

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA

**EFEITOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DA
CIANOBACTÉRIA *Microcystis aeruginosa* SOBRE O
POLIQUETO *Laeonereis acuta* (POLYCHAETA,
NEREIDIDAE)**

MSc. JANAINA DE CASTRO LEÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de DOUTOR.

Orientador: Prof. Dr. João Sarkis Yunes

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Laura Alicia Geracitano

RIO GRANDE

Setembro de 2008

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande, pela oportunidade.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. João Sarkis Yunes e Dr^a Laura Alicia Geracitano, pelo apoio, orientação e paciência.

Ao prof. Dr. José Maria Monserrat, pelo apoio em momentos difíceis, com sugestões e críticas que foram fundamentais.

À prof^a. Dr^a. Daniela Martí Barros, pelas sugestões experimentais utilizadas no capítulo III desta tese.

À colega Lílian Lund Amado pela amizade e pela imprescindível ajuda durante os procedimentos analíticos bioquímicos.

Ao colega Wilson Alves Colvara pelo apoio durante as etapas de coleta dos organismos e análise química em HPLC.

A todos os colegas da Unidade de Pesquisa em Cianobactérias, pelo apoio, incentivo, paciência e, principalmente, amizade.

Aos colegas do Departamento de Ciências Fisiológicas, incluindo minhas companheiras de congresso, que tornaram maravilhosa a minha passagem pelo departamento.

Aos meus pais, Rubens Leão de Andrade e Márcia Maria de Castro Cruz, ao meu irmão, Izan de Castro Leão e à minha irmã, Alessandra Lócio de Andrade, por estarem sempre presente (mesmo de longe) com palavras de conforto e, principalmente, incentivo.

Ao meu companheiro de jornada, o meu “porto seguro”, Rafael Gallo Costa, pela paciência, carinho, dedicação e, principalmente, amor.

À minha segunda família, Irani Gallo Costa, Armandio Gallo Costa, Guilherme T. Gallo Costa, Fabiana Gallo Costa, Carlos Renan Varela Juliano Jr, Sandro Gallo Costa e Louise Alves Almeida, pelo afeto e carinho ao longo dessa jornada.

À todos os amigos que de forma direta ou indireta contribuíram para o que eu sou, e poder estar alcançando esta importante etapa da minha vida.

“A felicidade não está em fazer o que a gente quer e sim em querer o que a gente faz...”

Jean Paul Sartre

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO I -Geral-	1
1.1. INTRODUÇÃO GERAL.....	2
1.1.1. As Cianobactérias.....	2
1.1.2. Florações de Cianobactérias	3
1.1.3. As Cianotoxinas	6
1.1.4. As Microcistinas	14
1.1.5. Efeito das Microcistinas nos Organismos Aquáticos.....	15
1.1.6. Bioacumulação das MC e Transferência na Cadeia Trófica	22
1.1.7. <i>Laenoneis acuta</i>	23
1.1.8. Hipóteses e Objetivos	25
1.2. ÁREA DE ESTUDO	27
1.2.1. A Lagoa dos Patos.....	27
1.2.2. O Estuário da Lagoa dos Patos	27
1.3. MATERIAL E MÉTODOS	29
1.3.1. Coleta dos Organismos	29
1.3.2. Cultivo das cianobactérias	31
1.3.3. Exposição dos Organismos	32
1.3.4. Análises dos conteúdos de microcistinas	37
1.3.5. Avaliação Fisiológica	38
1.3.6. Análises Bioquímicas.....	41

CAPÍTULO II -Estresse Oxidativo-	49
2.1. RESUMO.....	50
2.2. INTRODUÇÃO	51
2.3. MATERIAL E MÉTODOS	52
2.4. RESULTADOS	53
2.5. DISCUSSÃO	55
2.6. CONCLUSÃO.....	57
CAPÍTULO III -Alteração na Motilidade-	58
3.1. RESUMO.....	59
3.2. INTRODUÇÃO	60
3.3. MATERIAL E MÉTODOS	62
3.4. RESULTADOS	65
3.5. DISCUSSÃO	69
3.6. CONCLUSÃO.....	75
CAPÍTULO IV -Bioacumulação e Transferência na Cadeia Trófica-	77
4.1 RESUMO.....	78
4.2. INTRODUÇÃO	79
4.3. MATERIAL E MÉTODOS	81
4.4. RESULTADOS	82
4.5. DISCUSSÃO	84
4.6. CONCLUSÃO.....	86
CAPÍTULO V -Considerações Finais e Perspectivas Futuras-	87
5.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
5.2. PERSPECTIVAS FUTURAS	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
ANEXOS.....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Concentrações de microcistinas nas amostras coletadas de áreas localizadas na Lagoa dos Patos, durante ocorrência de florações em 2006.....	63
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Floração de <i>Microcystis aeruginosa</i> na praia de São Lourenço, localizada na Lagoa dos Patos (verão de 2006).....	5
Figura 1.2: Estrutura química das anatoxina-a e a(s).....	8
Figura 1.3: Mecanismo de ação das anatoxinas-a e a(s).....	9
Figura 1.4: Estrutura química da saxitoxina e suas variantes.....	10
Figura 1.5: Mecanismo de ação das saxitoxinas.....	10
Figura 1.6: Parede celular de uma bactéria gram-negativa mostrando a localização dos lipopolissacarídeos (LPS).....	11
Figura 1.7: Estrutura química de duas hepatotoxinas.....	13
Figura 1.8: Efeito da microcistina no fígado.....	16
Figura 1.9: Geração de estresse oxidativo bem como danos oxidativos, induzidos por microcistinas.....	20
Figura 1.10: Imagem de um exemplar de <i>L. acuta</i>	24
Figura 1.11: Estuário da Lagoa dos Patos.....	28
Figura 1.12: Local de coleta dos organismos (peixes e poliquetos).....	29
Figura 1.13: Coleta e aclimação dos poliquetos.....	30
Figura 1.14: Aquário e aclimação dos peixes.....	31
Figura 1.15: Obtenção do liofilizado das cianobactérias <i>Microcystis aeruginosa</i> (tóxica) e <i>Aphanotece sp.</i> (não tóxica).....	32
Figura 1.16: Tratamentos utilizados no teste para avaliação da ocorrência de estresse oxidativo no poliqueto <i>Laeonereis acuta</i> exposto a uma cepa tóxica de <i>Microcystis aeruginosa</i> e uma cepa não-toxica de <i>Aphanotece sp.</i>	33

Figura 1.17: Tratamentos utilizados no teste para avaliação do consumo de O ₂ e da motilidade do poliqueto <i>Laeonereis acuta</i> exposto a uma cepa tóxica de <i>Microcystis aeruginosa</i> e uma cepa não-toxica de <i>Aphanotece sp.</i>	34
Figura 1.18: Tratamentos utilizados no teste para avaliação da transferência de microcistina do poliqueto (<i>Laeonereis acuta</i>) para o peixe (<i>Jenynsia multidentata</i>).....	36
Figura 1.19: Eletrodo tipo Clark.....	39
Figura 1.20: Aparelho utilizado para medir o consumo de oxigênio.....	39
Figura 1.21: Método empregado para avaliação da motilidade dos poliquetos (oscilações.min ⁻¹).....	40
Figura 2.1: Atividade enzimática após 48 horas de exposição à 2 g.L ⁻¹ de células liofilizadas da cepa tóxica de <i>Microcystis aeruginosa</i> (≈2 mg MC.L ⁻¹), 2 g.L ⁻¹ de células liofilizadas da cianobactéria não tóxica <i>Aphanotece sp.</i> , e ausência de cianobactérias (controle).....	54
Figura 2.2: Danos oxidativos após 48 horas de exposição à 2 g.L ⁻¹ de células liofilizadas da cepa tóxica de <i>Microcystis aeruginosa</i> (≈2 mg MC.L ⁻¹), 2 g.L ⁻¹ de células liofilizadas da cianobactéria não tóxica <i>Aphanotece sp.</i> , e ausência de cianobactérias (controle).....	55
Figura 3.1: Área de coleta das amostras de água de superfície e dos espécimes de poliqueto.....	62

