

RESSALVA

Atendendo solicitação da
autora, o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 16/11/2019.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR)

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS E GENÉTICOS DE
MICROCISTINAS SOB SISTEMAS TESTES ANIMAIS E
VEGETAIS

MARIA TEREZA PAMPLONA SILVA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS E GENÉTICOS DE
MICROCISTINAS SOB SISTEMAS TESTES ANIMAIS E
VEGETAIS**

MARIA TEREZA PAMPLONA SILVA

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Aparecida Marin Morales
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Maria do Carmo Bittencourt-
Oliveira

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade Estadual Paulista, Campus
de Rio Claro, como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

RIO CLARO –SP

NOVEMBRO/2017

574.5 Silva, Maria Tereza Pamplona
S586a Avaliação dos efeitos tóxicos e genéticos de microcistinas
sob sistemas testes animais e vegetais / Maria Tereza
Pamplona Silva. - Rio Claro, 2017
140 f. : il., figs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientadora: Maria Aparecida Marin Morales
Coorientadora: Maria do Carmo Bittencourt Oliveira

1. Ecologia. 2. Ecotoxicologia. 3. Cianotoxinas. 4.
Microcistinas. 5. Allium cepa. 6. Células ZFL. 7. Células
HepG2. I. Título.



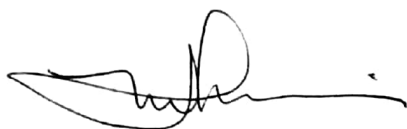
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS E GENÉTICOS DE MICROCISTINAS NATURAIS E SINTÉTICAS, SOB SISTEMAS TESTES ANIMAIS E VEGETAIS

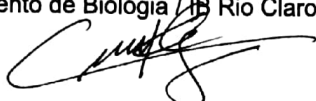
AUTORA: MARIA TEREZA PAMPLONA SILVA

ORIENTADORA: MARIA APARECIDA MARIN MORALES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES
Departamento de Biologia / IB Rio Claro



Prof. Dr. CESAR KOPPE GRISOLIA
Departamento de Genética e Morfologia / Universidade de Brasília

Profa. Dra. SILVIA TAMIE MATSUMOTO
Departamento de Ciências Biológicas / Universidade Federal do Espírito Santo



Profa. Dra. DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI
Departamento de Biologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 16 de novembro de 2017

Título alterado para: "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS E GENÉTICOS DE MICROCISTINAS, SOB SISTEMAS TESTES ANIMAIS E VEGETAIS"

*Dedico esse trabalho a
Deus, meus pais Odenil e
Irani e meu irmão Bruno*

"Você pode sonhar, criar, desenhar e construir o lugar mais maravilhoso do mundo. Mas é necessário ter pessoas para transformar seu sonho em realidade. " (Walt Disney)

AGRADECIMENTOS

À Deus, Aquela que permitiu que eu vencesse mais essa etapa, que me levantou quando eu caí, e foi a minha força quando eu não tinha mais forças, agradeço principalmente por Ele ter me fortalecido quando tive medo, e por colocar no meu caminho, amigos ou anjos tão especiais. Sem Ele nada disso seria possível.

Aos meus pais, Odenil e Irani, que me deram a vida e todo o amor e a base, que me ensinaram a lutar pelos meus sonhos e fizeram o possível e o impossível para que eu chegasse até aqui. Agradeço a vocês por todos os sacrifícios feitos por vocês para que eu realizasse esse sonho. Vocês são meus alicerces, o amor maior que existe.

Ao meu irmão, Bruno, que mesmo distante sempre torceu por mim e sempre acreditou que eu fosse capaz.

A toda minha família, tios, tias e primos que torceram, acreditaram e sempre demonstraram amor, carinho e confiança em mim. Também agradeço pelos momentos de descontração em família, sempre tão importantes para o descanso da mente e o conforto do coração.

Às minhas irmãs de alma, Ana Carolina, Érika e Adna, que foram minhas amigas, no sentido mais puro da palavra, estavam comigo sempre, mesmo à distância. Obrigada por me apoiarem, por me acalmarem, por me aconselharem e por me manterem com os pés no chão e a mente no céu, sempre.

Às malévolas lindas que eu amo, Paula e Cinthia que também me ouviram e acompanharam todo o estresse e todas as alegrias, obrigada por estarem sempre ao meu lado, me aconselhando e cuidando de mim.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Maria Aparecida Marin Morales, por ter me acolhido e me "adotado" (hehehe...). Obrigada por me acolher nesse grupo de pesquisa maravilhoso, onde aprendi muito. Obrigada por toda a PACIÊNCIA (e que paciência!), pela dedicação, pela orientação e principalmente por ter me dado a oportunidade de aprender tanto com você.

À professora Dr^a Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira, por nos ajudar desde o início do projeto com o seu conhecimento. E por me receber em seu laboratório e por permitir que eu realizasse parte do projeto lá.

A minha "irmã gêmea ou prima" Raquel, que foi para mim a minha família em Rio Claro, a amiga que me acalmou e que me ajudou em tudo desde o início. Obrigada, pelo incentivo,

por ter me acolhido aqui e por todas as risadas que você sempre proporciona. Agradeço também pela ajuda e pelo cuidado comigo, eu sei que dei trabalho, mas agradeço a paciência!

À minha Co, Leticia, que foi meu braço direito e esquerdo durante a realização deste trabalho. Obrigada pela amizade e pela parceria em todos os momentos de trabalho em fim de semanas, feriados e horários alternativos (hehehe...).

Aos meus amigos-irmãos, Rê e Preto, que me ouviram, me aguentaram e me aconselharam em vários momentos em que eu surtei, e principalmente, nesses momentos me fizeram rir.

Ao Cleiton, meu filho, amigo e conselheiro, por ser minha família, por estar do meu lado mesmo quando eu não mereci. Por cuidar de mim nos bons e maus momentos. Obrigada por essa amizade única.

Ao Mauricio, o amigo que Rio Claro me trouxe, e que me ensinou muito e com quem eu pude desabaçar e a quem pude recorrer nos momentos em que precisei.

Aos amigos mutagênicos, Michele, Lais, Nádia, Jaque Pira, Leticia C., Leticia G., Raguél, Matheus, Dânia, Marcia, Willian, Fernanda, Franco, Leticia B. por todas as risadas, brincadeiras durante todos os momentos. Obrigada por toda a ajuda nos experimentos de cultura, discussões (sobre assuntos sérios ou não), por todo o carinho (mesmo que este fosse demonstrado por porrada e zoação), por me acolherem aqui e acima de tudo isso, obrigada a todos por essa amizade louca que surgiu tão rapidamente. Valeu galera!

Aos agregados, Bairral, Cleiton, Camila e Jorge pelos momentos de descontração e diversão, que fazem tanta diferença no processo.

Ao Guilherme Thiago Mazuiero por nos ajudar e viabilizar a coleta no reservatório.

À Micheline do laboratório de cianobactérias da Esalq, que doou seu tempo e teve muita paciência em me ensinar sobre o cultivo das cianobactérias. Obrigada!

À Cnpq pelo financiamento por meio do projeto Universal 460962/2014-0.

À CAPES pela bolsa concedida.

À Prof^a Dejanira de Franceschi de Angelis, Dilza Nalim e ao Zito por toda ajuda e incentivo para a realização desse trabalho, todos sempre dispostos a ajudar.

A todos os professores do departamento de biologia, da biologia celular e molecular, pela transmissão de conhecimento durante este período.

À Prof^a Dr^a Dejanira de Franceschi de Angelis, Prof^a Dr^a Carmem Silvia Fontanetti Christofolotti, Prof^a Dr^a Silvia Tamie Matsumoto e ao Prof^o Cesar Koppe Grisólia por aceitarem o convite para fazer parte desta banca e se disponibilizarem para contribuir para este trabalho.

À técnica Adriana, pela ajuda nesse trabalho, pelas risadas e pela amizade.

Ao técnico Ger, pela ajuda, disponibilidade em ajudar sempre e por todo o bom humor nos nossos cafézinhos que fizeram toda a diferença.

À secretária do departamento Cris que sempre se mostrou muito solícita em me ajudar em tudo que estivesse ao seu alcance. Obrigada pelos momentos de descontração!

A todos os colegas do departamento de biologia pelo convívio agradável de todos os dias.

Espero não ter deixado ninguém de fora! Enfim, agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram direta ou indiretamente para que eu alcançasse esse sonho... OBRIGADA A TODOS!

RESUMO

As cianobactérias são organismos procariontes fotossintetizantes que apresentam capacidade de produzir metabólitos secundários de alto efeito tóxico para seres vivos, denominados de cianotoxinas. A presença desses organismos nos ambientes aquáticos se dá, inicialmente, pelo excesso de nutrientes, derivados, principalmente, de excessivo descarte de efluentes urbanos e industriais e de poluentes oriundos das atividades agrícolas. As cianobactérias produzem cianotoxinas do tipo endotoxinas, cuja toxicidade se dá, geralmente, quando a toxina é liberada para o meio extracelular, em decorrência de lise celular, devido ao envelhecimento ou morte das cianobactérias. São substâncias presentes nas paredes celulares de muitas cianobactérias; e exotoxinas, que apresentam uma potente ação tóxica e estão relacionadas com o metabolismo de manutenção da cianobactéria. Este estudo foi elaborado com o intuito de comparar a ação de cianotoxinas, sobre vários aspectos, em dois bioindicadores de citogenotoxicidade e sobre diferentes formas de aparecimento no ambiente. Para tanto, foram analisadas: microcistina-LR, substância adquirida comercialmente, com grau de pureza de 95 %; biomassa de cultivo, em laboratório, da *Microcystis aeruginosa* (linhagem BCCUSP 232), para avaliação da toxicidade das endocianotoxinas; extratos do meio em que a *M. aeruginosa* foi cultivada, para avaliação da toxicidade das exocianotoxinas; e extratos de amostras ambientais coletadas no reservatório de Salto Grande (Americana-SP), ambiente que apresenta recorrentes florações de cianobactérias. Os organismos testes, indicadores de cito, geno e mutagenicidade, utilizados neste estudo, para avaliar efeitos das cianotoxinas, foram *Allium cepa* e células hepáticas mantidas em cultura (humana – HepG2 e do peixe *Danio rerio* –ZFL). A espécie *A. cepa* foi utilizada em ensaios *in vivo* e as culturas de células hepáticas humanas e de *D. rerio* foram utilizadas nos ensaios *in vivo*. Neste estudo foram avaliados os efeitos citotóxico, genotóxico e mutagênico da microcistina purificada, adquirida comercialmente; de amostras ambientais coletadas em um ambiente com recorrentes florações por cianobactérias; com biomassa de *Microcystis aeruginosa*, obtidas em laboratório, para inferir efeitos das endotoxinas produzidas por essa espécie; e com o meio de cultivo da *M. aeruginosa*, para inferir os efeitos das exotoxinas desses procariontes. Para esta avaliação, foram realizados teste *in vivo* com *Allium cepa*, e testes *in vitro* com as culturas celulares. Com o organismo teste *A. cepa*, foram aplicados testes de aberrações cromossômicas (AC) e de micronúcleo (MN) em células meristemáticas e de micronúcleo (MN) em células F1. Neste organismo foram

