS et al., 1985). Esta espécie ocorre principalmente nas regiões tropical, subtropical e temperada, sendo, portanto, considerada cosmopolita (Figura 1).

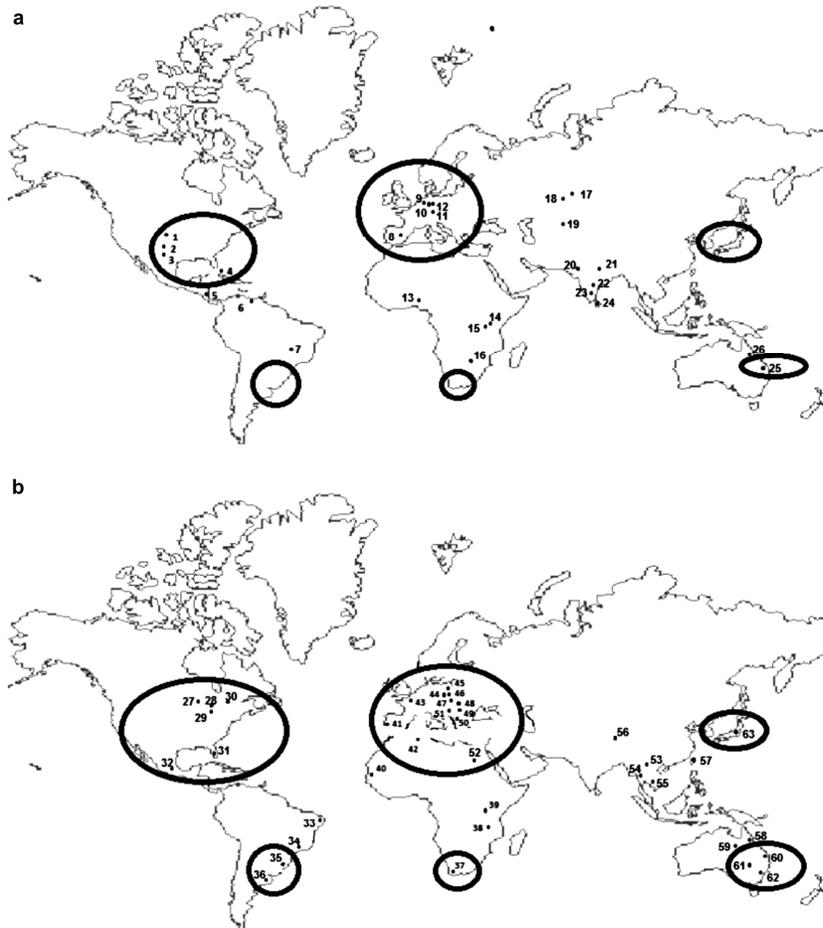


Figura 1 - Ocorrência da *C. raciborskii* no planeta. Cada ponto e círculo representa um país ou estado de ocorrência onde têm sido identificadas florações desta espécie. (Fonte SINHA et al., 2012).

## 2. CILINDROSPERMOPSINA (CYN):

A CYN (Figura 2) é uma cianotoxina que foi identificada como responsável por um dos casos mais graves de intoxicação causada por toxinas de cianobactérias. Este incidente aconteceu em 1979 na ilha de Palm (Queensland – Norte da Austrália), onde 148 pessoas foram internadas com sintomas severos de hepatenterite e falência renal, sem a ocorrência de óbito. A médica local, Dra. Susan Byth, sem saber a causa exata a que se atribuía o caso, o chamou de “doença misteriosa de Palm Island” (*The Palm Island mystery disease* – BYTH, 1980).

Posteriormente, se identificou que o surto estava diretamente ligado ao fornecimento de água de um reservatório (Reservatório de Solomon – *Solomon Dam*) que sofria com intensas florações de cianobactérias, principalmente da espécie *C. raciborskii* (BOURKE et al., 1983; HAWKINS et al., 1985). Estudos epidemiológicos e toxicológicos mostraram que a doença estava estreitamente relacionada com esta espécie. Tal fato constituiu o primeiro caso bem documentado de intoxicação humana causada por toxina produzida por uma cianobactéria. A toxina foi caracterizada como cilindrospermopsina (OHTANI et al, 1992).

No Brasil, a CYN também já foi vinculada a casos de intoxicação humana. Em 1996, na cidade de Caruaru-PE, mais de 130 pacientes de uma clínica de hemodiálise tiveram alterações clínicas (náuseas, vômitos e perturbações visuais) após o seu tratamento rotineiro. Após alguns meses, foram registradas 73 mortes diretamente ligadas à água contaminada por cianotoxinas que fora utilizada no tratamento destes pacientes. Estudos minuciosos verificaram que tanto a água quanto os filtros de carvão ativado, utilizados no processo de purificação da água para o tratamento, estavam contaminados com microcistina e cilindrospermopsina (CARMICHAEL et al., 2001).

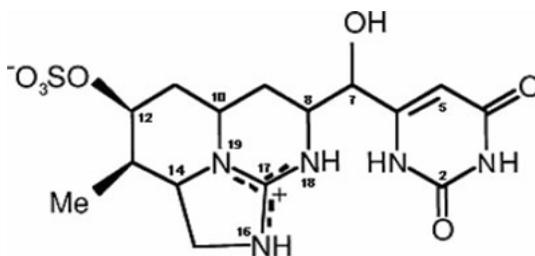


Figura 2 - Estrutura química da molécula de cilindrospermopsina (Fonte: FALCONER e HUMPAGE, 2006).

A CYN é um alcalóide guanidínico cíclico altamente hidrossolúvel capaz de causar danos severos em diversos órgãos de mamíferos como fígado, rins, pulmão, coração, estômago, sistema vascular, glândulas adrenais e sistema linfático. Hawkins et al. (1985) descreveram necrose centrolobular e acúmulo de lipídios nos hepatócitos (esteatose), além de necrose no epitélio tubular proximal renal. Em mamíferos (camundongos) expostos oralmente

a culturas de células de *C. raciborskii* produtora de CYN os efeitos no estômago foram desde úlceras no epitélio estomacal à presença de sangue nos tecidos intestinais e estomacais (SEAWRIGHT et al., 1999). No timo e baço observou-se necrose linfocitária, atrofia do timo e retração do baço. Danos vasculares também foram observados no músculo cardíaco, órbita ocular e cauda de camundongos (FALCONER e HUMPAGE, 2006).

Ainda não há dados consistentes que determinem a DL<sub>50</sub> (dose letal para 50% da população exposta) da CYN. No entanto, esta toxicidade foi inicialmente estimada em de 64 ± 5 mg de cultura liofilizada *C. raciborskii*/kg de peso corpóreo, através de injeção intraperitoneal (i.p.) em camundongos, após 24 horas (HAWKINS et al., 1985). Estudos posteriores (i.p.) encontraram o valor de 52 mg de extrato aquoso *C. raciborskii*/kg em 24 horas e 32 mg de extrato aquoso *C. raciborskii*/kg em 7 dias (HAWKINS et al., 1997). Apesar da importância dos estudos citados, o caminho mais provável para intoxicação pela CYN é a via oral. Por isso, foram realizados experimentos com camundongos que indicaram a DL<sub>50</sub> oral para CYN de 4,4-6,9 mg CYN/kg (SEAWRIGHT et al., 1999). Todos os dados apresentados indicam que esta toxina é de ação mais lenta e progressiva.

Apesar de diversos estudos mostrarem o potencial tóxico da CYN, ainda são escassos os dados sobre o seu mecanismo de ação. Primariamente, sabe-se que é uma potente inibidora de síntese protéica (TERAO et al., 1994; FROSCIO et al., 2001, RUNNEGAR et al., 2002); e que provavelmente esta inibição ocorra no nível ribossomal, através do bloqueio do processo de alongamento da cadeia polipeptídica (FROSCIO et al., 2003). Outro aspecto toxicológico a ser considerado é a ativação metabólica da CYN em células expostas à inibidores do complexo CYP450 (HUMPAGE et al., 2005), além do aumento na transcrição de alguns genes relacionados a este complexo (ZEGURA et al., 2011), sugerindo que estas enzimas têm papel crucial na toxicidade da CYN, entretanto este aspecto ainda está pouco elucidado.

Sabe-se que a CYN é capaz de causar a redução da síntese e dos níveis de glutatona (RUNNEGAR et al., 1994, 1995) em um mecanismo ainda desconhecido. Alguns mecanismos de genotoxicidade da molécula já foram descritos tais como, por exemplo, a fragmentação do DNA e perda de cromossomos inteiros (HUMPAGE et al., 2000, 2005). Adicionalmente, alterações na expressão de genes reguladores de danos ao DNA (*MDM2*, *GADD45a*) e de genes relacionados a apoptose (*BCL-2* e *BAX*) também já foram descritos (ŽEGURA et al., 2011; STRASER et al., 2012).

Gácsi et al. (2009) observaram que esta toxina causa apoptose em células da linhagem CHO-K1 (provenientes de ovários de hamster) mesmo em baixas concentrações e curto período de exposição (1–2 µM por 12 horas), já em altas concentrações e maior período de exposição, esta causa necrose nas células. Adicionalmente, este estudo também mostrou que a CYN promove alterações nucleares e no citoesqueleto dessa linhagem celular, corroborando os registros de genotoxicidade desta toxina. Young et al., (2008) evidenciaram que a CYN inibe a produção de progesterona e, portanto, mostra um potencial na desregulação endócrina de mamíferos já que altera significativamente a relação progesterona:estrogênio.

Terao et al., (1994) pela primeira vez sugeriram que a toxicidade da CYN poderia ser também mediada pela geração de radicais livres. Atualmente, sabe-se que a CYN é capaz de causar estresse oxidativo em diferentes classes de organismos como: plantas (PRIETO et al., 2011), cultura primária de hepatócitos de peixes (LIEBEL et al., 2011), linhagens celulares de peixes (GUTIÉRREZ-PRAENA et al., 2011a), peixes (PUERTO et al., 2011a; GUTIÉRREZ-PRAENA et al., 2011b), bivalves (PUERTO et al., 2011b); linhagens de linfócitos (ŽEGURA et al., 2011) e adenocarcinoma de cólon humanos (GUTIERREZ-PRAENA et al., 2012a). No entanto, exceto pelo trabalho de Liebel et al. (2011) pouco se sabe a respeito da CYN como causadora desse tipo de injúria em peixes da fauna tropical, sendo de

fundamental importância uma vez que estes animais compartilham do mesmo habitat das cianobactérias.

### **3. BIOMARCADORES:**

Um biomarcador é uma alteração em uma resposta fisiológica, morfológica ou genética mensurável num organismo como consequência da exposição a um agente exógeno estressor, ou ainda, qualquer medida refletindo uma interação entre um sistema biológico e um potencial risco, medida esta que pode ser física, química ou biológica (WHO, 1993). Desta forma os biomarcadores podem ser considerados alterações biológicas ou bioquímicas após a exposição a um determinado estressor. Dentre as classificações dos biomarcadores, temos: os biomarcadores de efeito; biomarcadores de susceptibilidade; e os biomarcadores de exposição. Para ser considerado um bom biomarcador, a resposta químico-biológica deve ser sensível ao poluente ao qual o organismo está exposto bem como deverá fornecer as respostas biológicas imediatas desta exposição, revelando possíveis relações causa/efeito ou dose/efeito, e que podem ser extrapoladas para níveis superiores de organização biológica (população ou comunidade) (VAN DER OOST et al, 2003). Por esse fato, a escolha de múltiplos biomarcadores poderá fornecer informações mais completas em relação à exposição de um organismo a um determinado poluente.

É válido destacar que a resposta de alguns biomarcadores referentes a uma determinada espécie não é necessariamente válida para outras espécies. Além disso, os dados obtidos em estudos ecotoxicológicos laboratoriais podem ser de difícil extrapolação às avaliações no campo (ECETOC, 1993), uma vez que seus efeitos podem ser super ou subestimados.

### **3.1. Biomarcadores do estresse oxidativo:**

A fim de avaliar o impacto dos poluentes em determinado ambiente aquático, uma proposta de abordagem é analisar algumas respostas bioquímicas, uma vez que estas podem refletir o potencial risco de exposição de algumas classes de contaminantes em organismos expostos (MCCARTHY e SHUGART, 1990). Mais recentemente, estudos têm demonstrado um crescente interesse no uso de biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo como forma de monitoramento da biota aquática, uma vez que um desequilíbrio no ambiente redox celular pode ser a explicação para vários efeitos tóxicos (WINSTON e DI GIULIO, 1991). E, além disso, a alteração no nível ou atividade desses biomarcadores está intimamente ligada à ação de diferentes classes de poluentes nos organismos expostos (ZANETTE et al. 2006; 2008).

A toxicidade mediada pelo oxigênio pode ser definida como os efeitos prejudiciais causados por espécies reativas de oxigênio (ERO), também conhecidas como intermediários reativos de oxigênio, radicais livres ou oxiradicais. Particularmente, os produtos de redução do oxigênio molecular são os de maior interesse já que podem reagir com macromoléculas celulares, podendo levar ao aumento ou inibição de atividades enzimáticas, peroxidação lipídica (LPO), danos ao DNA e proteínas, e até mesmo a morte celular (WINSTON e DI GIULIO, 1991). O funcionamento dos mecanismos antioxidantes celulares, que defendem a célula contra a ação das ERO, são criticamente importantes na remoção destes radicais. Portanto, a atividade das enzimas ligadas diretamente a estes processos de defesa antioxidante podem ser utilizados como importantes biomarcadores de exposição à determinados poluentes.

#### 4. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL *Hoplias malabaricus*:

Vários trabalhos utilizam peixes como modelos experimentais para avaliar efeitos tóxicos de diversos contaminantes como, por exemplo, os organofosforados, carbamatos e metais pesados (SILVA FILHO et al., 2000). *Hoplias malabaricus* (BOCH 1794 - família Erythrinidae) – nome comum: traíra (figura 3) - é uma espécie de peixe neotropical dulcícola, carnívora e predadora com ampla distribuição geográfica, a qual abrange todas as bacias hidrográficas da América do Sul, sendo um dos principais predadores em reservatórios e riachos (FOWLER, 1950; ARAÚJO-LIMA et al., 1985). Possui hábito noturno, e pode modular seu tipo de reprodução conforme o ambiente (ARAÚJO-LIMA e BITTENCOURT, 2002). O gênero *Hoplias* possui grande capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais, sendo utilizado como fonte alimentar por aves piscívoras e também por mamíferos, incluindo o homem.

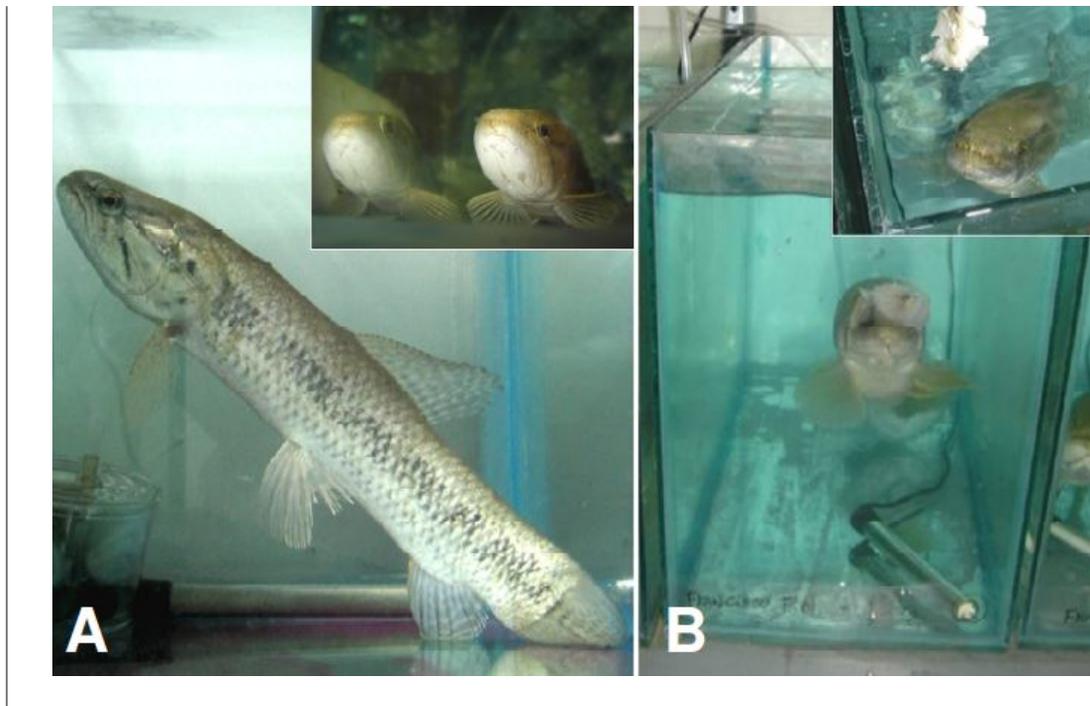


Figura 3 - Espécimes de *Hoplias malabaricus* (adultos). Crédito da foto: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto e Dra. Sonia Grotzner (Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, UFPR).

Segundo Hensley e Moody (1975), esta espécie é de ampla distribuição e abundância, por isso pode ser considerada como sendo ecologicamente bem sucedida. A traíra tem uma resistência física privilegiada, capaz de resistir a intensas variações climáticas. Esta espécie pode sobreviver em ambientes pouco oxigenados o que explica sua grande capacidade de dispersão e ajuste (SUNDIN et al., 1999), além de apresentar grande resistência aos períodos de privação de alimento (RIOS et al., 2002).

Há poucos estudos toxicológicos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, utilizando esta espécie como modelo experimental, principalmente com relação à exposição à xenobióticos. A maioria do estudos disponíveis se concentram no Laboratório de Toxicologia Celular da UFPR (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2006; ALVES COSTA et al., 2007; RABITTO et al., 2006; MELA et al., 2007; MELA et al., 2010; MIRANDA et al., 2008). Quanto aos estudos com cianotoxinas, estes são ainda incipientes com esta espécie (SILVA et al., 2011), e portanto os estudos desenvolvidos neste trabalho podem contribuir para conhecer o papel destas toxinas no metabolismo de peixes nativos brasileiros.

Tendo em vista as pesquisas relatadas acima, conclui-se que os dados toxicológicos em relação à CYN são em maior número para mamíferos do que em peixes, apesar dos peixes estarem mais expostos a estes metabólitos do que os mamíferos. Por esse motivo são muito importantes os estudos que visem o entendimento dos efeitos da CYN em organismos aquáticos. Portanto, esta tese tem como objetivo principal avaliar os efeitos da exposição à cianotoxina cilindrospermopsina em relação ao seu acúmulo em tecidos alvos da espécie *H. malabaricus*. A análise destes efeitos através de biomarcadores neurotóxicos, danos oxidativos, citotoxicidade e genotoxicidade em espécimes de traíra utilizando estudos *in vivo* e *in vitro* contribuirão para o aumento das informações sobre o risco de exposição das cianotoxinas para a biota aquática.

Face às informações apresentadas, a avaliação do potencial neurotóxico da CYN foi verificada em ensaios *in vivo* (Capítulo I). Seguindo o mesmo desenho e modelo experimental foi avaliado o efeito hepatotóxico através de diferentes biomarcadores (histopatológicos e bioquímicos) nos animais expostos à CYN (capítulo II). Por fim, a partir do cultivo primário de hepatócitos desta espécie de peixe foi avaliada a citotoxicidade da CYN através de biomarcadores de danos oxidativos e genotóxicos (capítulo III).

# CAPÍTULO I

## EFEITOS NEUROTÓXICOS EM *Hoplias malabaricus* (TRAÍRA) EXPOSTOS À CILINDROSPERMOPSINA.

### RESUMO

Cilindrospermopsina (CYN - cianotoxina) é um alcalóide citotóxico inibidor de síntese de proteínas e glutatona e que causa injurias em diferentes órgãos de mamíferos. Para os peixes, no entanto, dados em relação aos diferentes efeitos da CYN ainda são escassos. A literatura específica mostra que o fígado se configura como o órgão alvo mais importante para a ação da CYN, no entanto, não existem dados disponíveis a respeito da sua neurotoxicidade. Os objetivos deste estudo foram quantificar a CYN no cérebro e no músculo do peixe neotropical *Hoplias malabaricus* após exposição experimental e investigar o potencial neurotóxico do extrato celular aquoso contendo CYN (CYNex) e CYN purificada (CYNp) proveniente de um cepa de *Cylindrospermopsis raciborskii*. Os peixes foram expostos intraperitonealmente a uma dose única de CYN ( $50 \mu\text{g CYN kg}^{-1}$ ). A presença da CYN foi analisada 7 e 14 dias pós-exposição no cérebro e nos músculos; e os efeitos neurotóxicos (atividade da AChE) e oxidativos (atividade de glutatona S-transferase - GST, níveis de glutatona - GSH e peroxidação lipídica - LPO) somente no cérebro. De acordo com os resultados obtidos indivíduos expostos a CYNex apresentaram maior concentração de CYN do que os animais expostos a CYNp para ambos os tecidos estudados. Apenas a exposição CYNp causou uma diminuição da atividade da AChE, mas ambos CYNp e CYNex levaram ao aumento da GST e LPO no cérebro. Os níveis de GSH não foram afetados. Estes resultados mostraram que CYN pode atravessara barreira hematoencefálica e tem potencial neurotóxico, prejudicando a comunicação sináptica neuronal (através da inibição da atividade da AChE), bem como alterando o ambiente redox cerebral.

**Palavras-chave:** cilindrospermopsina, neurotoxicidade, danos oxidativos, *Hoplias malabaricus*, cianobactérias.

## 1. INTRODUÇÃO

Uma das conseqüências das atividades humanas aos ambientes naturais é a maior entrada de nutrientes nos ecossistemas aquáticos, favorecendo um grande aumento da população de alguns micro-organismos, principalmente cianobactérias. Notavelmente, as cianobactérias têm se tornado um grande problema de saúde pública, porque muitas espécies podem produzir cianotoxinas (KAEBERNICK e NEILAN, 2001). A presença de cianotoxinas tais como a cilindrospermopsina (citotóxica) têm sido relatadas em diferentes ecossistemas aquáticos do planeta, incluindo aqueles utilizados para abastecimento público de água (FALCONER e HUMPAGE, 2006).

Sabe-se que algumas cianotoxinas têm efeitos neurotóxicos importantes em diferentes organismos e, portanto, são um grave problema para a biota aquática. Mais especificamente, a anatoxina-a, que também é um alcalóide assim como a CYN, é um potente bloqueador neuromuscular pós-sináptico de receptores nicotínicos e colinérgicos, que são comuns tanto para mamíferos quanto para peixes. Esta ação se dá através da ligação (irreversível) aos receptores de acetilcolina, pois esta passa a não ser degradada pela acetilcolinesterase. A  $DL_{50}$  intraperitoneal (i.p.) em camundongos, para a toxina purificada, é de 200 mg/Kg de peso corpóreo, com um tempo de sobrevivência de 1 a 20 minutos (CARMICHAEL, 1992; 1994).

Em relação aos efeitos agudos da anatoxina-a em vertebrados, já foi retratada paralisia rápida dos músculos esqueléticos periféricos e respiratório, causando sintomas como perda de coordenação, contração muscular, respiração irregular, tremores, alteração da marcha e convulsões antes da morte por parada respiratória (ROGERS et al, 2005). Em peixes já foram observadas alterações no movimento opercular (super-estímulo) e natação anormal dos indivíduos expostos (OSSWALD et al., 2007), alteração da frequência cardíaca (OBEREMM et al., 1999) e morte (CARMICHAEL et al., 1975).

Particularmente, em relação à cilindropermopsina, sabe-se que ela é um potente inibidor da síntese de proteínas em células eucarióticas (TERAO et al, 1994, FROSCIO et al, 2008). Pode causar necrose no fígado (SEAWRIGHT et al, 1999, HUMPAGE e FALCONER, 2003) e nos túbulos renais proximais (HAWKINS et al. 1985, BERNARD et al. 2003) de mamíferos. Além disso, outros tecidos também já foram descritos como órgão alvo para a CYN como, por exemplo, o pulmão, o timo e o coração (HARADA et al. 1994, FALCONER et al. 1999). Efeitos como mutagenicidade (HUMPAGE et al. 2000, SHEN et al. 2002) e genotoxicidade, através da inibição da condensação da cromatina, alterações nucleares, e morte celular são atribuídos à exposição a esta toxina (GÁCSI et al., 2009); e a desregulação endócrina têm sido relatados para linhagens de células de mamíferos expostas à CYN (YOUNG et al., 2008).

Humpage e Falconer (2003) determinaram a dose oral de 30  $\mu\text{g CYN kg}^{-1}\text{dia}^{-1}$  como nível de efeito adverso não observado (NOAEL) em camundongos. A partir destes valores foi estabelecida a dose de 0,03  $\text{mg kg}^{-1}\text{dia}^{-1}$  como uma ingestão diária tolerada (IDT) para humanos e de 1,0  $\mu\text{g l}^{-1}$  como a concentração máxima aceitável na água para consumo humano, valor que é recomendado pela última Portaria do Ministério da Saúde Brasileiro (2.914/2011) (BRASIL, 2012).

Embora muitos estudos tenham demonstrado que CYN é tóxica para as células de vertebrados, dados sobre a sua neurotoxicidade são extremamente escassos (KISS et al., 2002), particularmente para os peixes.

A dosagem da atividade da acetilcolinesterase (AChE) tem sido empregada como biomarcador de efeito na verificação dos efeitos primários de alguns poluentes em peixes (STIEN et al., 1998; SANCHO et al., 2000; LIONETTO et al., 2003). Quando a atividade de AChE é inibida de alguma forma, há bloqueio na transmissão de impulsos nervosos,

paralisando as funções vitais devido à sobreposição desses impulsos, causados pela permanência de abertura dos canais de sódio (STENESH, 1998).

Assim sendo, o uso da AChE nos tecidos muscular e nervoso de peixes pode ser utilizada para avaliar os efeitos neurotóxicos da cilindropermopsina nos organismos expostos, já que esta enzima tem ampla disponibilidade e grande concentração nestes tecidos (STURM, 1999).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

- Avaliar a presença e o potencial neurotóxico da CYN (extrato aquoso – CYNex e toxina purificada - CYNp) em *Hoplias malabaricus* através de diferentes biomarcadores, após 7 e 14 dias de exposição.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a concentração de CYN no cérebro e tecido muscular através de técnicas de imunoensaio enzimático do tipo ELISA.
- Avaliar a atividade da AChE no cérebro e no tecido muscular dos animais.
- Avaliar alguns marcadores de desequilíbrio oxidativo, a saber: atividade da GST, conteúdo de GSH e LPO no cérebro dos animais.
- Verificar a possível diferença dos efeitos do extrato aquoso (CYNex) e toxina purificada (CYNp) experimentalmente em *H. malabaricus*.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS:**

#### **3.1. Cultivo da cepa de *Cylindrospermopsis raciborskii*:**

A cepa CYP011K da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*, gentilmente cedida pelo Dr. Andrew Humpage do Australian Water Quality Center – Austrália, foi cultivada em meio de cultura ASM-1 (GORHAM et al., 1964), nas seguintes condições: pH 8,0;  $23 \pm 2$  ° C;  $50 \mu\text{E. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de intensidade de luz medida a partir do sensor quântico (QSL-100 Box, - Biospherical instrumets Inc.), fotoperíodo de 12 horas e aeração contínua.

#### **3.2. Purificação, extração e análise da CYN:**

Para obtenção do extrato e quantificação da CYN, a cepa CYP011K foi cultivada em grandes volumes (mariotes de 9 litros). Após alcançar o final da fase exponencial de crescimento, o cultivo foi interrompido e o volume total da cultura foi centrifugado (6.000 rpm/ 10 min.). O material precipitado foi liofilizado e submetido à extração com água ultra-pura de acordo com Welker et al. (2002). Para tanto, esse material foi agitado durante 1 h, centrifugado (11.000 rpm / 20 min.) e o sobrenadante foi filtrado em filtros de celulose regenerada com 0,45  $\mu\text{m}$  de porosidade (Sartorius).

O extrato obtido foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência com fotodetector de dióxido (CLAE-DAD - Shimadzu) usando uma coluna analítica de fase reversa Lichrospher 100 RP-18 (5 mm, Merck ®). As condições cromatográficas foram estabelecidas sob condições mistas (isocrática e gradiente) de acordo com Welker et al. (2002). O volume injetado (loop) foi de 100  $\mu\text{L}$  com um fluxo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . A detecção da CYN por UV foi realizada a 262 nm.

No processo de purificação da toxina, utilizou-se uma coluna semi-preparativa (MERK LiChroCART ® 250 x 10 10 µm), seguindo as mesmas condições cromatográficas explicitadas anteriormente. A cada injeção, CYN foi coletada após a detecção do sinal cromatográfico no espectro de absorção e tempo de retenção característico, comprovado por comparação com padrão comercial certificado (NRC CYN-Certified Reference material) e alta similaridade ( $r^2 = 0,99$ ). O material foi congelado, liofilizado e reanalisado pelo método já descrito. Posteriormente, realizou-se confirmação e quantificação deste material por espectrometria de massa (3200 QTRAP LC/MS/MS - Applied Biosystems) de acordo com Eaglesham et al. (1999).

### **3.3. Exposição dos animais à CYN:**

Exemplares adultos de *H. malabaricus* (aproximadamente 300 à 400 g) foram obtidos a partir de uma fazenda comercial de peixes (Cidade de Paulo Lopes, Estado de Santa Catarina, Brasil; <http://www.pisciculturapanama.com.br>). Os peixes foram mantidos em tanques-rede (3 grupos de 20 animais por tanque com 2,0 m<sup>3</sup> de volume de água em cada tanque). No momento do experimento, os peixes foram anestesiados (200 mg/L de benzocaína em água). Uma única dose de CYN foi injetada intraperitonealmente (i.p.) (50 µg CYN kg<sup>-1</sup> peso corpóreo) nas duas formas: purificada (CYNp) ou o extrato celular (CYNex), sendo 20 animais no total para cada tratamento. Os animais-controle (n = 20) foram injetados com água. Nos 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias após a exposição, 10 peixes de cada grupo (controle, CYNex e CYNp) foram anestesiados e sacrificados, através de secção espinhal, para coleta de amostra do tecido muscular esquelético e do cérebro.

### **3.4. Extração e análise da CYN nos tecidos:**

As amostras de músculo (0,4 g) e cérebro (0,2 g) foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio - PBS (0,1 M, pH 7,5 para o músculo e pH 8,0 para o cérebro) e centrifugadas (15.000 rpm / 4 °C / 10 min). Os sobrenadantes foram congelados e armazenados a -76°C. Posteriormente, alíquotas foram obtidas para a realização das análises da AChE no músculo e no cérebro e atividade da GST, níveis de GSH e LPO no cérebro.

Para a análise CYN, os extratos de cérebro e músculo (sobrenadantes) foram filtrados (0,45 µm - filtros celulose regenerada - Sartorius), armazenados a -20 °C e, posteriormente, analisados pelo método de imunoenensaio do tipo ELISA (policlonal) utilizando kits para cilindrospermopsina (Beacon Analytical Systems Inc., Portland- ME, EUA). A média dos valores de absorvância dos animais não-expostos foi considerada como “*background*” (falso-positivo) para a quantificação CYN, isto é, estes valores foram subtraídos dos valores obtidos dos animais expostos. O limite de detecção deste método é de 0,1 ng mL<sup>-1</sup>.

### **3.5. Biomarcadores bioquímicos:**

O procedimento de cálculo das atividades dos biomarcadores avaliados está no anexo I desta tese.

#### **3.5.1. Avaliação da atividade da Acetilcolinesterase (AChE):**

A análise da atividade da AChE foi realizada de acordo com Oliveira Ribeiro e Silva de Assis (2005). Para o ensaio, 50 µL de extrato tecidual (tampão fosfato para o branco) foram adicionados a uma microplaca de 96 poços, seguido por 200 µL de DTNB 0,75 mM (ácido 5-5'-ditiobis (2-nitrobenzóico (preparado em tampão de fosfato)). Em seguida, foram adicionados

50  $\mu\text{L}$  de iodeto de acetiltiocolina (9,0 mM em tampão fosfato) e a absorbância foi medida a 405 nm em espectrofotômetro (seis ciclos de 30 segundos de intervalo). O coeficiente de extinção molar de 13,6 mM  $\text{cm}^{-1}$  foi utilizado para calcular a atividade da enzima.

### **3.5.2. Avaliação da atividade global das isoformas da GST:**

Seguindo-se o método descrito por Keen et al. (1976) um volume de 50  $\mu\text{L}$  do extrato tecidual (tampão fosfato para o branco) foi adicionado a microplacas de 96 poços, seguido imediatamente por 100  $\mu\text{L}$  de meio de reação (GSH 1,5 mM e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 2,0 mM em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5). O aumento da absorbância foi imediatamente medido a 340 nm em espectrofotômetro e o coeficiente de extinção molar de 9,6 mM<sup>-1</sup>  $\text{cm}^{-1}$  para o CDNB foi utilizado para calcular a atividade da enzima.

### **3.5.3. Avaliação dos conteúdos de GSH:**

Os níveis de GSH foram medidos após a precipitação da proteína da alíquota do homogenato tecidual com ácido tricloroacético 10% e centrifugação (10.000 g / 15 min. / 4 °C). No ensaio, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  do extrato tecidual e 230  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-base (0,4 M, pH 8,9) a uma nova microplaca. Como branco, foi utilizado 230  $\mu\text{L}$  do tampão Tris-base 0,4 M mais 50  $\mu\text{L}$  de TCA 10% em PBS. Por último, 20  $\mu\text{L}$  de DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico) 2,5 mM (em metanol 25%, tampão Tris-base 300 mM, pH 8,9) foi rapidamente acrescentado e procederam-se imediatamente as medidas de absorbância (415 nm em espectrofotômetro) (SEDLAK e LINDSAY, 1968) A determinação do conteúdo de GSH foi realizada através de comparação com curva-padrão de GSH (0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 e 32 nM GSH).

### **3.5.4. Avaliação da peroxidação de lipídios (LPO):**

A LPO foi medida pelo método FOX (*Ferrous Oxidation in Xylenol-orange*) segundo método descrito por Jiang et al. (1991; 1992) um volume de 800 µL de solução de reação (laranja de xilenol 0,1 mM, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25 mM, hidroxitolueno butilado 4,0 mM e FeSO<sub>4</sub>.NH<sub>4</sub> 0,25 mM - sulfato de ferroso amoniacal em metanol 100%) foi adicionado a tubos contendo 100 µL do extrato tecidual ou tampão fosfato (para o branco). A solução foi misturada e incubada durante 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, estes tubos foram centrifugados (10.000 x g / 5 min / 4 °C), e 250 µL deste sobrenadante foram colocados em uma microplaca de 96 poços e a absorbância medida a 550 nm em espectrofotômetro. Para determinar a concentração hidroperóxidos lipídicos (metabólitos resultantes da peroxidação lipídica), o coeficiente de extinção molar aparente utilizado para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e para hidroperóxidos de cumeno foi de  $4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  através de cálculo estabelecido pelo mesmo autor.

### **3.5.5. Quantificação de proteínas totais:**

As proteínas totais foram quantificadas de acordo com Bradford (1976). Para o ensaio, 10 µL do sobrenadante ou tampão fosfato (para o branco) e 250 µL de reagente de Bradford (azul brilhante de Coomassie BG-250) foram adicionados a uma microplaca de 96 poços e a absorbância foi medida a 595 nm. O teor de proteína foi calculado através de comparação com uma curva padrão de albumina de soro bovino.

### 3.6. Análises estatísticas:

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão de determinações de grupo com 10 repetições. Análise de variância (ANOVA) seguida pela análise *post hoc* por meio do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) foram realizados para análise bioquímica. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. As correlações entre a atividade de AChE e a concentração de CYN no músculo e no cérebro foram analisados pelo teste de correlação de Pearson.

## 4. RESULTADOS

Todos os resultados da concentração de CYN (média  $\pm$  desvio-padrão) estão expressos em  $\mu\text{g}$  CYN/kg de órgão/tecido. O dados brutos em relação às análises estão no anexo 2 desta tese.

### 4.1 Detecção e quantificação de CYN no cérebro:

Observou-se uma concentração no cérebro de  $0,259 \pm 0,095$  e  $0,253 \pm 0,157$ , após 7 e 14 dias de exposição, respectivamente, após a exposição à CYNex. Não houve diferença significativa nos níveis de CYN cerebrais entre estes dois períodos observados. Quando expostos a toxina purificada (CYNp) os valores foram bastante diferentes, mostrando uma menor concentração no cérebro de  $0,168 \pm 0,099$  e  $0,109 \pm 0,070$ , depois de 7 e 14 dias, respectivamente. Da mesma forma, não foi encontrada diferença significativa entre os dois períodos observados.

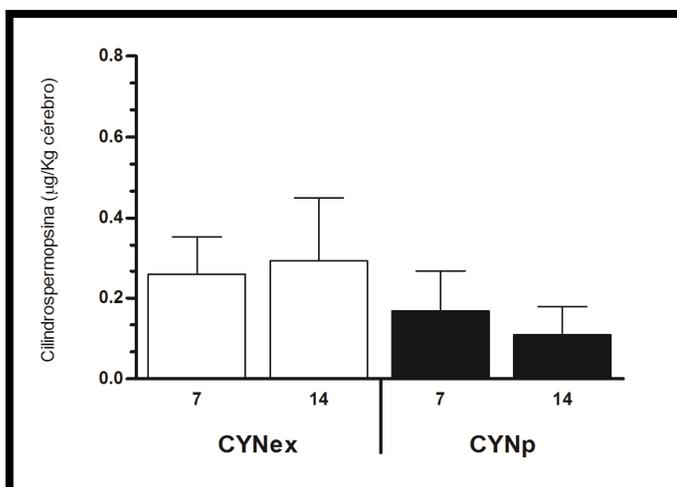


Figura 4 - Concentrações de cilindrospermopsina no cérebro de *H. malabaricus* expostos a uma dose única de CYN ( $50 \mu\text{g}$  CYN  $\text{kg}^{-1}$  peso corpóreo) em extrato aquoso (CYNex) e CYN purificada (CYNp) após 7 e 14 dias.

Barras indicam os desvios-padrão. Valores de concentração de CYN obtidos após subtração dos valores nos animais controle (falso-positivos).

#### 4.2. Detecção e quantificação de CYN no músculo:

Foi detectada a presença da toxina no tecido muscular após 7 ( $0,772 \pm 0,433$ ) e 14 ( $0,204 \pm 0,112$ ) dias de exposição a CYNex. Peixes expostos a CYNp também apresentaram a presença de CYN em 7 ( $0,429 \pm 0,249$ ) e 14 ( $0,209 \pm 0,196$ ) dias após a exposição. Os níveis de CYN foram significativamente superiores em peixes expostos a CYNex após 7 dias comparativamente com 14 dias pós-exposição ( $p < 0,001$  - figura 5).

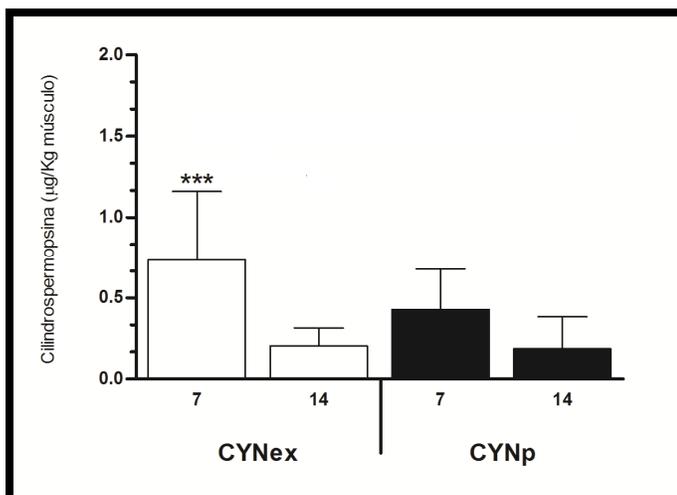


Figura 5 - Concentrações de cilindrospermopsina no músculo de *H. malabaricus* expostos a uma dose única de CYN ( $50 \mu\text{g CYN} \cdot \text{kg}^{-1}$  peso corpóreo) em extrato aquoso (CYNex) e CYN purificada (CYNp) após 7 e 14 dias. Barras indicam os desvios-padrão. Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa entre os dias do mesmo tratamento, onde \*\*\* indica que  $p < 0,001$ . Valores de concentração de CYN obtidos após subtração dos valores nos animais controle (falso-positivos).

Comparativamente, de uma maneira geral, e embora não hajam diferenças significativas, as concentrações de CYN são maiores quando os peixes estão expostos a CYNex do que CYNp para ambos os tecidos estudados (figuras 4 e 5). É notável que, mesmo depois de 14 dias de exposição, são encontradas concentrações de CYN no cérebro no grupo CYNex.

### 4.3. Análises bioquímicas:

A atividade da AChE aumentou no cérebro dos peixes expostos a CYNex no 7º dia pós-exposição (44%,  $p < 0,01$ ), mas retornou ao nível do controle após 14 dias. Inversamente, a exposição à CYNp levou a uma diminuição significativa (24%,  $p < 0,01$ ) de atividade da AChE após 14 dias de exposição, em comparação com o controle e com o grupo CYNex (figura 6).

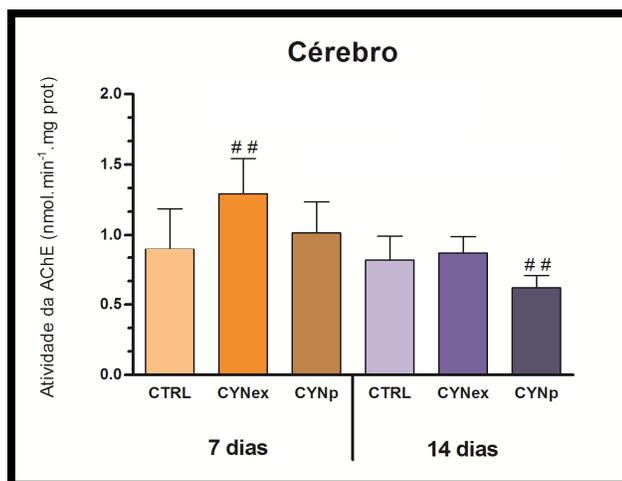


Figura 6 - Efeitos sobre a atividade da AChE no cérebro de *H. malabaricus* 7 e 14 dias após exposição a uma dose única de CYN ( $50 \mu\text{g CYN kg}^{-1}$  peso corpóreo) em extrato aquoso e CYN purificada. Barras indicam os desvios-padrão. O símbolo # indica diferença estatisticamente significativa comparando os grupos expostos (Extrato aquoso – CYNex, e toxina purificada – CYNp) com seu respectivo controle (Controle – CTRL), onde ## indica que  $p < 0,01$ .

Para o tecido muscular, os indivíduos expostos a CYNex e CYNp apresentaram redução significativa na atividade da enzima comparando-os ao grupo controle (38%,  $p < 0,05$  e 57%,  $p < 0,01$ , respectivamente), após 7 dias de exposição e não foram observadas diferenças entre os grupos no 14º dia (figura 7).

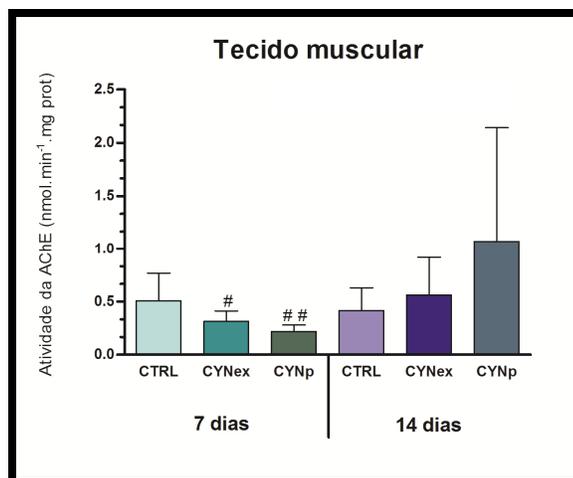


Figura 7 - Efeitos sobre a atividade da AChE no tecido muscular de *H. malabaricus* 7 e 14 dias após exposição a uma dose única de CYN ( $50 \mu\text{g CYN kg}^{-1}$  peso corpóreo) em extrato aquoso e CYN purificada. Barras indicam os desvios-padrão. O símbolo # indica diferença estatisticamente significativa comparando os grupos expostos (Extrato aquoso – CYNex, e toxina purificada – CYNp) com seu respectivo controle (Controle – CTRL), onde # e ## indica que  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente.

Quanto aos marcadores de desequilíbrio oxidativo estudados, não houve diferença significativa na atividade da GST no cérebro dos grupos expostos à CYN, considerando 7 dias de exposição, mas uma diferença significativa (36%,  $p < 0,05$ ) entre as condições CYNp e CYNex ocorreu neste período. Diferentemente, um aumento significativo em relação ao controle foi observado na atividade da GST após 14 dias de exposição para ambos os grupos expostos (31%,  $p < 0,05$  – CYNex; 35%,  $p < 0,01$  - CYNp) (figura 8).

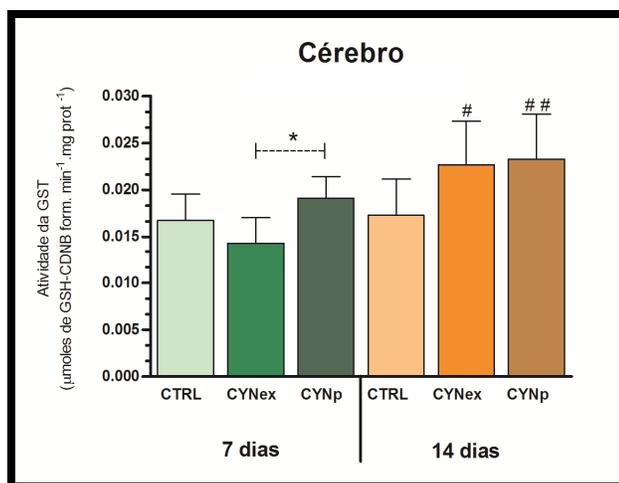


Figura 8 - Efeitos sobre a atividade da GST no cérebro de *H. malabaricus* 7 e 14 dias após exposição a uma dose única de CYN ( $50 \mu\text{g CYN. kg}^{-1}$  peso corpóreo) em extrato aquoso e CYN purificada. Barras indicam os desvios-padrão. Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos do mesmo dia de coleta, onde \* indica que  $p < 0,05$ . O símbolo # indica diferença estatisticamente significativa comparando os grupos expostos (Extrato aquoso – CYNex, e toxina purificada – CYNp) com seu respectivo controle (Controle – CTRL), onde # e ## indica que  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente.

Não houve alteração significativa nos níveis de GSH após a exposição à CYN, tanto purificada quanto através de extrato, em ambos os períodos de amostragem (figura 9).

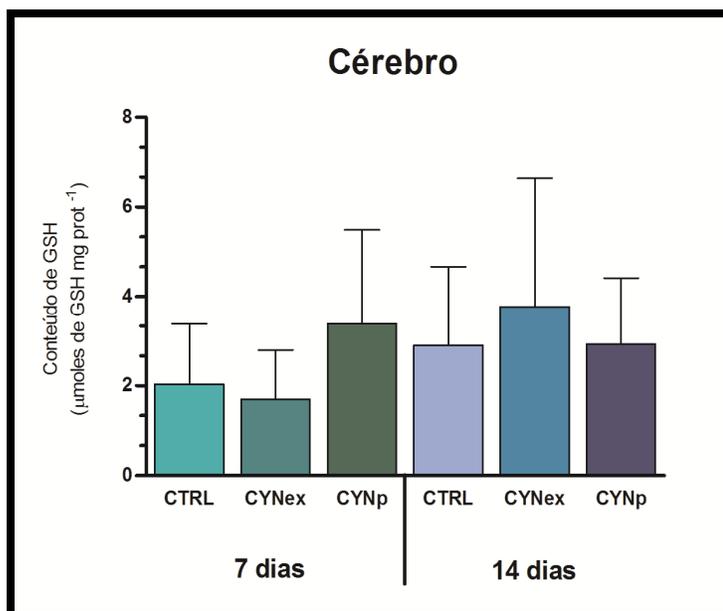


Figura 9 - Efeitos sobre o conteúdo de GSH no cérebro de *H. malabaricus* 7 e 14 dias após exposição a uma dose única de CYN ( $50 \mu\text{g CYN. kg}^{-1}$  peso corpóreo) em extrato aquoso e CYN purificada. Barras indicam os desvios-padrão.

No entanto, houve aumento na peroxidação lipídica após a exposição ao CYNex ( $p < 0,001$ ) e CYNp ( $p < 0,01$ ) no 7º dia (aumento de 74%) e 14º dia (aumento de 80%) em relação ao controle (figura 10).

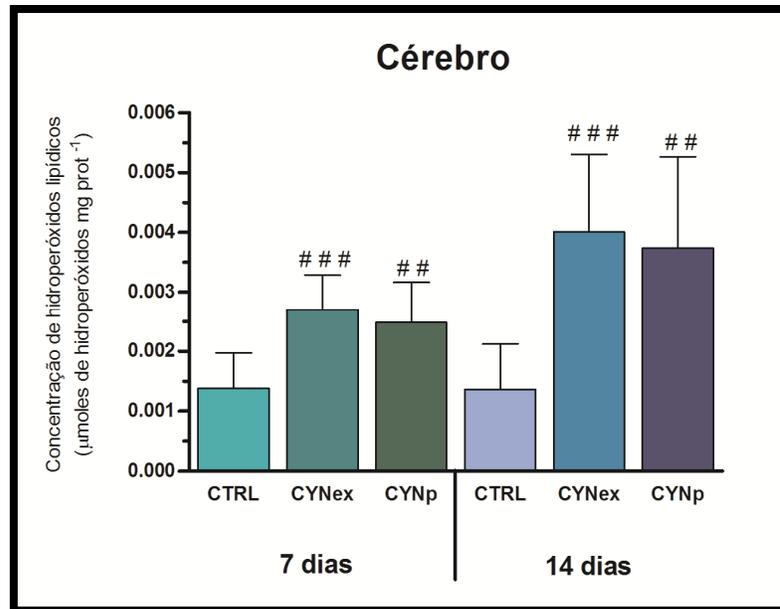


Figura 10 - Efeitos sobre a concentração de hidroperóxidos lipídicos no cérebro de *H. malabaricus* 7 e 14 dias após exposição a uma dose única de CYN ( $50 \mu\text{g CYN kg}^{-1}$  peso corpóreo) em extrato aquoso e CYN purificada. Barras indicam os desvios-padrão. O símbolo # indica diferença estatisticamente significativa comparando os grupos expostos (Extrato aquoso – CYNex, e toxina purificada – CYNp) com seu respectivo controle (Controle – CTRL), onde ## e ### indica que  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente.

## 5. DISCUSSÃO

A detecção da CYN no cérebro de peixes expostos tanto ao extrato aquoso contendo CYN (CYNex) ou toxina purificada (CYNp) mostrou que este órgão é um alvo de CYN. Além disso, a detecção de concentrações mais elevadas de toxina (sem diferença significativa) nos peixes expostos a CYNex é um importante tema de investigação. Embora não exista uma explicação razoável para este resultado, a hipótese de outros compostos presentes no extrato aquoso estarem auxiliando a entrada da toxina em tecidos ou órgãos deve ser considerada. A ocorrência de outras substâncias pode favorecer a absorção de toxina ou, mais provavelmente, prejudicar o efluxo ou influxo da toxina através da inibição de transportadores de membrana, tais como aqueles de fenótipo de resistência a multixenobióticos (MXR), como foi recentemente relatado por Liebel et al. (2011) em hepatócitos de peixe.

Transportadores podem auxiliar ou prejudicar a entrada da toxina em tecidos ou órgãos. Além disso, os transportadores MXR nas células endoteliais cerebrais são essenciais para função regulatória de barreira hematoencefálica (KING et al., 2001). Desta forma, qualquer substância que afetá-los pode tornar o cérebro mais sensível às toxinas exógenas e endógenas. Como demonstrado nos resultados deste trabalho, o intervalo entre a primeira coleta (7º dia) e a segunda (14º dia), não foi suficiente para que *H. malabaricus* eliminasse a toxina do cérebro. Desta forma, observamos que CYN pode se concentrar no cérebro dos peixes expostos a concentrações suficientes para causar danos neurotóxicos.

A neurotoxicidade é um efeito importante de cianotoxinas como, por exemplo, anatoxina-a e a(s), saxitoxina (BAKKE e HORSBERG, 2007) e microcistinas (FEURSTEIN et al., 2010), mas não há dados disponíveis para CYN a este respeito.

Neste estudo, a atividade da AChE diminuiu no cérebro (14º dia) e músculo (7º dia) dos peixes expostos a CYNp, indicando possíveis efeitos inibitórios da CYN, os quais podem

ser devidos a competição (dado não confirmado) com a acetilcolina como substrato endobiótico para a ACHE (KISS et al., 2002). A consequência da inibição da AChE é o aumento da concentração de acetilcolina na fenda sináptica. Dependendo do nível de inibição, uma super-estimulação dos neurônios pós-sinápticos pode induzir diferentes perturbações fisiológicas como hiperatividade, com alteração dos níveis de ácido láctico nos tecido muscular, assim como uma super-estimulação nas células glandulares.

No caso de *H. malabaricus*, a diminuição da atividade da AChE ocorreu após a exposição a CYNp (no 7º dia no músculo e no 14º dia no cérebro), assim como no músculo dos animais expostos ao CYNex (7º dia). Apesar de não ter sido realizado o acompanhamento do animal ao longo do experimento, há a possibilidade de uma recuperação da atividade da AChE no músculo após 14 dias, uma resposta que poderia ser atribuída ao aumento da síntese da enzima ou então a depuração dos produtos tóxicos presentes no extrato. Além disso, a possível síntese compensatória também foi observada no 7º dia no cérebro (grupo CYNex), mas os níveis voltaram à normalidade no 14º dia. Por outro lado, um efeito inibidor tardio (diminuição da atividade da AChE) foi observado para CYNp no cérebro comparativamente ao músculo, resposta que não pode ser explicada pelos níveis de CYN, mas pode ser um resultado dos sistemas de defesa das células. Essas hipóteses são pontos importantes para uma investigação mais aprofundada.

Importantes mecanismos de defesa antioxidante e de desintoxicação dependem dos níveis de glutathione (GSH). GSH é um tripeptídeo endógeno muito importante nos tecidos com alto metabolismo aeróbico, como o cérebro, para controlar os níveis de espécies oxidativas. Assim, a capacidade de CYN para diminuir ou mesmo inibir a síntese de GSH (RUNNEGAR et al. 1994, 1995; HUMPAGE et al. 2005) representa um risco funcional grave para o cérebro. O presente estudo mostrou que a concentração de GSH não é afetada pela exposição à CYN no cérebro dos animais, sugerindo que não há interferência da toxina nos

níveis de GSH ou então, houve uma recuperação destes níveis após 7 dias de exposição. A recuperação de GSH já foi relatada em peixes após 5 dias de exposição à CYN (I.P), que primariamente tiveram um diminuição desta concentração nas primeiras 24 horas pós-injeção (GUTIÉRREZ-PRAENA et al. 2011a e b), o que pode confirmar os resultados atuais.

Além das funções antioxidantes, GSH é um co-substrato para a enzima de conjugação glutathion S-transferase (GST), que catalisa a conjugação de compostos eletrofílicos e hidroperóxidos orgânicos com GSH (ARTEEL e SIES, 2001). De fato, a presença destes substratos podem explicar o aumento da atividade de GST após a exposição à CYNex e CYNp. Muitos substratos de GST podem induzir o aumento da expressão desta enzima, nesse caso, isso ocorreu muito tarde (levou mais de 7 dias), refletindo a baixa capacidade de desintoxicação do cérebro, ou talvez a quantidade inicial de CYN nesses tecidos não tenha sido suficiente para ativar a expressão em 7 dias. Do mesmo modo, o aumento da atividade da GST tem sido relatada para o fígado de peixe (*Oreochromis niloticus* - Tilápia) após a exposição à CYN (PUERTO et al., 2011a) e saxitoxina (CLEMENTE et al., 2010) e para o cérebro após a exposição à microcistina-RR (CAZENAVE et al., 2008). Várias cianotoxinas são metabolizadas pela GST, mas ainda não está claro se CYN é um substrato para esta enzima.

Seja qual for o papel exato (direto ou indireto) da GST em relação à defesa da célula contra a CYN, a atividade aumentada da GST e os níveis inalterados de GSH não foram eficientes para evitar os efeitos de diminuição da atividade da AChE e peroxidação lipídica no cérebro. Uma severa peroxidação de lipídios causa perda da fluidez, aumento da permeabilidade e uma eventual ruptura da membrana (GUTTERIDGE, 1995). É essencial, portanto, que as células neutralizem os hidroperóxidos lipídicos e seus subprodutos, seja através da conjugação com GSH, seja por outros meios. No entanto, neste trabalho a constatação de que o aumento da peroxidação lipídica tenha ocorrido já no dia 7 e não tenha

vido neutralizada nos 7 dias seguintes indica um estresse contínuo, que pode eventualmente levar a um mau funcionamento da célula ou mesmo morte celular.

Outros estudos já relataram o potencial da CYNp em alterar a homeostase redox e levar a peroxidação lipídica em hepatócitos (LIEBEL et al., 2011) e fígado de peixes (PUERTO et al., 2011a; GUTIÉRREZ-PRAENA et al., 2011b), no entanto, os efeitos da toxina sobre o cérebro podem ser mais graves uma vez que se trata do órgão sensorial, motor e controlador do metabolismo animal. Além disso, estudos com *H. malabaricus* expostos ao extrato de cianobactérias contendo saxitoxina apresentaram alterações nos biomarcadores investigados (GST, GSH e LPO) (SILVA et al., 2011), indicando que o potencial neurotóxico da CYN é contundente, uma vez que ambas são alcalóides.

Infelizmente, não foi possível estudar o comportamento dos peixes após a exposição à CYN, mas existem dados sobre efeitos de outras cianotoxinas (microcistinas e saxitoxina) sobre a atividade de natação dos peixes (CAZENAVE et al., 2008; CLEMENTE et al., 2010). Logo, os resultados obtidos neste trabalho levantam a necessidade de estudos em relação às consequências da exposição à CYN no aspecto comportamental destes animais.

Muito embora tenham sido observadas alterações nos biomarcadores analisados neste estudo, não foi possível observar diferenças significativas em relação à toxicidade quando os animais foram expostos ao extrato tóxico ou à toxina purificada sugerindo que ambas as formas foram neurotóxicas para os peixes. De acordo com a literatura, os extratos tóxicos contendo cianotoxinas são geralmente mais tóxicos do que a toxina isolada/purificada devido à sinergia entre os compostos bioativos e a toxina (FALCONER, 2007, KINNEAR, 2010; GUTIÉRREZ-PRAENA et al., 2011b).

## 6. CONCLUSÕES

- A detecção de CYN no cérebro dos animais mostrou que a CYN é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica.
- A exposição de *H. malabaricus* à CYN levou à diminuição da atividade da AChE (CYNp) bem como a aumentos da atividade de GST e peroxidação lipídica (tanto para CYNp quanto para CYNex) no cérebro desta espécie.
- Os efeitos estavam presentes mesmo 14 dias após a exposição, indicando a ineficiência dos mecanismos de desintoxicação celulares para neutralizar e/ou eliminar a CYN.
- Os efeitos neurotóxicos observados no cérebro foram corroborados pela diminuição da atividade da AChE no músculo dos peixes.
- Tanto os efeitos quanto a presença da CYN no cérebro indicam que esta toxina tem um papel neurotóxico importante nos peixes expostos.

## CAPÍTULO II

### HEPATOTOXICIDADE DA CILINDROSPERMOPSINA EM

#### *Hoplias malabaricus*.

#### RESUMO

Cilindrospermopsina (CYN) é uma cianotoxina que inibe as sínteses de proteína e GSH. No entanto, há poucos estudos toxicológicos que mostram esse tipo de dano em peixes tropicais, especialmente comparando a toxina purificada e extrato contendo CYN. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a hepatotoxicidade através dos níveis de estresse oxidativo e histopatologia em diferentes biomarcadores em uma espécie de peixe tropical (*Hoplias malabaricus*) expostas a uma dose única (50 µg CYN peixe kg<sup>-1</sup>) em duas formas de CYN - Extrato aquoso tóxico (CYNex) e toxina purificada (CYNp) - por injeção intraperitoneal (i.p.). Os peixes foram sacrificados 7 e 14 dias pós-exposição, então o fígado foi removido para as respectivas análises. Por meio de ELISA, a CYN foi detectada em níveis similares em ambas as datas. Alguns biomarcadores não apresentaram alterações no período observado (atividades da catalase, GPx, GR e níveis de GSH), embora tenha sido observado um aumento nas atividades de SOD (CYNex em 14 dias e no 7º dia em CYNp) e G6PDH (CYNex em 14 dias). Atividade da GST diminuiu no 7º dia (CYNex), mas aumentou dramaticamente no 14º dia (CYNp). Houve um aumento na concentração de hidroperóxidos lipídicos (CYNex e CYNp) e oxidação de proteínas (somente em CYNex), ambos após 14 dias de exposição, caracterizando dano oxidativo no fígado. Corroborando os resultados bioquímicos, alterações histopatológicas foram observadas (necrose), indicando sérios danos nesse tecido. A incidência de centros de melanomacrófagos e melanomacrófagos livres sugere uma resposta imune neste órgão devido à morte celular observada. Assim, a exposição aguda de CYN é capaz de causar danos bioquímicos e morfológicos graves no fígado de *H. malabaricus*, sugerindo que a peroxidação de lípidios e a carbonilação de proteínas (PCO) constituem importantes parâmetros de citotoxicidade da CYN. O fato da toxina pura não tem gerado PCO indica que outras moléculas presentes no extrato também possuem um elevado grau de toxicidade, que é uma questão importante para estudos posteriores.

**Palavras-chave:** cilindrospermopsina; estresse oxidativo; histopatologia; teleósteo; *Hoplias malabaricus*.

## 1. INTRODUÇÃO

A emissão de gases de efeito estufa somado ao constante despejo de esgotos doméstico e industrial tem sido identificada como as principais causas de florações de cianobactérias em todo o mundo (PEARL e HUISMAN, 2008; EL-SHEHAWY et al, 2011). Estes microrganismos já foram identificados em casos de envenenamento e morte de seres humanos e animais uma vez que muitas espécies são capazes de produzir metabolitos conhecidos como cianotoxinas (CHORUS e BARTRAM, 1999).

Como já mencionado no capítulo I, a cilindrospermopsina (CYN) é um cianotoxina citotóxica (FROSCIO et al., 2009) que é primariamente tóxica para o fígado e rins de mamíferos, mas atinge vários outros órgãos (FUNARI e TESTAI, 2008). Esta cianotoxina é produzida por várias espécies de cianobactérias (ŽEGURA et al., 2011), e está envolvida em casos de intoxicação e morte de animais, incluindo seres humanos (HAWKINS et al, 1985; CARMICHAEL et al, 2001; GRIFFITHS e SAKER, 2003).

Em células de mamíferos, o mecanismo de toxicidade primário da CYN é a inibição de síntese de proteínas (TERAO et al., 1994; FROSCIO et al., 2003) e de glutathione (GSH) (RUNNEGAR et al., 1994, 1995). No entanto, sugere-se que os metabólitos gerados pela ação do complexo citocromo P450 desempenham um papel crucial na toxicidade da CYN (HUMPAGE et al, 2005; ŽEGURA et al., 2011). Além disso, há fortes evidências de que a CYN é genotóxica e tem um potencial carcinogênico (SHEN et al., 2002; ŽEGURA et al., 2011; ŠTRASER et al., 2012).

A injeção intraperitoneal de CYN radio-marcada resultou na distribuição predominantemente hepática (NORRIS et al. 2001). Efeitos de intoxicação em humanos incluem, principalmente, hepatoenterite (BYTH, 1980). No fígado de ratos, a CYN causa necrose severa (HAWKINS et al., 1985), esteatose hepática com necrose periacinar (SEAWRIGHT et al., 1999), e aumento do peso deste órgão (HUMPAGE e FALCONER,

2003). Terao et al. (1994) verificaram a inibição da síntese de proteínas no fígado de camundongos a partir da dissociação observada dos ribossomos do retículo endoplasmático, seguido pela proliferação da membrana, a acumulação de gotículas de gordura, e morte celular.

A importância dos danos oxidativos como um dos mecanismos tóxicos da CYN ainda não é clara. Primariamente, Froscio (2002) descartou a possibilidade de que a toxicidade da CYN estivesse ligada a danos oxidativos, entretanto, de acordo com ensaios *in vitro*, a citotoxicidade da CYN pode ser mediada pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). O papel da GSH como molécula antioxidante parece ser mais importante nos mamíferos do que em peixes (HUMPAGE et al, 2005; LIEBEL et al., 2011, GUTIÉRREZ-PRAENA et al., 2012a). Adicionalmente, Froscio (2002) e Humpage et al. (2005) excluíram a peroxidação lipídica como um mecanismo tóxico da CYN, mas estudos mais recentes têm indicado exatamente o contrário (PUERTO et al., 2011; GUTIÉRREZ-PRAENA et al., 2011a e b, 2012a e b; LIEBEL et al., 2011).

Em geral, os efeitos tóxicos da CYN podem ser mais pronunciados por exposição ao extrato tóxico do que a toxina pura, provavelmente devido à presença de outras substâncias químicas bem como as interações entre CYN e outras moléculas presentes no extrato (FALCONER, 2007). Contudo, poucos estudos têm relatado os efeitos tóxicos de ambos (purificada e extrato) em peixes (GUTIÉRREZ-PRAENA et al., 2011a e b; 2012b).

Os peixes são importantes modelos para a investigação dos efeitos das cianotoxinas devido ao contato direto destes animais com estes metabólitos, seja pelo fato dos últimos estarem dissolvidos na água ou pela ingestão de células de cianobactérias propriamente ditas. Além disso, os vertebrados aquáticos parecem ser mais suscetíveis aos efeitos tóxicos de cianotoxinas do que organismos inferiores na cadeia trófica (KINNEAR, 2010). Nesse sentido, o peixe neotropical *Hoplias malabaricus* foi escolhido para o presente estudo, devido

à sua ampla utilização como modelo experimental para avaliar a toxicidade de uma variedade de compostos (RABITTO et al, 2005; OLIVEIRA RIBEIRO et al, 2006; MELA et al, 2007; FILIPAK NETO et al., 2007; MELA et al., 2010).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

- Avaliar os efeitos tóxicos da CYN sobre o fígado do peixe neotropical *H. malabaricus* exposto a uma dose única de CYN purificada e de extrato aquoso contendo CYN.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Verificar a presença de CYN no fígado de *H. malabaricus* após injeção intraperitoneal;
- Avaliar os efeitos da toxina utilizando diferentes biomarcadores de desequilíbrio e dano oxidativo:
- Avaliar os danos no tecido hepático do animal através de análises histopatológicas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O cultivo da cepa CYP011K da espécie *C. raciborskii*, a purificação, extração e análise da CYN, bem como o desenho experimental e a quantificação e detecção da CYN no fígado de *H. malabaricus* já foram reportados nos itens 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4, respectivamente, do Capítulo I.

#### 3.1. Biomarcadores de desequilíbrio e dano oxidativo:

Alíquotas das amostras de fígado homogeneizadas (0,3 - 0,4 gramas) em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,2), centrifugado (12.000 rpm / 0-4 °C / 40 min.) e armazenado a -76 ° C. Amostras foram diluídas de acordo com a concentração de proteína necessária para cada ensaio.

O procedimento de cálculo das atividades dos biomarcadores avaliados está no anexo I desta tese.

##### 3.1.1. Avaliação da atividade da CAT:

A atividade de CAT foi medida de acordo com a Aebi (1984). Brevemente, um volume de 20 µL do sobrenadante ou PBS (para o branco) foi misturado com 980 µL de meio de reação (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM, Tris-base 50 mM, EDTA 0,25 mM, pH 8,0 a 25 °C). A variação da absorbância a 240 nm foi monitorado durante 90 segundos com intervalo entre as medições de 1 segundo. O coeficiente de extinção de 36 mM cm<sup>-1</sup> para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi utilizado para calcular a atividade da enzima.

### **3.1.2. Avaliação da atividade da SOD:**

Etanol gelado (aproximadamente 4°C) foi adicionado ao sobrenadante ou PBS (para o branco) até atingir a concentração final de etanol de 25%. A mistura foi centrifugada (12.000 g / 20 min / 0-4 °C). Em uma microplaca de 96 poços, 20 µL de sobrenadante (25% de etanol para o branco) e 70 µL de meio de reação (cloreto de *nitroblue tetrazolium* 286 µM, EDTA 0,05 mM, carbonato de sódio 69 mM, pH 10,2) foram misturados. Para iniciar a reação foram adicionados 110 µL de cloreto de hidroxilamina 67 mM em tampão carbonato de sódio 182 mM, pH 10,2. A atividade da SOD foi medida a 560 nm, no início da reação e depois de 2 horas de incubação (CROUCH et al. 1981). A taxa de redução do NBT na ausência de extrato de tecido (solução hidro-alcoólica ao invés de amostra) foi utilizada como taxa de referência.

### **3.1.3. Avaliação da atividade da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH):**

Em uma microplaca transparente de 96 poços foram adicionados 30 µL de sobrenadante (PBS como branco) e 170 µL de meio de reação ( $\beta$ -NADP<sup>+</sup> 1,0 mM, G6P 2,0 mM, Tris-HCl 0,1 M, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 8,0 a 25 °C). A atividade foi espectrofotometricamente verificada pela variação na absorbância a 340 nm durante 2 minutos em intervalos de 20 segundos (GLOCK e MCLEAN, 1953). O coeficiente de extinção para NADPH de 6,22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> foi usado para calcular a atividade da enzima.

### **3.1.4. Avaliação da atividade da GPx:**

A atividade da GPx foi determinada na fração S9 (sobrenadante obtido após centrifugação a 9.000 g por 15 minutos). Em uma microplaca de 96 poços foi misturado um volume de 30 µL do sobrenadante (fração S9) ou PBS (para o branco) e 130 µL de solução de reação (Azida sódica 2,0 mM,  $\beta$ -NADPH 0,2 mM, 1,0 U.mL<sup>-1</sup> de glutathione redutase e GSH

2,0 mM em tampão fosfato de sódio 0,1 mM, pH 7,0). A reação foi iniciada pela adição de 40 µL de peróxido de hidrogênio 30% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0. A variação da absorbância foi imediatamente medida a 340 nm durante 2 minutos com intervalos de 10 segundos (SIES et al., 1979). O coeficiente de extinção para NADPH de  $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  foi usado para calcular a atividade da enzima.

### **3.1.5. Atividade da glutathione redutase (GR):**

Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 50 µL do sobrenadante obtido da fração S9 ou PBS (para o branco) e 100 µL solução de reação ( $\beta$ -NADPH 0,5 mM, glutathione oxidada (GSSG) 5,0 mM, EDTA 5,0 mM, tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,6 a 25 °C). O decréscimo na absorbância foi monitorado a 340 nm durante 5 minutos com intervalos de 30 segundos (SIES et al. 1979). O coeficiente de extinção de  $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para NADPH foi utilizado para calcular a atividade da enzima.

### **2.1.6. Avaliação da atividade global das isoformas da glutathione S-transferase (GST):**

Um volume de 20 µL de sobrenadante (PBS para o branco) e 180 µL de meio de reação (idêntico ao explicitado no item 3.5.2. do capítulo I) foi colocado em microplacas de 96 poços e o procedimento realizado foi semelhante ao descrito no item 3.5.2 do capítulo I desta tese.

### **3.1.7. Avaliação dos conteúdos de GSH:**

As concentrações de GSH foram determinadas através do mesmo procedimento utilizado no item 3.5.3 do Capítulo I.

### **3.1.8. Avaliação da peroxidação lipídica (LPO):**

A LPO foi medida pelo método já descrito no item 3.5.4 do Capítulo I.