Figura 3.2: Taxas de consumo de oxigênio nos poliqueto <i>Laeonereis acuta</i> expostos a 3 g.L ⁻¹ de células liofilizadas de <i>Microcystis aeruginosa</i> tóxica (≈3 mg.L ⁻¹ de microcistinas), 3 g.L ⁻¹ de células liofilizadas de <i>Aphanotece sp.</i> não tóxica, e ausência de células de cianobactérias (controle), durante 27 horas, e expostos à eserina (0,02 mg.L ⁻¹), durante 3 horas (após exposição às cianobactérias).....	67
Figura 3.3: Motilidade dos poliquetos <i>Laeonereis acuta</i> expostos a 3 g.L ⁻¹ de células liofilizadas de <i>Microcystis aeruginosa</i> tóxica (≈3 mg.L ⁻¹ de microcistinas), 3 g.L ⁻¹ de células liofilizadas de <i>Aphanotece sp.</i> não tóxica, e ausência de células de cianobactérias (controle), durante 27 horas, e expostos à eserina (0,02 mg.L ⁻¹), durante 3 horas (após exposição às cianobactérias).....	68
Figura 3.4: Atividade das enzimas fosfatases (PP) nos poliquetos <i>Laeonereis acuta</i> expostos a 3 g.L ⁻¹ de células liofilizadas de <i>Microcystis aeruginosa</i> tóxica (≈3 mg.L ⁻¹ de microcistinas), 3 g.L ⁻¹ de células liofilizadas de <i>Aphanotece sp.</i> não tóxica, e ausência de células de cianobactérias (controle), durante 27 horas, e expostos à eserina (0,02 mg.L ⁻¹), durante 3 horas (após exposição às cianobactérias).....	69
Figura 4.1: Concentração de microcistinas (MC) no tecido dos peixes controle (alimentados com ração comercial), dos peixes alimentados com poliquetos não contaminados e dos peixes alimentados com poliquetos contaminados com microcistinas (2,58 µg de MC.g ⁻¹ de peso seco), após 6 dias de exposição....	83

RESUMO

A elevada carga de material orgânico lançado em ambientes aquáticos tem causado a eutrofização artificial de corpos de água no mundo. Esta elevação da carga de nutrientes favorece a ocorrência de florações tóxicas de cianobactérias, prejudiciais ao meio ambiente e ao homem. Florações tóxicas contendo *Microcystis aeruginosa*, vêm sendo observadas na Lagoa dos Patos nos últimos 30 anos. As microcistinas são cianotoxinas hepatotóxicas conhecidas por inibirem as fosfatases (PP) e por gerarem estresse oxidativo. O poliqueto *Laeonereis acuta* é considerado um importante bioindicador em estudos ecotoxicológicos realizados na Lagoa dos Patos. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos bioquímicos e fisiológicos da cianobactéria *M. aeruginosa* sobre o poliqueto *L. acuta*, bem como a transferência de microcistinas entre dois níveis da cadeia trófica. Foi caracterizada a geração de estresse oxidativo, observado pelos altos níveis de lipídios peroxidados, além da ocorrência de conjugados DNA-proteína, no grupo exposto a células liofilizadas de *M. aeruginosa*. A perda da motilidade, associada com efeitos induzidos pelas microcistinas, como a inibição das PP, também foi observada. A transferência de microcistinas do poliqueto *L. acuta* para o peixe *Jenynsia multidentata* mostrou que os organismos podem entrar em contato e se contaminarem sem estarem expostos diretamente. Os presentes resultados mostram que existem efeitos mensuráveis gerados nos organismos aquáticos expostos. Não somente o acúmulo de microcistinas nos tecidos deve ser analisado, mas também efeitos bioquímicos e fisiológicos, para se avaliar os riscos toxicológicos para as populações expostas a essas toxinas.

Palavras-chave: *Microcystis*, microcistina, *Laeonereis*, estresse oxidativo, motilidade, bioacumulação.

ABSTRACT

The organic matter increase in the aquatic environment has been the cause of artificial eutrofication in water bodies of the world. This rise in nutrients favors the occurrence of toxic cianobacterial blooms, harmful to the environment and men. Several blooms containing the toxic species *Microcystis aeruginosa*, have been observed in the Patos Lagoon over the last three decades. Microcystins are hepatotoxic cyanotoxins known to inhibit protein phosphatases (PP) and to induce oxidative stress. The worm *Laeonereis acuta* has been regarded as an important bioindicator for ecotoxicological studies carried out in the Patos Lagoon. The present work aimed to evaluate the effects of the cyanobacteria *M. aeruginosa* extracts on the worm *L. acuta* as well the microcystins transfer to the food web. The generation of oxidative stress has been characterized by the high lipid peroxides and the occurrence of high DNA-protein crosslink levels has been observed, in the group exposed to lyophilized cells of *M. aeruginosa*. The lost of motility associated to classic effect induced by microcystins, as the PP enzymes inhibition was also observed. The transfer of microcystins from the worm *L. acuta* to the fish *Jenynsia multidentata* showed that the organisms can have contact and being contaminated without being directly exposed. The present results indicate that there are measurable effects generated in the aquatic organisms exposed to microcystins. The accumulation in tissues should not only be analyzed, but also the biochemical and physiological effects, in order to evaluate the toxicological risk to populations exposed to these toxins.

Key-words: *Microcystis*, microcystin, *Laeonereis*, oxidative stress, motility, bioaccumulation.

CAPÍTULO I

-Geral-

1.1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1.1. As Cianobactérias

As cianobactérias são organismos procariontes autotróficos, na maioria aeróbicos, que possuem um sistema fotossintetizante idêntico ao dos vegetais, sendo comuns em todos os habitats naturais (Mur *et al.*, 1999).

A origem das cianobactérias é estimada em 3,5 bilhões de anos pela descoberta de fósseis em rochas sedimentares (estromatólitos) encontradas na Austrália. As cianobactérias estão, portanto, entre os organismos pioneiros da Terra, sendo provavelmente os primeiros produtores primários de matéria orgânica a liberarem oxigênio elementar na atmosfera primitiva (Schopf & Walter, 1982).

A diversidade das cianobactérias pode ser analisada nos diversos aspectos estruturais e funcionais da morfologia da célula e nas variações em estratégias metabólicas, motilidade, divisão celular, desenvolvimento, mecanismos de defesas, etc (Bartram *et al.*, 1999; Sivonem & Jones, 1999). A produção de substâncias extracelulares e toxinas pelas cianobactérias demonstram apenas parte das suas interações com outros organismos (Christoffersen, 1996a; Wiegand & Pflugmacher, 2005; Funari & Testai, 2008).

As espécies que fixam nitrogênio contribuem para a fertilização de águas e solos (Yunes & Melo, 1987). As cianobactérias são importantes produtoras primárias e possuem um alto valor nutricional. Assim, pesquisas extensivas vêm sendo desenvolvidas em diversos campos da biotecnologia, como na utilização das cianobactérias para produção de alimentos e para fabricação de produtos de interesse farmacêuticos (Bartram *et al.*, 1999). Contudo podem ser

fonte de consideráveis problemas em muitas situações ambientais. Alguns gêneros de cianobactérias vivem dispersos na água fazendo parte do fitoplâncton (*Microcystis*, *Cylindrospermopsis*), enquanto outros crescem no sedimento, fazendo parte do fitobentos (*Nostoc*, *Calothrix*). Quando expostas a condições específicas, especialmente água rica em nutrientes, temperatura elevada e luz solar, as cianobactérias multiplicam-se atingindo grandes densidades, caracterizando as florações (Carmichael, 1992).

