



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



---

**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).

RIO CLARO –SP

NOVEMBRO/2017

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

MARIA TEREZA PAMPLONA SILVA

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Marin Morales  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> 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**

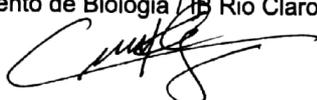
**AUTORA: MARIA TEREZA PAMPLONA SILVA**

**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

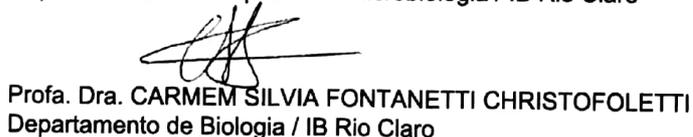


Prof. Dr. CESAR KOPPE GRISOLIA  
Departamento de Genética e Morfologia / Universidade de Brasília

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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Dejanira de Franceschi de Angelis, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvia Tamie Matsumoto e ao Prof<sup>o</sup> 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

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

## **2 Revisão de Literatura**

### **2.1 Histórico**

A história paleontológica das cianobactérias é muito bem documentada, devido ao seu tamanho e localização bem definidas, o que proporcionou boa conservação de cianobactérias fossilizadas (SERGEEV; GERASIMENKO; ZAVARZIN, 2002). Os primeiros fósseis documentados para esse procarionte datam de 3,5 bilhões de anos (MOLICA; AZEVEDO, 2009).

Nos primórdios da terra as cianobactérias se destacaram como primeiro grande grupo de organismos fototróficos, que apresentam a capacidade de oxidar a água para produzir oxigênio molecular. Existem evidências que indicam a transição destes organismos do seu estado inicial anaeróbico para sua condição atual aeróbica (GIOVANNONI et al., 1988). Acredita-se que elas desempenharam papel crucial na evolução das condições da terra, tendo contribuído para a oxigenação inicial da atmosfera terrestre (CARMICHAEL, 1994).

As adaptações evolutivas deste grupo de organismos conferiram a eles vantagem competitiva por apresentarem resistência as intempéries ambientais como variações de temperatura, pH, salinidade e presença de nutrientes, sendo, então, capazes de sobreviverem mesmo quando as condições ambientais se mostravam extremas (REICHWALDT; GHADOUANI, 2012; MOHAMED, 2016).

### **2.2 Cianobactérias**

Os organismos conhecidos como cianobactérias também recebem os nomes de cianofíceas (algas azuis), por realizarem fotossíntese, ou cianoprocariontes, por não possuírem sistemas de endomembranas desenvolvidos, como envoltório nuclear e organelas definidas por membrana, características estas também comumente observada em bactérias (SOUZA, 2006).

As cianobactérias são organismos procariontes fotoautotróficos, que realizam fotossíntese de forma semelhante à realizada nos cloroplastos de plantas e algas, mesmo não possuindo cloroplastos. Estes organismos podem ser unicelulares ou filamentosos e se apresentarem individualizados ou agrupados em colônias (WHITTON, 2012).

As cianobactérias possuem, de maneira geral, a capacidade de crescer e se manter em diferentes meios, embora os ambientes dulcícolas sejam os mais propícios para o seu crescimento e manutenção. As condições ideais para o desenvolvimento desses organismos são as águas neutras a alcalinas, com alta concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo (AZEVEDO, 1998).

Existem cerca de 150 gêneros e aproximadamente 2000 espécies pertencentes à classe das cianobactérias. Acredita-se que mais de 40 gêneros dessas bactérias sejam produtores de toxinas. Dentre o grupo de cianobactérias, destacam-se os gêneros: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria* e *Microcystis* (DEMOTT; ZHANG; CARMICHAEL, 1991; CARMICHAEL, 1992, 2012).

Estes organismos são microscópicos, habitualmente menores que 10  $\mu\text{m}$  de comprimento e diâmetro, podendo apresentar uma variação de tamanho considerável entre as espécies e, ainda, ao longo do crescimento durante as diferentes fases do seu ciclo de vida (BELLINGER; SIGEE, 2010). Uma única colônia de cianobactérias pode conter centenas ou até milhares de células. As florações de cianobactérias são eventos caracterizados pela presença de milhões de colônias em um corpo d'água, que podem estar limitadas à superfície ou migrarem para as partes profundas do corpo d'água, em busca de proteção contra a alta luminosidade (PADISAK; REYNOLDS, 1998; REYNOLDS, 2006; SANT'ANNA et al., 2006).

As cianobactérias são organismos conhecidos como produtores de diferentes tipos de toxinas, que apresentam diversos efeitos tóxicos (hepatotoxicidade, neurotoxicidade citotoxicidade). Desta forma, as florações por cianobactérias podem acarretar em contaminações que levam a uma variedade de problemas ecológicos como também de risco para a saúde humana (CARMICHAEL, 1992; PEUTHERT; CHAKRABARTI; PFLUGMACHER, 2007).

### 2.2.1 Florações de cianobactérias

As florações de cianobactérias podem ocorrer de várias formas, dependendo das interações estabelecidas entre as cianobactérias e o ambiente. Esta interação é marcada, principalmente, por fatores como luminosidade, temperatura e disponibilidade de nutrientes, que podem, inclusive, ser responsáveis pela determinação das espécies dominantes dos locais das florações (REYNOLDS, 1987; OLIVER; GANF, 2000).

O aumento de florações nos ambientes aquáticos está muito ligado à ação humana, principalmente aos descartes de esgotos domésticos (CROSSETTI; BICUDO; CARLOS, 2008), efluentes industriais (CROSSETTI et al., 2008) e de químicos aplicados na agropecuária. Isso porque essas atividades humanas conferem um aporte químico excessivo ao manancial receptor, que leva ao decréscimo da qualidade das suas águas. No caso de floração em rios, lagos e reservatórios utilizados para abastecimento, os efeitos podem ser negativos tanto para o ambiente como para os seres vivos associados ao local contaminado (SÁ et al., 2010).

A floração que ganhou mais destaque no Brasil ocorreu em Caruaru – PE no ano de 1996, quando um centro médico utilizou água contaminada por cianotoxinas em seus pacientes de hemodiálise, incorrendo em 123 pacientes com intoxicação hepática, dentre os quais 60 vieram a óbito (AZEVEDO, 1998). Esse fato serviu de alerta para os perigos deste tipo de contaminação, o que levou a exigência, pela legislação brasileira, de um monitoramento mais efetivo nas contaminações por cianobactérias.

## **2.2.2 Florações de cianobactéria no reservatório de Salto Grande, Americana-SP**

Os reservatórios, em geral, são ambientes dominados por comunidades fitoplanctônicas que, em ecossistemas aquáticos tropicais, apresentam grande variedade de espécies que estão vinculadas às próprias características do clima, como, por exemplo a temperatura, a dinâmica de circulação da água e o pH (BICUDO; BICUDO, 2004; TUCCI; DEBERDT; DEBERDT, 2004; CROSSETTI; BICUDO; CARLOS, 2008)

O reservatório de Salto Grande fica localizado no município de Americana-SP e está inserido na sub-bacia do rio Atibaia, que faz parte da bacia do rio Piracicaba (ESPÍNDOLA; FARIA; LEITE, 2004). A represa foi construída entre 1940 e 1949, com início de operação em 1950 (DEBERDT, 1997). Esse reservatório possui um histórico de florações de cianobactérias desde 1969. As espécies aquáticas de cianobactérias fazem parte dos chamados fitoplânctons, que é uma comunidade de diversos micro-organismos fotossintetizantes, que incluem também as algas. Minoti (1999) monitorou as comunidades fitoplanctônicas no período de ago/95 a jul/96 e verificou que 60,7% das espécies deste estrato aquático eram de cianobactérias. Falco (2000) observou que entre os 15 taxons mais abundantes do reservatório, no período de Jun/97 e jun/98, destacava-se o grupo das *Microcystis* (92%), sendo que a frequência média de *Microcystis aeruginosa* foi de 74%.

A presença constante das cianobactérias em um ambiente pode facilitar a reincidência de florações, porque os compostos tóxicos produzidos por estes microrganismos podem reduzir a diversidade de espécies do local, o que acaba por facilitar a proliferação de novas florações (RIBEIRO, 2007). Outro fator que pode também facilitar o reaparecimento de florações é a própria característica ambiental. Geralmente os ambientes acometidos de aumento considerável da biomassa apresentam características como estações mais secas e quentes e frequência de descartes ricos em nutrientes, onde estes organismos encontram o ambiente perfeito para se desenvolverem e, assim, formar grandes florações tóxicas (ESPÍNDOLA; LEITE; DORNFELD, 2004).

### 2.3 Cianotoxinas

Inúmeras cianobactérias são capazes de produzir metabólitos que agem como toxinas no meio aquático. Essas toxinas podem agir em vários níveis de toxicidade, dependendo da espécie produtora, do tipo da toxina e da concentração presente no ambiente (ZANCHETT; OLIVEIRA-FILHO, 2013).

Os metabólitos sintetizados por essas bactérias são divididos em metabólitos primários, ou seja, aqueles utilizados na própria atividade celular da bactéria, e metabólitos secundários, que atuam como hormônios, antibióticos ou ainda como as toxinas, conhecidas como cianotoxinas (CARMICHAEL, 1992; VAN APELDOORN et al., 2007; MÉJEAN; PLOUX, 2013). As toxinas são metabólitos secundários que agem negativamente sobre células, tecidos ou outros organismos que, segundo os autores, estão relacionadas com o mecanismo de defesa da cianobactéria (DEMOTT; ZHANG; CARMICHAEL, 1991; CARMICHAEL, 1992). Uma mesma cianotoxina pode ser produzida por várias espécies diferentes de cianobactérias ou também por populações diferentes de uma mesma espécie, assim como pode haver cianobactérias tóxicas e não tóxicas (CARMICHAEL, 2001; VAN APELDOORN et al., 2007; ZEGURA; STRASER; FILIPIČ, 2011). Para Demott et al. (1991), é clara a relação entre o nível de toxicidade e a concentração da toxina; assim como a forma de exposição e a sensibilidade do organismo alvo.

As cianotoxinas podem ser divididas por dois critérios principais: 1. Baseado no mecanismo de ação em vertebrados terrestres, como mamíferos, e sua ação em órgãos alvo (hepatotoxina, neurotoxina, dermatoxina etc.) e 2. baseado na estrutura química que apresentam (peptídeos cíclicos, alcaloides ou lipopolissacarídeos) (CARMICHAEL, 1992; FERRÃO-FILHO; KOZLOWSKY-SUZUKI, 2011).

A primeira cianotoxina descrita foi a Anatoxina-a (ANTX-a), cuja ação biológica a coloca na classe das neurotoxinas, pois se liga, irreversivelmente, aos receptores de acetilcolina e não se degrada pela acetilcolinesterase, provocando assim, espasmos musculares em animais e, conseqüente, a morte por parada respiratória (CODD et al., 1999).

Outra toxina da classe das neurotoxinas alcaloides é a Saxitoxina (STX), também conhecida como “veneno do crustáceo paralítico”, por terem sido primeiramente encontradas em mariscos intoxicados. Essa toxina bloqueia os canais de sódio dos neurônios desses organismo, paralisando os seus músculos (CHORUS; BARTRAM, 1999; FERRÃO-FILHO; KOZLOWSKY-SUZUKI, 2011).

As hepatotoxinas fazem parte da classe de cianotoxinas mais estudadas, e apesar de serem conhecidas desde os anos 50, sua identificação e sua estrutura química só foram determinadas nos anos 80 (CARMICHAEL; GORHAM, 1980). Dentre as hepatotoxinas, destaca-se as microcistinas.

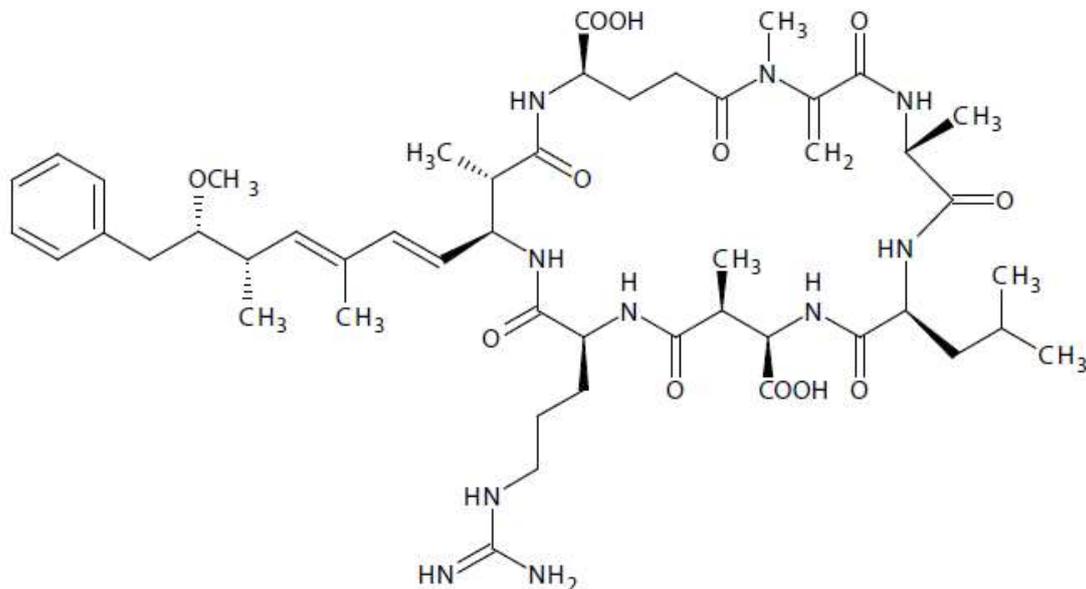
### 2.3.1 Microcistina

As microcistinas (MCs) são cianotoxinas do grupo dos heptopeptídeos cíclicos produzidos por inúmeras espécies de algas azuis. Até o momento, já foram descritas 90 variações estruturais desta toxina (LIU; SUN, 2015), cujos organismos envolvidos na sua produção são cianobactérias dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia* e *Oscillatoria*, que podem ser encontradas tanto em águas doces quanto salgadas (IKEHARA et al., 2015). Estas toxinas podem ser libertadas para o meio extracelular em pequenas quantidades, durante a vida das cianobactérias (PANTELIC' et al., 2013) ou após a lise celular (CORBEL; MOUGIN; BOUAÏCHA, 2014).

A síntese das microcistinas acontece a partir de um complexo multienzimático, formado por um peptídeo não-ribossomal sintetase (PNRS) e policetídeo sintetase (PCS). Esse complexo é codificado por um grupo de genes de composição e organização variadas, denominados de genes *mcy* (CARMICHAEL, 1992; CHRISTIANSEN et al., 2003; KURMAYER; CHRISTIANSEN, 2009; PEARSON et al., 2010). A presença destas microcistinas em corpos d'água e em água de abastecimento pode causar envenenamento, tumorizações, perda da integridade do citoesqueleto e até morte celular (GANDHI; KUMAR, 2017).

As microcistinas estão entre as toxinas prevalentes no ambiente (ZEGURA et al.,2011), sendo que as suas grandes produtoras são as linhagens tóxicas do gênero *Microcystis*. Este gênero abrange cerca de 50 espécies de cianobactérias, frequentemente encontradas em lagos de diversos países (KOMÁREK et al., 2012). Segundo Pearson et al. (2010), dentre os vários tipos estruturais da microcistina, há uma toxicidade variada, sendo a isoforma microcistina-LR a mais tóxica.

A microcistina-LR (MCLR) é a cianotoxina mais comumente encontrada no ambiente. Ela apresenta uma estrutura molecular cíclica [ciclo – (D-AlaL1-Leu2-D-MeAsp3-L-Arg4-Adda5-D-Glu6-Mdha7) ], conforme apresentada na Figura 1. O fígado é o principal órgão-alvo das MCLR, cuja ação dessas toxinas induz hepatomegalia, hemorragia hepática e até falha hepática (GANDHI; KUMAR, 2017). O potencial hepatotóxico da MCLR é principalmente vinculado aos peptídeos de transporte de ânions orgânicos, que são expressos apenas na membrana sinusoidal dos hepatócitos humanos, o que viabiliza o transporte da MCLR para dentro dos hepatócitos, facilitando sua ação (LIU; SUN, 2015).



**Figura 1** Fórmula química estrutural da cianotoxina Microcistina-LR (BLÁHA; BABICA; MARŠÁLEK, 2009)

### 2.3.2 Mecanismos de ação

Diante do conhecimento da toxicidade das microcistinas, alguns estudos têm focado em qual nível de toxicidade pode afetar os organismos. Segundo Ding et al.

(1999), as microcistinas são inibidoras das fosfatases 1 e 2A, sendo consideradas, predominantemente, como promotoras de tumor (ERIKSSON et al., 1990). Em consequência dessa inibição, ocorre a hiperfosforilação das proteínas do citoesqueleto, que leva a inúmeras alterações como distúrbio da homeostase celular, alterações e rearranjos do citoesqueleto e perda da adesão entre desmossomos. Essas alterações decorrem em disfunção da arquitetura hepática e, conseqüentemente, comprometimento do órgão (ERIKSSON et al., 1990; HOOSER et al., 1991; TOIVOLA; ERIKSSON, 1999).

De acordo com Zegura (2016), nas últimas décadas, muitos estudos envolvendo as microcistinas mostram que essas toxinas induzem danos no DNA, que estão envolvidos com a iniciação de tumores, mas, apesar desses estudos, ainda não ficou claro o mecanismo de ação que leva ao potencial genotóxico e carcinogênico das MCLR. No entanto, existem algumas evidências de que as microcistinas induzem danos no DNA que geram espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, pela quebra das cadeias da dupla hélice originada da excisão de adutos oxidativos do DNA (LOPES, 2011; ŠTRASER et al., 2013). Essas espécies reativas originadas do processo são, então, as moléculas responsáveis pela genotoxicidade e carcinogenicidade desta cianotoxina (NISHIWAKI-MATSUSHIMA et al., 1992; OHTA et al., 1992). Alguns autores citam, também a nefrotoxicidade como efeito da MCLR destacando que em baixas concentrações e exposição crônica pode levar a falha renal (ZEGURA; SEDMAK; FILIPIC, 2003; ZEGURA et al., 2011).

Doses elevadas de MCLR apresentam uma alta potência hepatotóxica, mas os mecanismos promotores de proliferação das células hepáticas, em doses baixas, ainda não estão totalmente esclarecidos. Em, altas concentrações a MCLR podem levar a necrose ou apoptose de células hepáticas (ESPÍNDOLA et al., 1998; NASCIMENTO et al., 2010).

Em decorrência dos perigos das contaminações por cianotoxinas e das frequências em que têm sido registradas florações de cianobactérias, há cada vez mais a necessidade do desenvolvimento de ensaios com organismos sensíveis, que possam estimar as potencialidades tóxicas desta substância química. Também é necessário avaliar a ação destas substâncias sobre o material genético dos organismos, mesmo quando os contaminantes estejam presentes em baixas concentrações (FRENZILLI et al., 2009; KLOBUCAR et al., 2003).

## 2.4 Métodos de avaliação de ecotoxicidade

### 2.4.1 Bioindicadores *in vitro* e *in vivo*

Devido aos atuais comprometimentos observados nos ecossistemas aquáticos, fica cada vez mais evidente a necessidade de se avaliar, mais detalhadamente, esses ambientes. Por isso, é indicada a realização de ensaios desenvolvidos por meio de diferentes metodologias, para que se possa obter um melhor monitoramento dos possíveis impactos que acometem os ecossistemas (DOWLING; MOTHERSILL, 2001).

Os testes mais utilizados para detecção de genotoxicidade e mutagenicidade de uma substância são os ensaios do cometa e do micronúcleo, respectivamente, por serem considerados simples, eficazes e de rápida aplicação e obtenção de resultados.

### 2.4.2 Cultura de células

Inúmeras linhagens de células mantidas em culturas vêm sendo utilizadas em diversos ensaios de monitoramento ambiental, principalmente em estudos de avaliação da mutagenicidade de ambientes aquáticos (RABELLO-GAY; RODRIGUES; MONTELEONE-NETO, 1991). Estes sistemas *in vitro* permitem uma padronização das condições do ensaio (densidade populacional, pH, temperatura, composição do meio de cultivo); a realização de tratamentos das células em várias fases do ciclo celular (ROGERO et al., 2003); a reprodução do teste em diferentes laboratórios, pela uniformidade de seu metabolismo e comportamento celular; rapidez, sensibilidade e viabilidade de realização dos ensaios, além de serem financeiramente acessível (KNASMÜLLER et al., 1998).

As linhagens celulares usadas em ensaios biológicos podem ser metabolizadoras ou não metabolizadoras, dependendo do tecido de origem. As linhagens metabolizadoras são utilizadas, geralmente, para avaliar os efeitos dos metabólitos derivados das transformações que o produto sofre dentro do organismo e as não metabolizadoras servem para avaliar o efeito do próprio produto investigado. Dentre as linhagens celulares metabolizadoras, podemos citar a HepG2 (célula de hepatoma humano) e a ZFL (célula de fígado de *Danio rerio*).

As células HepG2 são derivadas de hepatoblastoma primário de um jovem de 11 anos. Essa linhagem apresenta morfologia semelhante ao epitélio e ao parênquima hepático e, além disso, conserva a capacidade de sintetizar e secretar a maioria das

proteínas características das células normais do fígado humano (MIRANDA; COLLODI; ZHAO, 1993; GHOSH; ZHOU; COLLODI, 1994; HE, 2010). A linhagem celular ZFL é derivada da junção de aproximadamente 10 fígados de peixes adultos normais (*Danio rerio*), sendo esta a única linhagem que apresenta a morfologia epitelial típica deste órgão. Esta célula é muito importante no estudo da toxicologia *in vitro*, principalmente na análise dos efeitos de metabólitos bioativos derivados de compostos xenobióticos (KNASMÜLLER et al., 1998; UHL; HELMA; KNASMÜLLER, 1999; VALENTIN-SEVERIN et al., 2003). Desta forma, os ensaios desenvolvidos com estas linhagens celulares refletem, de forma mais fiel, a metabolização de mutágenos, sem a necessidade de adição de substâncias para desenvolver essa função (KNASMÜLLER et al., 1998; UHL; HELMA; KNASMÜLLER, 1999; VALENTIN-SEVERIN et al., 2003).

### 2.4.3 Ensaio do cometa

Na década de 80 foi desenvolvido um método de análise de danos no DNA que foi realizado com células únicas, dispostas em gel de eletroforese. Este método foi desenvolvido por (OSTLING; JOHANSON, 1984) e passou a ser chamado de ensaio do cometa, ensaio de eletroforese em gel de célula única ou eletroforese de microgel (OSTLING; JOHANSON, 1984). Neste teste, as células são dispostas em lâminas cobertas de agarose, lisadas e tratadas com sal. Após esses procedimentos, obtem-se nucleóides, que são núcleos sem envoltórios nuclear, mas com proteínas que mantêm a sua forma. Assim, o DNA é submetido a uma corrida eletroforética em condições neutras e corado com corante fluorescente (SINGH et al., 1988).

Após um período de estudos (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998; LIAO; MCNUTT; ZHU, 2009) fizeram algumas modificações na técnica e passaram a usar um tampão alcalino na corrida eletroforética, forma essa utilizada até hoje para este ensaio. A técnica do cometa alcalino é considerada um “endpoint” de genotoxicidade que permite detectar os danos no DNA em células individuais, e viabiliza quantificar quebras desta macromolécula induzidas por agentes físicos ou químicos (PAVLICA et al., 2001; ANDRADE; FREITAS; SILVA, 2004; MATSUMOTO et al., 2006).