### **3.5.9. Avaliação da carbonilação de proteínas (PCO):**

Um volume de 200  $\mu\text{L}$  de sobrenadante e 500  $\mu\text{L}$  de solução de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina 10 mM em ácido clorídrico 2,0 M) foram transferidos para um tubo de 2,0 mL e misturados em vortex. Para o branco foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de ácido clorídrico 2,0 M (sem DNPH). As amostras foram incubadas (30 °C / 1,5 horas), e então, em seguida, foi adicionado 1,0 mL de ácido tricloroacético 28%. Esta solução foi centrifugada (9.000 g / 10 min.) e o sobrenadante descartado. As proteínas precipitadas foram ressuspensas com solução de etanol / acetato de etila (1:1) e centrifugadas. Este procedimento foi repetido por 2 a 3 vezes para obtenção de um sobrenadante limpo e translúcido. As proteínas precipitadas foram solubilizadas em hidrocloreto de guanidina 6,0 M, e novamente centrifugadas (9000 g / 5 min.) para remover qualquer vestígio de material insolúvel. O conteúdo de carbonilas foi determinado espectrofotometricamente a 360 nm usando o coeficiente de absorção molar de  $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para hidrazonas e normalizado pelo teor de proteína total (LEVINE et al, 1994;. QUINLAN e GUTTERIDGE , 2000).

### **3.1.10. Quantificação de proteínas totais:**

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo mesmo método já descrito no item 3.5.5 do Capítulo I.

### **3.2. Biomarcadores histopatológicos:**

As amostras de fígado foram fixadas em solução de ALFAC (etanol a 70%: 4% de formaldeído: ácido acético a 5%) durante 16 h, lavadas em etanol 70%, desidratadas em série crescente de etanol, diafanizados em xilol e incluídos e emblocados em resina Paraplast® (Sigma). Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE), analisados e registrados em fotomicroscópio de luz (Leica).

As alterações histopatológicas foram analisadas segundo Bernet et al. (1999) através do cálculo do índice de lesão para o tecido, considerando: a ocorrência de necrose, respostas inflamatórias, esteatose, ocorrência (contagem) de centros de melanomacrófagos (CMM) e melanomacrófagos livres (ML), focos basófilos e acidófilos, parasitas e diferenciação tecidual.

### **3.3. Análise estatística dos dados obtidos:**

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão de determinações de grupo com 10 repetições. Análise de variância (ANOVA) seguida pela análise *post hoc* por meio do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) foram realizados para análise bioquímica. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Concentração de CYN no fígado:

Todos os resultados da concentração CYN (média  $\pm$  desvio-padrão) estão expressos em  $\mu\text{g CYN kg}^{-1}$ . Os dados brutos em relação às análises estão no anexo 2 desta tese.

Houve detecção de CYN no fígado de *H. malabaricus* após exposição com CYNp em 7 ( $7,90 \pm 4,19$ ) e 14 dias ( $10,51 \pm 5,39$ ) e no grupo CYNex apresentou concentrações de CYN em 7 ( $6,79 \pm 3,72$ ) e 14 dias ( $5,61 \pm 3,19$ ) (Figura 11).

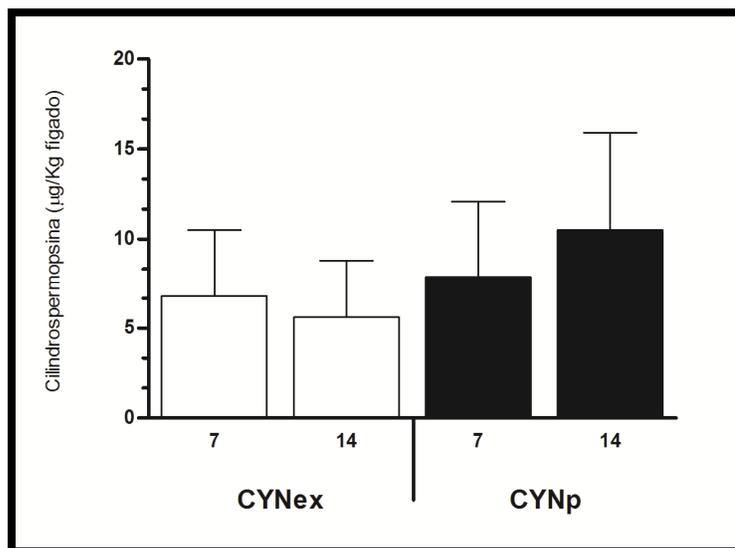


Figura 11- Concentrações de cilindropermopsina no fígado de *H. malabaricus* expostos a uma dose única de CYN ( $50 \mu\text{g CYN kg}^{-1}$  peso corpóreo) em extrato aquoso (CYNex) e CYN purificada (CYNp) após 7 e 14 dias. Barras indicam os desvios-padrão. Valores de concentração de CYN obtidos após subtração dos valores nos animais controle (falso-positivos).

### 4.2. Biomarcadores bioquímicos:

Para o melhor entendimento, as variações nas atividades enzimáticas de CAT, SOD, GPx, GR, GST, G6PDH, nos conteúdos de GSH, além das alterações de LPO e PCO, em ambos os tratamentos foram tabeladas (Tabela 1) como pode ser observado a seguir:

Tabela 1: Respostas bioquímicas - percentual de aumento ou redução em relação ao respectivo controle.

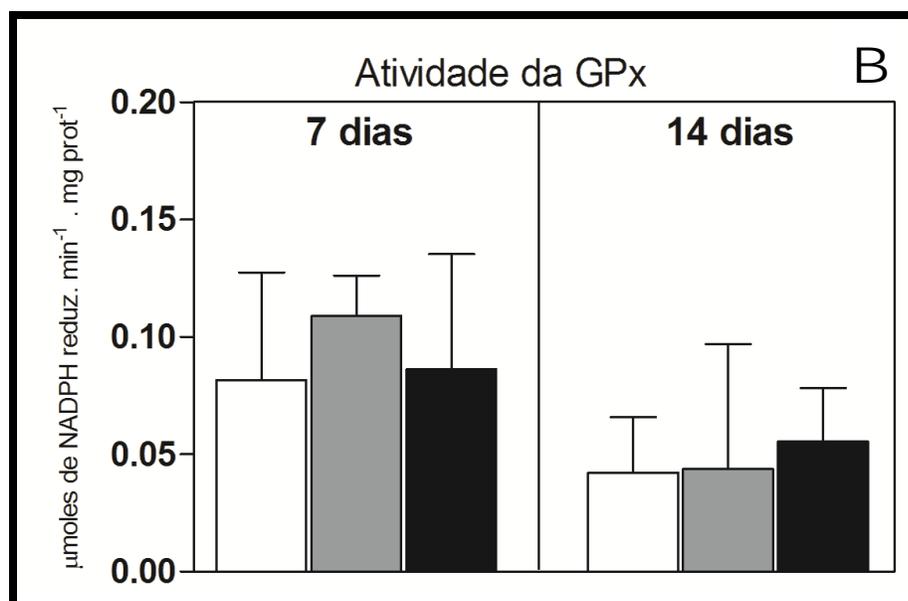
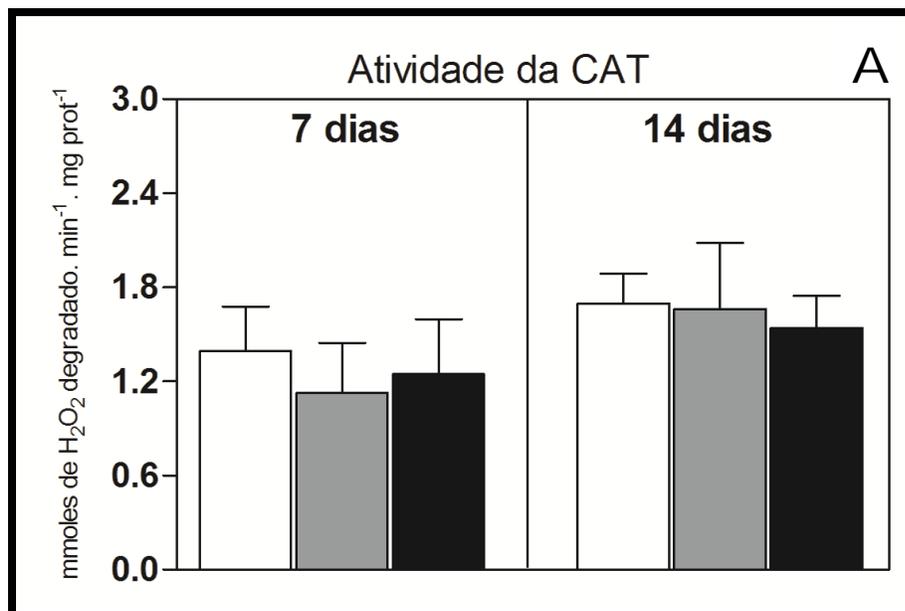
BIOMARCADOR	CYNex		CYNp		Figura
	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias	
CAT	-	-	-	-	12A
GPx	-	-	-	-	12B
GR	-	-	-	-	12C
GSH	-	-	-	-	12D
SOD	-	↑* (132%)	↑* (122%)	-	12E
G6PDH	-	↑* (187%)	-	-	12F
GST	↓** (20%)	-	↓* (19,8%)	↑*** (62%)	12G
LPO	-	↑** (91%)	-	↑*** (154%)	12H
PCO	-	↑*** (291%)	-	-	12I

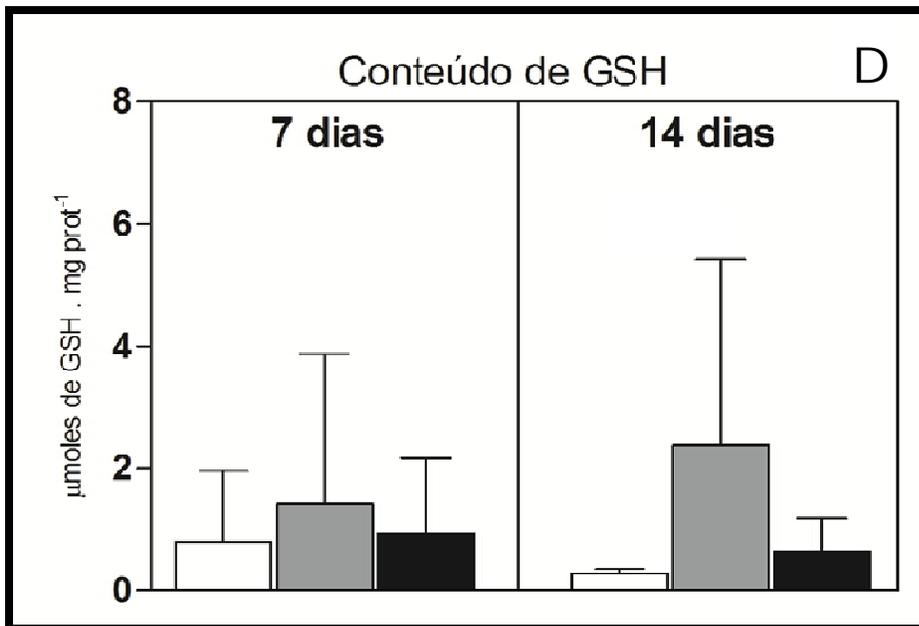
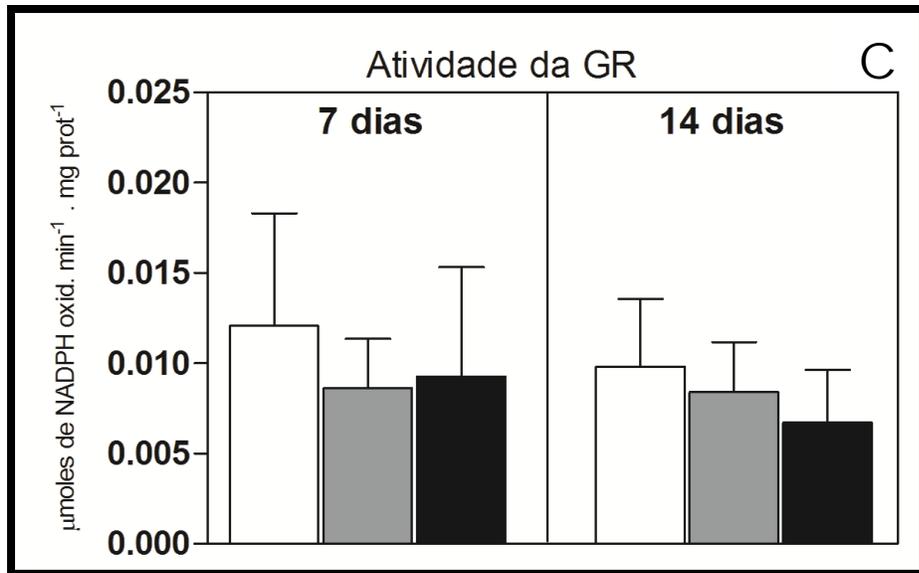
Grupos: Controle, CYNex e CYNp. Onde: asteriscos indicam diferença significativa em comparação com o grupo-controle (\* =  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Hífen indica que não houve alteração do biomarcador em relação ao seu respectivo controle. Setas para cima ou para baixo indicam que houve aumento ou diminuição, respectivamente, seguido pelo percentual de alteração em relação ao respectivo controle.

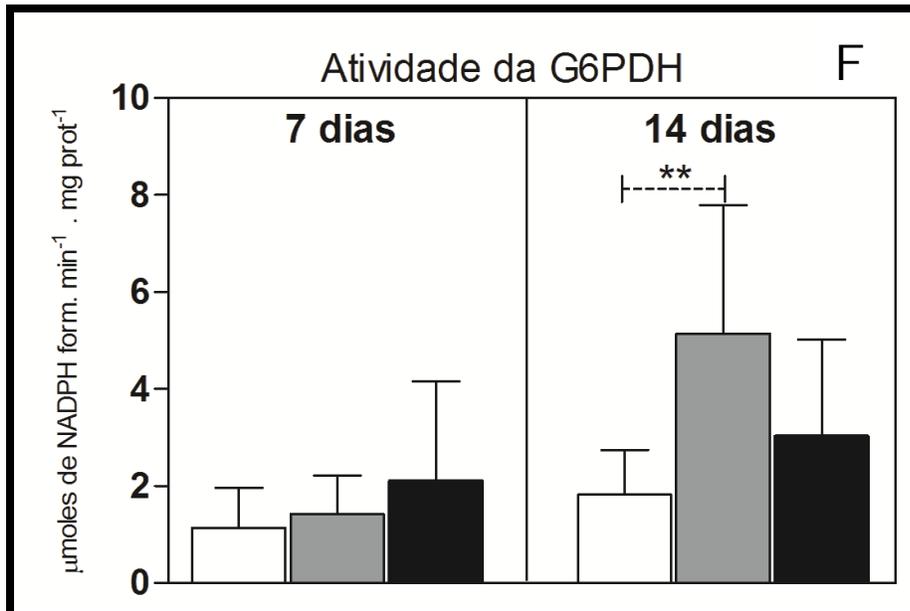
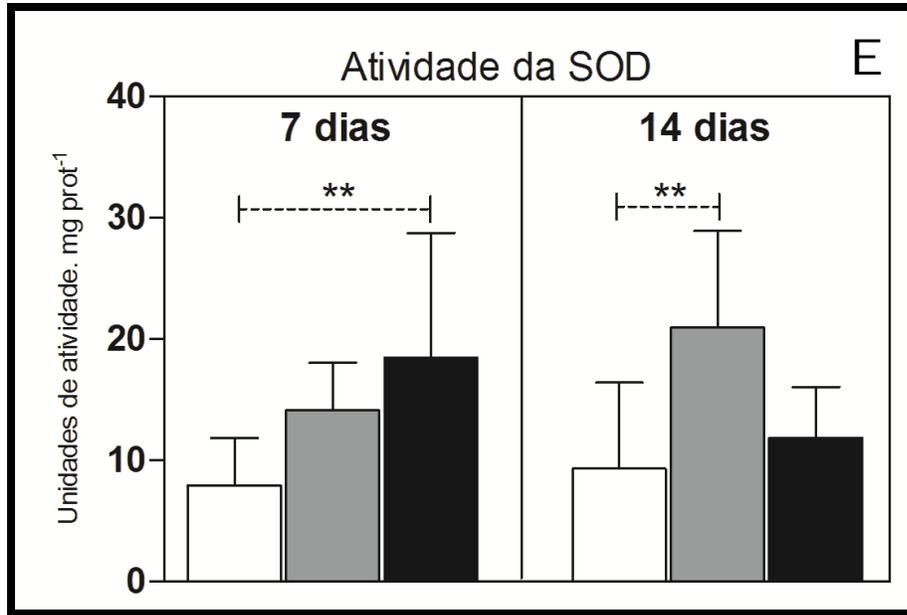
Não houve diferença entre os grupos experimentais em relação às atividades da CAT, GPx e GR (Figuras 12A, 12B e 12C). Do mesmo modo, não houve alteração nos conteúdos de GSH após a exposição à CYN(Figura 12D). Após o 7º dia de exposição, a atividade da SOD aumentou 122% no grupo CYNp ( $p < 0,01$ ), mas não em CYNex. Por outro lado, no 14º dia, a atividade desta enzima retornou aos níveis do controle no grupo CYNp e aumentou 132% no CYNex ( $p < 0,01$ ; Figura 12E). A atividade de G6PDH não foi alterada no 7º dia, mas aumentou 187% em CYNex no 14º dia ( $p < 0,01$ ; Figura 12F) e a atividade da GST diminuiu em ambos os grupos experimentais (CYNex: 20%,  $p < 0,01$ ; CYNp: 19,8%,  $p < 0,05$ ), após 7 dias de exposição. No 14º dia, a atividade GST no grupo CYNex voltou aos níveis do grupo controle, enquanto que aumentou 62% no grupo exposto a CYNp ( $p < 0,001$ ; Figura 12G).

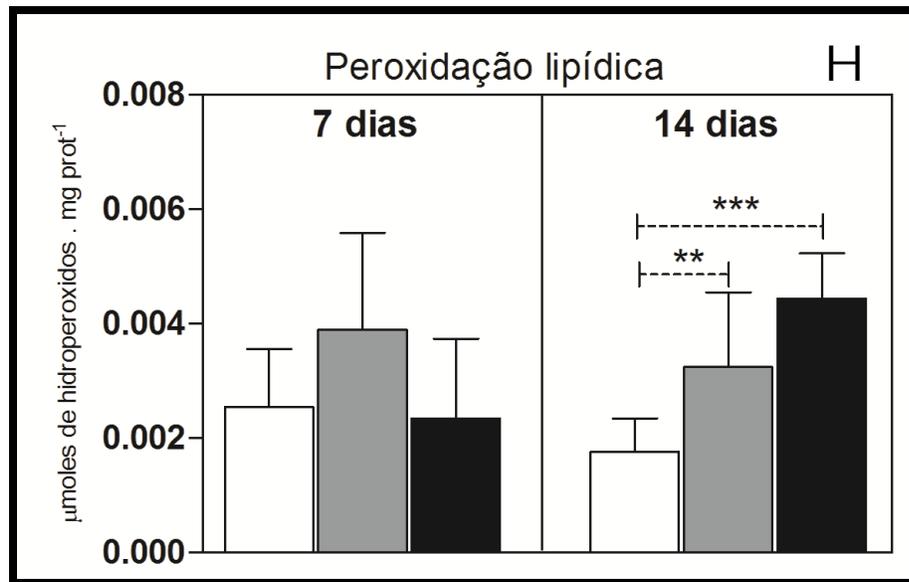
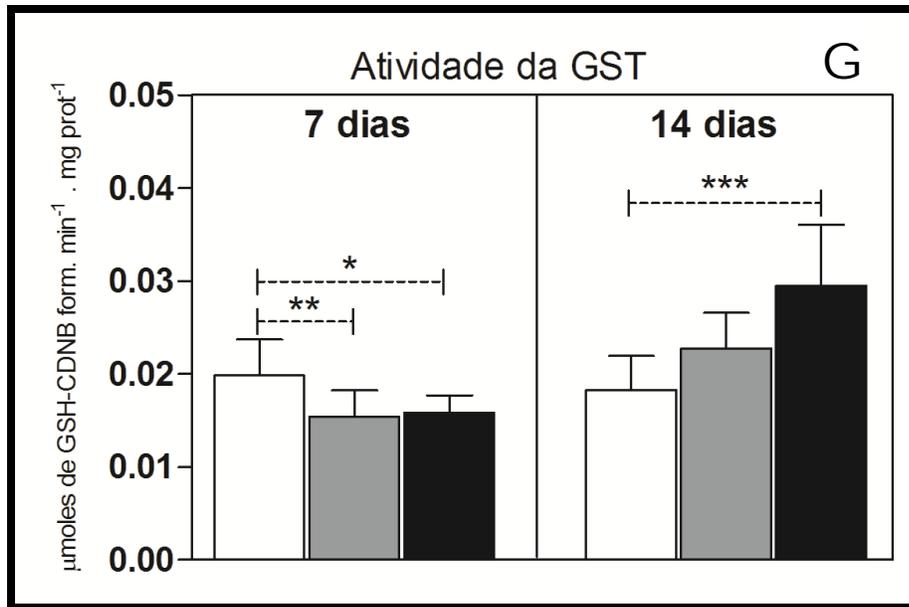
Considerando os danos às biomoléculas, em ambos os grupos, a LPO não foi alterada no 7º dia, mas aumentou 91% em indivíduos do grupo CYNex ( $p < 0,01$ ) e 154% em indivíduos expostos à CYNp ( $p < 0,001$ ) no 14º dia (Figura 12H). Da mesma forma, nenhuma diferença foi observada na PCO no 7º dia, mas aumentou 291% no grupo exposto a CYNex ( $p < 0,001$ ) no 14º dia, mas não em indivíduos expostos a CYNp (Figura 12I). Além disso, as

diferenças significativas de PCO entre os grupos expostos a CYNex e CYNp foram observadas após 14 dias (Figura 12I).









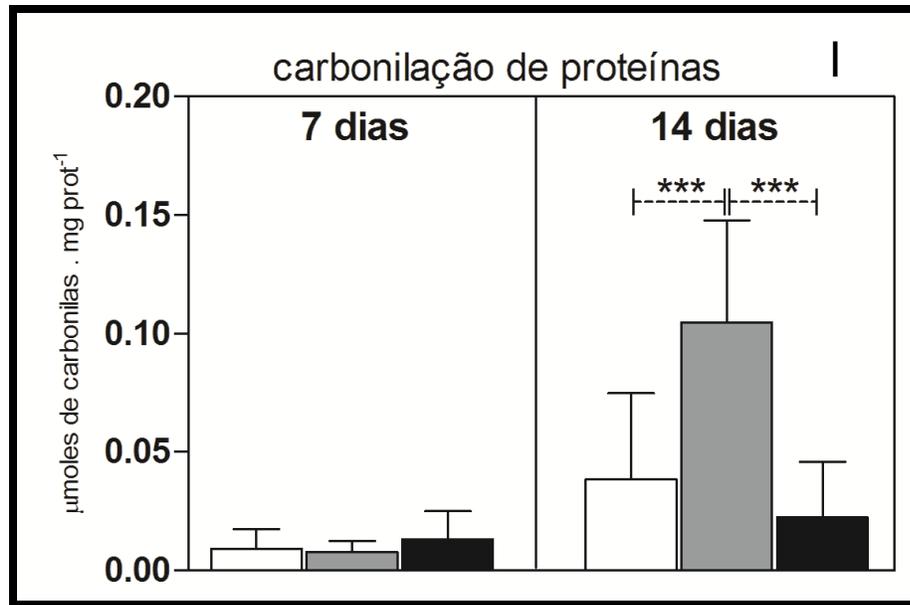


Figura 12 – Resultados dos biomarcadores bioquímicos no fígado de *H. malabaricus* expostos a CYNp e CYNex, após 7 e 14 dias. Atividades da CAT (A), SOD (B), G6PDH (C), GPx (D), GR (E), GST (F), conteúdo de GSH (G), peroxidação lipídica (H) e carbonilação de proteínas (I). Grupos: Controle (barra branca), CYNex (barra cinza) e CYNp (barra escura). ANOVA seguida pelo teste de Tukey, onde \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$  e \*\*\* =  $p < 0,001$ .

#### 4.3. Biomarcadores histopatológicos:

Os resultados da avaliação histopatológica estão apresentados na tabela 2 e figuras 13 e 14. A lesão mais comum no fígado foi a ocorrência de áreas de necrose (figuras 13 e 14). No 7º dia após a exposição, 100% e 75% dos fígados dos peixes apresentavam necrose após exposição à CYNex e CYNp, respectivamente. Mas estes percentuais reduziram para 34% (CYNex) e 67% (CYNp) após 14 dias de exposição. Nos animais do grupo-controle esse tipo de lesão estava presente em até 50% dos exemplares.

Os animais tratados com CYNex apresentaram quantidades consideráveis de centros de melanomacrófagos (CMM, 62,5%) e melanomacrófagos livres (ML, 50%) por fígado de peixe após 7 dias, mas estes níveis retornaram aos valores do grupo-controle no 14º dia. Em

indivíduos do grupo CYNp estes valores não foram tão evidentes no 7º dia (25% para CMM e 37,5% para FM) e diminuíram no 14º dia.

Tabela 2–Ocorrência de alterações hepáticas em indivíduos de *H. malabaricus* expostos à CYN.

	Controle		CYNex		CYNp	
	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
Necrose	4 (8)	3 (9)	8 (8)	3 (9)	6 (8)	6 (9)
Infiltração leucocitária	0 (8)	0 (9)	2 (8)	1 (9)	0 (8)	1 (9)
Vacuolização	0 (8)	1 (9)	0 (8)	2 (9)	1 (8)	1 (9)
Centros de melanomacrófagos	1 (8)	1 (9)	5 (8)	0 (9)	2 (8)	2 (9)
Melanomacrófagos livres	0 (8)	1 (9)	4 (8)	0 (9)	3 (8)	1 (9)
Neoplasias	0 (8)	0 (9)	0 (8)	0 (9)	1 (8)	0 (9)
Parasitas	0 (8)	0 (9)	0 (8)	0 (9)	0 (8)	0 (9)

Grupos: Controle, CYNex e CYNp. % de ocorrência do dano (número de animais-fígado lesionados / total de animais-fígado).

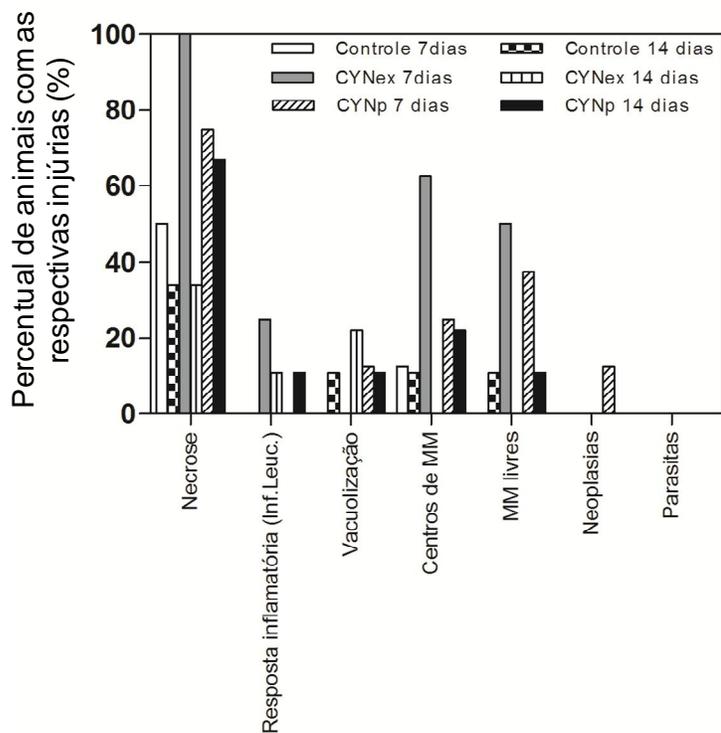


Figura 13 – Percentuais de alterações hepáticas no grupo controle e nos animais expostos à CYN.

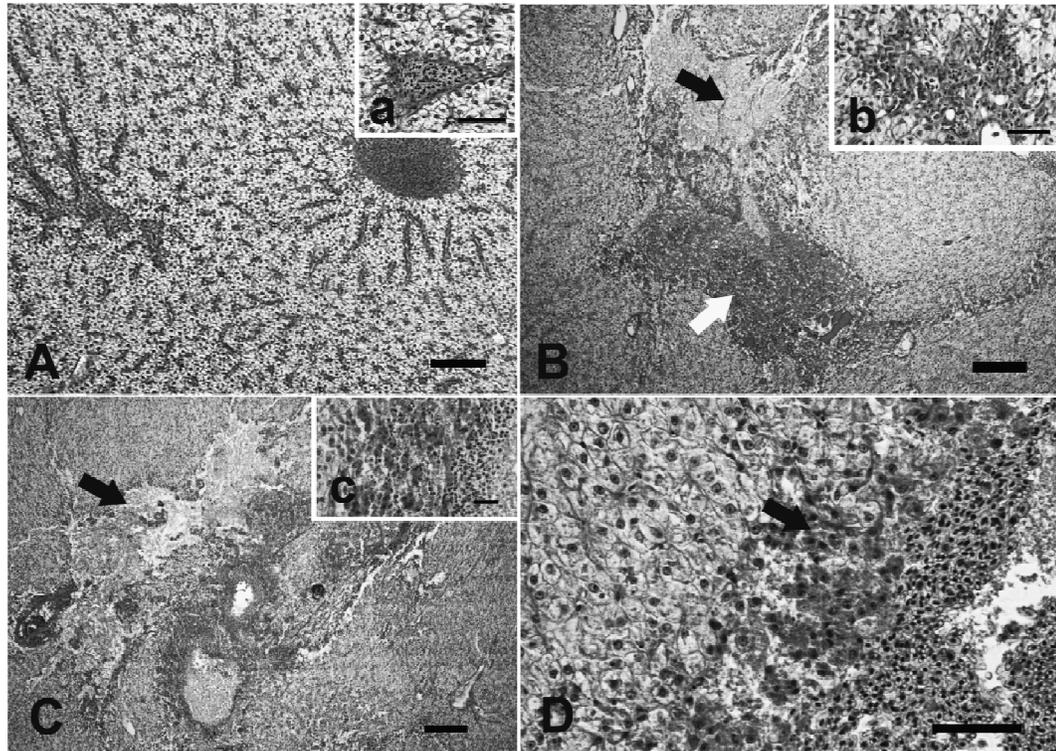


Figura 14– Fotomicrografias de cortes histológicos do fígado de *H. malabaricus* expostos a CYN. (A) grupo de controle. Escala (barra) = 100  $\mu$ m e 50  $\mu$ m (detalhe). (B) 7 dias após a exposição a CYNp. Observar a área de necrose (seta preta) e a área do pré-necrótica (seta branca). Escala (barra) = 200 $\mu$ m. (b) resposta inflamatória (infiltração leucocitária). Escala (barra) = 50  $\mu$ m. (C) 7 dias após a exposição a CYNex. Observar a extensa área de necrose (seta). Escala (barra) = 200 $\mu$ m. Em detalhe (c) é mostrado o tecido fibrosado. Escala (barra) = 100  $\mu$ m. (D) 7 dias após a exposição a CYNex. A seta indica a abundância de células pré-necróticas. Escala (barra) = 50  $\mu$ m.

Os valores atribuídos (“*score*”) para as alterações histopatológicas, de acordo com Bernet et al. (1999), demonstraram um aumento significativo do índice de lesão em indivíduos expostos a CYNex após 7 dias de exposição. No entanto, após 14 dias, o índice mostrou-se semelhante aos valores do grupo-controle (figura 15). Nenhuma diferença foi observada para os indivíduos expostos a CYNp nos dois tempos de exposição em relação aos seus relativos controles.

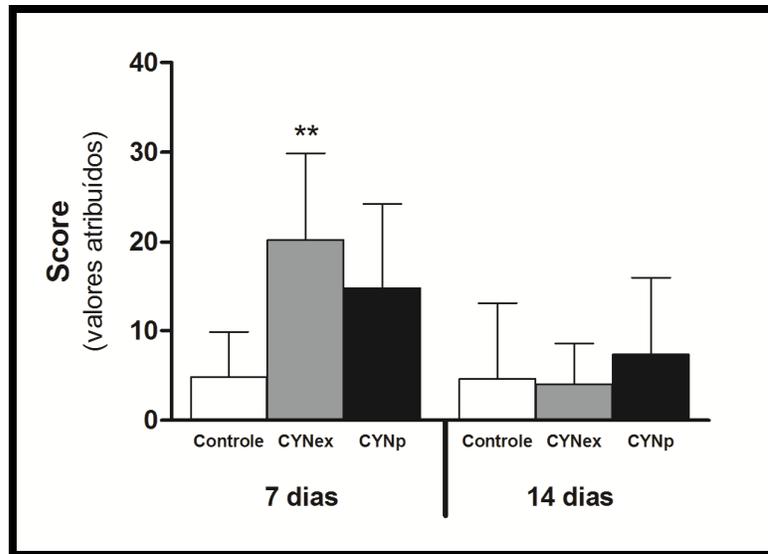


Figura 15 – *Score* de alterações (Bernet et al, 1999) no fígado de *H. malabaricus* após 7 e 14 dias de exposição a uma dose única de CYN. Os asteriscos indicam diferença significativa em comparação com o grupo-controle ( $p < 0,01$ ).

## 5. DISCUSSÃO:

A presença de outras moléculas que não a CYN propriamente dita, é uma premissa importante para avaliar o potencial tóxico e os riscos de exposição a essa cianotoxina. No presente caso, o extrato tóxico representa a situação mais frequente no ambiente, uma vez que o peixe entra em contato direto com a toxina e outros metabólitos que são liberados na água durante as florações de cianobactérias. Já o estudo com a toxina purificada avalia a ação da toxina sem a possibilidade de sinergia com outras moléculas.

Se comparado com as concentrações encontradas no cérebro e músculo (Capítulo I), a concentração de CYN no fígado dos peixes foi mais elevada (em ambos os grupos) ao longo dos 14 dias. A cilindrospermopsina esteve presente em concentrações muito semelhantes nos peixes expostos à CYN<sub>ex</sub> e CYN<sub>p</sub>, não se identificando qualquer influência significativa de outros compostos presentes no extrato sobre a concentração de toxina no fígado.

Apesar da sua natureza hidrofílica, possivelmente a CYN ainda permanece no fígado após 14 dias de exposição devido à dificuldade de eliminação dos hepatócitos. De acordo com Liebel et al. (2011), os hepatócitos de peixes têm os transportadores do sistema de resistência a multixenobióticos (MXR) afetados pela exposição à baixas concentrações de CYN, o que pode explicar a dificuldade do peixe em eliminar a toxina. Além disso, vários relatos têm mostrado que CYN é capaz de acumular nos tecidos de organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos (KINNEAR, 2010). Entretanto, não se sabe como ocorrem os processos de acúmulo e eliminação da CYN uma vez que poucos estudos têm sido realizados com esse intuito, portanto, trata-se de campo de estudo para futuras investigações e discussões.

Os conteúdos de GSH, assim como os níveis de atividades das enzimas GPx e GR não foram alterados. Estas enzimas são responsáveis, respectivamente, pela conversão de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, e pela manutenção do equilíbrio da relação GSH / GSSG,

principalmente sob condições de estresse oxidativo. Portanto, um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) resultantes da exposição a CYN (LIEBEL et al, 2011; GUTIÉRREZ-PRAENA et al, 2012a), associado a nenhum aumento das defesas antioxidantes, poderia sensibilizar as células dos organismos expostos, levando a efeitos indesejáveis, como por exemplo, a genotoxicidade (HUMPAGE et al., 2005). Portanto, os danos oxidativos a lipídios e proteínas provavelmente resultaram de mecanismos tóxicos que não envolvem alterações nos níveis de GSH ou atividades das enzimas do metabolismo da GSH (GPx e GR).

Os mecanismos de toxicidade da CYN em peixes são ainda pouco conhecidos (WILLIAMS e JAESCHKE, 2011), mas o estresse oxidativo mediado pelas espécies reativas de oxigênio pode desempenhar um papel crucial nesse aspecto (LIEBEL et al, 2011; GUTIÉRREZ-PRAENA et al, 2011a, b; 2012a). Estudos têm demonstrado que CYN é capaz de inibir a síntese e reduzir os níveis de GSH em células de mamíferos (RUNNEGAR et al, 1994, 1995; HUMPAGE et al, 2005; GUTIÉRREZ-PRAENA et al, 2012a), mas não em células dos peixes até o momento estudados (LIEBEL et al., 2011). Em peixes, sabe-se que as respostas de enzimas de fase II são menos pronunciados do que as respostas da fase I (VAN DER OOST et al, 2003). Neste caso, esta hipótese também poderia explicar porque nenhuma alteração nos níveis de GSH foi verificada após a exposição a CYN no presente estudo. Portanto, ou a CYN não afeta os níveis de GSH em peixes ou a recuperação da GSH não é prejudicada pela exposição à CYN (GUTIÉRREZ-PRAENA et al, 2011a).

A via principal de desintoxicação de xenobióticos é através da combinação destes compostos com GSH catalisada por GST (GEORGE, 1994). Conseqüentemente, a capacidade da CYN de diminuir a atividade da GST em *Hoplias malabaricus* no 7º dia após a exposição pode prejudicar o mecanismo de fase II do processo de desintoxicação (ARTEEL e SIES, 2001), e isso pode ter levado aos posteriores efeitos sobre a integridade das biomoléculas

(LPO e PCO) observados no 14º dia. Devido aos danos causados pela exposição à cilindrospermopsina, células responderam aumentando a atividade de GST no 14º dia. Liebel et al. (2011) descreveram que não houve alterações na atividade desta enzima em ensaios *in vitro*, enquanto que uma diminuição (observada no presente estudo) ou aumento (PUERTO et al., 2011a) já foram relatados para a atividade GST após exposição *in vivo* à CYN. Algumas hipóteses podem explicar essas diferenças: (i) o método utilizado, o qual não avalia a atividade de nenhuma isoforma específica da GST; (ii) as espécies de peixes utilizadas como modelo foram diferentes; (iii) doses e vias de exposição diferentes; ou ainda (iv) os diferentes níveis de atividade apresentado por diferentes espécies. De acordo com alguns autores (HUMPAGE et al, 2005; ŽEGURA et al, 2011; STRASER et al, 2012), a toxicidade de CYN é dependente do metabolismo do complexo citocromo-P450, mas este parece não envolver as reações de conjugação com GSH (NORRIS et al , 2002; PUERTO et al, 2011a).

Resultados conflitantes sobre a atividade da GST também já foram relatados para outros tipos de poluentes. No entanto, a maioria destes estudos não mostrou diferenças significativas na atividade da GST nos peixes da área impactada, quando comparados aos animais do grupo-controle (VAN DER OOST et al., 2003). No presente estudo, utilizamos o protocolo que usa o CDNB como substrato para GST e, portanto, mede a atividade total das GST (exceto as enzimas da classe-Q), por isso, constatamos a necessidade de estudos adicionais para elucidar quais isoformas são as mais sensíveis em resposta da exposição à CYN.

Enzimas CAT, SOD e GPx são enzimas extremamente importantes no processo de neutralização dos radicais de oxigênio em moléculas não-reativas. Resumidamente, a SOD catalisa a conversão de ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em  $H_2O_2$  e, em seguida a CAT ou GPx catalisa a conversão do  $H_2O_2$  em água e oxigênio molecular. O peróxido de hidrogênio é uma importante ERO, pois pode reagir com proteínas e membranas celulares tornando se altamente

tóxica no ambiente intracelular, o que pode gerar sérias conseqüências, como por exemplo, LPO e PCO. *H. malabaricus* expostos a CYNp e CYNex apresentaram em ambos os tratamentos um aumento na atividade da SOD, mas não nas atividades da CAT e GPx. Isso pode indicar que as taxas de atividade destas últimas enzimas podem ser suficientes para compensar o aumento da produção de peróxido de hidrogênio pela SOD, ou ainda, as células podem estar acumulando estas EROs. Žegura et al (2011) relataram resultados semelhantes em relação SOD e a CAT em linfócitos periféricos humanos expostos a CYN.

Estudos mais recentes mostram que o dano oxidativo está envolvido com efeitos tóxicos da CYN sobre peixes (LIEBEL et al 2011, PUERTO et al, 2011a; GUTIÉRREZ-PRAENA et al, 2011a, b), embora o dano oxidativo não tenha sido considerado importante na toxicidade da CYN para outros modelos (FROSCIO, 2002; HUMPAGE et al, 2005). O presente estudo reforça que o estresse oxidativo pode ser parte importante da toxicidade da CYN em peixes, uma vez que o aumento da peroxidação lipídica e da carbonilação de proteínas foi observado nos exemplares expostos. Estes danos podem causar a perda da fluidez da membrana e a sua possível ruptura (LPO), além da inativação de muitas proteínas extremamente importantes (PCO) (GUTTERIDGE, 1995). De acordo com a Van der Oost et al. (2003), lesões nestas biomoléculas podem ser responsáveis por injúrias celulares severas, e isso pode levar ao desenvolvimento e progressão de doenças. Além disso, os aumentos de LPO e PCO ocorreram apenas no 14º dia de exposição, indicando e confirmando os efeitos tardios da CYN. Para PCO, as interações químicas com moléculas do extrato parecem ser importantes, uma vez que a alteração na PCO foi observada em indivíduos expostos a CYNex, mas não a CYNp.

A histopatologia é uma ferramenta importante para avaliar os efeitos de contaminantes em peixes (RABITTO et al, 2005; OLIVEIRA RIBEIRO et al, 2006; MELA et al, 2007). Os aumentos de CMM e ML em *H. malabaricus* foram indicativos de resposta imune intensa

devido a lesão tecidual (RABITTO et al, 2005; MELA, et al 2007; ANDRADE BRITO et al, 2012), particularmente quando os peixes foram expostos a CYNex. Em geral, os macrófagos são associados às respostas para lesões necróticas, refletindo o fracasso dos mecanismos de proteção dos hepatócitos frente aos efeitos nocivos causados pela CYN levando à morte celular.

A integração de biomarcadores histológicos hepáticos é um método sugerido por Bernet et al. (1999), que converte as observações visuais em pontuações comparáveis (“*score*”) de acordo com o significado patológico de cada alteração. Estas pontuações revelaram que os peixes expostos à CYNex apresentaram lesões graves que comprometem a integridade funcional do fígado no 7º dia pós-exposição. No entanto, após 14 dias, essa pontuação voltou para níveis semelhantes ao do grupo-controle, sugerindo uma recuperação do tecido ou o reforço das defesas celulares. Seawright et al. (1999) mostraram que, em camundongos, o extrato contendo CYN pode ser 10 vezes mais tóxico do que a CYN pura, quando administrado oralmente. Nos peixes, no entanto, a CYN pura pode levar a alterações hepáticas diversas, tais como acúmulo de glicogênio, necrose, aumento do diâmetro nuclear hepatócitos e esteatose (GUTIÉRREZ-PRAENA et al. 2012b).

A utilização de múltiplos biomarcadores foi considerada como uma ferramenta adequada para a avaliação da saúde dos indivíduos de *H. malabaricus* quando expostos à CYN. Como visto nos resultados apresentados, as concentrações de toxinas encontradas no tecido hepático foram capazes de causar um desequilíbrio no ambiente redox provocando danos graves, tais como a peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas.

## 6. CONCLUSÕES

- Assim como no músculo e cérebro, houve detecção da toxina no fígado dos animais mesmo após 14 dias da exposição única.
- A concentração de CYN no fígado foi cerca de 10 vezes maior que no músculo e cérebro, o que pode ser explicado pela via de exposição (intraperitoneal).
- A detecção de danos oxidativos (LPO e PCO) sugere que os mecanismos de defesa avaliados neste estudo não foram suficientemente eficazes na proteção contra a toxicidade da CYN, tanto CYNp como CYNex.
- Parece haver uma relação entre a toxicidade tardia da CYN e os danos oxidativos, fato que foi corroborado pelo elevado número de lesões (necrose, MMC e FM) encontradas no fígado dos animais expostos.

## CAPÍTULO III

### EFEITOS *IN VITRO* DA CILINDROSPERMOPSINA NO AMBIENTE REDOX DE HEPATÓCITOS DE *Hoplias malabaricus*.

#### RESUMO

Cilindrospermopsina (CYN) é um cianotoxina que é citotóxica para uma grande variedade de células, principalmente para os hepatócitos. Neste estudo, os efeitos da CYN purificada (CYNp) e do extrato aquoso de células de *C. raciborskii* produtora de CYN (CYNex) foram investigados através de biomarcadores do estresse oxidativo e morte celular em cultura primária de hepatócitos de *Hoplias malabaricus*. Após o isolamento e fixação das células, estas foram expostas durante 72 h a diferentes concentrações de CYN purificada e extrato (0, 0,1; 1,0; 10; 100  $\mu\text{g l}^{-1}$ ). Em seguida, foram avaliadas a viabilidade celular, concentração de peróxido de hidrogênio (EROs), atividades da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR), glutatona S-transferase (GST), conteúdos de GSH, a peroxidação lipídica (LPO), carbonilação de proteínas (PCO) e danos ao DNA por ensaio cometa (EC). A diminuição significativa da viabilidade celular foi observada em todos os grupos expostos. A redução na atividade da SOD ocorreu apenas em células expostas à maior concentração do extrato. A redução na atividade da GR ocorreu em todas as concentrações testadas, exceto na menor concentração de CYNp. O conteúdo de GSH aumentou somente na maior concentração de CYNp ao passo que a atividade da GST aumentou somente nas células expostas a maior concentração de CYNex. A LPO e os níveis de EROs aumentaram, respectivamente, nas células expostas à maior concentração do extrato e CYN purificada. Houve redução na PCO na maior concentração do extrato indicando um possível efeito protetor. Nenhuma alteração nas atividades de CAT, G6PDH, GPx, além dos danos ao DNA, foi observada. Estes dados sugerem que, embora a CYN em si possa causar alteração no equilíbrio óxido redutor nos hepatócitos e morte celular, outros compostos contidos nos extratos certamente contribuem para os danos lipídicos. Sendo assim, os riscos potenciais da exposição ao extrato pode ser maior do que a toxina purificada. Além disso, este modelo celular se mostrou uma eficiente ferramenta para a investigação dos efeitos tóxicos da CYN, fornecendo dados importantes sobre os seus efeitos em hepatócitos de peixes neotropicais como a espécie *H. malabaricus*.

*Palavras-chave:* Cilindrospermopsina, estresse oxidativo, *Hoplias malabaricus*, cultivo primário, hepatócitos.

## 1. INTRODUÇÃO:

O estabelecimento de linhagens celulares de animais em monocamadas para estudos de citotoxicidade têm sido empregado desde a segunda metade do século XX, sendo estes testes *in vitro* vantajosos em relação aos testes *in vivo*, principalmente no que diz respeito ao custo, rapidez e sensibilidade (HENDRIKESSEN, 1994).

O conceito do três “Rs” (*reduction, refinement e replacement* – “*The principle of human experimental technique*” – RUSSEL e BURCH, 1959) está relacionado com o uso de animais em laboratórios para pesquisas e ensaios, tendo este conceito o objetivo de reduzir o número de animais, refinar os métodos e técnicas de estudo e por fim substituir os métodos existentes por metodologias alternativas, como por exemplo, os teste *in vitro*. Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais em pesquisas científicas, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de xenobióticos. Várias são as vantagens do uso de cultivo primário de células em ensaios toxicológicos, dentre elas está o fato dessas células conservarem boa parte das características bioquímicas dos tecidos intactos (SEGNER, 1998), permitindo extrapolar os resultados de toxicidade dos poluentes para o organismo como um todo.

Ensaio *in vitro* empregando hepatócitos têm sido utilizados em diversos estudos de hepatotoxicidade, genotoxicidade, processos de biotransformação, entre outros. O uso de cultivo primário de hepatócitos de *H. malabaricus* para avaliar danos oxidativos causados por estressores ambientais (Metil mercúrio - [MeHg] e Diclorodifeniltricloroetano - [DDT]) foi desenvolvido e padronizado por Filipak Neto et al. (2007). Além disso, hepatócitos de outras espécies de peixes tropicais também já foram utilizados para verificar estes efeitos quando expostos à MeHg, PCBs (bifenilas policloradas), pesticidas organoclorados (BUSSOLARO et al., 2010) e CYN (LIEBEL et al. 2011). Pelo nosso conhecimento, o presente trabalho é o primeiro que aborda os danos oxidativos causados pela exposição à CYN (extrato aquoso e

toxina purificada) em cultura primária de hepatócitos de *H. malabaricus*. (PESONEN e ANDERSSON, 1997).

Estudos têm relatado que os resultados dos testes de citotoxicidade *in vitro* de alguns xenobióticos são positivamente correlacionados com os resultados de toxicidade aguda *in vivo*, e, por conseguinte, os ensaios de citotoxicidade *in vitro* podem servir como uma alternativa para o teste de toxicidade aguda de peixes (FENT, 2001; FELIPAK NETO et al., 2007).

A toxicidade mediada pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) pode ser definida como os danos oxidativos celulares causados por espécies reativas de oxigênio ou radicais livres (oxiradicais) e que podem ser produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Entre as EROs mais importantes podemos destacar os radicais ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e os radicais hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), sendo os últimos, oxidantes extremamente potentes capazes de reagir com biomoléculas importantes (DNA, lipídios e proteínas), com diversos efeitos deletérios para as células, podendo levar a morte das mesmas por necrose ou apoptose (WINSTON e DI GIULIO, 1991; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). O radical  $HO^{\cdot}$  é formado no organismo principalmente por mecanismos de reação de  $H_2O_2$  com metais de transição (principalmente via reação de Fenton) e por exposição da água à radiação ionizante (HALLIWELL et al., 1992).

Os poluentes presentes nos ambientes aquáticos também podem exercer seus efeitos no ambiente redox celular causando alguns danos oxidativos que incluem os danos ao sistema de defesa antioxidante (AD) e os danos a macromoléculas (ALMROTH, 2008) de diferentes classes de organismos. Cada vez mais, tanto a atividade das moléculas do sistema AD quanto os danos oxidativos, têm sido utilizados como biomarcadores em estudos de monitoramento ambiental, uma vez que as mudanças nas atividades destes biomarcadores (estímulo ou

inibição) sugerem uma resposta adaptativa, ou até mesmo danosa, à exposição aos poluentes ou seus metabólitos (BALLESTEROS et al., 2009).

Os modelos de estudo *in vitro*, principalmente os que utilizam linhagens de hepatócitos de mamíferos, são muito aplicados em testes de toxicidade da CYN, inclusive na avaliação de danos oxidativos (RUNNEGAR et al., 1994, 1995, 2002; FROSCIO et al., 2003, 2009). No entanto, poucos estudam seus efeitos em células (linhagens ou cultivos primários) de peixes, sobretudo em peixes da fauna brasileira (LIEBEL et al., 2011).

Portanto, devido à escassez de informações a respeito da toxicologia da CYN, principalmente em peixes e culturas primárias, o objetivo do presente capítulo foi avaliar os efeitos das CYN (em diferentes concentrações de extrato aquoso e toxina purificada) na atividade de alguns biomarcadores do estresse oxidativo em cultura primária de hepatócitos de *H. malabaricus*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

- Verificar os efeitos hepatotóxicos do extrato aquoso contendo CYN e da CYN purificada em cultura primária de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* utilizando diferentes biomarcadores do estresse oxidativo.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade celular;
- Avaliar o desequilíbrio oxidativo através dos seguintes biomarcadores:
  - a. Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)
  - b. Atividade da Catalase (CAT)
  - c. Atividade da Superóxido dismutase (SOD)
  - d. Atividade da G6PDH (Glicose 6-fosfato desidrogenase)
  - e. Atividade da Glutaciona peroxidase (GPx)
  - f. Atividade da Glutaciona redutase (GR)
  - g. Atividade da Glutaciona S-transferase (GST)
  - h. Conteúdo de Glutaciona reduzida (GSH)
- Avaliar dano oxidativo através de Peroxidação de lipídios (LPO) e Carbonilação de proteínas (PCO).
- Avaliar danos ao DNA através ensaio cometa.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS:

O cultivo da cepa CYP011K da espécie *C. raciborskii*, a purificação, extração e análise da CYN estão reportadas respectivamente nos itens 3.1 e 3.2 do Capítulo I.

#### 3.1. Obtenção, manutenção e cuidado com os animais:

Exemplares de *Hoplias malabaricus* (300 - 500 g) foram adquiridos na piscicultura Panamá (Paulo Lopes – SC - Brasil) (<http://www.pisciculturapanama.com.br>) e transportados para o Laboratório de Bioensaios do Departamento de Biologia Celular no Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os peixes foram mantidos em tanques 500 litros de água sob aeração constante, contendo tubos de PVC no fundo para abrigo dos peixes. Por serem animais de hábito carnívoro, a cada três dias, eles recebiam alevinos de carpa (*Cyprinus* sp.), lambaris (*Astyanax* sp.) ou pedaços de tecido muscular de animais previamente sacrificados, como alimento.



Figura 16 – Tanques-rede (A) da Piscicultura Panamá (Paulo Lopes – SC – Brasil). Foto da vista aérea do local (B): Google Earth (2011 Google Inc.).

### **3.2. Isolamento e Cultivo dos hepatócitos de *H. malabaricus*:**

Para o isolamento e cultivo dos hepatócitos foi seguido o protocolo estabelecido por Filipak Neto et al. (2007) com modificações de acordo com Liebel et al. (2011). É válido destacar que todo material de dissecação utilizado neste processo de remoção do fígado e obtenção dos hepatócitos foi previamente esterilizado em autoclave, luz ultravioleta e assepsia com álcool etílico a 70%.

Foram utilizados de dois a três exemplares de peixe para obtenção das células para cada experimento. Os animais foram previamente anestesiados com Benzocaína (200 ppm em água) e sacrificados por secção espinal logo abaixo do crânio. Após a remoção das escamas, os animais sofreram assepsia com álcool etílico a 70% seguido de Clorexidina alcoólica a 2%. É válido destacar que os primeiros peixes que foram sacrificados desta forma apresentaram muitos coágulos nos vasos sanguíneos do fígado o que prejudicava a perfusão deste órgão. Desta forma, optou-se por, após o procedimento de anestesia, aplicar heparina (aproximadamente 500  $\mu\text{L}$  a 5.000  $\text{UL}^{-1}$ ) na veia caudal do animal para evitar a coagulação sanguínea e facilitar o processo de perfusão para remoção do sangue presente no órgão. Logo após este procedimento, seguiu-se com assepsia e a secção espinal conforme mencionado, e então os animais foram levados para o fluxo laminar.

Os dois lobos do fígado desses animais foram cuidadosamente removidos com auxílio de pinça, tesoura e bisturi, e, posteriormente, colocados em tubos do tipo Falcon (por aproximadamente 10-15 minutos) contendo uma solução de tampão fosfato salino (PBS pH 7.6) suplementado com antibióticos e fungicida (anfotericina-B (25  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), estreptomicina (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e penicilina (100 U  $\text{mL}^{-1}$ ) afim de evitar possíveis contaminações.

Após esse período, os lobos foram colocados em placas de petri, e em seguida foi realizado o procedimento de perfusão (com auxílio de seringa e agulha) com uma solução de

PBS (pH 7.6) suplementado com EDTA (2,0 mM) e glicose (1,0 g L<sup>-1</sup>). Após a remoção completa do sangue, os lobos foram cuidadosamente cortados (com bisturi) em pedaços pequenos (aproximadamente 0.2 - 0.3 cm) e então, colocados em tubos do tipo Falcon contendo uma solução de PBS (pH 7.6) suplementado com glicose (1,0 g L<sup>-1</sup>) e dispase (1 U L<sup>-1</sup>), utilizada para auxiliar e acelerar o processo de dissociação dos hepatócitos. Esse material foi colocado em estufa (30° C por 1 hora). Em seguida, as células foram peneiradas em telas de metal com aproximadamente 1 mm de porosidade afim de otimizar o processo de dissociação. As células isoladas obtidas foram centrifugadas (2 a 3 vezes à 100-120 g durante 3-4 minutos) para remover os resíduos celulares que por ventura tenham ficado na solução. As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado (D-glucose 2,0 g L<sup>-1</sup>, pH 7,6; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM; insulina mista (0,1 U mL<sup>-1</sup>); gentamicina (40 mg L<sup>-1</sup>); estreptomicina (1 µg mL<sup>-1</sup>); penicilina (10 U mL<sup>-1</sup>); anfotericina-B (2,5 µg L<sup>-1</sup>); soro fetal bovino (5% v/v)).

O número e a viabilidade celular foram determinados por contagem em câmara de Neubauer em microscópio de campo claro através do teste de exclusão do corante azul de tripan (*Tripan blue*). A viabilidade prévia das células obtidas para os experimentos de exposição a CYN esteve sempre acima de 95%.

Em seguida, as células foram semeadas em placas de cultivo celular (TTP® ou Corning®) de 24 (1,0 x 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup>) ou 96 poços (3 x 10<sup>5</sup> células mL<sup>-1</sup>), e mantidas por 72 horas (24° C e pCO<sub>2</sub> 1,7%) para adesão e reorganização celular. Após esse período, as células foram utilizadas para realização dos ensaios.

### 3.3. Desenho experimental para realização dos ensaios:

A partir do cultivo primário dos hepatócitos estabelecido no item 3.4, foram estabelecidos os grupos experimentais para avaliar a citotoxicidade da CYN em hepatócitos de *H. malabaricus* (Figura 17 e 18):

1. Grupo “Controle”: grupo exposto ao veículo da toxina (água ultrapura);
2. Grupo “0,1”: grupo exposto à 0,1 µg/L de CYN purificada;
3. Grupo “1”: grupo exposto à 1 µg/L de CYN purificada;
4. Grupo “10”: grupo exposto à 10 µg/L de CYN purificada;
5. Grupo “100”: grupo exposto à 100 µg/L de CYN purificada;
6. Grupo “0,1Ex”: grupo exposto à 0,1 µg/L de extrato aquoso contendo CYN;
7. Grupo “1Ex”: grupo exposto à 1 µg/L de extrato aquoso contendo CYN;
8. Grupo “10Ex”: grupo exposto à 10 µg/L de extrato aquoso contendo CYN;

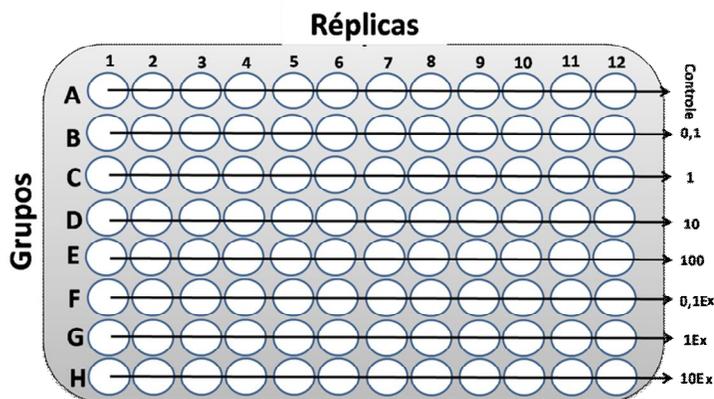


Figura 17 - Esquema de divisão dos grupos nos ensaios realizados em microplacas de 96 poços da marca Corning®. Biomarcadores avaliados com este modelo: CAT, SOD, G6PDH, GP, GR, GST, Viabilidade celular, EROs e ensaio cometa.

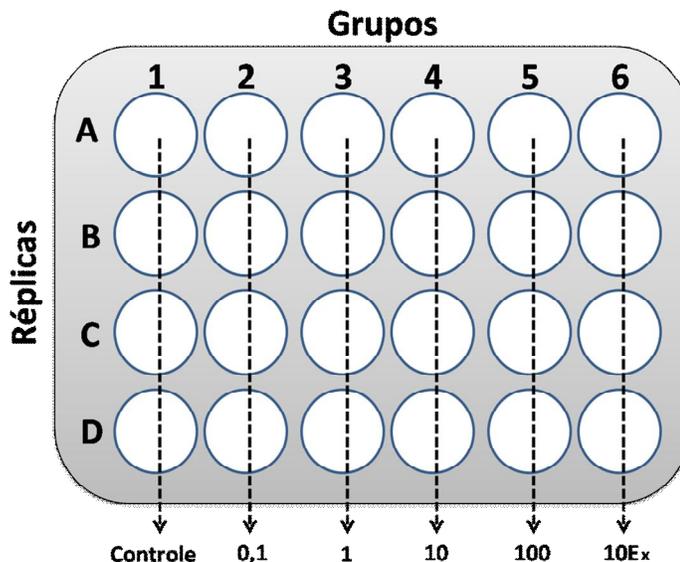


Figura 18 - Esquema de divisão dos grupos nos ensaios realizados em microplacas de 24 poços da marca Corning®. Biomarcadores avaliados com este modelo: GSH, PCO e LPO.

As células foram isoladas e cultivadas segundo o método descrito no item 3.4. O tempo de adesão e reorganização celular foi de 72 horas. Após esse período, 75% do volume de meio de cultura de cada poço foram removidos e substituídos por meio contendo as concentrações citadas da toxina, e então, expostos por 72 horas. Após esse período de exposição, cada poço foi lavado duas vezes com PBS (pH 7,6) para remoção completa do meio de cultura. Em seguida, as placas foram congeladas (-76° C) promovendo o rompimento celular para as análises bioquímicas subseqüentes: atividades da catalase, superóxido dismutase, glicose 6-fosfato desidrogenase, glutathiona peroxidase, glutathiona redutase, e glutathiona S-transferase, e para os níveis de glutathiona reduzida, carbonilação de proteínas e peroxidação de lipídios.

Para a realização dos ensaios de viabilidade celular e produção de espécies reativas de oxigênio, as células foram lavadas com PBS e utilizadas imediatamente. Para a realização do ensaio cometa, aos poços lavados foi adicionada uma solução de PBS suplementado com

tripsina por aproximadamente 20 minutos (tripsina 0,05%, EDTA dissódico 0,02%, 24 °C). As células foram removidas junto com esta solução para realização do ensaio.

### **3.4. Análises Bioquímicas:**

O procedimento de cálculo das atividades dos biomarcadores avaliados está no anexo I desta tese.

#### **3.4.1. Avaliação da viabilidade celular:**

A avaliação da viabilidade celular foi verificada através da incorporação do corante vital vermelho neutro (*neutral red*) pelos hepatócitos seguindo-se o método de Borenfreund et al. (1988). Através desta metodologia foi possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas através da medida de intensidade de cor da cultura celular.

Após 72 horas de exposição e lavagem com PBS, acrescentou-se 0,2 mL de meio novo contendo 50 µg mL<sup>-1</sup> de vermelho neutro. A incorporação deste corante pelas células vivas foi verificada após 3 h de incubação (24 °C e pCO<sub>2</sub> de 1,7%,). Após esse período, o meio de cultura foi removido e as células lavadas (três vezes) com uma solução fixadora de CaCl<sub>2</sub> (cloreto de cálcio) e formaldeído (100 gL<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> em formaldeído 15% em água). Após o descarte desta solução, cada poço recebeu 0,3 mL da solução de ácido acético em etanol (ácido acético à 1% em etanol à 50%). A placa foi agitada por 15 minutos, e aguardou-se 5 minutos para precipitação dos restos celulares e, então, 0,2 mL do sobrenadante foi transferido para outra microplaca. A leitura das densidades ópticas foi realizada em espectrofotômetro (TECAN) à 540 nm. Com os valores obtidos calculou-se a média da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de células (100%).

### **3.4.2. Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs):**

O princípio deste método consiste na detecção de  $H_2O_2$  através do marcador fluorescente diclorofluoresceína diacetato ( $H_2DCFDA$ ). Explicando brevemente, a  $H_2DCFDA$  difunde-se passivamente nas células, e é desacetilada ( $DCFH_2$ ) e subsequentemente oxidada originando 2-7-diclorofluoresceína ( $DCF$ ) fluorescente (BENOV et al., 1998).

Após a exposição à CYN e lavagem com PBS, o meio de cultura foi removido e as células incubadas (15 min. / 24 °C) com 200  $\mu$ L de meio de cultura contendo  $H_2DCFDA$  (diclorofluoresceína acetato - 10 mM em DMSO 0,1%) no escuro. Em seguida as células foram lavadas com PBS e posteriormente congeladas a -76 °C (para o rompimento celular). Após o descongelamento, 200  $\mu$ L do lisado celular foram transferidos para uma microplaca preta opaca para a medição de fluorescência usando o comprimento de onda de excitação de 488 nm e o comprimento de onda de emissão de 530 nm (BENOV et al., 1998). Todo procedimento foi realizado em gelo ao abrigo de luz.

### **3.4.3. Avaliação da atividade da Catalase (CAT):**

O lisado celular foi suspenso em 100  $\mu$ L de PBS gelado, transferidos para tubos de 1,5 mL e centrifugados (9.000 g / 20 min / 4 °C). Foram adicionados 640  $\mu$ L de meio de reação ( $H_2O_2$  20 mM, Tris-base 50 mM, EDTA dissódico 0,25 mM, pH 8.0 a 25 °C) à 60  $\mu$ L do sobrenadante da amostra. A leitura foi feita como descrito no item 3.5.1 do capítulo II desta tese.

#### **3.4.4. Avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD):**

O lisado celular foi descongelado, ressuspensão em PBS e colocado em microtubos de 1,5 mL e, então, centrifugadas (12.000 g / 20 min / 4 °C). O procedimento de leitura foi o mesmo ao descrito no item 3.5.2 do capítulo II desta tese.

#### **3.4.5. Avaliação da atividade da Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH):**

As amostras em placas de 96 poços foram descongeladas em gelo, e a cada poço foram adicionados 150 µL de PBS para ressuspensão do conteúdo intracelular. Em seguida, as placas foram centrifugadas (2.800 g / 10 min / 4 °C) e, por fim, um volume de 50 µL do sobrenadante (PBS para o branco) e 150 µL de meio de reação (com as mesmas especificações de concentrações de reagente e procedimentos de leitura do item 3.5.3 do capítulo II desta tese) foram adicionados a uma microplaca. A absorbância foi monitorada à 340 nm durante 3 min. em intervalos de 10 s. O coeficiente de extinção molar para o NADPH de 6,22 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> foi utilizado para o cálculo da atividade da G6PDH.

#### **3.4.6. Avaliação da atividade da Glutathiona peroxidase (GPx):**

As amostras foram descongeladas em gelo, ressuspensas em 100 µL de PBS e centrifugadas para obtenção da fração S9 (fração sobrenadante resultante de centrifugação a 9.000 x g). Para o ensaio foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item 3.5.4 do capítulo II desta tese.

#### **3.4.7. Avaliação da atividade da Glutathione redutase (GR):**

Para este ensaio, 50  $\mu\text{L}$  de amostra (PBS para o branco) obtidas da fração S9, e 100  $\mu\text{L}$  de meio de reação foram adicionados a uma nova microplaca de acordo com a metodologia descrita no item 3.5.5 do capítulo II desta tese.

#### **3.4.8. Avaliação da atividade total das isoformas GST:**

As células cultivadas nas microplacas de 96 poços foram lavadas com PBS e congeladas a  $-76\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após o descongelamento, o lisado celular foi suspenso em 150  $\mu\text{L}$  de PBS e as microplacas foram centrifugadas (2.800 g / 10 min /  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Em seguida, 30  $\mu\text{L}$  do sobrenadante (PBS para o branco) e 170  $\mu\text{L}$  de meio de reação foram colocados em novas microplacas, de acordo com o método descrito no item 3.5.2 do capítulo I desta tese.

#### **3.4.9. Avaliação dos conteúdos de GSH:**

O lisado celular foi suspenso em 100  $\mu\text{L}$  de PBS, transferidos para tubos de 1,5 mL e centrifugados (10.000 g / 10 min /  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Para as leituras seguiu-se o mesmo procedimento descrito no item 3.5.3 do capítulo I desta tese.

#### **3.4.10. Avaliação da LPO:**

O lisado celular foi resuspenso em 250  $\mu\text{L}$  de PBS gelado e transferido para tubos de 1,5 mL e então centrifugado (10.000 g / 5 min /  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Um volume de 200  $\mu\text{L}$  de sobrenadante (PBS para o branco) foi transferido para outro tubo e misturado com 500  $\mu\text{L}$  de solução de reação, sendo os procedimentos seguintes realizados de acordo com o método já descrito no item 3.5.4 do capítulo I desta tese.

#### **3.4.11. Avaliação da carbonilação de proteínas (PCO):**

O lisado celular foi ressuspensão em 300 µL de PBS, transferido para um tubo de 1,5 mL e centrifugado (12.000 g / 20 min, / 4 °C). Um volume de 200 µL de sobrenadante foi transferido para um tubo de 2,0 mL e misturado em vortex com 500 µL de solução DNPH. O procedimento de análise foi semelhante ao apresentado no item 3.5.9 do capítulo II desta tese.

#### **3.4.12. Ensaio cometa:**

Este ensaio permite verificar a presença de quebras simples, sítios lábeis alcalinos e *crosslinks* resultantes da ação de compostos genotóxicos que podem alterar a estrutura do DNA das células. Desta forma, após aplicação de corantes específicos e campo elétrico, se podem visualizar em microscópio de fluorescência a migração do DNA, que se assemelha a um cometa (SINGH et al., 1988).

Para o Ensaio Cometa foi utilizado o protocolo de Singh et al. (1988), com algumas modificações. Células dissociadas foram ressuspensas em agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% e estendidas sobre lâminas de vidro cobertas previamente com agarose de ponto de fusão normal a 1,5%. Após a solidificação da agarose as lâminas foram colocadas em solução de lise (NaCl 220 mM, EDTA 9 mM, Tris-base 0,9 mM, Triton X-100 1%, DMSO 10%, sarcosinato de sódio 0,9%, pH10) por 24h a 4°C. Em seguida, as lâminas foram reservadas em tampão de eletroforese (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, DMSO 2%, pH>13) por 25 min, e então submetidas a uma corrida eletroforética (25 V e 300 mA) por 25 min. Em seguida, as lâminas foram neutralizadas em solução de Tris-HCl 400 mM (pH 7,5) por 15 min e preservadas por etanol PA por 10 min. Por fim, o DNA foi fluorescentemente marcado com 2 µg mL<sup>-1</sup> de brometo de etídio. Um escore para cada lâmina foi calculado através de uma média ponderada

da classe de dano pela porcentagem de incidência do mesmo (Escore = (classe do dano x % de incidência)). Identificou-se 4 classes de danos (classes 0, 1, 2, 3 e 4) de acordo com o grau de fragmentação do DNA.

#### **3.4.13. Quantificação de proteínas totais:**

A quantificação de proteínas totais foi realizada conforme descrito no item 3.5.5 do Capítulo I.

#### **3.5. Análises estatísticas dos dados:**

Para cada biomarcador analisado, foram realizados três experimentos independentes. Em cada experimento foi empregado um *pool* de células provenientes do fígado de 3 peixes. Para a avaliação dos dados do ensaio cometa empregou-se o teste de Kruskal-Wallis. Já para a avaliação das diferenças encontradas nos ensaios com biomarcadores foi utilizado a Análise de Variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey-Kramer.

## 4. RESULTADOS:

O dados brutos em relação às análises estão no anexo 2 desta tese.

### 4.1. Viabilidade celular:

A viabilidade celular diminuiu significativamente em todos os grupos testados. Os grupos 1E e 10E tiveram os menores percentuais de viabilidade em relação ao grupo controle (uma redução da viabilidade celular de 22,5% e 20,8%, respectivamente) (Figura 19).