1.1.2. Florações de Cianobactérias

Condições de temperatura, luminosidade e concentração de nutrientes são decisivas para o aumento do crescimento de algas e cianobactérias em águas de superfície, tanto marinha como água doce (Pearson *et al.*, 1990; Yunes *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 2003). Quando a proliferação é dominada por uma (ou poucas) espécie(s), o fenômeno é referido como sendo uma floração de alga ou de cianobactéria (Yunes *et al.*, 1996).

Problemas associados com cianobactérias parecem aumentar em áreas de elevado crescimento populacional junto a corpos de água eutrofizados. A crescente eutrofização dos ambientes aquáticos tem sido produzida por atividades humanas, causando um enriquecimento artificial desses ecossistemas. As principais fontes desse enriquecimento têm sido identificadas como as descargas de esgotos domésticos e industriais dos centros urbanos e das regiões agriculturáveis (Carmichael *et al.*, 1993; Chorus, 1993; Dokulil *et al.*, 2000; Metcalf & Codd, 2004).

Esta eutrofização artificial ocorre principalmente pelo excesso de nitrogênio e fósforo e produz mudanças nas qualidades da água incluindo a

redução de oxigênio dissolvido, perda das qualidades cênicas, aumento do custo de tratamento, morte extensiva de peixes e aumento da incidência de florações de microalgas e cianobactérias (Reynolds, 1987; Pearson *et al.*, 1990). Como rápida resposta à eutrofização, a comunidade fitoplanctônica (microalgas e cianobactérias) apresenta uma redução na diversidade de espécies e elevação da biomassa. Além disso, tem sido observado, em ambientes eutrofizados, um aumento na dominância de espécies de cianobactérias devido a sua capacidade competitiva (Reynolds, 1987; Azevedo *et al.*, 1994; Gregor & Marsálek, 2004).

As florações normalmente ocorrem quando a temperatura da água se encontra entre 15°C e 30°C e o pH entre 6 e 9, e são mais freqüentes em lagos e reservatórios de águas lânticas, pois é onde a qualidade da água se degrada mais rapidamente devido ao seu elevado tempo de estagnação. Estas florações se caracterizam pelo intenso crescimento desses microorganismos na superfície da água, formando uma densa camada de células com vários centímetros de profundidade, com conseqüências relacionadas com o meio ambiente e saúde pública (Chorus, 1993; Bartram *et al.*, 1999).

São conseqüências desse estado, a redução do oxigênio dissolvido da água devido ao aumento da atividade metabólica das bactérias aeróbicas responsáveis pela decomposição da matéria orgânica, e a produção de toxinas por algumas espécies de cianobactérias. Ambos, muitas vezes, estão associados à morte de animais (Sivonen & Jones, 1999).

Altas biomassas de cianobactérias podem também causar problemas de estética ambiental, prejudicando o uso recreativo da água devido à produção

de espumas e liberação de odor desagradável, afetando também o sabor da água de consumo (Chorus, 1993).

É freqüente a ocorrência de florações em que predominam as cianobactérias dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* ou *Oscillatoria* todas capazes de produzir toxinas (Reynolds, 1987; Bartram *et al.*, 1999; Metcalf & Codd, 2004).

Diversas florações de *Microcystis aeruginosa* vêm sendo observadas nos últimos 30 anos ao longo da Lagoa dos Patos, onde a maior foi verificada em maio de 1994, quando praticamente toda a extensão do estuário foi tomada por colônias flutuantes que permaneceram na região por vários dias (Yunes *et al.*, 1996). *M. aeruginosa* ocorre nas águas do estuário durante todo o ano, com maior abundância nos meses de verão e primavera (Matthiensen, 1996) (Figura 1.1).



Figura 1.1: Floração de *Microcystis aeruginosa* na praia de São Lourenço, localizada na Lagoa dos Patos (verão de 2006).

A ocorrência desses eventos tornou esse ambiente alvo de diversos estudos onde foi observada a toxicidade destas florações em organismos detritívoros como os crustáceos *Artemia salina* (Yunes *et al.*, 1996), *Farfantepenaeus paulensis* (Yogui *et al.*, 1998) e *Kalliapseudes schubartii* (Montagnolli *et al.*, 2004), no crustáceo herbívoro *Daphnia similis* (Monteiro, 2001) e no caranguejo estuarino *Chasmagnatus granulatus* (Dewes *et al.*, 2006). Além de ter sido observado a capacidade dessas toxinas serem bioacumuladas em organismos filtradores nativos desse ambiente como o *Mesodesma mactroides* e o *Perna perna* (Leão, 2004).

1.1.3. As Cianotoxinas

Vários gêneros e espécies de cianobactérias que formam florações produzem toxinas. As toxinas de cianobactérias, conhecidas como cianotoxinas, constituem uma grande fonte de produtos naturais tóxicos produzidos por esses microorganismos. Embora as causas da produção dessas toxinas ainda não estejam devidamente esclarecidas, elas têm sido prejudiciais à saúde humana e animal, havendo diversos registros de morte por envenenamento de gado bovino, cavalos, porcos, ovelhas, cães, peixes e invertebrados, pela ingestão ou contato com essas florações tóxicas (Carmichael, 1994; Falconer, 1999; WHO, 2003; Codd *et al.*, 2005; Funari & Testai, 2008). Evidências experimentais e epidemiológicas indicam que a exposição continuada a doses subletais de cianotoxinas pode levar ao desenvolvimento de tumores (Falconer, 1999).

Algumas dessas toxinas são caracterizadas por sua ação rápida, causando a morte por parada respiratória após poucos minutos de exposição,

tendo sido identificadas como alcalóides neurotóxicos, análogos químicos aos pesticidas organofosforados. Outras atuam menos rapidamente e são identificadas como peptídeos hepatotóxicos (Carmichael, 1994; Falconer, 1999; WHO, 2003; Codd *et al*, 2005).

As toxinas produzidas por cianobactérias são enquadradas em três categorias, segundo seus efeitos em mamíferos: (1) neurotoxinas; (2) lipopolissacarídeos (LPS); e (3) hepatotoxinas (Pearson, 1990; Falconer, 1993, Metcalf & Codd, 2004; Funari & Testai, 2008).

1.1.3.1. Neurotoxinas

Segundo Sivonen & Jones (1999) e Metcalf & Codd (2004), são conhecidas três famílias de alcalóides neurotóxicos produzidos por cianobactérias: (1) anatoxina-a, que compete com o neurotransmissor acetil colina; (2) anatoxina-a(s), que é uma anticolinesterase não competitiva; e (3) saxitoxinas, alcalóides produzidos por dinoflagelados e cianobactérias, que bloqueiam os canais de sódio eletrodependentes das células nervosas.

A anatoxina-a foi a primeira toxina de cianobactéria a ser quimicamente e funcionalmente definida e trata-se de uma amina secundária (Devlin *et al.*, 1977) com peso molecular de 165 daltons (Figura 1.2). Os sinais de envenenamento por esta toxina, em animais selvagens e domésticos, incluem: desequilíbrio, fasciculação muscular, respiração ofegante e convulsões. A morte é devida a parada respiratória e ocorre de poucos minutos a poucas horas, dependendo da dosagem e consumo prévio de alimento. Os sinais clínicos de intoxicação mostram uma progressão de fasciculação muscular, decréscimo de movimentos, respiração abdominal exagerada, cianose,

convulsão e morte (Carmichael, 2004; WHO, 2003; Metcalf & Codd, 2004; Codd *et al*, 2005; Funari & Testai, 2008).