O ensaio do cometa é considerado um teste genotóxico rápido, simples e sensível, capaz de detectar danos no DNA de células individuais de qualquer tecido e/ou tipo celular induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes (PAVLICA et

al., 2001; ANDRADE; FREITAS; SILVA, 2004; MATSUMOTO et al., 2006). Para (SPEIT, 1996; PAVLICA et al., 2001; SPEIT; VASQUEZ; HARTMANN, 2009), o ensaio do cometa ganhou popularidade por ser um teste capaz de detectar baixos níveis de danos e também ser uma técnica que não requer um número muito grande de células e não necessitar que elas estejam em divisão, o que facilita a aplicabilidade do teste em qualquer fase do ciclo celular (FRENZILLI; NIGRO; LYONS, 2009; LIAO; MCNUTT; ZHU, 2009).

Este teste é baseado na quantificação de fragmentos de DNA que migram para fora do nucleóide durante a corrida de eletroforese. Esses fragmentos são decorrentes tanto dos danos no DNA como de processo de reparo celular, que fazem excisão de bases do local que sofreu mutação (FRENZILLI; NIGRO; LYONS, 2009; MARTINS; COSTA, 2015; IMANIKIA et al., 2016; REIS et al., 2017). Por ser um método reconhecido e por detectar baixos níveis de danos e reparos no DNA, cada vez mais, o ensaio do cometa tem sido utilizado para avaliar as quebras no material genético induzidas por contaminantes e, portanto, para a realização de biomonitoramento ambiental de genotoxicidade de substâncias, tanto por meio de testes *in vivo* como *in vitro* (COLLINS et al., 1997; HE et al., 2000; OLIVE; BANÁTH, 2006).

Alguns autores afirmam que apenas uma pequena parte dos danos que ocorrem no DNA não são passíveis de reparo, o que pode levar a eventos de transformação do DNA e conseqüentemente a uma mutação (FENECH, 2000; BONASSI et al., 2003; FENECH et al., 2003b).

#### **2.4.4 Teste do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese**

O micronúcleo (MN) é uma pequena massa de cromatina delimitada por membrana e separada do núcleo principal, com aparência de um pequeno núcleo. A presença de MN em uma célula, significa que o seu núcleo perdeu parte da sua cromatina, devido a quebras cromossômicas ou perdas de cromossomos inteiros (FENECH, 2000; FENECH et al., 2003b). São considerados MN clássicos as estruturas circulares de mesma refringência que o núcleo, não ligadas a este, com tamanho variando de 1/3 a 1/16 do tamanho do núcleo principal da célula (FENECH et al., 2003a; KIRSCH-VOLDERS et al., 2003; NERSESYAN et al., 2016; HARA; MARIN-MORALES, 2017).

Vários eventos celulares podem resultar em MNs, alguns por ação direta no material genético dos organismos expostos, promovendo ruptura da molécula de DNA e resultando em fragmentos acêntricos (ação clastogênica), e outros por ação indireta, por

interagirem com outras moléculas ou estruturas celulares, como, por exemplo, proteínas do fuso mitótico, levando a perda de cromossomos inteiros ou alterando a maquinaria mitótica (ação aneugênica) (FENECH, 2000; SOUZA; FONTANETTI, 2006).

O teste do MN é uma técnica muito usada no monitoramento ambiental, pois avalia a potencialidade mutagênica de contaminantes, sendo, então, um “endpoint” de avaliação mutagênica de ecossistemas (FENECH, 1997, 2000; KIRSCH-VOLDERS et al., 2003).

O ensaio do MN, também conhecido como teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN), realizado com sistema *in vitro* e que utiliza a citocalasina B, um inibidor de polimerização da actina, que impede a citocinese, mas não impede a cariocinese, resulta em células binucleadas, formadas a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão, independentemente do grau de sincronia e da proporção de células em divisão (FENECH, 1998; KIRSCH-VOLDERS; FENECH, 2001; FENECH et al., 2003b; TONELINE et al., 2014). Nesta técnica, são contabilizadas as células binucleadas, o que garante que os micronúcleos que apareceram são decorrentes da ação do agente de exposição (AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2000; BOETTCHER et al., 2010).

Alguns trabalhos demonstram a aplicabilidade do teste do MN em avaliações da extensão da poluição aquática, testando a genotoxicidade de poluentes, por meio de testes *in vivo* (FENECH, 2000; FENECH et al., 2011).

Alguns estudos demonstraram que esta técnica pode também ser usada para avaliar a presença de brotos e pontes nucleares em células expostas a agentes tóxicos. Durante a anáfase, cromossomos dicêntricos (originados de quebras e reorganização cromossômicas) em que cada centrômero é tensionado para um dos polos da célula, provavelmente, resultam em uma estrutura semelhante a uma ponte, que é revestida pela membrana nuclear. Essas pontes, juntamente com os brotos nucleares, são consideradas “endpoints” de genotoxicidade, e os MN “endpoints” de mutagenicidade (LAUGHINGHOUSE et al., 2012; OZAKCA; SILAH, 2013).

#### **2.4.5 O organismo teste *A. cepa***

A espécie *A. cepa* é reconhecida como um excelente modelo genético e, por isso, muito utilizada para ensaios de contaminação ambiental. São ensaios recomendados pelo United Nations Environment Programme- UNEP, World Health Organization (WHO) e

US Environmental Protection Agency (US EPA) como instrumento na avaliação de substâncias presentes no ambiente (RANK; NIELSEN, 1994; LEME; MARIN-MORALES, 2009; RADIC' et al., 2010).

Os ensaios realizados com plantas têm muitas vantagens sobre outros sistemas, incluindo a semelhança entre a morfologia dos cromossomos de plantas e mamíferos, bem como a resposta aos agentes mutagênicos. Além disso, os vegetais são sistemas mais econômicos, requerem um menor tempo de experimentação e seus cromossomos são grandes e em pequeno número, o que facilita a observação de alterações citogenéticas (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; RADIC' et al., 2010; LAUGHINGHOUSE et al., 2012).

Este teste é muito utilizado para avaliar os danos do DNA, aberrações cromossômicas e perturbações no ciclo mitótico, o que permite monitorar efeitos de poluentes inclusive de misturas complexas (MOHAMMED et al., 2015).

#### **2.4.5.1 Aberrações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa***

O teste de aberrações cromossômicas é um importante instrumento para avaliar os efeitos tóxicos e genotóxicos de amostras ambientais, destacando-se dentre elas as misturas complexas e os micropoluentes (RUSSEL, 2002; RANK; NIELSEN, 2004).

Neste teste, observa-se as alterações estruturais e numéricas dos cromossomos, que ocorrem espontaneamente ou por indução de agentes físicos ou químicos (LEME; MARIN-MORALES, 2008; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009). Alguns autores consideram estas alterações, como evidências de efeitos genotóxicos e mutagênicos induzidos por agentes clastogênicos e/ou aneugênicos (LEME; MARIN-MORALES, 2008; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009).

Dependendo da ação dos agentes tóxicos, podem ser induzidas diferentes tipos de aberrações cromossômicas. Quando um agente interfere na estrutura do fuso mitótico, portanto de ação aneugênica, ele pode afetar a segregação correta dos cromossomos durante a divisão celular ou ainda decorrer em C-metáfases (ALBERTINI et al., 2000; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009; GOUJON et al., 2014). Estas aberrações, que podem ser irreversíveis e muito prejudiciais às células, podem também estar relacionadas com o processo de morte celular (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009; FREITAS et al., 2016; PALMIERI, 2016).

A desestruturação do citoesqueleto pode levar a mal formações do fuso mitótico e causar inúmeras alterações cromossômicas, dentre elas as células poliplóides (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007). Além dos distúrbios causados pelas alterações no citoesqueleto, a ação de agentes tóxicos sobre constituintes celulares podem levar ao surgimento de células binucleadas e com MN (SHAMINA; SILKOVA; SERIUKOVA, 2003), o que também pode gerar perdas de cromossomos inteiros e consequente formação de células aneuplóides (FENECH; CROTT, 2002; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007).

Já a os brotos nucleares podem ser derivados de um processo de eliminação do DNA amplificado, em decorrência de inativação total do fuso mitótico (STANIER et al., 1979). Quando estes brotos são eliminados do núcleo, eles passam a formar os MNs.

### 3 Objetivos

Como a eutrofização de rios e lagos tem como consequência a floração de cianobactérias, microrganismos potencialmente produtores de toxinas, este trabalho teve como objetivos avaliar a ação biológica, em diversos níveis de toxicidade, das cianotoxinas presentes em extratos obtidos de amostras de recursos hídricos contaminados com cianotoxinas, no meio de cultivo onde estes procariontes foram cultivados (em laboratório) e da substância microcistina-LR (95% de pureza).

Para esta avaliação foram realizados testes específicos para:

- Avaliar os efeitos genotóxico e mutagênicos da biomassa de cianobactérias cultivadas em laboratório, das microcistinas presentes no meio de cultivo de *Microcystis aeruginosa*, em amostras de águas da represa de Salto Grande (Americana-SP) e da microcistina-LR (95% de pureza), por meio do teste do cometa, de anormalidades nucleares e do teste do micronúcleo realizados com linhagens de hepatócitos humanos (HepG2) e de *Danio rerio* (ZFL);
- Avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e potencial mutagênico da biomassa de cianobactérias cultivadas em laboratório, das microcistinas presentes no meio de cultivo de *Microcystis aeruginosa*, em amostras de águas da represa de Salto Grande (Americana-SP) e da microcistina-LR (95% de pureza), por meio da análise de alterações nos índices mitóticos, de morte celular, de aberrações cromossômicas e micronúcleos e quebras realizados com células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações desses compostos químicos;
- Avaliar a ação mutagênica da biomassa de cianobactérias cultivadas em laboratório, das microcistinas presentes no meio de cultivo de *Microcystis aeruginosa*, em amostras de águas da represa de Salto Grande (Americana-SP) e da microcistina-LR (95% de pureza), por meio da análise de micronúcleos células F1 de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações desses compostos químicos;
- Comparar os diversos resultados de toxicidade obtidos nos ensaios realizados com as diversas amostras de microcistinas produzida pela cianobactéria *Microcystis aeruginosa*;
- Avaliar a eficiência dos ensaios realizados com culturas celulares (HepG2 e ZFL) e com *A. cepa*, para monitorar efeitos citogenotóxicos e mutagênicos dessas toxinas.

## 4 Material e Métodos

### 4.1 Substância química

Foi utilizado como material químico a microcistina-LR (CAS N° 101043-37-2– Cayman- 95% de pureza), que foi testada em três concentrações (1µg/L concentração tida pela OMS como alerta de nível 1 para esta toxina; 1,5 µg/L concentração 50% maior que o alerta de nível 1, simulando um início de floração e, portanto, baixa presença de microcistina; e 2 µg/L concentração que é o dobro da concentração inicial, simulando uma floração em processo mais avançado de produção de microcistina).

### 4.2 Material biológico

Para a obtenção das microcistinas, foi utilizada uma cepa da cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, fornecida pela Profa Dra. Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira, do departamento de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo/ESALQ. A obtenção das microcistinas foi feita no Laboratório da referida professora (Dra. Maria do Carmo), cujos protocolos foram desenvolvidos conforme rotina daquele laboratório e sob a orientação da pesquisadora.

Para a realização dos testes de micronúcleo e do cometa foram utilizadas duas linhagens celulares: a linhagem de célula metabolizadora humana (HepG2), derivada de hepatoma humano, obtida junto ao banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ); e a linhagem de células metabolizadora de *D. rerio* (ZFL), derivada de hepatócito de *D. rerio*, cedida pela Profa. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez, da Universidade Estadual de Londrina/PR,

Para os testes de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, também foi utilizada a espécie *A. cepa* (cebola), organismo teste indicado para avaliação de toxicidade de águas.

#### 4.2.1 Cianobactérias

As cianobactérias (BCCUSP 232) foram cultivadas em câmaras climáticas sob condições controladas de temperatura ( $23 \pm 0,5$  °C), fotoperíodo (12:12hs

claro:escuro) e intensidade luminosa ( $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , medida com sensor esférico 120 subaquático fotômetro LI-COR, mod. LI-250). O meio de cultura utilizado foi o ASM-1, pH 7,4 (STANIER et al., 1979), modificado por (HE, 2010), pela substituição do citrato férrico de amônia por cloreto férrico. Sob intensidade luminosa de aproximadamente  $55 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , temperatura de  $24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH entre 7 e 8 e foto-período de 12 horas.

Ao atingirem a fase exponencial de crescimento (15-18 dias de cultivo) as células precisam de meio de cultivo novo pois já consumiram grande parte dos nutrientes, então foi realizado o repique, levando a uma produção maior de células. Para o repique foi utilizada a proporção de 1 parte de células em fase exponencial para 9 partes de meio novo. O meio ASM-1 é composto apenas por substâncias inorgânicas.

Após a obtenção de grande quantidade de cultivo (aproximadamente 65 L) foi realizada a centrifugação (10 minutos a 3000 rpm) destes para a obtenção da biomassa isolada. O meio de cultivo restante deste processo foi armazenado para posteriormente passar pela extração de fase sólida com cartucho C18, mais indicado para esta finalidade. A biomassa resultante do cultivo foi liofilizada e armazenada em freezer ( $-20^\circ\text{C}$ ) até o momento do uso.

Para a obtenção de microcistina extracelular a partir das células cultivadas de *M. aeruginosa*, foi realizado um procedimento de gelo/degelo do cultivo por três vezes consecutivas, sendo que a fase de congelamento foi realizada em nitrogênio líquido ( $\text{N}_2$ ) e o degelo em banho-maria  $24^\circ\text{C}$ . Este procedimento promove o rompimento da membrana celular e a microcistina extracelular é liberada. Em seguida, todo esse material composto por membranas celulares rompidas e microcistinas foi misturada com água de osmose reversa para a realização da dosagem de microcistinas por meio do Kit de Elisa para esta cianotoxina (Abraxis, Nº 522015). De acordo com o resultado desta dosagem foram preparadas as concentrações utilizadas.

### 4.3 Amostra Ambiental

#### 4.3.1 Reservatório de Salto Grande

O reservatório de Salto Grande fica localizado no município de Americana, no centro-leste do Estado de São Paulo, em uma altitude de 530 m (coordenadas geográficas: 22° 44'S e 47° 19'W). Está inserido na sub-bacia do rio Atibaia, que faz parte da bacia hidrográfica do rio Piracicaba.

A represa foi construída entre 1940 e 1949 com a finalidade de possibilitar o aproveitamento hidrelétrico pela Usina Hidroelétrica de Americana (USAM), mas atualmente contribui com a regularização da vazão do rio Piracicaba, além de ser importante para irrigação, piscicultura, recreação e abastecimento.

O reservatório é dividido em três compartimentos formados em decorrência da topografia de fundo que é condicionada à existência de dois saltos submersos, dividindo o reservatório em compartimentos distintos em termos de profundidade máxima e distribuição dos sedimentos.

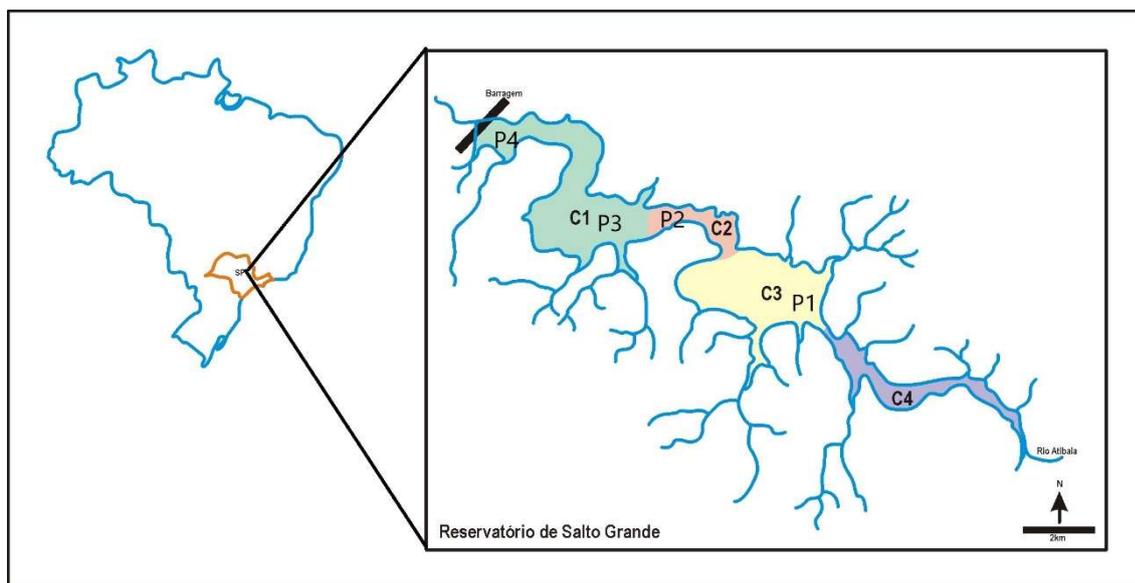
Os pontos de coleta das amostras de água foram distribuídos nos três compartimentos do reservatório de Salto Grande (Americana – SP), como segue:

P1– Ponto localizado logo após o estreitamento do compartimento 4, início do compartimento 3.

P2 – Ponto localizado onde ocorre um estreitamento do compartimento 2.

P3-Ponto localizado no compartimento 1.

P4- Ponto próximo a barragem do reservatório, início do compartimento



1.

**Figura 2** Esquema dos pontos de coleta localizados no reservatório de Salto Grande (Americana – Salto Grande (Americana-SP). P1- ponto localizado no compartimento 3 (C3), logo após o estreitamento do compartimento 4 (C4); P2- ponto localizado onde ocorre um estreitamento entre o

compartimento 2 (C2) e 1 (C1); P3- ponto localizado no compartimento 1 (C1); P4- ponto localizado no estreitamento do compartimento 1 (C1), próximo da barragem.

Após a coleta, as amostras foram centrifugadas (10 minutos a 3000 rpm) para a decantação da biomassa. Em seguida, foi retirado o sobrenadante e armazenado para posterior filtração e realização do processo de extração de fase sólida (EFS).

#### 4.3.2 Extração de Fase Sólida (EFS)

O processo de extração exige preparo das amostras, desde antes do momento das coletas até o processamento das mesmas. Sendo assim, antes da realização da coleta foi feita a lavagem dos frascos de vidro (4L), como segue: os galões (v: 4 L) passaram por banho com água destilada e Extran® “overnight”. Posteriormente, foram lavados em água corrente, até que não houvesse mais resíduo do detergente. Os galões foram secos e novamente lavados com água destilada. Após nova secagem, foram submetidos a uma desinfecção com etanol e secos novamente. Em seguida, foram passados por um novo banho em água destilada e, depois de estarem totalmente secos, passado acetona P.A. Após todo procedimento, os galões foram levados para estufa, para secagem, e destinados à coleta.

No momento da coleta das amostras de água, foi adicionado nos galões 8 mL de ácido acético glacial P.A., para fixação das condições da amostra e para evitar a proliferação de microrganismos.

Depois de realizada a coleta, as amostras foram filtradas três vezes em sistema de filtração a vácuo, com filtro de fibra de vidro (Glass-microfibre Discs MGA 47mm – Sartorius Stedim Biotech®). Após o processo de filtração, as amostras foram subdivididas em alíquotas de 1 L. Essas alíquotas passaram pelo processo de extração de fase sólida, que consistiu em passar a água por cartuchos poliméricos que retém, em resinas apropriadas, apenas as substâncias de interesse presentes nas amostras.

O procedimento de extração foi iniciado com o condicionamento dos cartuchos C18 EC 500mg/3mL (Chromabond® - Macherey-Nagel). Esses cartuchos foram acoplados a um aparelho de Manifold (Chromabond® - Macherey Nagel), onde foi adicionado 6 mL de metanol, em cada cartucho, para a abertura

das cadeias poliméricas dos mesmos. Após a passagem do metanol foi adicionado 6 mL de água milli-Q, para retirar resíduos do metanol.

Após o procedimento de extração, os cartuchos passaram por secagem, para serem armazenados em freezer (-20 °C).

#### 4.3.3 Eluição das Amostras

Para a eluição das amostras, os cartuchos foram retirados do congelador e acoplados ao Manifold, para a retirada do excesso de água. Uma vez secos, os cartuchos foram presos a um vidro de aproximadamente 15 mL, onde foram passados 10 mL de metanol, em sequências de 2 em 2 mL. Depois de passados os 10 mL de metanol, as amostras foram secas com nitrogênio gás  $N_{2(g)}$ , até restar apenas um pequeno resíduo no fundo do frasco. Esse resíduo foi retirado pela lavagem realizada com 1,5 mL de metanol, para ser transferido para um “vial” de 2 mL. O conteúdo do vial (1,5 mL) passou por processo de secagem, até alcançar um volume de 1 mL. Este extrato foi mantido em geladeira, para posterior uso nos experimentos. Para os testes em *A. cepa* utilizou-se extratos diluídos (1/10, v:v de extrato/água).

#### 4.4 Bioensaios com cultura celular (HepG2 e ZFL)

As células de hepatoma humano - HepG2 (2n=46 cromossomos), foram cultivadas em meio MEM (*Meio Mínimo Essencial Eagle*), com solução antibiótica/antimitótica, suplementado com 10 % de soro bovino fetal. Os frascos de 25 cm<sup>2</sup> (com ventilação de cultivo celular) foram mantidos em temperatura controlada (37 °C) em estufa de CO<sub>2</sub> (5 %) e umidade de 80 %. Inicialmente, foram descongeladas as ampolas contendo a linhagem HepG2 em 10 mL de meio MEM com soro bovino fetal (SBF). Após o crescimento celular, as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS, tripsinizadas por 5 minutos com Tripsina-EDTA 0,5 % e, logo em seguida, foram adicionados 1,5 mL de meio de cultura suplementado, para inativar a tripsina. Após obter a quantidade ideal de células, foram realizados o teste da resazurina, ensaio do cometa e teste do MN com bloqueio de citocinese.

As células de hepatócitos de *Danio rerio* – ZFL apresenta morfologia típica de células epiteliais. Em geral, o tempo de duplicação dessa linhagem de

células é de aproximadamente 72 horas. Estas células exibem um cariótipo hipodiplóide, com número modal de cromossomos de 47 ( $2n = 50$ ) (HE, 2010).

As células foram mantidas em frascos de 25 cm<sup>2</sup> sem ventilação, em temperatura controlada (28°C) em BOD. Inicialmente, as ampolas com a linhagem ZFL foram descongeladas em 10 mL de meio RPMI + Leibowitz L-15 (60/40%), suplementado com SBF. Após o crescimento celular, as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS e tripsinizadas com Tripsina-EDTA 0,125% por 7 minutos. Em seguida, a tripsina foi inativada com 1,7 mL de meio de cultura suplementado. Quando se obteve a quantidade ideal de células, foram realizados os testes da resazurina, do cometa e do MN com bloqueio de citocinese.

#### 4.4.1 Ensaio de viabilidade celular - Teste da Resazurina

A resazurina (7-hidroxi-3*H*-fenoxazina-3-ona 10-óxido) é um corante azul com baixa fluorescência que, após ser reduzido nas células vivas, transforma-se em resorufina, que é um corante rosa de alta fluorescência. O teste da resazurina foi realizado como um ensaio inicial para se determinar as concentrações que mantinham a viabilidade das células testadas (HepG2 e ZFL) maior que 80%. Uma vez definidas essas concentrações, foram realizados os ensaios de genotoxicidade (ensaio do cometa) e de mutagenicidade (teste do MN com bloqueio de citocinese) com essas linhagens celulares.