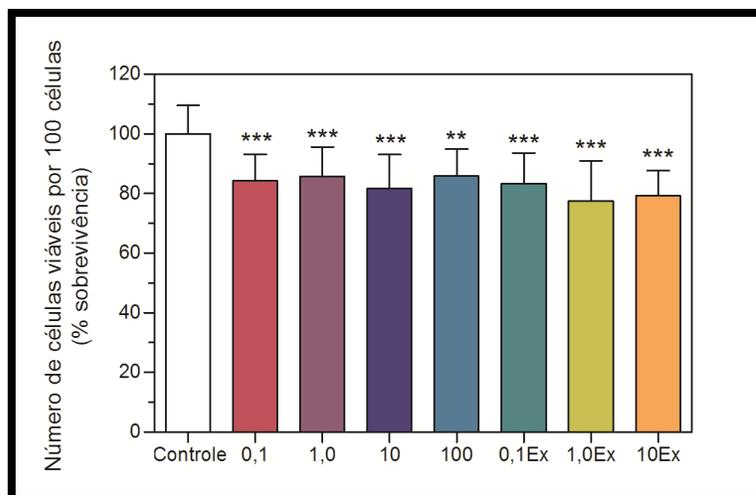


Figura 19 - Viabilidade celular estimada através de ensaio com vermelho neutro (*neutral red*). Média  $\pm$  desvio padrão. Viabilidade em número de células viáveis a cada 100 células. Grupos expostos à toxina purificada (0,1; 1,0; 10, e 100) e ao extrato aquoso contendo CYN (0,1E; 1,0E e 10E). Asteriscos, \*\* e \*\*\*, referem-se a  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente (em comparação com o grupo controle). Total de réplicas = 18 (3 experimentos independentes).

### 4.2. Atividades enzimáticas das CAT, SOD, G6PDH, GPx, GR e GST:

A atividade enzimática da CAT não sofreu alteração significativa em nenhum dos grupos testados (Figura 20). No entanto, mesmo sem essa diferença e apesar do alto desvio-padrão, verificamos que o grupo 100 teve um valor médio mais alto na atividade desta enzima (aumento de 23,7% em relação ao grupo controle).

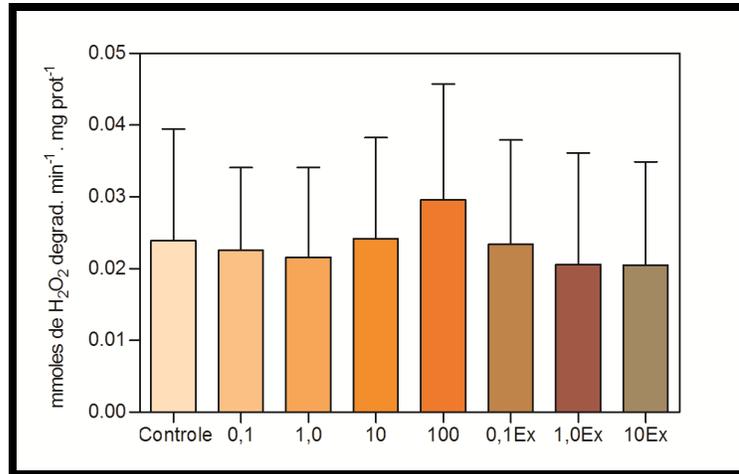


Figura 20 - Atividade específica da CAT. Média  $\pm$  desvio padrão. Atividade em milimoles de peróxido de hidrogênio degradado por minuto por miligrama de proteínas totais. Total de réplicas por grupo = 33-36 (3 experimentos independentes). Grupos expostos à toxina purificada (0,1; 1,0; 10, e 100) e ao extrato aquoso contendo CYN (0,1E; 1,0E e 10E).

Para a SOD, somente o grupo 10E teve uma redução significativa em sua atividade (26,6%,  $p < 0,05$ ) (Figura 21).

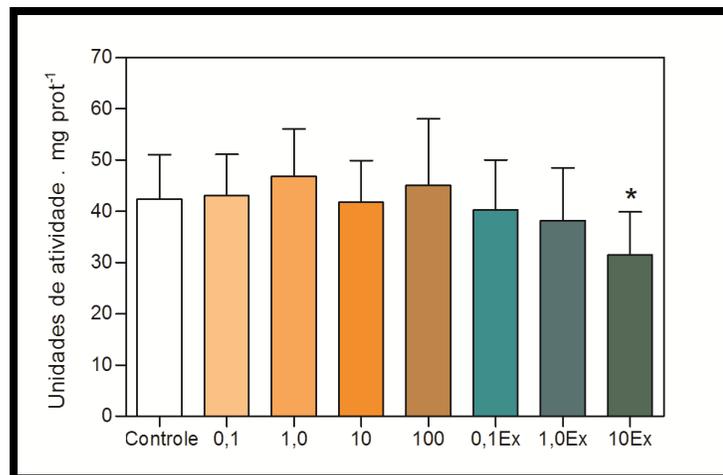


Figura 21 - Atividade específica das SOD. Média  $\pm$  desvio padrão. Atividade em micromoles do tioéter GSH-CDNB formado por minuto por miligrama de proteínas totais. \* =  $p < 0,05$ . Total de réplicas por grupo = 30-33 (3 experimentos independentes). Grupos expostos à toxina purificada (0,1; 1,0; 10, e 100) e ao extrato aquoso contendo CYN (0,1E; 1,0E e 10E).

Para a G6PDH, não houve diferença estatística significativa entre os grupos testados em relação ao controle (Figura 22).

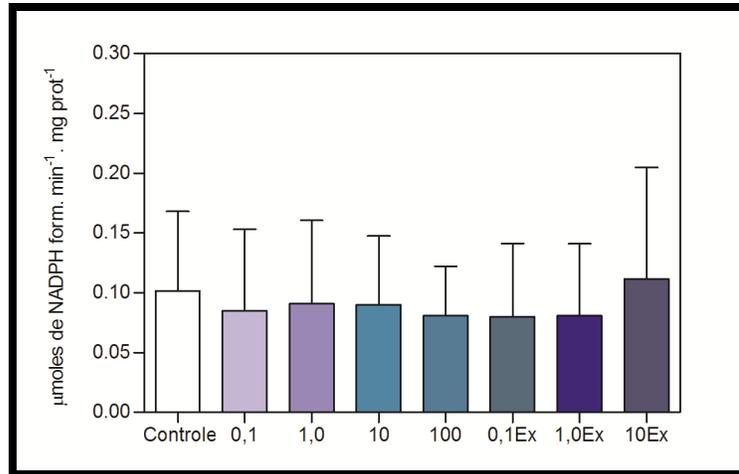


Figura 22 - Atividade específica da G6PDH. Média  $\pm$  desvio padrão. Atividade em micromoles de NADPH formado a partir da redução do  $\text{NADP}^+$  por minuto por miligrama de proteínas totais. Total de réplicas por grupo = 30-33 (3 experimentos independentes). Grupos expostos à toxina purificada (0,1; 1,0; 10, e 100) e ao extrato aquoso contendo CYN (0,1E; 1,0E e 10E).

Não houve diferença nas atividades de GPx em nenhum grupo testado (Figura 23).

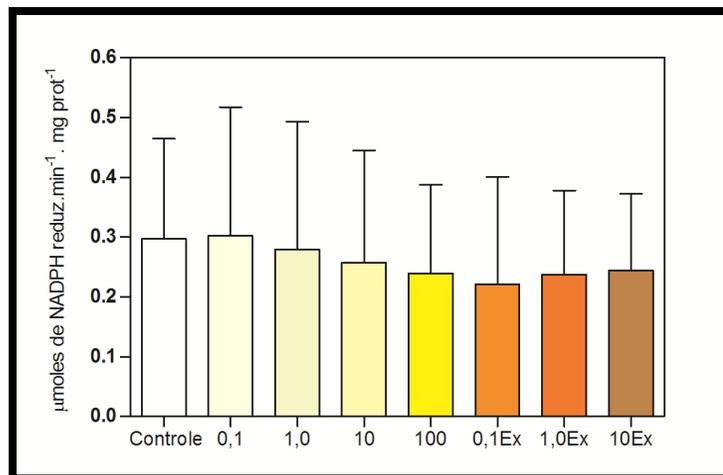


Figura 23 - Atividade específica da GPx. Média  $\pm$  desvio padrão da média. Atividade em micromoles de  $\text{NADP}^+$  reduzido a NADPH por minuto por miligrama de proteínas totais. Total de réplicas por grupo = 24-28 (3 experimentos independentes). Grupos expostos à toxina purificada (0,1; 1,0; 10, e 100) e ao extrato aquoso contendo CYN (0,1E; 1,0E e 10E).

A GR sofreu redução significativa na sua atividade em todos os grupos (1 – 25,4%; 10 – 30,8%; 100 – 52,8%; 0,1Ex – 65,7%; 1Ex – 50,7%; 10Ex – 49,5%), exceto no grupo 0,1

exposto a toxina purificada (redução de 14,6%). A comparação entre os grupos expostos ao extrato e toxina purificada mostrou diferença significativa entre os grupos 0.1 e 0.1E (60%) e os grupos 1 e 1E (34%). Já na comparação entre os grupos 10 e 10E, não se observou diferença significativa, no entanto, houve 27% de redução do grupo 10E em relação ao grupo 10 (Figura 24).

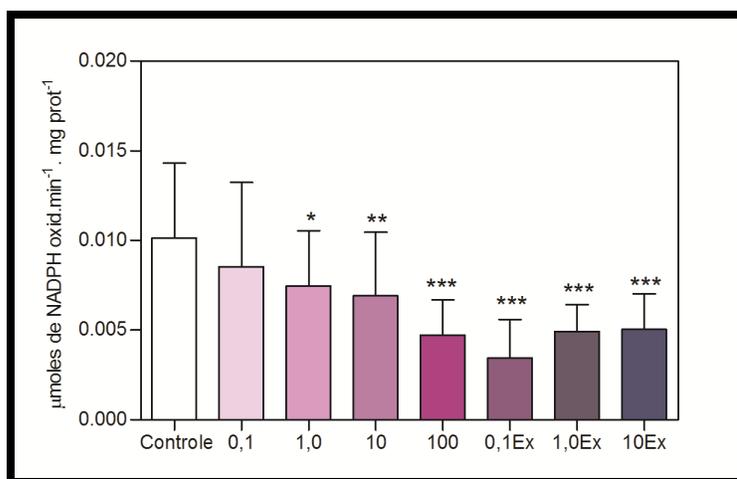


Figura 24 - Atividade específica da GR. Média  $\pm$  desvio padrão. Atividade em micromoles de NADPH oxidado a  $\text{NADP}^+$  por minuto por miligrama de proteínas totais. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$  e \*\*\* =  $p < 0,001$ . Total de réplicas por grupo = 26-29 (3 experimentos independentes). Grupos expostos à toxina purificada (0,1; 1,0; 10, e 100) e ao extrato aquoso contendo CYN (0,1E; 1,0E e 10E).

Para a GST, houve um aumento significativo na atividade destas enzimas apenas no grupo 10E (33,3%) (Figura 25).

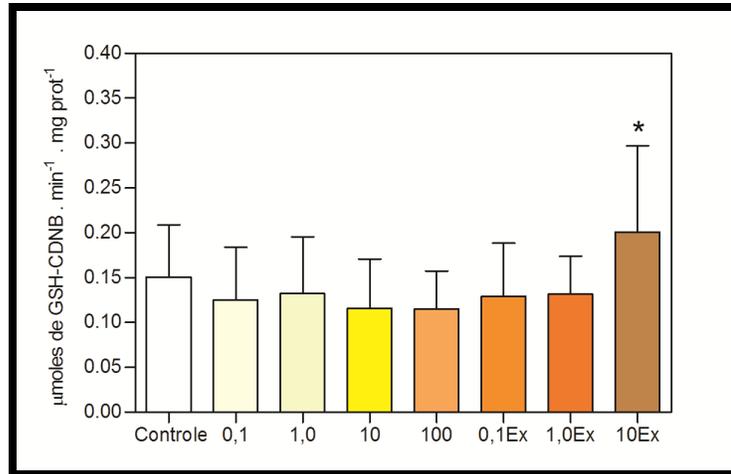


Figura 25 - Atividade específica de diferentes isoformas da GST. Média  $\pm$  desvio padrão. Atividade em micromoles do tioéter GSH-CDNB formado por minuto por miligrama de proteínas totais.\* =  $p < 0,05$  (asteriscos em comparação com o grupo controle). Total de réplicas por grupo = 29-32 (3 experimentos independentes). Grupos expostos à toxina purificada (0,1; 1,0; 10, e 100) e ao extrato aquoso contendo CYN (0,1E; 1,0E e 10E).

#### 4.3. Conteúdo de GSH:

O conteúdo de GSH aumentou significativamente apenas no grupo 100 (71,5%).

(Figura 26).

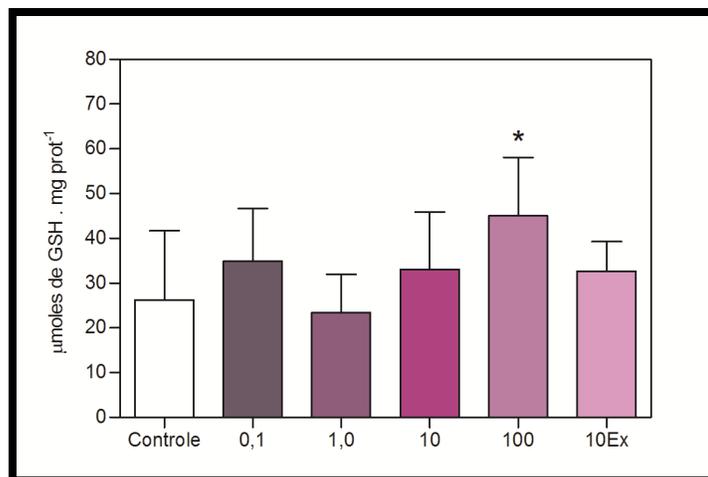


Figura 26 - Conteúdo de GSH. Média  $\pm$  desvio padrão. Concentração em micromoles de GSH por miligrama de proteínas totais. \* =  $p < 0,05$  (asteriscos em comparação com o grupo controle). Total de réplicas por grupo = 12 (3 experimentos independentes). Grupos expostos à toxina purificada (0,1; 1,0; 10, e 100) e ao extrato aquoso contendo CYN (10E).

#### 4.4. Peroxidação de lipídios (LPO) e Carbonilação de proteínas (PCO):

A LPO aumentou significativamente somente no grupo 10E (75,8%) (Figura 27).

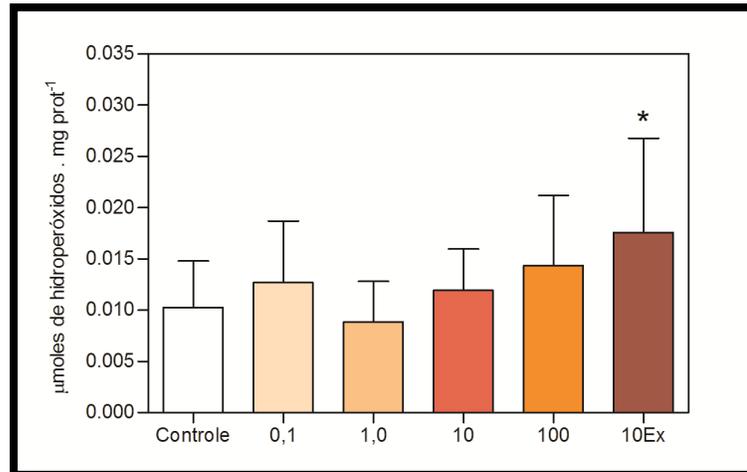


Figura 27 - Peroxidação de lipídios – concentração de hidroperóxidos lipídicos. Concentração em micromoles de hidroperóxidos por miligrama de proteínas totais. Média  $\pm$  desvio padrão. \* =  $p < 0,05$  (asteriscos em comparação com o grupo controle). Total de réplicas por grupo = 12 (3 experimentos independentes). Grupos expostos à toxina purificada (0,1; 1,0; 10, e 100) e ao extrato aquoso contendo CYN (10E).

A PCO diminuiu apenas no grupo 10E (30,3%). Nos demais grupos testados não houve diferença significativa em relação ao grupo controle (Figura 28).

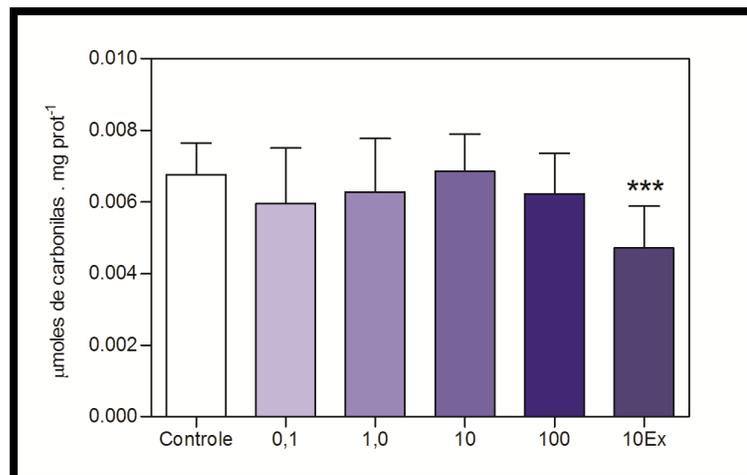
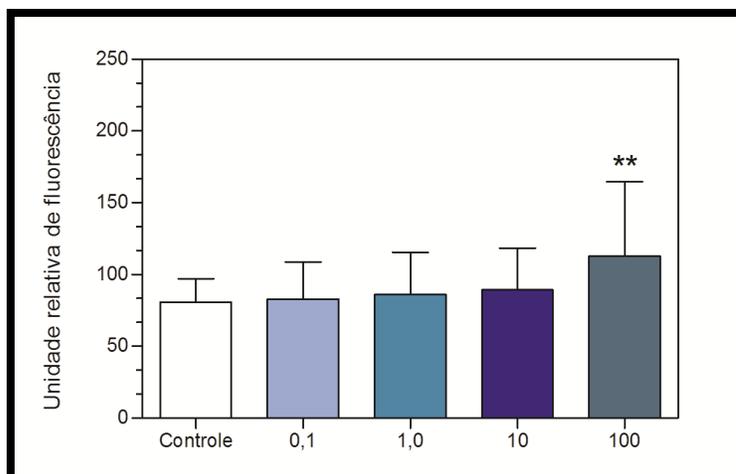


Figura 28 - Carbonilação de proteínas. Concentração de proteínas carboniladas em micromoles de carbonilas por miligrama de proteínas totais. Média  $\pm$  desvio padrão. \*\*\* =  $p < 0,001$  (asteriscos em comparação com o grupo controle). Total de réplicas por grupo = 12 (3 experimentos independentes). Grupos expostos à toxina purificada (0,1; 1,0; 10, e 100) e ao extrato aquoso contendo CYN (10E).

#### 4.5. Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs):

Os níveis de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) aumentaram significativamente somente no grupo 100 (40%) (Figura 29), embora não tenha sido possível realizar os testes com o extrato aquoso.



**Figura 29** - Produção de espécies reativas de oxigênio. Produção de EROs em unidade relativas de intensidade de fluorescência. \*\* =  $p < 0,01$  (asteriscos em comparação com o grupo controle). Total de réplicas por grupo = 26-29 (3 experimentos independentes). Grupos expostos à toxina purificada (0,1; 1,0; 10, e 100).

#### 4.6. Ensaio cometa:

Na avaliação de genotoxicidade, através do ensaio cometa, os nucleóides foram classificados pela atribuição de um valor numérico de acordo com o comprimento dos “rastros de DNA”. Para isso, um escore de dano foi calculado (Figura 30 e tabela 2). Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos testados.

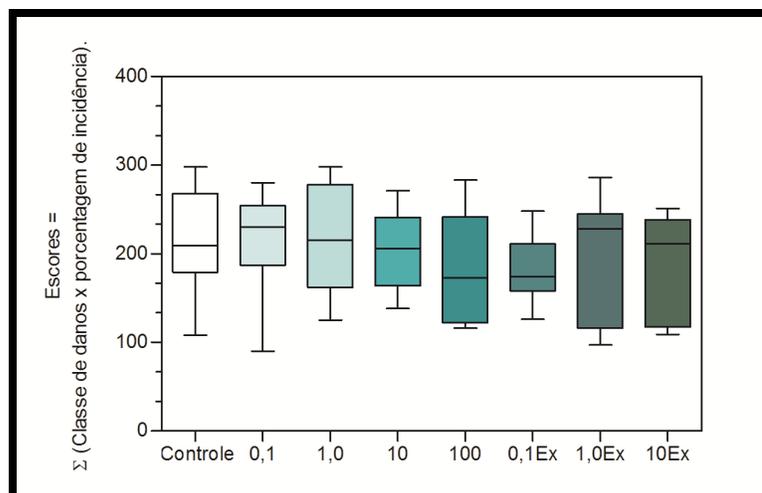


Figura 30 - Escores de danos ao DNA. Média  $\pm$  erro padrão da média. Escore = (classe do dano x % de incidência). Total de réplicas por grupo = 9 (3 experimentos independentes). Grupos expostos à toxina purificada (0,1; 1,0; 10, e 100) e ao extrato aquoso contendo CYN (0,1E; 1,0E e 10E).

Tabela 1 - Percentagem de incidência das classes de dano ao DNA (0, 1, 2, 3 e 4) e escores.

<b>Grupos</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>scores</b>
<b>Controle</b>	11.5 $\pm$ 11.4	14.4 $\pm$ 8.0	30.6 $\pm$ 15.3	41.9 $\pm$ 23.6	4.4 $\pm$ 4.3	<b>215.9 <math>\pm</math> 58.5</b>
<b>0.1</b>	13.2 $\pm$ 15.1	14.8 $\pm$ 9.9	31.9 $\pm$ 10.6	37.6 $\pm$ 24.0	2.6 $\pm$ 4.6	<b>201.7 <math>\pm</math> 66.3</b>
<b>1.0</b>	15.6 $\pm$ 13.5	12.0 $\pm$ 6.9	33.5 $\pm$ 9.4	30.4 $\pm$ 21.7	2.7 $\pm$ 3.6	<b>209.9 <math>\pm</math> 64.1</b>
<b>10</b>	14.5 $\pm$ 11.6	18.3 $\pm$ 9.6	31.2 $\pm$ 9.1	32.8 $\pm$ 19.4	3.5 $\pm$ 4.3	<b>192.8 <math>\pm</math> 54.3</b>
<b>100</b>	19.5 $\pm$ 13.4	19.0 $\pm$ 8.9	28.3 $\pm$ 9.6	29.4 $\pm$ 18.7	3.9 $\pm$ 7.6	<b>179.3 <math>\pm</math> 60.9</b>
<b>0.1E</b>	19.7 $\pm$ 11.6	18.9 $\pm$ 10.9	30.1 $\pm$ 12.1	29.0 $\pm$ 18.2	2.3 $\pm$ 3.5	<b>175.4 <math>\pm</math> 46.0</b>
<b>1E</b>	17.9 $\pm$ 14.7	15.1 $\pm$ 9.8	22.7 $\pm$ 7.8	40.1 $\pm$ 21.9	4.2 $\pm$ 7.3	<b>197.5 <math>\pm</math> 67.0</b>
<b>10E</b>	20.8 $\pm$ 16.8	17.2 $\pm$ 7.7	28.3 $\pm$ 7.7	28.8 $\pm$ 19.6	4.9 $\pm$ 6.7	<b>179.8 <math>\pm</math> 66.2</b>

Média  $\pm$  erro padrão da média. Escore = (classe do dano x % de incidência). Total de réplicas por grupo = 9 (3 experimentos independentes).

## 5. DISCUSSÃO:

Os usos de linhagens celulares ou de cultivos primários de células animais representam ferramentas preciosas e indispensáveis para os estudos de toxicidade envolvendo diferentes classes de xenobióticos, uma vez que estas células, principalmente as provenientes de cultivos primários, representam modelos muito próximos da realidade *in vivo* (FILIPAK-NETO et al., 2006). Em comparação com as técnicas *in vivo*, as técnicas *in vitro* oferecem algumas vantagens, principalmente no que se refere às questões éticas e econômicas.

As técnicas para obtenção dos hepatócitos para cultivos primários são bem difundidas desde o final da década de 1960 (BERRY e FRIEND, 1969), e Filipak Neto e colaboradores (2006) padronizaram este método para uma espécie nativa brasileira, *Hoplias malabaricus*, constituindo o primeiro estudo para esse tipo de cultivo com uma espécie de peixe nativa.

Seguindo o mesmo protocolo, não foi possível obter o mesmo rendimento celular que os autores citados obtiveram. Problemas de contaminações, não-adesão das células aos poços das microplacas, baixo rendimento e morte celular foram freqüentes. Por isso, algumas adequações aos procedimentos de isolamento foram implementadas, como por exemplo, o choque com antibióticos e antifúngicos, uso de enzimas (dispase) para auxiliar na dissociação celular e adição de glicose em algumas etapas do procedimento. Fato este que aumentou a sobrevivência das células. Ao final, houve melhora considerável na obtenção e rendimento celulares, entretanto, os problemas ainda permaneciam em alguns casos.

Uma possível explicação para a não-adesão das células seria o fato de termos utilizado microplacas (marca Corning®) sem pré-tratamento com matrigel ou colágeno (tipo I) para facilitar a adesão, o que não explica totalmente o observado, visto que Filipak Neto et al., (2006) utilizaram garrafas de cultura da mesma marca e sem pré-tratamento e tiveram sucesso.

Em relação à viabilidade e o baixo rendimento celular, já foi previamente descrito que a “espécie doadora” tem papel crucial no sucesso das culturas (FAISAL et al., 1995). No presente estudo, alguns espécimes de peixes coletados estavam, aparentemente, em perfeito estado nutricional e de saúde, o que viabilizaria células saudáveis para cultura. Entretanto, outros indivíduos não o estavam, impossibilitando a obtenção de células viáveis para o cultivo. Portanto, o estado geral de saúde do animal utilizado para obtenção de células para cultivo deve ser minuciosamente considerado antes do início dos experimentos para obtenção de cultivos celulares primários.

Estes fatos (morte e baixa viabilidade celular, não-adesão, contaminações e peixes em estado de saúde não-ideais) levaram a eliminação de alguns grupos de exposição à toxina, que teriam sido importantes neste estudo, como por exemplo, os grupos expostos ao extrato tóxico para verificação da geração de ERO.

Além disso, a logística na montagem dos grupos de exposição (Figuras 17 e 18) levou a exclusão de alguns quando expostos em microplacas de 24 poços. Alguns cultivos realizados nesse tipo de microplacas foram imprescindíveis, já que havia necessidade de altas concentrações de proteínas para a realização dos ensaios bioquímicos (ex. GSH, LPO e PCO). Apesar desse fato, acreditamos que discussões altamente relevantes com os resultados obtidos são perfeitamente cabíveis em relação aos efeitos citotóxicos da CYN (purificada e extrato aquoso).

O fígado e suas principais células constituintes, os hepatócitos, são órgão/células-alvo da ação de inúmeros xenobióticos, inclusive as cianotoxinas. Os mecanismos de lesão hepática causada por xenobióticos não-naturais foram amplamente estudados nos últimos anos, no entanto, os efeitos causados por cianotoxinas (exceto para microcistinas), principalmente a CYN, são descritos em estudos ainda reduzidos e recentes, sobretudo como agentes atuantes no desbalanço do ambiente redox celular. Por isso, os mecanismos

detalhados de toxicidade hepática da CYN ainda não são claros (WILLIAMS e JAESCHKE, 2011).

Já foi mostrado que os cultivos primários de hepatócitos podem ser utilizados como modelos celulares sensíveis para os ensaios de citotoxicidade da CYN (LIEBEL et al., 2011). Nesse sentido, investigamos os efeitos da CYNp e CYNex em cultura primária de hepatócitos de um peixe neotropical de fundamental importância ecológica e econômica.

Com base nos resultados observados podemos constatar que o ensaio de viabilidade celular foi um dos parâmetros que se mostrou mais sensível aos efeitos da CYN. Em ambos os grupos testados houve uma redução significativa em relação à viabilidade celular (média de  $20 \pm 2\%$ ) revelando que a CYN, presente tanto no extrato aquoso quanto de forma purificada, foi citotóxica aos hepatócitos em todas as concentrações testadas. A viabilidade celular é um dos ensaios de citotoxicidade mais utilizados para avaliar os efeitos de um contaminante. Este ensaio avalia o percentual de células saudáveis numa dada população de células exposta a um dado xenobiótico. Um decréscimo na viabilidade destas células pode ser interpretado como resultado dos efeitos tóxicos causados por algum estressor. Neste estudo, foi utilizado o teste de incorporação/exclusão do corante vital vermelho neutro que avalia a integridade e permeabilidade da membrana lisossomal (FAUTZ et al., 1991). Esta redução da viabilidade celular causada pela CYN já foi verificada em outros estudos utilizando cultura primária de hepatócitos de peixes de outra espécie (*Prochilodus lineatus*) (LIEBEL et al., 2011) e linhagens celulares diversas (CHONG et al., 2002; NEUMANN et al., 2007; FROSCIO et al., 2009; GUTIÉRREZ-PRAENA et al., 2011a; 2012a).

De fato, a redução na viabilidade celular pode estar intimamente ligada à geração e, conseqüentemente, aos efeitos deletérios das ERO. Já foi verificado que a CYN aumenta a produção de ERO em diferentes linhagens celulares (LIEBEL et al., 2011; GUTIÉRREZ-

PRAENA et al., 2011a) portanto, podemos considerar que trata-se de uma característica da toxicidade desta cianotoxina, no entanto, ainda pouco elucidada.

No presente estudo, a ERO avaliada ( $H_2O_2$ ) somente aumentou no grupo exposto a concentração mais alta de CYNp, muito embora não tenha sido realizado o ensaio com o extrato, que poderia até mesmo ser mais tóxico. Este aumento de ERO pode ter causado um desbalanço no ambiente redox celular, levando a redução da viabilidade celular dos hepatócitos. Liebel et al. (2011) observaram que a CYNp, mesmo em baixas concentrações ( $0,1 \mu gL^{-1}$ ) produz EROs, e além disso, ainda é capaz de inibir a atividade do complexo MXR (*multi-xenobiotic resistance*) o que pode impedir o efluxo de agentes tóxicos, sejam eles as ERO ou a CYN propriamente dita. Humpage et al. (2005) afirmaram que a relação entre formação de ERO e citotoxicidade causada pela CYN não era clara em hepatócitos de ratos. No entanto, o presente estudo mostra que as ERO podem estar associadas diretamente à toxicidade da CYN em hepatócitos de traíras, uma vez que essas ERO ( $H_2O_2$ ) são capazes de transpor as membranas celulares e gerar o radical  $OH^{\bullet}$  que por sua vez é extremamente reativo e pode causar danos à DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial.

O aumento na produção de EROs nos hepatócitos via exposição à CYN pode estar intimamente relacionado com o metabolismo mitocondrial dessas células, e como já mencionado, pode conduzir à morte celular por necrose ou apoptose, além de genotoxicidade. Portanto, o presente trabalho se propõe a sugerir um mecanismo alternativo (Figura 31). A toxicidade da CYN depende da metabolização pelas enzimas do complexo CYP450 (HUMPAGE et al. 2005), onde a atividade deste complexo é bastante elevada nos hepatócitos. O aumento da produção de  $H_2O_2$  (e até mesmo outras EROs não avaliadas neste trabalho) induzida pela CYN, ou o desbalanço no ambiente redox dos hepatócitos, pode aumentar o influxo de cálcio para a matriz mitocondrial, e esse fator tende a afetar a permeabilidade

mitocondrial (MPT - “*Mitochondrial Permeability Transition*”), aumentando-a. Entretanto, não se sabe se: (i) o aumento das EROs se dá por causa da alteração da MPT ou (ii) a MPT é uma consequência da liberação das EROs. Independente da causa, a consequência disso vai desde a liberação de fatores apoptóticos (ZEGURA et al., 2011; STRASER et al., 2012), perda de potencial de membrana mitocondrial (PMM) com depleção da síntese de ATP e aumento (retroalimentação) na produção de EROs, todos tendo como consequência final a morte celular. Na presença de elevadas concentrações de cálcio intracelular a MPT é induzida o que, por sua vez, pode estimular mais abertura de poros da membrana mitocondrial, gerando um ciclo de *feedback* positivo.

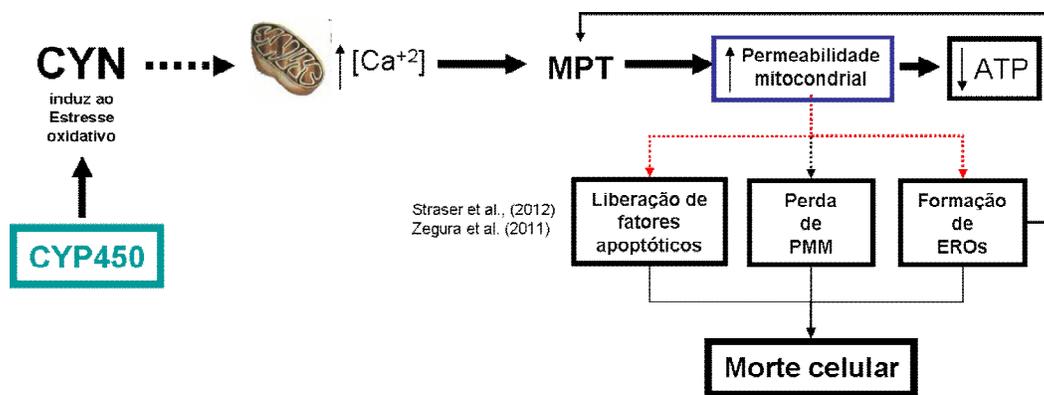


Figura 31 - Proposição de mecanismo alternativo de hepatotoxicidade após exposição à CYN através da formação de ERO, e conseqüente morte celular.

Sabe-se que as microcistinas são capazes de aumentar o influxo de cálcio em mitocôndrias de hepatócitos de ratos (DING et al., 2001) e que alguns fármacos metabolizados pelas enzimas do complexo CYP450 - alcalóides, assim como a CYN - possuem mecanismo semelhante de atuação em hepatócitos humanos, ou seja, aumentando MPT e levando ao aumento de ERO e causando a morte celular por necrose (TAY et al., 2005). A capacidade de a CYN induzir a MPT pode ser um aspecto importante da sua hepatotoxicidade, e isso levaria a uma diminuição da função mitocondrial das células expostas.

A possível toxicidade mitocondrial causada pela CYN, e que pode ser mediada pelas EROs, pode ser explicada por mecanismos que já foram observados em outros compostos nitroaromáticos. Similar a esses outros compostos, a CYN pode ter seus grupamentos nitrogenados reduzidos a uma amina primária e, durante esse ciclo redox, o oxigênio molecular seria reduzido ânions superóxido (BERNAREGGI, 1998), que é uma potente EROs, e que levaria a mitocôndria ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, à MPT (KOWALTOWSKI et al., 2001). Além disso, sabe-se que, nesses compostos, a formação da EROs é uma conseqüência da MPT e não a sua causa (TAY et al., 2005). Logo, este pode ser o mecanismo de toxicidade importante associado à CYN e EROs.

Como mencionado, as EROs podem causar efeitos danosos em algumas macromoléculas, entre elas as membranas celulares. A oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, presentes nas membranas celulares e lipoproteínas, é uma característica peculiar das EROs, fenômeno este que é conhecido como peroxidação lipídica (LPO). A LPO pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação das EROs sobre os lipídios insaturados das membranas celulares alterando a sua permeabilidade, podendo levar a morte celular (BENZIE, 1996). Nas células, a LPO pode ocorrer principalmente por duas vias distintas: uma via enzimática (ciclooxigenases e lipoxigenases, que participam da oxigenação dos ácidos graxos poliinsaturados) e outra via não-enzimática, que envolve a participação das EROs e outros radicais livres (PORTER et al., 1995). No presente estudo, notavelmente, não foi observado aumento significativo na concentração de hidroperóxidos lipídicos em nenhum grupo exposto à CYN purificada, embora possa haver uma tendência ao aumento na concentração desses metabólitos na maior concentração deste grupo. Esse resultado pode ser explicado pelos níveis de ERO em CYNp semelhante ao grupo controle (exceto o grupo  $100 \mu\text{gL}^{-1}$ ), e também pela possível eficiência de GSH e das enzimas CAT, GPx e SOD que são as principais responsáveis pela remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (CAT e GPx) e

$O_2^{\cdot}$  (SOD). Em CYNex, as células expostas a maior concentração de toxina apresentaram concentrações significativamente altas de hidroperóxidos lipídicos e, somado ao fato de ter sido verificado um decréscimo na atividade da SOD nesta concentração, podemos supor que o acúmulo de  $O_2^{\cdot}$  nos hepatócitos pode ter levado ao aumento de LPO. Este resultado sugere que outras moléculas presentes neste extrato aquoso sejam citotóxicas e não somente a CYN propriamente dita. Além disso, estes resultados nos permitem inferir que a redução da viabilidade celular dessas nos hepatócitos pode não ter ligação com este tipo de dano celular.

Algumas moléculas desempenham papel crucial na defesa antioxidante, na manutenção da homeostase celular e na desintoxicação de vários xenobióticos. A glutathiona (GSH) realiza todas essas funções. Na presença de GSH, a glutathiona peroxidase (GPx) catalisa a redução de hidroperóxidos orgânicos ou peróxido de hidrogênio formando glutathiona dissulfeto (GSSG). A formação de GSSG ou conjugados de GSH podem resultar na depleção de GSH celular, mas que pode ser repostada por duas vias principais: (i) através da redução da GSSG via glutathiona redutase (GR) e através de síntese *de novo* em um ciclo chamado  $\gamma$ -glutamil (MEISTER E ANDERSON, 1983). Já foi reportado que a CYN causa redução tanto nos níveis quanto na síntese de GSH em hepatócitos de mamíferos (RUNNEGAR et al, 1994;1995; HUMPAGE et al., 2005) no entanto, foi sugerido que isto não contribui significativamente para a toxicidade da CYN (NORRIS et al., 2002). Em nossos resultados, observamos que houve aumento significativo nas concentrações de GSH somente nas células expostas a maior concentração de CYNp, indicando que possivelmente a células estariam tentando combater as EROs geradas naquele grupo.

Um desequilíbrio na razão GSH/GSSG no ambiente redox intracelular pode ser muito danoso para célula (SCHAFER E BUETTNER, 2001). Como citado anteriormente, esse balanço é mantido basicamente por quatro moléculas: (i) GSH e GSSG propriamente ditas, (ii) GR e (iii) GPx. Adicionalmente, a redução de GSSG à GSH, através da GR, é dependente de

NADPH, molécula esta que pode ser regenerada pela ação da enzima G6PDH (KLETZIEN et al., 1994; SCHAFFER E BUETTNER, 2001). Portanto, qualquer alteração na concentração ou atividade destas moléculas pode acarretar o desbalanço deste microambiente. No presente estudo observamos que não houve alteração significativa nas atividades da G6PDH e GPx, e que portanto, em teoria, o suprimento de NADPH e formação de GSSG estariam em perfeita manutenção. Porém, a atividade da GR está significativamente baixa em quase todos os grupos testados (exceto  $0,1 \mu\text{gL}^{-1}$  CYNp), isto poderia alterar a formação de GSH, fato que não foi observado neste estudo. Alguns estudos mostram que a GSH estaria envolvida diretamente na remoção de xenobióticos e EROs (GUTIÉRREZ-PRAENA et al., 2012a), entretanto, como mencionado anteriormente, alguns autores afirmam que o mecanismo tóxico da CYN não depende de GSH (NORRIS et al., 2002; HUMPAGE et al., 2005). Portanto, ainda são inconclusivas as respostas frente à função exata da GSH para exposição à CYN uma vez que a medição direta do conjugado CYN-GSH ainda não foi estudada.

Além de causar danos oxidativos em diferentes tipos celulares, a CYN é capaz de causar danos genotóxicos importantes tanto *in vitro* quanto *in vivo* (HUMPAGE et al., 2000; SHEN et al., 2002; ZEGURA et al., 2011; STRASER et al., 2012). A presença de um grupamento uracila na molécula de CYN leva a crer que este pode reagir com os grupos adenina do DNA ou RNA interferindo na síntese desses ácidos nucléicos, levando a mutações e processos carcinogênicos, no entanto, para ter essa característica pró-genotóxica a CYN precisa ser metabolicamente ativada por enzimas do complexo CYP450 e, somado ao fato que culturas primárias de hepatócitos de peixes são capazes de manter constantes seus níveis de CYP450 por até 5 dias (PESONEN E ANDERSSON, 1991) era esperado que houvessem danos tanto ao DNA quanto às proteínas, principalmente no grupo CYNp100 já que havia altas concentrações de EROs, os quais podem interagir com estas biomoléculas, danificando-as. Entretanto, não foram observados danos ao DNA e proteínas neste estudo, indicando que o

mecanismo de defesa antioxidante (principalmente GSH) assim como o mecanismo de reparo dos hepatócitos foi muito eficiente nesse sentido ou ainda, que o mecanismo de toxicidade da CYN, neste caso específico, não envolve danos a estas moléculas. Além disso, o tipo celular e a espécie do animal, bem como a concentração de CYN utilizada, podem ter sido cruciais nos resultados apresentados.

Resultados semelhantes já foram observados em outros estudos com linhagens de células de mamíferos (FESSARD E BERNARD, 2003; LANKOFF et al., 2007; BAZIN et al., 2010) e peixes (LIEBEL et al, 2011). Os danos ao material genético podem ser observados através de biomarcadores citogenéticos, entre eles os que utilizam a técnica e ensaio cometa (SALVADORI et al., 2003) que detecta danos recentes, como por exemplo, quebra nas cadeias simples duplas de DNA ou sítios álcali-lábeis mas que ainda são passíveis de correção (GROFF et al., 2010).

Os aspectos toxicológicos de uma determinada substância podem ser verificados através de diferentes abordagens. Nesse sentido, o cultivo primário de células se mostra uma ferramenta importante uma vez que estas células conservam as características básicas dos modelos *in vivo* (BAKSI e FRAZIER, 1990). Logo, modelos *in vitro* empregando cultivo primário de hepatócitos são ferramentas aplicáveis em diversos estudos, já que este tipo celular são células muito versáteis do ponto de vista metabólico, respondem aos sinais para os quais eles respondiam antes da dissociação do fígado e são ricos em enzimas de metabolismo de drogas e xenobióticos (GUILLOUZO et al., 1990).

Os resultados apresentados, tanto no estudo *in vivo* quanto no *in vitro*, mostraram que a CYN foi capaz de provocar danos oxidativos no cérebro, fígado (Capítulo I e II) e hepatócitos dos animais expostos. Abordando mais especificamente o tecido hepático, nota-se que a peroxidação de lipídios ocorreu tanto no órgão quanto nos hepatócitos, já a carbonilação de proteínas ocorreu somente no fígado dos animais. Tal resultado sugere que a metabolização da

CYN no fígado íntegro pode ter levado à PCO, ao passo que esta metabolização decresce ao longo do tempo no hepatócito.

Como mencionado nos capítulos anteriores, estudos comparando os efeitos da CYN purificada com a CYN presente em extrato aquoso ainda são escassos. Artigos científicos mostram que o extrato tóxico de cianobactérias pode conter diferentes compostos bioativos, que não são as cianotoxinas conhecidas, mas são capazes de causar efeitos danosos aos organismos expostos tanto em ensaios *in vitro* quanto *in vivo* (FALCONER, 2007; PUERTO et al., 2011b; HUMPAGE et al., 2012). O estudo do desenvolvimento embrionário de peixes zebra (*Danio rerio*) expostos o extrato tóxico aquoso de *Cylindrospermopsis raciborskii* (cepa CYP011K) contendo CYN indicou que este chega a ser 200 vezes mais tóxico do que a toxina purificada (comunicação pessoal).

Nesse sentido dois grandes grupos foram testados neste estudo: o grupo exposto à CYN purificada (CYNp) e àquele exposto ao extrato aquoso contendo CYN (CYNex) em *H. malabaricus* tanto *in vivo* como *in vitro*. De maneira geral, o extrato aquoso se mostrou mais tóxico, tanto *in vitro* (redução da viabilidade celular e LPO) quanto *in vivo* (LPO no cérebro e fígado, PCO no fígado, maior número de injúrias (histopatologia) e maior índice de Bernet).

## 6. CONCLUSÕES:

- O uso de culturas primárias de hepatócitos de traíras se mostrou bastante satisfatório para avaliar a toxicidade da CYN.
- A redução e/ou aumento nos níveis e atividades de alguns dos biomarcadores utilizados é um forte indício que os hepatócitos expostos à CYN apresentavam um estado de estresse oxidativo.
- Não foram encontrados danos ao DNA e proteínas tanto no extrato quanto na toxina purificada, isto pode ser justificado pela perda progressiva da capacidade metabólica dos hepatócitos ao longo do tempo que é necessária para a bioativação da toxina.
- O aumento de  $H_2O_2$  associado ao aumento de LPO em CYNp indica que estes biomarcadores têm importante papel no seu mecanismo de toxicidade.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos envolvendo a interação entre a CYN e peixes vêm crescendo nos últimos anos, isto se justifica pelo fato de que estes organismos são os primeiros a entrarem em contato com essas toxinas, uma vez ambos estão na água. Portanto, elucidar os mecanismos de toxicidade da CYN nestes animais é condição imprescindível para a compreensão dos seus efeitos biológicos no ecossistema aquático como um todo.

Como foram discutidos ao longo desta tese, os mecanismos de toxicidade da CYN ainda são desconhecidos, em grande parte. Os estudos *in vivo* aliados aos estudos *in vitro* são ferramentas fundamentais para ampliar esse conhecimento. Os dados obtidos neste estudo são inéditos na literatura uma vez que mostram a toxicidade da CYN, em duas formas de exposição (purificada - CYNp e extrato aquoso - CYNex), utilizando-se ferramentas bioquímicas e os biomarcadores em uma espécie de peixe nativa da fauna brasileira, muito embora os resultados não tenham apresentado diferenças significativas entre as duas formas de intoxicação, o que *per se* já se torna um importante campo de investigação uma vez que o extrato aquoso tende a ser mais tóxico (fato já discutido anteriormente).

A espécie *Hoplias malabaricus* é um peixe com alta relevância econômica e ecológica, e utilizá-lo como modelo de estudo da ação da CYN ampliou o conhecimento sobre a sua biologia frente à exposição à toxina, revelando alguns efeitos de toxicidade inéditos em peixes, como o potencial neurotóxico da CYN discutido no primeiro capítulo.

A ação neurotóxica da CYN já havia sido previamente discutida em bivalves, entretanto, sem a certeza de que se tratava da CYN propriamente dita, uma vez que não foi feita nenhuma análise mais acurada da molécula utilizada (KISS et al., 2002). Pela primeira vez, observamos que a CYN foi capaz de atravessar a barreira hematoencefálica do animal, chegando ao cérebro e causando dano oxidativo nas membranas celulares deste órgão (peroxidação de lipídios) e, além disso, mesmo após 14 dias de exposição, a toxina ainda

permanecia nesse órgão e no tecido muscular, o que representa um risco não só para o animal, mas também para os seus consumidores.

Não foi possível demonstrar diferença em relação à concentração de CYN nos grupos estudados, tanto no cérebro quanto no músculo, embora haja, no extrato, a presença de outros metabólitos, o que poderia facilitar a entrada da toxina no tecido/órgão, aumentando a sua concentração naquele local. Portanto, no capítulo I, não foi possível concluir qual forma de exposição foi mais danosa ao cérebro da traíra, já que, como resultado final, ambos causaram danos oxidativos (LPO) a esse órgão. Em relação à atividade da AChE, observamos uma atividade aguda (7 dias) e uma recuperação após 14 dias de exposição. Já no cérebro, a toxina purificada parece ter um efeito mais tardio, já que houve diminuição na atividade desta enzima somente após 14 dias. Há vários relatos que mostram a CYN com uma atividade tóxica rápida (mediada por CYP450) e uma atividade tóxica tardia (através da inibição de síntese protéica). Em parte isso faz todo sentido, já que a ACHE é uma proteína (enzima) e sua síntese pode estar sendo interrompida pelo efeito tardio da CYN pura, causando essa diminuição em 14 dias, entretanto, foi observado aumento da atividade no fígado do animais expostos, e tal fato não é corroborado por esta teoria.

O emprego dos diferentes biomarcadores para avaliação do estado redox em um modelo experimental não-exótico são os pontos de destaque dos ensaios realizados no Capítulo II que visou demonstrar a hepatotoxicidade da CYN. Sabe-se que o fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo de drogas e xenobióticos em vertebrados, já que os hepatócitos são altamente especializados na remoção de substâncias tóxicas recém-absorvidas, na sua biotransformação e no lançamento dos produtos de biotransformação na circulação (RODRIGUES, 2003) para posterior excreção - desintoxicação.

A exposição a uma dose única de CYN mostrou que mesmo após 14 dias de exposição, assim como no cérebro, a toxina ainda permanecia no tecido hepático do animal, além disso,

os animais expostos à CYNp tendem a apresentar maiores concentrações de CYN do que aqueles expostos ao extrato, fato diferente do que foi observado no capítulo I (cérebro e músculo). Isso levantou ainda mais os questionamentos sobre o papel efetivo das outras moléculas presentes no extrato em relação ao processo de acúmulo da CYN, indicando que esse acúmulo depende do órgão que está se estudando. Os biomarcadores utilizados para avaliar os danos oxidativos foram considerados satisfatórios em suas respostas, uma vez que mostraram o papel da CYN como molécula causadora desse tipo de injúria no tecido hepático do peixe (LPO e PCO). Os resultados também confirmaram o fato da toxina ter característica toxicológica crônica, pelo fato dos danos terem sido observados, principalmente, 14 dias pós-exposição. Os resultados dos biomarcadores foram corroborados pelos exames histopatológicos que apresentaram alta incidência de necrose nos tecidos, que provavelmente ocorreram em decorrência da exposição. O uso de uma ferramenta que integra os danos histológicos observados (índice de Bernet – BERNET et al., 1999) indicou que animais expostos a CYNex tiveram maior dano tecidual no 7º dia pós-exposição. Isso pode ser considerado um efeito precoce uma vez que os biomarcadores bioquímicos indicaram um efeito tardio (14º dia) da toxina. Os resultados indicam que a CYNex tende a ser mais tóxica que a CYNp no tecido hepático dos peixes.

Portanto, nos ensaios *in vivo* (capítulos I e II) nota-se que os biomarcadores de cérebro (ACHE e LPO) e fígado (LPO, danos morfológicos, resposta inflamatória e GST) avaliados foram satisfatórios para demonstrar os efeitos tóxicos da CYN.

O emprego de 12 diferentes biomarcadores, de concentrações mais realísticas da CYN e de um modelo *in vitro* ainda pouco explorado (hepatócitos de uma espécie não-exótica), são os pontos de destaque do Capítulo III. Infelizmente, alguns biomarcadores não puderam ser testados com todas as concentrações propostas, e como foi discutido no capítulo, a saúde do animal é condição primordial para a obtenção de culturas primárias viáveis de hepatócitos.

Apesar desse fato, o estudo mostrou que o ensaio de viabilidade celular e a atividade da GR se mostraram *endpoints* sensíveis a exposição às várias concentrações de CYN testadas. Adicionalmente, os resultados mostraram que os hepatócitos são mais sensíveis a exposição ao extrato do que a toxina purificada, fato observado através da resposta de alguns biomarcadores (GST, SOD, LPO, GR e viabilidade celular).

A luz dos dados apresentados, foi possível inferir que a toxicidade da CYN pode ser mediada por ERO, porém não somente por elas. O mecanismo proposto indica que além das ERO, outros fatores comprovadamente descritos (ZEGURA et al, 2011, STRASER et al., 2012) podem aumentar a permeabilidade mitocondrial levando a um quadro de morte celular por apoptose, fato que foi observado nos resultados de viabilidade celular. Além disso, não foi observado nenhum padrão em relação as respostas dos biomarcadores utilizados se comparados os estudos *in vivo* e *in vitro*.

A exposição pontual e aguda dos animais mostrou resultados interessantes a níveis bioquímicos e morfológicos. No entanto, vale mencionar que no ambiente essa exposição é contínua e crônica, e que, por esse fato, alguns resultados negativos apresentados nesta tese podem ter ocorrido uma vez que a literatura aponta a CYN com ação mais crônica.

Portanto, este trabalho mostrou o uso de diferentes biomarcadores no intuito de apontar os efeitos da CYN em um peixe da fauna brasileira. Alguns dados obtidos aqui são de grande valia para futuras discussões em relação aos efeitos toxicológicos da CYN em peixes bem como para dirigir futuras investigações. É incontestável que a CYN causou danos oxidativos tanto no cérebro quanto no fígado desses animais nos ensaios *in vivo*. Além disso, os ensaios *in vitro* mostraram que a CYN é capaz de reduzir a viabilidade celular dos hepatócitos de *Hoplias malabaricus* mesmo em concentrações relativamente baixas, o que indica um risco no que diz respeito a saúde pública (alerta à exposição humana). Isto se deve ao fato de que os organismos aquáticos tendem a ser mais resistentes do que mamíferos pelo

fato de cianobactérias e peixes co-existirem no mesmo habitat a milhares de anos, o que pode ter lhes conferido um mecanismo de resistência mais eficiente (LIRÅS et al., 1998). Adicionalmente este último aspecto pode justificar as respostas inalteradas de alguns biomarcadores estudados.

Por fim, fazem-se necessários estudos que visem a exposição de organismos aquáticos a CYN em diferentes formas de exposição (pura, extrato celular e célula íntegra) bem como diferentes vias (principalmente oral) com o intuito de elucidar ainda mais seus mecanismos de toxicidade, principalmente à nível molecular. O uso de concentrações encontradas em ambientes naturais, e o comparativo entre a toxina pura e o extrato tóxico são de grande valia para avaliar o potencial da toxina isoladamente e em sinergia com outras moléculas.

## CONCLUSÕES FINAIS

- De maneira geral não se observou nenhuma diferença em relação à concentração de CYN em relação à forma de exposição (extrato ou purificada) em nenhum tecido/órgão;
- Mesmo após 14 dias de exposição a toxina ainda permanecia no cérebro, fígado e tecido muscular, indicando que o mecanismo de desintoxicação não foi eficiente na remoção da toxina;
- Em relação à atividade da ACHE no músculo, a toxina mostrou um efeito (decréscimo) mais rápido (7 dias) em ambas as formas de exposição (extrato e purificada), no entanto há uma recuperação nesses níveis de atividade após 14 dias;
- Já em relação à atividade da ACHE no cérebro, a toxina mostrou um efeito (decréscimo) mais lento (14 dias) somente quando os peixes foram expostos a toxina purificada;
- Tanto a presença da toxina quanto os danos observados – diminuição da atividade da ACHE (CYNp) e peroxidação de lipídios (CYNp e CYNex) - indicam um potencial neurotóxico da CYN e que a mesma é capaz de transpor a barreira hematoencefálica;
- O conjunto de biomarcadores avaliados mostrou-se eficiente para avaliar os danos da CYN no fígado dos exemplares de *H. malabaricus* expostos;

- Apesar da ativação de algumas moléculas do mecanismo antioxidante (SOD, G6PDH e GST) no fígado dos animais, a toxina causou danos tanto em CYNex (peroxidação de lipídios e carbonilação de proteínas) quanto em CYNp (peroxidação de lipídios) após 14 dias pós-exposição;
- Houve alta incidência de necrose, centros de melanomacrófagos e melanomacrófagos livres principalmente em CYNex, sendo os dois últimos indicativos de ativação da resposta imune;
- O índice de Bernet mostrou maior grau de alterações no grupo CYNex após 7 dias de exposição, isso somado ao fato da carbonilação de proteínas ter ocorrido somente em CYNex, indica que o extrato aquoso foi mais tóxico para o fígado do que CYNp. O fato de outras moléculas estarem presentes no extrato pode ser a justificativa para esta resposta;
- A resposta do ensaio de viabilidade celular se mostrou um parâmetro importante na avaliação da toxicidade da CYN, uma vez que todos os grupos tiveram decréscimo nesse biomarcador;
- O aumento da ERO (CYNp) associado à diminuição da viabilidade celular mostra o potencial deletério desta toxina, embora não tenha se observado ERO nas mais baixas concentrações de CYNp;
- O extrato apresentou dano lipídico (LPO) aos hepatócitos somente na mais alta concentração, embora tenha sido observado um aumento na atividade da GST nesta condição o que sugere a tentativa de um efeito protetor;

- Não foi observado nenhum dano ao DNA, indicando que o mecanismo de reparo desta biomolécula foi eficiente, ou ainda, que o mecanismo de toxicidade da CYN não envolve este tipo de dano em hepatócitos de peixes;
- A boa saúde dos espécimes foi condição imprescindível para a obtenção de cultura saudáveis de hepatócitos;
- Tanto os modelos *in vitro* como *in vivo*, foram eficientes no estudo de toxicidade da CYN em hepatócitos de *H. malabaricus*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. 1984. Catalase *in vitro*. Methods Enzymol., v.105, p.121-126.
- ALMROTH, B.C., 2008. Oxidative damage in fish used as biomarkers in field and laboratory studies. Department of Zoology/Zoophysiology, University of Gothenburg, Box 463, 405 30 Göteborg, Sweden.
- ALVES COSTA, J.R.M.; MELA, M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; PELLETIER, E.; RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. Ecotoxicol. Environ. Saf., v.67, p.82-88, 2007
- ANDRADE BRITO, I., ARRUDA FREIRE, C., YAMAMOTO, F.Y., SILVA DE ASSIS, H.C., RODRIGUES SOUZA-BASTOS, L., CESTARI, M.M., DE CASTILHOS GHISI, N., PRODOCIMO, V., FILIPAK NETO, F., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. 2012. Monitoring water quality in reservoirs for human supply through multi-biomarker evaluation in tropical fish. J Environ Monit. 14(2):615-25.
- ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M. 1985. Aspectos biológicos de peixes amazônicos. V. Desenvolvimento larval do jaraqui-escama grossa, *Semaprochilodus insignis* (Characiformes, Pisces) da Amazônia central. Rev. Brasil. Biol., 45(4): 423-443.
- ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M. E BITTENCOURT, M.M. 2002 A reprodução e o início da vida de *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae; Characiformes) na Amazônia Central. Acta Amazonica, Manaus, 32(2): 693-697.
- ARTEEL, G.E. e SIES, H. 2001. The biochemistry of selenium and the glutathione system. Environ. Toxicol. Pharmacol. 10, 153– 158.
- BAKKE, M.J. e HORSBERG, T.E. 2007. Effects of algal-produced neurotoxins on metabolic activity in telencephalon, optic tectum and cerebellum of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquat Toxicol. 85, 96-103.
- BALLESTEROS, M. L.; WUNDERLIN, D. A., BISTONI, M. A., 2009. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2, 199–205.
- BAKSI, S.M.; FRAZIER, J.M. Isolated fish hepatocytes – model systems for toxicology research: review. Aquat. Toxicol., v.16, p.229-256, 1990
- BAZIN, E., HUET, S., JARRY, G., HEGARAT, L.L., MUNDAY, J.S., HUMPAGE, A.R., FESSARD, V., 2010. Cytotoxic and genotoxic effects of cylindrospermopsin in mice treated by gavage or intraperitoneal injection, Environ. Toxicol. doi:10.1002/tox.20640.
- BENOV, L., SZTEINBERG, L., FRIDOVICH, I. 1998. Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. Free Radic. Biol. Med., 25, 826-831.
- BENZIE, I.F.F., 1996. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. Int. J. Food Sci. Nut, 47, 233-261.

- BERNARD, C., HARVEY, M., BRIAND, J. F., BIRÉ, R., KRYS, S. AND FONTAINE, J. J. 2003. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: Evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. *Environ. Toxicol.* 18, 176-186.
- BERNAREGGI, A. 1998. Clinical pharmacokinetics of nimesulide. *Clin. Pharmacokinet.*, 35 , pp. 247–274
- BERNET, D., SCHMIDT, H., MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P., WAHLI, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish. Dis.* 22, 25–34.
- BERRY, M. N. AND FRIEND, D. S., 1969. High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.* 43, 506-520.
- BORENFREUND, E., BABICH, H., MARTIN-ALGUACIL, N., 1988. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays — the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicology in Vitro* 2, 1–6.
- BOURKE, A.T.C., HAWES, R.B., NEILSON, A., STALLMAN, N.D., 1983. An outbreak of hepato-enteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. *Toxicon* 3:45–48.
- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- BRASIL, 2012. Ministério da Saúde. Portaria n. 2.914 de 4 de Janeiro de 2012. Disponível em: <http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1epagina=43edata=04/01/2012>. Consultado em 28 de fevereiro de 2012.
- BUSSOLARO, D., FILIPAK NETO, F., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., 2010. Responses of hepatocytes to DDT and methyl mercury exposure. *Toxicology in Vitro*, 24, 1491-1497.
- BYTH, S. 1980. Palm Island mystery disease. *Med J Aust* 2: 40–42.
- CARMICHAEL, W.W., BIGGS, D.F., GORHAM, P.R., 1975. Toxicology and pharmacological action of *Anabaena flos-aquae* toxin. *Science* 187, 542–544.
- CARMICHAEL, W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites – The Cyanotoxins. *J. Appl. Bact.*, 72: 445-459.
- CARMICHAEL, W.W. 1994. The toxins of Cyanobacteria. *Scientific American*. 270(1), pp. 78-86.
- CARMICHAEL, M., KRISHNAMURTHY, T., BEASLEY, V.M.J.Y., BUNNER, D.L., MOORE, R.E., ELOFF, J.N., RINEHART, K., FALCONER, I., RUNNEGAR, M., GORHAM, P., SKULBERG, O.M., HARADA, K.I., WATANABE, M., 1998. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon* 26, 971-973.

- CARMICHAEL, W.W., AZEVEDO, S.M.F.O., AN, J.S., MOLICA, R.J.R., JOCHIMSEN, E.M., LAU, S., RINEHART, K.L., SHAW, G.R., EAGLESHAM, G.K. 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ. Health Perspect.* 109: 663–668
- CAZENAVE, J., NORES, M.L., MICELI, M., DÍAZ, M.P., WUNDERLIN, D.A. BISTONI, M.A. 2008. Changes in the swimming activity and the glutathione S-transferase activity of *Jenynsia multidentata* fed with microcystin-RR. *Water Res.* 1299-307.
- CHONG, M.W.K., WONG, B.S.F., LAM, P.K.S., SHAW, G.R., SEAWRIGHT, A.A., 2002. Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophytotoxin in primary rat hepatocytes. *Toxicol.* 40, 205–211.
- CHORUS, I. e BARTRAM, J. (1999) Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management. Für WHO durch E e FN Spon /Chapman e Hall, London, 416 pp.
- CLEMENTE, Z., BUSATO, R.H., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., CESTARI, M.M., RAMSDORF, W.A., MAGALHÃES, V.F., WOSIACK, A.C. e SILVA DE ASSIS, H.C. 2010. Analyses of paralytic shellfish toxins and biomarkers in a southern Brazilian reservoir. *Toxicol.* 55(2-3), 396-406.
- CROUCH, R.K.; GANDY, S.C.; KIMSEY, G. 1981. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes*, 30, 235-41.
- DING, W.X.; SHEN, H.M.; ONG, C.N., 2001. Pivotal role of mitochondrial Ca<sup>(2+)</sup> in microcystin-induced mitochondrial permeability transition in rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 1155–1161.
- EAGLESHAM, G. K., NORRIS, R. L., SHAW, G.R., SMITH, M.J., CHISWELL, R.K., DAVIS, B.C., NEVILLE, G.R., SEAWRIGHT, A.A. AND MOORE, M.R. 1999. Use of HPLC-MS/MS to monitor cylindrospermopsin, a blue–green algal toxin, for public health purposes. *Environ. Toxicol.* 14, 151-154.
- ECETOC, 1993. Environmental hazard assessment of substances. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals: Technical Report No. 51. Brussels, Belgium.
- EL-SHEHAWY, R., GOROKHOVA, E., FERNÁNDEZ-PIÑAS, F., DEL CAMPO, F.F. 2011. Global warming and hepatotoxin production by cyanobacteria: What can we learn from experiments? *Water Research.* doi:10.1016/j.watres.2011.11.021.
- FAISAL, M.; RUTAN, B.J.; SAMI-DEMMEERLE, S., 1995. Development of continuous liver cell cultures from the marine teleost, spot (*Leiostomus xanthurus*, Pisces: Sciaenidae). *Aquaculture*, v.132, 59-72.
- FALCONER, I.R., 2007. Cyanobacterial toxins present in *Microcystis aeruginosa* extracts – more than microcystin! *Toxicol* 50, 585–588.
- FALCONER, I. R. AND HUMPAGE, A. R. 2006. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: Cylindrospermopsins. *Environ. Toxicol.*, 21: 299–304.

FALCONER, I. R., HARDY, S. J., HUMPAGE, A. R., FROSCIO, S. M., TOZER, G. J. AND HAWKINS, P. R. 1999. Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male Swiss albino mice. *Environ. Toxicol.* 14, 143-150.

FAUTZ, R., HUSEIN, B., HECHENBERGER, C., 1991. Application of the neutral red assay (NR assay) to monolayer cultures of primary hepatocytes: Rapid colorimetric viability determination for the unscheduled DNA synthesis test (UDS). *Mutat. Res.* 253, 173–179.

FENT, K., 2001. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicol.in Vitro* 15, 477–488.

FESSARD, V., BERNARD, B., 2003. Cell alterations but no DNA strand breaks induced *in vitro* by cylindrospermopsin in CHO K1 cells, *Environ. Toxicol.*18, 353– 359.

FEURSTEIN, D., FESSARD, V., LE HEGART, L. AND DIETRICH, D.R. 2010. Investigations of the neurotoxic potential mediated by single microcystin congeners – a potential new hazard for humans? Abstracts of the 8<sup>th</sup> International Conference on Toxic Cyanobacteria (ICTC8). Istanbul, Turkey. Aug 29<sup>th</sup> – sep 4<sup>th</sup> 2010. Abstract Book.p. 108.

FILIPAK NETO, F., ZANATA, S.M., SILVA DE ASSIS, H.C., BUSSOLARO, D., FERRARO, M.V.M., RANDI, M.A.F., ALVES COSTA, J R.M., CESTARI, M.M., ROCHE, H., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., 2007. Use of hepatocytes from *Hoplias malabaricus* to characterize the toxicity of a complex mixture of lipophilic halogenated compounds. *Toxicol. In Vitro.* 21,706-715.

FILIPAK NETO, F.; ZANATA, S.M.; RANDI, M.A.F.; PELLETIER, É.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., 2006. Hepatocytes primary culture from the Neotropical fish trahira *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794). *J. Fish Biol.*, v.69, p.1524- 1532.

FOWLER, H.W. Os peixes de água doce do Brasil. *Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo*, v.6, p.205-404, 1950.

FROSCIO, S.M., FANOK, S., HUMPAGE, A.R., 2009. Cytotoxicity screening for the cyanobacterial toxin Cylindrospermopsin. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 72, 345-349.

FROSCIO, S.M., HUMPAGE, A.R., WICKRAMASINGHE, W., SHAW, G. AND FALCONER, I.R. 2008. Interaction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin with the eukaryotic protein synthesis system. *Toxicon* 51, 191–198.

FROSCIO, S.M., HUMPAGE, A.R., BURCHAM, P.C., FALCONER, I.R. 2003. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environ Toxicol* 18(4):243–251.

FROSCIO, S.M. 2002. Investigation of the mechanisms involved in cylindrospermopsin toxicity: hepatocyte culture and reticulocyte lysate studies. Ph.D. Thesis. Adelaide, South Australia: University of Adelaide.

FROSCIO, S.M., HUMPAGE, A.R., BURCHAM, P.C., FALCONER, I.R. 2001. Cell-free protein synthesis inhibition assay for the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *Environ Toxicol* 16(5):408–412.

FUNARI E, TESTAI E. 2008. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Critical Reviews in Toxicology* 38(2):97 - 125.

GÁCSI, M., ANTAL, O., VASAS, G., MÁTHÉ, C., BORBÉLY, G., SAKER, M.L., GYÓRI, J., FARKAS, A., VEHOVSZKY, Á., BÁNFALVI, G., 2009. Comparative study of cyanotoxins affecting cytoskeletal and chromatin structure in CHO-K1 cells. *Toxicol. In Vitro* 3, 710–718.

GEORGE, S.G., 1994. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular perspectives*. Lewis Publishers, CRC press, pp. 37-85.

GLOCK, G.E., McLEAN, P. 1953. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem. J.*, v.55, p.400–408.

GORHAM, P.R., MCLACHLAN, J., HAMMER, U.T. e KIM, W.K. 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.). *Bréb. Verh. Int. Ver. Limnol.* 15, 796-804.

GRIFFITHS, D. J. e SAKER, M. L. 2003. The palm island mystery disease 20 years on: A review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environ. Toxicol.* 18, 78-93.

GROFF, A., DA SILVA, J., NUNES, E., IANISTCKI, M., GUECHEVA, T., OLIVEIRA, A., OLIVEIRA, C., VAL, A., HENRIQUES, J., 2010. UVA/UVB-induced genotoxicity and lesion repair in *Colossoma macropomum* and *Arapaima gigas* Amazonian fish. *J. Photochem. Photobiol., B*, 99 (2), 93 - 99.

GUILLOUZO, A.; MOREL, F.; RATANASAVANH, D.; CHESNE, C.; GUGUEN-GUILLOUZO, C. Long-term culture of functional hepatocytes. *Toxicol In Vitro*, v.4/5, p.415-427, 1990

GUTIÉRREZ-PRAENA, D., PICHARDO, S., JOS, A. AND MARÍA CAMEÁN A. 2011a. Toxicity and glutathione implication in the effects observed by exposure of the liver fish cell line PLHC-1 to pure cylindrospermopsin. *Ecotoxicol. Environ. Saf. In press*.

GUTIÉRREZ-PRAENA, D., JOS, A., PICHARDO, S. AND MARÍA CAMEÁN, A. 2011b. Oxidative stress responses in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a single dose of pure cylindrospermopsin under laboratory conditions: Influence of exposure route and time of sacrifice. *Aquatic Toxicol.* 105, 100– 106.

GUTIÉRREZ-PRAENA, D., PICHARDO, S., JOS, A., MORENO, F.J., CAMEÁN, A.M. 2012a. Biochemical and pathological toxic effects induced by the cyanotoxin Cylindrospermopsin on the human cell line Caco-2, *Water Research* doi:10.1016/j.watres.2011.12.044.

- GUTIÉRREZ-PRAENA, D., JOS, A., PICHARDO, S., MOYANO, R., BLANCO, A., MONTERDE, J.G., CAMEÁN, A.M. 2012b. Time-dependent histopathological changes induced in *Tilapia (Oreochromis niloticus)* after acute exposure to pure cylindrospermopsin by oral and intraperitoneal route. *Ecotoxicol Environ Saf.* 76(2):102-13.
- GUTTERIDGE, J.M.C. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. European Beckman Conference. *Clin. Chem.* 41/12, 1819-1828.
- HALLIWELL, B., CROSS, C.E., GUTTERIDGE, J.M.C. 1992. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 119: 598-620.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, third ed. Oxford University Press, Oxford, UK.
- HARADA, K.I., OHTANI, I., IWAMOTO, K., SUZUKI, M., WATANABE, M.F., WATANABE, M. AND TERAOKA, K. 1994. Isolation of Cylindrospermopsin from a Cyanobacterium *Umezakia Natans* and Its Screening Method. *Toxicon* 32, 73-84.
- HAWKINS, P.R., CHANDRASENA, N.R., JONES, G.J., HUMPAGE, A.R., FALCONER, I.R. 1997. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon* 35 (3): 341–6.
- HAWKINS, P.R., RUNNEGAR, M.T., JACKSON, A.R. A., FALCONER, I.R. 1985. Severe Hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green-alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water-supply reservoir. *App. Environ. Microbiol.* 50, 1292-1295.
- HENDRIKSEN, C.F.M. A short history of use of animals in vaccine development and quality control. *Developments in Biological Standardization.* n.86. p.3-10, 1994.
- HENSLEY, D. A. e MOODY, D. P. 1975. Occurrence and possible establishment of *Hoplias malabaricus* (Characoidei; Erythrinidae) in Florida. *Florida Scientist* 38(2): 122-128.
- HUMPAGE, A., FALCONER, I., BERNARD, C., FROSCIO, S., FABBRO, L. 2012. Toxicity of the cyanobacterium *Limnothrix* AC0243 to male Balb/c mice. *Water Res.* 46: 1576-83.
- HUMPAGE, A., FONTAINE, F., FROSCIO, S., BURCHAM, P., FALCONER, I., 2005. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: role of cytochrome P-450 and oxidative stress. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 68, 739–753.
- HUMPAGE, A. R. e FALCONER, I. R. 2003. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: Determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environ. Toxicol.* 18, 94-103.
- HUMPAGE, A. R., FENECH, M., THOMAS, P. AND FALCONER, I. R. 2000. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutat. Res. – Gen. Tox.En.* 472, 155-161.