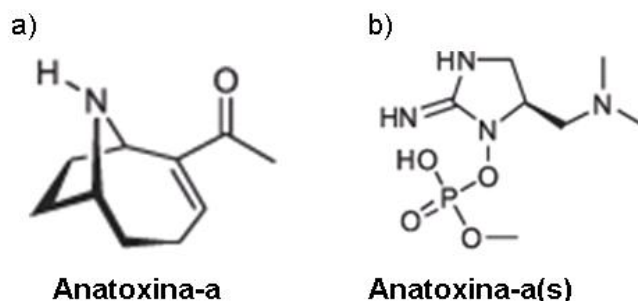


Figura 1.2: Estrutura química das anatoxina-a e a(s).

Este alcalóide neurotóxico é um potente bloqueador neuromuscular pós-sináptico de receptores nicotínicos e colinérgicos. Esta ação se dá porque a anatoxina-a se liga irreversivelmente aos receptores da acetilcolina, sendo incapaz de ser degradada pela acetilcolinesterase (Figura 1.3). A DL_{50} intraperitoneal (i.p.) em camundongos, para a toxina purificada, é de 200 $\mu\text{g/Kg}$ de peso corpóreo, com um tempo de sobrevivência de 1 a 20 minutos (Carmichael, 1992; 1994; Metcalf & Codd, 2004; Funari & Testai, 2008).

Doses orais produzem letalidade aguda em concentrações maiores, pois a toxicidade das células é alta o suficiente para que os animais precisem ingerir de poucos mililitros a poucos litros de água da superfície das florações para receber uma quantidade letal (Carmichael, 1992; 1994; Funari & Testai, 2008).

Outra neurotoxina, posteriormente caracterizada, que apresenta os mesmos sinais de intoxicação da anatoxina-a, acrescidos da intensa salivação, foi designada como anatoxina-a(s) (“s” de salivação). Estruturalmente é caracterizada como uma N-hidroxiguanidina fosfato de metila (Matsunaga *et al.*, 1989; WHO, 2003; Metcalf & Codd, 2004) (Figura 1.3).

Esta neurotoxina se liga ao sítio de ação da acetilcolinesterase, impedindo a degradação da acetilcolina ligada aos receptores (Figura 1.3). A DL₅₀ (i.p.) em camundongos é de 20µg/Kg de peso corpóreo e, portanto, dez vezes mais potente que a anatoxina-a (Carmichael, 1994; Metcalf & Codd, 2004; Funari & Testai, 2008).

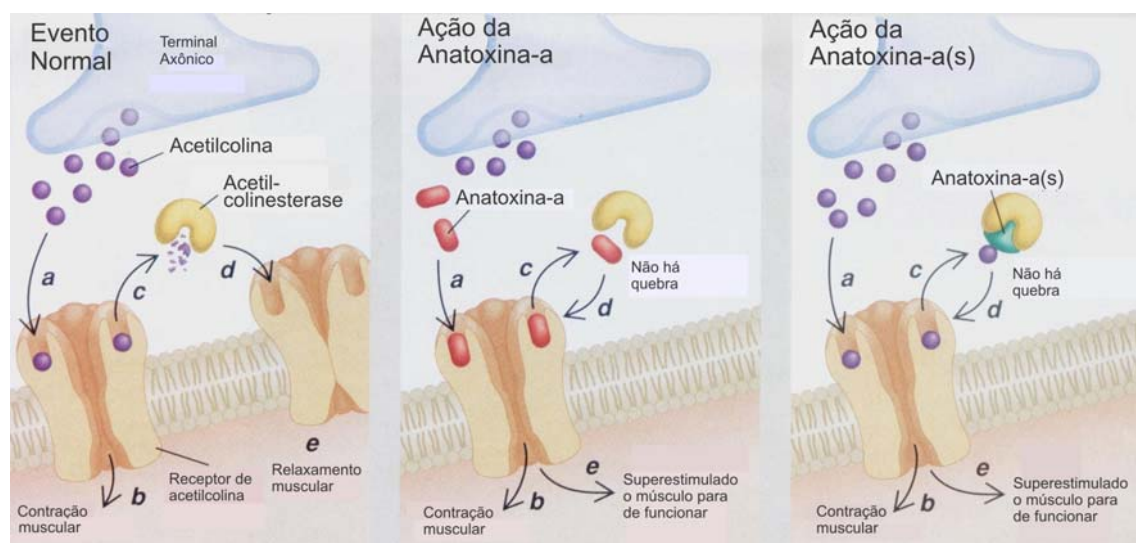


Figura 1.3: Mecanismo de ação das anatoxinas-a e a(s). Fonte: Carmichael, 1994.

Outras neurotoxinas da classe das “toxinas paralizantes”, conhecidas como PSPs, que foram isoladas de dinoflagelados marinhos (responsáveis pelas marés vermelhas) e de cepas de cianobactérias, dos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbia* e *Cylindrospermopsis*, são as saxitoxinas (Carmichael, 1994; Lagos *et al.*, 1999; Metcalf & Codd, 2004; Funari & Testai, 2008) (Figura 1.4).

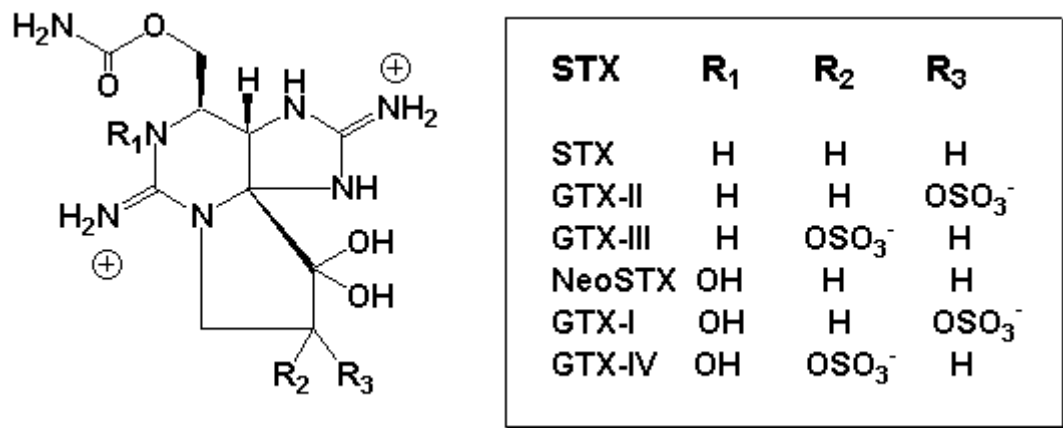


Figura 1.4: Estrutura química da saxitoxina e suas variantes. (STX - saxitoxina; GTX – gonialtoxina).

Estas neurotoxinas são alcalóides que inibem a condução nervosa bloqueando os canais de sódio, afetando a permeabilidade aos íons de sódio ou a resistência das membranas. A DL₅₀ (i.p.) em camundongos é 10-30 µg/Kg de peso corpóreo (Carmichael, 1994; Metcalf & Codd, 2004; Funari & Testai, 2008) (Figura 1.5).

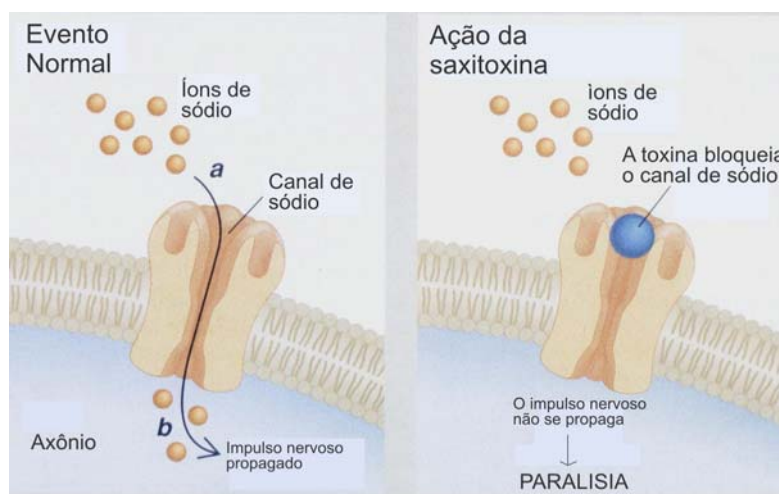


Figura 1.5: Mecanismo de ação das saxitoxinas.