testadas as concentrações de 1 µg/L (concentração considerada como alerta de nível 1 pela OMS); 1,5 µg/L (concentração 50% maior que a de alerta de nível 1), simulando um início de floração; e 2 µg/L (concentração duas vezes maior que a concentração de alerta), simulando uma floração de cianobactéria em estado avançado. As amostras ambientais e o meio de cultivo das *M. aeruginosa* passaram pelo processo de extração de fase sólida (EFS). Os extratos foram utilizados na diluição 1/10. Foi observado nos testes realizados com *A. cepa*, que nas concentrações e nas condições a que as células foram expostas, a microcistina purificada possui ação mutagênica e genotóxica e que sua ação pode estar relacionada com a inibição do sistema de reparo da célula e com uma ação clastogênica sobre o DNA. Ainda pode-se observar que em amostras ambientais, consideradas complexas, o efeito tóxico da microcistina pode ser amplificado, em decorrência de efeito sinérgico da microcistina com outras substâncias presentes na amostra, levando a efeitos adicionais, como indução de processos apoptóticos. Pelo teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese (MNBC), realizados com as linhagens celulares HepG2 e ZFL, pode-se observar um alto índice de mutagenicidade e genotoxicidade, porém não foi observado resultados significativos de genotoxicidade pelo ensaio do cometa. Esta contradição entre os testes infere que os danos no DNA, observados no teste MNBC, estariam relacionados a um estágio inicial de apoptose e não com uma ação genotóxica da substância. Os resultados também sugerem que a indução de MNBC pode ser decorrente de ação direta da microcistina sobre o citoesqueleto celular, uma vez que existem estudos que evidenciaram que essas toxinas agem sobre os microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários das células. Diante dos resultados obtidos neste trabalho, pudemos entender um pouco mais sobre a ação das cianotoxinas sobre os organismos vivos e, portando, registrarmos a real necessidade de monitoramentos efetivos que possam avaliar os comprometimentos nos ambientes aquáticos, principalmente, naqueles que tem histórico conhecido de florações por cianobactérias. Com estes resultados queremos, ainda, alertar e sensibilizar os órgãos públicos responsáveis pela qualidade ambiental, para que sejam realizadas, sistematicamente, avaliações que possam melhor monitorar os nossos corpos hídricos, destacando a necessidade de inclusão de testes de cito, geno e mutagenicidade, uma vez que, rotineiramente, vem sendo feito monitoramento desses ambientes, apenas por meio de análises químicas. Destacamos ainda que, a concentração de microcistina permitida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) também foi capaz de induzir danos na molécula de DNA.

Palavras-chaves: *Allium cepa*, ensaios *in vitro*, células HepG2, células ZFL, teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese, ensaio do cometa, cianotoxinas, microcistinas

ABSTRACT

Cyanobacteria are prokaryotic photosynthetic organisms that have been developed to produce live, called cyanotoxins. The presence of organisms in aquatic environments is initially due to excess nutrients, mainly derived from excessive disposal of urban and industrial effluents and pollutants from agricultural activities. Cyanobacteria produce cyanotoxins of the endotoxin type, the toxicity of which generally occurs when the toxin is released into the extracellular medium as a result of cell lysis due to the aging or death of the cyanobacteria. They are substances present in the cell walls of many cyanobacteria; and exotoxins, which present a potent toxic action and are related to the maintenance metabolism of cyanobacteria. This study was developed with the aim of comparing the action of cyanotoxins, on several aspects, in two bioindicators of cytotoxicity and on different forms of appearance in the environment. Therefore, we analyzed: microcystin-LR, a substance commercially acquired, with a purity of 95%; laboratory culture of *Microcystis aeruginosa* (strain BCCUSP 232), to evaluate the toxicity of endo-cyanotoxins; extracts from the medium in which *M. aeruginosa* was cultured, to evaluate the toxicity of exocyanotoxins; and extracts from environmental samples collected in the Salto Grande reservoir (Americana-SP), an environment that presents recurrent cyanobacterial blooms. The test organisms, cyto, geno and mutagenicity indicators used in this study to evaluate the effects of cyanotoxins were *Allium cepa* and cultured hepatic cells (human - HepG2 and *Danio rerio*-ZFL). *A. cepa* was used in *in vivo* assays and cultures of human hepatic and *D. rerio* cells were used in the *in vitro* assays. In this study the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of the commercially acquired purified microcystin were evaluated; of environmental samples collected in an environment with recurrent cyanobacterial blooms; with biomass of *Microcystis aeruginosa*, obtained in the laboratory, to infer effects of the endotoxins produced by this species; and with *M. aeruginosa* culture medium, to infer the effects of the exotoxins of these prokaryotes. For this evaluation, *in vivo* tests were performed with *Allium cepa*, and *in vitro* tests with cell cultures. With the test organism *A. cepa*, tests of chromosomal aberrations (AC) and micronucleus (MN) were applied in meristematic and micronucleus (MN) cells in F1 cells. In this organism, concentrations of 1 µg / L (concentration considered as level 1 alert by the WHO) were tested; 1.5 µg / L

(concentration 50% higher than the alert level 1), simulating a beginning of flowering; and 2 µg / L (concentration twice as high as the alert concentration), simulating an advanced cyanobacteria bloom. The environmental samples and culture medium of *M. aeruginosa* underwent solid phase extraction (SAI). The extracts were used in the 1/10 dilution. It was observed in the tests carried out with *A. cepa* that at the concentrations and the conditions to which the cells were exposed, the purified microcystin has a mutagenic and genotoxic action and that its action may be related to the inhibition of the cell repair system and with a clastogenic action on DNA. It can be observed that in environmental samples, considered as complex mixtures, the toxic effect of microcystin can be amplified, due to the synergistic effect of microcystin with other substances present in the sample, leading to additional effects, such as induction of apoptotic processes. A high index of mutagenicity and genotoxicity was observed by the micronucleus test with cytokinesis blockade (MNBC), carried out with the cell lines HepG2 and ZFL, but no significant results of genotoxicity were observed by the comet assay. This contradiction between the tests infers that DNA damage, observed in the MNBC test, would be related to an early stage of apoptosis and not to a genotoxic action of the substance. The results also suggest that the induction of MN may be due to the direct action of microcystin on the cell cytoskeleton, since there are studies that showed that these toxins act on the microtubules, microfilaments and intermediate filaments of the cells. In view of the results obtained in this work, we could understand a little more about the action of cyanotoxins on living organisms and, therefore, the real need for effective monitoring to assess the aquatic environment, especially those with a known history of cyanobacteria bloom. With these results, we also want to alert and sensitize the public bodies responsible for environmental quality, so that systematic evaluations can be carried out to better monitoring our water bodies, highlighting the need to include cytogenetic and mutagenicity tests, a since, routinely, monitoring of these environments has been done, only through chemical analysis. We also highlight that the concentration of microcystin permitted by the World Health Organization (WHO) was also able to induce damage in the DNA molecule.

Key-words: *Allium cepa*, in vitro assays, HepG2 cells, ZFL cells, micronucleus test with cytokinesis block, comet assay, cyanotoxins, microcystins

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANTX-a	Anatoxina-a
MNBC	Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese
CN	Controle negativo
CP	Controle Positivo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFS	Extração de Fase Sólida
HCl	Ácido clorídrico
HepG2	Linhagem de hepatoma humano
IM	Índice mitótico
IMC	Índice de morte celular
IPM	Índice de potencial mutagênico
IMt	Índice de mutagenicidade
MC	Microcistina
MC-LR	Microcistina - LR
MMS	Metil MetanoSulfonato
MN	Micronúcleo
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NO	Monóxido de nitrogênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCS	Policetídeo sintetase
PNRS	Peptídeo não-ribossomal sintetase
STX	Saxitoxina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UNEP	United Nations Environment Programme
USEPA	US Environmental Protection Agency
WHO	World Health Organization
ZFL	Linhagem de hepatócito de Zebrafish

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula química estrutural da cianotoxina Microcistina-LR.....	23
Figura 2. Esquema dos pontos de coleta localizados no reservatório de Salto Grande (Americana - SP).....	34
ARTIGO 1	
Figura 1. Esquema do Reservatório de Salto Grande Americana – SP, constando os pontos de coleta.....	45
Figura 2. Índice mitótico (média e desvio padrão).....	47
Figura 3. Aberrações cromossômicas (AC).....	48
Figura 4. Índice de potencia mutagênico (IPM).....	49
Figura 5. Índice de morte celular (IMC).....	49
Figura 6. Índice de mutagenicidade (IMt).....	50
Figura 7. Células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> expostas ao controle negativo (A-E) e aos tratamentos com microcistina (F-O).....	51
ARTIGO 2	
Figura 1. Resultados do ensaio de índice mitótico(IM) realizados com as raízes submetidas às diferentes concentrações da biomassa de cianobactéria (expressas em µg/L) e com a solução de 10 % do extrato do meio de cultivo.....	79
Figura 2. Resultados dos ensaios de aberrações cromossômicas (AC) realizadas com as raízes submetidas às diferentes concentrações da biomassa de cianobactéria (expressas em µg/L) e com a solução de 10 % do extrato do meio de cultivo.....	80
Figura 3. Resultados dos ensaios de índice de micronúcleos (IMN) realizados com células meristemáticas de raízes submetidas às diferentes concentrações da biomassa de cianobactéria (expressas em µg/L) e com a solução de 10 % do extrato do meio de cultivo.....	81
Figura 4. Resultados dos ensaios de índice de mutagenicidade (IMt) realizados com células F1 de raízes submetidas às diferentes concentrações da biomassa de cianobactéria (expressas em µg/L) e com a solução de 10 % do extrato do meio de cultivo.....	81
ARTIGO 3	
Figura 1. Esquema do Reservatório de Salto Grande Americana – SP, constando os pontos de coleta.....	116

Figura 2. Resultados do Índice de Divisão Celular e Citotoxicidade das células HepG2 e ZFL expostas aos tratamentos com a substância Microcistina-LR e com os extratos das águas do reservatório de Salto Grande.....	124
---	-----

ARTIGO 4

Figura 1. Resultados da avaliação citostática e citotoxicidade realizada com células HepG2 e ZFL pelo ensaio do micronúcleo, após tratamento com a biomassa obtida da cultura de cianobactérias e com o extrato do meio em que foram cultivadas.....	168
--	-----

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 3

Tabela 1. Resultados do ensaio do cometa realizado com células HepG2 e ZFL, após tratamento com a substância Microcistina-LR.....	120
Tabela 2. Resultados do ensaio do cometa realizado com células HepG2 e ZFL, após tratamento com Extratos das águas do reservatório de Salto Grande.....	120
Tabela 3. Resultados da avaliação da genotoxicidade, obtido no teste do micronúcleo, para as células HepG2 e ZFL, após tratamento com a substância Microcistina-LR.....	121
Tabela 4. Resultados da avaliação da genotoxicidade realizada com células HepG2 e ZFL, após tratamento com extratos das águas do Reservatório de Salto Grande.....	122
Tabela 5. Resultados da avaliação da mutagenicidade realizada com o teste do micronúcleo com as células HepG2 e ZFL, após tratamento com a substância Microcistina-LR.....	123
Tabela 6. Resultados da avaliação da mutagenicidade realizada com o teste do micronúcleo com as células HepG2 e ZFL, após tratamento com extratos das águas do Reservatório de Salto Grande.....	123