- JIANG, Z. Y., HUNT, J.V., WOLV, S.P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*. 202, 384-389.
- JIANG, Z-Y., WOOLLARD, A.C.S. AND WOLFF, S.P. 1991. Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of Fe<sup>+2</sup> in the presence of xylenol orange Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26:853-856.
- KAEBERNICK, M. e B. A. NEILAN. 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35, 1-9.
- KEEN, J.H., HABIG, W.H., JAKOBY, W.B., 1976. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 251, 6183-6188.
- KINNEAR, S. 2010. *Cylindrospermopsin: A Decade of Progress on Bioaccumulation Research – Review.* *Mar. Drugs* 8, 542-564.
- KING, M.; SU, W.; CHANG, A.; ZUCKERMAN, A.; PASTERNAK, G. W. 2001. Transport of opioids from the brain to the periphery by P-glycoprotein: peripheral actions of central drugs. *Nature Neurosci.* 4, 268.
- KISS, T., VEHOVSZKY, A., HIRIPI, L., KOVÁCS, A. AND VÖRÖS, L. 2002. Membrane effects of toxins isolated from a cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, on identified molluscan neurones. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 131, 167-176.
- KLETZIEN, R.F.; HARRIS, P.K.; FOELLM, L.A., 1994. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a “housekeeping” enzyme subject to tissue specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J.*, 8, 174–181.
- KOWALTOWSKI, A.J., CASTILHO, R.F., VERCESI, A.E. 2001. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett.*, 495, pp. 12–15
- LANKOFF, A., WOJCIK, A., LISOWSKA, H., BIALCZYK, J., DZIGA, D., CARMICHAEL, W.W., 2007. No induction of structural chromosomal aberrations in cylindrospermopsin-treated CHO-K1 cells without and with metabolic activation, *Toxicol* 50, 1105– 1115.
- LEVINE, R.L., WILLIAMS, J.A., STADTMAN, E.P., SHACTER, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods. Enzymol.* 233, 346-357.
- LIEBEL, S., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., SILVA, R.C., RAMSDORF, W.A., CESTARI, M.M., MAGALHÃES, V.F., GARCIA, J.R., ESQUIVEL, B.M. AND FILIPAK NETO, F. 2011. Cellular responses of *Prochilodus lineatus* hepatocytes after cylindrospermopsin exposure. *Toxicol In Vitro* 25, 1493-1500.
- LIONETTO, M.G.; CARICATTO, R.; GIORDANO, M.E.; PASCARIELLO, M.F.; MARINOSCI, L.; SCHETTINO, T., 2003. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Pollution Bulletin* 46 324–330.

- LIRÅS, V., LINDBERG, M., NYSTRÖM, P., ANNADOTTER, H., LAWTON, L. A., GRAF, B. 1998. Can ingested cyanobacteria be harmful to the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*)? *Freshwater Biology*, 39: 233–242.
- MCCARTHY, J.F., SHUGART, L.R., 1990. Biological markers of environmental contamination. In: MCCARTHY, J.F., SHUGART, L.R. (Eds.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 3-16.
- MEISTER, A., ANDERSON, M.E., 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.*, 52, 711–760.
- MELA, M.; RANDI, M.A.F.; VENTURA, D.F.; CARVALHO, C.E.V.; PELLETIER, E. OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. 2007. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 68 (3): 426-35.
- MIRANDA, A. L.; ROCHE, H.; RANDI, M.A.F.; MENEZES, M.L.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological, physiological, and immunological findings. *Environment International*, v.34, p.939–949, 2008.
- NEUMANN, C., BAIN, P., SHAW, G., 2007. Studies of the comparative *in vitro* toxicology of the cyanobacterial metabolite deoxy-cylindrospermopsin. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 70, 1679-1686.
- NORRIS, R. L. G., SEAWRIGHT, A. A., SHAW, G. R., SENOGLES, P., EAGLESHAM, G. K., SMITH, M. J., CHISWELL, R. K., MOORE, M. R., 2002. Hepatic xenobiotic metabolism of cylindrospermopsin *in vivo* in the mouse. *Toxicol.* 40, 471-476.
- OBEREMM, A., BECKER, J., CODD, G.A., STEINBERG, C. 1999. Effects of cyanobacterial toxins and aqueous crude extracts of cyanobacteria on the development of fish and amphibians. *Environ. Toxicol.* 14, 77–88.
- OHTANI, I., MOORE, R. E. AND RUNNEGAR, M. T. C. 1992. Cylindrospermopsin - a Potent Hepatotoxin from the Blue-Green-Alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 7941-7942.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C. A., ASSIS, H. C. S. AChE Inhibition as a Biomarker for Pollutants Contamination in Tropical Aquatic Ecosystems In: *Recent Trends in Acetylcholinesterase* ed. Amsterdam : IOS Press, Netherland, 2005, p. 103-124.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., FILIPAK NETO, F., MELA, M., SILVA, P.H., RANDI, M.A.F., COSTA, J.R.A., PELLETIER, E., 2006. Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methyl mercury, inorganic lead and tributyltin chloride. *Environ. Res.* 101, 74–80.
- OSSWALD, J., RELLÁN, S., CARVALHO, A.P., GAGO, A., VASCONCELOS, V. 2007. Acute effects of an anatoxin-a producing cyanobacterium on juvenile fish-*Cyprinus carpio* L. *Toxicol.* 49(5): 693-8.
- PAERL, H.W., HUISMAN, J., 2008. Blooms like it hot. *Science* 4, 57–58.

- PESONEN, M.; ANDERSSON, T. 1991. Characterization and induction of xenobiotic metabolizing enzyme activities in a primary culture of rainbow trout hepatocytes. *Xenobiotica* 21, 461–471.
- PESONEN, M.; ANDERSSON, T. B., 1997. Fish primary hepatocyte culture, an important model for xenobiotic metabolism and toxicity studies. *Aquatic Toxicology*. 37, 253-267.
- PORTER, N.A., CALDWELL, S.E., MILLS, K.A., 1995. Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, 30, 277-290.
- PUERTO, M., JOS, A., PICHARDO, S., GUTIÉRREZ-PRAENA, D., CAMEÁN, A.M. 2011a. Acute effects of pure cylindrospermopsin on the activity and transcription of antioxidant enzymes in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed by gavage. *Ecotoxicol.* 20(8):1852-60.
- PUERTO, M., CAMPOS, A., PRIETO, A., CAMEÁN, A., DE ALMEIDA, A.M., COELHO, A.V. AND VASCONCELOS, V. 2011b. Differential protein expression in two bivalve species; *Mytilus galloprovincialis* and *Corbicula fluminea*; exposed to *Cylindrospermopsis raciborskii* cells. *Aquat Toxicol.* 17, 109-116.
- QUINLAN, G.J., GUTTERIDGE, J.M.C., 2000. Carbonyl assay for oxidative damage to proteins. In: TANIGUCHI, N., GUTTERIDGE, J.M.C. (Eds.), *Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species*. Oxford University, New York, pp. 257-258.
- RABITTO, I.S. ; COSTA, J.R.M.A. ; ASSIS, H.C.S. ; PALLATIER, É. ; AKAISHI, F.M. ; ANJOS, A. ; RANDI, M.A.F; RIBEIRO, C.A.O. 2005. Effects of dietary PB (II) and tributyltin on tropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicology na Environmental Safety*. V. 60 p. 147 – h 156.
- RIOS, F.S.; KALININ, A.L. RANTIN, F.T., 2002. The effects of long-term food deprivation on respiration e hematology of the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Journal of fish biology*, 61:85-95.
- RODRIGUES, L. C. 2003. Estudo das glutathiona S-transferases hepáticas solúveis do peixe *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Pacu). Tese de doutorado em Bioquímica, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes/UERJ, Brasil.
- ROGERS, E.H., HUNTER III, E.S., MOSER, V.C., PHILLIPS, P.M., HERKOVITZ, J., MUNOZ, L., HALL, L.L., CHERNOFF, N. 2005. Potential developmental toxicity of anatoxin-a, a cyanobacterial toxin. *J. Appl. Toxicol.* 25, 527–534.
- RUNNEGAR, M.T., KONG, S.M., ZHONG, Y.Z., GE, J.L. AND LU, S.C. 1994. The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 201, 235-241.
- RUNNEGAR, M.T., KONG, S.-M., ZHONG, Y.-Z., LU, S.C., 1995. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 49, 219–225.

- RUNNEGAR, M.T., XIE, C., SNIDER, B.B., WALLACE, G.A., WEINREB, S.M., KUHLENKAMP, J., 2002. *In vitro* hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related synthetic analogues. *Toxicol Sci.*67(1): 81-7.
- RUSSELL, W.M.S. e BURCH, R.L., 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique.* Methuen, London.
- SALVADORI, D.; RIBEIRO, L.; FENECH, M. 2003. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: Ribeiro, L. M.; Salvadori, D. M. F.; Marques, E. K. *Mutagênese Ambiental.* Canoas: Editora da Ulbra.
- SANCHO, E, CERÓN, JJ, FERRANDO, MD. 2000. Cholinesterase Activity and Hematological Parameters as Biomarkers of Sublethal Molinate Exposure in *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* ; 46: 81-86.
- SCHAFER, F.Q. e BUETTNER, G.R., 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.*, 30, 1191-1212.
- SCHOPF, J. e PACKER, B., 1987. Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia. *Science* 237 (4810), 70-73.
- SEAWRIGHT, A.A., NOLAN, C.C., SHAW, G.R., CHISWELL, R.K., NORRIS, R.L., MOORE, M.R. AND SMITH, M.J. 1999. The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska). *Environ. Toxicol.* 14, 135-142.
- SEDLAK, J., LINDSAY, R.H. 1968. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 25:192-205.
- SEGNER, H. 1998. Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 120, 71-81.
- SHEN, X. Y., LAM, P. K. S., SHAW, G. R. AND WICKRAMASINGHE, W. 2002. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Toxicol* 40, 1499-1501.
- SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. 1979. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. *FEBS Letters*, 103, 287-290.
- SILVA FILHO, M.V.; OLIVEIRA, M.M. CUNHA, B.V.L.F.; ALVES, M.V. e CUNHA, B. J. 2000. Validação de espécies sentinelas para biomarcação com colinesterases de peixes. In: *Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI* (Espíndola, E. L. G.; Paschoal, C. M. R. B.; Rocha, O.; Bohrer, M. B. C. e Oliveira Neto, A. L.) São Carlos, Rima, 2000.
- SILVA, C. A., OBA, E. T., RAMSDORF, W. A., MAGALHÃES, V. F., CESTARI, M. M., RIBEIRO, C. A. O., ASSIS, H. C. S. 2011. First report about saxitoxins in freshwater fish *Hoplias malabaricus* through trophic exposure. *Toxicol* 57 (1) p. 141-147.

- SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175, 184-191.
- SINHA, R., PEARSON, L.A., DAVIS, T.W., BURFORD, M.A., ORR, P.T., NEILAN, B.A. 2012. Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones - Is climate change responsible? *Water Res.* 46(5): 1408-1419.
- STENESH, J. 1998. Biochemistry. New York: Plenum .In: Bioindicadores de contaminação em peixes de água doce, por exposição ao Chumbo (II): ensaios laboratoriais e estudos de caso preliminar no Rio Ribeira (SP/PR) (COSTA, J. R. M. A).
- STIEN, X, PERCIC, P, GNASSIA-BARELL, M, ROMÈO, M, LAFAURE, M. 1998. Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea. *Environmental Pollution*; 99: 339- 345.
- STRASER, A., FILIPIČ, M., ZEGURA, B. 2012. Genotoxic effects of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin in the HepG2 cell line. *Arch Toxicol.* 85, 1617-26.
- STURM, A.; DA SILVA, A., H.C. e HANSEN, P.D. 1999. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potencial use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Marine Environmental Research*, 47:389-398.
- SUNDIN, L.I.; REIS, S.G.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T. e MILSOM, W.K., 1999. Cardiovascular and respiratory reflexes: The tropical fish, Traíra (*Hoplias malabaricus*) O<sub>2</sub> Chemosponses. *Respiration physiology*, 116:181-199, 1999.
- TAY, V.K., WANG, A.S., LEOW, K.Y., ONG, M.M., WONG, K.P., BOELSTERLI, U.A., 2005. Mitochondrial permeability transition as a source of superoxide anion induced by the nitroaromatic drug nimesulide *in vitro*. *Free Radic Biol Med.* 39, 949-959.
- TEIXEIRA, M. G. L. C., COSTA, M. C. N., CARVALHO, V. L. P., PEREIRA, M. S., HAGE, E., 1993. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bulletin of PAHO.* 27(3): 244-253.
- TERAO, K., OHMORI, S., IGARASHI, K., OHTANI, I., WATANABE, M. F., HARADA, K. I., ITO, E. WATANABE, M. 1994. Electron-microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green-alga *umezakia natans*. *Toxicon* 32, 833-843.
- VAN DER OOST, R., BEYER, J. AND VERMEULEN, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* v. 13.
- VON SPERLING, E.V, FERREIRA, A.C.S., GOMES, L.N.L. 2008. Comparative eutrophication development in two Brazilian water supply reservoirs with respect to nutrient concentrations and bacteria growth. *Desalination* 226: 169-174.
- WELKER, M., BICKEL, H., FASTNER, J. 2002. HPLC-PDA detection of cylindrospermopsin - opportunities and limits. *Water Res.* 36, 4659-4663.

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

WILLIAMS, C.D. e JAESCHKE, H. 2011. Liver toxicology. In: Encyclopedia of Environmental Health (J. Nriagu, ed), Section: Toxicology (S. Ansari, ed), Elsevier, Oxford, in press.

WINSTON, G.W., DI GIULIO, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137-161.

YOUNG, F.M.; MICKLEM, J. AND HUMPAGE, A.R. 2008. Effects of blue-green algal toxin cylindrospermopsin (CYN) on human granulosa cells *in vitro*. *Reprod. Toxicol.* 25, 374-380.

ŽEGURA B, GAJSKI G, ŠTRASER, A, GARAJ-VRHOVAC, V. 2011. Cylindrospermopsin induced DNA damage and alteration in the expression of genes involved in the response to DNA damage, apoptosis and oxidative stress. *Toxicol.* 58: 471-479.

## Anexo I

### Base de cálculo para as análises bioquímicas

#### 1. Catalase (CAT):

**Atividade das CAT =  $[(\Delta\text{ABS}/\text{min}) \times \text{diluição}] / (\text{caminho óptico} \times \text{coeficiente de extinção molar} \times \text{concentração de proteínas})$**

Onde:

- Atividade das Catalases em milimoles por minuto por miligrama de proteínas
- $(\text{ABS}/\text{min}) = |\text{Absorbância final} - \text{Absorbância inicial}| \times 2$ , sendo que o intervalo final - inicial é de 30 s.
- Diluição (da amostra) = 20  $\mu\text{l}$  de amostra em 1000  $\mu\text{l}$  de volume final, ou seja, 50x.
- Coeficiente de extinção molar do  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\lambda = 240 \text{ nm}$ ) =  $40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- Caminho óptico (na cubeta) = 1 cm
- Concentração de proteínas totais em miligrama por mililitro.

#### 2. Glutathiona (GSH):

**[GSH] =  $(\text{ABS} \times \text{diluição}) / (\text{coeficiente angular da curva-padrão} \times \text{concentração de proteínas})$**

Onde:

[GSH] em micromoles de GSH por miligrama de proteínas.

- ABS = valor de absorvância registrado ( $\lambda = 415 \text{ nm}$ ) após descontar o valor do “branco”.
- Diluição na precipitação protéica = 250  $\mu\text{l}$  de amostra mais 50  $\mu\text{l}$  de TCA (300  $\mu\text{l}$  de volume final) = 1,2x. OBS: deve-se considerar essa diluição porque a alíquota para medir a concentração de proteínas foi separada antes da precipitação protéica.
- Coeficiente angular da curva-padrão (curva de 1º grau passando por  $x=0$ ;  $y=0$ ).
- [proteínas] = concentração de proteínas totais em miligrama por mililitro

#### 3. Peroxidação lipídica (LPO):

**[Hidroperóxidos] =  $(\text{ABS} \times \text{diluição}) / (\text{caminho óptico} \times \text{coeficiente de extinção molar} \times \text{concentração de proteínas})$**

Onde:

[Hidroperóxidos] em micromoles de hidroperóxidos por miligrama de proteínas.

- ABS = valor de absorvância registrado ( $\lambda = 570 \text{ nm}$ ) após descontar o valor do “branco”.
- Diluição (da amostra) = 10x.
- Coeficiente de extinção molar aproximado para  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hidroperóxido de cumeno ou hidróxido de butila ( $\lambda = 560 \text{ nm}$ ) =  $4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- Caminho óptico para 200  $\mu\text{l}$  = 0,6; para 300  $\mu\text{l}$  = 0,9.

- [proteínas] = concentração de proteínas totais em miligrama por mililitro.

#### 4. Atividade da GST:

**Atividade das GST = [(ABS/min) x diluição]/(caminho óptico x coeficiente de extinção molar x concentração de proteínas)**

**Onde:**

Atividade global das GST em micromoles por minuto por miligrama de proteínas.

- (ABS/min) = |Absorbância final – Abs. inicial|, sendo que o intervalo final - inicial é de 1 min.
- Diluição (da amostra) = 50 µl de amostra em 150 µl de volume final, ou seja, 3x.
- Caminho óptico (para 150 µl nos micropoços) = 0,45 cm.
- Coeficiente de extinção molar ( $\lambda = 340 \text{ nm}$ ) em pH = 6,5 para o CDNB =  $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- [proteínas] = concentração de proteínas totais em miligrama por mililitro.

#### 5. Atividade da Acetilcolinesterase (AChE):

**Atividade da ACHE = ( $\Delta$ ABS/min x diluição)/(caminho óptico x coef. de extinção molar x concentração de proteínas)**

**Onde:**

- $\Delta$ ABS = |Absorbância final – Abs. inicial|, sendo que o intervalo final - inicial é de 1 min.
- Diluição da amostra = 10x.
- Coeficiente de extinção molar aproximado para 2-nitrobenzoato-5-mercaptopicolina =  $13,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- Caminho óptico para 200 µl = 0,6; para 300 µl = 0,9.
- [proteínas] = concentração de proteínas totais em miligrama por mililitro.

#### 6. Atividade da Glutathioneredutase e peroxidase:

**Atividade da GR ou GPx = [( $\Delta$ Abs/min) x diluição]/(caminho óptico x coef. de extinção molar x concentração de proteínas)**

**Onde:**

Atividade da GR ou GPx em micromoles de NADPH oxidado (GR) ou reduzido (GPx) por minuto por miligrama de proteínas

- ( $\Delta$ Abs/min) = |Absorbância final – Absorbância inicial|/8, sendo que o intervalo final -inicial é de 8 min.
- Diluição (da amostra) = 50 µl de amostra em 300 µl de volume final, ou seja, 6x.
- Coeficiente de extinção molar do NADPH ( $\lambda = 340 \text{ nm}$ ) =  $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- Caminho óptico (para 300 µl nos micropoços) = 0,9 cm.

[proteínas] = concentração de proteínas em miligrama por mililitro

### 7. Atividade da superóxido dismutase (SOD):

**Atividade das SOD =  $(\Delta\text{ABS. Ref.}) / [(2 \times \text{ABS Amostra}) \times \text{diluição} \times \text{concentração de proteínas}]$**

#### **Onde:**

Atividade das SOD em unidades relativas de atividade por miligrama de proteínas

- $\Delta\text{Abs. Ref.} = |\text{Absorbância final} - \text{Abs. inicial}|$  da curva de referência de redução do NBT.
- $\Delta\text{Abs. Amostra} = |\text{Absorbância final} - \text{Abs. inicial}|$  da amostra, sendo que o intervalo de tempo é o mesmo utilizado para o  $\Delta\text{Abs. Ref.}$
- Diluição (da amostra) = 20  $\mu\text{l}$  de amostra em 200  $\mu\text{l}$  de volume final, ou seja, 10x.
- Concentração de proteínas em miligrama por mililitro

### 8. Atividade da G6PDH:

**Atividade da G6PDH =  $[(\Delta\text{ABS}/\text{min}) \times \text{diluição}] / (\text{caminho óptico} \times \text{coef. de extinção molar} \times \text{concentração de proteínas})$**

#### **Onde:**

Atividade da G6PDH em micromoles de NADPH oxidado por minuto por miligrama de proteínas

- $\Delta\text{Abs. min}^{-1} = |\text{Absorbância final} - \text{Absorbância inicial}|$ , sendo que o intervalo final - inicial é de 1 min.
- Diluição (da amostra) = 30  $\mu\text{l}$  de amostra em 200  $\mu\text{l}$  de volume final, ou seja, 20/3 x.
- Coeficiente de extinção molar do NADPH ( $\lambda = 340 \text{ nm}$ ) =  $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- Caminho óptico (para 200  $\mu\text{l}$  nos micropoços) = 0,6 cm.
- Concentração de proteínas em miligrama por mililitro.

### 9. Carbonilação de proteínas (PCO):

**Carbonilação de Proteínas =  $(\text{ABS}) / (\text{caminho óptico} \times \text{coef. de extinção molar} \times \text{concentração de proteínas})$**

#### **Onde:**

Carbonilação de proteínas em milimoles de carbonilas por miligrama de proteínas

- ABS. = valor de absorbância após descontar o valor do respectivo “branco”
- Coeficiente de absorção molar para hidrazonas ( $\lambda = 360 \text{ nm}$ ) =  $21 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- Caminho óptico (para 200  $\mu\text{l}$  nos micropoços) = 0,6 cm
- Concentração de proteínas em miligrama por mililitro, quantificadas após o ensaio, mas com valor corrigido para a concentração inicial de proteínas.

## Anexo II

### Dados brutos referentes à respostas dos biomarcadores avaliados.

1. Segue (abaixo) os dados brutos referentes às análises do capítulo I

	Atividade AChE - Cérebro					
	7 dias			14 dias		
	CTRL	CYNex	CYNp	CTRL	CYNex	CYNp
	1,07	1,08	1,24	0,62	1,03	0,5
	1,03	1,66	1,48	0,74	0,86	0,63
	0,97	0,87	0,94	0,71	0,92	0,82
	1,08	1,18	1,04	1,15	1,04	0,66
	0,7	1,09	0,93	0,84	0,95	0,58
	1,1	1,63	0,92	0,82	0,74	0,56
	1,05	1,37	0,8	0,72	0,76	0,62
	0,21	1,31	1	1,05	0,74	0,57
	0,89	1,31	0,8	0,7	0,75	0,57
		1,45				0,68
<b>Média</b>	0,9	1,295	1,016667	0,816667	0,865556	0,619
<b>DP</b>	0,28762	0,24892	0,218518	0,175	0,124309	0,088122

	Atividade AChE - Músculo					
	7 dias			14 dias		
	CTRL	CYNex	CYNp	CTRL	CYNex	CYNp
	0,589	0,503	0,174	0,426	0,528	0,601
	1,169	0,358	0,241	0,343	1,365	0,243
	0,319	0,187	0,142	0,62	0,549	0,173
	0,347	0,316	0,234	0,415	0,673	0,328
	0,472	0,339	0,199	0,804	0,456	0,419
	0,434	0,367	0,336	0,284	0,1	2,177
	0,48	0,336	0,164	0,129	0,47	2,243
	0,414	0,237	0,28	0,191	0,689	3,221
	0,367	0,337	0,209	0,544	0,251	0,552
		0,159				0,794
<b>Média</b>	0,510111	0,3139	0,219889	0,417333	0,564556	1,0751
<b>DP</b>	0,260134	0,09899	0,060818	0,213417	0,354329	1,067462

	Concentração CYN - Cérebro					
	7 dias			14 dias		
	CTRL	CYNex	CYNp	CTRL	CYNex	CYNp
	NSA	0,243	0,29	NSA	0,539	0,215
	NSA	0,11	0,249	NSA	0,539	0,229
	NSA	0,403	0,236	NSA	0,229	0,112
	NSA	0,292	0,066	NSA	0,166	0,035
	NSA	0,292	0,039	NSA	0,203	0,134
	NSA	0,14	0,102	NSA	0,356	0,119
	NSA	0,235	0,099	NSA	0,313	0,011
	NSA	0,203	0,139	NSA	0,131	0,082

	NSA	0,39	0,295	NSA	0,163	0,068
	NSA	0,281		NSA		0,082
<b>Média</b>	NSA	0,2589	0,168333	NSA	0,293222	0,1087
<b>DP</b>	NSA	0,094803	0,099499	NSA	0,156872	0,070386
NSA - Não se aplica						

<b>Concentração de CYN - Músculo</b>						
	7 dias			14 dias		
	CTRL	CYNex	CYNp	CTRL	CYNex	CYNp
	NSA	0,075	0,417	NSA	0,029	0,132
	NSA	0,274	0,274	NSA	0,171	0,094
	NSA	0,337	0,634	NSA	0,148	0,423
	NSA	1,284	0,327	NSA	0,311	0,086
	NSA	1,099	0,96	NSA	0,203	0,629
	NSA	1,074	0,548	NSA	0,144	0,136
	NSA	0,813	0,219	NSA	0,17	0,076
	NSA	0,918	0,314	NSA	0,424	0,047
	NSA	1,078	0,17	NSA	0,24	0,253
	NSA	0,421		NSA		
<b>Média</b>	NSA	0,7373	0,429222	NSA	0,204444	0,208444
<b>DP</b>	NSA	0,423098	0,24928	NSA	0,112222	0,19611
NSA - Não se aplica						

<b>Conteúdo de GSH - Cérebro</b>						
	7 dias			14 dias		
	CTRL	CYNex	CYNp	CTRL	CYNex	CYNp
	1,68	1,1733	3,34	0,98	1,5333	2,3067
	0,12	2,2867	0,9133	3,6133	3,0267	1,9667
	2,88	2,0667	2,64	2,3933	3,1267	2,82
	1,9	1,2733	3,6533	6,2	10,5533	1,76
	0,8533	0,9933	5,2533	1,64	3,7333	3,46
	1,3333	3,74	0,4	1,7733	2,1133	3,8733
	3,2867	1,1133	4,7267	1,2867	1,66	3,16
	4,22	2,6133	2,4733	4,9267	5,8933	0,94
			7,08	3,3	2,38	2,6333
						6,3733
<b>Média</b>	2,034163	1,907488	3,386656	2,901478	3,779989	2,92933
<b>DP</b>	1,349882	0,958654	2,104265	1,770213	2,864001	1,484195

<b>Atividade da GST- Cérebro</b>						
	7 dias			14 dias		
	CTRL	CYNex	CYNp	CTRL	CYNex	CYNp
	0,01554	0,01392	0,01839	0,0124	0,02502	0,01798
	0,01506	0,01628	0,02328	0,01774	0,02186	0,02749
	0,01913	0,00963	0,02108	0,01274	0,02342	0,03416
	0,0133	0,01651	0,01752	0,01777	0,0312	0,02288

	0,01363	0,01156	0,01565	0,01561	0,01962	0,02469
	0,01977	0,01364	0,01814	0,01538	0,01602	0,0186
	0,0173	0,01686	0,02105	0,0247	0,01731	0,02076
	0,02125	0,01765	0,01865	0,02027	0,0261	0,02162
	0,01562	0,01562	0,01827	0,01902	0,02356	0,02421
		0,0114				0,0206
<b>Média</b>	0,016873	0,014506	0,019114	0,017292	0,022679	0,023299
<b>DP</b>	0,002797	0,002832	0,002289	0,003845	0,004668	0,004777

<b>LPO - Cérebro</b>						
<b>7 dias</b>			<b>14 dias</b>			
<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>	
0,000691	0,00203	0,00264	0,00317	0,004	0,00777	
0,00118	0,00212	0,00204	0,000772	0,00482	0,00364	
0,00133	0,00296	0,00291	0,00141	0,00231	0,00301	
0,00232	0,00322	0,00248	0,00116	0,00194	0,00397	
0,00122	0,0037	0,00404	0,000689	0,00432	0,00387	
0,00119	0,00205	0,00201	0,0011	0,005	0,00309	
0,00245	0,00235	0,00207	0,00162	0,00328	0,00241	
0,000976	0,00272	0,0024	0,000795	0,00595	0,00393	
0,00107	0,00244	0,00173	0,00157	0,00444	0,0033	
	0,00336				0,00238	
<b>Média</b>	0,00142	0,002644	0,00248	0,001365	0,004007	0,003737
<b>DP</b>	0,000599	0,000615	0,000689	0,000759	0,001294	0,001532

2. Segue (abaixo) os dados brutos referentes às análises do capítulo II

<b>Concentração de CYN - Fígado</b>						
<b>7 dias</b>			<b>14 dias</b>			
<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>	
NSA	4,52	9,39	NSA	1,392	5,665	
NSA	11,463	3,543	NSA	2,171	5,434	
NSA	3,933	8,725	NSA	9,784	14,211	
NSA	3,78	11,238	NSA	3,058	3,34	
NSA	6,701	7,558	NSA	4,861	8,89	
NSA	6,811	7,161	NSA	9,182	11,234	
NSA	8,079	7,149	NSA	6,688	7,845	
NSA	0,38	0,889	NSA	9,035	11,151	
NSA	11,183	15,441	NSA	4,334	17,335	
NSA	11,056		NSA		19,998	
<b>Média</b>	NSA	6,7906	7,899333	NSA	5,611667	10,5103
<b>DP</b>	NSA	3,718834	4,187396	NSA	3,189715	5,39146
NSA - Não se aplica						

<b>Atividade da CAT - Fígado</b>						
	<b>7 dias</b>			<b>14 dias</b>		
	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>
	0,882996	1,318144	1,378314	2,117485	2,050206	1,629967
	1,506294	1,655441	0,83384	1,594428	1,027899	1,101925
	1,798282	0,966435	1,097219	1,654991	1,466795	1,538282
	1,282904	0,948577	2,03758	1,647533	1,608908	1,858416
	1,25119	1,012724	1,234362	1,69819	1,18965	1,664555
	1,150178	0,91482	1,127137	1,417406	1,698973	1,575356
	1,569958	1,143885	1,43821	1,669865	2,359717	1,595171
	1,70122	0,534459	1,103731	1,791802	1,96361	1,292886
	1,392638	1,303353	0,974231	1,706813	1,61826	1,573093
		1,458164				1,581008
<b>Média</b>	1,392851	1,1256	1,24718	1,699835	1,664891	1,541066
<b>DP</b>	0,286073	0,320351	0,350252	0,186903	0,418003	0,206837

<b>Atividade da G6PDH - Fígado</b>						
	<b>7 dias</b>			<b>14 dias</b>		
	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>
	0,092756	0,926815	0,597681	1,480361	7,797517	6,12566
	1,401817	2,523871	0,971697	0,500435	5,332741	0,16756
	1,989025	1,4467	2,606154	2,643555	5,478609	2,688438
	2,52013	2,138633	3,36167	1,080162	4,543566	4,315414
	0,369529	2,29946	0,751027	2,93903	0,339608	3,713246
	0,717365	1,925443	5,482349	3,1597	2,96895	3,709505
	0,608901	0,751027	4,861479	1,87682	9,496863	4,255571
	1,798276	0,122634	0,047874	1,682331	4,154587	0,287245
	0,773468	1,46914	0,317168	1,03154	6,16306	0,896895
		0,616381				4,22565
<b>Média</b>	1,141252	1,42201	2,110789	1,821548	5,141722	3,038518
<b>DP</b>	0,82256	0,801852	2,05099	0,920126	2,653467	1,985444

<b>Atividade da GPx - Fígado</b>						
	<b>7 dias</b>			<b>14 dias</b>		
	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>
	0,0386	0,1305	0,1085	0,0543	0,0074	0,0632
	0,0351	0,0896	0,1576	0,0691	0,0055	0,0074
	0,0353	0,1161	0,142	0,015	0,0129	0,0762
	0,0626	0,1133	0,0883	0,0647	0,0583	0,0476
	0,1375	0,0954	0,1008	0,0576	0,1631	0,0362
	0,128	0,0937	0,0409	0,0388	0,0046	0,0813
	0,1265	0,1176	0,023	0,0036	0,0056	0,0631
	0,124	0,096	0,0207	0,0196	0,0817	0,0385
	0,0464	0,1399	0,0935	0,0556	0,0527	0,0724
		0,0973				0,0687
<b>Média</b>	0,081556	0,10894	0,086144	0,042033	0,043533	0,05546
<b>DP</b>	0,045889	0,017196	0,049138	0,023835	0,053268	0,022873

<b>Atividade da GR - Fígado</b>						
---------------------------------	--	--	--	--	--	--

	7 dias			14 dias		
	CTRL	CYNex	CYNp	CTRL	CYNex	CYNp
	0,0239	0,0073	0,0076	0,0138	0,0108	0,0058
	0,0061	0,0106	0,0081	0,0048	0,0046	0,0012
	0,0146	0,0063	0,0107	0,0164	0,0097	0,0082
	0,0066	0,0141	0,0067	0,0065	0,0045	0,0068
	0,016	0,0092	0,0016	0,0097	0,0091	0,0037
	0,0064	0,0068	0,0216	0,0071	0,0119	0,0083
	0,017	0,0073	0,0057	0,0106	0,0106	0,009
	0,0069	0,0049	0,0159	0,0077	0,0057	0,0044
	0,0111	0,0083	0,0054	0,0119	0,0087	0,0109
		0,0114				0,0088
<b>Média</b>	0,012067	0,00862	0,009256	0,009833	0,0084	0,00671
<b>DP</b>	0,00624	0,002751	0,006076	0,003745	0,002785	0,002935

Conteúdo de GSH - Fígado						
	7 dias			14 dias		
	CTRL	CYNex	CYNp	CTRL	CYNex	CYNp
	3,85288	0,52848	0,19802	0,22219	5,3766	0,91321
	0,48106	0,84495	0,30765	0,19693	1,27881	1,22225
	0,41988	0,34978	0,38551	0,27461	0,74716	0,37208
	1,00679	0,50661	0,45477	0,23675	1,07487	0,29044
	0,22525	0,78468	0,4875	0,35601	9,43026	0,3319
	0,30021	1,40074	0,8903	0,40934	1,4048	0,21683
	0,3873	0,46865	1,52893	0,22364	1,03692	0,35505
	0,28904	8,34344	4,01691	0,35693	0,67112	1,9164
	0,17494	0,47412	0,20486	0,30368	0,45832	0,3904
		0,63032				0,46039
<b>Média</b>	0,793039	1,433177	0,941606	0,286676	2,38654	0,646895
<b>DP</b>	1,173182	2,446421	1,227556	0,07408	3,033883	0,546312

Atividade da GST - Fígado						
	7 dias			14 dias		
	CTRL	CYNex	CYNp	CTRL	CYNex	CYNp
	0,024449	0,011645	0,015484	0,015262	0,023497	0,028381
	0,017806	0,014087	0,017403	0,010921	0,015898	0,019941
	0,021084	0,015116	0,016744	0,018058	0,028113	0,029806
	0,022831	0,016715	0,014634	0,019321	0,02346	0,031807
	0,024241	0,015375	0,017206	0,021764	0,022102	0,043675
	0,013548	0,015934	0,014745	0,022564	0,023898	0,026904
	0,017433	0,0187	0,013282	0,02041	0,021879	0,031485
	0,021142	0,017095	0,018933	0,02	0,027234	0,020887
	0,015614	0,018981	0,013802	0,016039	0,018549	0,031961
		0,010116				0,029974
<b>Média</b>	0,019794	0,015376	0,015804	0,01826	0,022737	0,029482

<b>DP</b>	0,003875	0,002837	0,001876	0,003664	0,003825	0,006584
-----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------

<b>LPO - Fígado</b>						
	<b>7 dias</b>			<b>14 dias</b>		
	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>
	0,002743	0,003973	0,00105	0,000986	0,002356	0,00424
	0,00393	0,005642	0,003126	0,001101	0,000292	0,004562
	0,004059	0,003797	0,005037	0,002025	0,003943	0,004752
	0,002851	0,00339	0,002589	0,000854	0,003909	0,004949
	0,002748	0,003449	0,002025	0,002344	0,002447	0,005556
	0,002223	0,002984	0,003341	0,002068	0,004012	0,00255
	0,001484	0,005216	0,002326	0,002236	0,004162	0,00427
	0,001693	0,00074	0,000955	0,002017	0,003895	0,00415
	0,001157	0,006871	0,000615	0,00215	0,004158	0,004334
		0,002872				0,005001
<b>Média</b>	0,002543	0,003893	0,00234	0,001753	0,003242	0,004436
<b>DP</b>	0,001017	0,001698	0,001397	0,000592	0,001311	0,000793

<b>PCO - Fígado</b>						
	<b>7 dias</b>			<b>14 dias</b>		
	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>
	0,011063	0,008139	0,006194	0,004469	0,052142	0,08331
	0,002722	0,00958	0,006651	0,006076	0,039626	0,013557
	0,002314	0,003263	0,015226	0,066538	0,113387	0,01281
	0,001854	0,006735	0,042201	0,000836	0,115038	0,03687
	0,013479	0,011587	0,018802	0,054741	0,062527	0,017672
	0,026503	0,005322	0,00372	0,035324	0,155709	0,0142
	0,014992	0,017137	0,005707	0,114243	0,118264	0,02423
	0,004989	0,006131	0,010292	0,036527	0,147401	0,005302
	0,00542	0,000813	0,010142	0,026646	0,138775	0,003727
		0,010148				0,01317
<b>Média</b>	0,009259	0,007885	0,013215	0,038378	0,104763	0,022485
<b>DP</b>	0,00814	0,004591	0,011897	0,036348	0,042907	0,023354

<b>Atividade da SOD - Fígado</b>						
	<b>7 dias</b>			<b>14 dias</b>		
	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>
	2,647098	11,43797	20,93833	1,172551	32,52426	18,12524
	7,432032	13,90328	34,90327	4,080568	19,20287	12,23591
	9,54291	18,707	5,768948	15,58295	18,66286	15,53556
	3,942585	9,831423	16,69355	6,054368	18,87029	13,62111
	10,44486	12,26507	11,44971	3,824081	11,40547	13,39437
	9,301535	14,06023	16,22947	14,94625	30,37218	11,3455
	4,658388	20,09739	15,87236	23,11425	28,74281	10,96429
	7,938944	8,445436	9,284015	8,040999	10,26445	3,372986
	15,47369	13,75208	34,81388	7,128547	18,42071	13,04156
		18,62363				6,80211

<b>Média</b>	7,931338	14,11235	18,43928	9,327174	20,94066	11,84386
<b>DP</b>	3,91271	3,922363	10,32694	7,091372	7,966752	4,195662

3. Segue (abaixo) os dados brutos referentes às análises do capítulo III

<b>Ensaio de Viabilidade celular</b>								
	<b>Controle</b>	<b>0,1</b>	<b>1,0</b>	<b>10</b>	<b>100</b>	<b>0,1Ex</b>	<b>1,0Ex</b>	<b>10Ex</b>
	99,04777	76,27776	70,15146	66,11447	67,28307	66,04365	68,09756	67,17684
	85,66197	72,41784	70,22228	74,68421	83,57266	73,44479	67,63719	71,81583
	95,89609	78,40248	80,49181	86,68893	91,22169	77,62342	78,4379	72,20536
	88,45953	86,86599	80,59804	85,41409	85,98068	82,829	81,41252	75,00292
	96,10856	88,03459	84,35172	85,59115	88,99072	79,50027	76,87976	79,67732
	101,4204	87,14928	85,23703	83,25395	84,95373	81,83746	73,37396	80,66886
	109,9193	84,28091	83,74972	81,20005	87,64506	82,15617	74,01138	75,56952
	89,59273	62,32537	74,71963	58,78416	68,69956	64,09598	73,30314	73,30314
	98,44576	89,2386	83,21854	86,05151	89,94685	83,57266	73,30314	72,94902
	87,11388	81,44793	80,38557	66,57483	80,38557	78,96908	79,3232	83,57266
	98,79988	88,88448	81,80206	93,48806	83,21854	79,67732	81,09381	76,13611
	96,32103	72,59489	86,05151	73,30314	104,4658	84,28091	83,21854	88,88448
	104,1117	96,67516	93,13394	86,40563	94,90455	92,77982	87,46799	75,42786
	116,506	95,96691	89,59273	86,75975	97,3834	94,90455	91,00921	86,40563
	91,71745	92,07157	110,84	93,13394	81,80206	97,73752	42,14045	88,88448
	114,7353	83,21854	88,88448	83,57266	85,34327	82,86442	108,007	100,2164
	104,8199	82,5103	91,71745	65,86658	83,21854	95,96691		
	105,1741	95,25867	92,77982	98,09164		102,3411		
	116,1518	87,82212	101,2787	98,79988				
<b>Média</b>	100,0002	84,28649	85,74771	81,77782	85,82446	83,36806	77,4198	79,24353
<b>DP</b>	9,573647	8,909839	9,866211	11,36414	9,101832	10,29861	13,60967	8,481081

<b>Ensaio de Viabilidade celular</b>								
	<b>Controle</b>	<b>0,1</b>	<b>1,0</b>	<b>10</b>	<b>100</b>	<b>0,1Ex</b>	<b>1,0Ex</b>	<b>10Ex</b>
	0,0213	0,017	0,0177	0,0064	0,0027	0,0242	0,0208	0,0178
	0,0227	0,0199	0,0125	0,0131	0,0129	0,0185	0,0031	0,0219
	0,0227	0,0345	0,0167	0,0152	0,0184	0,0052	0,0057	0,0148
	0,0366	0,0318	0,0224	0,0021	0,0162	0,022	0,007	0,0097
	0,0139	0,0303	0,0205	0,0162	0,0288	0,0116	0,0041	0,0024
	0,0274	0,0094	0,0104	0,0103	0,0337	0,0177	0,0017	0,0202
	0,0178	0,0231	0,0064	0,018	0,0208	0,0068	0,0087	0,0105
	0,0311	0,0123	0,0109	0,0127	0,0155	0,013	0,0095	0,0185
	0,0258	0,0263	0,0101	0,0122	0,0099	0,0091	0,0106	0,0128
	0,016	0,008	0,0087	0,0245	0,0448	0,0082	0,0066	0,0187
	0,0178	0,0114	0,0269	0,0038	0,026	0,0161	0,0042	0,015
	0,0365	0,0342	0,0077	0,0155	0,0716	0,0107	0,0083	0,02
	0,0483	0,0413	0,0113	0,0493	0,0356	0,0406	0,0404	0,0062
	0,0622	0,0189	0,0129	0,029	0,0567	0,0319	0,0219	0,0269
	0,0224	0,0363	0,036	0,0467	0,0238	0,0305	0,0346	0,0545

	0,0356	0,0192	0,0321	0,037	0,0357	0,0105	0,0036	0,0661
	0,0218	0,0171	0,0221	0,0248	0,0364	0,0453	0,0229	0,0145
	0,013	0,0268	0,0075	0,0313	0,0434	0,0303	0,0202	0,0294
	0,0086	0,0153	0,0463	0,0257	0,0353	0,0102	0,0201	0,0477
	0,0107	0,0085	0,0295	0,0299	0,0341	0,0317	0,0374	0,027
	0,0348	0,0139	0,0126	0,0361	0,034	0,0124	0,0266	0,0204
	0,0305	0,0614	0,0487	0,0551	0,0376	0,0168	0,0107	0,0335
	0,0015	0,0243	0,0414	0,0268	0,0385	0,0182	0,0271	0,0253
	0,0721	0,0299	0,0283	0,0192	0,0613	0,0375	0,0165	0,0135
	0,0225	0,024	0,0285	0,0313	0,0124	0,0516	0,039	0,0398
	0,0186	0,0367	0,0238	0,0303	0,0395	0,0035	0,0635	0,0256
	0,03	0,0304	0,0253	0,0628	0,0069	0,0498	0,0363	0,0125
	0,0278	0,0204	0,0458	0,009	0,0322	0,0471	0,0558	0,0114
	0,0055	0,0166	0,012	0,0077	0,0234	0,0244	0,0254	0,0228
	0,0096	0,0085	0,0339	0,0209	0,0141	0,0243	0,0385	0,0064
	0,0034	0,0156	0,0086	0,0282	0,0293	0,0084	0,0189	0,0264
	0,0099	0,0136	0,0144	0,0241	0,0018	0,0383	0,0313	0,0179
	0,0108	0,0202		0,0206	0,0421	0,0421	0,0092	0,0041
		0,0095		0,0295		0,0011	0,0051	0,0015
				0,0208		0,0388	0,0261	0,0027
						0,0339		
<b>Média</b>	0,023915	0,022547	0,021622	0,024174	0,029558	0,023397	0,020611	0,020526
<b>DP</b>	0,01558	0,011547	0,012513	0,014111	0,01622	0,014543	0,015539	0,01439

	SOD							
	Controle	0,1	1,0	10	100	0,1Ex	1,0Ex	10Ex
	23,42475		28,33311	27,46077	18,16475	22,75272	20,34843	
	24,30828	21,75928	30,50756	30,19988	23,37703	23,70628	20,39199	18,94636
	30,61478	24,46943	34,10655	30,67516	24,70283	25,15747	22,93097	19,00229
	32,69112	35,07858	35,21378	31,91049	27,21181	25,68764	24,25766	20,24042
	32,78847	36,44312	35,60281	32,04166	28,35318	26,19941	24,39807	20,38023
	33,5537	36,45123	36,10988	33,05943	29,7862	26,68137	24,89459	21,70341
	34,13535	37,12455	38,49445	33,83006	31,47717	27,33557	25,49892	22,83876
	36,14255	37,28192	39,72881	33,87532	31,58729	29,12173	28,7833	23,52565
	36,40217	40,19001	40,81561	34,1004	34,55033	31,75324	30,67949	23,52831
	37,7453	40,85178	43,28029	35,86747	36,91357	34,30624	32,21621	23,59697
	38,18597	40,9138	43,37788	36,65377	39,24298	37,46574	32,71719	23,71733
	39,95854	42,0171	44,36444	37,0828	41,53489	38,49347	35,87227	24,5793
	40,19121	42,02373	44,72759	37,76524	42,28197	38,73695	36,29156	27,1588
	40,32458	42,25404	44,76189	38,45113	42,63186	39,5725	36,39776	28,26542
	40,76516	42,99332	44,9146	40,66028	43,38258	40,17157	37,15448	28,58953
	41,42353	43,47144	46,50441	41,5783	45,00282	41,80786	38,04643	29,27676
	41,63068	44,22329	47,3447	42,31664	46,19774	42,03892	39,13802	29,33173
	43,20721	45,29014	48,25079	42,66339	46,45695	42,37983	39,17692	30,78958
	43,98143	45,76695	49,21484	42,68478	46,55439	43,27977	40,7808	33,98254
	44,24885	45,77662	49,48754	42,88109	46,79986	43,80536	41,33705	35,0676
	44,9155	45,8918	49,89151	43,15707	46,80592	44,54503	42,08177	35,93576

	45,75726	46,33583	50,26472	43,85514	47,5582	44,90222	42,12459	36,28619
	46,66669	48,16569	50,59071	44,07016	49,05429	45,09943	42,64091	37,02122
	47,04586	48,35048	51,57195	44,89511	49,16823	45,78238	42,77967	38,29139
	47,3988	52,01982	54,36995	45,2956	50,31588	46,4536	42,8629	38,31081
	49,63151	52,12926	56,01869	45,33424	50,47213	46,49507	43,54809	39,6775
	49,70984	54,59014	56,39905	45,6025	51,50804	47,77195	43,82817	39,83613
	51,99488	55,67656	57,2356	46,97946	52,6579	48,84063	48,10996	40,26455
	52,15859	57,09293	57,92202	47,09618	54,36593	48,86272	48,9129	40,29111
	53,90043		60,22722	47,10114	56,40248	49,2688	49,05615	41,27105
	54,18328		61,7262	48,25248	58,79588	50,60641	50,02102	42,80269
	55,7552		65,73598	48,27586	59,47332	54,12017	55,43933	45,71578
	60,79595			49,14661	62,73367	57,09784	57,31981	46,47757
				53,10208	65,2428	57,10116	57,62139	
				62,45177	68,51886			
				62,7789	72,86833			
<b>Média</b>	42,29204	43,0226	46,78422	41,75423	45,05978	40,21768	38,16643	31,45946
<b>DP</b>	8,772909	8,131305	9,23046	8,1231	12,99038	9,800977	10,29667	8,435168

	GPx							
	Controle	0,1	1,0	10	100	0,1Ex	1,0Ex	10Ex
	0,517026	0,225004	0,133404	0,14035	0,09983	0,038141	0,08758	0,072672
	0,157824	0,16889	0,071618	0,120737	0,025693	0,027918	0,086983	0,127319
	0,188219	0,103727	0,106383	0,135608	0,010483	0,015306	0,065748	0,110657
	0,120012	0,086523	0,09388	0,072457	0,006732	0,010073	0,054497	0,11465
	0,106352	0,083545	0,118398	0,044137	0,392551	0,07208	0,028401	0,057647
	0,078629	0,113291	0,018544	0,032511	0,296178	0,020806	0,006484	0,056173
	0,204855	0,122005	0,18844	0,047295	0,222201	0,262877	0,268653	0,063998
	0,109858	0,022935	0,020604	0,03038	0,714165	0,266629	0,441481	0,020832
	0,203937	0,136834	0,046985	0,018227	0,253016	0,397316	0,340429	0,329442
	0,326905	0,305858	0,233603	0,268162	0,197445	0,21341	0,297414	0,343147
	0,320778	0,40104	0,208472	0,277687	0,285746	0,237848	0,63023	0,325297
	0,376467	0,645201	0,241069	0,543293	0,322714	0,11603	0,260589	0,385762
	0,334666	0,67244	0,616871	0,290919	0,291496	0,196759	0,269912	0,389774
	0,829002	0,557737	0,302103	0,437535	0,289665	0,215263	0,261548	0,251794
	0,665673	0,678718	0,697028	0,316265	0,214288	0,374083	0,318613	0,310934
	0,19051	0,630158	0,426453	0,387065	0,241967	0,752574	0,296639	0,35355
	0,378507	0,410792	0,530252	0,604123	0,250027	0,622615	0,268756	0,329277
	0,284445	0,725483	0,649288	0,29304	0,246673	0,220219	0,365764	0,363945
	0,254284	0,241817	0,655425	0,715654	0,187343	0,262298	0,271958	0,427059
	0,378257	0,335794	0,618083	0,531274	0,22277	0,211787	0,272981	0,375592
	0,342748	0,323994	0,328636	0,327329	0,149522	0,203877	0,221743	0,2591
	0,199983	0,127918	0,209753	0,173264	0,337863	0,208518	0,200329	0,311463
	0,321924	0,170633	0,184357	0,19332		0,166922	0,181172	0,358556
	0,265841	0,156365	0,150205	0,188723		0,194551	0,193707	0,18457
	0,269956	0,2063	0,210475	0,168495				0,253944
	0,225726	0,175538	0,139454	0,217939				0,173103
	0,366126	0,319739	0,338981	0,369086				

<b>Média</b>	0,296982	0,301788	0,279213	0,257218	0,239017	0,221163	0,23715	0,244241
<b>DP</b>	0,167049	0,214904	0,213743	0,187666	0,148308	0,179351	0,140657	0,128119

GR								
	Controle	0,1	1,0	10	100	0,1Ex	1,0Ex	10Ex
	0,004337	0,002453	0,00337	0,001892	0,001456	0,000399	0,002286	0,001089
	0,005247	0,003659	0,0037	0,002217	0,001605	0,000919	0,002479	0,001567
	0,007228	0,003746	0,004183	0,002634	0,001825	0,001153	0,002867	0,00214
	0,007402	0,00418	0,004319	0,002982	0,002167	0,001257	0,002965	0,002886
	0,007515	0,004559	0,004442	0,00315	0,002967	0,001366	0,003246	0,003543
	0,007651	0,005013	0,005144	0,003295	0,003247	0,00153	0,003466	0,003712
	0,007946	0,005022	0,005205	0,003544	0,00351	0,001633	0,003729	0,003727
	0,007956	0,005114	0,005571	0,004818	0,003559	0,001958	0,003795	0,003785
	0,008079	0,005424	0,00564	0,005002	0,003744	0,002158	0,00414	0,004304
	0,00819	0,006448	0,005723	0,005069	0,003826	0,002193	0,004397	0,004547
	0,008337	0,006654	0,005803	0,005371	0,00385	0,00232	0,004668	0,004895
	0,008481	0,00673	0,005956	0,005431	0,004084	0,002525	0,004932	0,00495
	0,008768	0,006785	0,006369	0,006274	0,004233	0,002799	0,004981	0,004969
	0,009346	0,006927	0,006604	0,006529	0,004369	0,002945	0,005003	0,00541
	0,009367	0,006929	0,006699	0,006694	0,00467	0,003085	0,005127	0,00555
	0,00942	0,007695	0,006813	0,006733	0,005459	0,003298	0,005152	0,005652
	0,009702	0,007903	0,00695	0,006743	0,005497	0,00341	0,005207	0,005824
	0,009705	0,008275	0,007514	0,006756	0,005748	0,003622	0,005292	0,005967
	0,009774	0,008411	0,008092	0,006996	0,006196	0,003945	0,005885	0,006124
	0,00981	0,009064	0,008387	0,008465	0,006439	0,003989	0,005898	0,006594
	0,010719	0,009921	0,00866	0,008842	0,00687	0,005278	0,006312	0,006713
	0,012135	0,011701	0,00968	0,010113	0,007131	0,005504	0,00654	0,007481
	0,01268	0,011705	0,01028	0,010537	0,007198	0,006243	0,006678	0,007814
	0,012706	0,013224	0,011322	0,011043	0,007426	0,006988	0,006705	0,007868
	0,019568	0,015674	0,011664	0,012186	0,007567	0,007252	0,006739	0,008986
	0,020583	0,016366	0,011798	0,012854	0,008071	0,00738	0,007072	
	0,021204	0,018284	0,013146	0,013477		0,007551	0,007601	
		0,021168	0,015742	0,014011				
<b>Média</b>	0,010143	0,008537	0,007456	0,006916	0,00472	0,003433	0,004932	0,005044
<b>DP</b>	0,004171	0,0047	0,003085	0,003546	0,001971	0,002155	0,001489	0,001986

GST								
	Controle	0,1	1,0	10	100	0,1Ex	1,0Ex	10Ex
	0,081156	0,022753	0,045033	0,046978	0,065496	0,073914	0,089897	0,112272
	0,084468	0,035783	0,065951	0,059605	0,067208	0,075398	0,094232	0,115647
	0,084579	0,063734	0,066452	0,05992	0,069289	0,081242	0,094519	0,119174
	0,089963	0,067273	0,066686	0,069234	0,074405	0,084065	0,096659	0,121118
	0,093276	0,067632	0,069627	0,070302	0,074725	0,085684	0,09888	0,121387
	0,098828	0,072072	0,075562	0,073731	0,074953	0,087786	0,100985	0,121771
	0,104176	0,07512	0,075634	0,073843	0,075898	0,088483	0,101169	0,123062
	0,111045	0,076817	0,081715	0,075739	0,082321	0,090079	0,101494	0,123839

	0,115147	0,089147	0,082184	0,078771	0,088071	0,090252	0,101973	0,127502
	0,12041	0,093805	0,083391	0,079759	0,088978	0,092837	0,102207	0,128677
	0,122748	0,100076	0,083557	0,079858	0,091172	0,093913	0,105424	0,130328
	0,124315	0,10656	0,085058	0,080301	0,091183	0,094697	0,106383	0,131257
	0,125543	0,107692	0,092255	0,084523	0,094321	0,096165	0,109293	0,138201
	0,126982	0,109596	0,096858	0,087085	0,095024	0,098023	0,112916	0,138228
	0,127795	0,112212	0,103157	0,088547	0,096269	0,101773	0,115244	0,14881
	0,129875	0,114599	0,105739	0,092127	0,09787	0,10292	0,115917	0,171348
	0,138715	0,117276	0,106328	0,096815	0,100044	0,107595	0,127758	0,181684
	0,139959	0,117505	0,123895	0,101299	0,125814	0,107755	0,129002	0,223358
	0,141338	0,129533	0,128864	0,103171	0,145368	0,108527	0,133533	0,233147
	0,146201	0,129771	0,15623	0,111341	0,14603	0,111669	0,137701	0,255907
	0,153667	0,139401	0,184204	0,120518	0,155708	0,122096	0,139241	0,258737
	0,163832	0,143324	0,184423	0,120952	0,156333	0,128797	0,139272	0,263662
	0,20804	0,178587	0,191787	0,125305	0,163202	0,136917	0,143775	0,29986
	0,211877	0,180089	0,199215	0,182615	0,164818	0,149181	0,145875	0,312364
	0,224474	0,190939	0,199473	0,189322	0,170569	0,153574	0,184834	0,35688
	0,232016	0,201882	0,208258	0,190293	0,182631	0,207869	0,194948	0,374247
	0,239365	0,218263	0,216016	0,191431	0,189027	0,210971	0,208958	0,38908
	0,241794	0,221454	0,21627	0,205805	0,195026	0,227663	0,233002	0,402133
	0,25546	0,233279	0,223916	0,213442		0,253031	0,24493	
	0,284686	0,23831	0,236641	0,214935		0,265431		
			0,247495	0,226643		0,274546		
<b>Média</b>	0,150724	0,125149	0,132318	0,115942	0,115062	0,129124	0,13138	0,200846
<b>DP</b>	0,057996	0,058682	0,063021	0,054923	0,042271	0,059504	0,042461	0,096101

<b>GSH</b>						
	<b>Controle</b>	<b>0,1</b>	<b>1,0</b>	<b>10</b>	<b>100</b>	<b>10Ex</b>
	10,26738	29,75913	26,32459	53,07838	47,18559	29,25085
	9,578172	32,49884	19,42689	27,40738	39,84087	30,74503
	18,4419	35,03819	13,07516	9,888144	46,99371	21,26682
	13,23056	25,83991	27,71681	21,87012	53,38782	28,39122
	16,40071	56,23384	32,16784	22,83335	41,05572	28,66293
	18,11522	12,72917	16,04636	49,92693	23,81012	32,90105
	24,78905	33,00597	12,90867	48,39133	23,76565	44,05343
	38,00486	51,41793	19,23572	37,57454	40,03885	44,86947
	41,8527	37,56193	37,26088	33,11249	71,68725	36,15525
	53,31587	24,20583	20,47333	30,67408	49,48124	30,62461
	44,90118	41,8076	37,03302	26,83279	54,08577	30,5008
		38,83662	18,52487	35,80962	48,97669	34,63049
<b>Média</b>	26,26342	34,91125	23,34951	33,1166	45,02577	32,671
<b>DP</b>	15,4636	11,76307	8,624601	12,76123	13,06087	6,627324

LPO						
	Controle	0,1	1,0	10	100	10Ex
	0,02	0,011	0,015	0,013	0,011	0,011
	0,013	0,012	0,012	0,012	0,019	0,015
	0,012	0,013	0,004	0,011	0,018	0,014
	0,012	0,014	0,012	0,006	0,011	0,03
	0,012	0,01	0,004	0,01	0,025	0,011
	0,003	0,008	0,006	0,01	0,011	0,014
	0,01	0,007	0,011	0,016	0,013	0,033
	0,01	0,027	0,011	0,019	0,004	0,005
	0,003	0,017	0,009	0,014	0,017	0,028
	0,007	0,018	0,011	0,005	0,025	0,025
	0,011	0,011	0,002	0,016	0,014	0,017
	0,01	0,004	0,009	0,011	0,004	0,008
<b>Média</b>	0,01025	0,012667	0,008833	0,011917	0,014333	0,017583
<b>DP</b>	0,004555	0,006005	0,003973	0,004055	0,006867	0,00917

PCO						
	Controle	0,1	1,0	10	100	10Ex
	0,005514	0,003641	0,004252	0,006751	0,006015	0,00416
	0,006413	0,006878	0,007722	0,006565	0,006744	0,005119
	0,006496	0,006352	0,005093	0,008315	0,006718	0,003627
	0,005956	0,006622	0,006694	0,005254	0,005002	0,003905
	0,007908	0,006113	0,007355	0,007302	0,008224	0,007025
	0,007355	0,007914	0,008414	0,007812	0,00535	0,003577
	0,007231	0,006721	0,003626	0,007818	0,006657	0,005661
	0,007465	0,004281	0,007306	0,006075	0,006586	0,006418
	0,007708	0,006753	0,006464	0,006187	0,007319	0,004324
	0,007622	0,007065	0,004895	0,007607	0,004835	0,003323
	0,005564	0,006373	0,006236	0,007494	0,006916	0,004715
	0,005904	0,002726	0,007272	0,005088	0,00436	0,004715
<b>Média</b>	0,006761	0,005953	0,006277	0,006856	0,006227	0,004714
<b>DP</b>	0,000883	0,001553	0,001493	0,001044	0,001137	0,001161

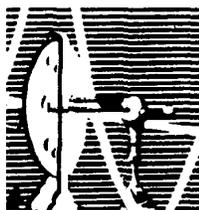
ROS						
	Controle	0,1	1,0	10	100	
	57,25535	32,4991		50,16753		
	57,58294	44,79702	41,59799	50,36683	56,86901	
	59,02932	48,43866	46,57749	55,5938	57,12679	
	59,45977	53,016	48,42249	59,191	57,507	
	60,21469	62,19243	53,79417	61,34419	61,84277	
	61,04441	62,88904	56,022	64,21042	64,51987	
	71,13927	64,3729	56,531	67,088	64,888	
	71,88689	64,784	58,24089	69,13174	65,38593	
	75,56796	65,72263	59,86382	70,627	69,514	
	75,70596	65,95381	60,888	71,395	72,04944	

	76,04782	66,64246	65,054	72,374	72,402
	77,52505	67,85	86,936	74,9643	73,29512
	79,34215	80,34	93,93159	75,50469	82,044
	79,57664	85,791	94,06119	77,227	82,906
	82,40814	87,67797	94,64207	79,252	91,279
	84,33361	91,863	100,5975	92,988	103,1138
	88,62232	92,233	103,1386	99,90874	110,194
	90,92297	92,69678	108,397	100,1274	126,987
	93,97672	94,00285	109,54	101,7555	138,66
	94,62251	94,27852	109,789	102,7898	146,0942
	96,73608	94,597	112,0582	103,124	150,9474
	97,60098	98,59896	117,8764	103,4414	167,3552
	100,1631	100,399	121,53	106,21	175,646
	109,731	101,3361	130,3605	115,9332	179,577
	115,5427	122,841	136,0236	135,9613	181,4342
		122,8477		139,998	193,5726
		127,9216		149,239	201,1226
		133,2854		149,4933	202,1297
<b>Média</b>	80,64153	82,85243	86,07806	89,26454	112,906
<b>DP</b>	16,5804	25,81014	29,50653	29,14177	51,78382

**Rodrigo de Cássio da Silva**

**Avaliação da toxicidade da cilindropermopsina  
(cianotoxina) em *Hoplias malabaricus* (traíra): estudos *in vivo* e *in vitro*.**

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR  
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA).



**Universidade Federal do Rio de Janeiro**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho**  
**2013**

**RODRIGO DE CÁSSIO DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA CILINDROSPERMOPSINA  
(CIANOTOXINA) EM *HOPLIAS MALABARICUS* (TRAÍRA): ESTUDOS  
*IN VIVO* E *IN VITRO*.**

Tese de doutorado submetida à Universidade  
Federal do Rio de Janeiro visando a obtenção do  
grau de doutor em ciências biológicas (biofísica).

**Orientadora: Dra. Valéria Freitas de Magalhães**  
**Co-orientador: Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro**

**Universidade Federal do Rio de Janeiro**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho**

**2013**

Silva, Rodrigo de Cássio

Avaliação da toxicidade da cilindrospermopsina (cianotoxina) em *Hoplias malabaricus* (traíra): estudos *in vivo* e *in vitro*. Rio de Janeiro, 2013.

xvi+144 p.

Tese de doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho / Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica).  
2013

Orientadora: Dra. Valéria Freitas de Magalhães  
Co-orientador: Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

1. Cianotoxina. 2. Peixe. 3. Biomarcadores. 4. Estresse oxidativo. 5. Hepatócitos. I. Magalhães, Valéria Freitas de II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). III. Título.

**Avaliação da toxicidade da cilindrospermopsina (cianotoxina)  
em *Hoplias malabaricus* (traíra): estudos *in vivo* e *in vitro*.**

**Rodrigo de Cássio da Silva**

**Orientadora: Valéria Freitas de Magalhães**

**Co-orientador: Ciro A. O. Ribeiro**

Tese submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências.

**Aprovada por:**

---

**Dra. Valéria Freitas de Magalhães  
(Presidente e Orientadora)**

---

**Dr. José Lailson Brito**

---

**Dr. Jayme da Cunha Bastos**

---

**Dr. Jean Remy Davee Guimarães**

---

**Dr. Raquel Moraes Soares (Revisora)**

**Rio de Janeiro, 28 de fevereiro de 2013.**

## **Dedicatória**

*Para*

Minhas Tias Glairdes (*in memoriam* / 1950 - 2011) e Durvalina  
*Por toda uma vida e por me ensinarem que o sofrimento e a dor são passageiros...*

À minha MÃE Maria das Graças  
*Pelo seu incondicional e ilimitado amor e pelo meu caráter...*

Ao meu PAI Raimundo Oliveira  
*Pelos princípios de respeito e coragem...*

Ao meu AMOR Juliana Staub  
*Pelo companheirismo e Por fazer com que TUDO valesse a pena...*

À minha Família  
*Por eu saber que sempre estarão “lá” quando eu voltar...*

Aos meus MESTRES Valéria, Ciro e Francisco “Chico”  
*Parafraseando Isaac Newton: “Se vi mais longe, foi por estar apoiado sobre ombros de gigantes”...*

À todos meu MUITO OBRIGADO.

*Rodrigo de Cássio da Silva*

## AGRADECIMENTOS

Nesse momento importante da minha vida, muitas pessoas foram meu alicerce para eu continuar a difícil jornada. Nesta lista, provavelmente, faltarão alguns que fizeram parte, mas que, por simples esquecimento (fato corriqueiro no final de tese), eu acabei por não citar, o que não significa que não foram importantes. A elas, meus sinceros agradecimentos.

Agradeço à Deus e meu guia espiritual por nunca me deixarem sucumbir.

Agradeço à CAPES pela bolsa e ao CNPq e FAPERJ pelo fomento à pesquisa.

Agradeço aos meus orientadores:

Valéria Freitas de Magalhães pelo carinho, PACIÊNCIA, amor quase materno e todos os anos de ensinamentos. Por ter me mostrado a vida científica.

Ciro Ribeiro pelo carinho, amizade, apreço, companheirismo e pelas infinitas ajudas no decorrer dos experimentos e escrita da tese.

Francisco “Chico” Filipak Neto por toda genialidade, simplicidade e humildade em me ensinar o que hoje sei sobre essa temática estudada.

Agradeço à profa Dra Raquel Moraes Soares pela excelente revisão deste manuscrito e pelo carinho.

Agradeço a banca: professores Jean Remy, Jayme Bastos, José Lailson, Mauro Rebelo e Reinaldo Bozelli por entender esse momento, pelas proveitosas contribuições que darão ao trabalho e pela paciência que tiveram em lê-lo.

Agradeço ao Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, e todos os seus membros estão e que se foram (sem exceção), me reservo o direito de não citar nomes para não ser injusto. Todos foram, são e serão importantes na minha carreira. Agradecimento especial à professora Sandra Azevedo pelo crédito dado ao meu trabalho durante todos esses anos.

Agradeço ao LABTOX (UFPR) aonde cheguei e fui recebido de braços abertos por todos. Fiz amigos pra toda vida. Um agradecimento especial aos amigos: Andressa, “Chico”, “Dani” Dietrich, Heloisa “Ioli” e Samuel “Sami” pelas boas risadas no cultivo e em Paulo Lopes.

Agradecimento especial à professora Sônia Grotzner pelas lâminas e pranchas histológicas, e, principalmente, pelo carinho demonstrado.

Agradecimento a Juan Esquivel (Piscicultura Panamá) pelo apoio logístico nos experimentos *in vivo* e pelo suporte de casa, comida e quase roupa lavada.

Agradecimento e desculpas aos meus amigos pessoais pelos anos de ausência.

Agradeço MUITO minha nova família: Cris Staub, Marcos Staub, Ruy João Staub, Elza Zucon e Adriano Safiano, por tudo que fizeram, ou seja, pelo amor que demonstram por mim.

Muito obrigado.

## RESUMO

A cilindropermopsina é uma cianotoxina que pode ser produzida por diferentes espécies de cianobactérias, e, portanto, sua presença nos corpos d'água é um problema de saúde pública em muitos países. Em mamíferos sua ação é sistêmica, entretanto pouco se sabe sobre sua ação toxicológica em peixes. Por esse fato, o uso de um modelo experimental da fauna tropical – *Hoplias malabaricus* - foi utilizado com este intuito no presente trabalho. A tese foi organizada em três capítulos sendo o primeiro e o segundo com a exposição *in vivo* onde após exposição a uma dose única de CYN (extrato aquoso e toxina purificada) foi avaliado seu acúmulo e danos no cérebro e no tecido muscular após 14 dias. No cérebro e músculo foram observadas alterações significativas na atividade da acetilcolinesterase além de danos oxidativos (peroxidação de lipídios) no cérebro indicando que a CYN é capaz de transpor a barreira hematoencefálica. No Capítulo II, foram avaliados, através de diferentes biomarcadores, além da concentração de CYN no fígado, também os danos através de biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo, danos em macromoléculas e aspectos histopatológicos. As injúrias histopatológicas foram corroboradas por alguns biomarcadores bioquímicos e de danos em macromoléculas como o aumento na concentração de hidroperóxidos e carbonilação de proteínas.. Os ensaios *in vitro* constituíram o terceiro capítulo, onde uma redução na viabilidade celular dos hepatócitos expostos tanto ao extrato quanto a toxina purificada foi observada. As respostas dos diferentes biomarcadores indicaram uma alteração no equilíbrio óxido-redutor dos hepatócitos, a qual foi mais pronunciada nas células expostas ao extrato aquoso. Concluindo, este trabalho apresenta vários aspectos inéditos uma vez que existem poucos dados referentes à toxicologia da CYN em espécies de peixes nativos brasileiros.

**Palavras-chave:** Cianotoxina. Peixe. Biomarcadores. Estresse oxidativo. Hepatócitos.

## ABSTRACT

Cylindrospermopsin is a cyanotoxin which can be produced by different species of cyanobacteria. Therefore their presence in water bodies is a public health concern worldwide. In mammals its action is systemic, but little is known about their toxicity in fish. Thus, the use of an experimental model of native tropical fish - *Hoplias malabaricus* - was used for this purpose in the present work. This thesis is organized into three chapters: the first and the second with exposure *in vivo* where after exposure to a single dose of CYN (aqueous extract and purified toxin) damage and its accumulation in the brain and muscle tissue after 14 days were assessed. In the brain and muscle were no significant changes in the activity of acetylcholinesterase. In addition, oxidative damage (lipid peroxidation) in the brain indicated that CYN is capable to crossing the blood brain barrier. In Chapter II, CYN concentration, biochemical biomarkers of oxidative stress, damage to macromolecules and histopathological aspects were evaluated. Injuries were corroborated by histological and biochemical biomarkers. Some damage to macromolecules, such as increase in the concentration of hydroperoxides and protein carbonylation, were observed. *In vitro* assays constituted the third chapter, in which a reduction in cellular viability of hepatocytes exposed to either extract and purified toxin was observed. The responses of different biomarkers indicated a change in the redox milieu of hepatocytes, which was more pronounced in cells exposed to the aqueous extract. In conclusion, this work presents novel aspects since there are few data regarding the toxicology of CYN in tropical fish species.