Fonte: Carmichael, 1994.

Anatoxina-a tem sido encontrada nos gêneros *Anabaena*, *Oscillatoria*, e *Aphanizomenon*, anatoxina-a(s) produzida por *Anabaena*, e saxitoxinas produzidas por *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Lyngbya* e *Cylindrospermopsis* (Sivonen & Jones, 1999). Mais de 21 variantes de saxitoxinas confirmadas de amostras têm sido reportadas (Mur *et al.*, 1999)

1.1.3.2. Dermatoxinas

Os LPS são componentes integrais da parede celular de bactérias gram-negativas, incluindo cianobactérias, e podem desencadear respostas alérgicas e irritantes em tecidos humanos e animais que entrarem em contato com esse composto (Pearson, 1990; Metcalf & Codd, 2004) (Figura 1.6).

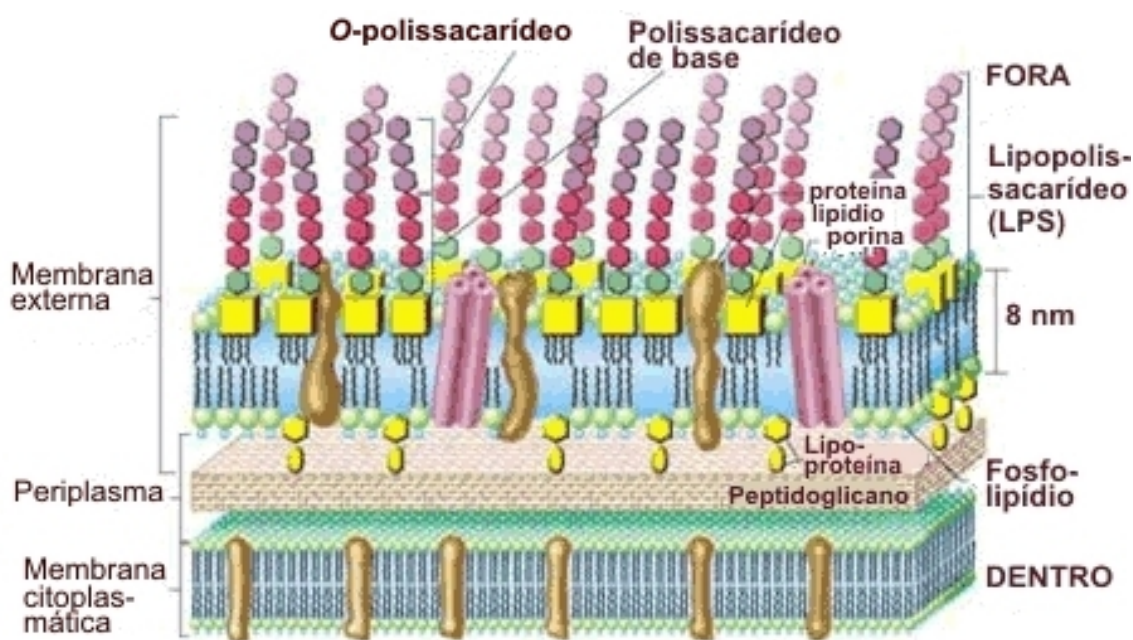


Figura 1.6: Parede celular de uma bactéria gram-negativa mostrando a localização dos lipopolissacarídeos (LPS).

Fonte: ecolio157toxins.googlepages.com/taxonomia

1.1.3.3. Hepatotoxinas

O tipo mais comum de intoxicação envolvendo cianobactérias é causado por hepatotoxinas, que apresentam uma ação mais lenta, causando a morte entre poucas horas e poucos dias, em decorrência de hemorragia intra-hepática e choque hipovolêmico (Carmichael & Schwartz, 1984; Beasley *et al.*, 1989; Carmichael, 1994; Metcalf & Codd, 2004; Funari & Testai, 2008).

Existem dois tipos de hepatotoxinas, as microcistinas e as nodularinas (Falconer, 1993). As microcistinas foram primeiramente isoladas a partir da cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, por isso recebeu tal denominação (Pearson, 1990). Porém essas cianotoxinas têm sido observadas em espécies planctônicas dos gêneros *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Nostoc*, e *Anabaenopsis*, e no gênero terrestre *Hapalosiphon* (Sivonen & Jones, 1999). A nodularina tem sido observada somente na espécie *Nodularia spumigena* (Carmichael, 1994).

As hepatotoxinas são heptapeptídeos (microcistinas) ou pentapeptídeos (nodularina) com os aminoácidos terminais formando uma união peptídica, gerando um composto cíclico (Figura 1.7). As hepatotoxinas são solúveis em água e, com exceção de algumas microcistinas hidrofóbicas, são incapazes de penetrar diretamente nas membranas lipídicas de células de animais, plantas e bactérias (Falconer, 1993; Metcalf & Codd, 2004; Funai & Testai, 2008).

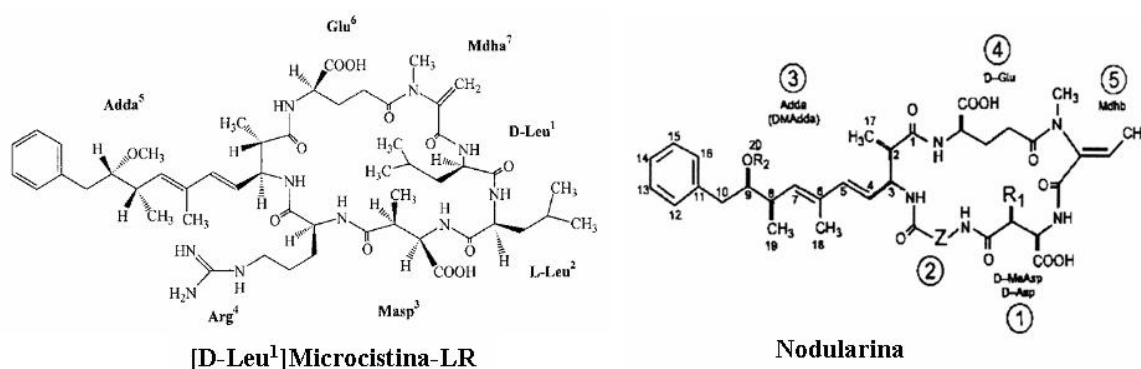


Figura 1.7: Estrutura química de duas hepatotoxinas.

As hepatotoxinas levam animais à morte após alterações citoesqueléticas das células do fígado, causando hemorragia intra-hepática letal ou insuficiência hepática. São consideradas hepatotoxinas devido ao seu modo de ação em mamíferos nos quais são rapidamente absorvidas pelos hepatócitos, pelas mesmas vias de transporte dos sais biliares. Elas atingem os hepatócitos por meio de transportadores dos ácidos biliares (Erikson *et al.*, 1990; Falconer, 1993; Carmichael, 1994; Metcalf & Codd, 2004) e promovem uma desorganização dos filamentos intermediários e dos filamentos de actina, que são polímeros protéicos componentes do citoesqueleto (Runnegar & Falconer, 1986). Esta desorganização leva a uma retração dos hepatócitos, provocando a perda de contato entre eles com as células que formam os capilares sinusoidais. Como consequência, o fígado perde sua arquitetura e desenvolve graves lesões internas. A perda de contato entre as células cria espaços internos que são preenchidos pelo sangue que passa a fluir dos capilares para esses locais (Hooser *et al.*, 1991; Carmichael, 1994; Lambert *et al.*, 1994; Metcalf & Codd, 2004).