ARTIGO 4

Tabela 1. Resultados do ensaio do cometa realizado com células HepG2 e ZFL, após tratamento com biomassa obtida da cultura de cianobactérias e com extrato do meio em que foram cultivadas.....	166
---	-----

Tabela 2. Resultados da avaliação da genotoxicidade realizada com células HepG2 e ZFL, após tratamento com a biomassa obtida da cultura de cianobactérias e com o extrato do meio em que foram cultivadas.....167

Tabela 3. Resultados da avaliação da mutagenicidade realizada com células HepG2 e ZFL, após tratamento com a biomassa obtida da cultura de cianobactérias e com o extrato do meio em que foram cultivadas.....168

SUMÁRIO

1	Introdução	15
2	Revisão de Literatura	18
	2.1 Histórico.....	18
	2.2 Cianobactérias.....	18
	2.2.1 Florações de cianobactérias	19
	2.2.2 Florações de cianobactéria no reservatório de Salto Grande, Americana-SP	20
	2.3 Cianotoxinas	21
	2.3.1 Microcistina	22
	2.3.2 Mecanismos de ação	23
	2.4 Métodos de avaliação de ecotoxicidade	25
	2.4.1 Bioindicadores in vitro e in vivo	25
	2.4.2 Cultura de células.....	25
	2.4.3 Ensaio do cometa.....	26
	2.4.4 Teste do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese.....	27
	2.4.5 O organismo teste A. cepa.....	28
3	Objetivos	31
4	Material e Métodos.....	32
	4.1 Substância química	32
	4.2 Material biológico.....	32
	4.2.1 Cianobactérias	32
	4.3 Amostra Ambiental.....	33
	4.3.1 Reservatório de Salto Grande	33
	4.3.2 Extração de Fase Sólida (EFS).....	35
	4.3.3 Eluição das Amostras.....	36
	4.4 Bioensaios com cultura celular (HepG2 e ZFL).....	36
	4.4.1 Ensaio de viabilidade celular - Teste da Resazurina.....	37

4.4.2	Ensaio do cometa.....	38
4.4.3	Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese.....	39
4.5	Bioensaio com Allium cepa	39
4.5.1	Teste de Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em Células Meristemáticas de A. cepa	40
5	Resultados	41
5.1	ARTIGO 1.	42
5.2	ARTIGO 2.	62
5.3	ARTIGO 3.	74
5.4	ARTIGO 4.	74
6	Considerações finais.....	94
7	Conclusões gerais.....	112
8	Referências Bibliográficas.....	114

1 Introdução

A qualidade dos recursos hídricos se transformou nos últimos anos, em grande preocupação para a população mundial e especialmente para a sociedade científica que tem discutido formas para evitar e remediar esta degradação. O decréscimo da qualidade da água está diretamente ligado ao aumento populacional, ao desenvolvimento industrial e ao conseqüente descarte de efluentes sem tratamento nos corpos hídricos. Este aumento no descarte de poluentes gera um maior aporte de nutrientes, o que somado às constantes alterações climáticas vinculadas ao aquecimento global, levam à floração de cianobactérias.

A presença de cianobactérias em corpos hídricos já vem sendo observada há algum tempo e os efeitos das suas toxinas têm se tornado uma preocupação crescente no que tange a saúde pública. No Brasil, em 1988, foi registrada a ocorrência de florações de cianobactérias no reservatório de Itaparica (Bahia), cujas águas destinadas ao consumo humano causaram intoxicação em 200 pessoas, em que cerca de 50% delas chegaram a óbito.

A ocorrência e persistência das florações de cianobactérias estão relacionadas à diminuição do padrão de qualidade e ao aumento da eutrofização das águas doces. O aumento das florações geralmente resulta em uma produção maior de toxinas que, conseqüentemente, incorre em uma maior probabilidade dos organismos do local contaminado se exporem às cianotoxinas.

A produção de toxinas por cianobactérias é variável dentre uma mesma população, sendo este padrão de irregularidade ainda pouco esclarecido. Porém, existem hipóteses de que esta variação na produção esteja relacionada com alterações nos fatores ambientais como luz, temperatura e nutrientes disponíveis, necessários para a síntese das toxinas(CARMICHAEL, 1992; CAMPOS; DUARTE, 2011)(CARMICHAEL, 1992; CAMPOS; DUARTE, 2011)(CARMICHAEL, 1992; CAMPOS; DUARTE, 2011)(CARMICHAEL, 1992; CAMPOS; DUARTE, 2011)

As cianotoxinas são compostos reconhecidamente hepatotóxicos, neurotóxicos e dermatotóxico. No fígado, estas toxinas atrofiam os hepatócitos devido a inibição de fosfatases essenciais para este órgão, provocando hemorragias hepáticas, que poderão levar a problemas cardíacos graves. Dentre as cianotoxinas, as microcistinas são as mais

estudadas, havendo registros do seu potencial tumorigênico para pele e fígado, conforme observado em estudos realizados com ratos (HOOSER et al., 1991; NISHIWAKI-MATSUSHIMA et al., 1992; ZEGURA; STRASER; FILIPIČ, 2011). Abramsson-Zetterberg Sundh e Mattsson (2010) associaram o potencial carcinogênico registrados para essas substâncias com à sua ação genotóxica, embora, segundo os autores, os dados sobre os efeitos genotóxico e mutagênicos das microcistinas ainda sejam limitados e contraditórios.

Para a avaliação destes parâmetros, foi utilizado neste trabalho, pela primeira vez as células hepáticas do peixe *Danio rerio* (ZFL) para avaliação ecotoxicológica de cianotoxinas. A escolha da linhagem hepática de peixes (ZFL) teve como propósito o uso de células de um organismo aquático altamente sensível a xenobiontes, o que permitirá a obtenção de importantes informações sobre os possíveis impactos que os organismos aquáticos possam estar submetidos em eventos de floração e cianobactérias. Outro aspecto importante de usar essa linhagem de peixe é a possibilidade de se avaliar, adicionalmente, as possibilidades da cianotoxina tornar-se ainda mais tóxica que o composto original, após passar por metabolização pelo fígado. A escolha da linhagem hepática do peixe *D. rerio* seguiu então os indicativos de que devem ser usados em bioensaios organismos que sejam sensíveis e representativos para uma das categoria importantes do meio investigado, neste caso os peixes. O peixe-zebra é considerado um poderoso organismo modelo para o estudo da biologia de vertebrados, sendo bem adaptado tanto para análise de desenvolvimento como para análise genética (DOOLEY; ZON, 2000; BABIN; GOIZET; RALDÚA, 2014). Somada a adequação de *D. rerio* ao tipo de estudo aqui realizado, temos ainda que esta espécie também tem sido muito utilizada em ensaios que buscam uma boa correspondência com as respostas em humanos (DOOLEY; ZON, 2000; BABIN; GOIZET; RALDÚA, 2014).

A linhagem HepG2 (hepatoma humano) foi escolhida para ser aplicada neste estudo, por ser um bioindicador que, segundo Zhou et al. (2008), pode estimar a ação citogenotóxica da cianotoxina para humanos. As informações obtidas neste estudo tem uma alta relevância, uma vez que já existem muitos relatos de problemas de saúde humana decorrentes de exposições a águas contaminadas com esta toxina. Essa linhagem celular, como descrito por Knasmüller et al. (2004), têm enzimas remanescentes em seu sistema fisiológico que conseguem metabolizar drogas que normalmente não seriam metabolizadas por outros cultivos celulares. Assim, o autor cita que estas células pode se

caracterizar em importantes ferramenta para a detecção de compostos reativos ao DNA, ação esta que procuramos investigar.

Diante destes fatos, existe uma eminente necessidade de se investigar mais amplamente estes compostos, para se conhecer as características e modo de ação destas toxinas sobre sistemas biológicos a elas expostos. Foram realizados estudos para avaliar tanto os efeitos da cianotoxina adquirida comercialmente como os de águas do reservatório de Salto Grande (cidade de Americana –SP), coletadas durante floração de cianobactérias. A avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade dessas toxinas foi realizada por meio de ensaios desenvolvidos com o organismo teste *Allium cepa*, com cultura de células de hepatoma humano (células HepG2) e com cultura de células hepática do peixe *Danio rerio* (ZFL).

6 Conclusões gerais

Diante dos resultados obtidos em ensaios *in vitro* e *in vivo*, realizados com culturas de células hepáticas humana (HepG2) e de peixe (ZFL), expostas a microcistina-LR podemos concluir que:

- ✓ A utilização de diferentes bioindicadores e biomarcadores contribuíram para uma análise mais completa e significativa dos riscos que esta toxina pode promover ao ambiente e aos organismos expostos;
- ✓ Todas as concentrações de microcistina-LR (95 % de pureza) e da biomassa testadas em *Allium cepa* apresentaram ação genotóxica, pelo aumento das aberrações cromossômicas, e ação mutagênica, confirmada pela presença de MN em células meristemáticas e F1.
- ✓ Dentre as amostras ambientais testadas com o bioindicador *Allium cepa*, ficou evidente a genotoxicidade e mutagenicidade para as águas coletadas nos pontos 1 e 4, indicando um maior efeito sinérgico entre a cianotoxina e outros compostos químicos presentes nestes pontos;
- ✓ O ensaio de citotoxicidade, realizado com as duas linhagens celulares, não apresentou resultados significativos, demonstrando uma baixa ação citotóxica da toxina nas concentrações testadas;
- ✓ A avaliação realizada por meio do teste do cometa não demonstrou genotoxicidade da cianotoxinas, para nenhuma das concentrações testadas da microcistina, em ambas as linhagens celulares. Entretanto, no teste de aberrações cromossômicas, pela técnica do micronúcleo com bloqueio de citocinese, o resultado foi inverso, pois todas as concentrações apresentaram genotoxicidade. Esses resultados controversos podem ser decorrentes da ação da toxina vinculada a eventos iniciais de apoptose;
- ✓ O ensaio do cometa e o teste do micronúcleo, realizados em sistema *in vitro* demonstraram ser eficientes e complementares para avaliação genotóxica e mutagênica de substâncias químicas;
- ✓ Os ensaios com as linhagens celulares permitiram, ainda, verificar a ação sobre o citoesqueleto e a ação proliferativa das células expostas à ação da microcistina. Por esses, podemos inferir uma ação tumorigênica das

microcistinas, mesmo em baixas concentrações e reduzido tempo de exposição.

- ✓ Podemos ainda concluir, pelos resultados obtidos, que as cianotoxinas apresentam-se mais tóxicas quando presentes em amostras complexas, como as ambientais, do que quando testada individualmente. Esses resultados, provavelmente, se devem a uma ação sinérgica e/ou aditiva entre a toxina e os demais compostos presentes nas amostras ambientais.