**Keywords:** Cyanotoxin. Fish. Biomarkers. Oxidative stress. Hepatocytes.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- $\beta$ -NADP<sup>+</sup> - Nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato
- CYN – Cilindropermopsina
- CYNp – Cilindropermopsina purificada
- CYNex – Extrato aquoso contendo CYN
- CYP – Citocromo P450
- DDT - diclorodifeniltricloroetano
- EDTA - Ácido etileno diamino tetracético (do inglês *Ethylenediaminetetracetic Acid*)
- ERO – espécie(s) reativa(s) de oxigênio e nitrogênio
- FOX* - do inglês *Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method*
- G6P - D-glucose-6-fosfato
- G6PDH – glucose-6-fosfato desidrogenase
- GPx – glutaciona peroxidase
- GR – glutaciona redutase
- GSH – glutaciona reduzida
- GSSG – glutaciona dissulfeto (glutaciona oxidada)
- GST – glutaciona S-transferase(s)
- LPO – peroxidação lipídica (do inglês *lipid peroxidation*)
- MXR – mecanismo de resistência a multixenobióticos (do inglês *multixenobiotic mechanism resistance*)
- PBS - tampão fosfato salino (do inglês *phosphate buffer saline*)
- PCO – carbonilação de proteínas (do inglês *protein carbonyl content or protein carbonylation*)
- pCO<sub>2</sub> – pressão parcial de CO<sub>2</sub>
- SOD – superóxido dismutase

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Ocorrência da <i>C. raciborskii</i> no planeta..	17
Figura 2 - Estrutura química da molécula de cilindrospermopsina.	18
Figura 3 - Espécimes de <i>Hoplias malabaricus</i> (adultos).	23
Figura 4 - Concentrações de cilindrospermopsina no cérebro de <i>H. malabaricus</i> expostos a uma dose única de CYN.....	37
Figura 5 - Concentrações de cilindrospermopsina no músculo de <i>H. malabaricus</i> expostos a uma dose única de CYN.....	38
Figura 6 - Efeitos sobre a atividade da AChE no cérebro de <i>H. malabaricus</i> .....	39
Figura 7 - Efeitos sobre a atividade da AChE no tecido muscular de <i>H. malabaricus</i> .....	40
Figura 8 - Efeitos sobre a atividade da GST no cérebro de <i>H. malabaricus</i> .....	41
Figura 9 - Efeitos sobre o conteúdo de GSH no cérebro de <i>H. malabaricus</i> .....	41
Figura 10 - Efeitos sobre a concentração de hidroperóxidos lipídicos no cérebro de <i>H. malabaricus</i> .....	42
Figura 11- Concentrações de cilindrospermopsina no fígado de <i>H. malabaricus</i> expostos a uma dose única de CYN.....	58
Figura 12 – Resultados dos biomarcadores bioquímicos no fígado de <i>H. malabaricus</i> .....	64
Figura 13 – Percentuais de alterações hepáticas no grupo controle e nos animais expostos à CYN. ....	65
Figura 14– Fotomicrografias de cortes histológicos do fígado de <i>H. malabaricus</i> expostos a CYN. ....	66
Figura 15 – <i>Score</i> de alterações no fígado de <i>H. malabaricus</i> .....	67
Figura 16– Tanques-rede da Piscicultura Panamá (Paulo Lopes – SC – Brasil).....	79
Figura 17 - Esquema de divisão dos grupos nos ensaios realizados em microplacas de 96 poços. ....	82
Figura 18 - Esquema de divisão dos grupos nos ensaios realizados em microplacas de 24 poços .....	83
Figura 19 - Viabilidade celular estimada através de ensaio com vermelho neutro ( <i>neutral red</i> ) .....	90
Figura 20 - Atividade específica da CAT.....	91
Figura 21 - Atividade específica das SOD.....	91
Figura 22 - Atividade específica da G6PDH.....	92
Figura 23 - Atividade específica da GPx..	92

Figura 24 - Atividade específica da GR. ....	93
Figura 25 - Atividade específica de diferentes isoformas da GST.. ....	94
Figura 26 - Conteúdo de GSH. ....	94
Figura 27 - Peroxidação de lipídios – concentração de hidroperóxidos lipídicos. ....	95
Figura 28 - Carbonilação de proteínas. ....	96
Figura 29 - Produção de espécies reativas de oxigênio.....	96
Figura 30 - Escores de danos ao DNA.....	97
Figura 31 - Proposição de mecanismo alternativo de hepatotoxicidade após exposição à CYN através da formação de EROs, e conseqüente morte celular.....	102
Tabela 1 - Alterações hepáticas em <i>H. malabaricus</i> expostos à CYN. ....	65
Tabela 2 - Percentagem de incidência das classes de dano ao DNA.....	97

# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>15</b>
<b>1. CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS:.....</b>	<b>15</b>
<b>2. CILINDROSPERMOPSINA (CYN): .....</b>	<b>17</b>
<b>3. BIOMARCADORES: .....</b>	<b>21</b>
3.1. BIOMARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO:.....	22
<b>4. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL HOPLIAS MALABARICUS:.....</b>	<b>23</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>26</b>
<b>EFEITOS NEUROTÓXICOS EM HOPLIAS MALABARICUS (TRAÍRA) EXPOSTOS À CILINDROSPERMOPSINA. ....</b>	<b>26</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>26</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	30
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS: .....</b>	<b>31</b>
3.1. CULTIVO DA CEPA DE <i>CYLINDROSPERMOPSIS RACIBORSKII</i> : .....	31
3.2. PURIFICAÇÃO, EXTRAÇÃO E ANÁLISE DA CYN:.....	31
3.3. EXPOSIÇÃO DOS ANIMAIS À CYN: .....	32
3.4. EXTRAÇÃO E ANÁLISE DA CYN NOS TECIDOS: .....	33
3.5. BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS: .....	33
3.5.1. Avaliação da atividade da Acetilcolinesterase (AChE):.....	33
3.5.2. Avaliação da atividade global das isoformas da GST: .....	34
3.5.3. Avaliação dos conteúdos de GSH: .....	34
3.5.4. Avaliação da peroxidação de lipídios (LPO): .....	35
3.5.5. Quantificação de proteínas totais: .....	35
3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS:.....	36
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
4.1 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CYN NO CÉREBRO:.....	37
4.2. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CYN NO MÚSCULO: .....	38
4.3. ANÁLISES BIOQUÍMICAS: .....	39
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>47</b>
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>48</b>
<b>HEPATOTOXICIDADE DA CILINDROSPERMOPSINA EM HOPLIAS MALABARICUS. ....</b>	<b>48</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>48</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>52</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	52
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	52

<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>53</b>
3.1. BIOMARCADORES DE DESEQUILÍBRIO E DANO OXIDATIVO:.....	53
3.1.1. Avaliação da atividade da CAT: .....	53
3.1.2. Avaliação da atividade da SOD: .....	54
3.1.3. Avaliação da atividade da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH):.....	54
3.1.4. Avaliação da atividade da GPx: .....	54
3.1.5. Atividade da glutathiona redutase (GR): .....	55
2.1.6. Avaliação da atividade global das isoformas da glutathiona S-transferase (GST):.....	55
3.1.7. Avaliação dos conteúdos de GSH: .....	55
3.1.8. Avaliação da peroxidação lipídica (LPO):.....	56
3.5.9. Avaliação da carbonilação de proteínas (PCO): .....	56
3.1.10. Quantificação de proteínas totais: .....	56
3.2. BIOMARCADORES HISTOPATOLÓGICOS: .....	57
3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS OBTIDOS: .....	57
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
4.1. CONCENTRAÇÃO DE CYN NO FÍGADO:.....	58
4.2. BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS: .....	58
4.3. BIOMARCADORES HISTOPATOLÓGICOS: .....	64
<b>5. DISCUSSÃO: .....</b>	<b>68</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>73</b>

## **CAPÍTULO III.....74**

### **EFEITOS *IN VITRO* DA CILINDROSPERMOPSINA NO AMBIENTE REDOX DE HEPATÓCITOS DE *HOPLIAS MALABARICUS*.....74**

<b>RESUMO .....</b>	<b>74</b>
<b>1. INTRODUÇÃO:.....</b>	<b>75</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>78</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	78
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	78
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS: .....</b>	<b>79</b>
3.1. OBTENÇÃO, MANUTENÇÃO E CUIDADO COM OS ANIMAIS: .....	79
3.2. ISOLAMENTO E CULTIVO DOS HEPATÓCITOS DE <i>H. MALABARICUS</i> : .....	80
3.3. DESENHO EXPERIMENTAL PARA REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS:.....	82
3.4. ANÁLISES BIOQUÍMICAS:.....	84
3.4.1. Avaliação da viabilidade celular: .....	84
3.4.2. Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs):.....	85
3.4.3. Avaliação da atividade da Catalase (CAT): .....	85
3.4.4. Avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD):.....	86
3.4.5. Avaliação da atividade da Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH): .....	86
3.4.6. Avaliação da atividade da Glutathiona peroxidase (GPx): .....	86
3.4.7. Avaliação da atividade da Glutathiona redutase (GR): .....	87
3.4.8. Avaliação da atividade total das isoformas GST: .....	87
3.4.9. Avaliação dos conteúdos de GSH: .....	87
3.4.10. Avaliação da LPO: .....	87
3.4.11. Avaliação da carbonilação de proteínas (PCO):.....	88
3.4.12. Ensaio cometa: .....	88
3.4.13. Quantificação de proteínas totais: .....	89
3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS: .....	89
<b>4. RESULTADOS: .....</b>	<b>90</b>
4.1. VIABILIDADE CELULAR: .....	90
4.2. ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DAS CAT, SOD, G6PDH, GPX, GR E GST:.....	90

4.3. CONTEÚDO DE GSH: .....	94
4.4. PEROXIDAÇÃO DE LÍPIDIOS (LPO) E CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS (PCO): .....	95
4.5. DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS):.....	96
4.6. ENSAIO COMETA:.....	96
<b>5. DISCUSSÃO: .....</b>	<b>98</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>109</b>
<b>CONCLUSÕES FINAIS .....</b>	<b>114</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>117</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>129</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>131</b>

# INTRODUÇÃO GERAL

## 1. CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS:

Estima-se que as cianobactérias habitem o planeta Terra a aproximadamente 2.8 bilhões de anos (SCHOPF e PACKER, 1987). Estes micro-organismos (procariontes fotossintetizantes) possuem características variadas em relação ao ambiente que habitam (ambientes marinhos e dulcícolas, fontes termais, desertos polares e ambientes hipersalinos), assim como em relação as suas formas celulares que podem ser coloniais, filamentosas ou unicelulares (CHORUS e BARTRAM, 1999).

A proliferação excessiva das cianobactérias, fenômeno comumente conhecido como floração ou “*bloom*”, pode ser ocasionada por diferentes agentes, entretanto os principais estão ligados à fatores antrópicos diretos (lançamento de esgotos domésticos e industriais em corpos d’água aumentando o aporte de nutrientes, por exemplo) ou indiretos (mudanças climáticas principalmente àquelas relacionadas ao aquecimento global) (VON SPERLING et al., 2008; SINHA et al., 2012). Tais florações podem ser extremamente prejudiciais para estes ecossistemas já que muitas espécies de cianobactérias são potencialmente produtoras de moléculas tóxicas (cianotoxinas) que podem causar efeitos danosos em animais e humanos (CARMICHAEL et al., 1998).

Existem diversos relatos de intoxicação humana relacionados a florações de cianobactérias na Austrália, Inglaterra, China, África do Sul (CHORUS e BARTRAM, 1999), e no Brasil onde já foi constatada uma correlação epidemiológica entre a floração de cianobactérias no Reservatório de Itaparica, Bahia, e a morte de 88 pessoas entre 2000 intoxicadas no ano de 1988 (TEIXEIRA et al., 1993), além do caso de Caruarú (CARMICHAEL et al., 2001), o qual será descrito posteriormente.

As cianotoxinas podem ser classificadas de acordo com seu órgão-alvo em mamíferos. As mais conhecidas são as microcistinas e nodularias, que são peptídeos cíclicos primariamente de ação hepatotóxica (CARMICHAEL et al., 1998). As saxitoxinas que são alcalóides de ação neurotóxica (CHORUS e BARTRAM, 1999). As cilindrospermopsinas que são alcalóides de ação generalista, e por isso classificada como citotóxica (OHTANI et al., 1992), o alvo de nosso estudo a sua atividade citotóxica.

Dentre as espécies potencialmente produtoras de cilindrospermopsina, destaca-se a *Cylindrospermopsis raciborskii* (HAWKINS et al., 1985). Esta espécie ocorre principalmente nas regiões tropical, subtropical e temperada, sendo, portanto, considerada cosmopolita (Figura 1).

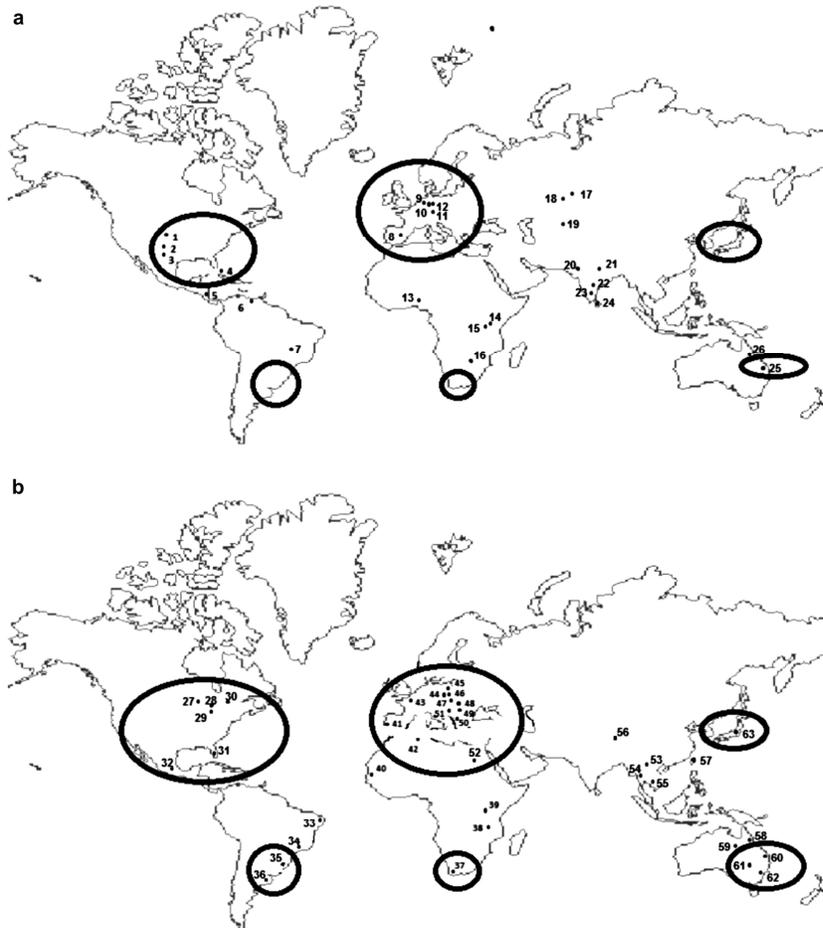


Figura 1 - Ocorrência da *C. raciborskii* no planeta. Cada ponto e círculo representa um país ou estado de ocorrência onde têm sido identificadas florações desta espécie. (Fonte SINHA et al., 2012).

## 2. CILINDROSPERMOPSINA (CYN):

A CYN (Figura 2) é uma cianotoxina que foi identificada como responsável por um dos casos mais graves de intoxicação causada por toxinas de cianobactérias. Este incidente aconteceu em 1979 na ilha de Palm (Queensland – Norte da Austrália), onde 148 pessoas foram internadas com sintomas severos de hepatenterite e falência renal, sem a ocorrência de óbito. A médica local, Dra. Susan Byth, sem saber a causa exata a que se atribuía o caso, o chamou de “doença misteriosa de Palm Island” (*The Palm Island mystery disease – BYTH, 1980*).



a culturas de células de *C. raciborskii* produtora de CYN os efeitos no estômago foram desde úlceras no epitélio estomacal à presença de sangue nos tecidos intestinais e estomacais (SEAWRIGHT et al., 1999). No timo e baço observou-se necrose linfocitária, atrofia do timo e retração do baço. Danos vasculares também foram observados no músculo cardíaco, órbita ocular e cauda de camundongos (FALCONER e HUMPAGE, 2006).

Ainda não há dados consistentes que determinem a DL<sub>50</sub> (dose letal para 50% da população exposta) da CYN. No entanto, esta toxicidade foi inicialmente estimada em de 64 ± 5 mg de cultura liofilizada *C. raciborskii*/kg de peso corpóreo, através de injeção intraperitoneal (i.p.) em camundongos, após 24 horas (HAWKINS et al., 1985). Estudos posteriores (i.p.) encontraram o valor de 52 mg de extrato aquoso *C. raciborskii*/kg em 24 horas e 32 mg de extrato aquoso *C. raciborskii*/kg em 7 dias (HAWKINS et al., 1997). Apesar da importância dos estudos citados, o caminho mais provável para intoxicação pela CYN é a via oral. Por isso, foram realizados experimentos com camundongos que indicaram a DL<sub>50</sub> oral para CYN de 4,4-6,9 mg CYN/kg (SEAWRIGHT et al., 1999). Todos os dados apresentados indicam que esta toxina é de ação mais lenta e progressiva.

Apesar de diversos estudos mostrarem o potencial tóxico da CYN, ainda são escassos os dados sobre o seu mecanismo de ação. Primariamente, sabe-se que é uma potente inibidora de síntese protéica (TERAO et al., 1994; FROSCIO et al., 2001, RUNNEGAR et al., 2002); e que provavelmente esta inibição ocorra no nível ribossomal, através do bloqueio do processo de alongamento da cadeia polipeptídica (FROSCIO et al., 2003). Outro aspecto toxicológico a ser considerado é a ativação metabólica da CYN em células expostas à inibidores do complexo CYP450 (HUMPAGE et al., 2005), além do aumento na transcrição de alguns genes relacionados a este complexo (ZEGURA et al., 2011), sugerindo que estas enzimas têm papel crucial na toxicidade da CYN, entretanto este aspecto ainda está pouco elucidado.

Sabe-se que a CYN é capaz de causar a redução da síntese e dos níveis de glutatona (RUNNEGAR et al., 1994, 1995) em um mecanismo ainda desconhecido. Alguns mecanismos de genotoxicidade da molécula já foram descritos tais como, por exemplo, a fragmentação do DNA e perda de cromossomos inteiros (HUMPAGE et al., 2000, 2005). Adicionalmente, alterações na expressão de genes reguladores de danos ao DNA (*MDM2*, *GADD45a*) e de genes relacionados a apoptose (*BCL-2* e *BAX*) também já foram descritos (ŽEGURA et al., 2011; STRASER et al., 2012).

Gácsi et al. (2009) observaram que esta toxina causa apoptose em células da linhagem CHO-K1 (provenientes de ovários de hamster) mesmo em baixas concentrações e curto período de exposição (1–2  $\mu$ M por 12 horas), já em altas concentrações e maior período de exposição, esta causa necrose nas células. Adicionalmente, este estudo também mostrou que a CYN promove alterações nucleares e no citoesqueleto dessa linhagem celular, corroborando os registros de genotoxicidade desta toxina. Young et al., (2008) evidenciaram que a CYN inibe a produção de progesterona e, portanto, mostra um potencial na desregulação endócrina de mamíferos já que altera significativamente a relação progesterona:estrogênio.

Terao et al., (1994) pela primeira vez sugeriram que a toxicidade da CYN poderia ser também mediada pela geração de radicais livres. Atualmente, sabe-se que a CYN é capaz de causar estresse oxidativo em diferentes classes de organismos como: plantas (PRIETO et al., 2011), cultura primária de hepatócitos de peixes (LIEBEL et al., 2011), linhagens celulares de peixes (GUTIÉRREZ-PRAENA et al., 2011a), peixes (PUERTO et al., 2011a; GUTIÉRREZ-PRAENA et al., 2011b), bivalves (PUERTO et al., 2011b); linhagens de linfócitos (ŽEGURA et al., 2011) e adenocarcinoma de cólon humanos (GUTIERREZ-PRAENA et al., 2012a). No entanto, exceto pelo trabalho de Liebel et al. (2011) pouco se sabe a respeito da CYN como causadora desse tipo de injúria em peixes da fauna tropical, sendo de

fundamental importância uma vez que estes animais compartilham do mesmo habitat das cianobactérias.

### **3. BIOMARCADORES:**

Um biomarcador é uma alteração em uma resposta fisiológica, morfológica ou genética mensurável num organismo como consequência da exposição a um agente exógeno estressor, ou ainda, qualquer medida refletindo uma interação entre um sistema biológico e um potencial risco, medida esta que pode ser física, química ou biológica (WHO, 1993). Desta forma os biomarcadores podem ser considerados alterações biológicas ou bioquímicas após a exposição a um determinado estressor. Dentre as classificações dos biomarcadores, temos: os biomarcadores de efeito; biomarcadores de susceptibilidade; e os biomarcadores de exposição. Para ser considerado um bom biomarcador, a resposta químico-biológica deve ser sensível ao poluente ao qual o organismo está exposto bem como deverá fornecer as respostas biológicas imediatas desta exposição, revelando possíveis relações causa/efeito ou dose/efeito, e que podem ser extrapoladas para níveis superiores de organização biológica (população ou comunidade) (VAN DER OOST et al, 2003). Por esse fato, a escolha de múltiplos biomarcadores poderá fornecer informações mais completas em relação à exposição de um organismo a um determinado poluente.

É válido destacar que a resposta de alguns biomarcadores referentes a uma determinada espécie não é necessariamente válida para outras espécies. Além disso, os dados obtidos em estudos ecotoxicológicos laboratoriais podem ser de difícil extrapolação às avaliações no campo (ECETOC, 1993), uma vez que seus efeitos podem ser super ou subestimados.

### **3.1. Biomarcadores do estresse oxidativo:**

A fim de avaliar o impacto dos poluentes em determinado ambiente aquático, uma proposta de abordagem é analisar algumas respostas bioquímicas, uma vez que estas podem refletir o potencial risco de exposição de algumas classes de contaminantes em organismos expostos (MCCARTHY e SHUGART, 1990). Mais recentemente, estudos têm demonstrado um crescente interesse no uso de biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo como forma de monitoramento da biota aquática, uma vez que um desequilíbrio no ambiente redox celular pode ser a explicação para vários efeitos tóxicos (WINSTON e DI GIULIO, 1991). E, além disso, a alteração no nível ou atividade desses biomarcadores está intimamente ligada à ação de diferentes classes de poluentes nos organismos expostos (ZANETTE et al. 2006; 2008).

A toxicidade mediada pelo oxigênio pode ser definida como os efeitos prejudiciais causados por espécies reativas de oxigênio (ERO), também conhecidas como intermediários reativos de oxigênio, radicais livres ou oxiradicais. Particularmente, os produtos de redução do oxigênio molecular são os de maior interesse já que podem reagir com macromoléculas celulares, podendo levar ao aumento ou inibição de atividades enzimáticas, peroxidação lipídica (LPO), danos ao DNA e proteínas, e até mesmo a morte celular (WINSTON e DI GIULIO, 1991). O funcionamento dos mecanismos antioxidantes celulares, que defendem a célula contra a ação das ERO, são criticamente importantes na remoção destes radicais. Portanto, a atividade das enzimas ligadas diretamente a estes processos de defesa antioxidante podem ser utilizados como importantes biomarcadores de exposição à determinados poluentes.

#### 4. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL *Hoplias malabaricus*:

Vários trabalhos utilizam peixes como modelos experimentais para avaliar efeitos tóxicos de diversos contaminantes como, por exemplo, os organofosforados, carbamatos e metais pesados (SILVA FILHO et al., 2000). *Hoplias malabaricus* (BOCH 1794 - família Erythrinidae) – nome comum: traíra (figura 3) - é uma espécie de peixe neotropical dulcícola, carnívora e predadora com ampla distribuição geográfica, a qual abrange todas as bacias hidrográficas da América do Sul, sendo um dos principais predadores em reservatórios e riachos (FOWLER, 1950; ARAÚJO-LIMA et al., 1985). Possui hábito noturno, e pode modular seu tipo de reprodução conforme o ambiente (ARAÚJO-LIMA e BITTENCOURT, 2002). O gênero *Hoplias* possui grande capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais, sendo utilizado como fonte alimentar por aves piscívoras e também por mamíferos, incluindo o homem.

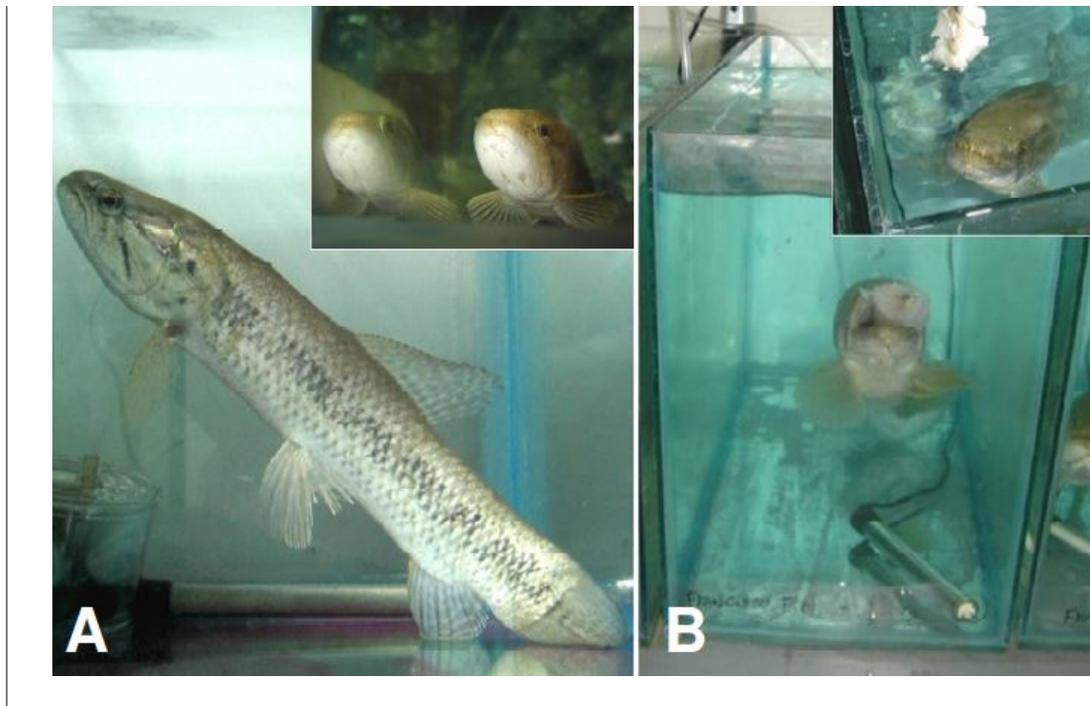


Figura 3 - Espécimes de *Hoplias malabaricus* (adultos). Crédito da foto: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto e Dra. Sonia Grotzner (Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, UFPR).

Segundo Hensley e Moody (1975), esta espécie é de ampla distribuição e abundância, por isso pode ser considerada como sendo ecologicamente bem sucedida. A traíra tem uma resistência física privilegiada, capaz de resistir a intensas variações climáticas. Esta espécie pode sobreviver em ambientes pouco oxigenados o que explica sua grande capacidade de dispersão e ajuste (SUNDIN et al., 1999), além de apresentar grande resistência aos períodos de privação de alimento (RIOS et al., 2002).

Há poucos estudos toxicológicos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, utilizando esta espécie como modelo experimental, principalmente com relação à exposição à xenobióticos. A maioria do estudos disponíveis se concentram no Laboratório de Toxicologia Celular da UFPR (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2006; ALVES COSTA et al., 2007; RABITTO et al., 2006; MELA et al., 2007; MELA et al., 2010; MIRANDA et al., 2008). Quanto aos estudos com cianotoxinas, estes são ainda incipientes com esta espécie (SILVA et al., 2011), e portanto os estudos desenvolvidos neste trabalho podem contribuir para conhecer o papel destas toxinas no metabolismo de peixes nativos brasileiros.

Tendo em vista as pesquisas relatadas acima, conclui-se que os dados toxicológicos em relação à CYN são em maior número para mamíferos do que em peixes, apesar dos peixes estarem mais expostos a estes metabólitos do que os mamíferos. Por esse motivo são muito importantes os estudos que visem o entendimento dos efeitos da CYN em organismos aquáticos. Portanto, esta tese tem como objetivo principal avaliar os efeitos da exposição à cianotoxina cilindrospermopsina em relação ao seu acúmulo em tecidos alvos da espécie *H. malabaricus*. A análise destes efeitos através de biomarcadores neurotóxicos, danos oxidativos, citotoxicidade e genotoxicidade em espécimes de traíra utilizando estudos *in vivo* e *in vitro* contribuirão para o aumento das informações sobre o risco de exposição das cianotoxinas para a biota aquática.

Face às informações apresentadas, a avaliação do potencial neurotóxico da CYN foi verificada em ensaios *in vivo* (Capítulo I). Seguindo o mesmo desenho e modelo experimental foi avaliado o efeito hepatotóxico através de diferentes biomarcadores (histopatológicos e bioquímicos) nos animais expostos à CYN (capítulo II). Por fim, a partir do cultivo primário de hepatócitos desta espécie de peixe foi avaliada a citotoxicidade da CYN através de biomarcadores de danos oxidativos e genotóxicos (capítulo III).

# CAPÍTULO I

## EFEITOS NEUROTÓXICOS EM *Hoplias malabaricus* (TRAÍRA) EXPOSTOS À CILINDROSPERMOPSINA.

### RESUMO

Cilindrospermopsina (CYN - cianotoxina) é um alcalóide citotóxico inibidor de síntese de proteínas e glutatona e que causa injúrias em diferentes órgãos de mamíferos. Para os peixes, no entanto, dados em relação aos diferentes efeitos da CYN ainda são escassos. A literatura específica mostra que o fígado se configura como o órgão alvo mais importante para a ação da CYN, no entanto, não existem dados disponíveis a respeito da sua neurotoxicidade. Os objetivos deste estudo foram quantificar a CYN no cérebro e no músculo do peixe neotropical *Hoplias malabaricus* após exposição experimental e investigar o potencial neurotóxico do extrato celular aquoso contendo CYN (CYNex) e CYN purificada (CYNp) proveniente de um cepa de *Cylindrospermopsis raciborskii*. Os peixes foram expostos intraperitonealmente a uma dose única de CYN ( $50 \mu\text{g CYN kg}^{-1}$ ). A presença da CYN foi analisada 7 e 14 dias pós-exposição no cérebro e nos músculos; e os efeitos neurotóxicos (atividade da AChE) e oxidativos (atividade de glutatona S-transferase - GST, níveis de glutatona - GSH e peroxidação lipídica - LPO) somente no cérebro. De acordo com os resultados obtidos indivíduos expostos a CYNex apresentaram maior concentração de CYN do que os animais expostos a CYNp para ambos os tecidos estudados. Apenas a exposição CYNp causou uma diminuição da atividade da AChE, mas ambos CYNp e CYNex levaram ao aumento da GST e LPO no cérebro. Os níveis de GSH não foram afetados. Estes resultados mostraram que CYN pode atravessar barreira hematoencefálica e tem potencial neurotóxico, prejudicando a comunicação sináptica neuronal (através da inibição da atividade da AChE), bem como alterando o ambiente redox cerebral.

**Palavras-chave:** cilindrospermopsina, neurotoxicidade, danos oxidativos, *Hoplias malabaricus*, cianobactérias.

## 1. INTRODUÇÃO

Uma das conseqüências das atividades humanas aos ambientes naturais é a maior entrada de nutrientes nos ecossistemas aquáticos, favorecendo um grande aumento da população de alguns micro-organismos, principalmente cianobactérias. Notavelmente, as cianobactérias têm se tornado um grande problema de saúde pública, porque muitas espécies podem produzir cianotoxinas (KAEBERNICK e NEILAN, 2001). A presença de cianotoxinas tais como a cilindrospermopsina (citotóxica) têm sido relatadas em diferentes ecossistemas aquáticos do planeta, incluindo aqueles utilizados para abastecimento público de água (FALCONER e HUMPAGE, 2006).

Sabe-se que algumas cianotoxinas têm efeitos neurotóxicos importantes em diferentes organismos e, portanto, são um grave problema para a biota aquática. Mais especificamente, a anatoxina-a, que também é um alcalóide assim como a CYN, é um potente bloqueador neuromuscular pós-sináptico de receptores nicotínicos e colinérgicos, que são comuns tanto para mamíferos quanto para peixes. Esta ação se dá através da ligação (irreversível) aos receptores de acetilcolina, pois esta passa a não ser degradada pela acetilcolinesterase. A  $DL_{50}$  intraperitoneal (i.p.) em camundongos, para a toxina purificada, é de 200 mg/Kg de peso corpóreo, com um tempo de sobrevivência de 1 a 20 minutos (CARMICHAEL, 1992; 1994).

Em relação aos efeitos agudos da anatoxina-a em vertebrados, já foi retratada paralisia rápida dos músculos esqueléticos periféricos e respiratório, causando sintomas como perda de coordenação, contração muscular, respiração irregular, tremores, alteração da marcha e convulsões antes da morte por parada respiratória (ROGERS et al, 2005). Em peixes já foram observadas alterações no movimento opercular (super-estímulo) e natação anormal dos indivíduos expostos (OSSWALD et al., 2007), alteração da frequência cardíaca (OBEREMM et al., 1999) e morte (CARMICHAEL et al., 1975).

Particularmente, em relação à cilindrospermopsina, sabe-se que ela é um potente inibidor da síntese de proteínas em células eucarióticas (TERAO et al, 1994, FROSCIO et al, 2008). Pode causar necrose no fígado (SEAWRIGHT et al, 1999, HUMPAGE e FALCONER, 2003) e nos túbulos renais proximais (HAWKINS et al. 1985, BERNARD et al. 2003) de mamíferos. Além disso, outros tecidos também já foram descritos como órgão alvo para a CYN como, por exemplo, o pulmão, o timo e o coração (HARADA et al. 1994, FALCONER et al. 1999). Efeitos como mutagenicidade (HUMPAGE et al. 2000, SHEN et al. 2002) e genotoxicidade, através da inibição da condensação da cromatina, alterações nucleares, e morte celular são atribuídos à exposição a esta toxina (GÁCSI et al., 2009); e a desregulação endócrina têm sido relatados para linhagens de células de mamíferos expostas à CYN (YOUNG et al., 2008).

Humpage e Falconer (2003) determinaram a dose oral de 30  $\mu\text{g CYN kg}^{-1}\text{dia}^{-1}$  como nível de efeito adverso não observado (NOAEL) em camundongos. A partir destes valores foi estabelecida a dose de 0,03  $\text{mg kg}^{-1}\text{dia}^{-1}$  como uma ingestão diária tolerada (IDT) para humanos e de 1,0  $\mu\text{g l}^{-1}$  como a concentração máxima aceitável na água para consumo humano, valor que é recomendado pela última Portaria do Ministério da Saúde Brasileiro (2.914/2011) (BRASIL, 2012).

Embora muitos estudos tenham demonstrado que CYN é tóxica para as células de vertebrados, dados sobre a sua neurotoxicidade são extremamente escassos (KISS et al., 2002), particularmente para os peixes.

A dosagem da atividade da acetilcolinesterase (AChE) tem sido empregada como biomarcador de efeito na verificação dos efeitos primários de alguns poluentes em peixes (STIEN et al., 1998; SANCHO et al., 2000; LIONETTO et al., 2003). Quando a atividade de AChE é inibida de alguma forma, há bloqueio na transmissão de impulsos nervosos,

paralisando as funções vitais devido à sobreposição desses impulsos, causados pela permanência de abertura dos canais de sódio (STENESH, 1998).

Assim sendo, o uso da AChE nos tecidos muscular e nervoso de peixes pode ser utilizada para avaliar os efeitos neurotóxicos da cilindropermopsina nos organismos expostos, já que esta enzima tem ampla disponibilidade e grande concentração nestes tecidos (STURM, 1999).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

- Avaliar a presença e o potencial neurotóxico da CYN (extrato aquoso – CYNex e toxina purificada - CYNp) em *Hoplias malabaricus* através de diferentes biomarcadores, após 7 e 14 dias de exposição.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a concentração de CYN no cérebro e tecido muscular através de técnicas de imunoensaio enzimático do tipo ELISA.
- Avaliar a atividade da AChE no cérebro e no tecido muscular dos animais.
- Avaliar alguns marcadores de desequilíbrio oxidativo, a saber: atividade da GST, conteúdo de GSH e LPO no cérebro dos animais.
- Verificar a possível diferença dos efeitos do extrato aquoso (CYNex) e toxina purificada (CYNp) experimentalmente em *H. malabaricus*.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS:**

#### **3.1. Cultivo da cepa de *Cylindrospermopsis raciborskii*:**

A cepa CYP011K da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*, gentilmente cedida pelo Dr. Andrew Humpage do Australian Water Quality Center – Austrália, foi cultivada em meio de cultura ASM-1 (GORHAM et al., 1964), nas seguintes condições: pH 8,0;  $23 \pm 2$  ° C;  $50 \mu\text{E. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de intensidade de luz medida a partir do sensor quântico (QSL-100 Box, - Biospherical instrumets Inc.), fotoperíodo de 12 horas e aeração contínua.

#### **3.2. Purificação, extração e análise da CYN:**

Para obtenção do extrato e quantificação da CYN, a cepa CYP011K foi cultivada em grandes volumes (mariotes de 9 litros). Após alcançar o final da fase exponencial de crescimento, o cultivo foi interrompido e o volume total da cultura foi centrifugado (6.000 rpm/ 10 min.). O material precipitado foi liofilizado e submetido à extração com água ultra-pura de acordo com Welker et al. (2002). Para tanto, esse material foi agitado durante 1 h, centrifugado (11.000 rpm / 20 min.) e o sobrenadante foi filtrado em filtros de celulose regenerada com 0,45  $\mu\text{m}$  de porosidade (Sartorius).

O extrato obtido foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência com fotodetector de dióxido (CLAE-DAD - Shimadzu) usando uma coluna analítica de fase reversa Lichrospher 100 RP-18 (5 mm, Merck ®). As condições cromatográficas foram estabelecidas sob condições mistas (isocrática e gradiente) de acordo com Welker et al. (2002). O volume injetado (loop) foi de 100  $\mu\text{L}$  com um fluxo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . A detecção da CYN por UV foi realizada a 262 nm.

No processo de purificação da toxina, utilizou-se uma coluna semi-preparativa (MERK LiChroCART ® 250 x 10 10 µm), seguindo as mesmas condições cromatográficas explicitadas anteriormente. A cada injeção, CYN foi coletada após a detecção do sinal cromatográfico no espectro de absorção e tempo de retenção característico, comprovado por comparação com padrão comercial certificado (NRC CYN-Certified Reference material) e alta similaridade ( $r^2 = 0,99$ ). O material foi congelado, liofilizado e reanalisado pelo método já descrito. Posteriormente, realizou-se confirmação e quantificação deste material por espectrometria de massa (3200 QTRAP LC/MS/MS - Applied Biosystems) de acordo com Eaglesham et al. (1999).

### **3.3. Exposição dos animais à CYN:**

Exemplares adultos de *H. malabaricus* (aproximadamente 300 à 400 g) foram obtidos a partir de uma fazenda comercial de peixes (Cidade de Paulo Lopes, Estado de Santa Catarina, Brasil; <http://www.pisciculturapanama.com.br>). Os peixes foram mantidos em tanques-rede (3 grupos de 20 animais por tanque com 2,0 m<sup>3</sup> de volume de água em cada tanque). No momento do experimento, os peixes foram anestesiados (200 mg/L de benzocaína em água). Uma única dose de CYN foi injetada intraperitonealmente (i.p.) (50 µg CYN kg<sup>-1</sup> peso corpóreo) nas duas formas: purificada (CYNp) ou o extrato celular (CYNex), sendo 20 animais no total para cada tratamento. Os animais-controle (n = 20) foram injetados com água. Nos 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias após a exposição, 10 peixes de cada grupo (controle, CYNex e CYNp) foram anestesiados e sacrificados, através de secção espinhal, para coleta de amostra do tecido muscular esquelético e do cérebro.

### **3.4. Extração e análise da CYN nos tecidos:**

As amostras de músculo (0,4 g) e cérebro (0,2 g) foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio - PBS (0,1 M, pH 7,5 para o músculo e pH 8,0 para o cérebro) e centrifugadas (15.000 rpm / 4 °C / 10 min). Os sobrenadantes foram congelados e armazenados a -76°C. Posteriormente, alíquotas foram obtidas para a realização das análises da AChE no músculo e no cérebro e atividade da GST, níveis de GSH e LPO no cérebro.

Para a análise CYN, os extratos de cérebro e músculo (sobrenadantes) foram filtrados (0,45 µm - filtros celulose regenerada - Sartorius), armazenados a -20 °C e, posteriormente, analisados pelo método de imunoenensaio do tipo ELISA (policlonal) utilizando kits para cilindrospermopsina (Beacon Analytical Systems Inc., Portland- ME, EUA). A média dos valores de absorbância dos animais não-expostos foi considerada como “*background*” (falso-positivo) para a quantificação CYN, isto é, estes valores foram subtraídos dos valores obtidos dos animais expostos. O limite de detecção deste método é de 0,1 ng mL<sup>-1</sup>.

### **3.5. Biomarcadores bioquímicos:**

O procedimento de cálculo das atividades dos biomarcadores avaliados está no anexo I desta tese.

#### **3.5.1. Avaliação da atividade da Acetilcolinesterase (AChE):**

A análise da atividade da AChE foi realizada de acordo com Oliveira Ribeiro e Silva de Assis (2005). Para o ensaio, 50 µL de extrato tecidual (tampão fosfato para o branco) foram adicionados a uma microplaca de 96 poços, seguido por 200 µL de DTNB 0,75 mM (ácido 5-5'-ditiobis (2-nitrobenzóico (preparado em tampão de fosfato). Em seguida, foram adicionados

50  $\mu\text{L}$  de iodeto de acetiltiocolina (9,0 mM em tampão fosfato) e a absorbância foi medida a 405 nm em espectrofotômetro (seis ciclos de 30 segundos de intervalo). O coeficiente de extinção molar de 13,6 mM  $\text{cm}^{-1}$  foi utilizado para calcular a atividade da enzima.

### **3.5.2. Avaliação da atividade global das isoformas da GST:**

Seguindo-se o método descrito por Keen et al. (1976) um volume de 50  $\mu\text{L}$  do extrato tecidual (tampão fosfato para o branco) foi adicionado a microplacas de 96 poços, seguido imediatamente por 100  $\mu\text{L}$  de meio de reação (GSH 1,5 mM e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 2,0 mM em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5). O aumento da absorbância foi imediatamente medido a 340 nm em espectrofotômetro e o coeficiente de extinção molar de 9,6 mM<sup>-1</sup>  $\text{cm}^{-1}$  para o CDNB foi utilizado para calcular a atividade da enzima.

### **3.5.3. Avaliação dos conteúdos de GSH:**

Os níveis de GSH foram medidos após a precipitação da proteína da alíquota do homogenato tecidual com ácido tricloroacético 10% e centrifugação (10.000 g / 15 min. / 4 °C). No ensaio, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  do extrato tecidual e 230  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-base (0,4 M, pH 8,9) a uma nova microplaca. Como branco, foi utilizado 230  $\mu\text{L}$  do tampão Tris-base 0,4 M mais 50  $\mu\text{L}$  de TCA 10% em PBS. Por último, 20  $\mu\text{L}$  de DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico) 2,5 mM (em metanol 25%, tampão Tris-base 300 mM, pH 8,9) foi rapidamente acrescentado e procederam-se imediatamente as medidas de absorbância (415 nm em espectrofotômetro) (SEDLAK e LINDSAY, 1968) A determinação do conteúdo de GSH foi realizada através de comparação com curva-padrão de GSH (0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 e 32 nM GSH).

### **3.5.4. Avaliação da peroxidação de lipídios (LPO):**

A LPO foi medida pelo método FOX (*Ferrous Oxidation in Xylenol-orange*) segundo método descrito por Jiang et al. (1991; 1992) um volume de 800  $\mu\text{L}$  de solução de reação (laranja de xilenol 0,1 mM,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  25 mM, hidroxitolueno butilado 4,0 mM e  $\text{FeSO}_4\cdot\text{NH}_4$  0,25 mM - sulfato de ferroso amoniacal em metanol 100%) foi adicionado a tubos contendo 100  $\mu\text{L}$  do extrato tecidual ou tampão fosfato (para o branco). A solução foi misturada e incubada durante 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, estes tubos foram centrifugados ( $10.000 \times g / 5 \text{ min} / 4 \text{ }^\circ\text{C}$ ), e 250  $\mu\text{L}$  deste sobrenadante foram colocados em uma microplaca de 96 poços e a absorbância medida a 550 nm em espectrofotômetro. Para determinar a concentração hidroperóxidos lipídicos (metabólitos resultantes da peroxidação lipídica), o coeficiente de extinção molar aparente utilizado para  $\text{H}_2\text{O}_2$  e para hidroperóxidos de cumeno foi de  $4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  através de cálculo estabelecido pelo mesmo autor.

### **3.5.5. Quantificação de proteínas totais:**

As proteínas totais foram quantificadas de acordo com Bradford (1976). Para o ensaio, 10  $\mu\text{L}$  do sobrenadante ou tampão fosfato (para o branco) e 250  $\mu\text{L}$  de reagente de Bradford (azul brilhante de Coomassie BG-250) foram adicionados a uma microplaca de 96 poços e a absorbância foi medida a 595 nm. O teor de proteína foi calculado através de comparação com uma curva padrão de albumina de soro bovino.

### 3.6. Análises estatísticas:

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão de determinações de grupo com 10 repetições. Análise de variância (ANOVA) seguida pela análise *post hoc* por meio do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) foram realizados para análise bioquímica. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. As correlações entre a atividade de AChE e a concentração de CYN no músculo e no cérebro foram analisados pelo teste de correlação de Pearson.

## 4. RESULTADOS

Todos os resultados da concentração de CYN (média  $\pm$  desvio-padrão) estão expressos em  $\mu\text{g}$  CYN/kg de órgão/tecido. O dados brutos em relação às análises estão no anexo 2 desta tese.

### 4.1 Detecção e quantificação de CYN no cérebro:

Observou-se uma concentração no cérebro de  $0,259 \pm 0,095$  e  $0,253 \pm 0,157$ , após 7 e 14 dias de exposição, respectivamente, após a exposição à CYNex. Não houve diferença significativa nos níveis de CYN cerebrais entre estes dois períodos observados. Quando expostos a toxina purificada (CYNp) os valores foram bastante diferentes, mostrando uma menor concentração no cérebro de  $0,168 \pm 0,099$  e  $0,109 \pm 0,070$ , depois de 7 e 14 dias, respectivamente. Da mesma forma, não foi encontrada diferença significativa entre os dois períodos observados.

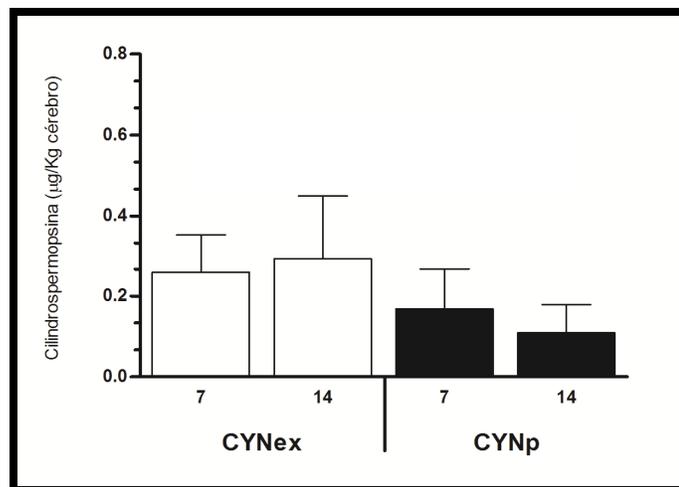


Figura 4 - Concentrações de cilindrospermopsina no cérebro de *H. malabaricus* expostos a uma dose única de CYN ( $50 \mu\text{g}$  CYN  $\text{kg}^{-1}$  peso corpóreo) em extrato aquoso (CYNex) e CYN purificada (CYNp) após 7 e 14 dias.

Barras indicam os desvios-padrão. Valores de concentração de CYN obtidos após subtração dos valores nos animais controle (falso-positivos).

#### 4.2. Detecção e quantificação de CYN no músculo:

Foi detectada a presença da toxina no tecido muscular após 7 ( $0,772 \pm 0,433$ ) e 14 ( $0,204 \pm 0,112$ ) dias de exposição a CYNex. Peixes expostos a CYNp também apresentaram a presença de CYN em 7 ( $0,429 \pm 0,249$ ) e 14 ( $0,209 \pm 0,196$ ) dias após a exposição. Os níveis de CYN foram significativamente superiores em peixes expostos a CYNex após 7 dias comparativamente com 14 dias pós-exposição ( $p < 0,001$  - figura 5).

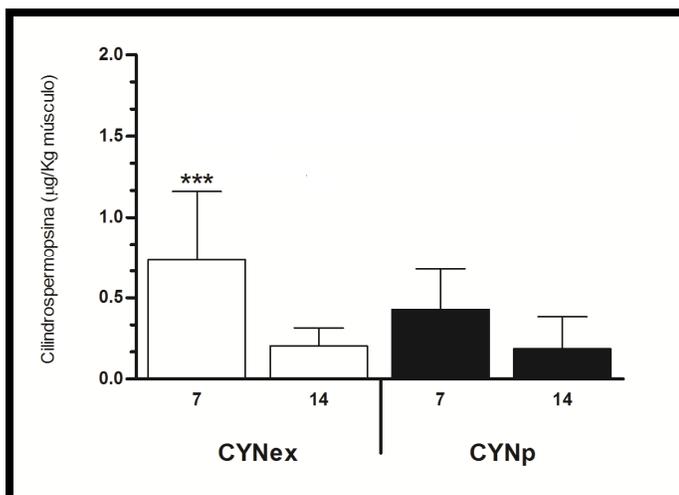


Figura 5 - Concentrações de cilindrospermopsina no músculo de *H. malabaricus* expostos a uma dose única de CYN ( $50 \mu\text{g CYN} \cdot \text{kg}^{-1}$  peso corpóreo) em extrato aquoso (CYNex) e CYN purificada (CYNp) após 7 e 14 dias. Barras indicam os desvios-padrão. Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa entre os dias do mesmo tratamento, onde \*\*\* indica que  $p < 0,001$ . Valores de concentração de CYN obtidos após subtração dos valores nos animais controle (falso-positivos).

Comparativamente, de uma maneira geral, e embora não hajam diferenças significativas, as concentrações de CYN são maiores quando os peixes estão expostos a CYNex do que CYNp para ambos os tecidos estudados (figuras 4 e 5). É notável que, mesmo depois de 14 dias de exposição, são encontradas concentrações de CYN no cérebro no grupo CYNex.

### 4.3. Análises bioquímicas:

A atividade da AChE aumentou no cérebro dos peixes expostos a CYNex no 7º dia pós-exposição (44%,  $p < 0,01$ ), mas retornou ao nível do controle após 14 dias. Inversamente, a exposição à CYNp levou a uma diminuição significativa (24%,  $p < 0,01$ ) de atividade da AChE após 14 dias de exposição, em comparação com o controle e com o grupo CYNex (figura 6).

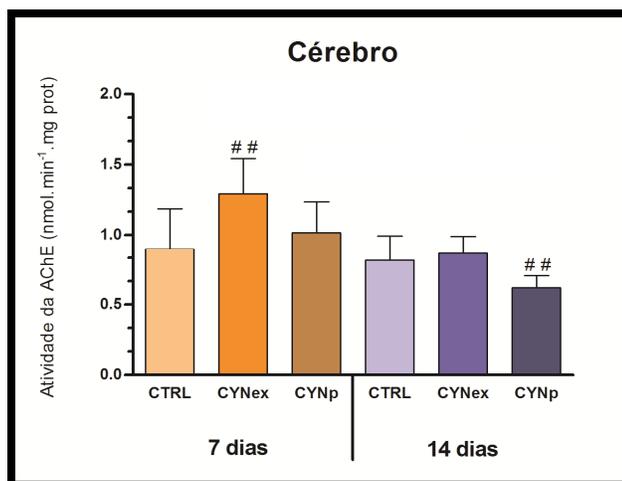


Figura 6 - Efeitos sobre a atividade da AChE no cérebro de *H. malabaricus* 7 e 14 dias após exposição a uma dose única de CYN ( $50 \mu\text{g CYN kg}^{-1}$  peso corpóreo) em extrato aquoso e CYN purificada. Barras indicam os desvios-padrão. O símbolo # indica diferença estatisticamente significativa comparando os grupos expostos (Extrato aquoso – CYNex, e toxina purificada – CYNp) com seu respectivo controle (Controle – CTRL), onde ## indica que  $p < 0,01$ .

Para o tecido muscular, os indivíduos expostos a CYNex e CYNp apresentaram redução significativa na atividade da enzima comparando-os ao grupo controle (38%,  $p < 0,05$  e 57%,  $p < 0,01$ , respectivamente), após 7 dias de exposição e não foram observadas diferenças entre os grupos no 14º dia (figura 7).

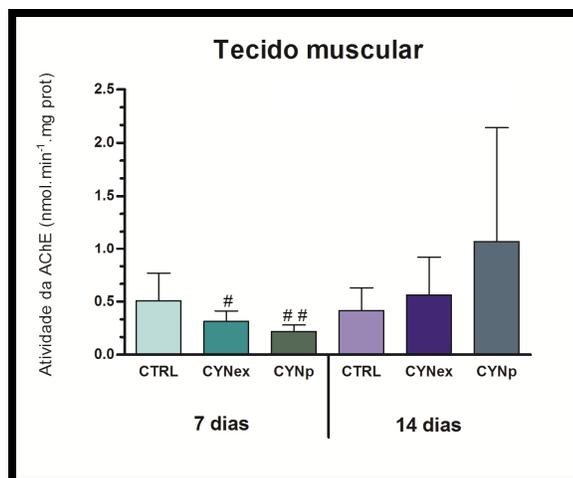


Figura 7 - Efeitos sobre a atividade da AChE no tecido muscular de *H. malabaricus* 7 e 14 dias após exposição a uma dose única de CYN ( $50 \mu\text{g CYN kg}^{-1}$  peso corpóreo) em extrato aquoso e CYN purificada. Barras indicam os desvios-padrão. O símbolo # indica diferença estatisticamente significativa comparando os grupos expostos (Extrato aquoso – CYNex, e toxina purificada – CYNp) com seu respectivo controle (Controle – CTRL), onde # e ## indica que  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente.

Quanto aos marcadores de desequilíbrio oxidativo estudados, não houve diferença significativa na atividade da GST no cérebro dos grupos expostos à CYN, considerando 7 dias de exposição, mas uma diferença significativa (36%,  $p < 0,05$ ) entre as condições CYNp e CYNex ocorreu neste período. Diferentemente, um aumento significativo em relação ao controle foi observado na atividade da GST após 14 dias de exposição para ambos os grupos expostos (31%,  $p < 0,05$  – CYNex; 35%,  $p < 0,01$  - CYNp) (figura 8).

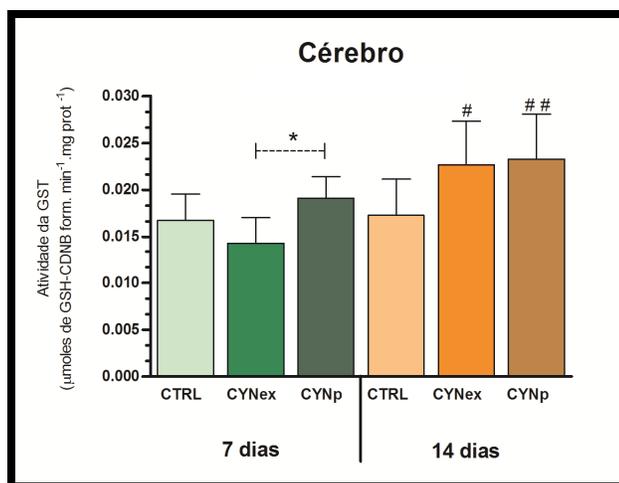


Figura 8 - Efeitos sobre a atividade da GST no cérebro de *H. malabaricus* 7 e 14 dias após exposição a uma dose única de CYN ( $50 \mu\text{g CYN. kg}^{-1}$  peso corpóreo) em extrato aquoso e CYN purificada. Barras indicam os desvios-padrão. Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos do mesmo dia de coleta, onde \* indica que  $p < 0,05$ . O símbolo # indica diferença estatisticamente significativa comparando os grupos expostos (Extrato aquoso – CYNex, e toxina purificada – CYNp) com seu respectivo controle (Controle – CTRL), onde # e ## indica que  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente.

Não houve alteração significativa nos níveis de GSH após a exposição à CYN, tanto purificada quanto através de extrato, em ambos os períodos de amostragem (figura 9).

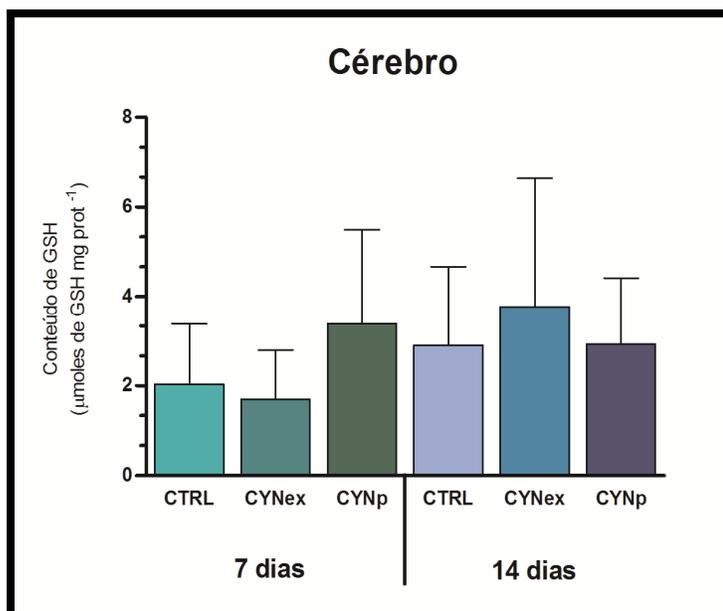


Figura 9 - Efeitos sobre o conteúdo de GSH no cérebro de *H. malabaricus* 7 e 14 dias após exposição a uma dose única de CYN ( $50 \mu\text{g CYN. kg}^{-1}$  peso corpóreo) em extrato aquoso e CYN purificada. Barras indicam os desvios-padrão.

No entanto, houve aumento na peroxidação lipídica após a exposição ao CYNex ( $p < 0,001$ ) e CYNp ( $p < 0,01$ ) no 7º dia (aumento de 74%) e 14º dia (aumento de 80%) em relação ao controle (figura 10).

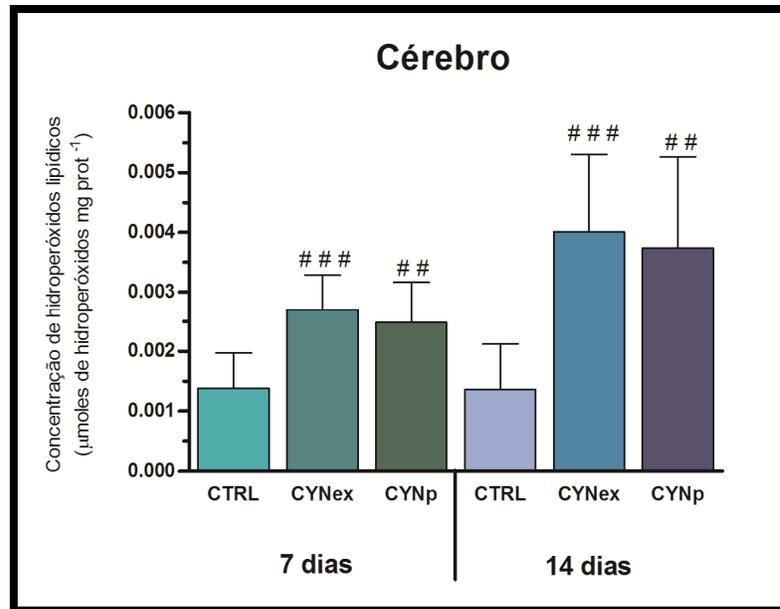


Figura 10 - Efeitos sobre a concentração de hidroperóxidos lipídicos no cérebro de *H. malabaricus* 7 e 14 dias após exposição a uma dose única de CYN ( $50 \mu\text{g CYN kg}^{-1}$  peso corpóreo) em extrato aquoso e CYN purificada. Barras indicam os desvios-padrão. O símbolo # indica diferença estatisticamente significativa comparando os grupos expostos (Extrato aquoso – CYNex, e toxina purificada – CYNp) com seu respectivo controle (Controle – CTRL), onde ## e ### indica que  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente.

## 5. DISCUSSÃO

A detecção da CYN no cérebro de peixes expostos tanto ao extrato aquoso contendo CYN (CYNex) ou toxina purificada (CYNp) mostrou que este órgão é um alvo de CYN. Além disso, a detecção de concentrações mais elevadas de toxina (sem diferença significativa) nos peixes expostos a CYNex é um importante tema de investigação. Embora não exista uma explicação razoável para este resultado, a hipótese de outros compostos presentes no extrato aquoso estarem auxiliando a entrada da toxina em tecidos ou órgãos deve ser considerada. A ocorrência de outras substâncias pode favorecer a absorção de toxina ou, mais provavelmente, prejudicar o efluxo ou influxo da toxina através da inibição de transportadores de membrana, tais como aqueles de fenótipo de resistência a multixenobióticos (MXR), como foi recentemente relatado por Liebel et al. (2011) em hepatócitos de peixe.

Transportadores podem auxiliar ou prejudicar a entrada da toxina em tecidos ou órgãos. Além disso, os transportadores MXR nas células endoteliais cerebrais são essenciais para função regulatória de barreira hematoencefálica (KING et al., 2001). Desta forma, qualquer substância que afetá-los pode tornar o cérebro mais sensível às toxinas exógenas e endógenas. Como demonstrado nos resultados deste trabalho, o intervalo entre a primeira coleta (7º dia) e a segunda (14º dia), não foi suficiente para que *H. malabaricus* eliminasse a toxina do cérebro. Desta forma, observamos que CYN pode se concentrar no cérebro dos peixes expostos a concentrações suficientes para causar danos neurotóxicos.

A neurotoxicidade é um efeito importante de cianotoxinas como, por exemplo, anatoxina-a e a(s), saxitoxina (BAKKE e HORSBERG, 2007) e microcistinas (FEURSTEIN et al., 2010), mas não há dados disponíveis para CYN a este respeito.

Neste estudo, a atividade da AChE diminuiu no cérebro (14º dia) e músculo (7º dia) dos peixes expostos a CYNp, indicando possíveis efeitos inibitórios da CYN, os quais podem

ser devidos a competição (dado não confirmado) com a acetilcolina como substrato endobiótico para a ACHE (KISS et al., 2002). A consequência da inibição da AChE é o aumento da concentração de acetilcolina na fenda sináptica. Dependendo do nível de inibição, uma super-estimulação dos neurônios pós-sinápticos pode induzir diferentes perturbações fisiológicas como hiperatividade, com alteração dos níveis de ácido láctico nos tecido muscular, assim como uma super-estimulação nas células glandulares.

No caso de *H. malabaricus*, a diminuição da atividade da AChE ocorreu após a exposição a CYNp (no 7º dia no músculo e no 14º dia no cérebro), assim como no músculo dos animais expostos ao CYNex (7º dia). Apesar de não ter sido realizado o acompanhamento do animal ao longo do experimento, há a possibilidade de uma recuperação da atividade da AChE no músculo após 14 dias, uma resposta que poderia ser atribuída ao aumento da síntese da enzima ou então a depuração dos produtos tóxicos presentes no extrato. Além disso, a possível síntese compensatória também foi observada no 7º dia no cérebro (grupo CYNex), mas os níveis voltaram à normalidade no 14º dia. Por outro lado, um efeito inibidor tardio (diminuição da atividade da AChE) foi observado para CYNp no cérebro comparativamente ao músculo, resposta que não pode ser explicada pelos níveis de CYN, mas pode ser um resultado dos sistemas de defesa das células. Essas hipóteses são pontos importantes para uma investigação mais aprofundada.

Importantes mecanismos de defesa antioxidante e de desintoxicação dependem dos níveis de glutathione (GSH). GSH é um tripeptídeo endógeno muito importante nos tecidos com alto metabolismo aeróbico, como o cérebro, para controlar os níveis de espécies oxidativas. Assim, a capacidade de CYN para diminuir ou mesmo inibir a síntese de GSH (RUNNEGAR et al. 1994, 1995; HUMPAGE et al. 2005) representa um risco funcional grave para o cérebro. O presente estudo mostrou que a concentração de GSH não é afetada pela exposição à CYN no cérebro dos animais, sugerindo que não há interferência da toxina nos

níveis de GSH ou então, houve uma recuperação destes níveis após 7 dias de exposição. A recuperação de GSH já foi relatada em peixes após 5 dias de exposição à CYN (I.P), que primariamente tiveram um diminuição desta concentração nas primeiras 24 horas pós-injeção (GUTIÉRREZ-PRAENA et al. 2011a e b), o que pode confirmar os resultados atuais.

Além das funções antioxidantes, GSH é um co-substrato para a enzima de conjugação glutathiona S-transferase (GST), que catalisa a conjugação de compostos eletrofílicos e hidroperóxidos orgânicos com GSH (ARTEEL e SIES, 2001). De fato, a presença destes substratos podem explicar o aumento da atividade de GST após a exposição à CYNex e CYNp. Muitos substratos de GST podem induzir o aumento da expressão desta enzima, nesse caso, isso ocorreu muito tarde (levou mais de 7 dias), refletindo a baixa capacidade de desintoxicação do cérebro, ou talvez a quantidade inicial de CYN nesses tecidos não tenha sido suficiente para ativar a expressão em 7 dias. Do mesmo modo, o aumento da atividade da GST tem sido relatada para o fígado de peixe (*Oreochromis niloticus* - Tilápia) após a exposição à CYN (PUERTO et al., 2011a) e saxitoxina (CLEMENTE et al., 2010) e para o cérebro após a exposição à microcistina-RR (CAZENAVE et al., 2008). Várias cianotoxinas são metabolizadas pela GST, mas ainda não está claro se CYN é um substrato para esta enzima.

Seja qual for o papel exato (direto ou indireto) da GST em relação à defesa da célula contra a CYN, a atividade aumentada da GST e os níveis inalterados de GSH não foram eficientes para evitar os efeitos de diminuição da atividade da AChE e peroxidação lipídica no cérebro. Uma severa peroxidação de lipídios causa perda da fluidez, aumento da permeabilidade e uma eventual ruptura da membrana (GUTTERIDGE, 1995). É essencial, portanto, que as células neutralizem os hidroperóxidos lipídicos e seus subprodutos, seja através da conjugação com GSH, seja por outros meios. No entanto, neste trabalho a constatação de que o aumento da peroxidação lipídica tenha ocorrido já no dia 7 e não tenha

vido neutralizada nos 7 dias seguintes indica um estresse contínuo, que pode eventualmente levar a um mau funcionamento da célula ou mesmo morte celular.

Outros estudos já relataram o potencial da CYNp em alterar a homeostase redox e levar a peroxidação lipídica em hepatócitos (LIEBEL et al., 2011) e fígado de peixes (PUERTO et al., 2011a; GUTIÉRREZ-PRAENA et al., 2011b), no entanto, os efeitos da toxina sobre o cérebro podem ser mais graves uma vez que se trata do órgão sensorial, motor e controlador do metabolismo animal. Além disso, estudos com *H. malabaricus* expostos ao extrato de cianobactérias contendo saxitoxina apresentaram alterações nos biomarcadores investigados (GST, GSH e LPO) (SILVA et al., 2011), indicando que o potencial neurotóxico da CYN é contundente, uma vez que ambas são alcalóides.

Infelizmente, não foi possível estudar o comportamento dos peixes após a exposição à CYN, mas existem dados sobre efeitos de outras cianotoxinas (microcistinas e saxitoxina) sobre a atividade de natação dos peixes (CAZENAVE et al., 2008; CLEMENTE et al., 2010). Logo, os resultados obtidos neste trabalho levantam a necessidade de estudos em relação às consequências da exposição à CYN no aspecto comportamental destes animais.

Muito embora tenham sido observadas alterações nos biomarcadores analisados neste estudo, não foi possível observar diferenças significativas em relação à toxicidade quando os animais foram expostos ao extrato tóxico ou à toxina purificada sugerindo que ambas as formas foram neurotóxicas para os peixes. De acordo com a literatura, os extratos tóxicos contendo cianotoxinas são geralmente mais tóxicos do que a toxina isolada/purificada devido à sinergia entre os compostos bioativos e a toxina (FALCONER, 2007, KINNEAR, 2010; GUTIÉRREZ-PRAENA et al., 2011b).

## 6. CONCLUSÕES

- A detecção de CYN no cérebro dos animais mostrou que a CYN é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica.
- A exposição de *H. malabaricus* à CYN levou à diminuição da atividade da AChE (CYNp) bem como a aumentos da atividade de GST e peroxidação lipídica (tanto para CYNp quanto para CYNex) no cérebro desta espécie.
- Os efeitos estavam presentes mesmo 14 dias após a exposição, indicando a ineficiência dos mecanismos de desintoxicação celulares para neutralizar e/ou eliminar a CYN.
- Os efeitos neurotóxicos observados no cérebro foram corroborados pela diminuição da atividade da AChE no músculo dos peixes.
- Tanto os efeitos quanto a presença da CYN no cérebro indicam que esta toxina tem um papel neurotóxico importante nos peixes expostos.

## CAPÍTULO II

### HEPATOTOXICIDADE DA CILINDROSPERMOPSINA EM

#### *Hoplias malabaricus*.

#### RESUMO

Cilindrospermopsina (CYN) é uma cianotoxina que inibe as sínteses de proteína e GSH. No entanto, há poucos estudos toxicológicos que mostram esse tipo de dano em peixes tropicais, especialmente comparando a toxina purificada e extrato contendo CYN. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a hepatotoxicidade através dos níveis de estresse oxidativo e histopatologia em diferentes biomarcadores em uma espécie de peixe tropical (*Hoplias malabaricus*) expostas a uma dose única ( $50 \mu\text{g CYN peixe kg}^{-1}$ ) em duas formas de CYN - Extrato aquoso tóxico (CYNex) e toxina purificada (CYNp) - por injeção intraperitoneal (i.p.). Os peixes foram sacrificados 7 e 14 dias pós-exposição, então o fígado foi removido para as respectivas análises. Por meio de ELISA, a CYN foi detectada em níveis similares em ambas as datas. Alguns biomarcadores não apresentaram alterações no período observado (atividades da catalase, GPx, GR e níveis de GSH), embora tenha sido observado um aumento nas atividades de SOD (CYNex em 14 dias e no 7º dia em CYNp) e G6PDH (CYNex em 14 dias). Atividade da GST diminuiu no 7º dia (CYNex), mas aumentou dramaticamente no 14º dia (CYNp). Houve um aumento na concentração de hidroperóxidos lipídicos (CYNex e CYNp) e oxidação de proteínas (somente em CYNex), ambos após 14 dias de exposição, caracterizando dano oxidativo no fígado. Corroborando os resultados bioquímicos, alterações histopatológicas foram observadas (necrose), indicando sérios danos nesse tecido. A incidência de centros de melanomacrófagos e melanomacrófagos livres sugere uma resposta imune neste órgão devido à morte celular observada. Assim, a exposição aguda de CYN é capaz de causar danos bioquímicos e morfológicos graves no fígado de *H. malabaricus*, sugerindo que a peroxidação de lípidios e a carbonilação de proteínas (PCO) constituem importantes parâmetros de citotoxicidade da CYN. O fato da toxina pura não tem gerado PCO indica que outras moléculas presentes no extrato também possuem um elevado grau de toxicidade, que é uma questão importante para estudos posteriores.

**Palavras-chave:** cilindrospermopsina; estresse oxidativo; histopatologia; teleósteo; *Hoplias malabaricus*.

## 1. INTRODUÇÃO

A emissão de gases de efeito estufa somado ao constante despejo de esgotos doméstico e industrial tem sido identificada como as principais causas de florações de cianobactérias em todo o mundo (PEARL e HUISMAN, 2008; EL-SHEHAWY et al, 2011). Estes microrganismos já foram identificados em casos de envenenamento e morte de seres humanos e animais uma vez que muitas espécies são capazes de produzir metabolitos conhecidos como cianotoxinas (CHORUS e BARTRAM, 1999).