O ensaio foi realizado em placas de Elisa de 96 poços, de acordo com o protocolo proposto por O'brian et al. (2000), com as seguintes modificações: as placas foram preparadas com  $2,34 \times 10^6$  células por poço, em um volume total de 100 µL de meio de cultura, correspondente de cada suspensão celular, suplementado com soro e incubadas por um período de 24 horas, tempo necessário para ocorrer a adesão das células na superfície dos poços. Após esse período, o meio foi retirado e foram adicionados os tratamentos previamente preparados com meio de cultura sem soro, em um volume final de 200 µL por poço. Nos poços destinados ao controle negativo (CN) foi adicionado meio de cultura sem soro e nos poços destinados ao controle positivo (CP) houve a adição de uma solução de Triton X-100 (1 %), preparado com meio de cultura sem soro. Nos demais poços, foram adicionadas as diferentes soluções de microcistina-LR ou da biomassa preparadas com meio de cultura sem soro, nas seguintes concentrações: 2µg/L; 1,75µg/L; 1,50µg/L; 1,25µg/L; 1µg/L; 0,75 µg/L (todas as concentrações foram calculadas a

partir da concentração ambiental considerada alerta de nível 1 pela OMS). Os tratamentos permaneceram nos poços por um período de 24 horas. Em seguida, os tratamentos foram retirados e foram adicionados 200  $\mu$ L de solução de resazurina (44  $\mu$ M) diluída em meio de cultura sem soro, permanecendo incubadas por 4 horas.

A fluorescência foi medida pelo fluorímetro leitor de placa, modelo Infinite M2000 Pro™ plate reader (Tecan, Crailsheim, Germany), utilizando um comprimento de onda de excitação de 560 nm e um comprimento de onda de emissão 590 nm. A viabilidade foi avaliada com base na comparação das células tratadas com as células não tratadas (CN), onde as concentrações abaixo de 80 % de viabilidade foram consideradas citotóxicas.

#### 4.4.2 Ensaio do cometa

Após o período de crescimento celular, foi realizada a confecção dos pré-frascos, onde foram semeadas, aproximadamente,  $5 \times 10^5$  células, mantidas nas condições ideais para o cultivo pelo período de um ciclo celular. Em seguida, as células foram submetidas aos tratamentos por um período de 24h (HepG2) e 48h (ZFL). Após este tempo, foi coletada a suspensão celular, transferida para tubos Falcon® e centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm. Foi retirado o sobrenadante, e adicionado meio novo (de acordo com a linhagem celular) e a suspensão foi então homogeneizada por meio da utilização de uma seringa de insulina (1mL).

Para o ensaio do cometa, foram montadas lâminas com 20  $\mu$ L da suspensão celular + 120  $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão a 37 ° C. Posteriormente, as lâminas foram banhadas, no escuro, em geladeira a 4 ° C, por 1 hora em solução de lise (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque - NaCl 2.5 M, EDTA 100mM, Tris 10 mM, pH 10, aproximadamente 8g de NaOH sólido para 1 L), pH 10. Após este procedimento, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese, contendo uma solução tampão (NaOH 300mM + EDTA 1mM, com pH>13), por 20 minutos, para a deslicoidização do DNA. A eletroforese foi realizada por 20 minutos a 25 V e 300 mA (~ 0.8 V/cm). Em seguida, as lâminas foram neutralizadas, durante 15 minutos, em tampão de neutralização (pH 7.2). Após a neutralização, as lâminas foram fixadas, em etanol absoluto (10 minutos) e coradas com GelRed® (15  $\mu$ L de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1M, e 45 mL de água destilada), no momento da análise ao

microscópio de epifluorescência (Leica, filtro B - 34 (excitação:  $\lambda=420$  nm – 490 nm, barreira:  $\lambda=520$  nm), em objetiva de 40x. Foram analisados, ao acaso, 100 nucleóides por frasco (três réplicas, duas lâminas com 50 nucleóides cada), totalizando 300 nucleóides/tratamento. A quantificação de danos no DNA foi feita pela porcentagem de DNA que estava presente na cauda do cometa, pelo software Comet IV. A média dos resultados de cada tratamento foi calculada e submetida ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e ao teste estatístico paramétrico, ANOVA ou não paramétrico Kruskal-Wallis/Dunn's ( $p>0,05$ ), para comparar os efeitos das cianotoxinas e o controle negativo.

#### 4.4.3 Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese

Para a realização do teste do micronúcleo em células mantidas em cultura, foi utilizada a técnica descrita por (CETESB, 2008), com algumas modificações, como segue: as células foram cultivadas por um ciclo celular completo (24 horas para a célula humana e 72 horas para a célula de *D. rerio*), antes da adição dos tratamentos. Em seguida, foram realizados tratamentos simultâneos (24h para HepG2 e 48h para ZFL), com a adição das concentrações preparadas em meio de cultura (três frascos para cada amostra). O controle positivo foi feito adicionando 50  $\mu$ L de MMS ( $4 \times 10^{-2}$ M) e o controle negativo, 50  $\mu$ L de PBS.

Após os tratamentos, as células foram lavadas, por duas vezes, com PBS, seguida da adição de 5 mL de meio de cultura completo com 3  $\mu$ g/mL de citocalasina B, onde permaneceram por 28 horas. Decorrido este tempo, as células foram colhidas e fixadas em Carnoy (etanol/ácido acético 3:1 – v:v). A seguir, foram gotejadas sobre lâminas limpas, geladas e contendo um filme de água, algumas gotas da cultura de células. Após secagem, as lâminas foram coradas com Giemsa 5 % por 5 minutos, e analisadas em microscópio (aumento de 100 x), para serem contabilizadas 2000 células por frasco, sendo 6000 células por tratamento.

#### 4.5 Bioensaio com *Allium cepa*

Sementes de *A. cepa* foram expostas à germinação em placas de Petri contendo os tratamentos. Os controles foram realizados com água mineral Controle Negativo – CN) e com solução aquosa de metilmetano sulfonato (MMS -  $4 \times 10^{-4}$ M), para o controle positivo.

Após germinação, quando as radículas atingiram cerca de 1,5 centímetros de comprimento, elas foram coletada e fixada em Carnoy 3:1 (3 partes de etanol para 1 de ácido acético – v:v). As raízes fixadas foram mantidas em geladeira, até sua utilização na confecção das lâminas.

#### **4.5.1 Teste de Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em Células Meristemáticas de *A. cepa***

-  
Para os testes de aberrações cromossômicas e micronúcleos em células meristemáticas de raiz de cebola, foi adotado o protocolo descrito por Grant (1982), com algumas modificações. As raízes fixadas em Carnoy 3:1, após 3 banhos em água destilada, foram hidrolisadas em HCl 1 N a 60 ° C por 10 minutos e, novamente, lavadas em água destilada. As raízes foram transferidas para frascos escuros contendo reativo de Schiff, onde permaneceram por, aproximadamente, 2 horas. Após alguns banhos em água destilada, necessários para a total retirada do excesso do reativo, os meristemas foram utilizados para a confecção das lâminas (técnica comum de esmagamento suave), e foram observadas em microscópio de luz.

Foi realizada contagens de 500 células/ lâminas em 15 lâminas, e com esta contagem, foram estimados os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos da substância. O índice mitótico (IM) foi obtido pela relação entre o número de células em divisão/número total de células observadas. O índice de Morte Celular (IMC) foi obtido pela relação entre o número de células em morte celular/número total de células observadas. O efeito genotóxico foi avaliado pela presença de alterações do tipo perdas, aderências, pontes e atrasos cromossômicos, anáfases multipolares, dentre outras e o mutagênico a partir das observações de alterações do tipo quebras cromossômica e presença de micronúcleos.

A análise estatística para citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade foi realizada pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk e, de acordo com a distribuição dos dados, realizou-se o teste paramétrico ANOVA com post hoc Turkey e não paramétrico Kruskal-Wallis, com  $p < 0,05$ , comparando os resultados dos tratamentos com o controle negativo.

## 5 Resultados

ARTIGO 1 – “Efeitos citogenotóxico da água contaminada por Microcistina-LR, coletada durante uma floração de cianobactérias”

ARTIGO 2 – “Danos no DNA induzidos tanto por endotoxinas como por exotoxinas de biomassa e meio de cultura de cianobactéria”

ARTIGO 3 – “Alta genotoxicidade de amostras ambientais contaminadas com microcistina em relação a toxicidade da microcistina-LR purificada, comprovam sinergismo da toxina com os estressores do ambiente”

ARTIGO 4 – “Ação das microcistinas produzidas por *Microcystis aeruginosa* sobre o citoesqueleto de hepatócitos de humanos e de peixes resultando em danos tóxicogenéticos”

## 5.1 ARTIGO 1.

### Efeitos citogenotóxicos da água contaminada por microcistina-LR coletada durante uma floração de cianobactérias

Maria Tereza Pamplona-Silva<sup>1</sup>; Letícia Cristina Gonçalves<sup>1</sup>; Maria Aparecida Marin-Morales<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>UNESP – Univ Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Av 24-A, 1515, CEP 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

\*Autor correspondente. Tel.: +55 19 3526 4143; fax: +55 19 35360009.

e-mail: mamm@rc.unesp.br

#### Resumo

A Microcistina-LR (MCLR) é a toxina produzida principalmente pela *Microcystis aeruginosa*, cianobactéria mais encontrada em ambientes eutrofizados. O reservatório de Salto Grande (Americana, Estado de São Paulo/Brazil) é alvo de florações de cianobactérias há várias décadas, principalmente observadas nos períodos de estiagem. Neste estudo foram avaliados os efeitos toxicogenéticos da MCLR adquirida comercialmente (microcistina pura) e de amostras de águas contaminadas por essa toxina, durante floração de cianobactérias, por meio de ensaios realizados com o organismo teste *Allium cepa*. Os resultados mostraram ação genotóxica para a microcistina pura e ação citotóxica, genotóxica e mutagênica para as amostras de água coletadas durante a floração. Os ensaios de aberrações cromossômicas mostraram que a MCLR induz quebras cromossômicas que persistem nas células filhas como MN. Portanto é possível inferir uma ação clastogênica para esta toxina. A MCLR presente em amostras ambientais mostrou ser mais citogenotóxica para as células que a substância pura, pois mesmo em concentrações mais baixas, induziram efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos no organismo teste utilizado. Essa ação tóxica amplificada deve estar relacionada a um efeito sinérgico e/ou aditivo entre a MCLR e outros compostos presentes nas amostras ambientais. Como os estudos toxicogenéticos da MCLR são escassos e inconsistentes, são necessárias investigações adicionais sobre esta toxina, para compreender, mais detalhadamente, o seu modo de ação no sistema biológico.

Palavras-chaves: *Allium cepa*; cianotoxina pura; aberrações cromossômicas; micronúcleos; morte celular

## Introdução

O estado de São Paulo é considerado o estado mais desenvolvido do Brasil, em termos de urbanização e industrialização (CORBI et al., 2006), tendo também um grande destaque na agricultura, por ser o maior produtor de cana-de-açúcar do país (MANZANO et al., 2015). Esse desenvolvimento, contudo, acaba gerando muitos resíduos que colocam em risco a qualidade ambiental. Como o ambiente aquático é o que mais sofre com a contaminação ambiental, por ser o destino final de todo poluente, os rios e reservatórios acabam recebendo muitos compostos que deterioram a qualidade de suas águas (DOWNING et al., 2005; JANG et al., 2006; EPA, 2017; ZHANG et al., 2017), caracterizando-se em um risco tanto para a vida aquática como para a própria saúde da população humana local.

As cianotoxinas são substâncias tóxicas produzidas por várias espécies de cianobactérias. Dentre esse grupo a Microcistina-LR (MCLR) é a mais comumente encontrada no ambiente, toxina esta produzida, principalmente, pela *Microcystis aeruginosa* (SINHA et al., 2012; KE et al., 2015; RIETZLER et al., 2016; TROUT-HANEY; WOOD; COTTINGHAM, 2016). A MCLR é comumente encontrada em reservatórios de água eutrofizados, decorrente de um grande aporte de nitrogênio e nutrientes (SINHA et al., 2012; KE et al., 2015; RIETZLER et al., 2016; TROUT-HANEY; WOOD; COTTINGHAM, 2016). De maneira geral, essas cianotoxinas apresentam grande potencial hepatotóxico, dermatotóxico e neurotóxico (LONE; KOIRI; BHADE, 2015). Por estas moléculas apresentarem uma grande estabilidade molecular, quanto a variações de temperatura, de pH e de hidrólise, e por serem altamente tóxicas, há uma grande preocupação com a sua presença nos recursos hídricos (LONE; KOIRI; BHADE, 2015) pois, por serem de difícil remoção dos ambientes, podem incorrer, por longos períodos em um perigo para o meio biológico e para a saúde humana.

O reservatório de Salto Grande (cidade de Americana-São Paulo/Brazil) tem tido reincidência de florações ocasionais de cianobactérias, desde 1969, principalmente observadas nas épocas de seca associadas a altas temperaturas ((DEBERDT, 2002), TUCCI; DEBERDT; DEBERDT, 2004). Este reservatório, que está localizado próximo a grandes centros urbanos do estado de São Paulo, tem grande valor econômico e social para a região (MATSUMOTO et al., 2006; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2009), além de ser utilizado pela população para lazer e abastecimento público, o que desperta uma grande preocupação com a sua contaminação por cianobactérias e, conseqüentemente, com a presença das toxinas desses organismos. Desta forma, há uma demanda real e urgente de melhor

compreender os efeitos dessas toxinas sobre o DNA, bem como realizar monitoramento de recursos hídricos que apresentem incidências sazonais de florações de cianobactérias.

A investigação da toxicidade de uma substância pode ser feita por diferentes tipos de bioensaios. Os testes citogenéticos são muito usados para monitorar a extensão da poluição e também para avaliar os efeitos que diferentes substâncias podem causar no meio biológico (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Muitos ensaios citogenéticos de curto prazo são aplicados para estudar o potencial mutagênico e genotóxico de contaminantes ambientais (FISKESJÖ, 1985; GRANT, 1994, 1998, 1999; RANK; NIELSEN, 1994; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Os ensaios desenvolvidos com plantas superiores fornecem informações precisas sobre o potencial tóxico de uma substância e são mais fáceis de serem realizados que os ensaios com células ou embriões de animais (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009; LEME; MARIN-MORALES, 2009; MAZZEO; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2011). Por esta razão, esses ensaios são frequentemente utilizados para monitorar ambientes contaminados (RANK; NIELSEN, 1994; ROBERTO et al., 2016). O organismo teste *A. cepa* é considerado um eficiente indicador pois responde prontamente à genotoxicidade e fornece informações importantes sobre o mecanismo de ação de xenobiontes (REPAVICH et al., 1990; RAO; BHATTACHARYA, 1996; LAKSHMANA RAO et al., 1998; DING et al., 1999; ZEGURA; LAH; FILIPIC, 2004; GAUDIN et al., 2008).

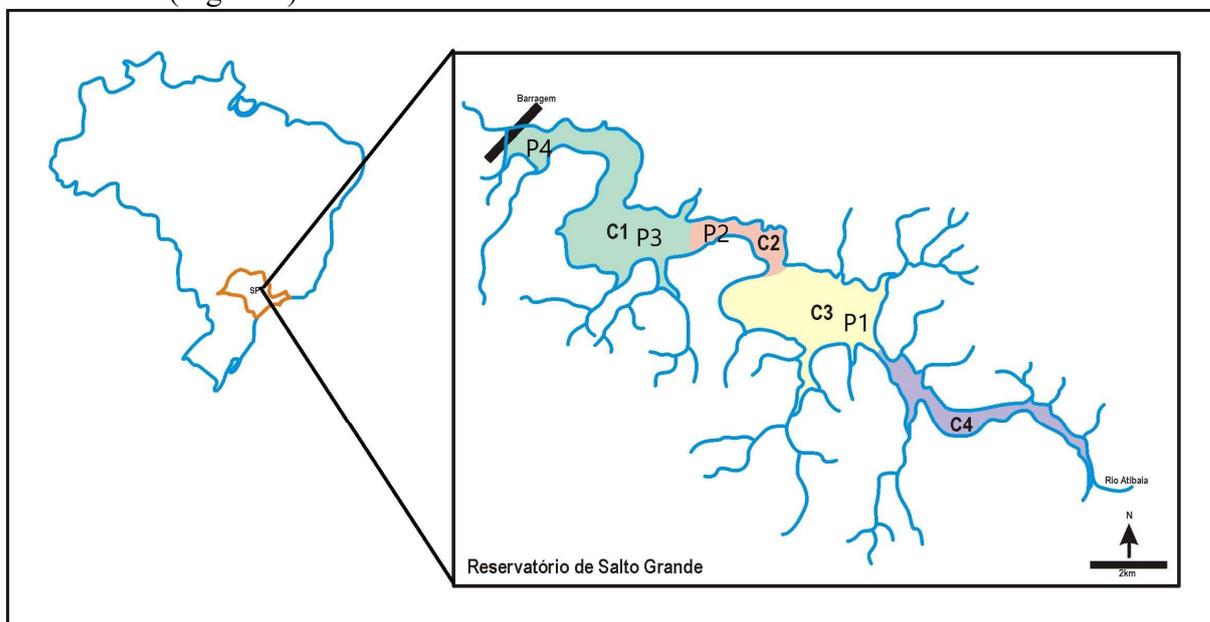
Alguns estudos indicam que há uma relação entre cianotoxinas e anormalidades cromossômicas e quebras de cromátides (MELLO; VIDAL, 1978). Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar tanto os efeitos da cianotoxina adquirida comercialmente, usada como parâmetro de efeito individual da substância em estudo, como a presente em extratos de águas coletadas durante floração de cianobactérias em um importante reservatório da cidade de Americana (estado de São Paulo-Brazil), por meio do organismo teste *Allium cepa*.

## **Materiais e métodos**

### **Microcistina LR**

Foram testadas neste estudo três concentrações de microcistina-LR (CAS N° 101043-37-2– Cayman- 95% de pureza): 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. Também foram testadas águas coletadas em quatro pontos distribuídos do reservatório de Salto Grande (Americana – SP): P1- Ponto

localizado no compartimento 3, logo após o estreitamento do compartimento 4; P2- Ponto localizado onde ocorre um estreitamento entre o compartimento 3 e 2; P3- Ponto localizado no compartimento 2; P4- Ponto localizado no compartimento 1, próximo a barragem do reservatório (Figura 1).



**Figura 1** Esquema do Reservatório de Salto Grande Americana – SP, constando os pontos de coleta. P1- ponto localizado no compartimento 3 (C3), logo após o estreitamento do compartimento 4 (C4); P2- ponto localizado onde ocorre um estreitamento entre o compartimento 2 (C2) e 1 (C1); P3- ponto localizado no compartimento 1 (C1); P4- ponto localizado no estreitamento do compartimento 1 (C1), próximo da barragem.

### Extração de Cianotoxinas de amostras ambientais

Após a coleta das amostras de água da represa com floração de cianobactérias, foram obtidos extratos (Extração de Fase Sólida – EFS) dos contaminantes orgânicos presentes nos 4 pontos coletados, por meio de cartuchos C18, considerado o mais indicado para extração de cianotoxinas. Os cartuchos foram eluídos em metanol, seguido por evaporação do metanol com  $N_2$  (G) em aparelho Manifold. O material obtido da eluição foi utilizado para a dosagem da microcistina presente nas amostras, pelo kit específico para esta cianotoxina (Abraxis, N° 522015) e para realização de testes preliminares de germinação de sementes de *A. cepa*. Diante da não germinação das sementes no extrato bruto, foram testadas diluições desses extratos, sendo selecionada a concentração de 1/10 mL (1 de extrato bruto para 10 de água Mili-Q), concentração esta que permitiu uma viabilidade de germinação superior a 80%. O Controle Negativo (CN) foi realizado em água mineral e o Controle Positivo (CP) em MMS ( $4 \times 10^{-2}$  M). Todos os ensaios foram desenvolvidos com 3 réplicas. A exposição das sementes foi contínua, durante 7 dias.

Após a germinação e crescimento das raízes (cerca de 1 cm de comprimento), as raízes foram fixadas em Carnoy 3:1 (3 partes álcool etílico PA:1 parte de ácido acético glacial PA) por 6 h, sendo, após este período, transferidas para um novo Carnoy, onde foram conservadas em geladeira, até sua utilização.

Para a realização das análises citogenéticas, as raízes foram hidrolisadas em HCl 1N a 60 ° C, durante 10 minutos, e submetidas à reação de Feulgen (LAUGHINGHOUSE et al., 2012). Para a confecção das lâminas, as regiões meristemáticas foram seccionadas em uma das extremidades da lâmina e as regiões F1 (cerca de 1mm acima da região meristemática – (DOLMAN et al., 2012)) na outra extremidade. O material foi contra corado com carmim acético 2%, para permitir uma melhor visualização das delimitações do citoplasma das células, e submetido a um esmagamento suave entre lâmina e lamínula, para a dissociação das células dos tecidos utilizados. As lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido N<sub>2(L)</sub> e as lâminas montadas em Entellan®, para serem posteriormente observadas sob microscopia de luz.

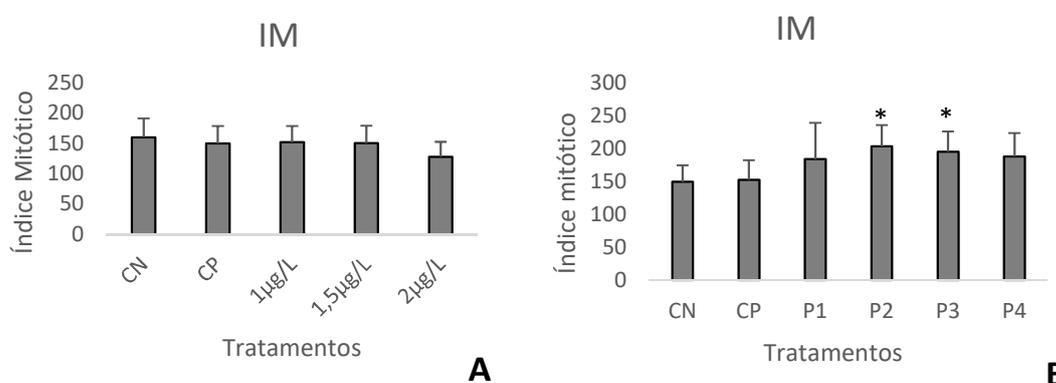
Foram analisadas 15 lâminas por tratamento, contabilizando 500 células meristemáticas de *A. cepa* por lâmina, totalizando 7.500 células para cada tratamento. Nesta análise foram determinadas e comparadas as frequências de células interfásicas, mitóticas e em processo de morte celular. A citotoxicidade foi avaliada pelo índice mitótico (IM) e pelo índice de células em processo de morte celular (IMC). Para o IM, foram consideradas as porcentagens das células em processo de divisão celular, seguindo da aplicação da fórmula:  $IM = \frac{\text{Número de células em divisão}}{\text{total de células observadas}} \times 100$ . Para o IMC foram consideradas as células com volume celular aumentado, com núcleo periféricamente posicionado e com citoplasma vacuolizado. Os (IMC) foram obtidos pela aplicação da fórmula:  $IMC = \frac{\text{Número de células em morte celular}}{\text{total de células observadas}} \times 100$ . A genotoxicidade (IAC) foi avaliada pelo número de células portadoras de aberrações cromossômicas (AC) e de anormalidades nucleares (AN), em relação às células sem alteração, segundo a fórmula:  $IAC = \frac{\text{Número de células com AC e AN}}{\text{total de células observadas}} \times 100$ . Também foram avaliadas a presença de células com micronúcleos (MN) e de células com quebras cromossômicas (QC), que foram consideradas alterações que podem promover uma maior instabilidade para a célula, pois são eventos que, se não reparados pelas células, podem se caracterizar em um potencial mutagênico (IMt). O índice (IMt) foi calculado segundo a fórmula:  $IMt = \frac{\text{Número total de células com MN e QC}}{\text{total de células observadas}} \times 100$ . Todos os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e, de acordo com a distribuição de cada grupo de dados, aplicado o teste paramétrico ANOVA com Post hoc Dunnet) ou não paramétrico Kruskal Wallis com post hoc de Dunn).

## Resultados

A dosagem da cianotoxina presente nas amostras, realizada por meio de kit de Elisa, específico para esta cianotoxina (Abraxis, N° 522015), foi de 6,23  $\mu\text{g/L}$  para P1, 6,86 para P2, 6,85 para P3 e 6,88 para P4. Esses resultados mostram que as concentrações de microcistina – LR presentes nas águas coletadas na represa, excedem ao índice de alerta da OMS, o que comprova uma alta contaminação do recurso hídrico estudado.