7 Referências Bibliográficas

ABRAMSSON-ZETTERBERG, L.; SUNDH, U. B.; MATTSSON, R. Cyanobacterial extracts and microcystin-LR are inactive in the micronucleus assay in vivo and in vitro. **Mutation Research**, v. 699, n. 1–2, p. 5–10, 17 jun. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.04.001>>.

ALBERTINI, R. J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G. R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A. T.; NORPPA, H.; SHUKER, D. E. G.; TICE, R.; WATERS, M. D.; AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. **Mutation Research**, v. 463, n. 2, p. 111–72, ago. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10913908>>.

ANDRADE, V. M.; FREITAS, T. R. O.; SILVA, J. Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutation Research**, v. 560, n. 1, p. 57–67, 9 maio 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15099825>>.

ARIZA, R. R.; KEYSE, S. M.; MOGGS, J. G.; WOOD, R. D. Reversible Protein Phosphorylation Modulates Nucleotide Excision Repair of Damaged DNA by Human Cell Extracts. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 3, p. 433–440, 1 fev. 1996. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=145647&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutation research**, v. 467, n. 2, p. 177–86, 8 maio 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10838205>>.

AZEVEDO, S. M. F. O. Toxinas de cianobactérias : causas e conseqüências para a saúde pública. **Med On Line**, v. 1, p. 1–16, 1998.

BABIN, P. J.; GOIZET, C.; RALDÚA, D. Zebrafish models of human motor neuron diseases: advantages and limitations. **Progress in Neurobiologyeurobiology**, v. 118, p. 36–58, jul. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24705136>>.

BAUTISTA, A. C.; MOORE, C. E.; LIN, Y.; CLINE, M. G.; BENITAH, N.; PUSCHNER, B. Hepatopathy following consumption of a commercially available blue-

green algae dietary supplement in a dog. **BMC veterinary research**, v. 11, p. 136, 19 jun. 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4472392&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

BELLINGER, E. G.; SIGEE, D. C. **Freshwater Algae**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2010.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research**, v. 415, n. 3, p. 167–84, 31 jul. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9714792>>.

BIANCHI, E.; GOLDONI, A.; TRINTINAGLIA, L.; LESSING, G.; SILVA, C.; NASCIMENTO, C.; ZIULKOSKI, A.; SPILKI, F.; SILVA, L. Evaluation of genotoxicity and cytotoxicity of water samples from the Sinos River Basin, southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 2, p. 68–74, maio 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842015000300012&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

BICUDO, C. E. M.; BICUDO, D. C. **Amostragem em Limnologia**. São Carlos: RiMa, 2004.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. Development of *Microcystis aeruginosa* Under, (Kützing) Kützing (Cyanophyceae/Cyanobacteria). **Algolog. Stud.**, v. 99, p. 29–37, 2000.

BOETTCHER, M.; GRUND, S.; KEITER, S.; KOSMEHL, T.; REIFFERSCHIED, G.; SEITZ, N.; ROCHA, P. S.; HOLLERT, H.; BRAUNBECK, T. Comparison of in vitro and in situ genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test. **Mutation research**, v. 700, n. 1–2, p. 11–7, 19 jul. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20417309>>.

BOLOGNESI, C.; HOLLAND, N. The use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for monitoring pesticide-exposed populations. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 770, p. 183–203, out. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383574216300345>>.

BONASSI, S.; NERI, M.; LANDO, C.; CEPPI, M.; LIN, Y.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; FENECH, M.; HUMN COLLABORATIVE GROUP. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. **Mutation Research**, v. 543, n. 2, p. 155–66, mar. 2003. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383574203000139>>.

BÖRNER, T.; DITTMANN, E. Molecular Biology of Cyanobacterial Toxins. In: **Harmful Cyanobacteria**. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. 3p. 25–40.

CALIJURI, M. do C.; ALVES, M. S. A.; DOS SANTOS, A. C. A. Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais. In: [s.l.] Rima, 2006. p. 118.

CAMPOS, M. F.; DUARTE, L. M. **Cianobactérias: um panorama geral**. Disponível em: <<http://www.ecodebate.com.br/2011/10/28/cianobacterias-um-panorama-geral-artigo-de-fernanda-de-matos-campos-e-lourdes-maria-duarte>>. Acesso em: 6 abr. 2017.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, n. 5, p. 722–5, jun. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18495201>>.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites--the cyanotoxins. **The Journal of applied bacteriology**, v. 72, n. 6, p. 445–59, jun. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1644701>>.

CARMICHAEL, W. W. The toxins of cyanobacteria. **Scientific American**, v. 270, n. 1, p. 78–86, jan. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8284661>>.

CARMICHAEL, W. W. Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: “The CyanoHABs”. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 7, n. 5, p. 1393–1407, set. 2001. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/loi/bher20%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1080/20018091095087%5Cnhttp://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>>.

CARMICHAEL, W. W. Human and Ecological Risk Assessment : An Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria : “ The CyanoHABs ” Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria : “ The CyanoHABs ”. n. February 2013, p. 37–41, 2012.

CARMICHAEL, W. W.; GORHAM, P. R. Freshwater Cyanophyte Toxins: Types and Their Effectes on the Use of Microalgae Biomass. In: SHELEF, G.; SOEDER, C. J. (Ed.). **Algae Biomass: Production and Use**. The netherlands: Elsevier Inc., 1980. p. 437–448.

CETESB. **Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo — 2007**. [s.l.: s.n.].

CHAN, K. M.; KU, L. L.; CHAN, P. C.-Y.; CHEUK, W. K. Metallothionein gene expression in zebrafish embryo-larvae and ZFL cell-line exposed to heavy metal ions. **Marine environmental research**, v. 62 Suppl, p. S83-7, jul. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16690118>>.

- CHEN, D. S.; CHAN, K. M. Differentially expressed proteins in zebrafish liver cells exposed to copper. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 104, n. 3–4, p. 270–7, ago. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21641295>>.
- CHEN, L.; XIE, P. Mechanisms of Microcystin-induced Cytotoxicity and Apoptosis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 13, p. 1018–1031, 2016. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=16&issue=13&spage=1018>>.
- CHEUK, W. K.; CHAN, P. C.-Y.; CHAN, K. M. Cytotoxicities and induction of metallothionein (MT) and metal regulatory element (MRE)-binding transcription factor-1 (MTF-1) messenger RNA levels in the zebrafish (*Danio rerio*) ZFL and SJD cell lines after exposure to various metal ions. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 89, n. 2, p. 103–12, 29 ago. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18639347>>.
- CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management**. London, UK: E & FN Spon, 1999.
- CHRISTIANSEN, G.; FASTNER, J.; ERHARD, M.; BÖRNER, T.; DITTMANN, E. Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution and manipulation. **Microbiology**, v. 185, n. 2, p. 564–572, 2003.
- CODD, G.; BELL, S.; KAYA, K.; WARD, C.; BEATTIE, K.; METCALF, J. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. **European Journal of Phycology**, v. 34, p. 405–415, 1999.
- COLLINS, A. R.; DOBSON, V. L.; DUSINSKÁ, M.; KENNEDY, G.; STĚTINA, R. The comet assay: what can it really tell us? **Mutation Research**, v. 375, n. 2, p. 183–93, 29 abr. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9202728>>.
- CORBEL, S.; MOUGIN, C.; BOUAÏCHA, N. Cyanobacterial toxins: modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. **Chemosphere**, v. 96, p. 1–15, fev. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24012139>>.
- CORBI, J. J.; STRIXINO, S. T.; SANTOS, A. Do; DEL GRANDE, M. Diagnóstico ambiental de metais e organoclorados em córregos adjacentes a áreas de cultivo de cana-de-açúcar (Estado de São Paulo, Brasil). **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 61–65, fev. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000100013&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

COSTA, C. L. A.; CHAVES, I. S.; VENTURA-LIMA, J.; FERREIRA, J. L. R.; FERRAZ, L.; DE CARVALHO, L. M.; MONSERRAT, J. M. In vitro evaluation of co-exposure of arsenium and an organic nanomaterial (fullerene, C₆₀) in zebrafish hepatocytes. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 155, n. 2, p. 206–12, mar. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.08.005>>.

CROSSETTI, L.; BICUDO, D.; BICUDO, C.; BINI, L. Phytoplankton biodiversity changes in a shallow tropical reservoir during the hypertrophication process. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4 suppl, p. 1061–1067, nov. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842008000500013&lng=en&tlng=en>.

CROSSETTI, L. O.; BICUDO, M.; CARLOS, E. Adaptations in phytoplankton life strategies to imposed change in a shallow urban tropical eutrophic reservoir, Garças Reservoir, over 8 years. **Hydrobiologia**, v. 614, n. 1, p. 91–105, 28 nov. 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10750-008-9539-1>>.

DEBERDT, G. L. B. **Produção primária e caracterização da comunidade fitoplanctônica no Reservatório de Salto Grande (Americana,SP) em duas épocas do ano**. 1997. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1997.

DEBERDT, G. L. B. **COM ELEVADO GRAU DE TROFIA (RESERVATÓRIO DE SALTO GRANDE - AMERICANA - SP)** Gina Luísa Boemer Deberdt. 2002. Universidade de São Paulo, 2002.

DEMOTT, W. R.; ZHANG, Q.-X.; CARMICHAEL, W. W. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of Daphnia. **Limnol. Oceanogr**, v. 36, n. 7, p. 1346–357, 1991.

DIAS, E.; LOURO, H.; PINTO, M.; SANTOS, T.; ANTUNES, S.; PEREIRA, P.; SILVA, M. J. Genotoxicity of microcystin-LR in in vitro and in vivo experimental models. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 949521, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24955368>>.

DING, W. X.; SHEN, H. M.; ONG, C. N. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 32, n. 3, p. 547–55, set. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10960448>>.

DING, W. X.; SHEN, H. M.; ZHU, H. G.; LEE, B. L.; ONG, C. N. Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China. **Mutation Research**, v.