Estudos têm mostrado que estas toxinas são reconhecidas como potentes promotores de tumores hepáticos (Falconer, 1991; Fujiki, 1992; Nishiwaki-Matsuhima *et al.*, 1992; Ding & Ong, 2003; Bouaicha & Maatouk, 2004; Zegura *et al.*, 2006; Weng *et al.*, 2007; Kujbida *et al.*, 2008) e, portanto, a ocorrência de espécies potencialmente produtoras dessas substâncias no ambiente aquático precisa ser melhor investigada e monitorada.

1.1.4. As Microcistinas

A hepatotoxina mais comum e, conseqüentemente, mais estudada, é a microcistina, que é freqüentemente associada a incidentes envolvendo envenenamento de animais e danos à saúde humana (Carmichael, 1994; WHO, 2003; Metcalf & Codd, 2004; Funari & Testai, 2008).

A ação nociva dessas toxinas foi comprovada em seres humanos quando no Brasil foi registrado um episódio de intoxicação aguda ocorrida no Instituto de Doenças Renais (Caruaru, PE). Mais de 60 pessoas morreram com sintomas de hepatotoxicidade provocada por microcistinas presentes em uma floração que ocorreu na água utilizada para hemodiálise (Jochimsem *et al.*, 1998).

Têm sido reportadas mais de 60 variantes estruturais de microcistinas que foram caracterizadas a partir de amostras de florações e de cepas isoladas de cianobactérias. Segundo Matthiensen *et al.* (2000), a [D-Leu¹]microcistina-LR é a principal variante produzida pela *M. aeruginosa* presente na Lagoa dos Patos (Figura 1.7). Sua estrutura química é caracterizada pela presença de uma D-Leucina e uma L-Leucina nas posições 1 e 2, respectivamente. Essa variante apresenta um valor de DL₅₀ de 71 µg.Kg⁻¹ (Matthiensen *et al.*, 2000),

enquanto que as variantes microcistina-LR e -RR apresentam valores de DL₅₀ de 50 e 320 µg/Kg, respectivamente, em bioensaio com camundongo (Chen *et al*, 2006).

1.1.5. Efeito das Microcistinas nos Organismos Aquáticos

1.1.5.1. Inibição da atividade das PP1 e 2A e hepatotoxicidade

As PP são responsáveis pelo balanço entre a fosforilação e a desfosforilação de proteínas que ocorrem nos resíduos de serina e treonina em proteínas de células eucarióticas. Esse processo é a base para o controle de diversos eventos biológicos ativados por efetores extracelulares, como hormônios, mitógenos, carcinógenos, citocinas, neurotransmissores, substâncias ou metabólitos tóxicos. Antre as consequências da ação destes efetores estão: regulação da divisão, diferenciação, desenvolvimento e morte celular, regulação do metabolismo, controle da expressão gênica, contração, transporte, locomoção celular, aprendizado e memória, dentre outras (Mackintosh *et al.*, 1990).

Muitas vias de sinalização celular são reguladas pela fosforilação/desfosforilação de proteínas. A adição ou remoção do grupamento fosfato de uma proteína pode gerar um reconhecimento para interação proteína-proteína, controle da estabilidade protéica e, o mais importante, modular atividade de enzimas. Aproximadamente 30% das proteínas celulares são fosfoproteínas (Cohen, 2000)

Bioquimicamente, a toxicidade das microcistinas envolve um inibidor específico de enzimas PP (Metcalf & Codd, 2004). Segundo Carmichael (1994),

as microcistinas são moléculas relativamente polares, com baixa permeabilidade na membrana celular, necessitando de um sistema de transporte que possibilite o seu ingresso na célula. Essa via de transporte ocorre através das proteínas transportadoras dos sais biliares chegando até o fígado, onde atuam inibindo as enzimas PP. Em condições normais, o parênquima hepático apresenta hepatócitos juntos uns dos outros, com as paredes celulares em contato, o mesmo acontecendo com os vasos sangüíneos. Após a ação da toxina e o colapso da célula, promovido pelo desarranjo dos microfilamentos, os hepatócitos, bem como as células que formam os vasos sangüíneos, perdem contato e surgem espaços vazios, permitindo que o sangue extravase e penetre por entre o parênquima (Figura 1.8). Dependendo das proporções, essa hemorragia pode levar o organismo à morte em poucos minutos, horas ou dias. Além disso, a inibição das PP mantém ativa a glicogênio fosforilase, enzima responsável pela quebra do glicogênio.

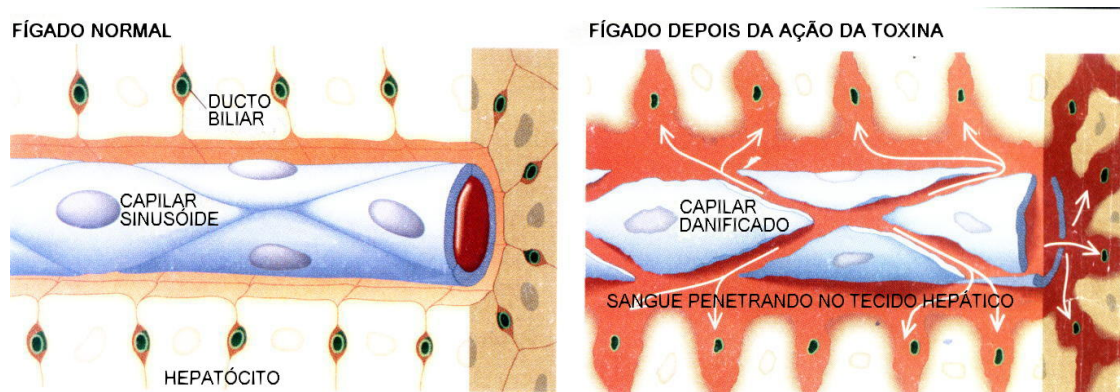


Figura 1.8: Efeito da microcistina no fígado. Fonte: Carmichael, 1994.

Tencalla & Dietrich (1997) observaram uma redução da atividade fosfatásica em hepatócitos isolados de espécimes da truta arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) submetidas à dose orais agudas (5.700 µg de microcistina-LR por Kg de peso corporal). Malbrouck *et al.* (2004) observaram uma redução na atividade das PP em hepatócitos incubados por 4 horas em 10 µg.L⁻¹ de microcistina-LR, os quais foram isolados de espécimes do peixe *Carassius auratus* mantidos com e sem alimento, como pré-tratamento. É importante salientar que a diminuição da atividade enzimática foi mais intensa nos hepatócitos isolados dos peixes mantidos sem alimento do que nos hepatócitos isolados dos peixes alimentados, sugerindo que o alimento minimiza o efeito da toxina sobre as PP. Em trabalho realizado com o camarão *Thamnocephalus platyurus*, Blom & Jüttner (2005) observaram inibição da atividade das PP induzidas por diferentes variantes de microcistina. Porém a toxicidade dessas variantes não estava somente relacionada com essa inibição, mas também com outras vias como retenção, transporte e detoxificação da toxina.

1.1.5.2. Estresse oxidativo

Estudos vêm mencionando as microcistinas como toxinas capazes de provocar um estado de estresse oxidativo. Essas toxinas, quando em doses subletais, são capazes de elevar a taxa de consumo de O₂, ocasionado um aumento indireto na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (Pflugmacher, 2004; Dewes *et al.*, 2006; Pietro *et al.* 2006). As ERO são moléculas que podem reagir com componentes celulares produzindo severos danos e exigem, portanto, a necessidade de mecanismos para sua

detoxificação. Esta função é realizada pelo sistema de defesa antioxidante (SDA), do qual fazem parte as enzimas catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR), além de compostos não enzimáticos como a glutathione reduzida (GSH) e as vitaminas C e E (Bainy *et al.*, 1996; Storey, 1996; Halliwell & Gutteridge, 1999).