## Índice mitótico (IM)

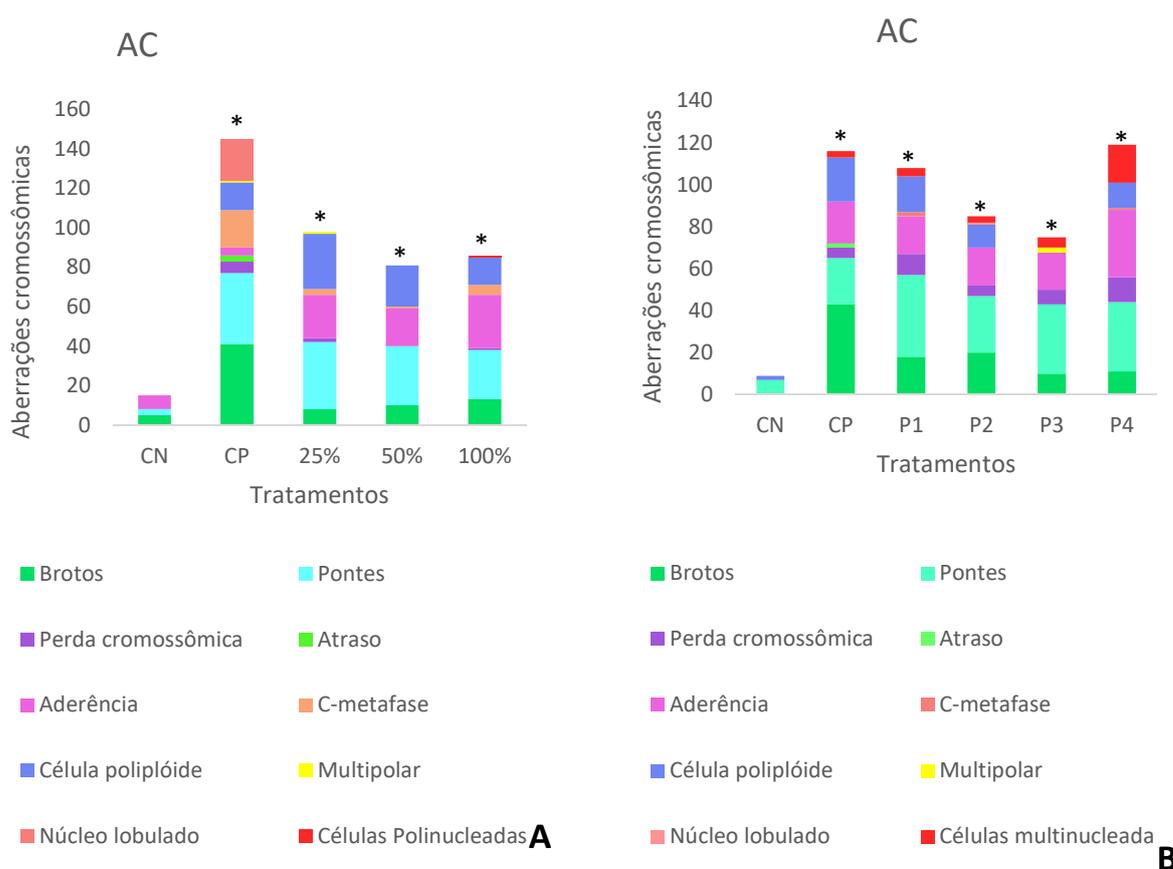
Os IMs dos grupos expostos às diferentes concentrações da microcistina pura não apresentaram diferenças significativas com o controle negativo. No entanto, pelo teste realizado com a diluição de 1:10 dos extratos obtidos das amostras de água coletadas na represa (média de  $0,66 \pm 0,22 \mu\text{g/L}$ ), pode-se observar diferenças estatisticamente significativas para os pontos de coleta P2 ( $203,60 \pm 32,31$ ) e P3 ( $192,20 \pm 30,87$ ), quando comparados com o CN ( $149,66 \pm 25,23$ ) (Fig 2), mostrando que as águas da represa apresentam uma contaminação de cianotoxina que pode conferir perigo tanto para a biota endêmica como para a saúde humana.



**Figura 2:** Índice mitótico (média e desvio padrão) observados nos testes realizados com diferentes concentrações de microcistina pura (A) e diluições de 1/10 $\mu\text{g/L}$  dos extratos das águas coletadas no reservatório de Salto Grande (B). CN- Controle Negativo; CP- Controle Positivo; P1 – Ponto 1; P2 – Ponto 2; P3 – Ponto 3 e P4- Ponto 4

## Índice de aberrações cromossômicas (IAC)

Os IACs obtidos nos ensaios realizados com as diferentes concentrações da substância pura apresentaram resultados estatisticamente significativos (Fig. 7), em relação ao CN), para todas as concentrações testadas ( $1\mu\text{g/L}$ :  $6.86 \pm 3.75$ ;  $1,5\mu\text{g/L}$ :  $5.60 \pm 3.48$ ; e  $2\mu\text{g/L}$ :  $5.73 \pm 2.34$ ). Os índices obtidos com a diluição de  $1/10\mu\text{g/L}$  dos extratos referentes aos diferentes pontos de coleta na represa também apresentaram diferenças estatisticamente significativas (P1:  $7.26 \pm 6.43$ ; P2:  $6.20 \pm 4,83$ ; P3;  $5.00 \pm 2.22$ ; e P4:  $8.53 \pm 4.47$ ), quando comparados ao CN ( $0.60 \pm 0.95$ ) (Figura 3).

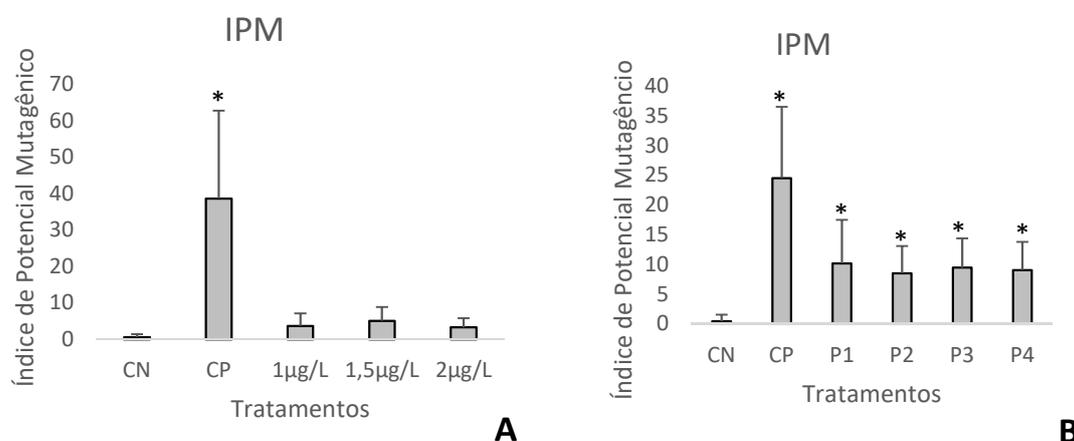


**Figura 3** Aberrações cromossômicas (AC) observadas nos testes realizados com diferentes concentrações de microcistina pura (A) e diluições de  $1/10\mu\text{g/L}$  dos extratos das águas coletadas no reservatório de Salto Grande (B). CN- Controle Negativo; CP- Controle Positivo; P1 – Ponto 1; P2 – Ponto 2; P3 – Ponto 3 e P4- Ponto 4

### Índice de potencial mutagênico (IPM)

Os resultados dos ensaios de IPM realizados com as diferentes concentrações da substância pura não se mostraram estatisticamente diferentes para nenhuma das concentrações quando comparadas com o CN ( $0,66 \pm 0,81$ ). Já os testes realizados com os extratos da água do reservatório (em diluição de  $1/10\mu\text{g/L}$ ), foi observado diferenças estatisticamente significativas para todos os pontos P1 ( $10,20 \pm 7,30$ ), P2 ( $8,53 \pm 4,58$ ), P3 ( $9,46 \pm 4,92$ ) e P4 ( $9,06 \pm 4,72$ ), quando comparados com o CN ( $0,46 \pm 1,12$ ) (Figura 4). Esses resultados mostram que a contaminação

da represa por microcistina - LR, derivada da floração da cianofíceia, inferiu um alto potencial mutagênico para as suas águas, inviabilizando a água para consumo público.

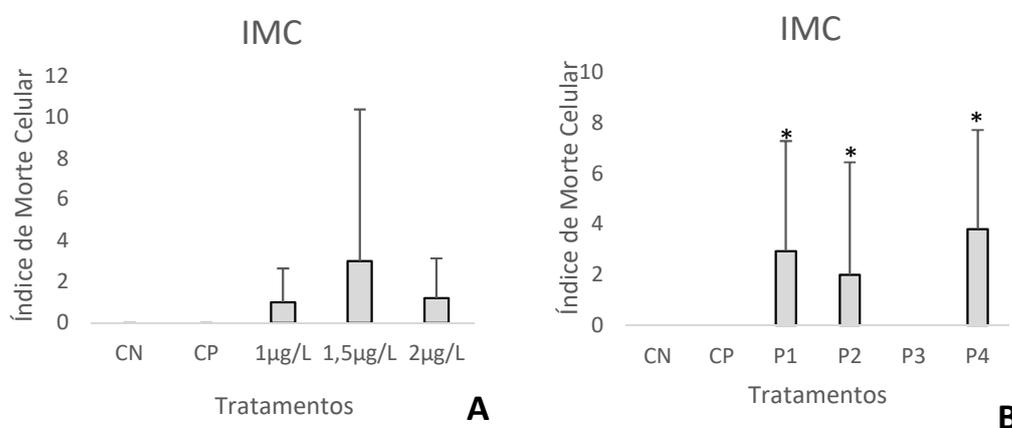


**Figura 4** Índice de potencial mutagênico (IPM) observadas nos testes realizados com diferentes concentrações de microcistina pura (A) e diluições de 1/10 µg/L dos extratos das águas coletadas no reservatório de Salto Grande (B). Índice de potencial mutagênico (IPM) observadas nos testes realizados com diferentes concentrações de microcistina pura (A) e diluições de 1/10 µg/L dos extratos das águas coletadas no reservatório de Salto Grande (B).

### Índice de morte celular (IMC)

Os IMCs observados para a substância pura não indicaram diferenças significativas, quando comparados ao CN, diferentemente dos resultados obtidos para os ensaios realizado com as diluições de 1/10 µg/L dos extratos das águas coletadas, que exibiram diferenças significativas, em relação ao CN (0,00±0,00), para os P1 (2,93±4,35), P2 (2,00±4,44) e P4 (3,80±3,91) (Figura 5).

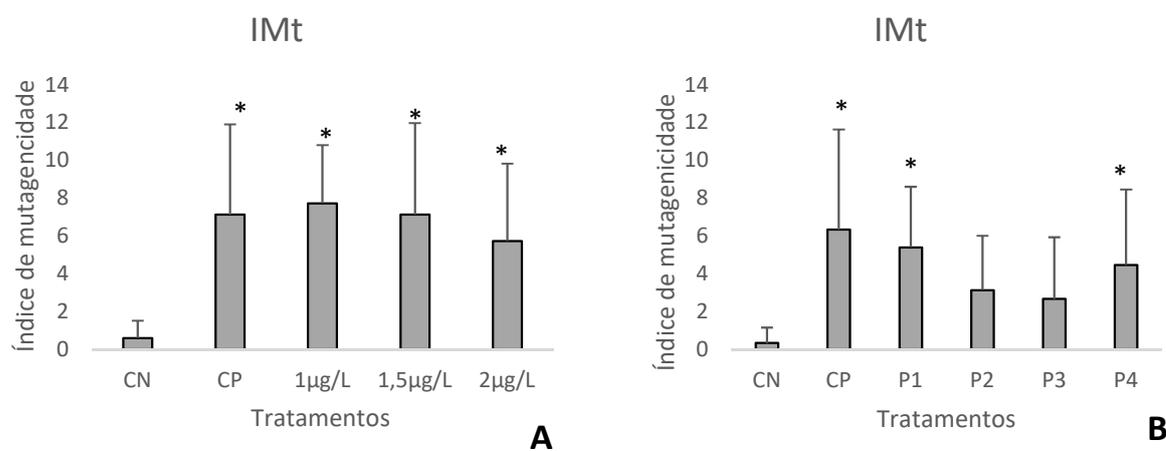
Os resultados dos IMCs mostraram que as águas da represa apresentaram, no período de floração das cianobactérias, um alto potencial tóxico.



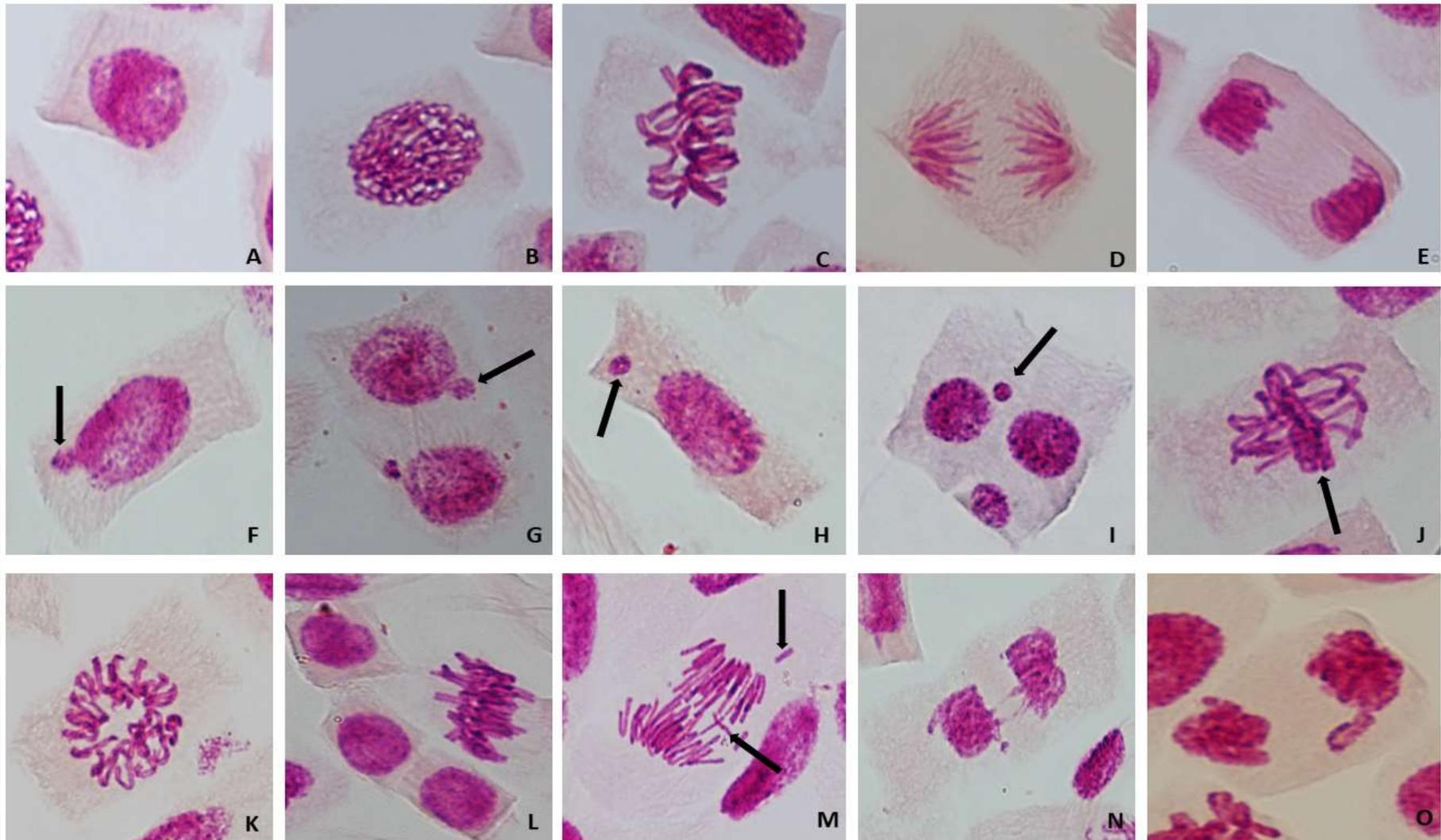
**Figura 5** Índice de morte celular (media e desvio padrão) observados nos testes realizados com diferentes concentrações de microcistina pura (A) e diluições de 1/10 µg/L dos extratos das águas coletadas no reservatório de Salto Grande (B). CN- Controle Negativo; CP- Controle Positivo; P1 – Ponto 1; P2 – Ponto 2; P3 – Ponto 3 e P4- Ponto 4

### Índice de Mutagenicidade (IMt)

Os IMts dos testes realizados com as diferentes concentrações preparadas com microcistina pura apresentaram resultados estatisticamente diferentes ( $1\mu\text{g/L}$ :  $7,73\pm 3,08$ ;  $1,5\mu\text{g/L}$ :  $7,13\pm 4,83$  e  $2\mu\text{g/L}$ :  $5,73\pm 4,09$ ) dos valores obtidos no CN ( $0,60\pm 0,91$ ). Os testes realizados com os extratos da água do reservatório mostraram que apenas o P1 ( $5,40\pm 3,20$ ) e P4 ( $4,46\pm 3,99$ ) foram estatisticamente diferentes do CN ( $0,33\pm 0,81$ ) para esse índice avaliado (Figura 6). Esses resultados mostram que a água da represa, em alguns pontos específicos, apresentou, durante a floração por cianobactéria, um potencial mutagênico.



**Figura 6** Índice de mutagenicidade (media e desvio padrão) observados nos testes realizados com diferentes concentrações de microcistina pura (A) e diluições de  $1/10\mu\text{g/L}$  dos extratos das águas coletadas no reservatório de Salto Grande (B) CN- Controle Negativo; CP- Controle Positivo; P1 – Ponto 1; P2 – Ponto 2; P3 – Ponto 3 e P4- Ponto 4



**Figura 7** Células meristemáticas de *Allium cepa* expostas ao controle negativo (A-E) e aos tratamentos com microcistinas (F-O) **A:** Interfase **B:** Prófase **C:** Metáfase **D:** Anáfase **E:** Telófase **F:** Interfase com Broto nuclear; **G:** Célula binucleada com brotos nucleares; **H:** Interfase com micronúcleo; **I:** Célula binucleada com micronúcleo e com microcito associado; **J:** Metáfase com aderência; parcial dos cromossomos; **K:** C- Metáfase; **L:** Metáfase Poliplóide **M:** Anáfase com quebras cromossômicas; **N:** Telófase com pontes cromossômicas; **O:** Telófase com perda cromossômica.

## Discussão

O declínio da qualidade dos corpos hídricos é um problema de ordem mundial (DROBAC et al., 2013) causado principalmente por fatores relacionados ao aumento de descartes de poluentes pela indústria e pela urbanização, o aumento do uso dos agroquímicos e a degradação dos ambientes naturais.

As agressões aos ambientes aquáticos geram eutrofização, o que é fator determinante para o aumento de florações de cianobactérias, microorganismos estes produtores de cianotoxinas (DROBAC et al., 2013). As cianotoxinas podem causar danos aos organismos, caracterizando-se em um problema de saúde ambiental (DROBAC et al., 2013). Por esta razão, é de extrema importância a realização de ensaios que permitam avaliar os efeitos destas toxinas sobre o material genético dos organismos expostos e compreender o seu modo de ação tanto isoladamente como em associação com outros poluentes presentes no ambiente.

Neste estudo foi possível observar que, quando o organismo foi exposto à microcistina pura, não houve alteração do índice mitótico, em relação ao resultado do CN. Esse resultado indicou que a substância pura, nas concentrações testadas, não levou a nenhuma alteração na divisão celular, contrariando os estudos de Lankoff et al. (2003), realizados com a cultura celular CHO-K1, onde os autores observaram a indução de um aumento do índice mitótico, mas corroborando os estudos de Pflugmacher (2002), onde os autores observaram redução do crescimento da planta *Ceratophyllum demersum*, quando submetida a concentração de 1 µg/L de microcistina. Esta discordância entre os resultados é explicada por Gehringer (2004) e Máthé et al. (2013), que afirmam que esta resposta dualista pode ser devido à dose ou ao tempo de exposição à cianotoxina, sendo que baixas doses e exposição aguda levariam ao aumento do índice de divisão celular, enquanto que altas doses ou exposições crônicas podem levar a inibição desse índice.

Os testes realizados com diluições dos extratos obtidos de amostras de águas coletadas no P2 (concentração de 0,686 µg/L) e P3 (concentrações de 0,685 µg/L) da Represa de Salto Grande, em período de floração de cianobactérias, mostraram que houve um aumento dos índices mitóticos, em relação ao CN, corroborando os resultados dos autores anteriormente citados, que afirmam que baixas concentrações de microcistina levam a um aumento de índice mitótico. Nossos resultados reforçam essa afirmação, pois concentrações muito maiores que as testadas por esses autores, preparadas com a substância pura, se mostraram menos tóxicas que as baixas concentrações presentes nas diluições das amostras ambientais.

O aumento do IAC observado nos ensaios realizados com todas as diluições dos extratos das amostras ambientais, como com as concentrações preparadas com a substância pura, comprova que a microcistina – LR tem um alto potencial genotóxico.

Embora haja estudos sobre o potencial mutagênico e genotóxico de extratos de amostras contendo MCLR, bem como da própria substância pura, Zegura (2016) afirma que os resultados encontrados ainda são inconclusivos. Contudo, os nossos resultados mostram que houve um aumento estatisticamente significativo do IAC para todos os tratamentos realizados, quando comparados com o CN. Ainda quanto ao endpoint IAC, as diluições dos extratos apresentaram médias dessas alterações maiores que as médias obtidas nos ensaios com a substância pura, o que pode indicar a presença de outros compostos no extrato que aumentam a toxicidade e genotoxicidade da amostra, resultados estes semelhantes aos encontrados por (LANKOFF et al., 2004).

Os ensaios realizados com os extratos obtidos da extração de fase sólida dos pontos de coleta da represa de Salto Grande exibiram índices de IPM estatisticamente significativos para todos os pontos amostrados. Esses resultados são corroborados pelos estudos de (LANKOFF et al., 2006), onde os autores atribuem essa mutagenicidade das amostras ambientais a um efeito sinérgico entre o composto alvo de estudo e outras substâncias presentes na amostra, uma vez que as amostras ambientais apresentam uma composição complexa, que pode levar a uma maior toxicidade, quando comparada com os efeitos da substância pura.

A incidência de MNs em bioensaios realizados com a MCLR purificada e com os extratos obtidos do ambiente da represa contaminada por esta cianotoxina pode ser atribuída à ação clastogênica deste composto, conforme descrito nos estudos realizados com linfócitos humanos (ZEGURA, 2016) e com células CHO-K1 de hamster chinês (ZEGURA, 2016).

O IMC é um parâmetro utilizado para avaliar a citotoxicidade de amostras ambientais ou de compostos químicos. Como já apresentado anteriormente, a MCLR pode apresentar efeitos, que podem variar desde proliferação até morte celular (ZEGURA, 2016). Este parâmetro não apresentou diferenças estatisticamente significativas para a substância pura, mas foi significativo para três dos quatro pontos amostrados (P1, P2 e P4). Chen e Xie (2016) e Ma et al. (2016) afirmam que a citotoxicidade da MCLR está ligada, principalmente, à uma inibição específica de serina/treonina fosfatase 1A e 2A (FF1 e FF2), o que resulta em uma hiperfosforilação de proteínas chaves, que leva a apoptose. Esta ação pode estar sendo magnificada por outras substâncias também presentes nestes pontos, conforme citado por ESTERHUIZEN-LONDT et al. (2016).