- 442, n. 2, p. 69–77, 25 jun. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10393275>>.
- DITTMANN, E.; FEWER, D. P.; NEILAN, B. A. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 1, p. 23–43, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23051004>>.
- DOLMAN, A. M.; RÜCKER, J.; PICK, F. R.; FASTNER, J.; ROHRLACK, T.; MISCHKE, U.; WIEDNER, C. Cyanobacteria and cyanotoxins: the influence of nitrogen versus phosphorus. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38757, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22719937>>.
- DOOLEY, K.; ZON, L. I. Zebrafish: a model system for the study of human disease. **Current opinion in genetics & development**, v. 10, n. 3, p. 252–6, jun. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10826982>>.
- DOWLING, K.; MOTHERSILL, C. The further development of rainbow trout primary epithelial cell cultures as a diagnostic tool in ecotoxicology risk assessment. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 53, n. 3–4, p. 279–89, ago. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11408085>>.
- DOWNING, T. G.; PHELAN, R. R.; DOWNING, S. A potential physiological role for cyanotoxins in cyanobacteria of arid environments. **Journal of Arid Environments**, v. 112, n. PB, p. 147–151, jan. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaridenv.2014.02.005>>.
- DOWNING, T. G.; SEMBER, C. S.; GEHRINGER, M. M.; LEUKES, W. Medium N:P ratios and specific growth rate comodule microcystin and protein content in *Microcystis aeruginosa* PCC7806 and *M. aeruginosa* UV027. **Microbial ecology**, v. 49, n. 3, p. 468–73, abr. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16003471>>.
- DREWS, G. The Evolution of Cyanobacteria and Photosynthesis. In: **Bioenergetic Processes of Cyanobacteria**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011. p. 265–284.
- DROBAC, D.; TOKODI, N.; SIMEUNOVIĆ, J.; BALTIĆ, V.; STANIĆ, D.; SVIRČEV, Z. Human exposure to cyanotoxins and their effects on health. **Arhiv za higijenu rada i toksikologiju**, v. 64, n. 2, p. 119–30, jun. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23819940>>.
- EPA. **Cyanobacteria/Cyanotoxins**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/nutrient-policy-data/cyanobacteriacyanotoxins>>. Acesso em: 9 ago. 2017.
- ERIKSSON, J. E.; TOIVOLA, D.; MERILUOTO, J. A.; KARAKI, H.; HAN, Y. G.; HARTSHORNE, D. Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects

inhibition of protein phosphatases. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 173, n. 3, p. 1347–53, 31 dez. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2176489>>.

ESPÍNDOLA, E. L. G. .; PASCHOAL, C. M. R. B. .; TONISSI, F. B. .; MAGALHÃES, R. Avaliação ecotoxicológica de sedimento como instrumento de controle de qualidade da água do reservatório de Salto Grande (Americana, SP). In: SIMPÓSIO DE ECOSSISTEMAS BRASILEIROS., Águas de Lindóia. **Anais... Águas de Lindóia**: 1998.

ESPÍNDOLA, E. L. G.; FARIA, O. B.; LEITE, M. A. Reservatório de Salto Grande: Uma Caracterização Geral do Sistema. In: ESPÍNDOLA, E. L. G.; LEITE, M. A.; DORNFELD, C. B. (Ed.). **Reservatório de Salto Grande (Americana, SP): Caracterização, Impactos e Propostas de Manejo**. São Carlos: RiMa, 2004. p. 1–17.

ESPÍNDOLA, E. L. G.; LEITE, M. A.; DORNFELD, C. B. **Reservatório de Salto Grande (americana, SP): Caracterização, Impactos e Propostas de Manejo**. 1. ed. São Carlos: RiMa, 2004.

ESPÍNDOLA, E. L. G.; ROCHA, O.; RIRTZLER, A. C. Caracterização limnológica do Reservatório de Salto Grande (americana, SP): Uma análise espacial e temporal. In: ESPÍNDOLA, E. L. G.; LEITE, M. A.; DORNFELD, C. B. (Ed.). **Reservatório de Salto Grande (Americana, SP): Caracterização, Impactos e Propostas de Manejo**. 1. ed. São Carlos: RiMa, 2004. p. 37–54.

ESTERHUIZEN-LONDT, M.; VON SCHNEHEN, M.; K?HN, S.; PFLUGMACHER, S. Oxidative stress responses in the animal model, *Daphnia pulex* exposed to a natural bloom extract versus artificial cyanotoxin mixtures. **Aquatic Toxicology**, v. 179, p. 151–157, out. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.09.003>>.

FALCO, P. B. **Distribuição espacial e temporal da comunidade fitoplânctonica e das variáveis ecológicas no reservatório de Salto Grande (Americana-SP) em duas épocas do ano**. 2000. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2000.

FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. **Environmental Health Perspectives**, v. 101 Suppl, n. Suppl 3, p. 101–7, out. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8143599>>.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation research**, v. 392, n. 1–2, p. 11–8, 1 ago. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9269327>>.

FENECH, M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes-a biomarker for DNA damage in human populations. **Mutation Research**, v. 404, n. 1–2, p. 155–65, 3 ago. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9729354>>.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, n. 1–2, p. 81–95, 20 nov. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113469>>.

FENECH, M.; BONASSI, S.; TURNER, J.; LANDO, C.; CEPPI, M.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BIGATTI, M. P.; BOLOGNESI, C.; CAO, J.; DE LUCA, G.; DI GIORGIO, M.; FERGUSON, L. R.; FUCIC, A.; LIMA, O. G.; HADJIDEKOVA, V. V.; HRELIA, P.; JAWORSKA, A.; JOKSIC, G.; KRISHNAJA, A. P.; LEE, T. K.; MARTELLI, A.; MCKAY, M. J.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; MÜLLER, W. U.; ODAGIRI, Y.; ORSIERE, T.; SCARFÌ, M. R.; SILVA, M. J.; SOFUNI, T.; SURALLES, J.; TRENTA, G.; VOROBTSOVA, I.; VRAL, A.; ZIJNO, A. Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes: Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 534, n. 1–2, p. 45–64, 2003a.

FENECH, M.; CHANG, W. P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; HUMAN MICRONNUCLEUS PROJECT. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 534, n. 1–2, p. 65–75, 10 jan. 2003b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12504755>>.

FENECH, M.; CROTT, J. W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 504, n. 1–2, p. 131–6, 25 jul. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12106653>>.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALLES, J.; CROTT, J. W.; PARRY, J.; NORPPA, H.; EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D.; THOMAS, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125–32, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21164193>>.

- FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252–259, jul. 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048357506001945>>.
- FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent-- Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 6, p. 1680–6, set. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19419762>>.
- FERRÃO-FILHO, A. D. S.; KOZLOWSKY-SUZUKI, B. Cyanotoxins: bioaccumulation and effects on aquatic animals. **Marine Drugs**, v. 9, n. 12, p. 2729–72, dez. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22363248>>.
- FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99–112, 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3988545>>.
- FREITAS, A. S.; FONTES CUNHA, I. M.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; TECHIO, V. H. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 124, p. 426–434, fev. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.11.017>>.
- FREITAS, E. C.; PINHEIRO, C.; ROCHA, O.; LOUREIRO, S. Can mixtures of cyanotoxins represent a risk to the zooplankton? The case study of *Daphnia magna* Straus exposed to hepatotoxic and neurotoxic cyanobacterial extracts. **Harmful Algae**, v. 31, p. 143–152, jan. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2013.11.004>>.
- FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation research**, v. 681, n. 1, p. 80–92, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18439870>>.
- GANDHI, V. P.; KUMAR, A. Isolation and Characterization of Microcystin Degrading Bacteria from Holy Ponds in India. **International Journal of Applied Sciences and Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 436, 6 jan. 2017. Disponível em: <<http://www.nepjol.info/index.php/IJASBT/article/view/16249>>.
- GARCIA, C. M. T. **Isolamento, cultura e avaliação de toxicidade de estirpes de cianobactérias na lagoa de Mira**. 2001. Faculdade de ciências da universidade de Porto, 2001.
- GAUDIN, J.; HUET, S.; JARRY, G.; FESSARD, V. In vivo DNA damage induced by

- the cyanotoxin microcystin-LR: comparison of intra-peritoneal and oral administrations by use of the comet assay. **Mutation Research**, v. 652, n. 1, p. 65–71, 29 mar. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18282792>>.
- GEHRINGER, M. M. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. **FEBS letters**, v. 557, n. 1–3, p. 1–8, 16 jan. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14741332>>.
- GHOSH, C.; ZHOU, Y. L.; COLLODI, P. Derivation and characterization of a zebrafish liver cell line. **Cell biology and toxicology**, v. 10, n. 3, p. 167–76, jun. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7994634>>.
- GIOVANNONI, S. J.; TURNER, S.; OLSEN, G. J.; BARNS, S.; LANE, D. J.; PACE, N. R. Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. **Journal of bacteriology**, v. 170, n. 8, p. 3584–92, ago. 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3136142>>.
- GOUJON, E.; STA, C.; TRIVELLA, A.; GOUPIL, P.; RICHARD, C.; LEDOIGT, G. Genotoxicity of sulcotrione pesticide and photoproducts on *Allium cepa* root meristem. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 113, n. 1, p. 47–54, jul. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.06.002>>.
- GRÄF, K. J.; KLEINECKE, R. L.; NEUMANN, F. The stimulation of male duct derivatives in female guinea-pig with an antiandrogen, cyproterone acetate. **Journal of reproduction and fertility**, v. 39, n. 2, p. 311–7, ago. 1974. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac902914r>>.
- GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310, n. 2, p. 175–85, 16 out. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7523890>>.
- GRANT, W. F. Higher Plant Assays for the Detection of Genotoxicity in Air Polluted Environments. **Ecosystem Health**, v. 4, n. 4, p. 210–229, dez. 1998. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1526-0992.1998.98097.x>>.
- GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations—a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation Research**, v. 426, n. 2, p. 107–12, 19 maio 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10350580>>.
- HARA, R. V.; MARIN-MORALES, M. A. In vitro and in vivo investigation of the genotoxic potential of waters from rivers under the influence of a petroleum refinery (São Paulo State - Brazil). **Chemosphere**, v. 174, p. 321–330, maio 2017. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28183058>>.

HAVENS, K. E. Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 619, n. 2004, p. 733–47, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18461790>>.

HE, J. .; CHEN, W. .; JIN, L. .; JIN, H. . Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 469, n. 2, p. 223–231, 29 set. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9202728>>.

HE, S. **Cancer and inflammation studies using zebrafish cell lines**. 2010. Universidade de Leiden, 2010.

HOOSER, S. B.; BEASLEY, V. R.; WAITE, L. L.; KUHLENSCHMIDT, M. S.; CARMICHAEL, W. W.; HASCHEK, W. M. Actin filament alterations in rat hepatocytes induced in vivo and in vitro by microcystin-LR, a hepatotoxin from the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. **Veterinary pathology**, v. 28, n. 4, p. 259–66, jul. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1949504>>.

HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 8, p. 2090–5, nov. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19647317>>.

HUANG, X.; CHEN, L.; LIU, W.; QIAO, Q.; WU, K.; WEN, J.; HUANG, C.; TANG, R.; ZHANG, X. Involvement of oxidative stress and cytoskeletal disruption in microcystin-induced apoptosis in CIK cells. **Aquatic Toxicology**, v. 165, p. 41–50, ago. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.05.009>>.

IKEHARA, T.; NAKASHIMA, J.; NAKASHIMA, S.; YASUMOTO, T. Different responses of primary normal human hepatocytes and human hepatoma cells toward cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR. **Toxicon**, v. 105, p. 4–9, out. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.08.025>>.

IMANIKIA, S.; GALEA, F.; NAGY, E.; PHILLIPS, D. H.; STÜRZENBAUM, S. R.; ARLT, V. M. The application of the comet assay to assess the genotoxicity of environmental pollutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 356–61, jul. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2016.06.020>>.