Um estado de estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre os pro-oxidantes (ERO) e a capacidade de defesa antioxidante (SDA) em favor dos pro-oxidantes. Esse estado está relacionado com danos irreversíveis como a lipoperoxidação (LPO) e dano de DNA, que por sua vez pode ocasionar mutações, levando a formação de tumores (Ding & Ong, 2003; Zegura & Filipic, 2003; Botha *et al.*, 2004; Bouaicha & Maatouk, 2004; Chen *et al.* 2004, Lankoff *et al.*, 2004; Zegura & Filipic, 2004).

McCord & Fridovich (1969) reportaram uma proteína do eritrócito capaz de catalisar a dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), a SOD. A dismutação do ânion superóxido gera o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que embora não seja um radical livre, pode reagir com o Fe^{2+} e o Cu^{2+} , através das reações de Fenton e Haber-Weiss, gerando o mais reativo dos radicais livres, o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$). O H_2O_2 é reduzido à água e oxigênio através da reação catalisada pela enzima CAT. Além disso, o H_2O_2 pode ser reduzido à água através da glutathione reduzida (GSH), a qual se tornará oxidada (GSSG), num processo catalizado pela GPx. A glutathione redutase (GR) catalizará a reação de redução da GSSG, para que ela novamente atue no processo de peroxidação e conjugação. A GST está envolvida no metabolismo de produtos

oxidados. Muitos destes produtos se conjugam com a GSH através de uma reação catalisada pela GST. Estes conjugados podem ser excretados pela chamada bomba de efluxo com gasto de ATP ou podem ser degradados e excretados através da urina (Halliwell & Gutteridge, 1999).

A detoxificação das microcistinas está envolvida com uma das principais vias que fazem parte do SDA, a GSH e a GST. A microcistina se conjuga com a GSH através de uma reação catalisada pela GST para que esse conjugado (MC-GSH) seja excretado do organismo. Com isso o SDA se torna debilitado, pois a concentração de GSH será diminuída, o que contribuirá para a geração de um estado de estresse oxidativo (Pflugmacher, 2004).

Alguns trabalhos têm mencionado a indução de estresse oxidativo por microcistinas. Dewes *et al.* (2006) reportou a ocorrência de estresse oxidativo no caranguejo estuarino *Chasmagnathus granulatus* expostos oralmente à extrato de *microcystis* produtora de microcistina. Pflugmacher (2004) e Pietro *et al.* (2006) observaram a indução de estresse oxidativo por MC na macrófita aquática *Ceratophyllum demersum* e na tilápia (*Oreochromis* sp.).

Quando a ativação do SDA não é suficiente para reverter o estado de estresse oxidativo, ocorrem os chamados danos oxidativos, como LPO e danos à molécula de DNA (Figura 1.9).

A lipoperoxidação das membranas é descrita como uma reação em cadeia entre o oxigênio molecular ou radicalar e os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolípidios membranares: é uma reação de auto-oxidação que deteriora os lipídios polinsaturados, alterando sua integridade e aumentando sua permeabilidade. Fosfolípidios membranares atacados por

ERO (lipoperoxidação) alteram as atividades celulares (Hermes-Lima *et al.*, 1995; Monserrat *et al.*, 2003).

Danos à molécula de DNA são comuns em situações de estresse oxidativo. Um tipo de dano que vem sendo observado é a formação de conjugados DNA-proteína, que em alguns casos está relacionado com o estresse oxidativo. Um conjugado DNA-proteína é formado quando uma proteína se liga covalentemente à molécula de DNA. Tal evento ocorre pela exposição das células à compostos citotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos, e pode estar envolvido com a presença de radicais livres (Zhitkovich & Costa, 1993; Barker *et al.*, 2005).

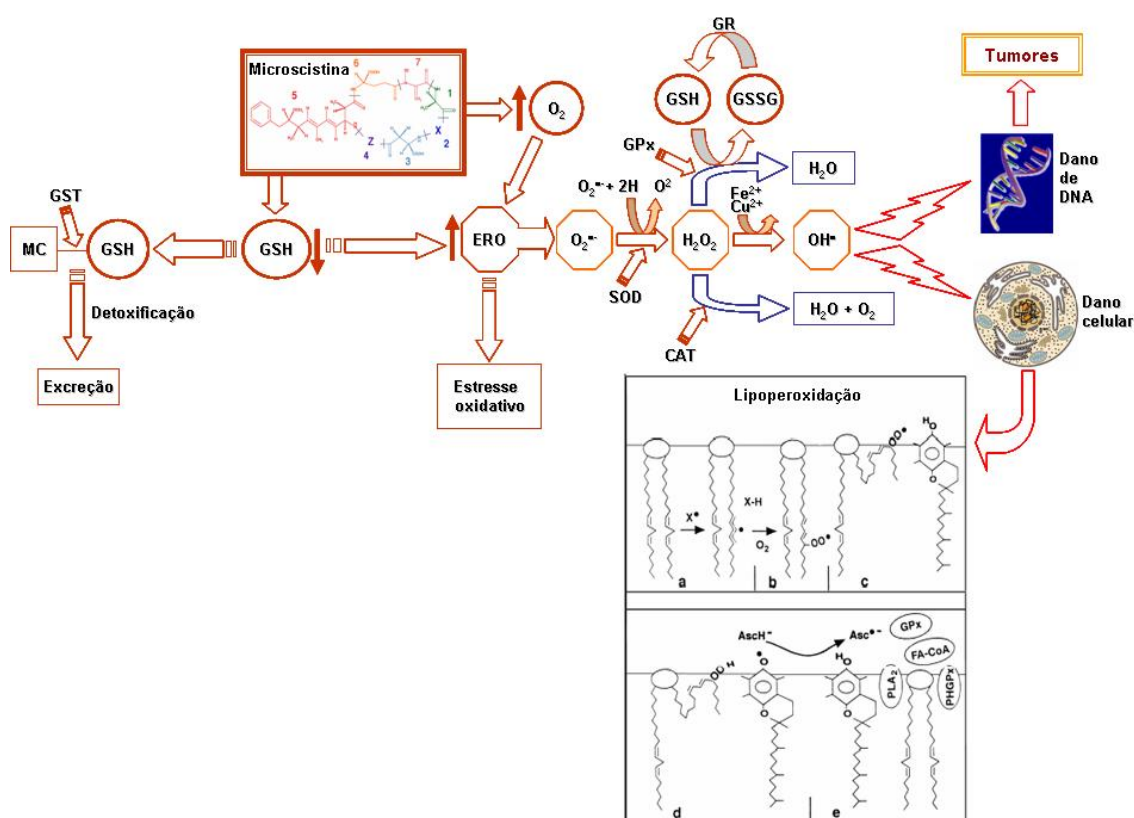


Figura 1.9: Geração de estresse oxidativo bem como danos oxidativos, induzidos por microcistinas

1.1.5.3. Alterações comportamentais

Embora poucos trabalhos tenham sido realizados com esse objetivo, resultados obtidos por diferentes autores têm demonstrado efeitos induzidos por microcistinas sobre o comportamento de diferentes organismos.