De acordo com (MEREL et al., 2013)), as MCs podem inibir o mecanismo de reparo de DNA, por meio da inibição da FF1 e FF2A, enzimas estas relacionadas com o reparo por excisão de nucleotídeos. O IMt foi avaliado pela presença de MN em células F1 de *A. cepa*, conforme indicação de (WERNER, 2002; SANT'ANNA et al., 2008). Os resultados encontrados em nosso estudo podem estar relacionados com falhas no mecanismo de reparo, onde os danos genotóxicos observados nas células meristemáticas persistiram nas células F1, sob a forma de MN.

### Conclusões

Diante dos dados encontrados neste estudo, podemos concluir que 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 conseqüentemente com uma ação clastogênica sobre o DNA. Podemos ainda acrescentar que, em amostras complexas, o efeito tóxico da microcistina pode ser amplificado por outras substâncias presentes no ambiente e, por isso, induzir processos apoptóticos decorrentes de hiperfosforilação de proteínas chaves da fisiologia celular. Como os estudos toxicogenéticos da MCLR ainda são escassos e com resultados inconsistentes, entendemos que são necessários mais estudos nesta área, para se ter uma compreensão melhor e mais detalhada dos efeitos desta cianotoxina para o meio biológico e para a saúde pública, principalmente quando está presente em amostras ambientais, uma vez que baixas concentrações desta toxina em amostras ambientais já são suficientes para promover danosos severos aos organismos.

### Referências Bibliográficas

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>>.

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>>.

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>>.

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](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000100013&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>.

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.

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>>.

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>>.

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>>.

DROBAC, D.; TOKODI, N.; SIMEUNOVIĆ, J.; BALTIC, 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.

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>>.

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>>.

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>>.

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>>.

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>>.

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>>.

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>>.

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>>.

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>>.

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>>.

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. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.051>>.

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>>.

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>>.

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.; MALAGUTTII, 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](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>>.

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>>.

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>>.

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>>.

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>>.

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>>.

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>>.

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>>.

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>>.

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.

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.

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>>.

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.; LAH, T. T.; FILIPIC, 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>>.

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>>.

## 5.2 ARTIGO 2.

### Danos no DNA induzidos por endotoxinas e exotoxinas de biomassa e meio de cultura de cianobactéria

Maria Tereza Pamplona-Silva<sup>1</sup>; Leticia Cristina Gonçalves<sup>1</sup>; Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira<sup>2</sup>; Maria Aparecida Marin-Morales<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>UNESP – Univ Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Av 24-A, 1515, CEP 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ, Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias 11, 13418-900, Piracicaba, São Paulo, Brasil

\*Autor correspondente. Tel.: +55 19 3526 4143; fax: +55 19 35360009.

e-mail: mamm@rc.unesp.br

### Resumo

As cianobactérias são procariontes envolvidos com contaminação de ambientes aquáticos por toxinas altamente potentes e perigosas para os organismos vivos. Dentre as toxinas desses procariontes estão as endo e exotoxinas. A literatura traz que as exotoxinas são altamente tóxicas, mas que as endotoxinas têm uma ação tóxica mais branda. Com base nessas descrições, este trabalho avaliou os efeitos toxicogênicos da endotoxina, por meio de ensaios com as diferentes concentrações de biomassa de cianobactérias (1 µg/L, 1,5 µg/L, 2 µg/L), e de meio de cultivo contendo exotoxina, na concentração de 10% do extrato do meio onde as cianobactérias foram cultivadas. Os resultados mostraram que todas as concentrações da biomassa (ação da endotoxina) e da exotoxina induziram alterações genotóxicas e mutagênicas em *Allium cepa*, mostrando que, mesmo em baixas concentrações, essas toxinas são altamente potentes para desencadear alterações na molécula do DNA de organismos a elas expostos. Essas informações são altamente importantes para serem consideradas em contaminações ambientais por florações de cianobactérias, pois alertam que essas toxinas podem, além de causar a morte de organismos, quando em altas concentrações, induzir mutações, em baixas concentrações, que se expressarão tardiamente nos organismos, impossibilitando a associação do efeito observado com o evento indutor do dano.

Palavras-chave: *Allium cepa*; biomassa; micronúcleos; aberrações cromossômicas; cianotoxinas

## Introdução

As cianobactérias são organismos que podem ser unicelulares ou filamentosos, podendo se apresentar individualizados ou agrupados em colônias. Estes organismos são procariotos fotoautotróficos, que realizam fotossíntese de forma semelhante à realizada nos cloroplastos de plantas e algas, mesmo não possuindo essas plastídeos (SANT'ANNA et al., 2008). As cianobactérias possuem características de algas, como clorofila *a* e pigmentos acessórios fotossintetizantes organizados nos tilacóides, (CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006) e de bactérias, como estrutura celular de procarionte (ZEGURA; STRASER; FILIPIČ, 2011; MOWE et al., 2014). Estes procariotos, que se apresentam organizados apenas na classe Cyanobacteria, tem uma grande plasticidade ecológica, podendo ser encontrados em habitats dulcícolas, marinhos, fontes termais, regiões polares, no nível do mar e em montanhas de altitudes, troncos arborícolas, na neve e nas areias do deserto (CARMICHAEL, 2001; NIAMIEN-EBROTTIE et al., 2015).

Existe uma grande preocupação com a presença dessas cianobactérias no ambiente pois elas podem produzir compostos tóxicos, denominados de cianotoxinas, que são perigosos para o ecossistema e para a saúde humana (CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006; MACHADO, 2016). Estas toxinas podem ser produzidas por várias espécies diferentes de cianobactérias ou também por populações diferentes de uma mesma espécie. Desta forma, as cianobactérias podem sintetizar compostos com diferentes toxicidades, que podem variar de muito tóxicos a não tóxicos (MOLICA; AZEVEDO, 2009; MONTGOMERY, 2017).

As cianotoxinas podem estar ligadas a estrutura celular da cianobactéria (endotoxinas) ou serem exportadas para o meio onde a bactéria se encontra (exotoxinas). As endotoxinas são constituintes da parede celular das cianobactérias, e geralmente são liberadas no ambiente quando estas morrem. Já as exotoxinas são compostos específicos e de alta toxicidade, cujo motivo da liberação pelas bactérias ainda é pouco conhecido (GARCIA, 2001). Sabe-se que exotoxinas são liberadas nas ocorrências de grandes florações de cianobactérias e que as endotoxinas podem também atingir o meio, quando as águas contaminadas por esses procariontes são tratadas, por exemplo, por algicidas. Estes tratamentos promovem a lise celular, com a consequente liberação das toxinas e elevação da toxicidade do ambiente (CARMICHAEL, 1992; SAITO et al., 2003; JAKUBOWSKA; SZELAĞ-WASIELEWSKA, 2015; MONTGOMERY, 2017). Tanto as endotoxinas como as exotoxinas despertam grande preocupação, pois podem estar envolvidas com envenenamento de animais e do homem, pois a toxicidade das cianobactérias pode se dar pelo consumo das próprias células bacterianas, pelo

consumo de outros animais que consumiram as cianobactérias ou ainda por consumo de águas contaminadas com cianotoxinas. O risco para os humanos irá depender dos níveis de consumo desses organismos contaminados ou do consumo ou contato com águas contaminadas (MELLO; VIDAL, 1978).

Dentre as exotoxinas, destacam-se as microcistinas, principalmente por serem compostos hepatotóxicos. A microcistina é um heptopeptídeo cíclico que pode se apresentar em várias configurações, alterando, assim, a sua toxicidade (CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006). Esta toxina vem despertando maior atenção em florações das cianobactérias, por serem as encontradas em maior quantidade e frequência nos corpos d'água.

Diante dos perigos que as cianotoxinas representam para a vida aquática e para a saúde ambiental e pela toxicidade comprovada das endo e exocianotoxinas, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos toxicogênicos desses compostos, por meio de ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade, desenvolvidos com o bioindicador *Allium cepa*. As avaliações dos efeitos das endotoxinas foram feitas com biomassa de cianobactérias obtidas de cultivo desses organismos e as avaliações das exotoxinas, com o extrato do meio onde as cianobactérias foram cultivadas.

## **Materiais e métodos**

### **Obtenção do meio e extrato contaminado com microcistina**

Para a obtenção das microcistinas, foi utilizada uma linhagem da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (BCCUSP 232), fornecida pela Prof<sup>a</sup> Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira, do departamento de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo/ ESALQ. Os ensaios de cultivo das cianobactérias, tanto para obtenção de biomassa do procarionte como do extrato do meio de cultivo contendo as microcistinas, foram realizados no Laboratório da Prof<sup>a</sup> Maria do Carmo, sob a orientação da referida pesquisadora.

A extração das exotoxinas presentes no meio de cultivo foi realizada por Extração de Fase Sólida (EFS), utilizando para esse procedimento o cartucho C18. Depois dos cartuchos serem eluídos em metanol (100% de pureza) foi realizada a dosagem da microcistina no extrato obtido, por meio de kit de Elisa específico para esta cianotoxina (Abraxis, N° 522015).

### **Teste de *Allium cepa***

Para os testes de toxicogênica realizados com a endotoxina (biomassa de cianobactérias), as sementes da espécie *A. cepa* foram expostas a germinação por 7 dias, em três diferentes concentrações da biomassa da cianobactéria diluídas em água mineral (1µg/L,

1,5 µg/L, 2µg/L). Para avaliar a ação da exotoxina dessas bactérias, as sementes foram submetidas a uma solução de 10% do extrato de meio de cultura (diluição em água mineral) que continha as cianotoxinas. O controle negativo (CN) foi realizado com água mineral e o Controle positivo (CP) em Metil Metano Sufonato (MMS) na concentração de  $4 \times 10^{-2}$  M. Todos os ensaios foram realizados em três réplicas. Posteriormente à germinação, as raízes foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 (3 partes álcool etílico PA:1 parte de ácido acético glacial PA) por 6 h, sendo, após este período, transferidas para um novo Carnoy, onde foram conservadas em geladeira, até sua utilização.

Para a realização das análises citogenéticas, as raízes coletadas foram submetidas à reação de Feulgen (CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006), com hidrólise ácida em HCl 1N a 60° C, durante 10 minutos e exposição ao reativo de Schiff, por duas horas. As regiões meristemáticas e as regiões F1 das raízes foram seccionadas em lâminas contendo carmim acético e submetidos a um esmagamento suave entre lâmina e lamínula. As lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido ( $N_2(L)$ ) e as lâminas montadas em resina sintética, para posterior observação.

Foram analisadas 15 lâminas por tratamento, contabilizando 500 células meristemáticas de *A. cepa* por lâmina, totalizando 7.500 células para cada tratamento realizado. As análises realizadas neste estudo foram usadas para a determinação das diferentes frequências de células do ciclo celular, presença de células portadoras de aberrações cromossômicas e presença de células em processo de morte. A citotoxicidade foi avaliada pelo índice mitótico (IM), que foi baseado no número de células das diferentes fases do ciclo celular, segundo a fórmula  $IM = \text{número de células em divisão} / \text{total de células observadas} \times 100$ , e pelo índice de células em processo de morte celular (IMC), seguindo da fórmula  $IMC = \text{número de células em morte celular} / \text{total de células observadas} \times 100$ . A genotoxicidade foi avaliada pela obtenção do índice de aberrações cromossômicas (IAC), baseado na presença de células portadoras de aberrações cromossômicas (AC) e anormalidades nucleares (AN), seguindo a fórmula:  $IAC = \text{número de células com AC e AN} / \text{total de células observadas} \times 100$ . Também foram avaliadas neste estudo a ocorrência de células portadoras de micronúcleos (MN) e de quebras cromossômicas (QC), cujos resultados da análise foram utilizados para avaliar instabilidade cromossômica, que denominamos de índice de potencial mutagênico (IPM). É sabido que, se eventos como MN e QC não forem reparados ou forem reparados erradamente pelas células, pode haver indução de mutações. O IPM foi calculado, segundo a fórmula:  $IPM = \text{Número total de células com MN e QC} / \text{Total de células observadas} \times 100$ . Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e, de acordo com a distribuição de cada grupo

de dados, foi aplicado o teste estatístico mais indicado. Para os dados paramétricos foi aplicação o teste ANOVA, com Post hoc de Tukey, e para os não paramétricos o Kruskal Wallis, com post hoc de Dunn.

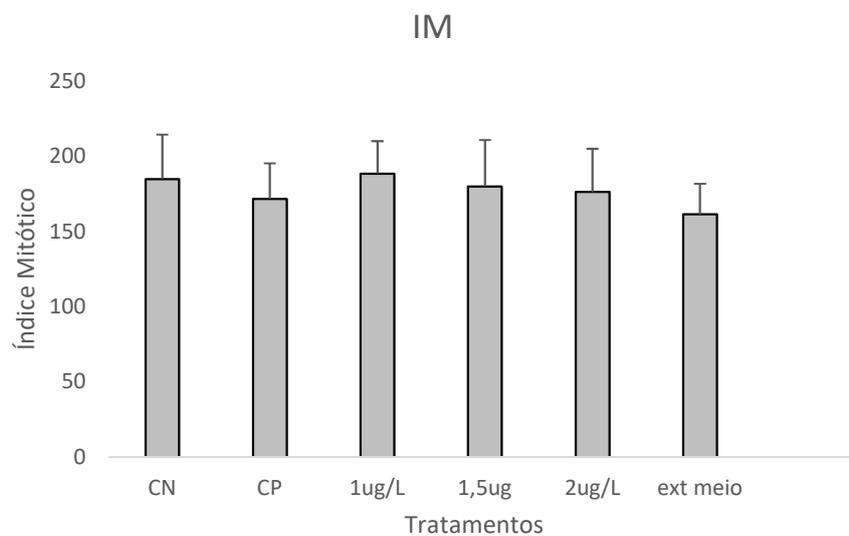
## Resultados

### Dosagem da Microcistina

A dosagem de microscistina realizada com kit de Elisa (Abraxis, N° 522015) detectou uma concentração de 0,689  $\mu\text{g/L}$  desta cianotoxicina no extrato do meio de cultivo.

### Índice mitótico

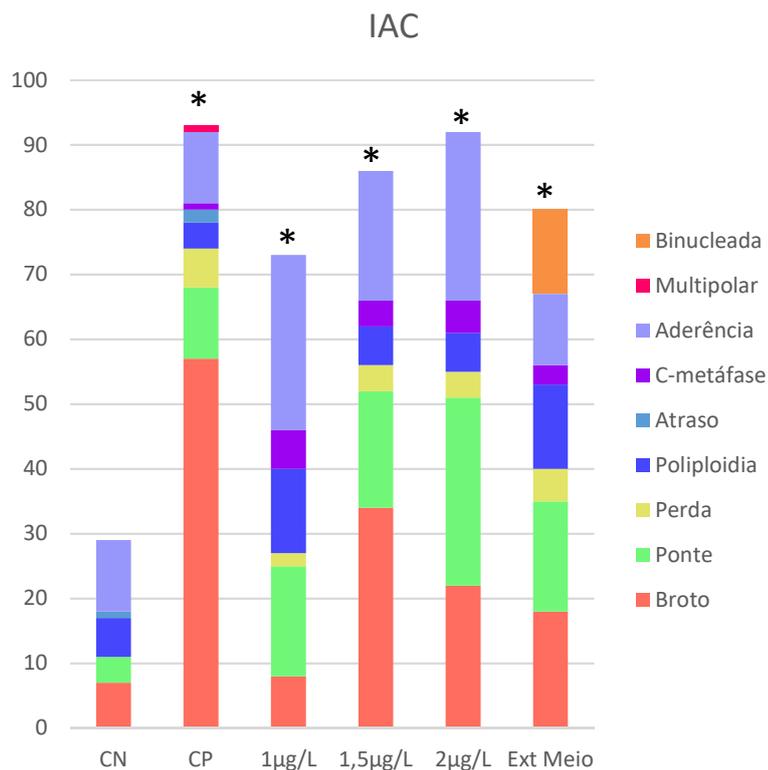
Os índices mitóticos das raízes de *A. cepa* expostas às diferentes concentrações da biomassa e ao extrato do meio de cultivo, não apresentaram diferença significativa em relação aos resultados do CN (Figura 1) (Teste de normalidade Shapiro-wilk e Teste paramétrico ANOVA/Tukey).



**Figura 1** Resultados dos ensaios de índice mitótico (IM) realizados com as raízes submetidas às diferentes concentrações da biomassa de cianobactéria (expressas em  $\mu\text{g/L}$ ) e com a solução de 10 % do extrato do meio de cultivo.

### Índice de aberrações cromossômicas (IAC)

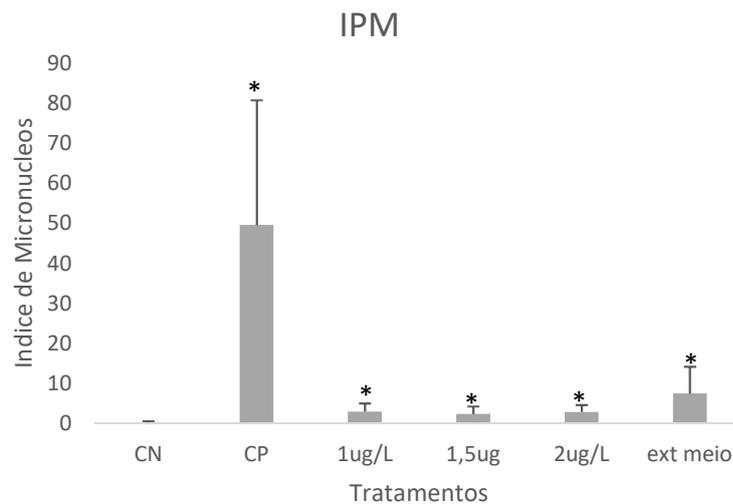
Todos os tratamentos foram estatisticamente significativos (teste de normalidade Shapiro-wilk e Teste paramétrico ANOVA/Tukey), quando comparados com os resultados do CN (Figura 2). Sendo que os índices foram dose-dependentes, quanto maior a concentração, maior o número de aberrações apresentados.



**Figura 2.** Resultados dos ensaios de aberrações cromossômicas (AC) realizadas com as raízes submetidas às diferentes concentrações da biomassa de cianobactéria (expressas em  $\mu\text{g/L}$ ) e com a solução de 10 % do extrato do meio de cultivo.

### Índice de potencial mutagênico (IPM) de células meristemáticas

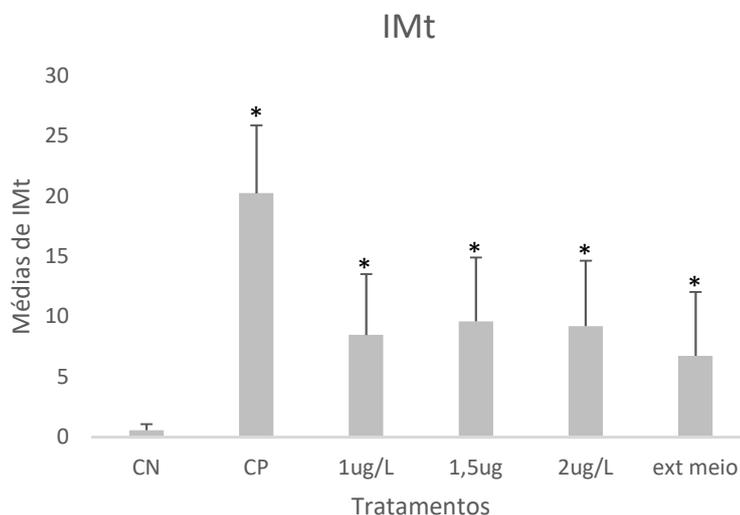
Os resultados de todos os tratamentos realizados foram estatisticamente significativos, quando comparados com o CN. (Figura 3) (Teste de normalidade Shapiro-wilk e Teste paramétrico ANOVA/Tukey).



**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  $\mu\text{g/L}$ ) e com a solução de 10 % do extrato do meio de cultivo.

### Índice de Mutagenicidade (IMt) de células F1

Na análise de células F1, todos os tratamentos apresentaram significância estatística, quando comparado com o CN (Figura 4).



**Figura 4** Resultados dos ensaios de índice de micronúcleos (IMN) realizados com células F1 de raízes submetidas às diferentes concentrações da biomassa de cianobactéria (expressas em  $\mu\text{g/L}$ ) e com a solução de 10 % do extrato do meio de cultivo.

### Discussão

Diante dos resultados encontrados, ficou evidente a toxicidade da biomassa de cianobactéria, portanto das endotoxinas desse grupo de bactéria, bem como do extrato do meio

de cultivo desses procariontes, conferida pelas exotoxinas das cianobactérias, para todas as concentrações estudadas. A toxicidade das endotoxinas está ligada à presença de polissacarídeos ou glicofosfolípídeo denominado de lipídios “A”. Esses compostos possuem propriedades tóxicas fracas, mas potencialmente fatais em altas doses. Já a toxicidade das exotoxinas são conferidas por polipeptídeos altamente tóxicos, mesmo quando em baixas concentrações (CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006).

Apesar das endotoxinas serem consideradas toxinas fracas, nossos estudos comprovaram um potente potencial tóxico para as endotoxinas derivadas de cianobactérias, pois observamos que todas as concentrações de biomassa utilizadas neste estudo desencadearam processos toxicogênicos significativos no organismo teste *A. cepa*. Esses resultados indicam que ambientes com floração de cianobactérias podem levar organismos associados ao local contaminado à morte e essas mortes podem aumentar ainda mais os processos de eutrofização desses ambientes. Os resultados comprovam, então, um alto potencial tóxico para as endocianotoxinas. Contudo, estudos *in vitro* realizados por Lakshmana Rao et al. (1998), com as doses 25, 50, 100 e 150 mg/mL da biomassa de *Microcystis aeruginosa* (UTEX 2385) e com as concentrações de 0,25, 0,50, 1 e 2 mg/mL da toxina MCLR, mostraram que os danos causados no DNA, foram maiores nas células tratadas com MCLR do que com a biomassa. Os autores registraram a presença de alterações nucleares do tipo fragmentação nuclear, que foi relacionada a processo de morte celular, processo este não registrado entre os resultados do nosso estudo. Em contrapartida, mais recentemente, (DING et al., 1999; ZEGURA, 2016) expuseram o organismo *A. cepa* ao extrato de *Microcystis aeruginosa* (NPCD-1) e obtiveram resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo. Além da grande presença de danos genotóxicos, os autores ainda destacam o aumento significativo de micronúcleos e de alterações citogênicas dos tipos cromossomos em anel e cromossomos dispostos de forma desorganizada nas células, alterações estas também registradas em nosso estudo. Estas alterações podem estar ligadas a alterações no citoesqueleto celular que, segundo (ZEGURA, 2016), é uma via de sinalização da ação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). Essa ativação pode promover a hiperfosforilação das proteínas responsáveis pela manutenção da organização do citoesqueleto e, conseqüentemente a desorganização celular durante a divisão.

Em um dos primeiros estudos realizados para avaliar a genotoxicidade de extratos isolados do ambiente (ZEGURA, 2016), foi destacado um aumento de quebras no DNA dose dependente à presença de biomassa de cianobactérias. Em nossos estudos, também encontramos

uma relação diretamente proporcional entre o aumento de genotoxicidade e a concentração de biomassa desses organismos.

Quanto ao potencial mutagênico de cianotoxinas, os dados de literatura ainda são pouco precisos e ainda controversos. Os estudos trazem tanto resultados positivos como negativos para este parâmetro de análise. Esses resultados controversos para mutagenicidade de extratos de cianotoxinas obtidos de amostras ambientais são discutidos por Zegura (2016), como sendo decorrente da presença de outros interferentes presentes na amostra (ZEGURA, 2016). Neste estudo, entretanto, encontramos resultados estatisticamente significativos para mutagenicidade, nos extratos obtidos em cultura de laboratório, contrapondo as afirmações do autor acima citado.

Os resultados encontrados no presente estudo corroboram os dados de Epavich et al. (1990), que mostraram efeitos clastogênicos da toxina MCLR para linfócitos humanos. Nossos resultados também corroboram os resultados de (LAUGHINGHOUSE et al., 2012), onde os autores observaram, pelo teste de Ames, ação mutagênica para baixas concentrações de cianotoxinas presentes em amostras ambientais.