- IVANOVA, L.; UHLIG, S. A bioassay for the simultaneous measurement of metabolic activity, membrane integrity, and lysosomal activity in cell cultures. **Analytical biochemistry**, v. 379, n. 1, p. 16–9, 1 ago. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18485274>>.
- JAKUBOWSKA, N.; SZELĄG-WASIELEWSKA, E. Toxic Picoplanktonic Cyanobacteria—Review. **Marine Drugs**, v. 13, n. 3, p. 1497–1518, 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-3397/13/3/1497/>>.
- JANG, M.-H.; HA, K.; JUNG, J.-M.; LEE, Y.-J.; TAKAMURA, N. Increased microcystin production of *Microcystis aeruginosa* by indirect exposure of nontoxic cyanobacteria: potential role in the development of *Microcystis* bloom. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 76, n. 6, p. 957–62, jun. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16855901>>.
- KE, X.; WANG, C.; ZHANG, H.; ZHANG, Y.; GUI, S. Characterization of estrogenic receptor agonists and evaluation of estrogenic activity in the sediments of Liaohe River protected areas. **Marine Pollution Bulletin**, v. 100, n. 1, p. 176–181, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.09.008>>.
- KIRSCH-VOLDERS, M.; FENECH, M. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. **Mutagenesis**, v. 16, n. 1, p. 51–8, jan. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11139598>>.
- KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE, M.; KIRCHNER, S.; LORGE, E.; MORITA, T.; NORPPA, H.; SURRALLÉS, J.; VANHAUWAERT, A.; WAKATA, A. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutation Research**, v. 540, n. 2, p. 153–63, 7 out. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14550499>>.
- KNASMÜLLER, S.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; KEVEKORDES, S.; DARROUDI, F.; HUBER, W. W.; HOELZL, C.; BICHLER, J.; MAJER, B. J. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. **Toxicology**, v. 198, n. 1–3, p. 315–28, 20 maio 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15138058>>.
- KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.;

LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A. T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research**, v. 402, n. 1–2, p. 185–202, 18 jun. 1998. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C4SC01255K%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.05.007%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611086%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.01.008%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23519281%5Cnhttp://linkinghub.els>>.

KROLL, A.; PILLUKAT, M. H.; HAHN, D.; SCHNEKENBURGER, J. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 72, n. 2, p. 370–7, jun. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.08.009>>.

KURMAYER, R.; CHRISTIANSEN, G. The Genetic Basis of Toxin Production in Cyanobacteria. **Freshwater Reviews**, v. 2, n. 1, p. 31–50, jun. 2009. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1608/FRJ-2.1.2>>.

LAKSHMANA RAO, P. V.; BHATTACHARYA, R.; PARIDA, M. M.; JANA, A. M.; BHASKAR, A. S. Freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UTEX 2385) induced DNA damage in vivo and in vitro. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 1–6, jan. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21781844>>.

LAMMERDING, J.; WOLF, K. Nuclear envelope rupture: Actin fibers are putting the squeeze on the nucleus. **The Journal of Cell Biology**, v. 215, n. 1, p. 5–8, 10 out. 2016. Disponível em: <<http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201609102>>.

LANKOFF, A.; BANASIK, A.; OBE, G.; DEPERAS, M.; KUZMINSKI, K.; TARCZYNSKA, M.; JURCZAK, T.; WOJCIK, A. Effect of microcystin-LR and cyanobacterial extract from Polish reservoir of drinking water on cell cycle progression, mitotic spindle, and apoptosis in CHO-K1 cells. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 189, n. 3, p. 204–13, 15 jun. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12791305>>.

LANKOFF, A.; BIALCZYK, J.; DZIGA, D.; CARMICHAEL, W. W.; LISOWSKA, H.; WOJCIK, A. Inhibition of nucleotide excision repair (NER) by microcystin-LR in CHO-K1 cells. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 48, n. 8, p. 957–65, 15 dez. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16989880>>.

- LANKOFF, A.; KRZOWSKI, Ł.; GŁAB, J.; BANASIK, A.; LISOWSKA, H.; KUSZEWSKI, T.; GÓŹDŹ, S.; WÓJCIK, A. DNA damage and repair in human peripheral blood lymphocytes following treatment with microcystin-LR. **Mutation Research**, v. 559, n. 1–2, p. 131–42, 11 abr. 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383571804000105>>.
- LAUGHINGHOUSE, H. D.; PRÁ, D.; SILVA-STENICO, M. E.; RIEGER, A.; FRESCURA, V. D.-S.; FIORE, M. F.; TEDESCO, S. B. Biomonitoring genotoxicity and cytotoxicity of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, cyanobacteria) using the *Allium cepa* test. **The Science of the total environment**, v. 432, p. 180–8, 15 ago. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.093>>.
- LEEMAN, W. R.; KRUL, L.; HOUBEN, G. F. Complex mixtures: relevance of combined exposure to substances at low dose levels. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 58, p. 141–8, ago. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.03.050>>.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water--a case study. **Mutation research**, v. 650, n. 1, p. 80–6, 31 jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18068420>>.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71–81, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19577002>>.
- LIAO, W.; MCNUTT, M. A.; ZHU, W.-G. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 48, n. 1, p. 46–53, maio 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202309000383>>.
- LIU, J.; SUN, Y. The role of PP2A-associated proteins and signal pathways in microcystin-LR toxicity. **Toxicology letters**, v. 236, n. 1, p. 1–7, 2 jul. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.04.010>>.
- LIU, J.; WANG, B.; HUANG, P.; WANG, H.; XU, K.; WANG, X.; XU, L.; GUO, Z. Microcystin-LR promotes cell proliferation in the mice liver by activating Akt and p38/ERK/JNK cascades. **Chemosphere**, v. 163, p. 14–21, nov. 2016a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.002>>.
- LIU, J.; WANG, H.; WANG, B.; CHEN, T.; WANG, X.; HUANG, P.; XU, L.; GUO, Z.

Microcystin-LR promotes proliferation by activating Akt/S6K1 pathway and disordering apoptosis and cell cycle associated proteins phosphorylation in HL7702 cells. **Toxicology letters**, v. 240, n. 1, p. 214–25, 5 jan. 2016b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.10.015>>.

LONE, Y.; KOIRI, R. K.; Bhide, M. An overview of the toxic effect of potential human carcinogen Microcystin-LR on testis. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 289–296, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214750015000104>>.

LOPES, I. C. **Estudo Eletroquímico e Eletroanalítico da Microcistina-LR e Avaliação in situ da sua Interação com DNA**. 2011. Universidade Federal da Paraíba, 2011.

MA, J.; FENG, Y.; LIU, Y.; LI, X. PUMA and survivin are involved in the apoptosis of HepG2 cells induced by microcystin-LR via mitochondria-mediated pathway. **Chemosphere**, v. 157, p. 241–9, ago. 2016a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.051>>.

MA, J.; QIN, B.; PAERL, H. W.; BROOKES, J. D.; HALL, N. S.; SHI, K.; ZHOU, Y.; GUO, J.; LI, Z.; XU, H.; WU, T.; LONG, S. The persistence of cyanobacterial (*Microcystis* spp.) blooms throughout winter in Lake Taihu, China. **Limnology and Oceanography**, v. 61, n. 2, p. 711–722, mar. 2016b. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/lno.10246>>.

MA, T. H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONNELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, G. A.; ZHANG, H. The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, n. 2, p. 185–95, abr. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7885371>>.

MACHADO, L. dos S. **Variação espacial e temporal da comunidade fitoplanctônica no reservatório de Guarapiranga - SP**. 2016. Universidade Estadual Paulista, 2016. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/142003>>.

MANKIEWICZ, J.; WALTER, Z.; TARCZYNSKA, M.; PALYVODA, O.; WOJTYSIAK-STANIASZCZYK, M.; ZALEWSKI, M. Genotoxicity of cyanobacterial extracts containing microcystins from Polish water reservoirs as determined by SOS chromotest and comet assay. **Environmental Toxicology**, v. 17, n. 4, p. 341–50, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12203955>>.

MANZANO, B. C.; ROBERTO, M. M.; HOSHINA, M. M.; MENEGÁRIO, A. A.; MARIN-MORALES, M. A. Evaluation of the genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of São Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells. **Environmental science and pollution research**

- international**, v. 22, n. 2, p. 1399–407, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25146123>>.
- MARTINS, M.; COSTA, P. M. The comet assay in Environmental Risk Assessment of marine pollutants: applications, assets and handicaps of surveying genotoxicity in non-model organisms. **Mutagenesis**, v. 30, n. 1, p. 89–106, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25527732>>.
- MÁTHÉ, C.; M-HAMVAS, M.; VASAS, G. Microcystin-LR and cylindrospermopsin induced alterations in chromatin organization of plant cells. **Marine drugs**, v. 11, n. 10, p. 3689–717, 30 set. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24084787>>.
- MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 148–158, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572006000100028&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.
- MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v. 85, n. 1, p. 13–8, set. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21741065>>.
- MÉJEAN, A.; PLOUX, O. A Genomic View of Secondary Metabolite Production in Cyanobacteria. In: **Advances in botanical research**. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 189–234.
- MELLO, M. L. .; VIDAL, B. C. A reação de Feulgen. **Ciência e Cultura**, v. 30, n. 6, p. 665–676, 1978.
- MEREL, S.; WALKER, D.; CHICANA, R.; SNYDER, S.; BAURÈS, E.; THOMAS, O. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. **Environment international**, v. 59, p. 303–27, set. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.013>>.
- MILUTINOVIC, A.; SEDMAK, B.; HORVAT-ZNIDARSIC, I.; SUPUT, D. Renal injuries induced by chronic intoxication with microcystins. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 7, n. 1, p. 139–141, 2002.
- MILUTINOVIĆ, A.; ZIVIN, M.; ZORC-PLESKOVIĆ, R.; SEDMAK, B.; SUPUT, D. Nephrotoxic effects of chronic administration of microcystins -LR and -YR. **Toxicon** :

- official journal of the International Society on Toxinology**, v. 42, n. 3, p. 281–8, set. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14559079>>.
- MINOTI, R. **Variação anual da produção primária e estrutura da comunidade fitoplânctônica no reservatório de Salto Grande (Americana-SP)**. 1999. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1999.
- MIRANDA, C.; COLLODI, P.; ZHAO, X. **Regulation of Cytochrome P450 Expression in a Novel Liver Cell Line from Zebrafish (Brachydanio rerio)** *Archives of biochemistry* ..., 1993. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986183714293>>.
- MOHAMED, Z. Harmful cyanobacteria and their cyanotoxins in Egyptian fresh waters – state of knowledge and research needs. *African Journal of Aquatic Science*, v. 41, n. 4, p. 361–368, dez. 2016.
- MOHAMMED, K. P.; AAREY, A.; TAMKEEN, S.; JAHAN, P. Forskolín: genotoxicity assessment in *Allium cepa*. *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis*, v. 777, n. 1, p. 29–32, 1 jan. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.11.005>>.
- MOLICA, R.; AZEVEDO, S. Ecofisiologia De Cianobactérias Produtoras De Cianotoxinas. *Oecologia Australis*, v. 13, n. 2, p. 229–246, 2009. Disponível em: <<http://www.oecologiaaustralis.org/ojs/index.php/oa/article/view/oeco.2009.1302.02/72>>.
- MONTGOMERY, B. L. Seeing new light: recent insights into the occurrence and regulation of chromatic acclimation in cyanobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 37, p. 18–23, jun. 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369526616302291>>.
- MOWE, M. A. D.; MITROVIC, S. M.; LIM, R. P.; FUREY, A.; YEO, D. C. J. Tropical cyanobacterial blooms: a review of prevalence, problem taxa, toxins and influencing environmental factors. *Journal of Limnology*, v. 73, n. AoP, p. 205–224, 30 dez. 2014. Disponível em: <<http://jlimnol.it/index.php/jlimnol/article/view/jlimnol.2014.1005>>.
- NASCIMENTO, P. B.; LUIZ, J.; MUCCI, N.; PAULO, S. Cianobactérias como indicadoras de poluição nos mananciais abastecedores do Sistema Cantareira. 2010.
- NERSESYAN, A.; FENECH, M.; BOLOGNESI, C.; MIŠÍK, M.; SETAYESH, T.; WULTSCH, G.; BONASSI, S.; THOMAS, P.; KNASMÜLLER, S. Use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay in occupational biomonitoring of genome damage caused by in vivo exposure to chemical genotoxins: Past, present and