Como já mencionado no capítulo I, a cilindrospermopsina (CYN) é um cianotoxina citotóxica (FROSCIO et al., 2009) que é primariamente tóxica para o fígado e rins de mamíferos, mas atinge vários outros órgãos (FUNARI e TESTAI, 2008). Esta cianotoxina é produzida por várias espécies de cianobactérias (ŽEGURA et al., 2011), e está envolvida em casos de intoxicação e morte de animais, incluindo seres humanos (HAWKINS et al, 1985; CARMICHAEL et al, 2001; GRIFFITHS e SAKER, 2003).

Em células de mamíferos, o mecanismo de toxicidade primário da CYN é a inibição de síntese de proteínas (TERAO et al., 1994; FROSCIO et al., 2003) e de glutathiona (GSH) (RUNNEGAR et al., 1994, 1995). No entanto, sugere-se que os metabólitos gerados pela ação do complexo citocromo P450 desempenham um papel crucial na toxicidade da CYN (HUMPAGE et al, 2005; ŽEGURA et al., 2011). Além disso, há fortes evidências de que a CYN é genotóxica e tem um potencial carcinogênico (SHEN et al., 2002; ŽEGURA et al., 2011; ŠTRASER et al., 2012).

A injeção intraperitoneal de CYN radio-marcada resultou na distribuição predominantemente hepática (NORRIS et al. 2001). Efeitos de intoxicação em humanos incluem, principalmente, hepatoenterite (BYTH, 1980). No fígado de ratos, a CYN causa necrose severa (HAWKINS et al., 1985), esteatose hepática com necrose periacinar (SEAWRIGHT et al., 1999), e aumento do peso deste órgão (HUMPAGE e FALCONER,

2003). Terao et al. (1994) verificaram a inibição da síntese de proteínas no fígado de camundongos a partir da dissociação observada dos ribossomos do retículo endoplasmático, seguido pela proliferação da membrana, a acumulação de gotículas de gordura, e morte celular.

A importância dos danos oxidativos como um dos mecanismos tóxicos da CYN ainda não é clara. Primariamente, Froscio (2002) descartou a possibilidade de que a toxicidade da CYN estivesse ligada a danos oxidativos, entretanto, de acordo com ensaios *in vitro*, a citotoxicidade da CYN pode ser mediada pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). O papel da GSH como molécula antioxidante parece ser mais importante nos mamíferos do que em peixes (HUMPAGE et al, 2005; LIEBEL et al., 2011, GUTIÉRREZ-PRAENA et al., 2012a). Adicionalmente, Froscio (2002) e Humpage et al. (2005) excluíram a peroxidação lipídica como um mecanismo tóxico da CYN, mas estudos mais recentes têm indicado exatamente o contrário (PUERTO et al., 2011; GUTIÉRREZ-PRAENA et al., 2011a e b, 2012a e b; LIEBEL et al., 2011).

Em geral, os efeitos tóxicos da CYN podem ser mais pronunciados por exposição ao extrato tóxico do que a toxina pura, provavelmente devido à presença de outras substâncias químicas bem como as interações entre CYN e outras moléculas presentes no extrato (FALCONER, 2007). Contudo, poucos estudos têm relatado os efeitos tóxicos de ambos (purificada e extrato) em peixes (GUTIÉRREZ-PRAENA et al., 2011a e b; 2012b).

Os peixes são importantes modelos para a investigação dos efeitos das cianotoxinas devido ao contato direto destes animais com estes metabólitos, seja pelo fato dos últimos estarem dissolvidos na água ou pela ingestão de células de cianobactérias propriamente ditas. Além disso, os vertebrados aquáticos parecem ser mais suscetíveis aos efeitos tóxicos de cianotoxinas do que organismos inferiores na cadeia trófica (KINNEAR, 2010). Nesse sentido, o peixe neotropical *Hoplias malabaricus* foi escolhido para o presente estudo, devido

à sua ampla utilização como modelo experimental para avaliar a toxicidade de uma variedade de compostos (RABITTO et al, 2005; OLIVEIRA RIBEIRO et al, 2006; MELA et al, 2007; FILIPAK NETO et al., 2007; MELA et al., 2010).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

- Avaliar os efeitos tóxicos da CYN sobre o fígado do peixe neotropical *H. malabaricus* exposto a uma dose única de CYN purificada e de extrato aquoso contendo CYN.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Verificar a presença de CYN no fígado de *H. malabaricus* após injeção intraperitoneal;
- Avaliar os efeitos da toxina utilizando diferentes biomarcadores de desequilíbrio e dano oxidativo:
- Avaliar os danos no tecido hepático do animal através de análises histopatológicas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O cultivo da cepa CYP011K da espécie *C. raciborskii*, a purificação, extração e análise da CYN, bem como o desenho experimental e a quantificação e detecção da CYN no fígado de *H. malabaricus* já foram reportados nos itens 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4, respectivamente, do Capítulo I.

#### 3.1. Biomarcadores de desequilíbrio e dano oxidativo:

Alíquotas das amostras de fígado homogeneizadas (0,3 - 0,4 gramas) em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,2), centrifugado (12.000 rpm / 0-4 °C / 40 min.) e armazenado a -76 °C. Amostras foram diluídas de acordo com a concentração de proteína necessária para cada ensaio.

O procedimento de cálculo das atividades dos biomarcadores avaliados está no anexo I desta tese.

##### 3.1.1. Avaliação da atividade da CAT:

A atividade de CAT foi medida de acordo com a Aebi (1984). Brevemente, um volume de 20 µL do sobrenadante ou PBS (para o branco) foi misturado com 980 µL de meio de reação (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM, Tris-base 50 mM, EDTA 0,25 mM, pH 8,0 a 25 °C). A variação da absorbância a 240 nm foi monitorado durante 90 segundos com intervalo entre as medições de 1 segundo. O coeficiente de extinção de 36 mM cm<sup>-1</sup> para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi utilizado para calcular a atividade da enzima.

### **3.1.2. Avaliação da atividade da SOD:**

Etanol gelado (aproximadamente 4°C) foi adicionado ao sobrenadante ou PBS (para o branco) até atingir a concentração final de etanol de 25%. A mistura foi centrifugada (12.000 g / 20 min / 0-4 °C). Em uma microplaca de 96 poços, 20 µL de sobrenadante (25% de etanol para o branco) e 70 µL de meio de reação (cloreto de *nitroblue tetrazolium* 286 µM, EDTA 0,05 mM, carbonato de sódio 69 mM, pH 10,2) foram misturados. Para iniciar a reação foram adicionados 110 µL de cloreto de hidroxilamina 67 mM em tampão carbonato de sódio 182 mM, pH 10,2. A atividade da SOD foi medida a 560 nm, no início da reação e depois de 2 horas de incubação (CROUCH et al. 1981). A taxa de redução do NBT na ausência de extrato de tecido (solução hidro-alcoólica ao invés de amostra) foi utilizada como taxa de referência.

### **3.1.3. Avaliação da atividade da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH):**

Em uma microplaca transparente de 96 poços foram adicionados 30 µL de sobrenadante (PBS como branco) e 170 µL de meio de reação ( $\beta$ -NADP<sup>+</sup> 1,0 mM, G6P 2,0 mM, Tris-HCl 0,1 M, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 8,0 a 25 °C). A atividade foi espectrofotometricamente verificada pela variação na absorbância a 340 nm durante 2 minutos em intervalos de 20 segundos (GLOCK e MCLEAN, 1953). O coeficiente de extinção para NADPH de 6,22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> foi usado para calcular a atividade da enzima.

### **3.1.4. Avaliação da atividade da GPx:**

A atividade da GPx foi determinada na fração S9 (sobrenadante obtido após centrifugação a 9.000 g por 15 minutos). Em uma microplaca de 96 poços foi misturado um volume de 30 µL do sobrenadante (fração S9) ou PBS (para o branco) e 130 µL de solução de reação (Azida sódica 2,0 mM,  $\beta$ -NADPH 0,2 mM, 1,0 U.mL<sup>-1</sup> de glutatona redutase e GSH

2,0 mM em tampão fosfato de sódio 0,1 mM, pH 7,0). A reação foi iniciada pela adição de 40 µL de peróxido de hidrogênio 30% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0. A variação da absorbância foi imediatamente medida a 340 nm durante 2 minutos com intervalos de 10 segundos (SIES et al., 1979). O coeficiente de extinção para NADPH de  $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  foi usado para calcular a atividade da enzima.

### **3.1.5. Atividade da glutathione redutase (GR):**

Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 50 µL do sobrenadante obtido da fração S9 ou PBS (para o branco) e 100 µL solução de reação ( $\beta$ -NADPH 0,5 mM, glutathione oxidada (GSSG) 5,0 mM, EDTA 5,0 mM, tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,6 a 25 °C). O decréscimo na absorbância foi monitorado a 340 nm durante 5 minutos com intervalos de 30 segundos (SIES et al. 1979). O coeficiente de extinção de  $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para NADPH foi utilizado para calcular a atividade da enzima.

### **2.1.6. Avaliação da atividade global das isoformas da glutathione S-transferase (GST):**

Um volume de 20 µL de sobrenadante (PBS para o branco) e 180 µL de meio de reação (idêntico ao explicitado no item 3.5.2. do capítulo I) foi colocado em microplacas de 96 poços e o procedimento realizado foi semelhante ao descrito no item 3.5.2 do capítulo I desta tese.

### **3.1.7. Avaliação dos conteúdos de GSH:**

As concentrações de GSH foram determinadas através do mesmo procedimento utilizado no item 3.5.3 do Capítulo I.

### **3.1.8. Avaliação da peroxidação lipídica (LPO):**

A LPO foi medida pelo método já descrito no item 3.5.4 do Capítulo I.

### **3.5.9. Avaliação da carbonilação de proteínas (PCO):**

Um volume de 200  $\mu\text{L}$  de sobrenadante e 500  $\mu\text{L}$  de solução de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina 10 mM em ácido clorídrico 2,0 M) foram transferidos para um tubo de 2,0 mL e misturados em vortex. Para o branco foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de ácido clorídrico 2,0 M (sem DNPH). As amostras foram incubadas (30 °C / 1,5 horas), e então, em seguida, foi adicionado 1,0 mL de ácido tricloroacético 28%. Esta solução foi centrifugada (9.000 g / 10 min.) e o sobrenadante descartado. As proteínas precipitadas foram ressuspensas com solução de etanol / acetato de etila (1:1) e centrifugadas. Este procedimento foi repetido por 2 a 3 vezes para obtenção de um sobrenadante limpo e translúcido. As proteínas precipitadas foram solubilizadas em hidrocloreto de guanidina 6,0 M, e novamente centrifugadas (9000 g / 5 min.) para remover qualquer vestígio de material insolúvel. O conteúdo de carbonilas foi determinado espectrofotometricamente a 360 nm usando o coeficiente de absorção molar de  $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para hidrazonas e normalizado pelo teor de proteína total (LEVINE et al, 1994;. QUINLAN e GUTTERIDGE , 2000).

### **3.1.10. Quantificação de proteínas totais:**

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo mesmo método já descrito no item 3.5.5 do Capítulo I.

### **3.2. Biomarcadores histopatológicos:**

As amostras de fígado foram fixadas em solução de ALFAC (etanol a 70%: 4% de formaldeído: ácido acético a 5%) durante 16 h, lavadas em etanol 70%, desidratadas em série crescente de etanol, diafanizados em xilol e incluídos e emblocados em resina Paraplast® (Sigma). Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE), analisados e registrados em fotomicroscópio de luz (Leica).

As alterações histopatológicas foram analisadas segundo Bernet et al. (1999) através do cálculo do índice de lesão para o tecido, considerando: a ocorrência de necrose, respostas inflamatórias, esteatose, ocorrência (contagem) de centros de melanomacrófagos (CMM) e melanomacrófagos livres (ML), focos basófilos e acidófilos, parasitas e diferenciação tecidual.

### **3.3. Análise estatística dos dados obtidos:**

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão de determinações de grupo com 10 repetições. Análise de variância (ANOVA) seguida pela análise *post hoc* por meio do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) foram realizados para análise bioquímica. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Concentração de CYN no fígado:

Todos os resultados da concentração CYN (média  $\pm$  desvio-padrão) estão expressos em  $\mu\text{g CYN kg}^{-1}$ . Os dados brutos em relação às análises estão no anexo 2 desta tese.

Houve detecção de CYN no fígado de *H. malabaricus* após exposição com CYNp em 7 ( $7,90 \pm 4,19$ ) e 14 dias ( $10,51 \pm 5,39$ ) e no grupo CYNex apresentou concentrações de CYN em 7 ( $6,79 \pm 3,72$ ) e 14 dias ( $5,61 \pm 3,19$ ) (Figura 11).

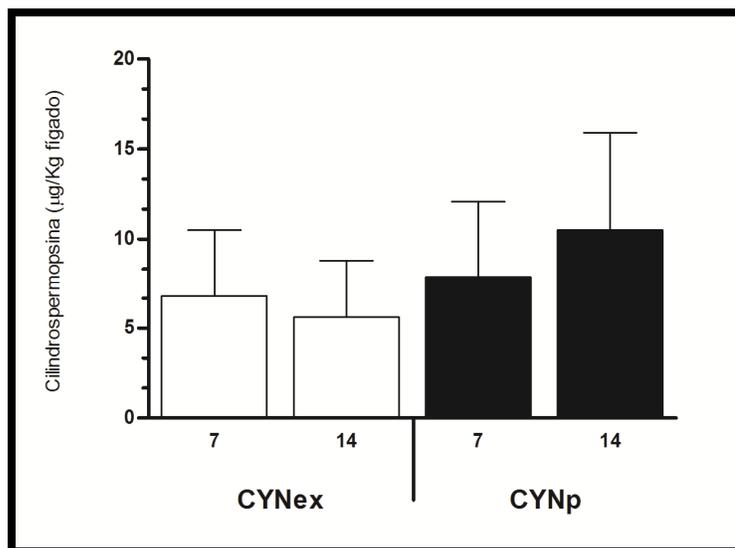


Figura 11- Concentrações de cilindropermopsina no fígado de *H. malabaricus* expostos a uma dose única de CYN ( $50 \mu\text{g CYN kg}^{-1}$  peso corpóreo) em extrato aquoso (CYNex) e CYN purificada (CYNp) após 7 e 14 dias. Barras indicam os desvios-padrão. Valores de concentração de CYN obtidos após subtração dos valores nos animais controle (falso-positivos).

### 4.2. Biomarcadores bioquímicos:

Para o melhor entendimento, as variações nas atividades enzimáticas de CAT, SOD, GPx, GR, GST, G6PDH, nos conteúdos de GSH, além das alterações de LPO e PCO, em ambos os tratamentos foram tabeladas (Tabela 1) como pode ser observado a seguir:

Tabela 1: Respostas bioquímicas - percentual de aumento ou redução em relação ao respectivo controle.

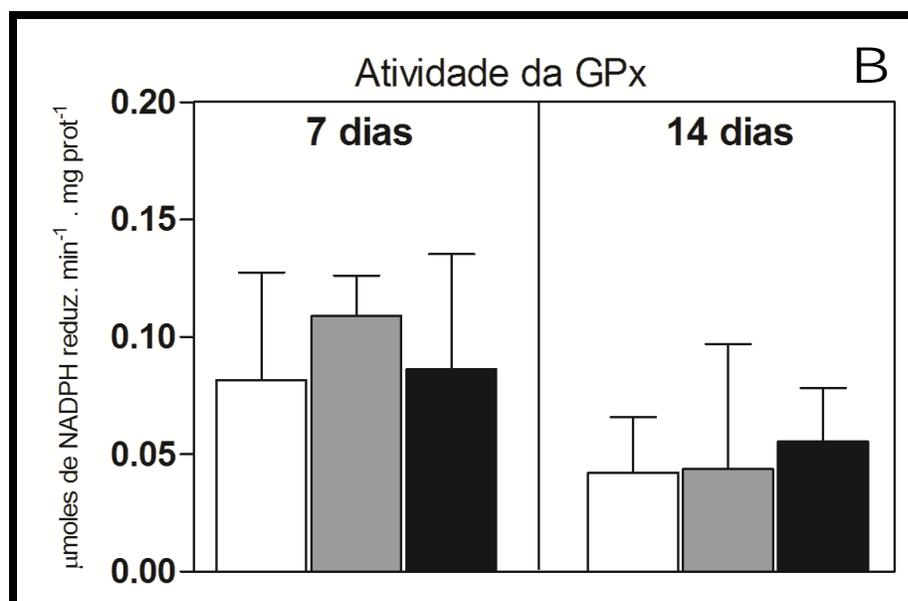
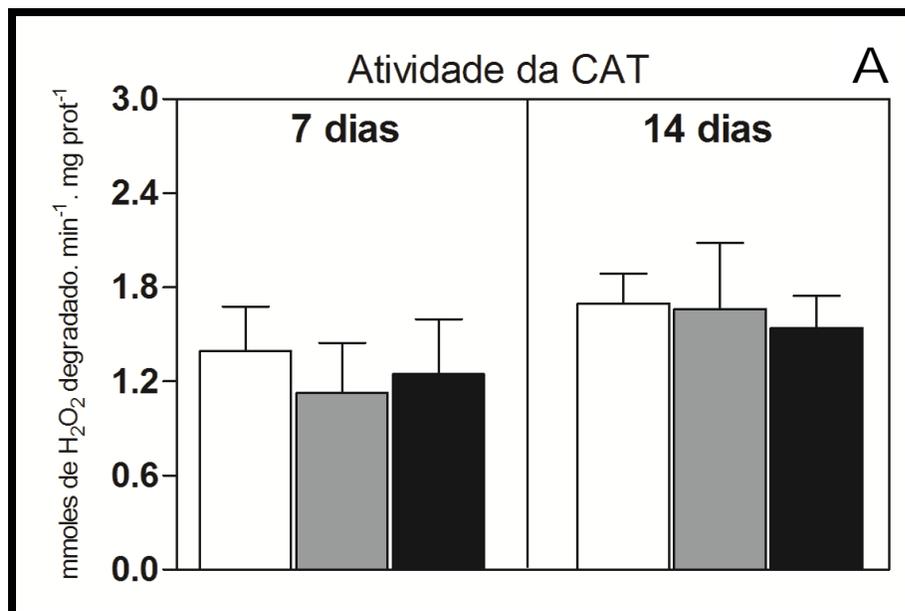
BIOMARCADOR	CYNex		CYNp		Figura
	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias	
CAT	-	-	-	-	12A
GPx	-	-	-	-	12B
GR	-	-	-	-	12C
GSH	-	-	-	-	12D
SOD	-	↑* (132%)	↑* (122%)	-	12E
G6PDH	-	↑* (187%)	-	-	12F
GST	↓** (20%)	-	↓* (19,8%)	↑*** (62%)	12G
LPO	-	↑** (91%)	-	↑*** (154%)	12H
PCO	-	↑*** (291%)	-	-	12I

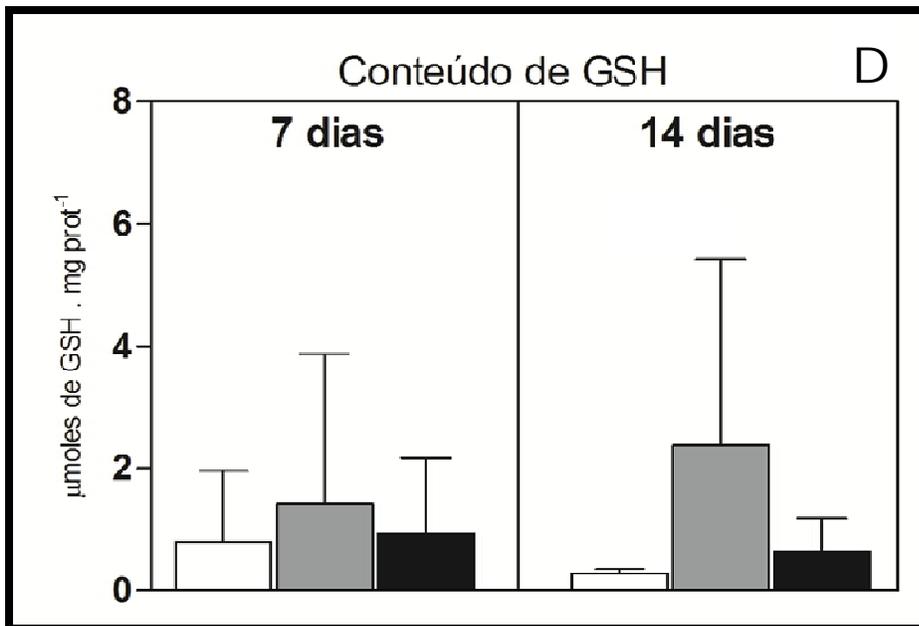
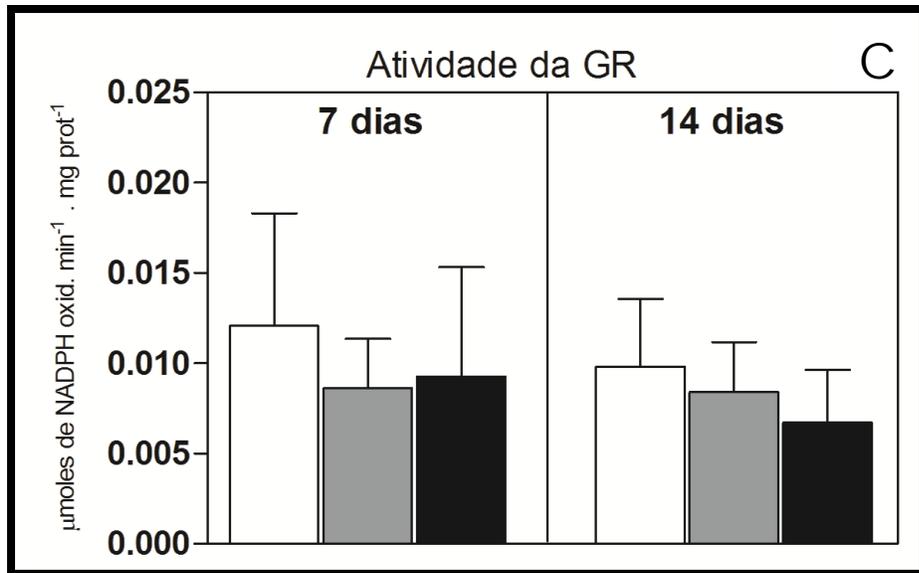
Grupos: Controle, CYNex e CYNp. Onde: asteriscos indicam diferença significativa em comparação com o grupo-controle (\* =  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Hífen indica que não houve alteração do biomarcador em relação ao seu respectivo controle. Setas para cima ou para baixo indicam que houve aumento ou diminuição, respectivamente, seguido pelo percentual de alteração em relação ao respectivo controle.

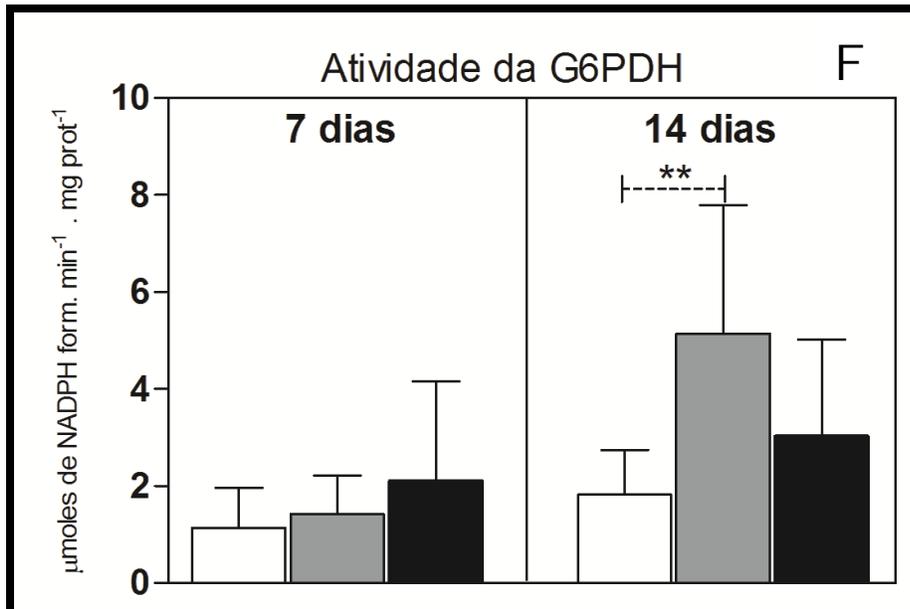
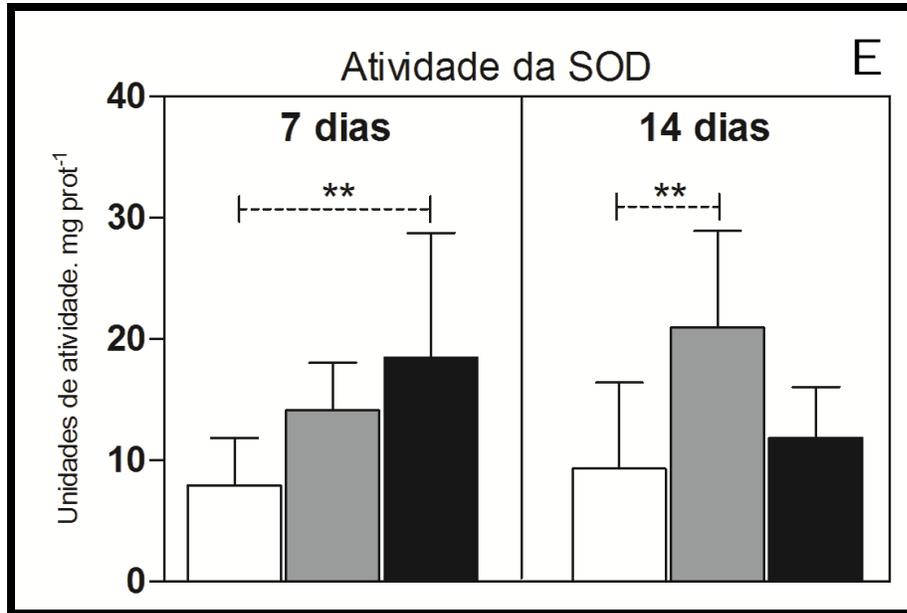
Não houve diferença entre os grupos experimentais em relação às atividades da CAT, GPx e GR (Figuras 12A, 12B e 12C). Do mesmo modo, não houve alteração nos conteúdos de GSH após a exposição à CYN (Figura 12D). Após o 7º dia de exposição, a atividade da SOD aumentou 122% no grupo CYNp ( $p < 0,01$ ), mas não em CYNex. Por outro lado, no 14º dia, a atividade desta enzima retornou aos níveis do controle no grupo CYNp e aumentou 132% no CYNex ( $p < 0,01$ ; Figura 12E). A atividade de G6PDH não foi alterada no 7º dia, mas aumentou 187% em CYNex no 14º dia ( $p < 0,01$ ; Figura 12F) e a atividade da GST diminuiu em ambos os grupos experimentais (CYNex: 20%,  $p < 0,01$ ; CYNp: 19,8%,  $p < 0,05$ ), após 7 dias de exposição. No 14º dia, a atividade GST no grupo CYNex voltou aos níveis do grupo controle, enquanto que aumentou 62% no grupo exposto a CYNp ( $p < 0,001$ ; Figura 12G).

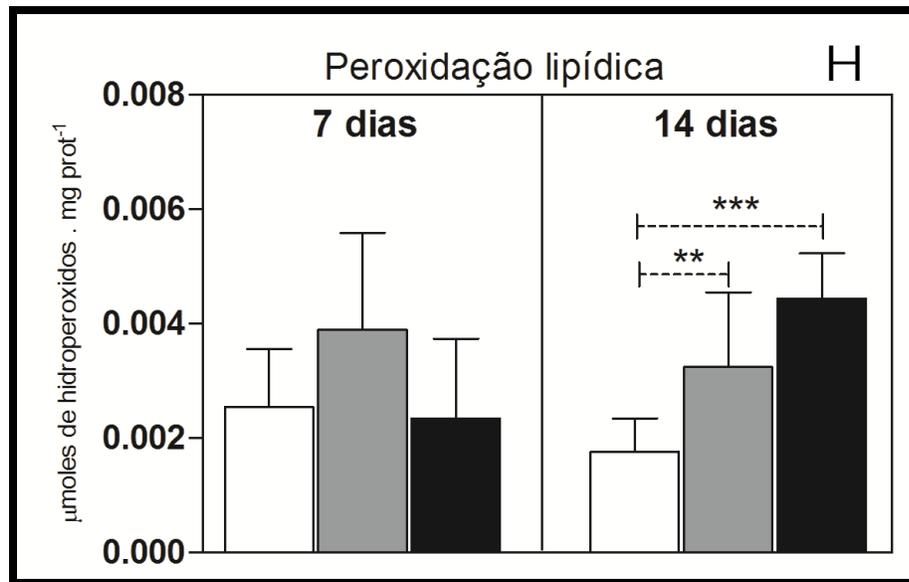
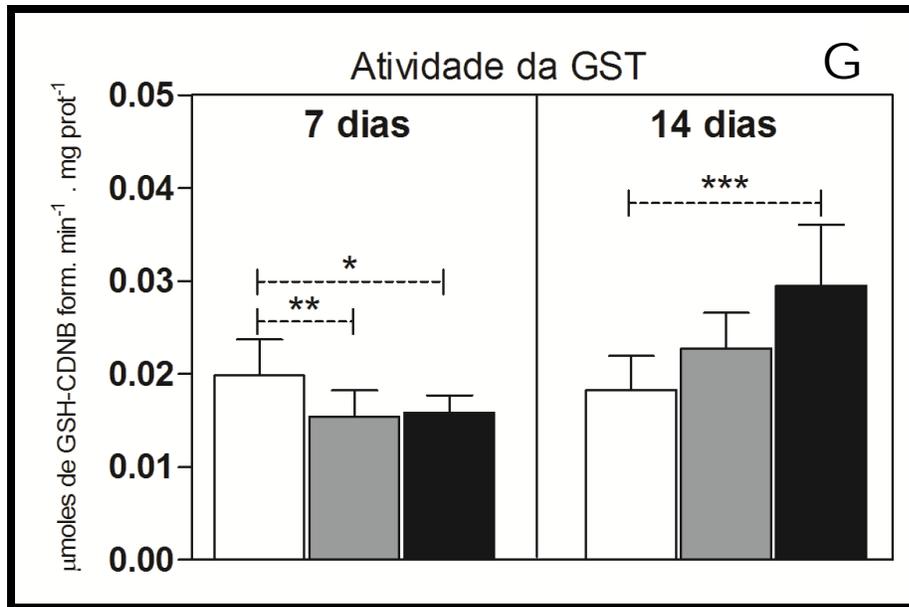
Considerando os danos às biomoléculas, em ambos os grupos, a LPO não foi alterada no 7º dia, mas aumentou 91% em indivíduos do grupo CYNex ( $p < 0,01$ ) e 154% em indivíduos expostos à CYNp ( $p < 0,001$ ) no 14º dia (Figura 12H). Da mesma forma, nenhuma diferença foi observada na PCO no 7º dia, mas aumentou 291% no grupo exposto a CYNex ( $p < 0,001$ ) no 14º dia, mas não em indivíduos expostos a CYNp (Figura 12I). Além disso, as

diferenças significativas de PCO entre os grupos expostos a CYNex e CYNp foram observadas após 14 dias (Figura 12I).









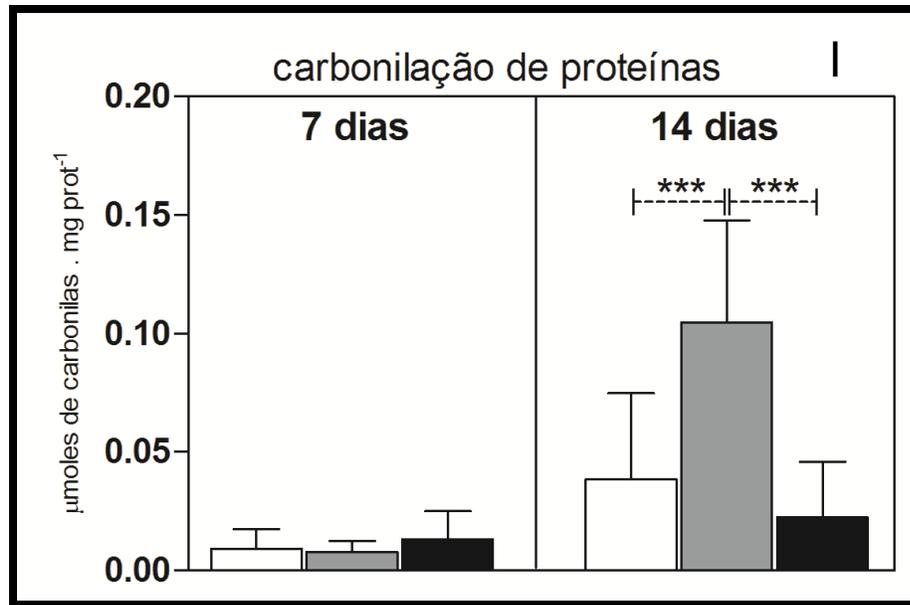


Figura 12 – Resultados dos biomarcadores bioquímicos no fígado de *H. malabaricus* expostos a CYNp e CYNex, após 7 e 14 dias. Atividades da CAT (A), SOD (B), G6PDH (C), GPx (D), GR (E), GST (F), conteúdo de GSH (G), peroxidação lipídica (H) e carbonilação de proteínas (I). Grupos: Controle (barra branca), CYNex (barra cinza) e CYNp (barra escura). ANOVA seguida pelo teste de Tukey, onde \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$  e \*\*\* =  $p < 0,001$ .

#### 4.3. Biomarcadores histopatológicos:

Os resultados da avaliação histopatológica estão apresentados na tabela 2 e figuras 13 e 14. A lesão mais comum no fígado foi a ocorrência de áreas de necrose (figuras 13 e 14). No 7º dia após a exposição, 100% e 75% dos fígados dos peixes apresentavam necrose após exposição à CYNex e CYNp, respectivamente. Mas estes percentuais reduziram para 34% (CYNex) e 67% (CYNp) após 14 dias de exposição. Nos animais do grupo-controle esse tipo de lesão estava presente em até 50% dos exemplares.

Os animais tratados com CYNex apresentaram quantidades consideráveis de centros de melanomacrófagos (CMM, 62,5%) e melanomacrófagos livres (ML, 50%) por fígado de peixe após 7 dias, mas estes níveis retornaram aos valores do grupo-controle no 14º dia. Em

indivíduos do grupo CYNp estes valores não foram tão evidentes no 7º dia (25% para CMM e 37,5% para FM) e diminuíram no 14º dia.

Tabela 2–Ocorrência de alterações hepáticas em indivíduos de *H. malabaricus* expostos à CYN.

	Controle		CYNex		CYNp	
	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
Necrose	4 (8)	3 (9)	8 (8)	3 (9)	6 (8)	6 (9)
Infiltração leucocitária	0 (8)	0 (9)	2 (8)	1 (9)	0 (8)	1 (9)
Vacuolização	0 (8)	1 (9)	0 (8)	2 (9)	1 (8)	1 (9)
Centros de melanomacrófagos	1 (8)	1 (9)	5 (8)	0 (9)	2 (8)	2 (9)
Melanomacrófagos livres	0 (8)	1 (9)	4 (8)	0 (9)	3 (8)	1 (9)
Neoplasias	0 (8)	0 (9)	0 (8)	0 (9)	1 (8)	0 (9)
Parasitas	0 (8)	0 (9)	0 (8)	0 (9)	0 (8)	0 (9)

Grupos: Controle, CYNex e CYNp. % de ocorrência do dano (número de animais-fígado lesionados / total de animais-fígado).

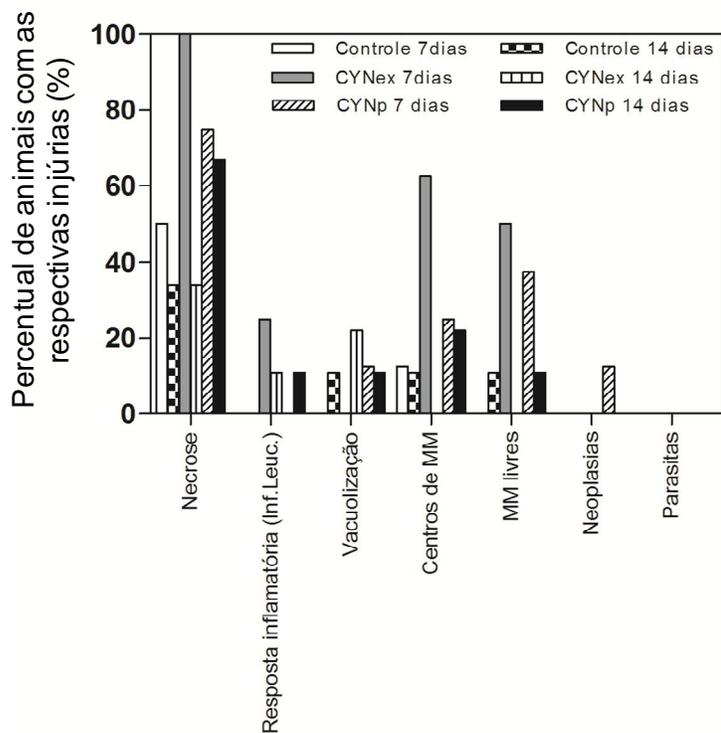


Figura 13 – Percentuais de alterações hepáticas no grupo controle e nos animais expostos à CYN.

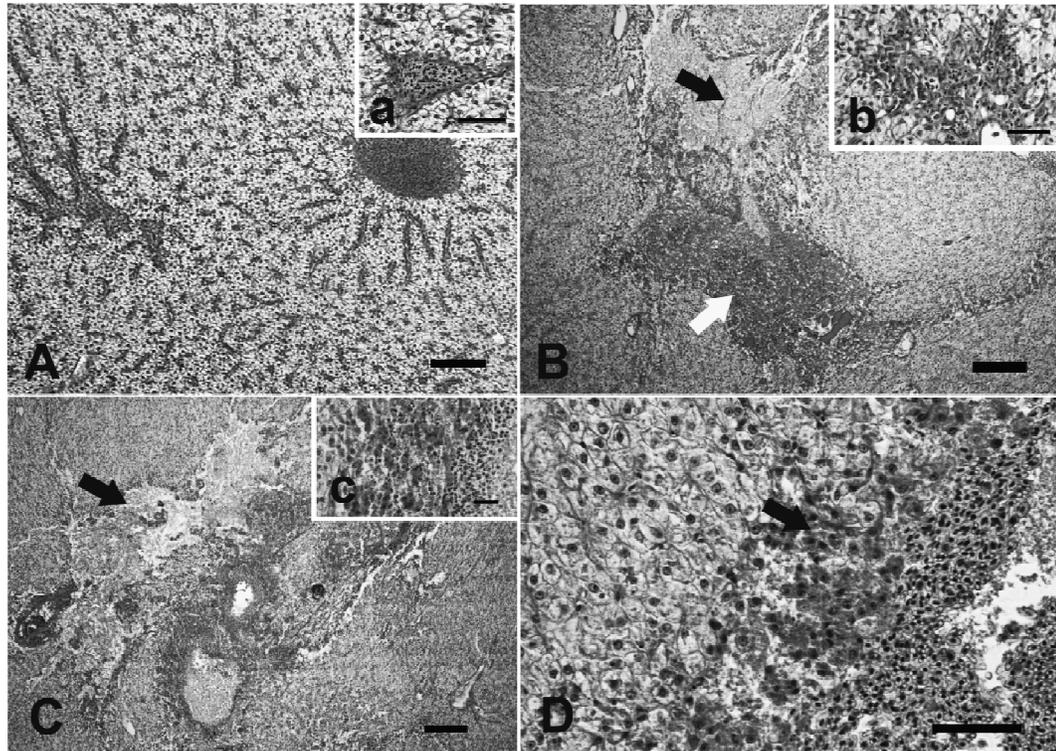


Figura 14– Fotomicrografias de cortes histológicos do fígado de *H. malabaricus* expostos a CYN. (A) grupo de controle. Escala (barra) = 100  $\mu$ m e 50  $\mu$ m (detalhe). (B) 7 dias após a exposição a CYNp. Observar a área de necrose (seta preta) e a área do pré-necrótica (seta branca). Escala (barra) = 200 $\mu$ m. (b) resposta inflamatória (infiltração leucocitária). Escala (barra) = 50  $\mu$ m. (C) 7 dias após a exposição a CYNex. Observar a extensa área de necrose (seta). Escala (barra) = 200 $\mu$ m. Em detalhe (c) é mostrado o tecido fibrosado. Escala (barra) = 100  $\mu$ m. (D) 7 dias após a exposição a CYNex. A seta indica a abundância de células pré-necróticas. Escala (barra) = 50  $\mu$ m.

Os valores atribuídos (“*score*”) para as alterações histopatológicas, de acordo com Bernet et al. (1999), demonstraram um aumento significativo do índice de lesão em indivíduos expostos a CYNex após 7 dias de exposição. No entanto, após 14 dias, o índice mostrou-se semelhante aos valores do grupo-controle (figura 15). Nenhuma diferença foi observada para os indivíduos expostos a CYNp nos dois tempos de exposição em relação aos seus relativos controles.

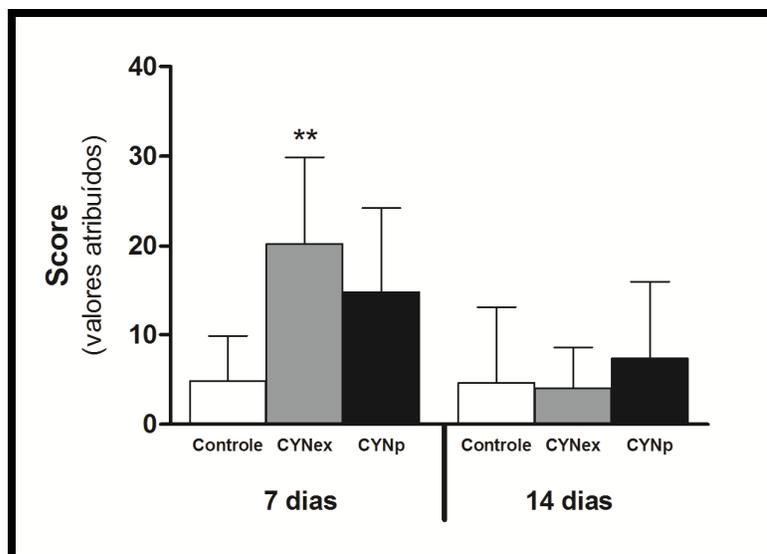


Figura 15 – *Score* de alterações (Bernet et al, 1999) no fígado de *H. malabaricus* após 7 e 14 dias de exposição a uma dose única de CYN. Os asteriscos indicam diferença significativa em comparação com o grupo-controle ( $p < 0,01$ ).

## 5. DISCUSSÃO:

A presença de outras moléculas que não a CYN propriamente dita, é uma premissa importante para avaliar o potencial tóxico e os riscos de exposição a essa cianotoxina. No presente caso, o extrato tóxico representa a situação mais frequente no ambiente, uma vez que o peixe entra em contato direto com a toxina e outros metabólitos que são liberados na água durante as florações de cianobactérias. Já o estudo com a toxina purificada avalia a ação da toxina sem a possibilidade de sinergia com outras moléculas.

Se comparado com as concentrações encontradas no cérebro e músculo (Capítulo I), a concentração de CYN no fígado dos peixes foi mais elevada (em ambos os grupos) ao longo dos 14 dias. A cilindrospermopsina esteve presente em concentrações muito semelhantes nos peixes expostos à CYN<sub>ex</sub> e CYN<sub>p</sub>, não se identificando qualquer influência significativa de outros compostos presentes no extrato sobre a concentração de toxina no fígado.

Apesar da sua natureza hidrofílica, possivelmente a CYN ainda permanece no fígado após 14 dias de exposição devido à dificuldade de eliminação dos hepatócitos. De acordo com Liebel et al. (2011), os hepatócitos de peixes têm os transportadores do sistema de resistência a multixenobióticos (MXR) afetados pela exposição à baixas concentrações de CYN, o que pode explicar a dificuldade do peixe em eliminar a toxina. Além disso, vários relatos têm mostrado que CYN é capaz de acumular nos tecidos de organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos (KINNEAR, 2010). Entretanto, não se sabe como ocorrem os processos de acúmulo e eliminação da CYN uma vez que poucos estudos têm sido realizados com esse intuito, portanto, trata-se de campo de estudo para futuras investigações e discussões.

Os conteúdos de GSH, assim como os níveis de atividades das enzimas GPx e GR não foram alterados. Estas enzimas são responsáveis, respectivamente, pela conversão de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, e pela manutenção do equilíbrio da relação GSH / GSSG,

principalmente sob condições de estresse oxidativo. Portanto, um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) resultantes da exposição a CYN (LIEBEL et al, 2011; GUTIÉRREZ-PRAENA et al, 2012a), associado a nenhum aumento das defesas antioxidantes, poderia sensibilizar as células dos organismos expostos, levando a efeitos indesejáveis, como por exemplo, a genotoxicidade (HUMPAGE et al., 2005). Portanto, os danos oxidativos a lipídios e proteínas provavelmente resultaram de mecanismos tóxicos que não envolvem alterações nos níveis de GSH ou atividades das enzimas do metabolismo da GSH (GPx e GR).

Os mecanismos de toxicidade da CYN em peixes são ainda pouco conhecidos (WILLIAMS e JAESCHKE, 2011), mas o estresse oxidativo mediado pelas espécies reativas de oxigênio pode desempenhar um papel crucial nesse aspecto (LIEBEL et al, 2011; GUTIÉRREZ-PRAENA et al, 2011a, b; 2012a). Estudos têm demonstrado que CYN é capaz de inibir a síntese e reduzir os níveis de GSH em células de mamíferos (RUNNEGAR et al, 1994, 1995; HUMPAGE et al, 2005; GUTIÉRREZ-PRAENA et al, 2012a), mas não em células dos peixes até o momento estudados (LIEBEL et al., 2011). Em peixes, sabe-se que as respostas de enzimas de fase II são menos pronunciados do que as respostas da fase I (VAN DER OOST et al, 2003). Neste caso, esta hipótese também poderia explicar porque nenhuma alteração nos níveis de GSH foi verificada após a exposição a CYN no presente estudo. Portanto, ou a CYN não afeta os níveis de GSH em peixes ou a recuperação da GSH não é prejudicada pela exposição à CYN (GUTIÉRREZ-PRAENA et al, 2011a).

A via principal de desintoxicação de xenobióticos é através da combinação destes compostos com GSH catalisada por GST (GEORGE, 1994). Conseqüentemente, a capacidade da CYN de diminuir a atividade da GST em *Hoplias malabaricus* no 7º dia após a exposição pode prejudicar o mecanismo de fase II do processo de desintoxicação (ARTEEL e SIES, 2001), e isso pode ter levado aos posteriores efeitos sobre a integridade das biomoléculas

(LPO e PCO) observados no 14º dia. Devido aos danos causados pela exposição à cilindrospermopsina, células responderam aumentando a atividade de GST no 14º dia. Liebel et al. (2011) descreveram que não houve alterações na atividade desta enzima em ensaios *in vitro*, enquanto que uma diminuição (observada no presente estudo) ou aumento (PUERTO et al., 2011a) já foram relatados para a atividade GST após exposição *in vivo* à CYN. Algumas hipóteses podem explicar essas diferenças: (i) o método utilizado, o qual não avalia a atividade de nenhuma isoforma específica da GST; (ii) as espécies de peixes utilizadas como modelo foram diferentes; (iii) doses e vias de exposição diferentes; ou ainda (iv) os diferentes níveis de atividade apresentado por diferentes espécies. De acordo com alguns autores (HUMPAGE et al, 2005; ŽEGURA et al, 2011; STRASER et al, 2012), a toxicidade de CYN é dependente do metabolismo do complexo citocromo-P450, mas este parece não envolver as reações de conjugação com GSH (NORRIS et al , 2002; PUERTO et al, 2011a).

Resultados conflitantes sobre a atividade da GST também já foram relatados para outros tipos de poluentes. No entanto, a maioria destes estudos não mostrou diferenças significativas na atividade da GST nos peixes da área impactada, quando comparados aos animais do grupo-controle (VAN DER OOST et al., 2003). No presente estudo, utilizamos o protocolo que usa o CDNB como substrato para GST e, portanto, mede a atividade total das GST (exceto as enzimas da classe-Q), por isso, constatamos a necessidade de estudos adicionais para elucidar quais isoformas são as mais sensíveis em resposta da exposição à CYN.

Enzimas CAT, SOD e GPx são enzimas extremamente importantes no processo de neutralização dos radicais de oxigênio em moléculas não-reativas. Resumidamente, a SOD catalisa a conversão de ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em  $H_2O_2$  e, em seguida a CAT ou GPx catalisa a conversão do  $H_2O_2$  em água e oxigênio molecular. O peróxido de hidrogênio é uma importante ERO, pois pode reagir com proteínas e membranas celulares tornando se altamente

tóxica no ambiente intracelular, o que pode gerar sérias conseqüências, como por exemplo, LPO e PCO. *H. malabaricus* expostos a CYNp e CYNex apresentaram em ambos os tratamentos um aumento na atividade da SOD, mas não nas atividades da CAT e GPx. Isso pode indicar que as taxas de atividade destas últimas enzimas podem ser suficientes para compensar o aumento da produção de peróxido de hidrogênio pela SOD, ou ainda, as células podem estar acumulando estas EROs. Žegura et al (2011) relataram resultados semelhantes em relação SOD e a CAT em linfócitos periféricos humanos expostos a CYN.

Estudos mais recentes mostram que o dano oxidativo está envolvido com efeitos tóxicos da CYN sobre peixes (LIEBEL et al 2011, PUERTO et al, 2011a; GUTIÉRREZ-PRAENA et al, 2011a, b), embora o dano oxidativo não tenha sido considerado importante na toxicidade da CYN para outros modelos (FROSCIO, 2002; HUMPAGE et al, 2005). O presente estudo reforça que o estresse oxidativo pode ser parte importante da toxicidade da CYN em peixes, uma vez que o aumento da peroxidação lipídica e da carbonilação de proteínas foi observado nos exemplares expostos. Estes danos podem causar a perda da fluidez da membrana e a sua possível ruptura (LPO), além da inativação de muitas proteínas extremamente importantes (PCO) (GUTTERIDGE, 1995). De acordo com a Van der Oost et al. (2003), lesões nestas biomoléculas podem ser responsáveis por injúrias celulares severas, e isso pode levar ao desenvolvimento e progressão de doenças. Além disso, os aumentos de LPO e PCO ocorreram apenas no 14º dia de exposição, indicando e confirmando os efeitos tardios da CYN. Para PCO, as interações químicas com moléculas do extrato parecem ser importantes, uma vez que a alteração na PCO foi observada em indivíduos expostos a CYNex, mas não a CYNp.

A histopatologia é uma ferramenta importante para avaliar os efeitos de contaminantes em peixes (RABITTO et al, 2005; OLIVEIRA RIBEIRO et al, 2006; MELA et al, 2007). Os aumentos de CMM e ML em *H. malabaricus* foram indicativos de resposta imune intensa

devido a lesão tecidual (RABITTO et al, 2005; MELA, et al 2007; ANDRADE BRITO et al, 2012), particularmente quando os peixes foram expostos a CYNex. Em geral, os macrófagos são associados às respostas para lesões necróticas, refletindo o fracasso dos mecanismos de proteção dos hepatócitos frente aos efeitos nocivos causados pela CYN levando à morte celular.

A integração de biomarcadores histológicos hepáticos é um método sugerido por Bernet et al. (1999), que converte as observações visuais em pontuações comparáveis (“score”) de acordo com o significado patológico de cada alteração. Estas pontuações revelaram que os peixes expostos à CYNex apresentaram lesões graves que comprometem a integridade funcional do fígado no 7º dia pós-exposição. No entanto, após 14 dias, essa pontuação voltou para níveis semelhantes ao do grupo-controle, sugerindo uma recuperação do tecido ou o reforço das defesas celulares. Seawright et al. (1999) mostraram que, em camundongos, o extrato contendo CYN pode ser 10 vezes mais tóxico do que a CYN pura, quando administrado oralmente. Nos peixes, no entanto, a CYN pura pode levar a alterações hepáticas diversas, tais como acúmulo de glicogênio, necrose, aumento do diâmetro nuclear hepatócitos e esteatose (GUTIÉRREZ-PRAENA et al. 2012b).

A utilização de múltiplos biomarcadores foi considerada como uma ferramenta adequada para a avaliação da saúde dos indivíduos de *H. malabaricus* quando expostos à CYN. Como visto nos resultados apresentados, as concentrações de toxinas encontradas no tecido hepático foram capazes de causar um desequilíbrio no ambiente redox provocando danos graves, tais como a peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas.

## 6. CONCLUSÕES

- Assim como no músculo e cérebro, houve detecção da toxina no fígado dos animais mesmo após 14 dias da exposição única.
- A concentração de CYN no fígado foi cerca de 10 vezes maior que no músculo e cérebro, o que pode ser explicado pela via de exposição (intraperitoneal).
- A detecção de danos oxidativos (LPO e PCO) sugere que os mecanismos de defesa avaliados neste estudo não foram suficientemente eficazes na proteção contra a toxicidade da CYN, tanto CYNp como CYNex.
- Parece haver uma relação entre a toxicidade tardia da CYN e os danos oxidativos, fato que foi corroborado pelo elevado número de lesões (necrose, MMC e FM) encontradas no fígado dos animais expostos.

## CAPÍTULO III

### EFEITOS *IN VITRO* DA CILINDROSPERMOPSINA NO AMBIENTE REDOX DE HEPATÓCITOS DE *Hoplias malabaricus*.

#### RESUMO

Cilindrospermopsina (CYN) é um cianotoxina que é citotóxica para uma grande variedade de células, principalmente para os hepatócitos. Neste estudo, os efeitos da CYN purificada (CYNp) e do extrato aquoso de células de *C. raciborskii* produtora de CYN (CYNex) foram investigados através de biomarcadores do estresse oxidativo e morte celular em cultura primária de hepatócitos de *Hoplias malabaricus*. Após o isolamento e fixação das células, estas foram expostas durante 72 h a diferentes concentrações de CYN purificada e extrato (0, 0,1; 1,0; 10; 100  $\mu\text{g l}^{-1}$ ). Em seguida, foram avaliadas a viabilidade celular, concentração de peróxido de hidrogênio (EROs), atividades da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR), glutatona S-transferase (GST), conteúdos de GSH, a peroxidação lipídica (LPO), carbonilação de proteínas (PCO) e danos ao DNA por ensaio cometa (EC). A diminuição significativa da viabilidade celular foi observada em todos os grupos expostos. A redução na atividade da SOD ocorreu apenas em células expostas à maior concentração do extrato. A redução na atividade da GR ocorreu em todas as concentrações testadas, exceto na menor concentração de CYNp. O conteúdo de GSH aumentou somente na maior concentração de CYNp ao passo que a atividade da GST aumentou somente nas células expostas a maior concentração de CYNex. A LPO e os níveis de EROs aumentaram, respectivamente, nas células expostas à maior concentração do extrato e CYN purificada. Houve redução na PCO na maior concentração do extrato indicando um possível efeito protetor. Nenhuma alteração nas atividades de CAT, G6PDH, GPx, além dos danos ao DNA, foi observada. Estes dados sugerem que, embora a CYN em si possa causar alteração no equilíbrio óxido redutor nos hepatócitos e morte celular, outros compostos contidos nos extratos certamente contribuem para os danos lipídicos. Sendo assim, os riscos potenciais da exposição ao extrato pode ser maior do que a toxina purificada. Além disso, este modelo celular se mostrou uma eficiente ferramenta para a investigação dos efeitos tóxicos da CYN, fornecendo dados importantes sobre os seus efeitos em hepatócitos de peixes neotropicais como a espécie *H. malabaricus*.

*Palavras-chave:* Cilindrospermopsina, estresse oxidativo, *Hoplias malabaricus*, cultivo primário, hepatócitos.

## 1. INTRODUÇÃO:

O estabelecimento de linhagens celulares de animais em monocamadas para estudos de citotoxicidade têm sido empregado desde a segunda metade do século XX, sendo estes testes *in vitro* vantajosos em relação aos testes *in vivo*, principalmente no que diz respeito ao custo, rapidez e sensibilidade (HENDRIKESSEN, 1994).

O conceito do três “Rs” (*reduction, refinement e replacement* – “*The principle of human experimental technique*” – RUSSEL e BURCH, 1959) está relacionado com o uso de animais em laboratórios para pesquisas e ensaios, tendo este conceito o objetivo de reduzir o número de animais, refinar os métodos e técnicas de estudo e por fim substituir os métodos existentes por metodologias alternativas, como por exemplo, os teste *in vitro*. Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais em pesquisas científicas, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de xenobióticos. Várias são as vantagens do uso de cultivo primário de células em ensaios toxicológicos, dentre elas está o fato dessas células conservarem boa parte das características bioquímicas dos tecidos intactos (SEGNER, 1998), permitindo extrapolar os resultados de toxicidade dos poluentes para o organismo como um todo.

Ensaio *in vitro* empregando hepatócitos têm sido utilizados em diversos estudos de hepatotoxicidade, genotoxicidade, processos de biotransformação, entre outros. O uso de cultivo primário de hepatócitos de *H. malabaricus* para avaliar danos oxidativos causados por estressores ambientais (Metil mercúrio - [MeHg] e Diclorodifeniltricloroetano - [DDT]) foi desenvolvido e padronizado por Filipak Neto et al. (2007). Além disso, hepatócitos de outras espécies de peixes tropicais também já foram utilizados para verificar estes efeitos quando expostos à MeHg, PCBs (bifenilas policloradas), pesticidas organoclorados (BUSSOLARO et al., 2010) e CYN (LIEBEL et al. 2011). Pelo nosso conhecimento, o presente trabalho é o primeiro que aborda os danos oxidativos causados pela exposição à CYN (extrato aquoso e

toxina purificada) em cultura primária de hepatócitos de *H. malabaricus*. (PESONEN e ANDERSSON, 1997).

Estudos têm relatado que os resultados dos testes de citotoxicidade *in vitro* de alguns xenobióticos são positivamente correlacionados com os resultados de toxicidade aguda *in vivo*, e, por conseguinte, os ensaios de citotoxicidade *in vitro* podem servir como uma alternativa para o teste de toxicidade aguda de peixes (FENT, 2001; FELIPAK NETO et al., 2007).

A toxicidade mediada pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) pode ser definida como os danos oxidativos celulares causados por espécies reativas de oxigênio ou radicais livres (oxiradicais) e que podem ser produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Entre as EROs mais importantes podemos destacar os radicais ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e os radicais hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), sendo os últimos, oxidantes extremamente potentes capazes de reagir com biomoléculas importantes (DNA, lipídios e proteínas), com diversos efeitos deletérios para as células, podendo levar a morte das mesmas por necrose ou apoptose (WINSTON e DI GIULIO, 1991; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). O radical  $HO^{\cdot}$  é formado no organismo principalmente por mecanismos de reação de  $H_2O_2$  com metais de transição (principalmente via reação de Fenton) e por exposição da água à radiação ionizante (HALLIWELL et al., 1992).

Os poluentes presentes nos ambientes aquáticos também podem exercer seus efeitos no ambiente redox celular causando alguns danos oxidativos que incluem os danos ao sistema de defesa antioxidante (AD) e os danos a macromoléculas (ALMROTH, 2008) de diferentes classes de organismos. Cada vez mais, tanto a atividade das moléculas do sistema AD quanto os danos oxidativos, têm sido utilizados como biomarcadores em estudos de monitoramento ambiental, uma vez que as mudanças nas atividades destes biomarcadores (estímulo ou

inibição) sugerem uma resposta adaptativa, ou até mesmo danosa, à exposição aos poluentes ou seus metabólitos (BALLESTEROS et al., 2009).

Os modelos de estudo *in vitro*, principalmente os que utilizam linhagens de hepatócitos de mamíferos, são muito aplicados em testes de toxicidade da CYN, inclusive na avaliação de danos oxidativos (RUNNEGAR et al., 1994, 1995, 2002; FROSCIO et al., 2003, 2009). No entanto, poucos estudam seus efeitos em células (linhagens ou cultivos primários) de peixes, sobretudo em peixes da fauna brasileira (LIEBEL et al., 2011).

Portanto, devido à escassez de informações a respeito da toxicologia da CYN, principalmente em peixes e culturas primárias, o objetivo do presente capítulo foi avaliar os efeitos das CYN (em diferentes concentrações de extrato aquoso e toxina purificada) na atividade de alguns biomarcadores do estresse oxidativo em cultura primária de hepatócitos de *H. malabaricus*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

- Verificar os efeitos hepatotóxicos do extrato aquoso contendo CYN e da CYN purificada em cultura primária de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* utilizando diferentes biomarcadores do estresse oxidativo.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade celular;
- Avaliar o desequilíbrio oxidativo através dos seguintes biomarcadores:
  - a. Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)
  - b. Atividade da Catalase (CAT)
  - c. Atividade da Superóxido dismutase (SOD)
  - d. Atividade da G6PDH (Glicose 6-fosfato desidrogenase)
  - e. Atividade da Glutaciona peroxidase (GPx)
  - f. Atividade da Glutaciona redutase (GR)
  - g. Atividade da Glutaciona S-transferase (GST)
  - h. Conteúdo de Glutaciona reduzida (GSH)
- Avaliar dano oxidativo através de Peroxidação de lipídios (LPO) e Carbonilação de proteínas (PCO).
- Avaliar danos ao DNA através ensaio cometa.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS:

O cultivo da cepa CYP011K da espécie *C. raciborskii*, a purificação, extração e análise da CYN estão reportadas respectivamente nos itens 3.1 e 3.2 do Capítulo I.

#### 3.1. Obtenção, manutenção e cuidado com os animais:

Exemplares de *Hoplias malabaricus* (300 - 500 g) foram adquiridos na piscicultura Panamá (Paulo Lopes – SC - Brasil) (<http://www.pisciculturapanama.com.br>) e transportados para o Laboratório de Bioensaios do Departamento de Biologia Celular no Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os peixes foram mantidos em tanques 500 litros de água sob aeração constante, contendo tubos de PVC no fundo para abrigo dos peixes. Por serem animais de hábito carnívoro, a cada três dias, eles recebiam alevinos de carpa (*Cyprinus* sp.), lambaris (*Astyanax* sp.) ou pedaços de tecido muscular de animais previamente sacrificados, como alimento.



Figura 16 – Tanques-rede (A) da Piscicultura Panamá (Paulo Lopes – SC – Brasil). Foto da vista aérea do local (B): Google Earth (2011 Google Inc.).

### **3.2. Isolamento e Cultivo dos hepatócitos de *H. malabaricus*:**

Para o isolamento e cultivo dos hepatócitos foi seguido o protocolo estabelecido por Filipak Neto et al. (2007) com modificações de acordo com Liebel et al. (2011). É válido destacar que todo material de dissecação utilizado neste processo de remoção do fígado e obtenção dos hepatócitos foi previamente esterilizado em autoclave, luz ultravioleta e assepsia com álcool etílico a 70%.

Foram utilizados de dois a três exemplares de peixe para obtenção das células para cada experimento. Os animais foram previamente anestesiados com Benzocaína (200 ppm em água) e sacrificados por secção espinal logo abaixo do crânio. Após a remoção das escamas, os animais sofreram assepsia com álcool etílico a 70% seguido de Clorexidina alcoólica a 2%. É válido destacar que os primeiros peixes que foram sacrificados desta forma apresentaram muitos coágulos nos vasos sanguíneos do fígado o que prejudicava a perfusão deste órgão. Desta forma, optou-se por, após o procedimento de anestesia, aplicar heparina (aproximadamente 500  $\mu\text{L}$  a 5.000  $\text{UL}^{-1}$ ) na veia caudal do animal para evitar a coagulação sanguínea e facilitar o processo de perfusão para remoção do sangue presente no órgão. Logo após este procedimento, seguiu-se com assepsia e a secção espinal conforme mencionado, e então os animais foram levados para o fluxo laminar.

Os dois lobos do fígado desses animais foram cuidadosamente removidos com auxílio de pinça, tesoura e bisturi, e, posteriormente, colocados em tubos do tipo Falcon (por aproximadamente 10-15 minutos) contendo uma solução de tampão fosfato salino (PBS pH 7.6) suplementado com antibióticos e fungicida (anfotericina-B (25  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), estreptomicina (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e penicilina (100 U  $\text{mL}^{-1}$ ) afim de evitar possíveis contaminações.

Após esse período, os lobos foram colocados em placas de petri, e em seguida foi realizado o procedimento de perfusão (com auxílio de seringa e agulha) com uma solução de

PBS (pH 7.6) suplementado com EDTA (2,0 mM) e glicose (1,0 g L<sup>-1</sup>). Após a remoção completa do sangue, os lobos foram cuidadosamente cortados (com bisturi) em pedaços pequenos (aproximadamente 0.2 - 0.3 cm) e então, colocados em tubos do tipo Falcon contendo uma solução de PBS (pH 7.6) suplementado com glicose (1,0 g L<sup>-1</sup>) e dispase (1 U L<sup>-1</sup>), utilizada para auxiliar e acelerar o processo de dissociação dos hepatócitos. Esse material foi colocado em estufa (30° C por 1 hora). Em seguida, as células foram peneiradas em telas de metal com aproximadamente 1 mm de porosidade afim de otimizar o processo de dissociação. As células isoladas obtidas foram centrifugadas (2 a 3 vezes à 100-120 g durante 3-4 minutos) para remover os resíduos celulares que por ventura tenham ficado na solução. As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado (D-glucose 2,0 g L<sup>-1</sup>, pH 7,6; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM; insulina mista (0,1 U mL<sup>-1</sup>); gentamicina (40 mg L<sup>-1</sup>); estreptomicina (1 µg mL<sup>-1</sup>); penicilina (10 U mL<sup>-1</sup>); anfotericina-B (2,5 µg L<sup>-1</sup>); soro fetal bovino (5% v/v)).

O número e a viabilidade celular foram determinados por contagem em câmara de Neubauer em microscópio de campo claro através do teste de exclusão do corante azul de tripan (*Tripan blue*). A viabilidade prévia das células obtidas para os experimentos de exposição a CYN esteve sempre acima de 95%.

Em seguida, as células foram semeadas em placas de cultivo celular (TTP® ou Corning®) de 24 (1,0 x 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup>) ou 96 poços (3 x 10<sup>5</sup> células mL<sup>-1</sup>), e mantidas por 72 horas (24° C e pCO<sub>2</sub> 1,7%) para adesão e reorganização celular. Após esse período, as células foram utilizadas para realização dos ensaios.

### 3.3. Desenho experimental para realização dos ensaios:

A partir do cultivo primário dos hepatócitos estabelecido no item 3.4, foram estabelecidos os grupos experimentais para avaliar a citotoxicidade da CYN em hepatócitos de *H. malabaricus* (Figura 17 e 18):

1. Grupo “Controle”: grupo exposto ao veículo da toxina (água ultrapura);
2. Grupo “0,1”: grupo exposto à 0,1 µg/L de CYN purificada;
3. Grupo “1”: grupo exposto à 1 µg/L de CYN purificada;
4. Grupo “10”: grupo exposto à 10 µg/L de CYN purificada;
5. Grupo “100”: grupo exposto à 100 µg/L de CYN purificada;
6. Grupo “0,1Ex”: grupo exposto à 0,1 µg/L de extrato aquoso contendo CYN;
7. Grupo “1Ex”: grupo exposto à 1 µg/L de extrato aquoso contendo CYN;
8. Grupo “10Ex”: grupo exposto à 10 µg/L de extrato aquoso contendo CYN;

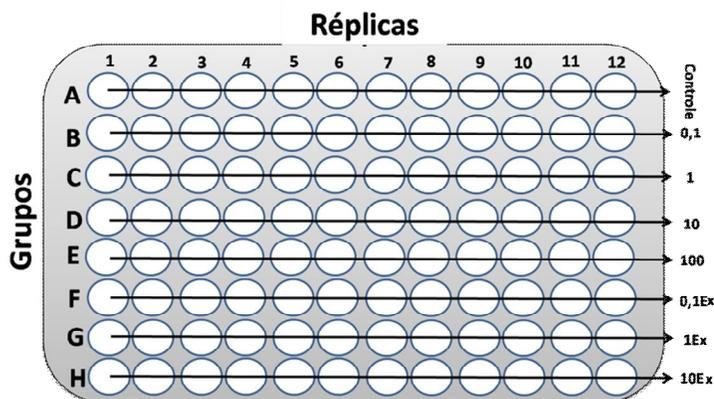


Figura 17 - Esquema de divisão dos grupos nos ensaios realizados em microplacas de 96 poços da marca Corning®. Biomarcadores avaliados com este modelo: CAT, SOD, G6PDH, GP, GR, GST, Viabilidade celular, EROs e ensaio cometa.

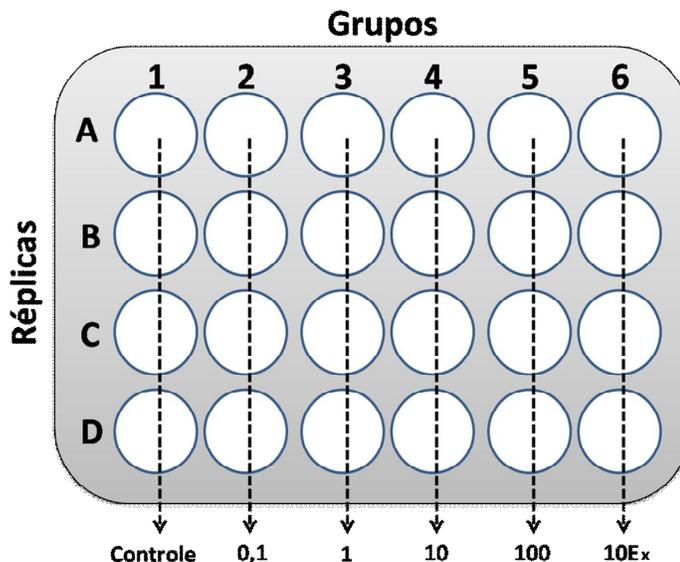


Figura 18 - Esquema de divisão dos grupos nos ensaios realizados em microplacas de 24 poços da marca Corning®. Biomarcadores avaliados com este modelo: GSH, PCO e LPO.

As células foram isoladas e cultivadas segundo o método descrito no item 3.4. O tempo de adesão e reorganização celular foi de 72 horas. Após esse período, 75% do volume de meio de cultura de cada poço foram removidos e substituídos por meio contendo as concentrações citadas da toxina, e então, expostos por 72 horas. Após esse período de exposição, cada poço foi lavado duas vezes com PBS (pH 7,6) para remoção completa do meio de cultura. Em seguida, as placas foram congeladas (-76° C) promovendo o rompimento celular para as análises bioquímicas subseqüentes: atividades da catalase, superóxido dismutase, glicose 6-fosfato desidrogenase, glutathiona peroxidase, glutathiona redutase, e glutathiona S-transferase, e para os níveis de glutathiona reduzida, carbonilação de proteínas e peroxidação de lipídios.

Para a realização dos ensaios de viabilidade celular e produção de espécies reativas de oxigênio, as células foram lavadas com PBS e utilizadas imediatamente. Para a realização do ensaio cometa, aos poços lavados foi adicionada uma solução de PBS suplementado com

tripsina por aproximadamente 20 minutos (tripsina 0,05%, EDTA dissódico 0,02%, 24 °C). As células foram removidas junto com esta solução para realização do ensaio.

### **3.4. Análises Bioquímicas:**

O procedimento de cálculo das atividades dos biomarcadores avaliados está no anexo I desta tese.

#### **3.4.1. Avaliação da viabilidade celular:**

A avaliação da viabilidade celular foi verificada através da incorporação do corante vital vermelho neutro (*neutral red*) pelos hepatócitos seguindo-se o método de Borenfreund et al. (1988). Através desta metodologia foi possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas através da medida de intensidade de cor da cultura celular.