A ação mutagênica da microcistina, foi confirmada por (DEMOTT; ZHANG; CARMICHAEL, 1991; ZEGURA; STRASER; FILIPIČ, 2011; MÉJEAN; PLOUX, 2013), por meio de ensaios realizados com células híbridas. Os autores citam que a mutagenicidade da MCLR pode estar relacionada com a interação dessa toxina com as mitocôndrias. Segundo eles, a exposição a MCLR pode levar a um aumento de monóxido de nitrogênio (NO) na célula e, conseqüentemente, a uma disfunção mitocondrial, que pode levar à liberação de ânions superóxidos. Esses ânions podem reagir com NO, formando peroxinitrito reativo, que podem induzir mutações por hidroxilação e nitração do DNA.

### **Conclusões**

Nossos estudos trazem informações importantes e adicionais às já descritas para a ecotoxicogenética de toxinas de uma das cianobactérias mais relacionadas a florações de recursos hídricos dulcícolas (*M. aeruginosa*). Nossos dados confirmam a ação genotóxica e mutagênica já descrita por alguns autores tanto para a endo como para a exotoxina de *M. aeruginosa*, mas mostram ainda que, independente do organismo teste usado nos ensaios, esta toxina é altamente potente para desencadear eventos mutacionais na molécula de DNA. Os resultados dos estudos já realizados com as cianotoxinas alertam sobre os perigos imediatos que as florações de cianobactérias podem conferir à biota endêmica e à saúde humana, pois as toxinas derivadas destas florações podem levar os organismos à morte. Contudo, nossos estudos alertam ainda para uma preocupação sobre a contaminação por baixas concentrações desta

toxina, pois estas podem induzir mutações no material genético, que poderão ser detectadas tardiamente a exposição, o que impossibilitará relacionar o efeito observado com a causa indutora do dano.

### Referências bibliográficas

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.

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. 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>>.

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.

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>>.

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.

JAKUBOWSKA, N.; SZELAĞ-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/>>.

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>>.

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>>.

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>>.

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>>.

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.

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>>.

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](http://www.allresearchjournal.com)>.

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>>.

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>>.

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>>.

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

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>>.

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.; 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>>.

### 5.3 ARTIGO 3.

#### **Alta genotoxicidade de amostras ambientais contaminadas com microcistina em relação a toxicidade da microcistina-LR purificada, comprovam sinergismo da toxina com os estressores do ambiente.**

Maria Tereza Pamplona-Silva<sup>1</sup>; Letícia Cristina Gonçalves<sup>1</sup>; Maria Aparecida Marin-Morales<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>UNESP – Univ Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Av 24-A, 1515, CEP 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

\*Autor correspondente. Tel.: +55 19 3526 4143; fax: +55 19 35360009.

e-mail: mamm@rc.unesp.br

#### **Resumo**

O aumento da industrialização e do desenvolvimento das populações tem gerado grandes danos aos corpos hídricos, o que resulta em um aumento na concentração de nutrientes, gerando eutrofização dos ambientes aquáticos. Ambientes eutrofizados são propícios para florações de cianobactérias e, conseqüentemente para produção de toxinas perigosas à saúde ambiental e humana. Diante da preocupação com o aumento destas toxinas nos ambientes, este estudo teve como objetivo avaliar e comparar os efeitos da substância microcistina-LR e dos extratos das águas do reservatório de Salto Grande em Americana –SP, contaminada com microcistina, sobre o DNA de células hepáticas humanas e de zebrafish. Pelo teste do micronúcleo, foram evidenciados efeitos genotóxicos e mutagênicos para a microcistina, o que não ficou evidente pelos ensaios do cometa. Esta contradição de resposta entre os ensaios pode ser decorrente das toxinas estarem mais envolvidas com estágios iniciais de apoptose. Os resultados deste estudo também mostraram que amostras ambientais contaminadas com cianotoxinas apresentam maior toxicidade do que a cianotoxina purificada, adquirida comercialmente, provavelmente por haver um efeito sinérgico entre essa toxina e outros compostos presentes nas amostras.

Palavras-chaves: Células HepG2, Células ZFL, citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade, sinergismo de amostras ambientais.

#### **Introdução**

Atualmente, existe grande preocupação mundial com a integridade dos corpos hídricos, pois muitos mananciais vêm perdendo a qualidade de suas águas. Muitas das alterações que os corpos d'água vem sofrendo em decorrência da poluição pode colocar em risco a biota associada e até mesmo a saúde humana. Uma das conseqüências da poluição que atinge nossos recursos hídricos é a eutrofização. A eutrofização dos ambientes propicia florações de cianobactérias (GRÄF; KLEINECKE; NEUMANN, 1974; CARMICHAEL, 2001; ZEGURA; STRASER; FILIPIČ, 2011), que são procariontes que podem ou não serem

produtores das toxinas denominadas de cianotoxinas. Essas toxinas são metabólitos secundários que podem apresentar variados níveis de toxicidade para os organismos vivos (GRÄF; KLEINECKE; NEUMANN, 1974; CARMICHAEL, 2001; ZEGURA; STRASER; FILIPIČ, 2011).

Dentre as cianotoxinas, as microcistinas são a mais conhecidas, com mais de 90 variantes descritas, além de serem também as que apresentam maior potencial tóxico. São toxinas do grupo dos heptapeptídeos monocíclicos, que podem ser produzidas por diferentes espécies de cianobactérias, sendo as mais usualmente relacionadas com esse tipo de contaminação, as espécies do gênero *Microcystis* (LIU; SUN, 2015).

A Microcistina-lisina arginina (MCLR), que é a microcistina mais comumente encontrada em ambientes contaminados por cianobactérias, apresenta alto potencial tóxico, sendo a única cianotoxina que possui valor de referência em água para consumo humano (1µg/L) proposto pela World Health Organization (WHO) (LIU; SUN, 2015).

Intoxicações por microcistinas levam a inibição das fosfatase, que acarreta em subsequente mecanismos incluindo danos oxidativos, alteração no citoesqueleto e autofagia (BAUTISTA et al., 2015). Alguns estudos descrevem, ainda, outros efeitos como disfunção mitocondrial e apoptose (BOLOGNESI; HOLLAND, 2016) e necrose hemorrágica (RUSSEL, 2002; HARA; MARIN-MORALES, 2017). Pela toxicidade reconhecida das microcistinas, existe, então, a necessidade de mais estudos possam melhor esclarecer a ação delas no meio ambiente. Por isso, é de grande importância realizar estudos e monitoramentos de ambientes que apresentem florações frequentes de cianobactérias.

Para entender melhor a interação das microcistinas com o DNA, podem ser utilizados ensaios toxicogênicos como o do micronúcleo e o do cometa. Estes testes são internacionalmente considerados preditivo de genotoxicidade e mutagenicidade ambiental, que podem ser usados para avaliar substâncias isoladas e/ou misturas complexas encontradas no meio ambiente (MATSUMOTO et al., 2006; BIANCHI et al., 2015; MANZANO et al., 2015; HARA; MARIN-MORALES, 2017), portanto também aplicáveis a ambientes contaminados com as cianobactérias.

As substâncias isoladas ou em misturas que estão presentes no ambiente podem ter ação biológica, sendo muitas vezes tóxicas para o material genético. Nestes casos, os compostos podem induzir aberrações ou danos estruturais nos cromossomos (FENECH, 2000).

Muitos dos ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade de amostras ambientais são realizados com linhagens celulares mantidas em cultura (FENECH; CROTT, 2002; KIRSCH-VOLDERS et al., 2003; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009). O teste de

micronúcleo com bloqueio de citocinese é um dos testes mais eficientes para avaliação ambiental, sendo considerado um ótimo instrumento para monitoramento de ecossistemas. Os testes genotóxicos avaliam a presença de brotos, pontes nucleares e micronúcleos (MN) (FENECH; CROTT, 2002; KIRSCH-VOLDERS et al., 2003; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009). Os MNs são estruturas que podem ser resultantes de diferentes processos, como os gerados por ação direta de um xenobiótico com o material genético. Neste caso, os efeitos dessa interação podem induzir quebra na fita de DNA, gerando fragmentos acêntricos (considerada uma ação clastogênica). Podem também ser gerados por ação indireta, onde o agente interage com outras moléculas ou estruturas celulares, como por exemplo os fusos mitóticos, levando a perda de cromossomos inteiros, sendo esta ação chamada de aneugênica (PALMIERI, 2016).

Outro teste reconhecido e muito utilizado na Ecotoxicologia é o ensaio do cometa, na maioria das vezes utilizado em paralelo com o teste do micronúcleo (SINGH et al., 1988). Essa associação permite a avaliação mais completa dos danos sofridos pelo DNA. O ensaio do cometa permite avaliar o grau de dano sofrido por meio da intensidade da cauda formada ao correr uma corrente em gel de eletroforese (SINGH et al., 1988).

Diante da necessidade de compreender melhor a interação de uma substância tóxica produzida pelas cianobactérias, a microcistina, o objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar os efeitos da substância microcistina-LR pura e dos extratos das águas do reservatório de Salto Grande em Americana –SP, contaminada com microcistina sobre o DNA de células hepáticas humanas e de zebrafish.

## **Materiais e métodos**

### **Substância química**

Foi utilizado como material químico neste estudo a microcistina-LR (CAS Nº 101043-37-2– Cayman- 95% de pureza), testada em três concentrações: 1µg/L (concentração considerada pela Organização Mundial da Saúde - OMS como alerta de nível 1); 1,5 µg/L (concentração 50% mais alta que a de alerta de nível 1, para simular um início de floração); e 2 µg/L (concentração 100% mais alta que a de alerta de nível 1, para simular uma floração em estado avançado de contaminação).

### **Amostra ambiental**

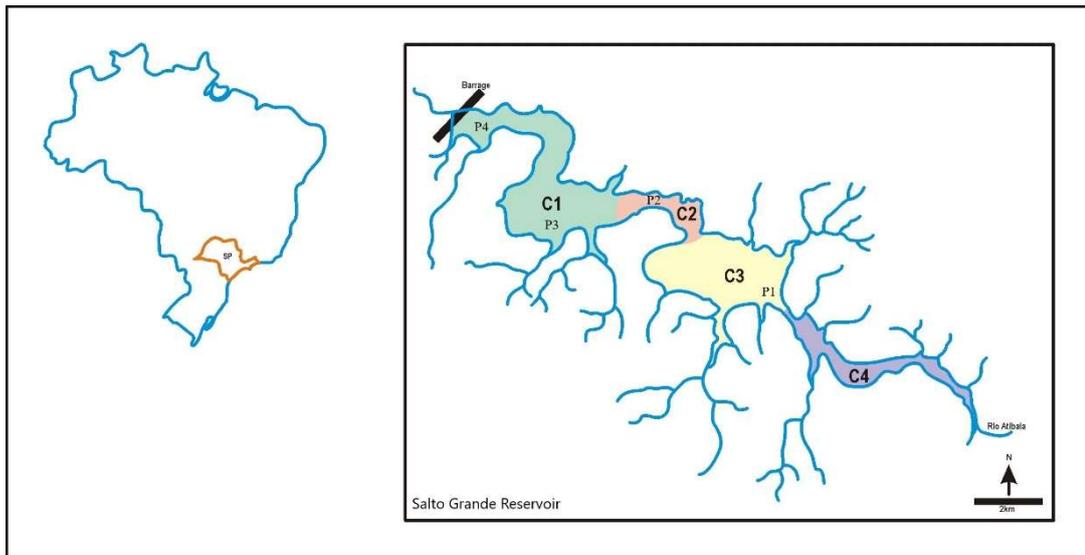
Foram coletadas águas de quatro pontos distribuídos no reservatório de Salto Grande, situado em Americana, uma região de alto desenvolvimento urbano, agrícola e industrial do estado de São Paulo/Brasil, como segue:

P1 – Ponto localizado logo após o estreitamento do compartimento 4 da represa, início do compartimento 3.

P2 – Ponto localizado onde ocorre um estreitamento do compartimento 2.

P3 - Ponto localizado no compartimento 1.

P4 - Ponto próximo à barragem do reservatório, início do compartimento 1.



**Figura 1** Esquema do Reservatório de Salto Grande Americana – SP, constando os pontos de coleta. P1- Ponto localizado no compartimento 3 (C3), localizado logo após o estreitamento do compartimento 4 da represa, início do compartimento 3 P2- Ponto localizado no compartimento 2, onde ocorre um estreitamento do compartimento 3 (C3); P3- Ponto localizado no compartimento 1 (C1); P4- Ponto próximo à barragem do reservatório, início do compartimento 1 (C1).

As amostras coletadas nos pontos anteriormente citados, foram submetidas à Extração de Fase Sólida (EPS) em cartucho C18, considerado o mais indicado para a retenção de cianotoxina, para a obtenção de extratos dos 4 pontos de coleta. Os extratos obtidos foram, posteriormente, eluídos em metanol, para serem submetidos à dosagem da microcistina, por meio de kit de Elisa específico para esta toxina (Abraxis, N° 522015).

### **Bioensaios realizados com as linhagens celulares HepG2 e ZFL**

As células de hepatoma humano (HepG2), obtidas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro, foram cultivadas em meio MEM (Meio Mínimo Essencial Eagle) e suplementado com 10% de soro bovino fetal. Os frascos de cultivo celular com ventilação (25 cm<sup>2</sup>) foram

mantidos em temperatura e umidade controlada (37 ° C e 25 cm<sup>2</sup>, respectivamente) em estufa de CO<sub>2</sub> (5%).

As células de fígado do peixe *Danio rerio* (ZFL) cedidas pela Dr<sup>a</sup> Cláudia Bueno dos Reis Martinez da Universidade Estadual de Londrina, foram cultivadas em meio 60 % Leibovitz (L-15) e 40 % RPMI e suplementado com 10 % de soro bovino fetal. Os frascos de cultivo sem ventilação (25 cm<sup>2</sup>) foram mantidos em temperatura controlada (28 ° C).

### **Teste de viabilidade celular com Resazurina**

Antes da realização dos testes de genotoxicidade (ensaio do cometa) e de mutagenicidade (teste do MN com bloqueio de citocinese), foi realizado o teste com resazurina, para as culturas celulares, para definir as concentrações de Microcistina-LR a serem utilizadas neste estudo. O ensaio de resazurina foi realizado em placas de 96 poços, de acordo com o protocolo proposto por (FENECH, 2000), com algumas modificações. As placas foram preparadas com  $2,34 \times 10^6$  células e incubadas por um período de 24 horas, tempo necessário para ocorrer a adesão das células na parede dos poços. Após esse período, o meio foi retirado e foram adicionados os seguintes tratamentos: Controle negativo - meio de cultura sem soro; Controle positivo - solução de Triton X-100 (1 %), preparada com meio de cultura sem soro; e nos demais poços as diferentes concentrações de Microcistina-LR (2; 1,75; 1,50; 1,25; 1; 0,75 µg/L), preparadas com meio de cultura sem soro. Essas concentrações partiram do valor estabelecido pela OMS para presença de microcistina-LR em águas destinadas ao consumo humano. Os tratamentos permaneceram nos poços por um período de 24 horas. Em seguida, os tratamentos foram retirados e foi adicionado em cada poço 200 µL de solução de resazurina (44 µM), diluída em meio de cultura sem soro, onde as células foram incubadas por 4 horas. A fluorescência foi medida em fluorímetro Infinite M2000 Pro™ (Tecan, Crailsheim, Germany), utilizando o comprimento de onda de excitação de 560 nm e o comprimento de onda de emissão 590 nm. A viabilidade celular foi avaliada com base na comparação entre as células tratadas e as células não tratadas (CN). Nenhuma das concentrações apresentaram citotoxicidade, ou seja, nenhuma delas apresentou viabilidade menor que 80%. Portanto, optamos por usar as concentrações de 1, 1,5 e 2 µg/L.

### **Ensaio do cometa**

Após o período de crescimento celular, foi realizada a confecção dos pré-frascos, onde foram semeadas, aproximadamente,  $5 \times 10^5$  células. O material foi mantido em condições ideais de cultivo para cada linhagem celular 24 h tempo este referente ao período de estabilização das

células nos frascos. Após exposição aos tratamentos por 24 horas para HepG2 e 48 horas para ZFL foi realizada a coleta da suspensão celular, que foi transferida para tubos de centrifuga e centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm (HepG2) e 7min a 1700 rpm (ZFL). O sobrenadante foi descartado e a suspensão homogeneizada em 0,5 mL de meio de cultura.

Para a realização do ensaio de viabilidade celular, foram separados em criotubos, 20 µL da suspensão celular. Em seguida, foi adicionado, em cada amostra, 20 µL de Azul de Trypan. A contagem das células viáveis foi realizada em câmara de Neubauer, onde se quantificou os percentuais das células vivas (brancas) e das células mortas (azuis) encontradas em cada um dos quatro quadrantes da câmara.

Para o ensaio do cometa, foram montadas lâminas com 20 µL da suspensão celular com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão a 37 °C. Posteriormente, as lâminas foram banhadas em solução de lise (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque - NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10, aproximadamente 8 g de NaOH sólido para 1 L), pH 10, no escuro, em geladeira a 4 °C por, no mínimo, 1 hora. Após este procedimento, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese envolta por gelo, contendo uma solução tampão (NaOH 300 mM + EDTA 1 mM, com pH>13) a 4 °C, por 20 minutos, para a deslicoidização do DNA. A corrida eletroforética foi realizada por 20 minutos a 39 V e 300 mA (~ 0,8 V/cm). Em seguida, as lâminas foram neutralizadas com tampão de neutralização (pH 7,2) e fixadas em etanol absoluto.

As lâminas foram coradas com GelRed® (15 µL de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1M, e 45 mL de água destilada) no momento da análise, que foi feita em microscópio de epifluorescência Leica, filtro B - 34 (excitação:  $\lambda = 420 \text{ nM} - 490 \text{ nM}$  e barreira:  $\lambda = 520 \text{ nM}$ ). Foram analisados ao acaso, em objetiva de 40x, 200 nucleóides por frasco (3 réplicas, duas lâminas com 50 nucleóides cada), totalizando 300 nucleóides/tratamento. Os danos no DNA foram estimados baseados na intensidade da cauda de DNA, medidos pelo software Comet Assay IV. A média dos resultados de cada tratamento foi calculada e submetida ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e então, de acordo com a distribuição dos dados, foi realizado o teste estatístico paramétrico ANOVA com post hoc de Dunnet, para comparar os danos entre as células tratadas com as concentrações de microcistinas-LR e os extrato das amostras coletadas na represa com o controle negativo.

### **Teste do Micronúcleo**

As células HepG2 e ZFL foram semeadas em frascos de cultura com  $1 \times 10^5$  células e mantidas em condições controladas por 24 horas. Em seguida, as células foram submetidas aos

tratamentos por mais 24 (HepG2) e 48(ZFL) horas. Após a exposição das células aos tratamentos, foi retirado todo o conteúdo do frasco para ser substituído por meio de cultura novo com adição de 3 µg/mL de citocalasina B. Transcorridas as 28 horas para obtenção de células binucleadas, as células foram coletadas e centrifugadas, o sobrenadante descartado e a suspensão homogeneizada em 0,5 mL de meio de cultura. A suspensão celular foi tratada com solução hipotônica de citrato de sódio (0,01%) e homogeneizada com 2 gotas de formaldeído. Em seguida, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante descartado e a suspensão homogeneizada com solução fixadora de Carnoy (3 metanol:1 ácido acético, v: v). Para o preparo das lâminas, a suspensão celular foi ressuspensa em 0,5 mL de Carnoy e gotejada sobre lâminas pré-lavadas com água destilada e com um filme de água a 4°C. As lâminas foram secas em temperatura ambiente e coradas com Giemsa 5 % por 8 minutos.

Foram contabilizadas 1.000 células binucleadas (com limite nuclear e limite citoplasmático íntegros, núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e com o mesmo padrão e intensidade de coloração) por réplica, totalizando 6.000 células por tratamento. Foram observadas células binucleadas normais e células binucleares portadoras de MN, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares, usando critérios descritos por (FENECH, 2000). Para avaliar o índice de divisão celular e citotoxicidade (IDCC), foram contabilizadas 500 células por frasco, totalizando 3000 células/tratamento. O IDCC foi calculado seguindo a fórmula:  $IDCC = \frac{Ap + Nec + M1 + (2M2) + (3M3) + (4M4)}{N}$ , onde M1 – M4 representa o número de células com 1-4 núcleos, respectivamente, Ap (células em apoptose), Nec (células em necrose) e N o número de células analisadas (LAUGHINGHOUSE et al., 2012). Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e, de acordo com a distribuição dos dados, foi realizada a análise de significância ou pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, ou o paramétrico ANOVA com post hoc Dunnet ( $p < 0,05$ ).

## Resultados

As dosagens da toxina microcistina foram realizadas por meio de kit de Elisa, específico para esta cianotoxina (Abraxis, N° 522015). Os resultados obtidos com as amostras de água coletadas na represa foram; 6,23 µg/L para P1, 6,86 para P2, 6,85 para P3 e 6,88 para P4.

Os resultados do ensaio do cometa realizado com as duas linhagens celulares (HepG2 e ZFL) estão apresentados nas tabelas 1 e 2. Como pode ser observado, todas as concentrações de Microcistina-LR testadas não apresentaram resultados estatisticamente significativos em relação ao teste controle (Tabela 1). Já os resultados do ensaio do cometa obtidos com os

extratos dos quatro pontos de coleta da represa, mostraram que o P1 apresentou efeito genotóxico para as duas linhagens testadas e o P3 para as células de fígado de peixes (ZFL) (Tabela 2).

**Tabela 1** Resultados do ensaio do cometa realizado com células HepG2 e ZFL, após tratamento com a substância Microcistina-LR.

Tratamentos	HepG2	ZFL
	Intensidade da Cauda	Intensidade da Cauda
Controle Negativo	24,38±5,79	11,06±8,20
Controle Positivo	56,30±24,18*	19,94±3,80*
1 µg/L	27,05±8,00	12,33±2,28
1,5 µg/L	22,86±4,85	15,31±6,33
2 µg/L	32,09±12,89	12,08±4,29

\*- Estatisticamente significativo, quando comparado com o controle negativo.

**Tabela 2** Resultados do ensaio do cometa realizado com células HepG2 e ZFL, após tratamento com Extratos das águas do reservatório de Salto Grande.

Tratamentos	HepG2	ZFL
	Intensidade da Cauda	Intensidade da Cauda
Controle Negativo	24,08±14,81	10,33±2,68
Controle Positivo	56,30±24,18*	22,94±2,19*
P1	43,52±6,63*	18,00±0,93*
P2	23,29±5,13	12,62±5,21
P3	20,06±5,04	16,10±4,78*
P4	17,21±4,49	13,44±1,40

\*- Estatisticamente significativo, quando comparado com o controle negativo.

A genotoxicidade da microcistina-LR também foi avaliada pelo teste de MN com bloqueio de citocinese. Neste ensaio foram observados resultados estatisticamente significativos para todas as concentrações testadas dessa toxina, em ambas as linhagens celulares (Tabela 3).