- future. **Mutation research**, v. 770, n. Pt A, p. 1–11, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27894679>>.
- NIAMIEN-EBROTTIE, J. E.; BHATTACHARYYA, S.; DEEP, P. R.; NAYAK, B. Cyanobacteria and cyanotoxins in the World: Review. **International Journal of Applied Research**, v. 1, n. 48, p. 563–569, 2015. Disponível em: <www.allresearchjournal.com>.
- NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R.; OHTA, T.; NISHIWAKI, S.; SUGANUMA, M.; KOHYAMA, K.; ISHIKAWA, T.; CARMICHAEL, W. W.; FUJIKI, H. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 118, n. 6, p. 420–4, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1618889>>.
- O'BRIAN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue(resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5421–5426, 2000.
- O'NEIL, J. M.; DAVIS, T. W.; BURFORD, M. A.; GOBLER, C. J. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. **Harmful Algae**, v. 14, n. 12, p. 313–334, fev. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.027>>.
- OBERHOLSTER, P.; BOTHA, A.; GROBBELAAR, J. Microcystis aeruginosa: source of toxic microcystins in drinking water. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 159–168, 2004. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/AJB>>.
- OHTA, T.; NISHIWAKI, R.; YATSUNAMI, J.; KOMORI, A.; SUGANUMA, M.; FUJIKI, H. Hyperphosphorylation of cytokeratins 8 and 18 by microcystin-LR, a new liver tumor promoter, in primary cultured rat hepatocytes. **Carcinogenesis**, v. 13, n. 12, p. 2443–2447, 1992. Disponível em: <<https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/13.12.2443>>.
- OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nature protocols**, v. 1, n. 1, p. 23–9, 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2006.5>>.
- OLIVER, L. R.; GANF, G. G. Freshwater Blooms. In: WHITTON, B. A.; POTTS, M. (Ed.). **The ecology of Cyanobacteria. The diversity in time and space**. [s.l.] Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 149–194.
- OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 123, n. 1, p. 291–8, 30 ago. 1984. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6477583>>.

OZAKCA, D. U.; SILAH, H. Genotoxicity effects of Flusilazole on the somatic cells of *Allium cepa*. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 107, n. 1, p. 38–43, set. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.05.001>>.

PADISAK, J.; REYNOLDS, C. S. Selection of phytoplankton associations in Lake Balaton, Hungary, in response to eutrophication and restoration measures, with special reference to the cyanoprokaryotes. **Hydrobiologia**, v. 384, n. 1/3, p. 41–53, 1998. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/A:1003255529403>>.

PAERL, H. W.; OTTEN, T. G. Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. **Microbial ecology**, v. 65, n. 4, p. 995–1010, maio 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23314096>>.

PALMIERI, M. J. **LACTUCA SATIVA: BIOINDICADOR PARA ANÁLISE DO EFEITO GENOTÓXICO DE PEÇONHAS**. 2016. Universidade Federal de Lavras, 2016.

PANTELIĆ, D.; SVIRČEV, Z.; SIMEUNOVIĆ, J.; VIDOVIĆ, M.; TRAJKOVIĆ, I. Cyanotoxins: Characteristics, production and degradation routes in drinking water treatment with reference to the situation in Serbia. **Chemosphere**, v. 91, n. 4, p. 421–441, abr. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653513000507>>.

PAVLICA, M.; KLOBUCAR, G. I.; MOJAS, N.; ERBEN, R.; PAPES, D. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. **Mutation Research**, v. 490, n. 2, p. 209–14, 20 fev. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11342246>>.

PEARSON, L.; MIHALI, T.; MOFFITT, M.; KELLMANN, R.; NEILAN, B. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. **Marine drugs**, v. 8, n. 5, p. 1650–80, 10 maio 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20559491>>.

PEUTHERT, A.; CHAKRABARTI, S.; PFLUGMACHER, S. Uptake of microcystins-LR and -LF (cyanobacterial toxins) in seedlings of several important agricultural plant species and the correlation with cellular damage (lipid peroxidation). **Environmental toxicology**, v. 22, n. 4, p. 436–42, ago. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17607734>>.

PFLUGMACHER, S. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. **Environmental toxicology**, v. 17, n. 4, p. 407–

- 13, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12203964>>.
- QIAO, Q.; LE MANACH, S.; HUET, H.; DUVERNOIS-BERTHET, E.; CHAOUCH, S.; DUVAL, C.; SOTTON, B.; PONGER, L.; MARIE, A.; MATHÉRON, L.; LENNON, S.; BOLBACH, G.; DJEDIAT, C.; BERNARD, C.; EDERY, M.; MARIE, B. An integrated omic analysis of hepatic alteration in medaka fish chronically exposed to cyanotoxins with possible mechanisms of reproductive toxicity. **Environmental Pollution**, v. 219, p. 119–131, dez. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749116306972>>.
- RABELLO-GAY, N.; RODRIGUES, M. A.; MONTELEONE-NETO, R. Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: métodos e critérios de avaliação. **Revista Brasileira de genética**, p. 83–90, 1991.
- RADIĆ, S.; STIPANICEV, D.; VUJCIĆ, V.; RAJCIĆ, M. M.; SIRAC, S.; PEVALEK-KOZLINA, B. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. **The Science of the total environment**, v. 408, n. 5, p. 1228–33, 1 fev. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20018345>>.
- RANK, J.; NIELSEN, M. H. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research**, v. 312, n. 1, p. 17–24, fev. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7507212>>.
- RANK, J.; NIELSEN, M. H. A Modified *Allium* Test as a Tool in the Screening of the Genotoxicity of Complex Mixtures. **Hereditas**, v. 118, n. 1, p. 49–53, 28 maio 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1601-5223.1993.t01-3-00049.x>>.
- RAO, P. V.; BHATTACHARYA, R. The cyanobacterial toxin microcystin-LR induced DNA damage in mouse liver in vivo. **Toxicology**, v. 114, n. 1, p. 29–36, 15 nov. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8931758>>.
- RAVEN, J. A.; GIORDANO, M.; BEARDALL, J.; MABERLY, S. C. Algal evolution in relation to atmospheric CO₂: carboxylases, carbon-concentrating mechanisms and carbon oxidation cycles. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 367, n. 1588, p. 493–507, 19 fev. 2012. Disponível em: <<http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2011.0212>>.
- REICHWALDT, E. S.; GHADOUANI, A. Effects of rainfall patterns on toxic cyanobacterial blooms in a changing climate: between simplistic scenarios and complex dynamics. **Water research**, v. 46, n. 5, p. 1372–93, 1 abr. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.052>>.
- REIS, G. B. dos; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; MORAES, I. de C.; CÉSAR, P. H. S.;

- MARCUSSI, S.; DAVIDE, L. C. Reliability of plant root comet assay in comparison with human leukocyte comet assay for assessment environmental genotoxic agents. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 142, n. October 2016, p. 110–116, ago. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.004>>.
- REPAVICH, W.; SONZOGNI, W.; STANDRIDGE, J.; WEDEPOHL, R.; MEISNER, L. Cyanobacteria (blue-green algae) in wisconsin waters: acute and chronic toxicity. **Water Research**, v. 24, n. 2, p. 225–231, fev. 1990. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/004313549090107H>>.
- REYNOLDS, C. S. Cyanobacterial water-blooms. In: CALLOW, J. (Ed.). **Advances in botanical research**. London: Academic Press, 1987. p. 67–143.
- REYNOLDS, C. S. Ecology of Phytoplankton. **Cambridge University Press.**, p. 535, 2006.
- RIBEIRO, H. Saúde Pública e meio ambiente: evolução do conhecimento e da prática, alguns aspectos éticos. **Saúde e Sociedade**, v. 13, n. 1, p. 70–80, abr. 2004. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/sausoc/article/view/7109%5Cnhttp://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-12902004000100008&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>.
- RIBEIRO, P. C. **Análise de fatores que influenciam a proliferação de cianobactérias e algas em lagoas de estabilização**. 2007. Universidade Federal de Campina Grande, 2007.
- RIETZLER, A. C.; BOTTA, C. R.; RIBEIRO, M. M.; ROCHA, O.; FONSECA, A. L. Accelerated eutrophication and toxicity in tropical reservoir water and sediments: an ecotoxicological approach. **Environmental Science and Pollution Research**, 19 out. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11356-016-7719-5>>.
- ROBERTO, M. M.; JAMAL, C. M.; MALASPINA, O.; MARIN-MORALES, M. A. Antigenotoxicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of Brazilian green propolis and its main botanical source determined by the *Allium cepa* test system. **Genetics and molecular biology**, v. 39, n. 2, p. 257–69, 24 maio 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27223486>>.
- ROCHA, P. S.; BERNECKER, C.; STRECKER, R.; MARIANI, C. F.; POMPÊO, M. L. M.; STORCH, V.; HOLLERT, H.; BRAUNBECK, T. Sediment-contact fish embryo toxicity assay with *Danio rerio* to assess particle-bound pollutants in the Tietê River Basin (São Paulo, Brazil). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, n. 7, p. 1951–9, out. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21802730>>.

- ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, Á. S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317–320, 27 jun. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21523412>>.
- RUSSEL, P. . Chromosomal Mutation. In: CUMMINGS, B. (Ed.). **Genetics**. São Francisco: Pearson Education Inc, 2002. p. 595–621.
- RYDBERG, B.; JOHANSON, K. . **Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells**. New York: Academic Press, 1978.
- SÁ, L. L. C. de; VIEIRA, J. M. dos S.; MENDES, R. de A.; PINHEIRO, S. C. C.; VALE, E. R.; ALVES, F. A. dos S.; JESUS, I. M. de; SANTOS, E. C. de O.; COSTA, V. B. da. Ocorrência de uma floração de cianobactérias tóxicas na margem direita do Rio Tapajós, no Município de Santarém (Pará, Brasil). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 1, p. 109–124, mar. 2010. Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232010000100023&lng=pt&nrm=iso&tlng=es>.
- SAITO, T.; OKANO, K.; PARK, H.-D.; ITAYAMA, T.; INAMORI, Y.; NEILAN, B. A.; BURNS, B. P.; SUGIURA, N. Detection and sequencing of the microcystin LR-degrading gene, *mlrA*, from new bacteria isolated from Japanese lakes. **FEMS microbiology letters**, v. 229, n. 2, p. 271–6, 12 dez. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14680710>>.
- SANDRINI, G.; JI, X.; VERSPAGEN, J. M. H.; TANN, R. P.; SLOT, P. C.; LUIJSTRA, V. M.; SCHUURMANS, J. M.; MATTHIJS, H. C. P.; HUISMAN, J. Rapid adaptation of harmful cyanobacteria to rising CO₂. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 33, p. 9315–20, 16 ago. 2016. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1602435113>>.
- SANDRINI, J. Z.; BIANCHINI, A.; TRINDADE, G. S.; NERY, L. E. M.; MARINS, L. F. F. Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 95, n. 4, p. 285–91, 13 dez. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19328561>>.
- SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. de P.; WERNER, V. R.; DOGO, C. R.; RIOS, F. R.; DE CARVALHO, L. R. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. **Algological Studies**, v. 126, n. 1, p. 251–265, 1 abr. 2008. Disponível em:

<<http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1864-1318&volume=126&issue=1&spage=251>>.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P.; AGUJARO, L. F.; CARVALHO, L. R.; SOUZA, R. C. R. **Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras**. São Paulo: Interciência; São Paulo: Sociedade Brasileira de Ficologia, 2006.

SEOK, S.-H.; BAEK, M.-W.; LEE, H.-Y.; KIM, D.-J.; NA, Y.-R.; NOH, K.-J.; PARK, S.-H.; LEE, H.-K.; LEE, B.-H.; RYU, D.-Y.; PARK, J.-H. Arsenite-induced apoptosis is prevented by antioxidants in zebrafish liver cell line. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 21, n. 5, p. 870–7, ago. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17416483>>.

SERGEEV, V. N.; GERASIMENKO, L. M.; ZAVARZIN, G. A. [Proterozoic history and present state of cyanobacteria]. **Mikrobiologiya**, v. 71, n. 6, p. 725–40, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12526193>>.

SHAMINA, N. V.; SILKOVA, O. G.; SERIUKOVA, E. G. Monopolar spindles in meiosis of intergeneric cereal hybrids. **Cell biology international**, v. 27, n. 8, p. 657–64, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12867157>>.

SIEROSLAWSKA, A. Assessment of the mutagenic potential of cyanobacterial extracts and pure cyanotoxins. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxicology**, v. 74, p. 76–82, nov. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.07.029>>.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, v. 175, n. 1, p. 184–91, mar. 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3345800>>.

SINHA, R.; PEARSON, L. A.; DAVIS, T. W.; BURFORD, M. A.; ORR, P. T.; NEILAN, B. A. Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones--is climate change responsible? **Water research**, v. 46, n. 5, p. 1408–19, 1 abr. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2011.12.019>>.

SOUZA, R. C. . Introdução. In: SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P.; AGUJARO, L. F.; CARVALHO, L. R.; SOUZA, R. C. R. (Ed.). **Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras**. São Paulo: Interciência; São Paulo: Sociedade Brasileira de Ficologia, 2006. p. 1–4.

- SOUZA, T. S.; FONTANETTI, C. S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research**, v. 605, n. 1–2, p. 87–93, 16 jun. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16678473>>.
- SOUZA, T. S.; HENCKLEIN, F. A.; DE FRANCESCHI DE ANGELIS, D.; FONTANETTI, C. S. Clastogenicity of landfarming soil treated with sugar cane vinasse. **Environmental monitoring and assessment**, v. 185, n. 2, p. 1627–36, fev. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22580848>>.
- SPEIT, G. Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. **Toxicology Letters**, v. 88, n. 1–3, p. 91–98, nov. 1996. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037842749603723X>>.
- SPEIT, G.; VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. **Mutation Research**, v. 681, n. 1, p. 3–12, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18462987>>.
- STANIER, R. Y.; DERUELLES, J.; RIPPKA, R.; HERDMAN, M.; WATERBURY, J. B. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1–61, 1 mar. 1979. Disponível em: <<http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-111-1-1>>.
- ŠTRASER, A.; FILIPIČ, M.; GORENC, I.; ŽEGURA, B. The influence of cylindrospermopsin on oxidative DNA damage and apoptosis induction in HepG2 cells. **Chemosphere**, v. 92, n. 1, 2013.
- SUN, Y.; ZHENG, Q.; SUN, Y.-T.; HUANG, P.; GUO, Z.-L.; XU, L.-H. Microcystin-LR induces protein phosphatase 2A alteration in a human liver cell line. **Environmental toxicology**, v. 29, n. 11, p. 1236–44, nov. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18767141>>.
- TOIVOLA, D. M.; ERIKSSON, J. E. Toxins affecting cell signalling and alteration of cytoskeletal structure. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 13, n. 4–5, p. 521–30, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20654510>>.
- TONELINE, M. T.; FILHO, J. B.; RODRIGUEIRO, D. A.; FERREIRA, N. FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E OUTRAS ALTERAÇÕES NUCLEARES EM PACIENTES PORTADORES DE DIABETES MELLITUS. **Revista Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba**, v. 16, n. 2, p. 80–85, 2014.

TROUT-HANEY, J.; WOOD, Z.; COTTINGHAM, K. Presence of the Cyanotoxin Microcystin in Arctic Lakes of Southwestern Greenland. **Toxins**, v. 8, n. 9, p. 256, 31 ago. 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6651/8/9/256>>.

TUCCI, A.; DEBERDT, G. L. B.; DEBERDT, A. J. Análise da comunidade de Fitoplâncton do Reservatório de Salto Grande (Americana, SP): Uma revisão dos estudos desenvolvidos em um sistema eutrófico. In: ESPÍNDOLA, E. L. G.; LEITE, M. A.; DORNFELD, C. B. (Ed.). **Reservatório de Salto Grande (Americana, SP): Caracterização, Impactos e Propostas de Manejo**. 1. ed. São Carlos: RiMa, 2004. p. 107–153.

UENO, Y.; NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; HASEGAWA, A.; WATANABE, M. F.; PARK, H. D.; CHEN, G. C.; CHEN, G.; YU, S. Z. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 6, p. 1317–21, jun. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8681449>>.

UHL, M.; HELMA, C.; KNASMÜLLER, S. Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (Hep G2) cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 441, n. 2, p. 215–224, 20 maio 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12694748>>.

VALENTIN-SEVERIN, I.; LE HEGARAT, L.; LHUGUENOT, J. C.; LE BON, A. M.; CHAGNON, M. C. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: Comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 536, n. 1–2, p. 79–90, 2003.

VAN APELDOORN, M. E.; VAN EGMOND, H. P.; SPEIJERS, G. J. A.; BAKKER, G. J. I. Toxins of cyanobacteria. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, n. 1, p. 7–60, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17195276>>.

VLCEK, V.; POHANKA, M. Toxicity of cyanobacterial secondary metabolites. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 59–64, abr. 2015. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00013542-201504000-00004>>.

WAN, G.; CHEUK, W. K.; CHAN, K. M. Differential regulation of zebrafish metallothionein-II (zMT-II) gene transcription in ZFL and SJD cell lines by metal ions. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 91, n. 1, p. 33–43, 18 jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19019466>>.

- WANG, X.; HUANG, P.; LIU, Y.; DU, H.; WANG, X.; WANG, M.; WANG, Y.; HEI, T. K.; WU, L.; XU, A. Role of nitric oxide in the genotoxic response to chronic microcystin-LR exposure in human-hamster hybrid cells. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 29, p. 210–8, 1 mar. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25766030>>.
- WERNER, V. R. **Cyanophyceae/Cyanobacteria no sistema de lagoas e lagunas da planície costeira do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil**. 2002. Instituto de biociências Unesp, 2002.
- WHITTON, B. A. **Ecology of Cyanobacteria II**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012.
- WOOLBRIGHT, B. L.; WILLIAMS, C. D.; NI, H.; KUMER, S. C.; SCHMITT, T.; KANE, B.; JAESCHKE, H. Microcystin-LR induced liver injury in mice and in primary human hepatocytes is caused by oncotic necrosis. **Toxicon**, v. 125, p. 99–109, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.11.254>>.
- WU, J.-Y.; XU, Q.-J.; GAO, G.; SHEN, J.-H. Evaluating genotoxicity associated with microcystin-LR and its risk to source water safety in Meiliang Bay, Taihu Lake. **Environmental Toxicology**, v. 21, n. 3, p. 250–5, jun. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18767141>>.
- ZANCHETT, G.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Cyanobacteria and cyanotoxins: from impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects. **Toxins**, v. 5, n. 10, p. 1896–917, 23 out. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24152991>>.
- ZEGURA, B. An Overview of the Mechanisms of Microcystin-LR Genotoxicity and Potential Carcinogenicity. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 13, p. 1042–62, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26951459>>.
- ZEGURA, B.; GAJSKI, G.; STRASER, A.; GARAJ-VRHOVAC, V.; FILIPIČ, M. Microcystin-LR induced DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. **Mutation Research**, v. 726, n. 2, p. 116–22, 24 dez. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22001196>>.
- ZEGURA, B.; LAH, T. T.; FILIPIČ, M. The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. **Toxicology**, v. 200, n. 1, p. 59–68, 15 jul. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15158564>>.
- ZEGURA, B.; SEDMAK, B.; FILIPIČ, M. Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 41, n. 1, p. 41–8, jan. 2003. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12467660>>.

ZEGURA, B.; STRASER, A.; FILIPIČ, M. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. **Mutation Research**, v. 727, n. 1–2, p. 16–41, 2011.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21277993>>.

ZHANG, G.; ZHANG, Y. C.; NADAGOUDA, M.; HAN, C.; O'SHEA, K.; EL-SHEIKH, S. M.; ISMAIL, A. A.; DIONYSIOU, D. D. Visible light-sensitized S, N and C co-doped polymorphic TiO₂ for photocatalytic destruction of microcystin-LR. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 144, p. 614–621, jan. 2014.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apcatb.2013.07.058>>.

ZHANG, Q.; SONG, Q.; WANG, C.; ZHOU, C.; LU, C.; ZHAO, M. Effects of glufosinate on the growth of and microcystin production by *Microcystis aeruginosa* at environmentally relevant concentrations. **The Science of the total environment**, v. 575, p. 513–518, 1 jan. 2017.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.011>>.

ZHOU, M.; TU, W.; XU, J. Mechanisms of microcystin-LR-induced cytoskeletal disruption in animal cells. **Toxicon : official journal of the International Society on**

Toxinology, v. 101, p. 92–100, jul. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.05.005>>.

ZHOU, Q.; ZHANG, J.; FU, J.; SHI, J.; JIANG, G. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica chimica acta**, v. 606,

n. 2, p. 135–50, 14 jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18082645>>.