Após 72 horas de exposição e lavagem com PBS, acrescentou-se 0,2 mL de meio novo contendo 50 µg mL<sup>-1</sup> de vermelho neutro. A incorporação deste corante pelas células vivas foi verificada após 3 h de incubação (24 °C e pCO<sub>2</sub> de 1,7%,). Após esse período, o meio de cultura foi removido e as células lavadas (três vezes) com uma solução fixadora de CaCl<sub>2</sub> (cloreto de cálcio) e formaldeído (100 gL<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> em formaldeído 15% em água). Após o descarte desta solução, cada poço recebeu 0,3 mL da solução de ácido acético em etanol (ácido acético à 1% em etanol à 50%). A placa foi agitada por 15 minutos, e aguardou-se 5 minutos para precipitação dos restos celulares e, então, 0,2 mL do sobrenadante foi transferido para outra microplaca. A leitura das densidades ópticas foi realizada em espectrofotômetro (TECAN) à 540 nm. Com os valores obtidos calculou-se a média da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de células (100%).

### **3.4.2. Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs):**

O princípio deste método consiste na detecção de  $H_2O_2$  através do marcador fluorescente diclorofluoresceína diacetato ( $H_2DCFDA$ ). Explicando brevemente, a  $H_2DCFDA$  difunde-se passivamente nas células, e é desacetilada ( $DCFH_2$ ) e subsequentemente oxidada originando 2-7-diclorofluoresceína ( $DCF$ ) fluorescente (BENOV et al., 1998).

Após a exposição à CYN e lavagem com PBS, o meio de cultura foi removido e as células incubadas (15 min. / 24 °C) com 200  $\mu$ L de meio de cultura contendo  $H_2DCFDA$  (diclorofluoresceína acetato - 10 mM em DMSO 0,1%) no escuro. Em seguida as células foram lavadas com PBS e posteriormente congeladas a -76 °C (para o rompimento celular). Após o descongelamento, 200  $\mu$ L do lisado celular foram transferidos para uma microplaca preta opaca para a medição de fluorescência usando o comprimento de onda de excitação de 488 nm e o comprimento de onda de emissão de 530 nm (BENOV et al., 1998). Todo procedimento foi realizado em gelo ao abrigo de luz.

### **3.4.3. Avaliação da atividade da Catalase (CAT):**

O lisado celular foi suspenso em 100  $\mu$ L de PBS gelado, transferidos para tubos de 1,5 mL e centrifugados (9.000 g / 20 min / 4 °C). Foram adicionados 640  $\mu$ L de meio de reação ( $H_2O_2$  20 mM, Tris-base 50 mM, EDTA dissódico 0,25 mM, pH 8.0 a 25 °C) à 60  $\mu$ L do sobrenadante da amostra. A leitura foi feita como descrito no item 3.5.1 do capítulo II desta tese.

#### **3.4.4. Avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD):**

O lisado celular foi descongelado, ressuspensão em PBS e colocado em microtubos de 1,5 mL e, então, centrifugadas (12.000 g / 20 min / 4 °C). O procedimento de leitura foi o mesmo ao descrito no item 3.5.2 do capítulo II desta tese.

#### **3.4.5. Avaliação da atividade da Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH):**

As amostras em placas de 96 poços foram descongeladas em gelo, e a cada poço foram adicionados 150 µL de PBS para ressuspensão do conteúdo intracelular. Em seguida, as placas foram centrifugadas (2.800 g / 10 min / 4 °C) e, por fim, um volume de 50 µL do sobrenadante (PBS para o branco) e 150 µL de meio de reação (com as mesmas especificações de concentrações de reagente e procedimentos de leitura do item 3.5.3 do capítulo II desta tese) foram adicionados a uma microplaca. A absorbância foi monitorada à 340 nm durante 3 min. em intervalos de 10 s. O coeficiente de extinção molar para o NADPH de 6,22 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> foi utilizado para o cálculo da atividade da G6PDH.

#### **3.4.6. Avaliação da atividade da Glutathiona peroxidase (GPx):**

As amostras foram descongeladas em gelo, ressuspensas em 100 µL de PBS e centrifugadas para obtenção da fração S9 (fração sobrenadante resultante de centrifugação a 9.000 x g). Para o ensaio foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item 3.5.4 do capítulo II desta tese.

#### **3.4.7. Avaliação da atividade da Glutathione redutase (GR):**

Para este ensaio, 50  $\mu\text{L}$  de amostra (PBS para o branco) obtidas da fração S9, e 100  $\mu\text{L}$  de meio de reação foram adicionados a uma nova microplaca de acordo com a metodologia descrita no item 3.5.5 do capítulo II desta tese.

#### **3.4.8. Avaliação da atividade total das isoformas GST:**

As células cultivadas nas microplacas de 96 poços foram lavadas com PBS e congeladas a  $-76\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após o descongelamento, o lisado celular foi suspenso em 150  $\mu\text{L}$  de PBS e as microplacas foram centrifugadas (2.800 g / 10 min /  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Em seguida, 30  $\mu\text{L}$  do sobrenadante (PBS para o branco) e 170  $\mu\text{L}$  de meio de reação foram colocados em novas microplacas, de acordo com o método descrito no item 3.5.2 do capítulo I desta tese.

#### **3.4.9. Avaliação dos conteúdos de GSH:**

O lisado celular foi suspenso em 100  $\mu\text{L}$  de PBS, transferidos para tubos de 1,5 mL e centrifugados (10.000 g / 10 min /  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Para as leituras seguiu-se o mesmo procedimento descrito no item 3.5.3 do capítulo I desta tese.

#### **3.4.10. Avaliação da LPO:**

O lisado celular foi resuspenso em 250  $\mu\text{L}$  de PBS gelado e transferido para tubos de 1,5 mL e então centrifugado (10.000 g / 5 min /  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Um volume de 200  $\mu\text{L}$  de sobrenadante (PBS para o branco) foi transferido para outro tubo e misturado com 500  $\mu\text{L}$  de solução de reação, sendo os procedimentos seguintes realizados de acordo com o método já descrito no item 3.5.4 do capítulo I desta tese.

#### **3.4.11. Avaliação da carbonilação de proteínas (PCO):**

O lisado celular foi ressuspensão em 300 µL de PBS, transferido para um tubo de 1,5 mL e centrifugado (12.000 g / 20 min, / 4 °C). Um volume de 200 µL de sobrenadante foi transferido para um tubo de 2,0 mL e misturado em vortex com 500 µL de solução DNPH. O procedimento de análise foi semelhante ao apresentado no item 3.5.9 do capítulo II desta tese.

#### **3.4.12. Ensaio cometa:**

Este ensaio permite verificar a presença de quebras simples, sítios lábeis alcalinos e *crosslinks* resultantes da ação de compostos genotóxicos que podem alterar a estrutura do DNA das células. Desta forma, após aplicação de corantes específicos e campo elétrico, se podem visualizar em microscópio de fluorescência a migração do DNA, que se assemelha a um cometa (SINGH et al., 1988).

Para o Ensaio Cometa foi utilizado o protocolo de Singh et al. (1988), com algumas modificações. Células dissociadas foram ressuspensas em agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% e estendidas sobre lâminas de vidro cobertas previamente com agarose de ponto de fusão normal a 1,5%. Após a solidificação da agarose as lâminas foram colocadas em solução de lise (NaCl 220 mM, EDTA 9 mM, Tris-base 0,9 mM, Triton X-100 1%, DMSO 10%, sarcosinato de sódio 0,9%, pH10) por 24h a 4°C. Em seguida, as lâminas foram reservadas em tampão de eletroforese (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, DMSO 2%, pH>13) por 25 min, e então submetidas a uma corrida eletroforética (25 V e 300 mA) por 25 min. Em seguida, as lâminas foram neutralizadas em solução de Tris-HCl 400 mM (pH 7,5) por 15 min e preservadas por etanol PA por 10 min. Por fim, o DNA foi fluorescentemente marcado com 2 µg mL<sup>-1</sup> de brometo de etídio. Um escore para cada lâmina foi calculado através de uma média ponderada

da classe de dano pela porcentagem de incidência do mesmo (Escore = (classe do dano x % de incidência)). Identificou-se 4 classes de danos (classes 0, 1, 2, 3 e 4) de acordo com o grau de fragmentação do DNA.

#### **3.4.13. Quantificação de proteínas totais:**

A quantificação de proteínas totais foi realizada conforme descrito no item 3.5.5 do Capítulo I.

#### **3.5. Análises estatísticas dos dados:**

Para cada biomarcador analisado, foram realizados três experimentos independentes. Em cada experimento foi empregado um *pool* de células provenientes do fígado de 3 peixes. Para a avaliação dos dados do ensaio cometa empregou-se o teste de Kruskal-Wallis. Já para a avaliação das diferenças encontradas nos ensaios com biomarcadores foi utilizado a Análise de Variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey-Kramer.

## 4. RESULTADOS:

O dados brutos em relação às análises estão no anexo 2 desta tese.

### 4.1. Viabilidade celular:

A viabilidade celular diminuiu significativamente em todos os grupos testados. Os grupos 1E e 10E tiveram os menores percentuais de viabilidade em relação ao grupo controle (uma redução da viabilidade celular de 22,5% e 20,8%, respectivamente) (Figura 19).

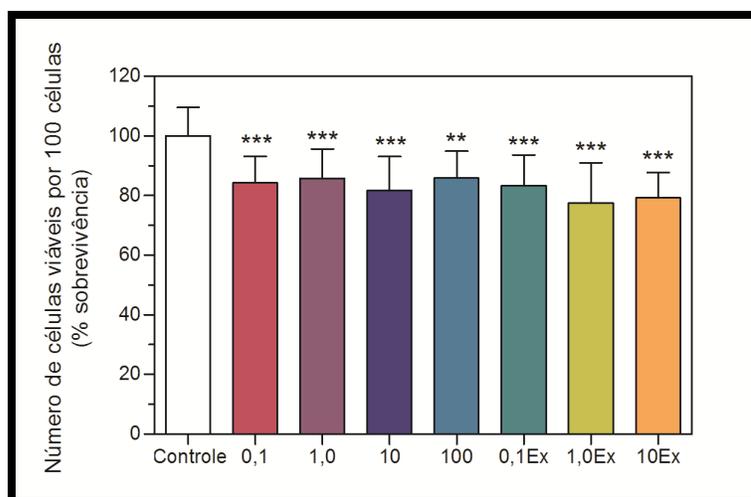


Figura 19 - Viabilidade celular estimada através de ensaio com vermelho neutro (*neutral red*). Média  $\pm$  desvio padrão. Viabilidade em número de células viáveis a cada 100 células. Grupos expostos à toxina purificada (0,1; 1,0; 10, e 100) e ao extrato aquoso contendo CYN (0,1E; 1,0E e 10E). Asteriscos, \*\* e \*\*\*, referem-se a  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente (em comparação com o grupo controle). Total de réplicas = 18 (3 experimentos independentes).

### 4.2. Atividades enzimáticas das CAT, SOD, G6PDH, GPx, GR e GST:

A atividade enzimática da CAT não sofreu alteração significativa em nenhum dos grupos testados (Figura 20). No entanto, mesmo sem essa diferença e apesar do alto desvio-padrão, verificamos que o grupo 100 teve um valor médio mais alto na atividade desta enzima (aumento de 23,7% em relação ao grupo controle).

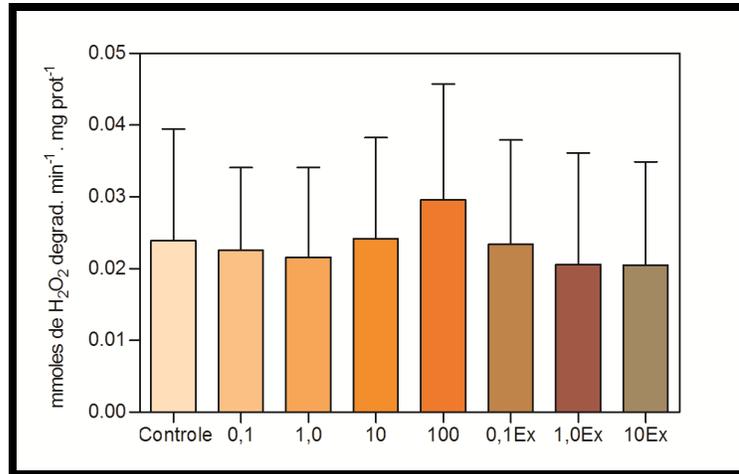


Figura 20 - Atividade específica da CAT. Média  $\pm$  desvio padrão. Atividade em milimoles de peróxido de hidrogênio degradado por minuto por miligrama de proteínas totais. Total de réplicas por grupo = 33-36 (3 experimentos independentes). Grupos expostos à toxina purificada (0,1; 1,0; 10, e 100) e ao extrato aquoso contendo CYN (0,1E; 1,0E e 10E).

Para a SOD, somente o grupo 10E teve uma redução significativa em sua atividade (26,6%,  $p < 0,05$ ) (Figura 21).

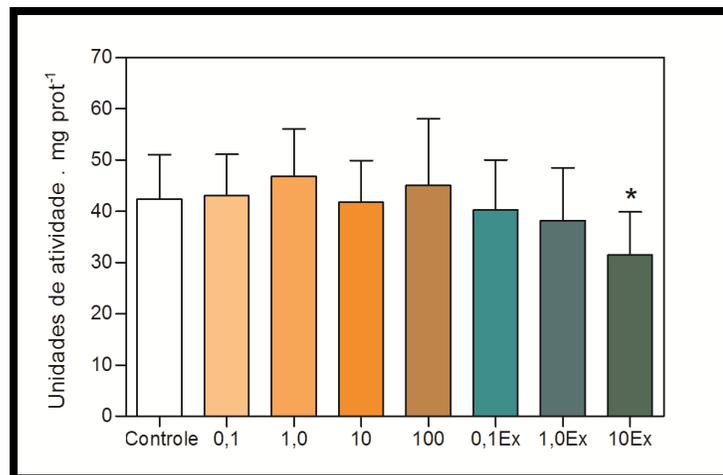


Figura 21 - Atividade específica das SOD. Média  $\pm$  desvio padrão. Atividade em micromoles do tioéter GSH-CDNB formado por minuto por miligrama de proteínas totais. \* =  $p < 0,05$ . Total de réplicas por grupo = 30-33 (3 experimentos independentes). Grupos expostos à toxina purificada (0,1; 1,0; 10, e 100) e ao extrato aquoso contendo CYN (0,1E; 1,0E e 10E).

Para a G6PDH, não houve diferença estatística significativa entre os grupos testados em relação ao controle (Figura 22).

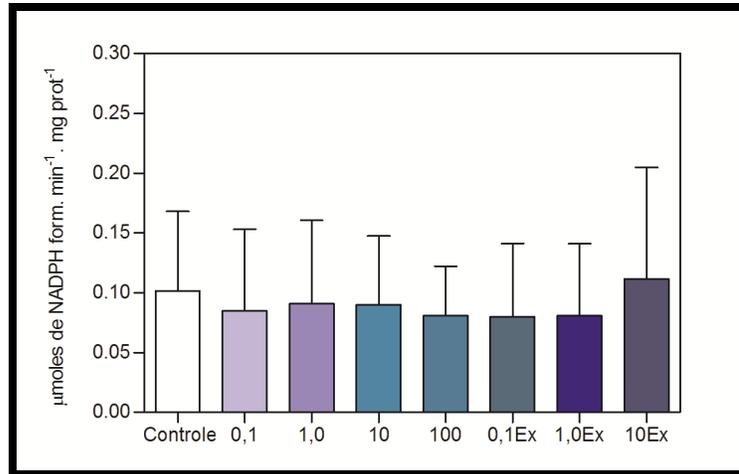


Figura 22 - Atividade específica da G6PDH. Média  $\pm$  desvio padrão. Atividade em micromoles de NADPH formado a partir da redução do NADP<sup>+</sup> por minuto por miligrama de proteínas totais. Total de réplicas por grupo = 30-33 (3 experimentos independentes). Grupos expostos à toxina purificada (0,1; 1,0; 10, e 100) e ao extrato aquoso contendo CYN (0,1E; 1,0E e 10E).

Não houve diferença nas atividades de GPx em nenhum grupo testado (Figura 23).

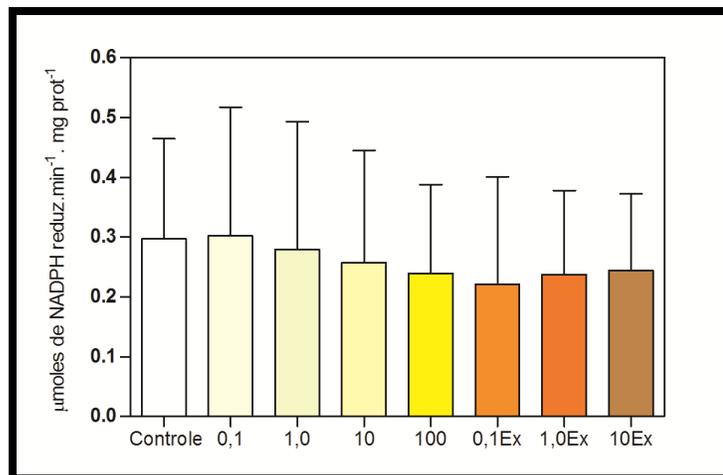


Figura 23 - Atividade específica da GPx. Média  $\pm$  desvio padrão da média. Atividade em micromoles de NADP<sup>+</sup> reduzido a NADPH por minuto por miligrama de proteínas totais. Total de réplicas por grupo = 24-28 (3 experimentos independentes). Grupos expostos à toxina purificada (0,1; 1,0; 10, e 100) e ao extrato aquoso contendo CYN (0,1E; 1,0E e 10E).

A GR sofreu redução significativa na sua atividade em todos os grupos (1 – 25,4%; 10 – 30,8%; 100 – 52,8%; 0,1Ex – 65,7%; 1Ex – 50,7%; 10Ex – 49,5%), exceto no grupo 0,1

exposto a toxina purificada (redução de 14,6%). A comparação entre os grupos expostos ao extrato e toxina purificada mostrou diferença significativa entre os grupos 0.1 e 0.1E (60%) e os grupos 1 e 1E (34%). Já na comparação entre os grupos 10 e 10E, não se observou diferença significativa, no entanto, houve 27% de redução do grupo 10E em relação ao grupo 10 (Figura 24).

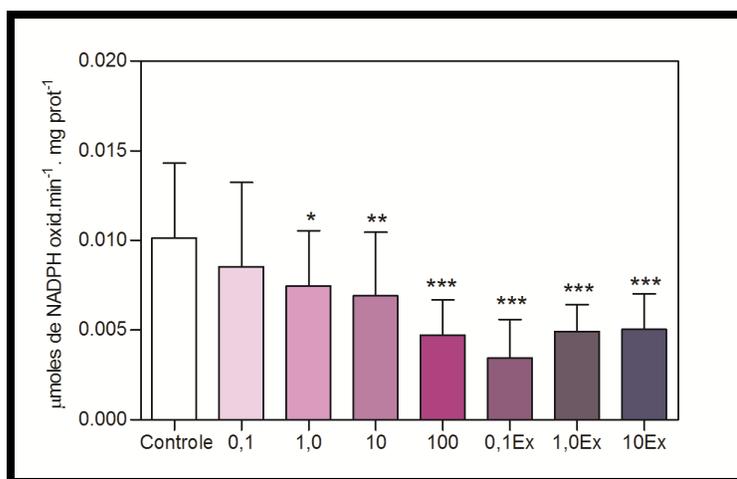


Figura 24 - Atividade específica da GR. Média  $\pm$  desvio padrão. Atividade em micromoles de NADPH oxidado a  $\text{NADP}^+$  por minuto por miligrama de proteínas totais. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$  e \*\*\* =  $p < 0,001$ . Total de réplicas por grupo = 26-29 (3 experimentos independentes). Grupos expostos à toxina purificada (0,1; 1,0; 10, e 100) e ao extrato aquoso contendo CYN (0,1E; 1,0E e 10E).

Para a GST, houve um aumento significativo na atividade destas enzimas apenas no grupo 10E (33,3%) (Figura 25).

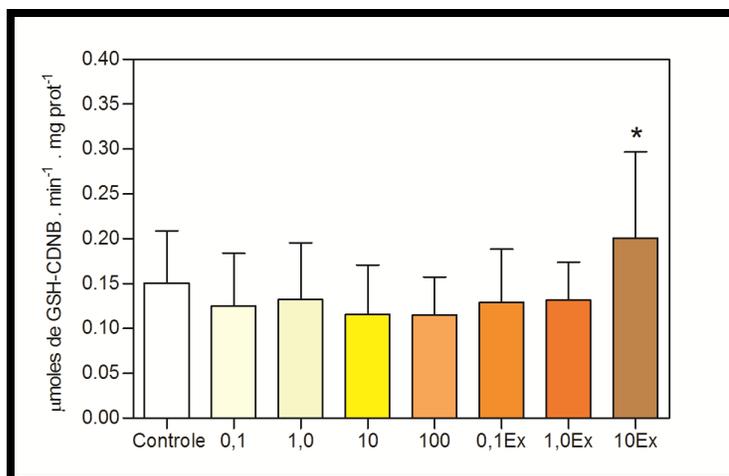


Figura 25 - Atividade específica de diferentes isoformas da GST. Média  $\pm$  desvio padrão. Atividade em micromoles do tioéter GSH-CDNB formado por minuto por miligrama de proteínas totais.\* =  $p < 0,05$  (asteriscos em comparação com o grupo controle). Total de réplicas por grupo = 29-32 (3 experimentos independentes). Grupos expostos à toxina purificada (0,1; 1,0; 10, e 100) e ao extrato aquoso contendo CYN (0,1E; 1,0E e 10E).

#### 4.3. Conteúdo de GSH:

O conteúdo de GSH aumentou significativamente apenas no grupo 100 (71,5%).

(Figura 26).

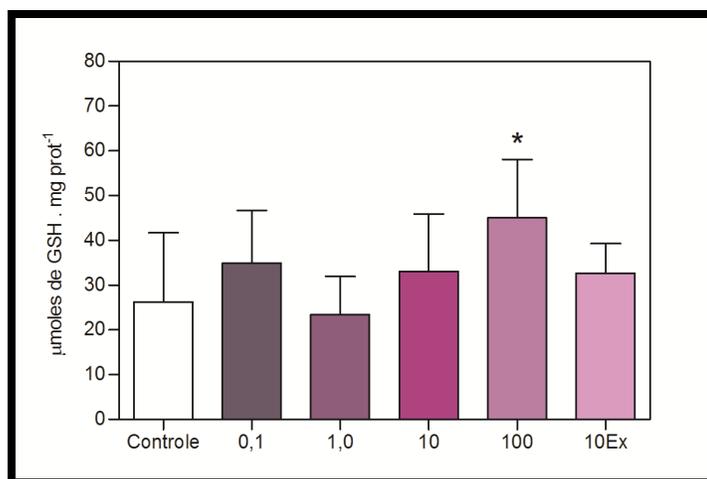


Figura 26 - Conteúdo de GSH. Média  $\pm$  desvio padrão. Concentração em micromoles de GSH por miligrama de proteínas totais. \* =  $p < 0,05$  (asteriscos em comparação com o grupo controle). Total de réplicas por grupo = 12 (3 experimentos independentes). Grupos expostos à toxina purificada (0,1; 1,0; 10, e 100) e ao extrato aquoso contendo CYN (10E).

#### 4.4. Peroxidação de lipídios (LPO) e Carbonilação de proteínas (PCO):

A LPO aumentou significativamente somente no grupo 10E (75,8%) (Figura 27).

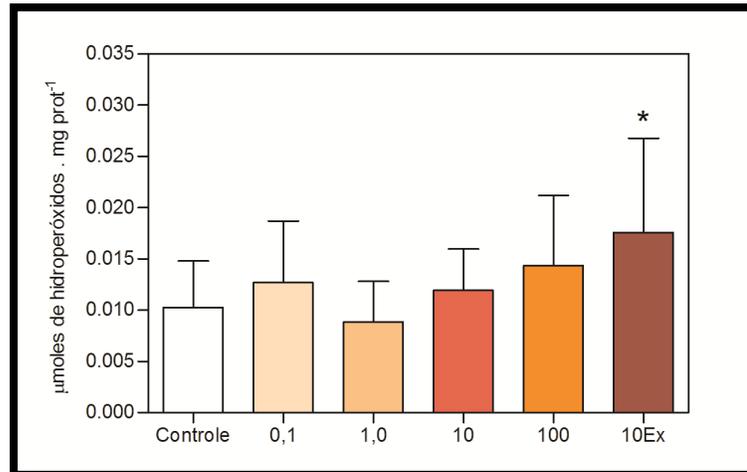


Figura 27 - Peroxidação de lipídios – concentração de hidroperóxidos lipídicos. Concentração em micromoles de hidroperóxidos por miligrama de proteínas totais. Média  $\pm$  desvio padrão. \* =  $p < 0,05$  (asteriscos em comparação com o grupo controle). Total de réplicas por grupo = 12 (3 experimentos independentes). Grupos expostos à toxina purificada (0,1; 1,0; 10, e 100) e ao extrato aquoso contendo CYN (10E).

A PCO diminuiu apenas no grupo 10E (30,3%). Nos demais grupos testados não houve diferença significativa em relação ao grupo controle (Figura 28).

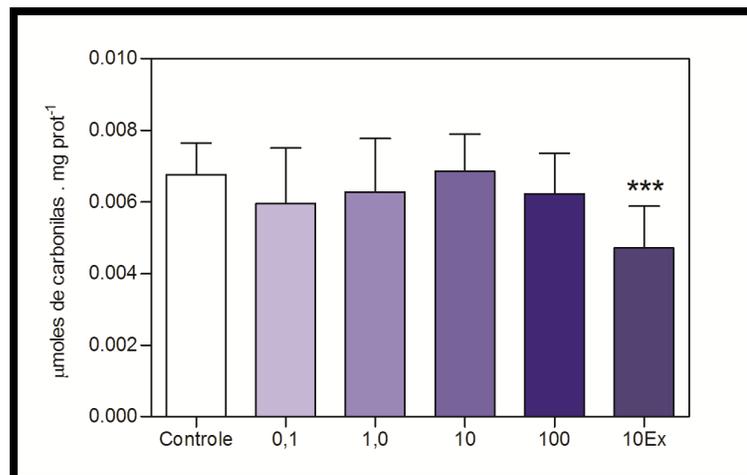
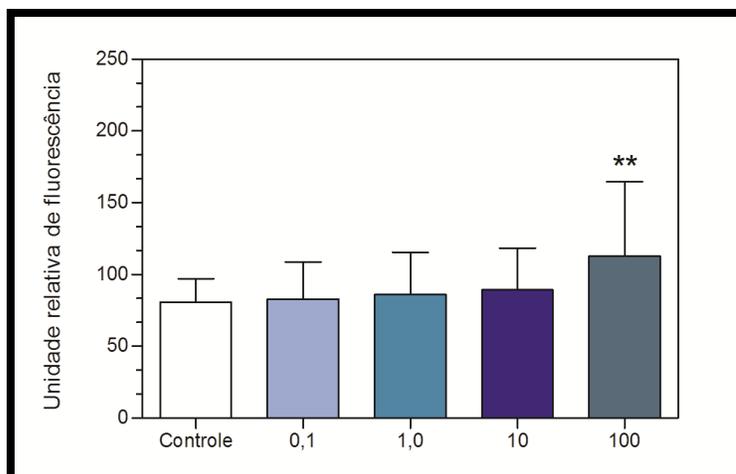


Figura 28 - Carbonilação de proteínas. Concentração de proteínas carboniladas em micromoles de carbonilas por miligrama de proteínas totais. Média  $\pm$  desvio padrão. \*\*\* =  $p < 0,001$  (asteriscos em comparação com o grupo controle). Total de réplicas por grupo = 12 (3 experimentos independentes). Grupos expostos à toxina purificada (0,1; 1,0; 10, e 100) e ao extrato aquoso contendo CYN (10E).

#### 4.5. Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs):

Os níveis de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) aumentaram significativamente somente no grupo 100 (40%) (Figura 29), embora não tenha sido possível realizar os testes com o extrato aquoso.



**Figura 29** - Produção de espécies reativas de oxigênio. Produção de EROs em unidade relativas de intensidade de fluorescência. \*\* =  $p < 0,01$  (asteriscos em comparação com o grupo controle). Total de réplicas por grupo = 26-29 (3 experimentos independentes). Grupos expostos à toxina purificada (0,1; 1,0; 10, e 100).

#### 4.6. Ensaio cometa:

Na avaliação de genotoxicidade, através do ensaio cometa, os nucleóides foram classificados pela atribuição de um valor numérico de acordo com o comprimento dos “rastros de DNA”. Para isso, um escore de dano foi calculado (Figura 30 e tabela 2). Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos testados.

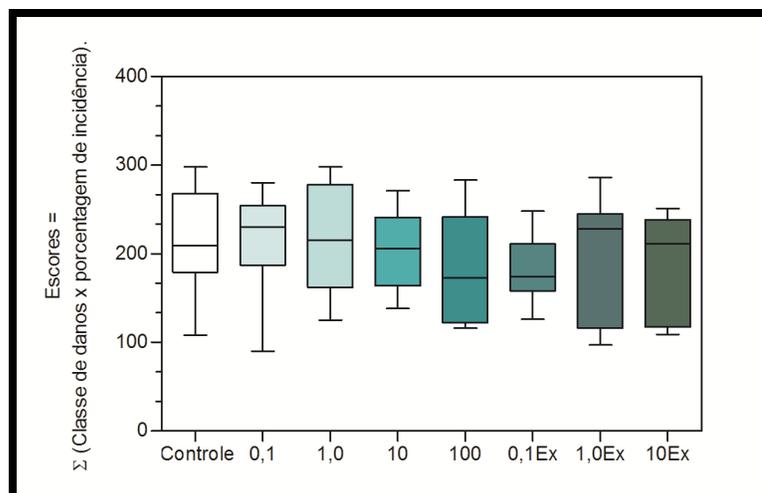


Figura 30 - Escores de danos ao DNA. Média  $\pm$  erro padrão da média. Escore = (classe do dano x % de incidência). Total de réplicas por grupo = 9 (3 experimentos independentes). Grupos expostos à toxina purificada (0,1; 1,0; 10, e 100) e ao extrato aquoso contendo CYN (0,1E; 1,0E e 10E).

Tabela 1 - Percentagem de incidência das classes de dano ao DNA (0, 1, 2, 3 e 4) e escores.

<b>Grupos</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>scores</b>
<b>Controle</b>	11.5 $\pm$ 11.4	14.4 $\pm$ 8.0	30.6 $\pm$ 15.3	41.9 $\pm$ 23.6	4.4 $\pm$ 4.3	<b>215.9 <math>\pm</math> 58.5</b>
<b>0.1</b>	13.2 $\pm$ 15.1	14.8 $\pm$ 9.9	31.9 $\pm$ 10.6	37.6 $\pm$ 24.0	2.6 $\pm$ 4.6	<b>201.7 <math>\pm</math> 66.3</b>
<b>1.0</b>	15.6 $\pm$ 13.5	12.0 $\pm$ 6.9	33.5 $\pm$ 9.4	30.4 $\pm$ 21.7	2.7 $\pm$ 3.6	<b>209.9 <math>\pm</math> 64.1</b>
<b>10</b>	14.5 $\pm$ 11.6	18.3 $\pm$ 9.6	31.2 $\pm$ 9.1	32.8 $\pm$ 19.4	3.5 $\pm$ 4.3	<b>192.8 <math>\pm</math> 54.3</b>
<b>100</b>	19.5 $\pm$ 13.4	19.0 $\pm$ 8.9	28.3 $\pm$ 9.6	29.4 $\pm$ 18.7	3.9 $\pm$ 7.6	<b>179.3 <math>\pm</math> 60.9</b>
<b>0.1E</b>	19.7 $\pm$ 11.6	18.9 $\pm$ 10.9	30.1 $\pm$ 12.1	29.0 $\pm$ 18.2	2.3 $\pm$ 3.5	<b>175.4 <math>\pm</math> 46.0</b>
<b>1E</b>	17.9 $\pm$ 14.7	15.1 $\pm$ 9.8	22.7 $\pm$ 7.8	40.1 $\pm$ 21.9	4.2 $\pm$ 7.3	<b>197.5 <math>\pm</math> 67.0</b>
<b>10E</b>	20.8 $\pm$ 16.8	17.2 $\pm$ 7.7	28.3 $\pm$ 7.7	28.8 $\pm$ 19.6	4.9 $\pm$ 6.7	<b>179.8 <math>\pm</math> 66.2</b>

Média  $\pm$  erro padrão da média. Escore = (classe do dano x % de incidência). Total de réplicas por grupo = 9 (3 experimentos independentes).

## 5. DISCUSSÃO:

Os usos de linhagens celulares ou de cultivos primários de células animais representam ferramentas preciosas e indispensáveis para os estudos de toxicidade envolvendo diferentes classes de xenobióticos, uma vez que estas células, principalmente as provenientes de cultivos primários, representam modelos muito próximos da realidade *in vivo* (FILIPAK-NETO et al., 2006). Em comparação com as técnicas *in vivo*, as técnicas *in vitro* oferecem algumas vantagens, principalmente no que se refere às questões éticas e econômicas.

As técnicas para obtenção dos hepatócitos para cultivos primários são bem difundidas desde o final da década de 1960 (BERRY e FRIEND, 1969), e Filipak Neto e colaboradores (2006) padronizaram este método para uma espécie nativa brasileira, *Hoplias malabaricus*, constituindo o primeiro estudo para esse tipo de cultivo com uma espécie de peixe nativa.

Seguindo o mesmo protocolo, não foi possível obter o mesmo rendimento celular que os autores citados obtiveram. Problemas de contaminações, não-adesão das células aos poços das microplacas, baixo rendimento e morte celular foram freqüentes. Por isso, algumas adequações aos procedimentos de isolamento foram implementadas, como por exemplo, o choque com antibióticos e antifúngicos, uso de enzimas (dispase) para auxiliar na dissociação celular e adição de glicose em algumas etapas do procedimento. Fato este que aumentou a sobrevivência das células. Ao final, houve melhora considerável na obtenção e rendimento celulares, entretanto, os problemas ainda permaneciam em alguns casos.

Uma possível explicação para a não-adesão das células seria o fato de termos utilizado microplacas (marca Corning®) sem pré-tratamento com matrigel ou colágeno (tipo I) para facilitar a adesão, o que não explica totalmente o observado, visto que Filipak Neto et al., (2006) utilizaram garrafas de cultura da mesma marca e sem pré-tratamento e tiveram sucesso.

Em relação à viabilidade e o baixo rendimento celular, já foi previamente descrito que a “espécie doadora” tem papel crucial no sucesso das culturas (FAISAL et al., 1995). No presente estudo, alguns espécimes de peixes coletados estavam, aparentemente, em perfeito estado nutricional e de saúde, o que viabilizaria células saudáveis para cultura. Entretanto, outros indivíduos não o estavam, impossibilitando a obtenção de células viáveis para o cultivo. Portanto, o estado geral de saúde do animal utilizado para obtenção de células para cultivo deve ser minuciosamente considerado antes do início dos experimentos para obtenção de cultivos celulares primários.

Estes fatos (morte e baixa viabilidade celular, não-adesão, contaminações e peixes em estado de saúde não-ideais) levaram a eliminação de alguns grupos de exposição à toxina, que teriam sido importantes neste estudo, como por exemplo, os grupos expostos ao extrato tóxico para verificação da geração de ERO.

Além disso, a logística na montagem dos grupos de exposição (Figuras 17 e 18) levou a exclusão de alguns quando expostos em microplacas de 24 poços. Alguns cultivos realizados nesse tipo de microplacas foram imprescindíveis, já que havia necessidade de altas concentrações de proteínas para a realização dos ensaios bioquímicos (ex. GSH, LPO e PCO). Apesar desse fato, acreditamos que discussões altamente relevantes com os resultados obtidos são perfeitamente cabíveis em relação aos efeitos citotóxicos da CYN (purificada e extrato aquoso).

O fígado e suas principais células constituintes, os hepatócitos, são órgão/células-alvo da ação de inúmeros xenobióticos, inclusive as cianotoxinas. Os mecanismos de lesão hepática causada por xenobióticos não-naturais foram amplamente estudados nos últimos anos, no entanto, os efeitos causados por cianotoxinas (exceto para microcistinas), principalmente a CYN, são descritos em estudos ainda reduzidos e recentes, sobretudo como agentes atuantes no desbalanço do ambiente redox celular. Por isso, os mecanismos

detalhados de toxicidade hepática da CYN ainda não são claros (WILLIAMS e JAESCHKE, 2011).

Já foi mostrado que os cultivos primários de hepatócitos podem ser utilizados como modelos celulares sensíveis para os ensaios de citotoxicidade da CYN (LIEBEL et al., 2011). Nesse sentido, investigamos os efeitos da CYNp e CYNex em cultura primária de hepatócitos de um peixe neotropical de fundamental importância ecológica e econômica.

Com base nos resultados observados podemos constatar que o ensaio de viabilidade celular foi um dos parâmetros que se mostrou mais sensível aos efeitos da CYN. Em ambos os grupos testados houve uma redução significativa em relação à viabilidade celular (média de  $20 \pm 2\%$ ) revelando que a CYN, presente tanto no extrato aquoso quanto de forma purificada, foi citotóxica aos hepatócitos em todas as concentrações testadas. A viabilidade celular é um dos ensaios de citotoxicidade mais utilizados para avaliar os efeitos de um contaminante. Este ensaio avalia o percentual de células saudáveis numa dada população de células exposta a um dado xenobiótico. Um decréscimo na viabilidade destas células pode ser interpretado como resultado dos efeitos tóxicos causados por algum estressor. Neste estudo, foi utilizado o teste de incorporação/exclusão do corante vital vermelho neutro que avalia a integridade e permeabilidade da membrana lisossomal (FAUTZ et al., 1991). Esta redução da viabilidade celular causada pela CYN já foi verificada em outros estudos utilizando cultura primária de hepatócitos de peixes de outra espécie (*Prochilodus lineatus*) (LIEBEL et al., 2011) e linhagens celulares diversas (CHONG et al., 2002; NEUMANN et al., 2007; FROSCIO et al., 2009; GUTIÉRREZ-PRAENA et al., 2011a; 2012a).

De fato, a redução na viabilidade celular pode estar intimamente ligada à geração e, conseqüentemente, aos efeitos deletérios das ERO. Já foi verificado que a CYN aumenta a produção de ERO em diferentes linhagens celulares (LIEBEL et al., 2011; GUTIÉRREZ-

PRAENA et al., 2011a) portanto, podemos considerar que trata-se de uma característica da toxicidade desta cianotoxina, no entanto, ainda pouco elucidada.

No presente estudo, a ERO avaliada ( $H_2O_2$ ) somente aumentou no grupo exposto a concentração mais alta de CYNp, muito embora não tenha sido realizado o ensaio com o extrato, que poderia até mesmo ser mais tóxico. Este aumento de ERO pode ter causado um desbalanço no ambiente redox celular, levando a redução da viabilidade celular dos hepatócitos. Liebel et al. (2011) observaram que a CYNp, mesmo em baixas concentrações ( $0,1 \mu gL^{-1}$ ) produz EROs, e além disso, ainda é capaz de inibir a atividade do complexo MXR (*multi-xenobiotic resistance*) o que pode impedir o efluxo de agentes tóxicos, sejam eles as ERO ou a CYN propriamente dita. Humpage et al. (2005) afirmaram que a relação entre formação de ERO e citotoxicidade causada pela CYN não era clara em hepatócitos de ratos. No entanto, o presente estudo mostra que as ERO podem estar associadas diretamente à toxicidade da CYN em hepatócitos de traíras, uma vez que essas ERO ( $H_2O_2$ ) são capazes de transpor as membranas celulares e gerar o radical  $OH^{\bullet}$  que por sua vez é extremamente reativo e pode causar danos à DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial.

O aumento na produção de EROs nos hepatócitos via exposição à CYN pode estar intimamente relacionado com o metabolismo mitocondrial dessas células, e como já mencionado, pode conduzir à morte celular por necrose ou apoptose, além de genotoxicidade. Portanto, o presente trabalho se propõe a sugerir um mecanismo alternativo (Figura 31). A toxicidade da CYN depende da metabolização pelas enzimas do complexo CYP450 (HUMPAGE et al. 2005), onde a atividade deste complexo é bastante elevada nos hepatócitos. O aumento da produção de  $H_2O_2$  (e até mesmo outras EROs não avaliadas neste trabalho) induzida pela CYN, ou o desbalanço no ambiente redox dos hepatócitos, pode aumentar o influxo de cálcio para a matriz mitocondrial, e esse fator tende a afetar a permeabilidade

mitocondrial (MPT - “*Mitochondrial Permeability Transition*”), aumentando-a. Entretanto, não se sabe se: (i) o aumento das EROs se dá por causa da alteração da MPT ou (ii) a MPT é uma consequência da liberação das EROs. Independente da causa, a consequência disso vai desde a liberação de fatores apoptóticos (ZEGURA et al., 2011; STRASER et al., 2012), perda de potencial de membrana mitocondrial (PMM) com depleção da síntese de ATP e aumento (retroalimentação) na produção de EROs, todos tendo como consequência final a morte celular. Na presença de elevadas concentrações de cálcio intracelular a MPT é induzida o que, por sua vez, pode estimular mais abertura de poros da membrana mitocondrial, gerando um ciclo de *feedback* positivo.

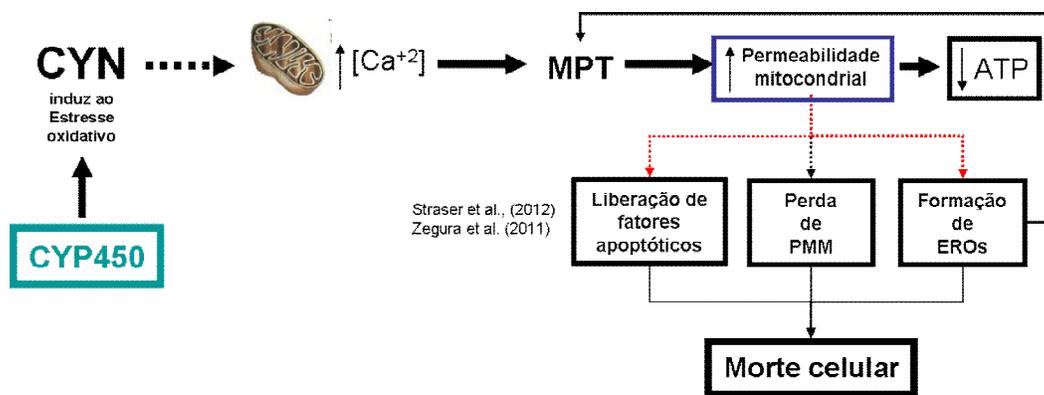


Figura 31 - Proposição de mecanismo alternativo de hepatotoxicidade após exposição à CYN através da formação de ERO, e conseqüente morte celular.

Sabe-se que as microcistinas são capazes de aumentar o influxo de cálcio em mitocôndrias de hepatócitos de ratos (DING et al., 2001) e que alguns fármacos metabolizados pelas enzimas do complexo CYP450 - alcalóides, assim como a CYN - possuem mecanismo semelhante de atuação em hepatócitos humanos, ou seja, aumentando MPT e levando ao aumento de ERO e causando a morte celular por necrose (TAY et al., 2005). A capacidade de a CYN induzir a MPT pode ser um aspecto importante da sua hepatotoxicidade, e isso levaria a uma diminuição da função mitocondrial das células expostas.

A possível toxicidade mitocondrial causada pela CYN, e que pode ser mediada pelas EROs, pode ser explicada por mecanismos que já foram observados em outros compostos nitroaromáticos. Similar a esses outros compostos, a CYN pode ter seus grupamentos nitrogenados reduzidos a uma amina primária e, durante esse ciclo redox, o oxigênio molecular seria reduzido ânions superóxido (BERNAREGGI, 1998), que é uma potente EROs, e que levaria a mitocôndria ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, à MPT (KOWALTOWSKI et al., 2001). Além disso, sabe-se que, nesses compostos, a formação da EROs é uma conseqüência da MPT e não a sua causa (TAY et al., 2005). Logo, este pode ser o mecanismo de toxicidade importante associado à CYN e EROs.

Como mencionado, as EROs podem causar efeitos danosos em algumas macromoléculas, entre elas as membranas celulares. A oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, presentes nas membranas celulares e lipoproteínas, é uma característica peculiar das EROs, fenômeno este que é conhecido como peroxidação lipídica (LPO). A LPO pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação das EROs sobre os lipídios insaturados das membranas celulares alterando a sua permeabilidade, podendo levar a morte celular (BENZIE, 1996). Nas células, a LPO pode ocorrer principalmente por duas vias distintas: uma via enzimática (ciclooxigenases e lipoxigenases, que participam da oxigenação dos ácidos graxos poliinsaturados) e outra via não-enzimática, que envolve a participação das EROs e outros radicais livres (PORTER et al., 1995). No presente estudo, notavelmente, não foi observado aumento significativo na concentração de hidroperóxidos lipídicos em nenhum grupo exposto à CYN purificada, embora possa haver uma tendência ao aumento na concentração desses metabólitos na maior concentração deste grupo. Esse resultado pode ser explicado pelos níveis de ERO em CYNp semelhante ao grupo controle (exceto o grupo  $100 \mu\text{gL}^{-1}$ ), e também pela possível eficiência de GSH e das enzimas CAT, GPx e SOD que são as principais responsáveis pela remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (CAT e GPx) e

$O_2^{\cdot}$  (SOD). Em CYNex, as células expostas a maior concentração de toxina apresentaram concentrações significativamente altas de hidroperóxidos lipídicos e, somado ao fato de ter sido verificado um decréscimo na atividade da SOD nesta concentração, podemos supor que o acúmulo de  $O_2^{\cdot}$  nos hepatócitos pode ter levado ao aumento de LPO. Este resultado sugere que outras moléculas presentes neste extrato aquoso sejam citotóxicas e não somente a CYN propriamente dita. Além disso, estes resultados nos permitem inferir que a redução da viabilidade celular dessas nos hepatócitos pode não ter ligação com este tipo de dano celular.

Algumas moléculas desempenham papel crucial na defesa antioxidante, na manutenção da homeostase celular e na desintoxicação de vários xenobióticos. A glutathiona (GSH) realiza todas essas funções. Na presença de GSH, a glutathiona peroxidase (GPx) catalisa a redução de hidroperóxidos orgânicos ou peróxido de hidrogênio formando glutathiona dissulfeto (GSSG). A formação de GSSG ou conjugados de GSH podem resultar na depleção de GSH celular, mas que pode ser repostada por duas vias principais: (i) através da redução da GSSG via glutathiona redutase (GR) e através de síntese *de novo* em um ciclo chamado  $\gamma$ -glutamil (MEISTER E ANDERSON, 1983). Já foi reportado que a CYN causa redução tanto nos níveis quanto na síntese de GSH em hepatócitos de mamíferos (RUNNEGAR et al, 1994;1995; HUMPAGE et al., 2005) no entanto, foi sugerido que isto não contribui significativamente para a toxicidade da CYN (NORRIS et al., 2002). Em nossos resultados, observamos que houve aumento significativo nas concentrações de GSH somente nas células expostas a maior concentração de CYNp, indicando que possivelmente a células estariam tentando combater as EROs geradas naquele grupo.

Um desequilíbrio na razão GSH/GSSG no ambiente redox intracelular pode ser muito danoso para célula (SCHAFER E BUETTNER, 2001). Como citado anteriormente, esse balanço é mantido basicamente por quatro moléculas: (i) GSH e GSSG propriamente ditas, (ii) GR e (iii) GPx. Adicionalmente, a redução de GSSG à GSH, através da GR, é dependente de

NADPH, molécula esta que pode ser regenerada pela ação da enzima G6PDH (KLETZIEN et al., 1994; SCHAFFER E BUETTNER, 2001). Portanto, qualquer alteração na concentração ou atividade destas moléculas pode acarretar o desbalanço deste microambiente. No presente estudo observamos que não houve alteração significativa nas atividades da G6PDH e GPx, e que portanto, em teoria, o suprimento de NADPH e formação de GSSG estariam em perfeita manutenção. Porém, a atividade da GR está significativamente baixa em quase todos os grupos testados (exceto  $0,1 \mu\text{gL}^{-1}$  CYNp), isto poderia alterar a formação de GSH, fato que não foi observado neste estudo. Alguns estudos mostram que a GSH estaria envolvida diretamente na remoção de xenobióticos e EROs (GUTIÉRREZ-PRAENA et al., 2012a), entretanto, como mencionado anteriormente, alguns autores afirmam que o mecanismo tóxico da CYN não depende de GSH (NORRIS et al., 2002; HUMPAGE et al., 2005). Portanto, ainda são inconclusivas as respostas frente à função exata da GSH para exposição à CYN uma vez que a medição direta do conjugado CYN-GSH ainda não foi estudada.

Além de causar danos oxidativos em diferentes tipos celulares, a CYN é capaz de causar danos genotóxicos importantes tanto *in vitro* quanto *in vivo* (HUMPAGE et al., 2000; SHEN et al., 2002; ZEGURA et al., 2011; STRASER et al., 2012). A presença de um grupamento uracila na molécula de CYN leva a crer que este pode reagir com os grupos adenina do DNA ou RNA interferindo na síntese desses ácidos nucléicos, levando a mutações e processos carcinogênicos, no entanto, para ter essa característica pró-genotóxica a CYN precisa ser metabolicamente ativada por enzimas do complexo CYP450 e, somado ao fato que culturas primárias de hepatócitos de peixes são capazes de manter constantes seus níveis de CYP450 por até 5 dias (PESONEN E ANDERSSON, 1991) era esperado que houvessem danos tanto ao DNA quanto às proteínas, principalmente no grupo CYNp100 já que havia altas concentrações de EROs, os quais podem interagir com estas biomoléculas, danificando-as. Entretanto, não foram observados danos ao DNA e proteínas neste estudo, indicando que o

mecanismo de defesa antioxidante (principalmente GSH) assim como o mecanismo de reparo dos hepatócitos foi muito eficiente nesse sentido ou ainda, que o mecanismo de toxicidade da CYN, neste caso específico, não envolve danos a estas moléculas. Além disso, o tipo celular e a espécie do animal, bem como a concentração de CYN utilizada, podem ter sido cruciais nos resultados apresentados.

Resultados semelhantes já foram observados em outros estudos com linhagens de células de mamíferos (FESSARD E BERNARD, 2003; LANKOFF et al., 2007; BAZIN et al., 2010) e peixes (LIEBEL et al, 2011). Os danos ao material genético podem ser observados através de biomarcadores citogenéticos, entre eles os que utilizam a técnica e ensaio cometa (SALVADORI et al., 2003) que detecta danos recentes, como por exemplo, quebra nas cadeias simples duplas de DNA ou sítios álcali-lábeis mas que ainda são passíveis de correção (GROFF et al., 2010).

Os aspectos toxicológicos de uma determinada substância podem ser verificados através de diferentes abordagens. Nesse sentido, o cultivo primário de células se mostra uma ferramenta importante uma vez que estas células conservam as características básicas dos modelos *in vivo* (BAKSI e FRAZIER, 1990). Logo, modelos *in vitro* empregando cultivo primário de hepatócitos são ferramentas aplicáveis em diversos estudos, já que este tipo celular são células muito versáteis do ponto de vista metabólico, respondem aos sinais para os quais eles respondiam antes da dissociação do fígado e são ricos em enzimas de metabolismo de drogas e xenobióticos (GUILLOUZO et al., 1990).

Os resultados apresentados, tanto no estudo *in vivo* quanto no *in vitro*, mostraram que a CYN foi capaz de provocar danos oxidativos no cérebro, fígado (Capítulo I e II) e hepatócitos dos animais expostos. Abordando mais especificamente o tecido hepático, nota-se que a peroxidação de lipídios ocorreu tanto no órgão quanto nos hepatócitos, já a carbonilação de proteínas ocorreu somente no fígado dos animais. Tal resultado sugere que a metabolização da

CYN no fígado íntegro pode ter levado à PCO, ao passo que esta metabolização decresce ao longo do tempo no hepatócito.

Como mencionado nos capítulos anteriores, estudos comparando os efeitos da CYN purificada com a CYN presente em extrato aquoso ainda são escassos. Artigos científicos mostram que o extrato tóxico de cianobactérias pode conter diferentes compostos bioativos, que não são as cianotoxinas conhecidas, mas são capazes de causar efeitos danosos aos organismos expostos tanto em ensaios *in vitro* quanto *in vivo* (FALCONER, 2007; PUERTO et al., 2011b; HUMPAGE et al., 2012). O estudo do desenvolvimento embrionário de peixes zebra (*Danio rerio*) expostos o extrato tóxico aquoso de *Cylindrospermopsis raciborskii* (cepa CYP011K) contendo CYN indicou que este chega a ser 200 vezes mais tóxico do que a toxina purificada (comunicação pessoal).

Nesse sentido dois grandes grupos foram testados neste estudo: o grupo exposto à CYN purificada (CYNp) e àquele exposto ao extrato aquoso contendo CYN (CYNex) em *H. malabaricus* tanto *in vivo* como *in vitro*. De maneira geral, o extrato aquoso se mostrou mais tóxico, tanto *in vitro* (redução da viabilidade celular e LPO) quanto *in vivo* (LPO no cérebro e fígado, PCO no fígado, maior número de injúrias (histopatologia) e maior índice de Bernet).

## 6. CONCLUSÕES:

- O uso de culturas primárias de hepatócitos de traíras se mostrou bastante satisfatório para avaliar a toxicidade da CYN.
- A redução e/ou aumento nos níveis e atividades de alguns dos biomarcadores utilizados é um forte indício que os hepatócitos expostos à CYN apresentavam um estado de estresse oxidativo.
- Não foram encontrados danos ao DNA e proteínas tanto no extrato quanto na toxina purificada, isto pode ser justificado pela perda progressiva da capacidade metabólica dos hepatócitos ao longo do tempo que é necessária para a bioativação da toxina.
- O aumento de  $H_2O_2$  associado ao aumento de LPO em CYNp indica que estes biomarcadores têm importante papel no seu mecanismo de toxicidade.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos envolvendo a interação entre a CYN e peixes vêm crescendo nos últimos anos, isto se justifica pelo fato de que estes organismos são os primeiros a entrarem em contato com essas toxinas, uma vez ambos estão na água. Portanto, elucidar os mecanismos de toxicidade da CYN nestes animais é condição imprescindível para a compreensão dos seus efeitos biológicos no ecossistema aquático como um todo.

Como foram discutidos ao longo desta tese, os mecanismos de toxicidade da CYN ainda são desconhecidos, em grande parte. Os estudos *in vivo* aliados aos estudos *in vitro* são ferramentas fundamentais para ampliar esse conhecimento. Os dados obtidos neste estudo são inéditos na literatura uma vez que mostram a toxicidade da CYN, em duas formas de exposição (purificada - CYNp e extrato aquoso - CYNex), utilizando-se ferramentas bioquímicas e os biomarcadores em uma espécie de peixe nativa da fauna brasileira, muito embora os resultados não tenham apresentado diferenças significativas entre as duas formas de intoxicação, o que *per se* já se torna um importante campo de investigação uma vez que o extrato aquoso tende a ser mais tóxico (fato já discutido anteriormente).

A espécie *Hoplias malabaricus* é um peixe com alta relevância econômica e ecológica, e utilizá-lo como modelo de estudo da ação da CYN ampliou o conhecimento sobre a sua biologia frente à exposição à toxina, revelando alguns efeitos de toxicidade inéditos em peixes, como o potencial neurotóxico da CYN discutido no primeiro capítulo.

A ação neurotóxica da CYN já havia sido previamente discutida em bivalves, entretanto, sem a certeza de que se tratava da CYN propriamente dita, uma vez que não foi feita nenhuma análise mais acurada da molécula utilizada (KISS et al., 2002). Pela primeira vez, observamos que a CYN foi capaz de atravessar a barreira hematoencefálica do animal, chegando ao cérebro e causando dano oxidativo nas membranas celulares deste órgão (peroxidação de lipídios) e, além disso, mesmo após 14 dias de exposição, a toxina ainda

permanecia nesse órgão e no tecido muscular, o que representa um risco não só para o animal, mas também para os seus consumidores.

Não foi possível demonstrar diferença em relação à concentração de CYN nos grupos estudados, tanto no cérebro quanto no músculo, embora haja, no extrato, a presença de outros metabólitos, o que poderia facilitar a entrada da toxina no tecido/órgão, aumentando a sua concentração naquele local. Portanto, no capítulo I, não foi possível concluir qual forma de exposição foi mais danosa ao cérebro da traíra, já que, como resultado final, ambos causaram danos oxidativos (LPO) a esse órgão. Em relação à atividade da AChE, observamos uma atividade aguda (7 dias) e uma recuperação após 14 dias de exposição. Já no cérebro, a toxina purificada parece ter um efeito mais tardio, já que houve diminuição na atividade desta enzima somente após 14 dias. Há vários relatos que mostram a CYN com uma atividade tóxica rápida (mediada por CYP450) e uma atividade tóxica tardia (através da inibição de síntese protéica). Em parte isso faz todo sentido, já que a ACHE é uma proteína (enzima) e sua síntese pode estar sendo interrompida pelo efeito tardio da CYN pura, causando essa diminuição em 14 dias, entretanto, foi observado aumento da atividade no fígado do animais expostos, e tal fato não é corroborado por esta teoria.

O emprego dos diferentes biomarcadores para avaliação do estado redox em um modelo experimental não-exótico são os pontos de destaque dos ensaios realizados no Capítulo II que visou demonstrar a hepatotoxicidade da CYN. Sabe-se que o fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo de drogas e xenobióticos em vertebrados, já que os hepatócitos são altamente especializados na remoção de substâncias tóxicas recém-absorvidas, na sua biotransformação e no lançamento dos produtos de biotransformação na circulação (RODRIGUES, 2003) para posterior excreção - desintoxicação.

A exposição a uma dose única de CYN mostrou que mesmo após 14 dias de exposição, assim como no cérebro, a toxina ainda permanecia no tecido hepático do animal, além disso,

os animais expostos à CYNp tendem a apresentar maiores concentrações de CYN do que aqueles expostos ao extrato, fato diferente do que foi observado no capítulo I (cérebro e músculo). Isso levantou ainda mais os questionamentos sobre o papel efetivo das outras moléculas presentes no extrato em relação ao processo de acúmulo da CYN, indicando que esse acúmulo depende do órgão que está se estudando. Os biomarcadores utilizados para avaliar os danos oxidativos foram considerados satisfatórios em suas respostas, uma vez que mostraram o papel da CYN como molécula causadora desse tipo de injúria no tecido hepático do peixe (LPO e PCO). Os resultados também confirmaram o fato da toxina ter característica toxicológica crônica, pelo fato dos danos terem sido observados, principalmente, 14 dias pós-exposição. Os resultados dos biomarcadores foram corroborados pelos exames histopatológicos que apresentaram alta incidência de necrose nos tecidos, que provavelmente ocorreram em decorrência da exposição. O uso de uma ferramenta que integra os danos histológicos observados (índice de Bernet – BERNET et al., 1999) indicou que animais expostos a CYNex tiveram maior dano tecidual no 7º dia pós-exposição. Isso pode ser considerado um efeito precoce uma vez que os biomarcadores bioquímicos indicaram um efeito tardio (14º dia) da toxina. Os resultados indicam que a CYNex tende a ser mais tóxica que a CYNp no tecido hepático dos peixes.

Portanto, nos ensaios *in vivo* (capítulos I e II) nota-se que os biomarcadores de cérebro (ACHE e LPO) e fígado (LPO, danos morfológicos, resposta inflamatória e GST) avaliados foram satisfatórios para demonstrar os efeitos tóxicos da CYN.

O emprego de 12 diferentes biomarcadores, de concentrações mais realísticas da CYN e de um modelo *in vitro* ainda pouco explorado (hepatócitos de uma espécie não-exótica), são os pontos de destaque do Capítulo III. Infelizmente, alguns biomarcadores não puderam ser testados com todas as concentrações propostas, e como foi discutido no capítulo, a saúde do animal é condição primordial para a obtenção de culturas primárias viáveis de hepatócitos.

Apesar desse fato, o estudo mostrou que o ensaio de viabilidade celular e a atividade da GR se mostraram *endpoints* sensíveis a exposição às várias concentrações de CYN testadas. Adicionalmente, os resultados mostraram que os hepatócitos são mais sensíveis a exposição ao extrato do que a toxina purificada, fato observado através da resposta de alguns biomarcadores (GST, SOD, LPO, GR e viabilidade celular).

A luz dos dados apresentados, foi possível inferir que a toxicidade da CYN pode ser mediada por ERO, porém não somente por elas. O mecanismo proposto indica que além das ERO, outros fatores comprovadamente descritos (ZEGURA et al, 2011, STRASER et al., 2012) podem aumentar a permeabilidade mitocondrial levando a um quadro de morte celular por apoptose, fato que foi observado nos resultados de viabilidade celular. Além disso, não foi observado nenhum padrão em relação as respostas dos biomarcadores utilizados se comparados os estudos *in vivo* e *in vitro*.

A exposição pontual e aguda dos animais mostrou resultados interessantes a níveis bioquímicos e morfológicos. No entanto, vale mencionar que no ambiente essa exposição é contínua e crônica, e que, por esse fato, alguns resultados negativos apresentados nesta tese podem ter ocorrido uma vez que a literatura aponta a CYN com ação mais crônica.

Portanto, este trabalho mostrou o uso de diferentes biomarcadores no intuito de apontar os efeitos da CYN em um peixe da fauna brasileira. Alguns dados obtidos aqui são de grande valia para futuras discussões em relação aos efeitos toxicológicos da CYN em peixes bem como para dirigir futuras investigações. É incontestável que a CYN causou danos oxidativos tanto no cérebro quanto no fígado desses animais nos ensaios *in vivo*. Além disso, os ensaios *in vitro* mostraram que a CYN é capaz de reduzir a viabilidade celular dos hepatócitos de *Hoplias malabaricus* mesmo em concentrações relativamente baixas, o que indica um risco no que diz respeito a saúde pública (alerta à exposição humana). Isto se deve ao fato de que os organismos aquáticos tendem a ser mais resistentes do que mamíferos pelo

fato de cianobactérias e peixes co-existirem no mesmo habitat a milhares de anos, o que pode ter lhes conferido um mecanismo de resistência mais eficiente (LIRÅS et al., 1998). Adicionalmente este último aspecto pode justificar as respostas inalteradas de alguns biomarcadores estudados.

Por fim, fazem-se necessários estudos que visem a exposição de organismos aquáticos a CYN em diferentes formas de exposição (pura, extrato celular e célula íntegra) bem como diferentes vias (principalmente oral) com o intuito de elucidar ainda mais seus mecanismos de toxicidade, principalmente à nível molecular. O uso de concentrações encontradas em ambientes naturais, e o comparativo entre a toxina pura e o extrato tóxico são de grande valia para avaliar o potencial da toxina isoladamente e em sinergia com outras moléculas.

## CONCLUSÕES FINAIS

- De maneira geral não se observou nenhuma diferença em relação à concentração de CYN em relação à forma de exposição (extrato ou purificada) em nenhum tecido/órgão;
- Mesmo após 14 dias de exposição a toxina ainda permanecia no cérebro, fígado e tecido muscular, indicando que o mecanismo de desintoxicação não foi eficiente na remoção da toxina;
- Em relação à atividade da ACHE no músculo, a toxina mostrou um efeito (decréscimo) mais rápido (7 dias) em ambas as formas de exposição (extrato e purificada), no entanto há uma recuperação nesses níveis de atividade após 14 dias;
- Já em relação à atividade da ACHE no cérebro, a toxina mostrou um efeito (decréscimo) mais lento (14 dias) somente quando os peixes foram expostos a toxina purificada;
- Tanto a presença da toxina quanto os danos observados – diminuição da atividade da ACHE (CYNp) e peroxidação de lipídios (CYNp e CYNex) - indicam um potencial neurotóxico da CYN e que a mesma é capaz de transpor a barreira hematoencefálica;
- O conjunto de biomarcadores avaliados mostrou-se eficiente para avaliar os danos da CYN no fígado dos exemplares de *H. malabaricus* expostos;

- Apesar da ativação de algumas moléculas do mecanismo antioxidante (SOD, G6PDH e GST) no fígado dos animais, a toxina causou danos tanto em CYNex (peroxidação de lipídios e carbonilação de proteínas) quanto em CYNp (peroxidação de lipídios) após 14 dias pós-exposição;
- Houve alta incidência de necrose, centros de melanomacrófagos e melanomacrófagos livres principalmente em CYNex, sendo os dois últimos indicativos de ativação da resposta imune;
- O índice de Bernet mostrou maior grau de alterações no grupo CYNex após 7 dias de exposição, isso somado ao fato da carbonilação de proteínas ter ocorrido somente em CYNex, indica que o extrato aquoso foi mais tóxico para o fígado do que CYNp. O fato de outras moléculas estarem presentes no extrato pode ser a justificativa para esta resposta;
- A resposta do ensaio de viabilidade celular se mostrou um parâmetro importante na avaliação da toxicidade da CYN, uma vez que todos os grupos tiveram decréscimo nesse biomarcador;
- O aumento da ERO (CYNp) associado à diminuição da viabilidade celular mostra o potencial deletério desta toxina, embora não tenha se observado ERO nas mais baixas concentrações de CYNp;
- O extrato apresentou dano lipídico (LPO) aos hepatócitos somente na mais alta concentração, embora tenha sido observado um aumento na atividade da GST nesta condição o que sugere a tentativa de um efeito protetor;

- Não foi observado nenhum dano ao DNA, indicando que o mecanismo de reparo desta biomolécula foi eficiente, ou ainda, que o mecanismo de toxicidade da CYN não envolve este tipo de dano em hepatócitos de peixes;
- A boa saúde dos espécimes foi condição imprescindível para a obtenção de cultura saudáveis de hepatócitos;
- Tanto os modelos *in vitro* como *in vivo*, foram eficientes no estudo de toxicidade da CYN em hepatócitos de *H. malabaricus*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. 1984. Catalase *in vitro*. Methods Enzymol., v.105, p.121-126.

ALMROTH, B.C., 2008. Oxidative damage in fish used as biomarkers in field and laboratory studies. Department of Zoology/Zoophysiology, University of Gothenburg, Box 463, 405 30 Göteborg, Sweden.

ALVES COSTA, J.R.M.; MELA, M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; PELLETIER, E.; RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. Ecotoxicol. Environ. Saf., v.67, p.82-88, 2007

ANDRADE BRITO, I., ARRUDA FREIRE, C., YAMAMOTO, F.Y., SILVA DE ASSIS, H.C., RODRIGUES SOUZA-BASTOS, L., CESTARI, M.M., DE CASTILHOS GHISI, N., PRODOCIMO, V., FILIPAK NETO, F., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. 2012. Monitoring water quality in reservoirs for human supply through multi-biomarker evaluation in tropical fish. J Environ Monit. 14(2):615-25.

ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M. 1985. Aspectos biológicos de peixes amazônicos. V. Desenvolvimento larval do jaraqui-escama grossa, *Semaprochilodus insignis* (Characiformes, Pisces) da Amazônia central. Rev. Brasil. Biol., 45(4): 423-443.

ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M. E BITTENCOURT, M.M. 2002 A reprodução e o início da vida de *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae; Characiformes) na Amazônia Central. Acta Amazonica, Manaus, 32(2): 693-697.

ARTEEL, G.E. e SIES, H. 2001. The biochemistry of selenium and the glutathione system. Environ. Toxicol. Pharmacol. 10, 153– 158.

BAKKE, M.J. e HORSBERG, T.E. 2007. Effects of algal-produced neurotoxins on metabolic activity in telencephalon, optic tectum and cerebellum of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquat Toxicol. 85, 96-103.

BALLESTEROS, M. L.; WUNDERLIN, D. A., BISTONI, M. A., 2009. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2, 199–205.

BAKSI, S.M.; FRAZIER, J.M. Isolated fish hepatocytes – model systems for toxicology research: review. Aquat. Toxicol., v.16, p.229-256, 1990

BAZIN, E., HUET, S., JARRY, G., HEGARAT, L.L., MUNDAY, J.S., HUMPAGE, A.R., FESSARD, V., 2010. Cytotoxic and genotoxic effects of cylindrospermopsin in mice treated by gavage or intraperitoneal injection, Environ. Toxicol. doi:10.1002/tox.20640.

BENOV, L., SZTEINBERG, L., FRIDOVICH, I. 1998. Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. Free Radic. Biol. Med., 25, 826-831.

BENZIE, I.F.F., 1996. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. Int. J. Food Sci. Nut, 47, 233-261.

- BERNARD, C., HARVEY, M., BRIAND, J. F., BIRÉ, R., KRYS, S. AND FONTAINE, J. J. 2003. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: Evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. *Environ. Toxicol.* 18, 176-186.
- BERNAREGGI, A. 1998. Clinical pharmacokinetics of nimesulide. *Clin. Pharmacokinet.*, 35 , pp. 247–274
- BERNET, D., SCHMIDT, H., MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P., WAHLI, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish. Dis.* 22, 25–34.
- BERRY, M. N. AND FRIEND, D. S., 1969. High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.* 43, 506-520.
- BORENFREUND, E., BABICH, H., MARTIN-ALGUACIL, N., 1988. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays — the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicology in Vitro* 2, 1–6.
- BOURKE, A.T.C., HAWES, R.B., NEILSON, A., STALLMAN, N.D., 1983. An outbreak of hepato-enteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. *Toxicon* 3:45–48.
- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- BRASIL, 2012. Ministério da Saúde. Portaria n. 2.914 de 4 de Janeiro de 2012. Disponível em: <http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1epagina=43edata=04/01/2012>. Consultado em 28 de fevereiro de 2012.
- BUSSOLARO, D., FILIPAK NETO, F., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., 2010. Responses of hepatocytes to DDT and methyl mercury exposure. *Toxicology in Vitro*, 24, 1491-1497.
- BYTH, S. 1980. Palm Island mystery disease. *Med J Aust* 2: 40–42.
- CARMICHAEL, W.W., BIGGS, D.F., GORHAM, P.R., 1975. Toxicology and pharmacological action of *Anabaena flos-aquae* toxin. *Science* 187, 542–544.
- CARMICHAEL, W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites – The Cyanotoxins. *J. Appl. Bact.*, 72: 445-459.
- CARMICHAEL, W.W. 1994. The toxins of Cyanobacteria. *Scientific American*. 270(1), pp. 78-86.
- CARMICHAEL, M., KRISHNAMURTHY, T., BEASLEY, V.M.J.Y., BUNNER, D.L., MOORE, R.E., ELOFF, J.N., RINEHART, K., FALCONER, I., RUNNEGAR, M., GORHAM, P., SKULBERG, O.M., HARADA, K.I., WATANABE, M., 1998. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon* 26, 971-973.