**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.

	Alteração	Controle Negativo	Controle Positivo	1µg/L	1,5µg/L	2µg/L
<b>HepG2</b>	Broto	3,83±0,75	10,33±2,94*	21,16±5,49*	18,00±5,05*	18,50±5,31*
	Ponte	0,00±0,00	3,83±3,31*	5,50±1,64*	3,33±1,36*	3,00±1,67*
	B+MN	0,00±0,00	0,00±0,00	0,50±1,22	0,33±0,81	0,00±0,00
	P+MN	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,16±0,40
	Total AN	3,83±0,75	10,33±2,94*	29,16±13,49*	23,00±10,05*	21,50±8,31*
<b>ZFL</b>	Broto	7,83±4,44	40,50±11,11*	9,66±5,20	18,16±5,19*	18,66±12,89
	Ponte	0,33±0,51	4,50±2,07*	1,33±1,50	1,83±1,47	2,16±4,02
	B+MN	0,00±0,00	0,83±0,75	0,16±0,40	0,16±0,40	0,00±0,00
	P+MN	0,16±0,40	1,33±1,50	0,33±0,51	0,16±0,40	0,33±0,81
	Total AN	8,33±4,63	47,33±14,67*	11,50±6,80*	20,33±3,98*	21,16±17,30*

\*- Estatisticamente significativo quando comparado com o controle Negativo. B+MN: Broto nuclear e Micronúcleo; P+MN: Ponte nuclear e Micronúcleo; AN: Anormalidades Nucleares

Na avaliação realizada com os extratos do reservatório de Salto Grande, apenas as amostras do P1 e P3 induziram resultados estatisticamente significativos para as duas linhagens testadas. Para a linhagem ZFL ainda observamos resultado estatisticamente significativo para P2 (Tabela 4).

**Tabela 4** Resultados da avaliação da genotoxicidade realizada com células HepG2 e ZFL, após tratamento com extratos das águas do Reservatório de Salto Grande

	<b>Tratamentos</b>	Controle Negativo	Controle Positivo	P1	P2	P3	P4
<b>HepG2</b>	Broto	8,50±1,22	41,66±14,34*	19,00±5,05*	9,83±5,19	20,16±2,04*	10,50±1,04
	Ponte	1,16±0,40	10,50±3,56*	5,83±2,63*	8,16±2,78*	3,33±0,51	3,50±1,87
	B+MN	0,00±0,00	1,00±1,54	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	P+MN	0,00±0,00	0,50±0,83	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	Total NA	9,66±1,36	53,66±15,51*	24,83±4,66*	18,00±4,04	23,50±1,97*	14,00±1,26
<b>ZFL</b>	Broto	5,66±1,44	12,16±3,11*	13,66±2,00*	18,00±2,66*	11,33±3,00*	6,66±4,33
	Ponte	1,33±0,81	3,16±2,48	4,50±2,94*	3,33±1,21*	3,50±0,83*	3,16±1,32*
	B+MN	0,00±0,00	0,50±0,54	0,16±0,40	0,33±0,51	0,16±0,40	0,00±0,00
	P+MN	0,00±0,00	0,16±0,40	0,66±0,51	0,50±0,83	0,16±0,40	0,00±0,00
	Total NA	7,00±2,44	16,00±5,29*	19,00±3,57*	22,16±5,41*	15,16±4,11*	9,83±5,84

\*- Estatisticamente significativo quando comparado com o controle Negativo; MN: Micronúcleo; B+MN: Broto+Micronúcleo; P+MN: Ponte +Micronúcleo; AN: Anormalidades Nucleares

**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.

	Tratamentos	1MN	2MN	3MN	4MN	Total MN
<b>HepG2</b>	Controle Negativo	6,33±1,21	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	6,33±1,21
	Controle Positivo	27,50±5,99*	0,16±0,40	0,16±0,40	0,00±0,00	27,83±5,94*
	1µg/L	30,83±9,64*	1,16±1,00	0,00±0,00	0,16±0,40	32,16±10,74*
	1,5µg/L	22,50±2,25*	0,83±0,98	0,00±0,00	0,00±0,00	23,33±2,80*
	2µg/L	31,00±4,56*	1,50±1,37	0,66±1,03	0,00±0,00	33,16±4,91*
<b>ZFL</b>	Controle Negativo	6,50±1,76	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	6,50±1,76
	Controle Positivo	51,50±14,26*	2,16±2,40*	0,00±0,00	0,00±0,00	53,66±15,53*
	1µg/L	15,66±5,85*	0,50±0,54	0,33±0,81	0,00±0,00	16,50±6,34*
	1,5µg/L	31,66±6,74*	0,66±1,03	0,00±0,00	0,00±0,00	32,33±5,85*
	2µg/L	26,83±6,17*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,33±0,81	27,16±6,73*

\*- Estatisticamente significativo quando comparado com o controle Negativo; MN: Micronúcleo

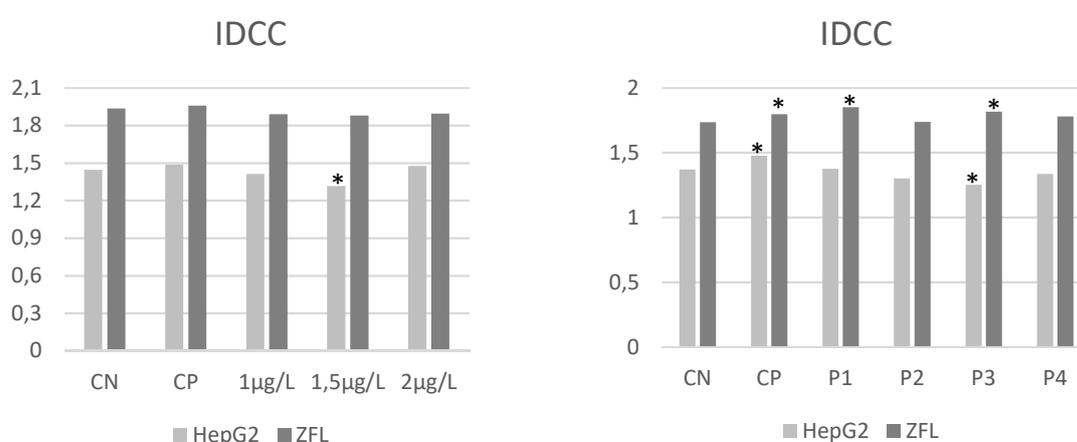
**Tabela 6** Resultados da avaliação da mutagenicidade realizada com o teste do micronúcleo com as células HepG2 e ZFL, após tratamento com extratos das águas do Reservatório de Salto Grande.

	Tratamentos	1MN	2MN	3MN	4MN	Total MN
<b>HepG2</b>	Controle Negativo	8,33±2,58	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	8,33±2,58
	Controle Positivo	37,00±10,44*	0,33±0,51	0,16±0,40	0,00±0,00	37,50±11,00*
	P1	15,33±2,42*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	15,33±2,42*
	P2	9,16±2,48	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	9,16±2,48
	P3	15,66±4,17*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	15,66±4,17*
	P4	8,16±2,31	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	8,16±2,31
<b>ZFL</b>	Controle Negativo	7,00±1,41	0,16±0,40	0,00±0,00	0,00±0,00	7,16±1,60
	Controle Positivo	24,50±7,39*	0,50±1,22	0,00±0,00	0,00±0,00	25,00±7,53*
	P1	22,00±4,89*	0,66±1,21	0,00±0,00	0,16±0,40	22,83±6,24*
	P2	12,83±4,70	0,16±0,40	0,00±0,00	0,00±0,00	13,00±4,97
	P3	18,66±7,17*	0,00±0,00	0,50±0,83	0,00±0,00	19,16±7,35*
	P4	11,66±7,81	0,66±1,63	0,16±0,40	0,00±0,00	12,50±9,00

Pela avaliação de mutagenicidade pelo teste do MN, foi observado que a Microcistina-LR induziu índices de MN estatisticamente significativos em relação ao CN, para ambas as linhagens celulares (Tabela 5).

Na tabela 6 estão representados os resultados de mutagenicidade dos extratos das águas do reservatório de Salto Grande para as linhagens celulares HepG2 e ZFL. Os resultados mostram que as amostras de água em forma de extrato do P1 e do P3 foram mutagênicas para as duas linhagens avaliadas.

Os dados foram usados para a obtenção do Índice de Divisão Celular e citotoxicidade, conforme apresentados na figura 2.



**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. \*-Estatisticamente significativo quando comparado com o CN. CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo. IDCC: Índice de divisão celular e citotoxicidade.

Pode-se observar que para este parâmetro, quando as células foram expostas às diferentes concentrações de Microcistina-LR, a concentração de 1,5 µg/L apresentou resultados estatisticamente significativo para a linhagem HepG2. Já para os extratos de amostras de águas da represa, os resultados foram estatisticamente significativos para o P3, para ambas as linhagens celulares, e para o P1 para a cultura celular ZFL.

## Discussão

A degradação do meio ambiente tem aumentado muito nos últimos anos, em decorrência dos impactos gerados, principalmente, pelo desenvolvimento industrial, pela alta densidade populacional e pelos insumos usados na agricultura. Esses impactos têm afetado a qualidade ambiental, sobretudo os ambientes aquáticos e, por isso, vem preocupando a comunidade científica e os dirigentes governamentais preocupados com a

segurança da população, quanto às exposições que possam estar colocando em risco a saúde humana.

Esse problema gerado pelas atividades antrópicas nos leva a refletir sobre a necessidade de avaliarmos com mais profundidade que tipo de impacto estamos causando no ambiente e sobre os riscos que estamos potencialmente expostos, porque, segundo (HAVENS, 2008; O'NEIL et al., 2012) o declínio da saúde humana está diretamente relacionado com o declínio da qualidade ambiental.

A degradação que os recursos hídricos vêm sofrendo podem incorrer em processos de eutrofização, que podem levar ao desenvolvimento de florações de cianobactérias (OBERHOLSTER; BOTHA; GROBBELAAR, 2004). O impacto causado por essas florações podem agir diretamente sobre os organismos do meio, como por exemplo, os peixes, invertebrados e outros organismos da fauna aquática (OBERHOLSTER; BOTHA; GROBBELAAR, 2004) e indiretamente sobre seres vivos que entram em contato com os organismos contaminados, como, por exemplo, os seres humanos (OBERHOLSTER; BOTHA; GROBBELAAR, 2004).

Zhou et al. (2008) citam que para avaliar os contaminantes de recursos hídricos deve haver uma seleção rigorosa do bioindicador a ser utilizado, pois este deve ser representativo dos demais organismos do ambiente em estudo, cujas respostas contemplem os propósitos do monitoramento específico. Devem ser escolhidos representantes dos organismos abundantes do sistema hídrico investigado, como os organismos representantes do plâncton, do bento, dos peixes ou de outros grupos específicos do ambiente. Os autores reforçam que, como a qualidade da água afeta diretamente a população endêmica do local, quanto ao número de espécies, à abundância e o comportamento dos organismos, eles podem atuar como bioindicadores para a avaliação da poluição da água.

Neste estudo avaliamos a interação da cianotoxina sobre células hepáticas de peixes e humanas, a fim de estimar a gama de efeitos que esta toxina pode desencadear sobre os seres aquáticos e sobre o homem, bem como para comparar os efeitos toxicogênicos da microcistina-LR e de misturas complexas que contêm essa toxina como um dos componentes, entre as células metabolizadoras desses dois bioindicadores.

Os resultados do ensaio do cometa e de anormalidades nucleares da amostra coletada em P1 se mostraram estatisticamente significativos, em relação ao CN, para as duas linhagens celulares testadas (HepG2 e ZFL), indicando um efeito sinérgico e/ou aditivo entre os contaminantes deste local. Sugerimos que esse efeito registrado para P1

pode ser devido a presença de outros contaminantes na amostra que amplificam o potencial genotóxico da cianotoxina. Foi observado, também, diferença significativa para amostra de água de P3, apenas na célula ZFL, que, além de evidenciar o potencial sinérgico da amostra, também destaca a sensibilidade desta linhagem celular tempo de exposição dependente. A sugestão do possível sinergismo dos compostos das nossas amostras ambientais se baseia nos estudos de Freitas et al.(2014), que citam que florações de cianobactérias em ambiente aquáticos podem decorrer em contaminação por cianotoxinas. Segundo os autores essas substâncias raramente são encontradas isolada nos ambientes, pois estão sempre associadas a outros estressores do local. Os autores ainda destacam que nos reservatórios brasileiros pode haver coexistência de cianobactérias, como *Microcystis aeruginosa* e *Anabaena spiroides*, que podem estar envolvidas com síntese de diferentes toxinas. Outros autores, como Leeman et al. (2013) também afirmam que os compostos presentes em uma mistura complexa podem apresentar interação entre si e desencadear efeitos aditivos ou sinérgicos, podendo, inclusive, ter ação acumulativa nos organismos, fatores esses extremamente importantes para serem considerados em uma avaliação de risco dos ambientes. Como as amostras coletadas na represa do Salto Grande têm características complexas, por receberem diferentes estressores derivados das diversas atividades antrópicas da região, a maior toxicidade dessas amostras, em relação à microcistina-LR pura, deve estar relacionada com a ação sinérgica e/ou aditiva entre a microcistina e demais xenobiontes presentes naquelas águas.

A avaliação da genotoxicidade feita pelo parâmetro de anormalidades nucleares (presença de brotos e pontes nucleares), com o desenvolvimento do teste do MN, mostrou que todas as concentrações testadas de microcistina-LR purificada apresentaram resultados significativos em relação ao CN, em ambas as linhagens testadas. Porém, a genotoxicidade avaliada pelo ensaio do cometa não houve diferença estatística entre as concentrações testadas e o CN. Esses resultados contraditórios também são corroborados por Dias et al. (2014), que também avaliaram a genotoxicidade da Microcistina-LR pelo teste do MN com bloqueio de citocinese e pelo ensaio do cometa. Os autores que também registraram resultados negativos apenas no ensaio do cometa, sugeriram que os danos no DNA devem estar mais ligados a estágios iniciais de apoptose, do que propriamente com ação genotóxica da substância.

Pelo teste de mutagenicidade realizado com a microcistina-LR, obtivemos resultados estatisticamente significativos para todas as concentrações testadas, em relação aos resultados do CN, para as duas linhagens celulares. Esses resultados indicam que,

mesmo em baixas concentrações, essa toxina é capaz de induzir danos significativos no DNA de células de fígado de peixes e de humanos.

O teste de mutagenicidade, realizado com os extratos das amostras coletadas no reservatório, confirmam os resultados obtidos no ensaio do cometa para o P1 e P3. Esses resultados reforçam a ideia de que existem outros contaminantes nestes pontos que estão aumentando o potencial mutagênico dessas amostras. Qiao et al. (2016) mostraram em seus estudos que a presença de outros compostos produzidos por cianobactérias, além das cianotoxinas, ou introduzidos no ambiente por outras fontes de contaminação podem alterar as vias metabólicas dos organismos expostos. (DREWS, 2011; SANDRINI et al., 2016) observaram em testes *in vivo*, que a microcistina induziu apoptose em células hepáticas, por processos de fragmentação do DNA e ativação de caspases. Os autores ainda observaram que as alterações induzidas pela microcistina-LR no citoesqueleto, foram eventos que precederam a apoptose. Pelos resultados observados no presente estudo, bem como nos estudos de (HUANG et al., 2015; ZHOU; TU; XU, 2015), podemos inferir que os MN observados podem indicar o início do processo de apoptose.

O potencial citostático e citotóxico observado para os extratos das amostras de águas coletadas em P1 e P3 na represa do Salto Grande, para as linhagens HepG2, confirmam que os contaminantes presentes nas misturas atuam sobre a desregulação do ciclo celular, via citoesqueleto da célula (SANDRINI et al., 2016). Porém, esses efeitos mostraram-se reduzidos, para as células ZFL, o que indica que as células de fígado de peixe são menos sensíveis que as de fígado humano, para este parâmetro analisado.

### **Conclusões**

Diante dos resultados encontrados neste estudo, podemos ressaltar que, quando a microcistina se associa a outros estressores, ela pode apresentar um potencial ainda mais tóxico que a substância isolada. Pudemos observar também que as amostras de água de ambientes contaminados com cianobactérias apresentam alta genotoxicidade, devido ao sinergismo e/ou efeito aditivo existente entre a cianotoxina e os outros compostos tóxicos presentes no local. Desta forma, este contaminante requer muita atenção por parte dos órgãos gestores de qualidade ambiental, pois a sua presença no meio aquático pode comprometer a qualidade da água e, conseqüentemente o ecossistema e a saúde ambiental.

### **Referências bibliográficas**

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>>.

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](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842015000300012&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>.

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>>.

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>>.

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>>.

DREWS, G. The Evolution of Cyanobacteria and Photosynthesis. In: **Bioenergetic**

**Processes of Cyanobacteria.** Dordrecht: Springer Netherlands, 2011. p. 265–284.

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.; CHANG, W. P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; HUMAN MICRONUCLEUS 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. 2003. 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>>.

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>>.

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>>.

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>>.

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>>.

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>>.

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>>.

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>>.

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>>.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTII, 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](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572006000100028&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>.

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>>.

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

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>>.

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](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)>.

RUSSEL, P. . Chromosomal Mutation. In: CUMMINGS, B. (Ed.). **Genetics**. São Francisco: Pearson Education Inc, 2002. p. 595–621.

SANDRINI, G.; JI, X.; VERSPAGEN, J. M. H.; TANN, R. P.; SLOT, P. C.;

LUIIMSTRA, V. M.; SCHUURMANS, J. M.; MATTHIJS, H. C. P.; HUISMAN, J. Rapid adaptation of harmful cyanobacteria to rising CO<sub>2</sub>. **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>>.

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>>.

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>>.

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 TiO<sub>2</sub> 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>>.

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>>.

#### 5.4 ARTIGO 4.

##### **Ações citogenotóxicas das microcistinas produzidas por *Microcystis aeruginosa* sobre hepatócitos humanos e de peixes.**

Maria Tereza Pamplona-Silva<sup>1</sup>; Leticia Cristina Gonçalves<sup>1</sup>; Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira<sup>2</sup>; Maria Aparecida Marin-Morales<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>UNESP – Univ Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Av 24-A, 1515, CEP 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ, Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias 11, 13418-900, Piracicaba, São Paulo, Brasil

\*Autor correspondente. Tel.: +55 19 3526 4143; fax: +55 19 35360009.

e-mail: mamm@rc.unesp.br

#### **Resumo**

As cianobactérias são organismos primitivos que sofreram muitas alterações evolutivas para chegarem ao nível de resistência atual. São microrganismos capazes de sobreviver nas mais diversas condições ambientais, por isso estão presentes em ambientes eutrofizados, devido a lançamento de resíduos derivados das mais diversas atividades antropogênicas. A resistência ambiental, a alta toxicidade dos metabólitos produzidos e a difícil remoção de suas toxinas do ambiente conferem, para as contaminações de cianotoxinas, uma preocupação muito grande, quanto aos perigos que esses organismos possam significar para os ecossistemas impactados e, sobretudo, para a saúde ambiental. Por esse motivo, tornou-se de grande importância a compreensão da ação das cianotoxinas sobre as macromoléculas biológicas, como o DNA e proteínas. Diante desta preocupação, o presente estudo avaliou os efeitos citogenotóxicos das endo e exotoxinas produzidas em culturas de *Microcystis aeruginosa* (linhagem BCCUSP 232), por meio dos testes do micronúcleo e do cometa em linhagens hepáticas humanas (HepG2) e do peixe *Danio rerio* (ZFL). Os resultados do presente estudo mostram a ação citogenotóxica e mutagênica das toxinas, sobre as linhagens estudadas, comprovando uma ação direta tanto sobre as proteínas que compõem o citoesqueleto celular como no DNA de células expostas. Além destes efeitos, foi também observada a ação proliferativa destas toxinas, mesmos em baixas concentrações, o que desperta para uma preocupação adicional sobre os perigos das microcistinas, pois o aumento de proliferação celular pode estar associado com a promoção de tumores, principalmente de fígado, já que toxinas têm um comprovado efeito hepatotóxico.

Palavras-chaves: Endotoxina; exotoxina; citoesqueleto; células HepG2; células ZFL; micronúcleo.

## Introdução

As cianobactérias estão presentes no ambiente há bilhões de anos, se adaptando às pressões evolutivas diversas conferidas pelo aumento dos níveis de CO<sub>2</sub>, aumento da temperatura e mudanças na pressão de predação, tanto por alteração no seu aparato genético (RAVEN et al., 2012; SANDRINI et al., 2016), como por alterações co-evolutivas (DITTMANN; FEWER; NEILAN, 2013; DOWNING; PHELAN; DOWNING, 2015). Dentre os fatores descritos acima, alguns autores descrevem que a disponibilidade de carbono inorgânico é o mais importante a ser considerado na evolução das cianobactérias, porque o nível aumentado de CO<sub>2</sub> pode alterar as respostas fisiológicas e ecológicas das espécies, levando a sínteses de diferentes toxinas (BÖRNER; DITTMANN, 2005). Essas respostas fisiológicas diferenciadas permitem que esses microrganismos sobrevivam em condições extremas e persistam por mais tempo no ambiente (MA et al., 2016b).

As toxinas produzidas pelas cianobactérias são metabólitos de composição diversificada, como alcaloides, lipopolissacarídeos e peptídeos, que podem desencadear efeitos deletérios em outros organismos (VLCEK; POHANKA, 2015). Muitos estudos têm sido realizados para compreender melhor as vias moleculares que levam a biossíntese desses compostos secundários tóxicos das cianobactérias. Neilan et al. (2013) afirmam que esses estudos têm possibilitado uma melhor compreensão dos fatores moleculares envolvidos com a produção dessas toxinas. A resistência das cianobactérias aos intempéries climáticas, como a temperatura por exemplo, tem conferido uma preocupação mundial quanto a limitação do uso da água para fins diversos, pois essa resistência dificulta tanto a eliminação desses organismos do ambiente (DROBAC et al., 2013) como também de seus metabólitos tóxicos presentes na água (O'NEIL et al., 2012). Outro fator preocupante é o aporte cada vez maior de CO<sub>2</sub> no ambiente, agente esse que limita as condições de sobrevivência de muitas espécies e favorece o desenvolvimento das cianobactérias, tornando, então, as condições ambientais propícias para o aparecimento de florações desses organismos.

Os metabólitos secundários tóxicos das cianobactérias são conhecidos como cianotoxinas. As cianotoxinas são subdivididas de acordo com sua ação sobre os órgãos e sistemas humanos em citotoxinas, hepatotoxinas, neurotoxinas, dermatotoxinas e irritantes do sistema gastrointestinal (SUN et al., 2014). Dentre as cianotoxinas, as hepatotoxinas são as mais conhecidas e estudadas mundialmente, sendo que neste grupo

as microcistinas, que são as mais conhecidas e de maior incidência (IKEHARA et al., 2015).

As microcistinas são produzidas, principalmente, por *Microcystis aeruginosa*. Sua estrutura química básica é composta por cinco aminoácidos fixos e dois aminoácidos variáveis, os quais são responsáveis por formar os mais de 90 tipos diferentes das microcistinas identificadas. Entre as variantes, a mais comumente encontrada é a Microcistina-LR (IKEHARA et al., 2015). A microcistina-LR é uma toxina de reconhecido potencial tóxico, com capacidade de inibir as atividades das proteínas fosfatases serina/treonina PP1 e PP2A e de induzir tumores hepáticos (IKEHARA et al., 2015). Zegura et al. (2011) ainda citam que a toxicidade desta cianotoxina pode estar relacionada com uma alteração na maquinaria de reparo de danos das células, pois esses autores encontraram que o aumento dos danos celulares estava relacionado com uma expressão positiva de genes de reparo.

Alguns autores afirmam que as microcistinas podem também alterar a dinâmica dos citoesqueleto, devido indução de colapsos nessas estruturas (ZHOU et al, 2015). Esses colapsos podem causar alterações morfológicas na estruturas das proteínas dos citoesqueletos, levando a severas desorganizações dos microfilamentos (HUANG et al., 2015). (DOOLEY; ZON, 2000) afirmam que esses distúrbios do citoesqueleto levam a formação de brotos nucleares, ruptura do envoltório nuclear e, conseqüentemente a perda de cromatina, culminando com a formação de micronúcleos nas células expostas as essas toxinas.

Os bioensaios *in vitro* são técnicas usadas com sucesso, em todo o mundo (CHAN et al., 2006; SEOK et al., 2007; CHEUK; CHAN; CHAN, 2008; SANDRINI et al., 2009; WAN; CHEUK; CHAN, 2009; CHEN; CHAN, 2011; COSTA et al., 2012). Dentre as linhagens celulares usadas em ensaios biológicos, temos as metabolizadoras e as não metabolizadoras, dependendo do tecido de que são originadas. As células hepáticas de *Danio rerio* (linhagem ZFL) e de hepatoma humano (linhagem HepG2 são exemplos de células metabolizadoras.