- CARMICHAEL, W.W., AZEVEDO, S.M.F.O., AN, J.S., MOLICA, R.J.R., JOCHIMSEN, E.M., LAU, S., RINEHART, K.L., SHAW, G.R., EAGLESHAM, G.K. 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ. Health Perspect.* 109: 663–668
- CAZENAVE, J., NORES, M.L., MICELI, M., DÍAZ, M.P., WUNDERLIN, D.A. BISTONI, M.A. 2008. Changes in the swimming activity and the glutathione S-transferase activity of *Jenynsia multidentata* fed with microcystin-RR. *Water Res.* 1299-307.
- CHONG, M.W.K., WONG, B.S.F., LAM, P.K.S., SHAW, G.R., SEAWRIGHT, A.A., 2002. Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophytotoxin in primary rat hepatocytes. *Toxicol.* 40, 205–211.
- CHORUS, I. e BARTRAM, J. (1999) Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management. Für WHO durch E e FN Spon /Chapman e Hall, London, 416 pp.
- CLEMENTE, Z., BUSATO, R.H., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., CESTARI, M.M., RAMSDORF, W.A., MAGALHÃES, V.F., WOSIACK, A.C. e SILVA DE ASSIS, H.C. 2010. Analyses of paralytic shellfish toxins and biomarkers in a southern Brazilian reservoir. *Toxicol.* 55(2-3), 396-406.
- CROUCH, R.K.; GANDY, S.C.; KIMSEY, G. 1981. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes*, 30, 235-41.
- DING, W.X.; SHEN, H.M.; ONG, C.N., 2001. Pivotal role of mitochondrial Ca<sup>(2+)</sup> in microcystin-induced mitochondrial permeability transition in rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 1155–1161.
- EAGLESHAM, G. K., NORRIS, R. L., SHAW, G.R., SMITH, M.J., CHISWELL, R.K., DAVIS, B.C., NEVILLE, G.R., SEAWRIGHT, A.A. AND MOORE, M.R. 1999. Use of HPLC-MS/MS to monitor cylindrospermopsin, a blue–green algal toxin, for public health purposes. *Environ. Toxicol.* 14, 151-154.
- ECETOC, 1993. Environmental hazard assessment of substances. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals: Technical Report No. 51. Brussels, Belgium.
- EL-SHEHAWY, R., GOROKHOVA, E., FERNÁNDEZ-PIÑAS, F., DEL CAMPO, F.F. 2011. Global warming and hepatotoxin production by cyanobacteria: What can we learn from experiments? *Water Research.* doi:10.1016/j.watres.2011.11.021.
- FAISAL, M.; RUTAN, B.J.; SAMI-DEMMELE, S., 1995. Development of continuous liver cell cultures from the marine teleost, spot (*Leiostomus xanthurus*, Pisces: Sciaenidae). *Aquaculture*, v.132, 59-72.
- FALCONER, I.R., 2007. Cyanobacterial toxins present in *Microcystis aeruginosa* extracts – more than microcystin! *Toxicol* 50, 585–588.
- FALCONER, I. R. AND HUMPAGE, A. R. 2006. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: Cylindrospermopsins. *Environ. Toxicol.*, 21: 299–304.

FALCONER, I. R., HARDY, S. J., HUMPAGE, A. R., FROSCIO, S. M., TOZER, G. J. AND HAWKINS, P. R. 1999. Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male Swiss albino mice. *Environ. Toxicol.* 14, 143-150.

FAUTZ, R., HUSEIN, B., HECHENBERGER, C., 1991. Application of the neutral red assay (NR assay) to monolayer cultures of primary hepatocytes: Rapid colorimetric viability determination for the unscheduled DNA synthesis test (UDS). *Mutat. Res.* 253, 173–179.

FENT, K., 2001. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicol.in Vitro* 15, 477–488.

FESSARD, V., BERNARD, B., 2003. Cell alterations but no DNA strand breaks induced *in vitro* by cylindrospermopsin in CHO K1 cells, *Environ. Toxicol.*18, 353– 359.

FEURSTEIN, D., FESSARD, V., LE HEGART, L. AND DIETRICH, D.R. 2010. Investigations of the neurotoxic potential mediated by single microcystin congeners – a potential new hazard for humans? Abstracts of the 8<sup>th</sup> International Conference on Toxic Cyanobacteria (ICTC8). Istanbul, Turkey. Aug 29<sup>th</sup> – sep 4<sup>th</sup> 2010. Abstract Book.p. 108.

FILIPAK NETO, F., ZANATA, S.M., SILVA DE ASSIS, H.C., BUSSOLARO, D., FERRARO, M.V.M., RANDI, M.A.F., ALVES COSTA, J R.M., CESTARI, M.M., ROCHE, H., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., 2007. Use of hepatocytes from *Hoplias malabaricus* to characterize the toxicity of a complex mixture of lipophilic halogenated compounds. *Toxicol. In Vitro.* 21,706-715.

FILIPAK NETO, F.; ZANATA, S.M.; RANDI, M.A.F.; PELLETIER, É.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., 2006. Hepatocytes primary culture from the Neotropical fish trahira *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794). *J. Fish Biol.*, v.69, p.1524- 1532.

FOWLER, H.W. Os peixes de água doce do Brasil. *Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo*, v.6, p.205-404, 1950.

FROSCIO, S.M., FANOK, S., HUMPAGE, A.R., 2009. Cytotoxicity screening for the cyanobacterial toxin Cylindrospermopsin. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 72, 345-349.

FROSCIO, S.M., HUMPAGE, A.R., WICKRAMASINGHE, W., SHAW, G. AND FALCONER, I.R. 2008. Interaction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin with the eukaryotic protein synthesis system. *Toxicon* 51, 191–198.

FROSCIO, S.M., HUMPAGE, A.R., BURCHAM, P.C., FALCONER, I.R. 2003. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environ Toxicol* 18(4):243–251.

FROSCIO, S.M. 2002. Investigation of the mechanisms involved in cylindrospermopsin toxicity: hepatocyte culture and reticulocyte lysate studies. Ph.D. Thesis. Adelaide, South Australia: University of Adelaide.

FROSCIO, S.M., HUMPAGE, A.R., BURCHAM, P.C., FALCONER, I.R. 2001. Cell-free protein synthesis inhibition assay for the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *Environ Toxicol* 16(5):408–412.

FUNARI E, TESTAI E. 2008. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Critical Reviews in Toxicology* 38(2):97 - 125.

GÁCSI, M., ANTAL, O., VASAS, G., MÁTHÉ, C., BORBÉLY, G., SAKER, M.L., GYÓRI, J., FARKAS, A., VEHOVSZKY, Á., BÁNFALVI, G., 2009. Comparative study of cyanotoxins affecting cytoskeletal and chromatin structure in CHO-K1 cells. *Toxicol. In Vitro* 3, 710–718.

GEORGE, S.G., 1994. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular perspectives*. Lewis Publishers, CRC press, pp. 37-85.

GLOCK, G.E., McLEAN, P. 1953. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem. J.*, v.55, p.400–408.

GORHAM, P.R., MCLACHLAN, J., HAMMER, U.T. e KIM, W.K. 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.). *Bréb. Verh. Int. Ver. Limnol.* 15, 796-804.

GRIFFITHS, D. J. e SAKER, M. L. 2003. The palm island mystery disease 20 years on: A review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environ. Toxicol.* 18, 78-93.

GROFF, A., DA SILVA, J., NUNES, E., IANISTCKI, M., GUECHEVA, T., OLIVEIRA, A., OLIVEIRA, C., VAL, A., HENRIQUES, J., 2010. UVA/UVB-induced genotoxicity and lesion repair in *Colossoma macropomum* and *Arapaima gigas* Amazonian fish. *J. Photochem. Photobiol., B*, 99 (2), 93 - 99.

GUILLOUZO, A.; MOREL, F.; RATANASAVANH, D.; CHESNE, C.; GUGUEN-GUILLOUZO, C. Long-term culture of functional hepatocytes. *Toxicol In Vitro*, v.4/5, p.415-427, 1990

GUTIÉRREZ-PRAENA, D., PICHARDO, S., JOS, A. AND MARÍA CAMEÁN A. 2011a. Toxicity and glutathione implication in the effects observed by exposure of the liver fish cell line PLHC-1 to pure cylindrospermopsin. *Ecotoxicol. Environ. Saf. In press*.

GUTIÉRREZ-PRAENA, D., JOS, A., PICHARDO, S. AND MARÍA CAMEÁN, A. 2011b. Oxidative stress responses in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a single dose of pure cylindrospermopsin under laboratory conditions: Influence of exposure route and time of sacrifice. *Aquatic Toxicol.* 105, 100– 106.

GUTIÉRREZ-PRAENA, D., PICHARDO, S., JOS, A., MORENO, F.J., CAMEÁN, A.M. 2012a. Biochemical and pathological toxic effects induced by the cyanotoxin Cylindrospermopsin on the human cell line Caco-2, *Water Research* doi:10.1016/j.watres.2011.12.044.

- GUTIÉRREZ-PRAENA, D., JOS, A., PICHARDO, S., MOYANO, R., BLANCO, A., MONTERDE, J.G., CAMEÁN, A.M. 2012b. Time-dependent histopathological changes induced in *Tilapia (Oreochromis niloticus)* after acute exposure to pure cylindrospermopsin by oral and intraperitoneal route. *Ecotoxicol Environ Saf.* 76(2):102-13.
- GUTTERIDGE, J.M.C. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. European Beckman Conference. *Clin. Chem.* 41/12, 1819-1828.
- HALLIWELL, B., CROSS, C.E., GUTTERIDGE, J.M.C. 1992. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 119: 598-620.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, third ed. Oxford University Press, Oxford, UK.
- HARADA, K.I., OHTANI, I., IWAMOTO, K., SUZUKI, M., WATANABE, M.F., WATANABE, M. AND TERAOKA, K. 1994. Isolation of Cylindrospermopsin from a Cyanobacterium *Umezakia Natans* and Its Screening Method. *Toxicon* 32, 73-84.
- HAWKINS, P.R., CHANDRASENA, N.R., JONES, G.J., HUMPAGE, A.R., FALCONER, I.R. 1997. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon* 35 (3): 341–6.
- HAWKINS, P.R., RUNNEGAR, M.T., JACKSON, A.R. A., FALCONER, I.R. 1985. Severe Hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green-alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water-supply reservoir. *App. Environ. Microbiol.* 50, 1292-1295.
- HENDRIKSEN, C.F.M. A short history of use of animals in vaccine development and quality control. *Developments in Biological Standardization.* n.86. p.3-10, 1994.
- HENSLEY, D. A. e MOODY, D. P. 1975. Occurrence and possible establishment of *Hoplias malabaricus* (Characoidei; Erythrinidae) in Florida. *Florida Scientist* 38(2): 122-128.
- HUMPAGE, A., FALCONER, I., BERNARD, C., FROSCIO, S., FABBRO, L. 2012. Toxicity of the cyanobacterium *Limnothrix* AC0243 to male Balb/c mice. *Water Res.* 46: 1576-83.
- HUMPAGE, A., FONTAINE, F., FROSCIO, S., BURCHAM, P., FALCONER, I., 2005. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: role of cytochrome P-450 and oxidative stress. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 68, 739–753.
- HUMPAGE, A. R. e FALCONER, I. R. 2003. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: Determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environ. Toxicol.* 18, 94-103.
- HUMPAGE, A. R., FENECH, M., THOMAS, P. AND FALCONER, I. R. 2000. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutat. Res. – Gen. Tox.En.* 472, 155-161.

- JIANG, Z. Y., HUNT, J.V., WOLV, S.P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*. 202, 384-389.
- JIANG, Z-Y., WOOLLARD, A.C.S. AND WOLFF, S.P. 1991. Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of Fe<sup>+2</sup> in the presence of xylenol orange Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26:853-856.
- KAEBERNICK, M. e B. A. NEILAN. 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35, 1-9.
- KEEN, J.H., HABIG, W.H., JAKOBY, W.B., 1976. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 251, 6183-6188.
- KINNEAR, S. 2010. *Cylindrospermopsin: A Decade of Progress on Bioaccumulation Research – Review.* *Mar. Drugs* 8, 542-564.
- KING, M.; SU, W.; CHANG, A.; ZUCKERMAN, A.; PASTERNAK, G. W. 2001. Transport of opioids from the brain to the periphery by P-glycoprotein: peripheral actions of central drugs. *Nature Neurosci.* 4, 268.
- KISS, T., VEHOVSZKY, A., HIRIPI, L., KOVÁCS, A. AND VÖRÖS, L. 2002. Membrane effects of toxins isolated from a cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, on identified molluscan neurones. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 131, 167-176.
- KLETZIEN, R.F.; HARRIS, P.K.; FOELLM, L.A., 1994. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a “housekeeping” enzyme subject to tissue specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J.*, 8, 174–181.
- KOWALTOWSKI, A.J., CASTILHO, R.F., VERCESI, A.E. 2001. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett.*, 495, pp. 12–15
- LANKOFF, A., WOJCIK, A., LISOWSKA, H., BIALCZYK, J., DZIGA, D., CARMICHAEL, W.W., 2007. No induction of structural chromosomal aberrations in cylindrospermopsin-treated CHO-K1 cells without and with metabolic activation, *Toxicol* 50, 1105– 1115.
- LEVINE, R.L., WILLIAMS, J.A., STADTMAN, E.P., SHACTER, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods. Enzymol.* 233, 346-357.
- LIEBEL, S., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., SILVA, R.C., RAMSDORF, W.A., CESTARI, M.M., MAGALHÃES, V.F., GARCIA, J.R., ESQUIVEL, B.M. AND FILIPAK NETO, F. 2011. Cellular responses of *Prochilodus lineatus* hepatocytes after cylindrospermopsin exposure. *Toxicol In Vitro* 25, 1493-1500.
- LIONETTO, M.G.; CARICATTO, R.; GIORDANO, M.E.; PASCARIELLO, M.F.; MARINOSCI, L.; SCHETTINO, T., 2003. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Pollution Bulletin* 46 324–330.

- LIRÅS, V., LINDBERG, M., NYSTRÖM, P., ANNADOTTER, H., LAWTON, L. A., GRAF, B. 1998. Can ingested cyanobacteria be harmful to the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*)? *Freshwater Biology*, 39: 233–242.
- MCCARTHY, J.F., SHUGART, L.R., 1990. Biological markers of environmental contamination. In: MCCARTHY, J.F., SHUGART, L.R. (Eds.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 3-16.
- MEISTER, A., ANDERSON, M.E., 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.*, 52, 711–760.
- MELA, M.; RANDI, M.A.F.; VENTURA, D.F.; CARVALHO, C.E.V.; PELLETIER, E. OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. 2007. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 68 (3): 426-35.
- MIRANDA, A. L.; ROCHE, H.; RANDI, M.A.F.; MENEZES, M.L.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological, physiological, and immunological findings. *Environment International*, v.34, p.939–949, 2008.
- NEUMANN, C., BAIN, P., SHAW, G., 2007. Studies of the comparative *in vitro* toxicology of the cyanobacterial metabolite deoxy-cylindrospermopsin. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 70, 1679-1686.
- NORRIS, R. L. G., SEAWRIGHT, A. A., SHAW, G. R., SENOGLES, P., EAGLESHAM, G. K., SMITH, M. J., CHISWELL, R. K., MOORE, M. R., 2002. Hepatic xenobiotic metabolism of cylindrospermopsin *in vivo* in the mouse. *Toxicol.* 40, 471-476.
- OBEREMM, A., BECKER, J., CODD, G.A., STEINBERG, C. 1999. Effects of cyanobacterial toxins and aqueous crude extracts of cyanobacteria on the development of fish and amphibians. *Environ. Toxicol.* 14, 77–88.
- OHTANI, I., MOORE, R. E. AND RUNNEGAR, M. T. C. 1992. Cylindrospermopsin - a Potent Hepatotoxin from the Blue-Green-Alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 7941-7942.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C. A., ASSIS, H. C. S. AChE Inhibition as a Biomarker for Pollutants Contamination in Tropical Aquatic Ecosystems In: *Recent Trends in Acetylcholinesterase* ed. Amsterdam : IOS Press, Netherland, 2005, p. 103-124.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., FILIPAK NETO, F., MELA, M., SILVA, P.H., RANDI, M.A.F., COSTA, J.R.A., PELLETIER, E., 2006. Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methyl mercury, inorganic lead and tributyltin chloride. *Environ. Res.* 101, 74–80.
- OSSWALD, J., RELLÁN, S., CARVALHO, A.P., GAGO, A., VASCONCELOS, V. 2007. Acute effects of an anatoxin-a producing cyanobacterium on juvenile fish-*Cyprinus carpio* L. *Toxicol.* 49(5): 693-8.
- PAERL, H.W., HUISMAN, J., 2008. Blooms like it hot. *Science* 4, 57–58.

- PESONEN, M.; ANDERSSON, T. 1991. Characterization and induction of xenobiotic metabolizing enzyme activities in a primary culture of rainbow trout hepatocytes. *Xenobiotica* 21, 461–471.
- PESONEN, M.; ANDERSSON, T. B., 1997. Fish primary hepatocyte culture, an important model for xenobiotic metabolism and toxicity studies. *Aquatic Toxicology*. 37, 253-267.
- PORTER, N.A., CALDWELL, S.E., MILLS, K.A., 1995. Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, 30, 277-290.
- PUERTO, M., JOS, A., PICHARDO, S., GUTIÉRREZ-PRAENA, D., CAMEÁN, A.M. 2011a. Acute effects of pure cylindrospermopsin on the activity and transcription of antioxidant enzymes in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed by gavage. *Ecotoxicol.* 20(8):1852-60.
- PUERTO, M., CAMPOS, A., PRIETO, A., CAMEÁN, A., DE ALMEIDA, A.M., COELHO, A.V. AND VASCONCELOS, V. 2011b. Differential protein expression in two bivalve species; *Mytilus galloprovincialis* and *Corbicula fluminea*; exposed to *Cylindrospermopsis raciborskii* cells. *Aquat Toxicol.* 17, 109-116.
- QUINLAN, G.J., GUTTERIDGE, J.M.C., 2000. Carbonyl assay for oxidative damage to proteins. In: TANIGUCHI, N., GUTTERIDGE, J.M.C. (Eds.), *Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species*. Oxford University, New York, pp. 257-258.
- RABITTO, I.S. ; COSTA, J.R.M.A. ; ASSIS, H.C.S. ; PALLATIER, É. ; AKAISHI, F.M. ; ANJOS, A. ; RANDI, M.A.F; RIBEIRO, C.A.O. 2005. Effects of dietary PB (II) and tributyltin on tropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicology na Environmental Safety*. V. 60 p. 147 – h 156.
- RIOS, F.S.; KALININ, A.L. RANTIN, F.T., 2002. The effects of long-term food deprivation on respiration e hematology of the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Journal of fish biology*, 61:85-95.
- RODRIGUES, L. C. 2003. Estudo das glutationa S-transferases hepáticas solúveis do peixe *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Pacu). Tese de doutorado em Bioquímica, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes/UERJ, Brasil.
- ROGERS, E.H., HUNTER III, E.S., MOSER, V.C., PHILLIPS, P.M., HERKOVITZ, J., MUNOZ, L., HALL, L.L., CHERNOFF, N. 2005. Potential developmental toxicity of anatoxin-a, a cyanobacterial toxin. *J. Appl. Toxicol.* 25, 527–534.
- RUNNEGAR, M.T., KONG, S.M., ZHONG, Y.Z., GE, J.L. AND LU, S.C. 1994. The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 201, 235-241.
- RUNNEGAR, M.T., KONG, S.-M., ZHONG, Y.-Z., LU, S.C., 1995. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 49, 219–225.

- RUNNEGAR, M.T., XIE, C., SNIDER, B.B., WALLACE, G.A., WEINREB, S.M., KUHLENKAMP, J., 2002. *In vitro* hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related synthetic analogues. *Toxicol Sci.*67(1): 81-7.
- RUSSELL, W.M.S. e BURCH, R.L., 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique.* Methuen, London.
- SALVADORI, D.; RIBEIRO, L.; FENECH, M. 2003. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: Ribeiro, L. M.; Salvadori, D. M. F.; Marques, E. K. *Mutagênese Ambiental.* Canoas: Editora da Ulbra.
- SANCHO, E, CERÓN, JJ, FERRANDO, MD. 2000. Cholinesterase Activity and Hematological Parameters as Biomarkers of Sublethal Molinate Exposure in *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* ; 46: 81-86.
- SCHAFER, F.Q. e BUETTNER, G.R., 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.*, 30, 1191-1212.
- SCHOPF, J. e PACKER, B., 1987. Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia. *Science* 237 (4810), 70-73.
- SEAWRIGHT, A.A., NOLAN, C.C., SHAW, G.R., CHISWELL, R.K., NORRIS, R.L., MOORE, M.R. AND SMITH, M.J. 1999. The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska). *Environ. Toxicol.* 14, 135-142.
- SEDLAK, J., LINDSAY, R.H. 1968. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 25:192-205.
- SEGNER, H. 1998. Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 120, 71-81.
- SHEN, X. Y., LAM, P. K. S., SHAW, G. R. AND WICKRAMASINGHE, W. 2002. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Toxicol* 40, 1499-1501.
- SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. 1979. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. *FEBS Letters*, 103, 287-290.
- SILVA FILHO, M.V.; OLIVEIRA, M.M. CUNHA, B.V.L.F.; ALVES, M.V. e CUNHA, B. J. 2000. Validação de espécies sentinelas para biomarcação com colinesterases de peixes. In: *Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI* (Espíndola, E. L. G.; Paschoal, C. M. R. B.; Rocha, O.; Bohrer, M. B. C. e Oliveira Neto, A. L.) São Carlos, Rima, 2000.
- SILVA, C. A., OBA, E. T., RAMSDORF, W. A., MAGALHÃES, V. F., CESTARI, M. M., RIBEIRO, C. A. O., ASSIS, H. C. S. 2011. First report about saxitoxins in freshwater fish *Hoplias malabaricus* through trophic exposure. *Toxicol* 57 (1) p. 141-147.

- SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175, 184-191.
- SINHA, R., PEARSON, L.A., DAVIS, T.W., BURFORD, M.A., ORR, P.T., NEILAN, B.A. 2012. Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones - Is climate change responsible? *Water Res.* 46(5): 1408-1419.
- STENESH, J. 1998. Biochemistry. New York: Plenum .In: Bioindicadores de contaminação em peixes de água doce, por exposição ao Chumbo (II): ensaios laboratoriais e estudos de caso preliminar no Rio Ribeira (SP/PR) (COSTA, J. R. M. A).
- STIEN, X, PERCIC, P, GNASSIA-BARELL, M, ROMÈO, M, LAFAURE, M. 1998. Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea. *Environmental Pollution*; 99: 339- 345.
- STRASER, A., FILIPIČ, M., ZEGURA, B. 2012. Genotoxic effects of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin in the HepG2 cell line. *Arch Toxicol.* 85, 1617-26.
- STURM, A.; DA SILVA, A., H.C. e HANSEN, P.D. 1999. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potencial use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Marine Environmental Research*, 47:389-398.
- SUNDIN, L.I.; REIS, S.G.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T. e MILSOM, W.K., 1999. Cardiovascular and respiratory reflexes: The tropical fish, Traíra (*Hoplias malabaricus*) O<sub>2</sub> Chemosponses. *Respiration physiology*, 116:181-199, 1999.
- TAY, V.K., WANG, A.S., LEOW, K.Y., ONG, M.M., WONG, K.P., BOELSTERLI, U.A., 2005. Mitochondrial permeability transition as a source of superoxide anion induced by the nitroaromatic drug nimesulide *in vitro*. *Free Radic Biol Med.* 39, 949-959.
- TEIXEIRA, M. G. L. C., COSTA, M. C. N., CARVALHO, V. L. P., PEREIRA, M. S., HAGE, E., 1993. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bulletin of PAHO.* 27(3): 244-253.
- TERAO, K., OHMORI, S., IGARASHI, K., OHTANI, I., WATANABE, M. F., HARADA, K. I., ITO, E. WATANABE, M. 1994. Electron-microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green-alga *umezakia natans*. *Toxicon* 32, 833-843.
- VAN DER OOST, R., BEYER, J. AND VERMEULEN, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* v. 13.
- VON SPERLING, E.V, FERREIRA, A.C.S., GOMES, L.N.L. 2008. Comparative eutrophication development in two Brazilian water supply reservoirs with respect to nutrient concentrations and bacteria growth. *Desalination* 226: 169-174.
- WELKER, M., BICKEL, H., FASTNER, J. 2002. HPLC-PDA detection of cylindrospermopsin - opportunities and limits. *Water Res.* 36, 4659-4663.

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

WILLIAMS, C.D. e JAESCHKE, H. 2011. Liver toxicology. In: Encyclopedia of Environmental Health (J. Nriagu, ed), Section: Toxicology (S. Ansari, ed), Elsevier, Oxford, in press.

WINSTON, G.W., DI GIULIO, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137-161.

YOUNG, F.M.; MICKLEM, J. AND HUMPAGE, A.R. 2008. Effects of blue-green algal toxin cylindrospermopsin (CYN) on human granulosa cells *in vitro*. *Reprod. Toxicol.* 25, 374-380.

ŽEGURA B, GAJSKI G, ŠTRASER, A, GARAJ-VRHOVAC, V. 2011. Cylindrospermopsin induced DNA damage and alteration in the expression of genes involved in the response to DNA damage, apoptosis and oxidative stress. *Toxicol.* 58: 471-479.

## Anexo I

### Base de cálculo para as análises bioquímicas

#### 1. Catalase (CAT):

**Atividade das CAT =  $[(\Delta\text{ABS}/\text{min}) \times \text{diluição}] / (\text{caminho óptico} \times \text{coeficiente de extinção molar} \times \text{concentração de proteínas})$**

Onde:

- Atividade das Catalases em milimoles por minuto por miligrama de proteínas
- $(\text{ABS}/\text{min}) = |\text{Absorbância final} - \text{Absorbância inicial}| \times 2$ , sendo que o intervalo final - inicial é de 30 s.
- Diluição (da amostra) = 20  $\mu\text{l}$  de amostra em 1000  $\mu\text{l}$  de volume final, ou seja, 50x.
- Coeficiente de extinção molar do  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\lambda = 240 \text{ nm}$ ) =  $40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- Caminho óptico (na cubeta) = 1 cm
- Concentração de proteínas totais em miligrama por mililitro.

#### 2. Glutathiona (GSH):

**[GSH] =  $(\text{ABS} \times \text{diluição}) / (\text{coeficiente angular da curva-padrão} \times \text{concentração de proteínas})$**

Onde:

[GSH] em micromoles de GSH por miligrama de proteínas.

- ABS = valor de absorvância registrado ( $\lambda = 415 \text{ nm}$ ) após descontar o valor do “branco”.
- Diluição na precipitação protéica = 250  $\mu\text{l}$  de amostra mais 50  $\mu\text{l}$  de TCA (300  $\mu\text{l}$  de volume final) = 1,2x. OBS: deve-se considerar essa diluição porque a alíquota para medir a concentração de proteínas foi separada antes da precipitação protéica.
- Coeficiente angular da curva-padrão (curva de 1° grau passando por  $x=0$ ;  $y=0$ ).
- [proteínas] = concentração de proteínas totais em miligrama por mililitro

#### 3. Peroxidação lipídica (LPO):

**[Hidroperóxidos] =  $(\text{ABS} \times \text{diluição}) / (\text{caminho óptico} \times \text{coeficiente de extinção molar} \times \text{concentração de proteínas})$**

Onde:

[Hidroperóxidos] em micromoles de hidroperóxidos por miligrama de proteínas.

- ABS = valor de absorvância registrado ( $\lambda = 570 \text{ nm}$ ) após descontar o valor do “branco”.
- Diluição (da amostra) = 10x.
- Coeficiente de extinção molar aproximado para  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hidroperóxido de cumeno ou hidróxido de butila ( $\lambda = 560 \text{ nm}$ ) =  $4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- Caminho óptico para 200  $\mu\text{l}$  = 0,6; para 300  $\mu\text{l}$  = 0,9.

- [proteínas] = concentração de proteínas totais em miligrama por mililitro.

#### 4. Atividade da GST:

**Atividade das GST = [(ABS/min) x diluição]/(caminho óptico x coeficiente de extinção molar x concentração de proteínas)**

**Onde:**

Atividade global das GST em micromoles por minuto por miligrama de proteínas.

- (ABS/min) = |Absorbância final – Abs. inicial|, sendo que o intervalo final - inicial é de 1 min.
- Diluição (da amostra) = 50 µl de amostra em 150 µl de volume final, ou seja, 3x.
- Caminho óptico (para 150 µl nos micropoços) = 0,45 cm.
- Coeficiente de extinção molar ( $\lambda = 340 \text{ nm}$ ) em pH = 6,5 para o CDNB =  $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- [proteínas] = concentração de proteínas totais em miligrama por mililitro.

#### 5. Atividade da Acetilcolinesterase (AChE):

**Atividade da ACHE = ( $\Delta$ ABS/min x diluição)/(caminho óptico x coef. de extinção molar x concentração de proteínas)**

**Onde:**

- $\Delta$ ABS = |Absorbância final – Abs. inicial|, sendo que o intervalo final - inicial é de 1 min.
- Diluição da amostra = 10x.
- Coeficiente de extinção molar aproximado para 2-nitrobenzoato-5-mercaptopicolina =  $13,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- Caminho óptico para 200 µl = 0,6; para 300 µl = 0,9.
- [proteínas] = concentração de proteínas totais em miligrama por mililitro.

#### 6. Atividade da Glutathioneredutase e peroxidase:

**Atividade da GR ou GPx = [( $\Delta$ Abs/min) x diluição]/(caminho óptico x coef. de extinção molar x concentração de proteínas)**

**Onde:**

Atividade da GR ou GPx em micromoles de NADPH oxidado (GR) ou reduzido (GPx) por minuto por miligrama de proteínas

- ( $\Delta$ Abs/min) = |Absorbância final – Absorbância inicial|/8, sendo que o intervalo final -inicial é de 8 min.
- Diluição (da amostra) = 50 µl de amostra em 300 µl de volume final, ou seja, 6x.
- Coeficiente de extinção molar do NADPH ( $\lambda = 340 \text{ nm}$ ) =  $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- Caminho óptico (para 300 µl nos micropoços) = 0,9 cm.

[proteínas] = concentração de proteínas em miligrama por mililitro

### 7. Atividade da superóxido dismutase (SOD):

**Atividade das SOD =  $(\Delta\text{ABS. Ref.}) / [(2 \times \text{ABS Amostra}) \times \text{diluição} \times \text{concentração de proteínas}]$**

#### **Onde:**

Atividade das SOD em unidades relativas de atividade por miligrama de proteínas

- $\Delta\text{Abs. Ref.} = |\text{Absorbância final} - \text{Abs. inicial}|$  da curva de referência de redução do NBT.
- $\Delta\text{Abs. Amostra} = |\text{Absorbância final} - \text{Abs. inicial}|$  da amostra, sendo que o intervalo de tempo é o mesmo utilizado para o  $\Delta\text{Abs. Ref.}$
- Diluição (da amostra) = 20  $\mu\text{l}$  de amostra em 200  $\mu\text{l}$  de volume final, ou seja, 10x.
- Concentração de proteínas em miligrama por mililitro

### 8. Atividade da G6PDH:

**Atividade da G6PDH =  $[(\Delta\text{ABS}/\text{min}) \times \text{diluição}] / (\text{caminho óptico} \times \text{coef. de extinção molar} \times \text{concentração de proteínas})$**

#### **Onde:**

Atividade da G6PDH em micromoles de NADPH oxidado por minuto por miligrama de proteínas

- $\Delta\text{Abs. min}^{-1} = |\text{Absorbância final} - \text{Absorbância inicial}|$ , sendo que o intervalo final - inicial é de 1 min.
- Diluição (da amostra) = 30  $\mu\text{l}$  de amostra em 200  $\mu\text{l}$  de volume final, ou seja, 20/3 x.
- Coeficiente de extinção molar do NADPH ( $\lambda = 340 \text{ nm}$ ) =  $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- Caminho óptico (para 200  $\mu\text{l}$  nos micropoços) = 0,6 cm.
- Concentração de proteínas em miligrama por mililitro.

### 9. Carbonilação de proteínas (PCO):

**Carbonilação de Proteínas =  $(\text{ABS}) / (\text{caminho óptico} \times \text{coef. de extinção molar} \times \text{concentração de proteínas})$**

#### **Onde:**

Carbonilação de proteínas em milimoles de carbonilas por miligrama de proteínas

- ABS. = valor de absorbância após descontar o valor do respectivo “branco”
- Coeficiente de absorção molar para hidrazonas ( $\lambda = 360 \text{ nm}$ ) =  $21 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- Caminho óptico (para 200  $\mu\text{l}$  nos micropoços) = 0,6 cm
- Concentração de proteínas em miligrama por mililitro, quantificadas após o ensaio, mas com valor corrigido para a concentração inicial de proteínas.

## Anexo II

### Dados brutos referentes à respostas dos biomarcadores avaliados.

1. Segue (abaixo) os dados brutos referentes às análises do capítulo I

Atividade AChE - Cérebro						
	7 dias			14 dias		
	CTRL	CYNex	CYNp	CTRL	CYNex	CYNp
	1,07	1,08	1,24	0,62	1,03	0,5
	1,03	1,66	1,48	0,74	0,86	0,63
	0,97	0,87	0,94	0,71	0,92	0,82
	1,08	1,18	1,04	1,15	1,04	0,66
	0,7	1,09	0,93	0,84	0,95	0,58
	1,1	1,63	0,92	0,82	0,74	0,56
	1,05	1,37	0,8	0,72	0,76	0,62
	0,21	1,31	1	1,05	0,74	0,57
	0,89	1,31	0,8	0,7	0,75	0,57
		1,45				0,68
<b>Média</b>	0,9	1,295	1,016667	0,816667	0,865556	0,619
<b>DP</b>	0,28762	0,24892	0,218518	0,175	0,124309	0,088122

Atividade AChE - Músculo						
	7 dias			14 dias		
	CTRL	CYNex	CYNp	CTRL	CYNex	CYNp
	0,589	0,503	0,174	0,426	0,528	0,601
	1,169	0,358	0,241	0,343	1,365	0,243
	0,319	0,187	0,142	0,62	0,549	0,173
	0,347	0,316	0,234	0,415	0,673	0,328
	0,472	0,339	0,199	0,804	0,456	0,419
	0,434	0,367	0,336	0,284	0,1	2,177
	0,48	0,336	0,164	0,129	0,47	2,243
	0,414	0,237	0,28	0,191	0,689	3,221
	0,367	0,337	0,209	0,544	0,251	0,552
		0,159				0,794
<b>Média</b>	0,510111	0,3139	0,219889	0,417333	0,564556	1,0751
<b>DP</b>	0,260134	0,09899	0,060818	0,213417	0,354329	1,067462

Concentração CYN - Cérebro						
	7 dias			14 dias		
	CTRL	CYNex	CYNp	CTRL	CYNex	CYNp
	NSA	0,243	0,29	NSA	0,539	0,215
	NSA	0,11	0,249	NSA	0,539	0,229
	NSA	0,403	0,236	NSA	0,229	0,112
	NSA	0,292	0,066	NSA	0,166	0,035
	NSA	0,292	0,039	NSA	0,203	0,134
	NSA	0,14	0,102	NSA	0,356	0,119
	NSA	0,235	0,099	NSA	0,313	0,011
	NSA	0,203	0,139	NSA	0,131	0,082

	NSA	0,39	0,295	NSA	0,163	0,068
	NSA	0,281		NSA		0,082
<b>Média</b>	NSA	0,2589	0,168333	NSA	0,293222	0,1087
<b>DP</b>	NSA	0,094803	0,099499	NSA	0,156872	0,070386
NSA - Não se aplica						

<b>Concentração de CYN - Músculo</b>						
	<b>7 dias</b>			<b>14 dias</b>		
	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>
	NSA	0,075	0,417	NSA	0,029	0,132
	NSA	0,274	0,274	NSA	0,171	0,094
	NSA	0,337	0,634	NSA	0,148	0,423
	NSA	1,284	0,327	NSA	0,311	0,086
	NSA	1,099	0,96	NSA	0,203	0,629
	NSA	1,074	0,548	NSA	0,144	0,136
	NSA	0,813	0,219	NSA	0,17	0,076
	NSA	0,918	0,314	NSA	0,424	0,047
	NSA	1,078	0,17	NSA	0,24	0,253
	NSA	0,421		NSA		
<b>Média</b>	NSA	0,7373	0,429222	NSA	0,204444	0,208444
<b>DP</b>	NSA	0,423098	0,24928	NSA	0,112222	0,19611
NSA - Não se aplica						

<b>Conteúdo de GSH - Cérebro</b>						
	<b>7 dias</b>			<b>14 dias</b>		
	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>
	1,68	1,1733	3,34	0,98	1,5333	2,3067
	0,12	2,2867	0,9133	3,6133	3,0267	1,9667
	2,88	2,0667	2,64	2,3933	3,1267	2,82
	1,9	1,2733	3,6533	6,2	10,5533	1,76
	0,8533	0,9933	5,2533	1,64	3,7333	3,46
	1,3333	3,74	0,4	1,7733	2,1133	3,8733
	3,2867	1,1133	4,7267	1,2867	1,66	3,16
	4,22	2,6133	2,4733	4,9267	5,8933	0,94
			7,08	3,3	2,38	2,6333
						6,3733
<b>Média</b>	2,034163	1,907488	3,386656	2,901478	3,779989	2,92933
<b>DP</b>	1,349882	0,958654	2,104265	1,770213	2,864001	1,484195

<b>Atividade da GST- Cérebro</b>						
	<b>7 dias</b>			<b>14 dias</b>		
	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>
	0,01554	0,01392	0,01839	0,0124	0,02502	0,01798
	0,01506	0,01628	0,02328	0,01774	0,02186	0,02749
	0,01913	0,00963	0,02108	0,01274	0,02342	0,03416
	0,0133	0,01651	0,01752	0,01777	0,0312	0,02288

	0,01363	0,01156	0,01565	0,01561	0,01962	0,02469
	0,01977	0,01364	0,01814	0,01538	0,01602	0,0186
	0,0173	0,01686	0,02105	0,0247	0,01731	0,02076
	0,02125	0,01765	0,01865	0,02027	0,0261	0,02162
	0,01562	0,01562	0,01827	0,01902	0,02356	0,02421
		0,0114				0,0206
<b>Média</b>	0,016873	0,014506	0,019114	0,017292	0,022679	0,023299
<b>DP</b>	0,002797	0,002832	0,002289	0,003845	0,004668	0,004777

<b>LPO - Cérebro</b>						
<b>7 dias</b>			<b>14 dias</b>			
<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>	
0,000691	0,00203	0,00264	0,00317	0,004	0,00777	
0,00118	0,00212	0,00204	0,000772	0,00482	0,00364	
0,00133	0,00296	0,00291	0,00141	0,00231	0,00301	
0,00232	0,00322	0,00248	0,00116	0,00194	0,00397	
0,00122	0,0037	0,00404	0,000689	0,00432	0,00387	
0,00119	0,00205	0,00201	0,0011	0,005	0,00309	
0,00245	0,00235	0,00207	0,00162	0,00328	0,00241	
0,000976	0,00272	0,0024	0,000795	0,00595	0,00393	
0,00107	0,00244	0,00173	0,00157	0,00444	0,0033	
	0,00336				0,00238	
<b>Média</b>	0,00142	0,002644	0,00248	0,001365	0,004007	0,003737
<b>DP</b>	0,000599	0,000615	0,000689	0,000759	0,001294	0,001532

2. Segue (abaixo) os dados brutos referentes às análises do capítulo II

<b>Concentração de CYN - Fígado</b>						
<b>7 dias</b>			<b>14 dias</b>			
<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>	
NSA	4,52	9,39	NSA	1,392	5,665	
NSA	11,463	3,543	NSA	2,171	5,434	
NSA	3,933	8,725	NSA	9,784	14,211	
NSA	3,78	11,238	NSA	3,058	3,34	
NSA	6,701	7,558	NSA	4,861	8,89	
NSA	6,811	7,161	NSA	9,182	11,234	
NSA	8,079	7,149	NSA	6,688	7,845	
NSA	0,38	0,889	NSA	9,035	11,151	
NSA	11,183	15,441	NSA	4,334	17,335	
NSA	11,056		NSA		19,998	
<b>Média</b>	NSA	6,7906	7,899333	NSA	5,611667	10,5103
<b>DP</b>	NSA	3,718834	4,187396	NSA	3,189715	5,39146
NSA - Não se aplica						

Atividade da CAT - Fígado						
	7 dias			14 dias		
	CTRL	CYNex	CYNp	CTRL	CYNex	CYNp
	0,882996	1,318144	1,378314	2,117485	2,050206	1,629967
	1,506294	1,655441	0,83384	1,594428	1,027899	1,101925
	1,798282	0,966435	1,097219	1,654991	1,466795	1,538282
	1,282904	0,948577	2,03758	1,647533	1,608908	1,858416
	1,25119	1,012724	1,234362	1,69819	1,18965	1,664555
	1,150178	0,91482	1,127137	1,417406	1,698973	1,575356
	1,569958	1,143885	1,43821	1,669865	2,359717	1,595171
	1,70122	0,534459	1,103731	1,791802	1,96361	1,292886
	1,392638	1,303353	0,974231	1,706813	1,61826	1,573093
		1,458164				1,581008
<b>Média</b>	1,392851	1,1256	1,24718	1,699835	1,664891	1,541066
<b>DP</b>	0,286073	0,320351	0,350252	0,186903	0,418003	0,206837

Atividade da G6PDH - Fígado						
	7 dias			14 dias		
	CTRL	CYNex	CYNp	CTRL	CYNex	CYNp
	0,092756	0,926815	0,597681	1,480361	7,797517	6,12566
	1,401817	2,523871	0,971697	0,500435	5,332741	0,16756
	1,989025	1,4467	2,606154	2,643555	5,478609	2,688438
	2,52013	2,138633	3,36167	1,080162	4,543566	4,315414
	0,369529	2,29946	0,751027	2,93903	0,339608	3,713246
	0,717365	1,925443	5,482349	3,1597	2,96895	3,709505
	0,608901	0,751027	4,861479	1,87682	9,496863	4,255571
	1,798276	0,122634	0,047874	1,682331	4,154587	0,287245
	0,773468	1,46914	0,317168	1,03154	6,16306	0,896895
		0,616381				4,22565
<b>Média</b>	1,141252	1,42201	2,110789	1,821548	5,141722	3,038518
<b>DP</b>	0,82256	0,801852	2,05099	0,920126	2,653467	1,985444

Atividade da GPx - Fígado						
	7 dias			14 dias		
	CTRL	CYNex	CYNp	CTRL	CYNex	CYNp
	0,0386	0,1305	0,1085	0,0543	0,0074	0,0632
	0,0351	0,0896	0,1576	0,0691	0,0055	0,0074
	0,0353	0,1161	0,142	0,015	0,0129	0,0762
	0,0626	0,1133	0,0883	0,0647	0,0583	0,0476
	0,1375	0,0954	0,1008	0,0576	0,1631	0,0362
	0,128	0,0937	0,0409	0,0388	0,0046	0,0813
	0,1265	0,1176	0,023	0,0036	0,0056	0,0631
	0,124	0,096	0,0207	0,0196	0,0817	0,0385
	0,0464	0,1399	0,0935	0,0556	0,0527	0,0724
		0,0973				0,0687
<b>Média</b>	0,081556	0,10894	0,086144	0,042033	0,043533	0,05546
<b>DP</b>	0,045889	0,017196	0,049138	0,023835	0,053268	0,022873

Atividade da GR - Fígado						
--------------------------	--	--	--	--	--	--

	7 dias			14 dias		
	CTRL	CYNex	CYNp	CTRL	CYNex	CYNp
	0,0239	0,0073	0,0076	0,0138	0,0108	0,0058
	0,0061	0,0106	0,0081	0,0048	0,0046	0,0012
	0,0146	0,0063	0,0107	0,0164	0,0097	0,0082
	0,0066	0,0141	0,0067	0,0065	0,0045	0,0068
	0,016	0,0092	0,0016	0,0097	0,0091	0,0037
	0,0064	0,0068	0,0216	0,0071	0,0119	0,0083
	0,017	0,0073	0,0057	0,0106	0,0106	0,009
	0,0069	0,0049	0,0159	0,0077	0,0057	0,0044
	0,0111	0,0083	0,0054	0,0119	0,0087	0,0109
		0,0114				0,0088
<b>Média</b>	0,012067	0,00862	0,009256	0,009833	0,0084	0,00671
<b>DP</b>	0,00624	0,002751	0,006076	0,003745	0,002785	0,002935

Conteúdo de GSH - Fígado						
	7 dias			14 dias		
	CTRL	CYNex	CYNp	CTRL	CYNex	CYNp
	3,85288	0,52848	0,19802	0,22219	5,3766	0,91321
	0,48106	0,84495	0,30765	0,19693	1,27881	1,22225
	0,41988	0,34978	0,38551	0,27461	0,74716	0,37208
	1,00679	0,50661	0,45477	0,23675	1,07487	0,29044
	0,22525	0,78468	0,4875	0,35601	9,43026	0,3319
	0,30021	1,40074	0,8903	0,40934	1,4048	0,21683
	0,3873	0,46865	1,52893	0,22364	1,03692	0,35505
	0,28904	8,34344	4,01691	0,35693	0,67112	1,9164
	0,17494	0,47412	0,20486	0,30368	0,45832	0,3904
		0,63032				0,46039
<b>Média</b>	0,793039	1,433177	0,941606	0,286676	2,38654	0,646895
<b>DP</b>	1,173182	2,446421	1,227556	0,07408	3,033883	0,546312

Atividade da GST - Fígado						
	7 dias			14 dias		
	CTRL	CYNex	CYNp	CTRL	CYNex	CYNp
	0,024449	0,011645	0,015484	0,015262	0,023497	0,028381
	0,017806	0,014087	0,017403	0,010921	0,015898	0,019941
	0,021084	0,015116	0,016744	0,018058	0,028113	0,029806
	0,022831	0,016715	0,014634	0,019321	0,02346	0,031807
	0,024241	0,015375	0,017206	0,021764	0,022102	0,043675
	0,013548	0,015934	0,014745	0,022564	0,023898	0,026904
	0,017433	0,0187	0,013282	0,02041	0,021879	0,031485
	0,021142	0,017095	0,018933	0,02	0,027234	0,020887
	0,015614	0,018981	0,013802	0,016039	0,018549	0,031961
		0,010116				0,029974
<b>Média</b>	0,019794	0,015376	0,015804	0,01826	0,022737	0,029482

<b>DP</b>	0,003875	0,002837	0,001876	0,003664	0,003825	0,006584
-----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------

<b>LPO - Fígado</b>						
	<b>7 dias</b>			<b>14 dias</b>		
	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>
	0,002743	0,003973	0,00105	0,000986	0,002356	0,00424
	0,00393	0,005642	0,003126	0,001101	0,000292	0,004562
	0,004059	0,003797	0,005037	0,002025	0,003943	0,004752
	0,002851	0,00339	0,002589	0,000854	0,003909	0,004949
	0,002748	0,003449	0,002025	0,002344	0,002447	0,005556
	0,002223	0,002984	0,003341	0,002068	0,004012	0,00255
	0,001484	0,005216	0,002326	0,002236	0,004162	0,00427
	0,001693	0,00074	0,000955	0,002017	0,003895	0,00415
	0,001157	0,006871	0,000615	0,00215	0,004158	0,004334
		0,002872				0,005001
<b>Média</b>	0,002543	0,003893	0,00234	0,001753	0,003242	0,004436
<b>DP</b>	0,001017	0,001698	0,001397	0,000592	0,001311	0,000793

<b>PCO - Fígado</b>						
	<b>7 dias</b>			<b>14 dias</b>		
	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>
	0,011063	0,008139	0,006194	0,004469	0,052142	0,08331
	0,002722	0,00958	0,006651	0,006076	0,039626	0,013557
	0,002314	0,003263	0,015226	0,066538	0,113387	0,01281
	0,001854	0,006735	0,042201	0,000836	0,115038	0,03687
	0,013479	0,011587	0,018802	0,054741	0,062527	0,017672
	0,026503	0,005322	0,00372	0,035324	0,155709	0,0142
	0,014992	0,017137	0,005707	0,114243	0,118264	0,02423
	0,004989	0,006131	0,010292	0,036527	0,147401	0,005302
	0,00542	0,000813	0,010142	0,026646	0,138775	0,003727
		0,010148				0,01317
<b>Média</b>	0,009259	0,007885	0,013215	0,038378	0,104763	0,022485
<b>DP</b>	0,00814	0,004591	0,011897	0,036348	0,042907	0,023354

<b>Atividade da SOD - Fígado</b>						
	<b>7 dias</b>			<b>14 dias</b>		
	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>	<b>CTRL</b>	<b>CYNex</b>	<b>CYNp</b>
	2,647098	11,43797	20,93833	1,172551	32,52426	18,12524
	7,432032	13,90328	34,90327	4,080568	19,20287	12,23591
	9,54291	18,707	5,768948	15,58295	18,66286	15,53556
	3,942585	9,831423	16,69355	6,054368	18,87029	13,62111
	10,44486	12,26507	11,44971	3,824081	11,40547	13,39437
	9,301535	14,06023	16,22947	14,94625	30,37218	11,3455
	4,658388	20,09739	15,87236	23,11425	28,74281	10,96429
	7,938944	8,445436	9,284015	8,040999	10,26445	3,372986
	15,47369	13,75208	34,81388	7,128547	18,42071	13,04156
		18,62363				6,80211

<b>Média</b>	7,931338	14,11235	18,43928	9,327174	20,94066	11,84386
<b>DP</b>	3,91271	3,922363	10,32694	7,091372	7,966752	4,195662

3. Segue (abaixo) os dados brutos referentes às análises do capítulo III

<b>Ensaio de Viabilidade celular</b>								
	<b>Controle</b>	<b>0,1</b>	<b>1,0</b>	<b>10</b>	<b>100</b>	<b>0,1Ex</b>	<b>1,0Ex</b>	<b>10Ex</b>
	99,04777	76,27776	70,15146	66,11447	67,28307	66,04365	68,09756	67,17684
	85,66197	72,41784	70,22228	74,68421	83,57266	73,44479	67,63719	71,81583
	95,89609	78,40248	80,49181	86,68893	91,22169	77,62342	78,4379	72,20536
	88,45953	86,86599	80,59804	85,41409	85,98068	82,829	81,41252	75,00292
	96,10856	88,03459	84,35172	85,59115	88,99072	79,50027	76,87976	79,67732
	101,4204	87,14928	85,23703	83,25395	84,95373	81,83746	73,37396	80,66886
	109,9193	84,28091	83,74972	81,20005	87,64506	82,15617	74,01138	75,56952
	89,59273	62,32537	74,71963	58,78416	68,69956	64,09598	73,30314	73,30314
	98,44576	89,2386	83,21854	86,05151	89,94685	83,57266	73,30314	72,94902
	87,11388	81,44793	80,38557	66,57483	80,38557	78,96908	79,3232	83,57266
	98,79988	88,88448	81,80206	93,48806	83,21854	79,67732	81,09381	76,13611
	96,32103	72,59489	86,05151	73,30314	104,4658	84,28091	83,21854	88,88448
	104,1117	96,67516	93,13394	86,40563	94,90455	92,77982	87,46799	75,42786
	116,506	95,96691	89,59273	86,75975	97,3834	94,90455	91,00921	86,40563
	91,71745	92,07157	110,84	93,13394	81,80206	97,73752	42,14045	88,88448
	114,7353	83,21854	88,88448	83,57266	85,34327	82,86442	108,007	100,2164
	104,8199	82,5103	91,71745	65,86658	83,21854	95,96691		
	105,1741	95,25867	92,77982	98,09164		102,3411		
	116,1518	87,82212	101,2787	98,79988				
<b>Média</b>	100,0002	84,28649	85,74771	81,77782	85,82446	83,36806	77,4198	79,24353
<b>DP</b>	9,573647	8,909839	9,866211	11,36414	9,101832	10,29861	13,60967	8,481081

<b>Ensaio de Viabilidade celular</b>								
	<b>Controle</b>	<b>0,1</b>	<b>1,0</b>	<b>10</b>	<b>100</b>	<b>0,1Ex</b>	<b>1,0Ex</b>	<b>10Ex</b>
	0,0213	0,017	0,0177	0,0064	0,0027	0,0242	0,0208	0,0178
	0,0227	0,0199	0,0125	0,0131	0,0129	0,0185	0,0031	0,0219
	0,0227	0,0345	0,0167	0,0152	0,0184	0,0052	0,0057	0,0148
	0,0366	0,0318	0,0224	0,0021	0,0162	0,022	0,007	0,0097
	0,0139	0,0303	0,0205	0,0162	0,0288	0,0116	0,0041	0,0024
	0,0274	0,0094	0,0104	0,0103	0,0337	0,0177	0,0017	0,0202
	0,0178	0,0231	0,0064	0,018	0,0208	0,0068	0,0087	0,0105
	0,0311	0,0123	0,0109	0,0127	0,0155	0,013	0,0095	0,0185
	0,0258	0,0263	0,0101	0,0122	0,0099	0,0091	0,0106	0,0128
	0,016	0,008	0,0087	0,0245	0,0448	0,0082	0,0066	0,0187
	0,0178	0,0114	0,0269	0,0038	0,026	0,0161	0,0042	0,015
	0,0365	0,0342	0,0077	0,0155	0,0716	0,0107	0,0083	0,02
	0,0483	0,0413	0,0113	0,0493	0,0356	0,0406	0,0404	0,0062
	0,0622	0,0189	0,0129	0,029	0,0567	0,0319	0,0219	0,0269
	0,0224	0,0363	0,036	0,0467	0,0238	0,0305	0,0346	0,0545

	0,0356	0,0192	0,0321	0,037	0,0357	0,0105	0,0036	0,0661
	0,0218	0,0171	0,0221	0,0248	0,0364	0,0453	0,0229	0,0145
	0,013	0,0268	0,0075	0,0313	0,0434	0,0303	0,0202	0,0294
	0,0086	0,0153	0,0463	0,0257	0,0353	0,0102	0,0201	0,0477
	0,0107	0,0085	0,0295	0,0299	0,0341	0,0317	0,0374	0,027
	0,0348	0,0139	0,0126	0,0361	0,034	0,0124	0,0266	0,0204
	0,0305	0,0614	0,0487	0,0551	0,0376	0,0168	0,0107	0,0335
	0,0015	0,0243	0,0414	0,0268	0,0385	0,0182	0,0271	0,0253
	0,0721	0,0299	0,0283	0,0192	0,0613	0,0375	0,0165	0,0135
	0,0225	0,024	0,0285	0,0313	0,0124	0,0516	0,039	0,0398
	0,0186	0,0367	0,0238	0,0303	0,0395	0,0035	0,0635	0,0256
	0,03	0,0304	0,0253	0,0628	0,0069	0,0498	0,0363	0,0125
	0,0278	0,0204	0,0458	0,009	0,0322	0,0471	0,0558	0,0114
	0,0055	0,0166	0,012	0,0077	0,0234	0,0244	0,0254	0,0228
	0,0096	0,0085	0,0339	0,0209	0,0141	0,0243	0,0385	0,0064
	0,0034	0,0156	0,0086	0,0282	0,0293	0,0084	0,0189	0,0264
	0,0099	0,0136	0,0144	0,0241	0,0018	0,0383	0,0313	0,0179
	0,0108	0,0202		0,0206	0,0421	0,0421	0,0092	0,0041
		0,0095		0,0295		0,0011	0,0051	0,0015
				0,0208		0,0388	0,0261	0,0027
						0,0339		
<b>Média</b>	0,023915	0,022547	0,021622	0,024174	0,029558	0,023397	0,020611	0,020526
<b>DP</b>	0,01558	0,011547	0,012513	0,014111	0,01622	0,014543	0,015539	0,01439

	SOD							
	Controle	0,1	1,0	10	100	0,1Ex	1,0Ex	10Ex
	23,42475		28,33311	27,46077	18,16475	22,75272	20,34843	
	24,30828	21,75928	30,50756	30,19988	23,37703	23,70628	20,39199	18,94636
	30,61478	24,46943	34,10655	30,67516	24,70283	25,15747	22,93097	19,00229
	32,69112	35,07858	35,21378	31,91049	27,21181	25,68764	24,25766	20,24042
	32,78847	36,44312	35,60281	32,04166	28,35318	26,19941	24,39807	20,38023
	33,5537	36,45123	36,10988	33,05943	29,7862	26,68137	24,89459	21,70341
	34,13535	37,12455	38,49445	33,83006	31,47717	27,33557	25,49892	22,83876
	36,14255	37,28192	39,72881	33,87532	31,58729	29,12173	28,7833	23,52565
	36,40217	40,19001	40,81561	34,1004	34,55033	31,75324	30,67949	23,52831
	37,7453	40,85178	43,28029	35,86747	36,91357	34,30624	32,21621	23,59697
	38,18597	40,9138	43,37788	36,65377	39,24298	37,46574	32,71719	23,71733
	39,95854	42,0171	44,36444	37,0828	41,53489	38,49347	35,87227	24,5793
	40,19121	42,02373	44,72759	37,76524	42,28197	38,73695	36,29156	27,1588
	40,32458	42,25404	44,76189	38,45113	42,63186	39,5725	36,39776	28,26542
	40,76516	42,99332	44,9146	40,66028	43,38258	40,17157	37,15448	28,58953
	41,42353	43,47144	46,50441	41,5783	45,00282	41,80786	38,04643	29,27676
	41,63068	44,22329	47,3447	42,31664	46,19774	42,03892	39,13802	29,33173
	43,20721	45,29014	48,25079	42,66339	46,45695	42,37983	39,17692	30,78958
	43,98143	45,76695	49,21484	42,68478	46,55439	43,27977	40,7808	33,98254
	44,24885	45,77662	49,48754	42,88109	46,79986	43,80536	41,33705	35,0676
	44,9155	45,8918	49,89151	43,15707	46,80592	44,54503	42,08177	35,93576

	45,75726	46,33583	50,26472	43,85514	47,5582	44,90222	42,12459	36,28619
	46,66669	48,16569	50,59071	44,07016	49,05429	45,09943	42,64091	37,02122
	47,04586	48,35048	51,57195	44,89511	49,16823	45,78238	42,77967	38,29139
	47,3988	52,01982	54,36995	45,2956	50,31588	46,4536	42,8629	38,31081
	49,63151	52,12926	56,01869	45,33424	50,47213	46,49507	43,54809	39,6775
	49,70984	54,59014	56,39905	45,6025	51,50804	47,77195	43,82817	39,83613
	51,99488	55,67656	57,2356	46,97946	52,6579	48,84063	48,10996	40,26455
	52,15859	57,09293	57,92202	47,09618	54,36593	48,86272	48,9129	40,29111
	53,90043		60,22722	47,10114	56,40248	49,2688	49,05615	41,27105
	54,18328		61,7262	48,25248	58,79588	50,60641	50,02102	42,80269
	55,7552		65,73598	48,27586	59,47332	54,12017	55,43933	45,71578
	60,79595			49,14661	62,73367	57,09784	57,31981	46,47757
				53,10208	65,2428	57,10116	57,62139	
				62,45177	68,51886			
				62,7789	72,86833			
<b>Média</b>	42,29204	43,0226	46,78422	41,75423	45,05978	40,21768	38,16643	31,45946
<b>DP</b>	8,772909	8,131305	9,23046	8,1231	12,99038	9,800977	10,29667	8,435168

	GPx							
	Controle	0,1	1,0	10	100	0,1Ex	1,0Ex	10Ex
	0,517026	0,225004	0,133404	0,14035	0,09983	0,038141	0,08758	0,072672
	0,157824	0,16889	0,071618	0,120737	0,025693	0,027918	0,086983	0,127319
	0,188219	0,103727	0,106383	0,135608	0,010483	0,015306	0,065748	0,110657
	0,120012	0,086523	0,09388	0,072457	0,006732	0,010073	0,054497	0,11465
	0,106352	0,083545	0,118398	0,044137	0,392551	0,07208	0,028401	0,057647
	0,078629	0,113291	0,018544	0,032511	0,296178	0,020806	0,006484	0,056173
	0,204855	0,122005	0,18844	0,047295	0,222201	0,262877	0,268653	0,063998
	0,109858	0,022935	0,020604	0,03038	0,714165	0,266629	0,441481	0,020832
	0,203937	0,136834	0,046985	0,018227	0,253016	0,397316	0,340429	0,329442
	0,326905	0,305858	0,233603	0,268162	0,197445	0,21341	0,297414	0,343147
	0,320778	0,40104	0,208472	0,277687	0,285746	0,237848	0,63023	0,325297
	0,376467	0,645201	0,241069	0,543293	0,322714	0,11603	0,260589	0,385762
	0,334666	0,67244	0,616871	0,290919	0,291496	0,196759	0,269912	0,389774
	0,829002	0,557737	0,302103	0,437535	0,289665	0,215263	0,261548	0,251794
	0,665673	0,678718	0,697028	0,316265	0,214288	0,374083	0,318613	0,310934
	0,19051	0,630158	0,426453	0,387065	0,241967	0,752574	0,296639	0,35355
	0,378507	0,410792	0,530252	0,604123	0,250027	0,622615	0,268756	0,329277
	0,284445	0,725483	0,649288	0,29304	0,246673	0,220219	0,365764	0,363945
	0,254284	0,241817	0,655425	0,715654	0,187343	0,262298	0,271958	0,427059
	0,378257	0,335794	0,618083	0,531274	0,22277	0,211787	0,272981	0,375592
	0,342748	0,323994	0,328636	0,327329	0,149522	0,203877	0,221743	0,2591
	0,199983	0,127918	0,209753	0,173264	0,337863	0,208518	0,200329	0,311463
	0,321924	0,170633	0,184357	0,19332		0,166922	0,181172	0,358556
	0,265841	0,156365	0,150205	0,188723		0,194551	0,193707	0,18457
	0,269956	0,2063	0,210475	0,168495				0,253944
	0,225726	0,175538	0,139454	0,217939				0,173103
	0,366126	0,319739	0,338981	0,369086				

<b>Média</b>	0,296982	0,301788	0,279213	0,257218	0,239017	0,221163	0,23715	0,244241
<b>DP</b>	0,167049	0,214904	0,213743	0,187666	0,148308	0,179351	0,140657	0,128119

GR								
	Controle	0,1	1,0	10	100	0,1Ex	1,0Ex	10Ex
	0,004337	0,002453	0,00337	0,001892	0,001456	0,000399	0,002286	0,001089
	0,005247	0,003659	0,0037	0,002217	0,001605	0,000919	0,002479	0,001567
	0,007228	0,003746	0,004183	0,002634	0,001825	0,001153	0,002867	0,00214
	0,007402	0,00418	0,004319	0,002982	0,002167	0,001257	0,002965	0,002886
	0,007515	0,004559	0,004442	0,00315	0,002967	0,001366	0,003246	0,003543
	0,007651	0,005013	0,005144	0,003295	0,003247	0,00153	0,003466	0,003712
	0,007946	0,005022	0,005205	0,003544	0,00351	0,001633	0,003729	0,003727
	0,007956	0,005114	0,005571	0,004818	0,003559	0,001958	0,003795	0,003785
	0,008079	0,005424	0,00564	0,005002	0,003744	0,002158	0,00414	0,004304
	0,00819	0,006448	0,005723	0,005069	0,003826	0,002193	0,004397	0,004547
	0,008337	0,006654	0,005803	0,005371	0,00385	0,00232	0,004668	0,004895
	0,008481	0,00673	0,005956	0,005431	0,004084	0,002525	0,004932	0,00495
	0,008768	0,006785	0,006369	0,006274	0,004233	0,002799	0,004981	0,004969
	0,009346	0,006927	0,006604	0,006529	0,004369	0,002945	0,005003	0,00541
	0,009367	0,006929	0,006699	0,006694	0,00467	0,003085	0,005127	0,00555
	0,00942	0,007695	0,006813	0,006733	0,005459	0,003298	0,005152	0,005652
	0,009702	0,007903	0,00695	0,006743	0,005497	0,00341	0,005207	0,005824
	0,009705	0,008275	0,007514	0,006756	0,005748	0,003622	0,005292	0,005967
	0,009774	0,008411	0,008092	0,006996	0,006196	0,003945	0,005885	0,006124
	0,00981	0,009064	0,008387	0,008465	0,006439	0,003989	0,005898	0,006594
	0,010719	0,009921	0,00866	0,008842	0,00687	0,005278	0,006312	0,006713
	0,012135	0,011701	0,00968	0,010113	0,007131	0,005504	0,00654	0,007481
	0,01268	0,011705	0,01028	0,010537	0,007198	0,006243	0,006678	0,007814
	0,012706	0,013224	0,011322	0,011043	0,007426	0,006988	0,006705	0,007868
	0,019568	0,015674	0,011664	0,012186	0,007567	0,007252	0,006739	0,008986
	0,020583	0,016366	0,011798	0,012854	0,008071	0,00738	0,007072	
	0,021204	0,018284	0,013146	0,013477		0,007551	0,007601	
		0,021168	0,015742	0,014011				
<b>Média</b>	0,010143	0,008537	0,007456	0,006916	0,00472	0,003433	0,004932	0,005044
<b>DP</b>	0,004171	0,0047	0,003085	0,003546	0,001971	0,002155	0,001489	0,001986

GST								
	Controle	0,1	1,0	10	100	0,1Ex	1,0Ex	10Ex
	0,081156	0,022753	0,045033	0,046978	0,065496	0,073914	0,089897	0,112272
	0,084468	0,035783	0,065951	0,059605	0,067208	0,075398	0,094232	0,115647
	0,084579	0,063734	0,066452	0,05992	0,069289	0,081242	0,094519	0,119174
	0,089963	0,067273	0,066686	0,069234	0,074405	0,084065	0,096659	0,121118
	0,093276	0,067632	0,069627	0,070302	0,074725	0,085684	0,09888	0,121387
	0,098828	0,072072	0,075562	0,073731	0,074953	0,087786	0,100985	0,121771
	0,104176	0,07512	0,075634	0,073843	0,075898	0,088483	0,101169	0,123062
	0,111045	0,076817	0,081715	0,075739	0,082321	0,090079	0,101494	0,123839

	0,115147	0,089147	0,082184	0,078771	0,088071	0,090252	0,101973	0,127502
	0,12041	0,093805	0,083391	0,079759	0,088978	0,092837	0,102207	0,128677
	0,122748	0,100076	0,083557	0,079858	0,091172	0,093913	0,105424	0,130328
	0,124315	0,10656	0,085058	0,080301	0,091183	0,094697	0,106383	0,131257
	0,125543	0,107692	0,092255	0,084523	0,094321	0,096165	0,109293	0,138201
	0,126982	0,109596	0,096858	0,087085	0,095024	0,098023	0,112916	0,138228
	0,127795	0,112212	0,103157	0,088547	0,096269	0,101773	0,115244	0,14881
	0,129875	0,114599	0,105739	0,092127	0,09787	0,10292	0,115917	0,171348
	0,138715	0,117276	0,106328	0,096815	0,100044	0,107595	0,127758	0,181684
	0,139959	0,117505	0,123895	0,101299	0,125814	0,107755	0,129002	0,223358
	0,141338	0,129533	0,128864	0,103171	0,145368	0,108527	0,133533	0,233147
	0,146201	0,129771	0,15623	0,111341	0,14603	0,111669	0,137701	0,255907
	0,153667	0,139401	0,184204	0,120518	0,155708	0,122096	0,139241	0,258737
	0,163832	0,143324	0,184423	0,120952	0,156333	0,128797	0,139272	0,263662
	0,20804	0,178587	0,191787	0,125305	0,163202	0,136917	0,143775	0,29986
	0,211877	0,180089	0,199215	0,182615	0,164818	0,149181	0,145875	0,312364
	0,224474	0,190939	0,199473	0,189322	0,170569	0,153574	0,184834	0,35688
	0,232016	0,201882	0,208258	0,190293	0,182631	0,207869	0,194948	0,374247
	0,239365	0,218263	0,216016	0,191431	0,189027	0,210971	0,208958	0,38908
	0,241794	0,221454	0,21627	0,205805	0,195026	0,227663	0,233002	0,402133
	0,25546	0,233279	0,223916	0,213442		0,253031	0,24493	
	0,284686	0,23831	0,236641	0,214935		0,265431		
			0,247495	0,226643		0,274546		
<b>Média</b>	0,150724	0,125149	0,132318	0,115942	0,115062	0,129124	0,13138	0,200846
<b>DP</b>	0,057996	0,058682	0,063021	0,054923	0,042271	0,059504	0,042461	0,096101

GSH						
	Controle	0,1	1,0	10	100	10Ex
	10,26738	29,75913	26,32459	53,07838	47,18559	29,25085
	9,578172	32,49884	19,42689	27,40738	39,84087	30,74503
	18,4419	35,03819	13,07516	9,888144	46,99371	21,26682
	13,23056	25,83991	27,71681	21,87012	53,38782	28,39122
	16,40071	56,23384	32,16784	22,83335	41,05572	28,66293
	18,11522	12,72917	16,04636	49,92693	23,81012	32,90105
	24,78905	33,00597	12,90867	48,39133	23,76565	44,05343
	38,00486	51,41793	19,23572	37,57454	40,03885	44,86947
	41,8527	37,56193	37,26088	33,11249	71,68725	36,15525
	53,31587	24,20583	20,47333	30,67408	49,48124	30,62461
	44,90118	41,8076	37,03302	26,83279	54,08577	30,5008
		38,83662	18,52487	35,80962	48,97669	34,63049
<b>Média</b>	26,26342	34,91125	23,34951	33,1166	45,02577	32,671
<b>DP</b>	15,4636	11,76307	8,624601	12,76123	13,06087	6,627324

LPO						
	Controle	0,1	1,0	10	100	10Ex
	0,02	0,011	0,015	0,013	0,011	0,011
	0,013	0,012	0,012	0,012	0,019	0,015
	0,012	0,013	0,004	0,011	0,018	0,014
	0,012	0,014	0,012	0,006	0,011	0,03
	0,012	0,01	0,004	0,01	0,025	0,011
	0,003	0,008	0,006	0,01	0,011	0,014
	0,01	0,007	0,011	0,016	0,013	0,033
	0,01	0,027	0,011	0,019	0,004	0,005
	0,003	0,017	0,009	0,014	0,017	0,028
	0,007	0,018	0,011	0,005	0,025	0,025
	0,011	0,011	0,002	0,016	0,014	0,017
	0,01	0,004	0,009	0,011	0,004	0,008
<b>Média</b>	0,01025	0,012667	0,008833	0,011917	0,014333	0,017583
<b>DP</b>	0,004555	0,006005	0,003973	0,004055	0,006867	0,00917

PCO						
	Controle	0,1	1,0	10	100	10Ex
	0,005514	0,003641	0,004252	0,006751	0,006015	0,00416
	0,006413	0,006878	0,007722	0,006565	0,006744	0,005119
	0,006496	0,006352	0,005093	0,008315	0,006718	0,003627
	0,005956	0,006622	0,006694	0,005254	0,005002	0,003905
	0,007908	0,006113	0,007355	0,007302	0,008224	0,007025
	0,007355	0,007914	0,008414	0,007812	0,00535	0,003577
	0,007231	0,006721	0,003626	0,007818	0,006657	0,005661
	0,007465	0,004281	0,007306	0,006075	0,006586	0,006418
	0,007708	0,006753	0,006464	0,006187	0,007319	0,004324
	0,007622	0,007065	0,004895	0,007607	0,004835	0,003323
	0,005564	0,006373	0,006236	0,007494	0,006916	0,004715
	0,005904	0,002726	0,007272	0,005088	0,00436	0,004715
<b>Média</b>	0,006761	0,005953	0,006277	0,006856	0,006227	0,004714
<b>DP</b>	0,000883	0,001553	0,001493	0,001044	0,001137	0,001161

ROS						
	Controle	0,1	1,0	10	100	
	57,25535	32,4991		50,16753		
	57,58294	44,79702	41,59799	50,36683	56,86901	
	59,02932	48,43866	46,57749	55,5938	57,12679	
	59,45977	53,016	48,42249	59,191	57,507	
	60,21469	62,19243	53,79417	61,34419	61,84277	
	61,04441	62,88904	56,022	64,21042	64,51987	
	71,13927	64,3729	56,531	67,088	64,888	
	71,88689	64,784	58,24089	69,13174	65,38593	
	75,56796	65,72263	59,86382	70,627	69,514	
	75,70596	65,95381	60,888	71,395	72,04944	

	76,04782	66,64246	65,054	72,374	72,402
	77,52505	67,85	86,936	74,9643	73,29512
	79,34215	80,34	93,93159	75,50469	82,044
	79,57664	85,791	94,06119	77,227	82,906
	82,40814	87,67797	94,64207	79,252	91,279
	84,33361	91,863	100,5975	92,988	103,1138
	88,62232	92,233	103,1386	99,90874	110,194
	90,92297	92,69678	108,397	100,1274	126,987
	93,97672	94,00285	109,54	101,7555	138,66
	94,62251	94,27852	109,789	102,7898	146,0942
	96,73608	94,597	112,0582	103,124	150,9474
	97,60098	98,59896	117,8764	103,4414	167,3552
	100,1631	100,399	121,53	106,21	175,646
	109,731	101,3361	130,3605	115,9332	179,577
	115,5427	122,841	136,0236	135,9613	181,4342
		122,8477		139,998	193,5726
		127,9216		149,239	201,1226
		133,2854		149,4933	202,1297
<b>Média</b>	80,64153	82,85243	86,07806	89,26454	112,906
<b>DP</b>	16,5804	25,81014	29,50653	29,14177	51,78382