Zebrafish (*Danio rerio*) é um importante organismo modelo para estudo de biologia, desenvolvimento e genética de vertebrados. Essa importância decorre da sua grande similaridade de resposta com outros vertebrados e, principalmente, com a espécie humana (CHAN et al., 2006; SEOK et al., 2007; CHEUK; CHAN; CHAN, 2008; SANDRINI et al., 2009; WAN; CHEUK; CHAN, 2009; CHEN; CHAN, 2011; COSTA et al., 2012). Ensaios *in vitro* com células hepáticas de *D. rerio* (células ZFL) são muito

utilizados em avaliações toxicológicas, inclusive para monitorar impactos ambientais, desde 1980, quando foi observada a correspondência desta espécie com outros vertebrados (SPEIT, 1996).

Células de mamífero mantidas em cultura, como as de hepatoma humano, são sistemas testes *in vitro* muito utilizados para avaliar o potencial citotóxico e genotóxico de agentes químicos e de amostras complexas, sendo também aplicadas em testes relacionados à toxicidade da microcistina-LR (FENECH, 2000). Com este sistema teste são realizadas avaliações de genotoxicidade e do potencial mutagênico, por meio do ensaio do cometa (FENECH, 1993) e do teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese (FENECH, 1993).

O teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese é um teste que permite uma rápida avaliação dos efeitos de xenobiontes sobre as células, além de ser economicamente viável, principalmente por poder ser realizado em larga escala (FENECH, 1993).

Diante da necessidade de mais estudos com a microcistina-LR, para que se possa mensurar os reais efeitos genotóxicos e o potencial mutagênico desta substância presente em contaminações aquática, derivadas de exo e endotoxina, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos citogenotóxicos das endo e exotoxinas produzidas em culturas de *Microcystis aeruginosa*, por meio dos testes do micronúcleo e do cometa em células hepáticas humanas e de peixe.

## **Materiais e Métodos**

### **Substância química**

Os ensaios de controle positivo (CP), realizados para avaliação da eficiência de resposta das culturas celulares às amostras contaminadas com microcistinas, foram feitos com solução de  $4 \times 10^{-4}$  de metilmetano sulfonato (MMS -Sigma-Aldrich).

### **Material Biológico e obtenção de amostras contaminadas com microcistina**

Para a obtenção das microcistinas, foi utilizada a cepa da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (BCCUSP 232), fornecida pela Prof<sup>a</sup> Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira, do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo/ ESALQ. A cepa de *M. aeruginosa* foi cultivada em meios específicos para a obtenção de biomassa desta cianobactéria e meio de cultivo, materiais estes utilizados para estimar a presença e ação das endo e exotoxinas, respectivamente. Todo procedimento foi realizado no Laboratório de cianobactérias da ESALQ, sob a orientação da Dra. Maria do Carmo.

Para os ensaios realizados com as exotoxinas, foi necessária a realização de um procedimento prévio de Extração de Fase Sólida (EFS), em cartucho c18. Após a extração, os cartuchos foram eluídos em metanol, para a obtenção do material a ser utilizado na dosagem da microcistina, que foi realizada com o kit de Elisa específico para esta cianotoxina (Abraxis, N° 522015).

### **Bioensaios realizados com as linhagens celulares HepG2 e ZFL**

As células de hepatoma humano - HepG2 (2n=46 cromossomos), obtidas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro, foram cultivadas em meio MEM (*Meio Mínimo Essencial Eagle*) e suplementado com 10% de soro bovino fetal. Os frascos de cultivo celular (25 cm<sup>2</sup>), com ventilação, foram mantidos em temperatura controlada (37 °C) em estufa de CO<sub>2</sub> (5 %) e umidade controlada (60 %).

As células de fígado do peixe *Danio rerio* (ZFL), foram cedidas pela Prof<sup>a</sup> Cláudia Bueno dos Reis Martinez da Universidade Estadual de Londrina. Essa linhagem celular foi cultivada em meio 60 % Leibovitz (L-15) /40 % RPMI e suplementado com 10 % de soro bovino fetal. Os frascos de cultivo foram mantidos em temperatura controlada (28 °C).

### **Teste de viabilidade celular com Resazurina**

Antes de proceder com os ensaios de genotoxicidade (ensaio do cometa) e mutagenicidade (teste do MN com bloqueio de citocinese), foi realizado, para ambas as culturas celulares, o teste de viabilidade celular com resazurina, para se determinar quais as concentrações de Microcistina-LR que apresentavam uma viabilidade celular superior a 80 %. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, de acordo com o protocolo proposto por (FENECH, 2000), com algumas modificações. As placas foram preparadas com  $2,34 \times 10^6$  células e incubadas por um período de 24 horas, tempo necessário para ocorrer a adesão das células na superfície dos poços. Após esse período, o meio foi retirado e foram adicionados os seguintes tratamentos: CN - meio de cultura sem soro; CP - solução de Triton X-100 (1%), preparada com meio de cultura sem soro; as diferentes concentrações de Microcistina-LR, preparadas com meio de cultura sem soro (concentrações de 2; 1,75; 1,50; 1,25; 1; 0,75 µg/L). Essas concentrações partiram do valor permitido, pela OMS, para microcistinas em água destinada para consumo humano. Os tratamentos permaneceram nos poços por um período de 24 horas. Em seguida, foram retirados os tratamentos e adicionados 200 µL de solução de resazurina (44 µM), diluída em meio de

cultura sem soro, onde as células foram incubadas por 4 horas. A fluorescência foi medida em fluorímetro Infinite M2000 Pro™ (Tecan, Crailsheim, Germany), utilizando um comprimento de onda de excitação de 560 nm e um comprimento de onda de emissão 590 nm. A viabilidade celular foi estimada com base na comparação entre as células tratadas e as células não tratadas (CN). Nenhuma das concentrações testadas apresentará citotoxicidade, ou seja, nenhuma apresentou viabilidade menor que 80%. Portanto, optamos por continuar o estudo com as concentrações de 1, 1,5 e 2 µg/L.

### **Ensaio do cometa**

Após o período de crescimento celular foi realizada a confecção dos pré-frascos, onde foram semeadas, aproximadamente,  $5 \times 10^5$  células. O material foi mantido em condições ideais de cultivo para cada linhagem celular (ZFL e HepG2) por 24 h, tempo este referente ao período de estabilização das células nos frascos. Após exposição aos tratamentos por 48 e 24 horas, respectivamente, foi realizada a coleta da suspensão celular, que foi transferida para tubos de centrifuga e centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e a suspensão homogeneizada em 0,5 mL de meio de cultura.

Para a realização do ensaio de viabilidade celular, foram separados em criotubos, 20 µL da suspensão celular. Em seguida, foi adicionado, em cada amostra, 20 µL de Azul de Trypan. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer, onde se quantificaram os percentuais das células vivas (brancas) e células mortas (azuis) encontradas em cada um dos quatro quadrantes da câmara.

Para o ensaio do cometa, foram montadas lâminas com 20 µL da suspensão celular com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão a 37 °C. Posteriormente, as lâminas foram banhadas em solução de lise (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque - NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10, aproximadamente 8 g de NaOH sólido para 1 L), pH 10, no escuro, em geladeira a 4 °C por, no mínimo, 1 hora. Após este procedimento, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese envolta por gelo, contendo uma solução tampão (NaOH 300 mM + EDTA 1 mM, com pH>13) a 4 °C, por 20 minutos, para a deslicoidização do DNA. A corrida eletroforética foi realizada por 20 minutos a 39 V e 300 mA (~ 0,8 V/cm). Em seguida, as lâminas foram neutralizadas com tampão de neutralização (pH 7,2) e fixadas em etanol absoluto.

As lâminas foram coradas com GelRed® (15 µL de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1M, e 45 mL de água destilada), no momento da análise em microscópio de epifluorescência Leica, filtro B - 34 (excitação:  $\lambda = 420 \text{ nm} - 490 \text{ nm}$ , barreira:  $\lambda = 520 \text{ nm}$ ). Foram analisados, ao acaso, 200 nucleóides por frasco (3 réplicas, duas lâminas com 50 nucleóides cada), totalizando 300 nucleóides/tratamento, em objetiva de 40x. Os danos no DNA foram estimados baseados na intensidade da cauda de DNA, medidos pelo software Comet Assay IV. A média dos resultados de cada tratamento foi calculada e submetida ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e então, de acordo com a distribuição dos dados, foi realizado o teste estatístico paramétrico ANOVA com post hoc de Dunnet, para comparar os danos entre as células tratadas com microcistina e controle negativo.

### **Teste do Micronúcleo**

As células HepG2 e ZFL foram semeadas em frascos de cultura com  $1 \times 10^6$  células e mantidas em condições controladas por 24 horas. Em seguida, as células foram submetidas aos tratamentos por mais 24(HepG2) e 48(ZFL) horas. Após a exposição das células aos tratamentos, foi retirado todo o conteúdo do frasco, substituído por meio de cultura novo e adicionado 3 µg/mL de citocalasina B, onde permaneceram, por 28 horas, para obtenção de células binucleadas. As células coletadas foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e a suspensão homogeneizada em 0,5 mL de meio de cultura. A suspensão celular foi tratada com solução hipotônica de citrato de sódio (0,01%) e homogeneizada com 2 gotas de formaldeído. Em seguida, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante descartado e a suspensão homogeneizada com solução fixadora de Carnoy (3 metanol:1 ácido acético, v:v). Para o preparo das lâminas, a suspensão celular foi ressuspendida em 0,5 mL de Carnoy e gotejada sobre lâminas pré-lavadas com água destilada e com um filme de água, a 4°C. Após secas em temperatura ambiente, foram coradas com Giemsa 5% por 8 minutos.

Foram contabilizadas 1.000 células binucleadas com membrana nuclear e citoplasmática íntegras, núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e com o mesmo padrão e intensidade de coloração, por réplica, totalizando 6.000 células por tratamento. Foram observadas células binucleadas normais e células binucleares portadoras de MN, pontes nucleoplasmáticas e/ou brotos nucleares, usando critérios descritos por (PAERL; OTTEN, 2013). Para avaliar o índice de divisão celular e citotoxicidade (IDCC), foram contabilizadas 500 células por frasco, totalizando 3000 células/tratamento. O IDCC foi calculado seguindo a fórmula:  $IDCC = \frac{Ap + Nec + M1 + (2M2) + (3M3) + (4M4)}{N}$ , onde

M1 – M4 representa o número de células com 1-4 núcleos, respectivamente, Ap (células em apoptose), Nec (células em necrose) e N o número de células analisadas (UENO et al., 1996). Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e de acordo com a distribuição dos dados, foi realizada a análise de significância ou pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, ou o paramétrico ANOVA com post hoc Dunnet ( $p < 0,05$ ).

## Resultados

A análise do ensaio do cometa resultou nos dados apresentados na tabela 1. Todos os tratamentos apresentaram resultados estatisticamente significativos, para as duas linhagens testadas.

**Tabela 7** 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

Tratamentos	HepG2	ZFL
	Intensidade da Cauda	Intensidade da Cauda
Controle Negativo	6,08±3,53	6,86±2,19
Controle Positivo	64,00±2,41*	19,28± 2,34*
1 µg/L	26,55±3,36*	18,12±4,51*
1,5 µg/L	19,61±4,74*	22,10± 3,96*
2 µg/L	28,24±7,36*	21,38±2,79*
Extrato do Meio	17,26±3,711*	12,36±2,72*

-\*estatisticamente significativo quando comparado com o controle negativo

Nas tabelas 2 e 3, estão os resultados obtidos por meio do teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese, sendo que na tabela 2 estão expostos os dados da análise de genotoxicidade em que apenas as maiores concentrações e o extrato do meio apresentaram diferença estatisticamente significativas quando comparados com o controle negativo. A análise do potencial mutagênico da amostra exposto na tabela 3, apresentou apenas resultados significativos para as maiores concentrações da endotoxina para o extrato da exotoxina.

**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.

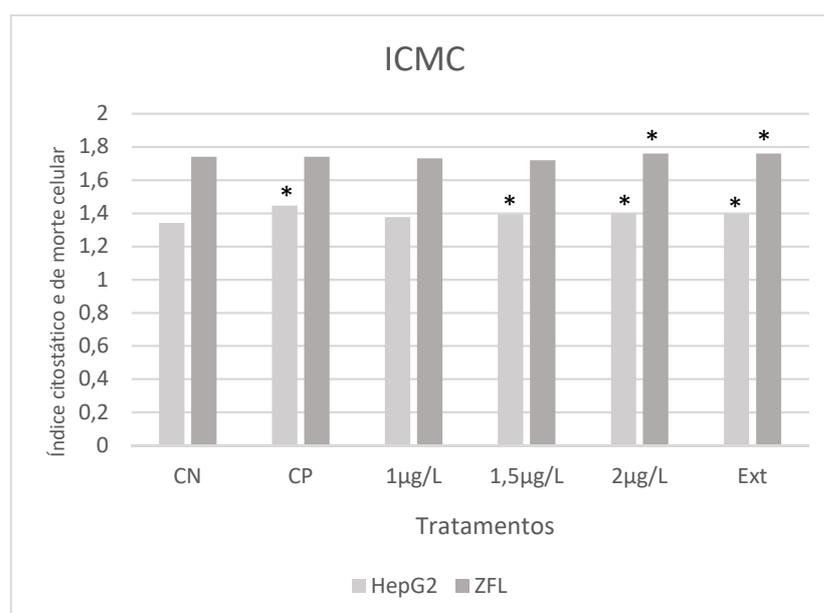
	Tratamentos	Controle Negativo	Controle Positivo	1µg/L	1,5 µg/L	2µg/L	Extrato do Meio
<b>HepG2</b>	Broto	3,83±0,75	32,33±13,64*	10,33±2,42	15,66±2,42*	36,83±14,98*	36,16±2,78*
	Ponte	0,00±0,00	4,00±2,00*	1,33±1,03	1,50±0,83	3,00±1,67*	8,50±0,83*
	B+MN	0,16±0,40	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,16±1,60	0,83±1,32
	P+MN	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,16±0,40
	Total NA	4,16±1,16	36,33±14,74*	11,66±3,01	17,16±2,48*	42,16±16,38*	45,83±1,60*
<b>ZFL</b>	Broto	3,83±2,22	29,83±21,25*	7,33±3,01	15,00±4,81*	16,33±2,25*	14,16±1,94*
	Ponte	1,00±0,63	5,66±2,06*	0,50±1,22	2,50±2,42	5,83±5,19*	2,66±1,03
	B+MN	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,16±0,40
	P+MN	0,00±0,00	5,66±4,36*	0,00±0,00	0,16±0,40	0,50±0,54	0,33±0,81
	Total NA	4,83±2,40	41,83±23,57*	7,83±3,86	17,66±5,53*	22,66±7,17*	17,33±3,38*

\*- Estatisticamente significativo quando comparado com o Controle Negativo. B+MN: Broto+Micronúcleo; P+MN: Ponte+Micronúcleo; AN: Anormalidades Nucleares

**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.

	Tratamentos	1MN	2MN	3MN	4MN	Total MN
<b>HepG2</b>	Controle Negativo	6,33±1,21	1,33±2,42	0,16±0,40	0,00±0,00	7,83±3,54
	Controle Positivo	49,66±11,51*	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	49,66±11,51*
	1 µg/L	21,33±3,82*	0,00±0,00	0,16±0,40	0,00±0,00	21,50±3,83
	1,5 µg/L	27,50±2,16*	1,16±0,98	0,00±0,00	0,00±0,00	28,66±1,63*
	2 µg/L	48,66±16,96*	1,50±2,07	0,00±0,00	0,00±0,00	50,16±18,80*
	Extrato do Meio	48,16±7,52*	2,66±4,17	0,33±0,81	0,00±0,00	51,16± 4,79*
	<b>ZFL</b>	Controle Negativo	7,66±2,25	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Controle Positivo	78,83±15,84*	3,83±3,18*	1,33±0,81*	0,33±0,81	78,00±16,37*	
1 µg/L	13,33±4,17	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	13,33±4,17	
1,5 µg/L	17,16±3,92*	1,00±1,26	0,16±0,40	0,00±0,00	18,33±4,32*	
2 µg/L	23,66±2,33*	0,33±0,81	0,00±0,00	0,00±0,00	24,00±2,00*	
Extrato do Meio	17,00±1,89*	0,16±0,40	0,00±0,00	0,00±0,00	17,66±3,07*	

**Legenda:** (--- µg/L) concentrações testadas de microcistina \*- Estatisticamente significativo quando comparado com o Controle Negativo.



**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. \*- Estatisticamente si significativo quando comparado com o Controle Negativo.

Na figura 1, foram apresentados os resultados do índice citostático e de morte celular. Sendo que para HepG2 foram significativos nas concentrações maiores e para o extrato, já para a ZFL apenas a maior concentração e o extrato do meio apresentaram significância.

## Discussão

As atividades antropogênicas produzem compostos que, quando descartados no ambiente, alteram as características físico-químicas e biológicas dos ecossistemas. Isto pode ser visto quando há um excesso de nutrientes lançado no meio aquático (rios, lagos, reservatórios e oceanos) e estes são capazes de estimular o aparecimento de florações de cianobactérias. As consequências ambientais das florações destes microrganismos começam pela própria descaracterização da água, pela perda da sua cristalinidade, o que impede a penetração de luz adequada para a manutenção das macrófitas aquáticas, causando um déficit destes organismos no sistema. Como esses são organismos produtores do sistema, causa um efeito direto sobre os demais consumidores dependentes da energia por eles gerada. Esse desequilíbrio ambiental, além de afetar a biota do local, interfere, de forma indireta na saúde humana (UENO et al., 1996). O efeito das microcistinas derivadas de florações de cianobactérias sobre a saúde humana foi sugerido em estudos epidemiológicos, que constataram a alta incidência de câncer hepático atribuído a presença de MCLR em certas regiões da China (ZEGURA et al., 2011). Entretanto as informações sobre o risco de genotoxicidade em humanos ainda são escassas e inconclusivas.

Os resultados deste estudo mostram uma ação citotóxica e genotóxica da microcistina para células hepáticas humanas e de peixes (HepG2 e ZFL, respectivamente), confirmando a hepatotoxicidade desta substância. O teste do cometa apresentou resultados significativos para todas as concentrações da biomassa de *M. aeruginosa*, e para o extrato do meio, indicando genotoxicidade tanto da endotoxina quanto da exotoxina. Nossos dados são corroborados por (ZEGURA et al., 2011), que também observaram a presença da genotoxicidade nos seus estudos realizados com células de hamster chinês modificada com gene humano (A<sub>L</sub>).

No entanto, quando avaliamos a genotoxicidade e mutagenicidade pelo teste do MN, foram observados, para as duas linhagens testadas, aumentos desses índices apenas para as maiores concentrações de biomassa de *M. aeruginosa* e para o extrato do meio de cultivos dessas cianobactérias. Esses resultados indicam que a toxicidade das cianotoxinas é dose dependente, podendo estar relacionada com a gravidade dos danos causados por elas, onde baixas concentrações induzem danos passíveis de serem reparados pelos sistemas de reparo celular e as maiores concentrações desta toxina, causam distúrbios na maquinaria de reparo das células. Essa influência da microcistina sobre o mecanismo de reparo celular foram descritos também por (ZEGURA et al., 2011), que encontraram que a microcistina induziu aumento do danos celulares e também expressão positiva para genes de reparo.

Neste estudo, observamos um aumento no número de MN para as células de ambas as linhagens expostas à toxina. A presença desta anormalidade pode ser decorrente da interação das endo e exo toxinas com o citoesqueleto celular, que acaba interferindo na segregação cromossômica nos eventos de divisão celular. Essa hipótese também está suportada nos estudos de Zhou et al. (2015), que afirmaram que a MCLR pode causar um colapso nos três componentes do citoesqueleto (microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermediários); e pelas observações de Huang et al. (2015) que observaram alterações morfológicas na estrutura do citoesqueleto de células de rim de carpa CIK, expostas a MCLR. Os autores descrevem que, após 24 horas de exposição, ficou clara a diminuição no número de microtúbulos e uma retração desses microtúbulos e dos microfilamentos agregados em torno do núcleo. Após 48 hora de tratamento, as células apresentaram severas desorganizações dos microfilamentos. Lammerding and Wolf (2016) afirmam que o distúrbio no citoesqueleto leva a formação de brotos nucleares, que podem levar a ruptura do envoltório nuclear, o que pode resultar na perda de cromatina, mecanismo este que justifica a presença de micronúcleos nas células expostas as microcistinas.

Também foi observado um aumento nos índices citostáticos e de morte celular nas células expostas a maior concentração da biomassa e ao extrato do meio de cultivo da *M. aeruginosa*. Observamos que, na concentração média, também houve aumento significativo desses índices na linhagem celular de hepatócito humano. A ação proliferativa da microcistina também já foi comprovada em outros estudos, como o de (MA et al., 1995), que verificaram a atividade proliferativa da MCLR em fígado de ratos. (MILUTINOVIC et al., 2002; MILUTINOVIĆ et al., 2003)) também estudaram a

atividade proliferativa da microcistina em hepatócitos humanos (Linhagem HL7702), e constataram um aumento na proliferação celular após 24h, 48 horas e 72 horas de exposição a concentrações maiores que as testadas neste estudo.

Diante dos resultados observados e discutidos neste estudo, concluímos que a MCLR (endo e exotoxinas) possui ação genotóxica e potencial mutagênico para células hepáticas, pois obtivemos resultados positivos para esses parâmetros, quando testamos cianotoxina em linhagem de células de fígados de peixes (ZFL) e de humanos (HepG2). A ação mutagênica observada, pela presença de MN infere que essa microcistina interfere no citoesqueleto e, em decorrência disso, promove alterações que decorrem em transtornos hepáticos graves, que associada a ação proliferativa desta toxina, confirmada pelo IDCC, pode promover a tumorigênese. Frente a essas discussões, destacamos a necessidade de mais estudos sobre as consequências que as florações de cianobactérias podem acarretar à saúde ambiental e humana.

#### Referências bibliográficas

- BÖRNER, T.; DITTMANN, E. Molecular Biology of Cyanobacterial Toxins. In: **Harmful Cyanobacteria**. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. 3p. 25–40.
- 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>>.
- 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>>.
- 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, C<sub>60</sub>) 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>>.
- 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>>.
- 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>>.
- 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>>.
- 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>>.
- 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 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.; 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. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12504755>>.
- 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>>.
- 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>>.
- 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>>.
- 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>>.
- 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>>.
- 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. 2016. 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>>.
- 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.
- MILUTINOVIC, A.; ZIVIN, M.; ZORC-PLESKOVIC, 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>>.
- 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>>.
- 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>>.
- RAVEN, J. A.; GIORDANO, M.; BEARDALL, J.; MABERLY, S. C. Algal evolution in relation to atmospheric CO<sub>2</sub>: 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>>.
- 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>>.
- SANDRINI, G.; JI, X.; VERSPAGEN, J. M. H.; TANN, R. P.; SLOT, P. C.; LUIMSTRA, V. M.; SCHUURMANS, J. M.; MATTHIJS, H. C. P.; HUISMAN, J. Rapid adaptation of harmful cyanobacteria to rising CO<sub>2</sub>. **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>>.
- 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>>.
- 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>>.
- 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>>.
- 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>>.
- 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>>.

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>>.

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>>.

## 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](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](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, C<sub>60</sub>) 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](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 Toxicology**, 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](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](http://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 CO<sub>2</sub>: 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](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](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 CO<sub>2</sub>. **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-](http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1864-1318&volume=126&issue=1&spage=251)

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]. **Mikrobiologiia**, 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 TiO<sub>2</sub> 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>>.