Uma vez que o comportamento é o elo entre processos ecológicos e fisiológicos, tem funcionado como um biomarcador nos estudos sobre o estresse preliminar gerado por compostos tóxicos presentes no meio (Scott & Sloman, 2004). Trabalhos recentes têm mostrado que alterações comportamentais em diversos organismos estão, muitas vezes, associadas com efeitos tóxicos gerados por diferentes compostos presentes no ambiente, inclusive as cianotoxinas, tanto as neurotoxinas [saxitoxinas, anatoxina-a e a(s)] como as microcistinas (Carmichael, 1994; Monserrat & Bianchini, 2001, Bushnell & Moser, 2006, Kirkpatrick *et al.*, 2006, Shepherd *et al.* 2006).

Alterações comportamentais induzidas por microcistinas foram observadas em peixes das espécies *Danio rerio*, *Coregonus lavaretus* e *Jenynsia multidentata* por Baganz *et al.* (1998), Ernst *et al.* (2006) e Cazenave *et al.* (2008), onde o batimento do opérculo (ventilação), desova e atividade natatória foram afetados. Além disso, efeito amnésico induzido por microcistinas foi observado em camundongos (Maidana *et al.*, 2006).

1.1.6. Bioacumulação das Microcistinas e Transferência na Cadeia Trófica

Existe uma possível bioacumulação de cianotoxinas ao longo da cadeia trófica (Vasconcelos, 1995; Christoffersen, 1996a). Os organismos aquáticos, para estarem expostos ao efeito das toxinas de *Microcystis* precisam se alimentar das suas células (Gilbert, 1996), pois segundo Pearson (1990), as toxinas são liberadas para o meio somente quando as células se rompem, no momento da sua morte. Os diferentes organismos podem apresentar sensibilidade e comportamento diferentes quando em presença de cianobactérias (Christoffersen, 1996a).

Populações naturais de nanoflagelados heterotróficos sofreram um decréscimo em número e tiveram sua taxa de crescimento *in situ* reduzida, durante uma floração de *Microcystis* em um lago eutrófico (Christoffersen, 1996b). Em experimentos para testar a toxicidade de microcistinas em cladóceras, observou-se diminuição na sobrevivência com respostas diferentes para cada espécie estudada (Reinekainen *et al.*, 1995). Em trabalho realizado por Kiviranta *et al.* (1993) foram realizados testes com larvas de mosquito *Aedes aegypti*, sendo observada toxicidade que causou a morte das larvas. Mohamed (2001) constatou a acumulação de microcistinas pelo cladocera *Daphnia parvula*. Em testes realizados com as espécies de rotíferos, *Brachionus angularis* e *B. plicatilis*, de cladóceras, *Moina micrura* e *Ceriodaphnia cornuta* e de copépoda, *Metacyclops mendocinus*, indicou capacidade de bioacumular microcistinas, tornando-os vetores de microcistinas para níveis mais elevados da cadeia trófica (Ferrão-Filho, 2002).

Segundo Yogui *et al.* (1998) testes com os crustáceos *Artemia sp.* e *Farfantepenaeus paulensis* mostraram toxicidade quando estes foram expostos à toxina. Leão (2004) observou uma bioacumulação de microcistinas em organismos filtradores como o marisco *Mesodesma mactroides* e o mexilhão *Perna perna*, tornando-os vetores da toxina. Pinho *et al.* (2005) e Dewes *et al.* (2006) observaram distúrbios osmorregulatório e estresse oxidativo no caranguejo estuarino *Chasmagnathus granulatus* exposto oralmente à microcistinas, respectivamente. Em testes com a truta arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*), a toxicidade estava relacionada a distúrbios osmorregulatórios (Best *et al.*, 2003). Eler *et al.* (2001), associaram a morte de peixes (*Brycon cephalus* e *Piaractus mesopotamicus*) em um pesque-pague, no interior de São Paulo, com a ocorrência de florações de *Anabaena spiroides* e *M. aeruginosa*. Dessa forma pode se observar efeitos tóxicos em diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar, desde zooplâncton herbívoros (que se alimentam das microalgas tóxicas) até peixes que se alimentam de outros organismos expostos à toxina.

1.1.7. *Laeonereis acuta*

O poliqueto *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) é um animal epifaunal com ampla distribuição no bentos. É uma espécie tipicamente estuarina encontrada em águas rasas que se destaca pela frequência de ocorrência e dominância, tanto em ambientes poluídos como não poluídos. No estuário da Lagoa dos Patos essa espécie ocorre ao longo de todo ano (Bemvenuti, 1998a e 1998b) (Figura 1.10).

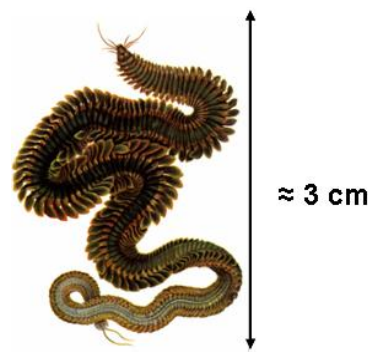


Figura 1.10: Imagem de um exemplar de *L. acuta*.

Na cadeia trófica, está incluído no primeiro nível de consumidores detritívoros pouco seletivos (Bemvenuti, 1998a e 1998b). No ambiente, estão em contato direto com o sedimento. Por se tratarem de organismos com pouca mobilidade no meio, podem refletir os problemas do próprio ambiente em que habitam.

L. acuta é considerado como importante monitor de ambientes poluídos, apresentando diferentes respostas em nível de biomarcadores. Esse organismo é considerado oxiconformador e se caracteriza por apresentar resistência a anoxia e/ou hipoxia (Abele-Oeschger & Oeschger, 1995; Rosa *et al.* 2005). Possui hemoglobina, um pigmento que, pela auto-oxidação, pode levar a formação de ERO, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), indicando a presença de um sistema de defesa antioxidante. Além disso, é de fácil coleta e manutenção em laboratório (Geracitano *et al.*, 2001, 2002, 2004a, 2004b).

Uma das vantagens do uso de biomarcadores nos trabalhos de biomonitoramento é o fato de que estes detectam rapidamente o surgimento de efeitos gerados por substâncias tóxicas nos organismos que habitam um ambiente particular, antes mesmo que a população ou a comunidade seja impactada.

1.1.8. Hipóteses e Objetivos

1.1.8.1. HIPÓTESES:

Hipótese Principal: A ocorrência de florações tóxicas de cianobactérias no estuário da Lagoa dos Patos é um fator que causa danos biológicos mensuráveis.

Hipótese 1: Florações tóxicas de *Microcystis* provocam um aumento no consumo de oxigênio dos organismos afetando o equilíbrio entre a formação de ERO e a taxa de consumo destas pelas defesas antioxidantes, gerando um estado de estresse oxidativo. Este estado é observado pela variação da atividade das enzimas associadas ao SDA, e pelos danos oxidativos.

Hipótese 2: A ocorrência de florações tóxicas de *Microcystis* provoca nos organismos alterações comportamentais, fisiológicas e bioquímicas geradas pelo estresse induzido pelas microcistinas presentes.

Hipótese 3: A capacidade dos organismos ingerirem certa quantidade (que varia de acordo com as características do organismo) de células tóxicas de *Microcystis* e sobreviver, leva à acumulação de microcistinas nos tecidos e transferência para o nível trófico seguinte.

1.1.8.2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Avaliar os efeitos bioquímicos e fisiológicos das cianotoxinas produzidas por *Microcystis aeruginosa* da Lagoa dos Patos sobre o poliqueto *Laeonereis acuta* bem como sua transferência na cadeia trófica.

Objetivos específicos:

- (1) Determinar as respostas das enzimas antioxidantes bem como danos oxidativos em exemplares de *L. acuta* expostos a uma cepa tóxica de *M. aeruginosa*;
- (2) Identificar um possível estado de estresse oxidativo em *L. acuta*, gerado pela exposição a uma cepa tóxica de *M. aeruginosa*;
- (3) Observar alterações comportamentais, fisiológicas e bioquímicas no *L. acuta* expostos a uma cepa tóxica de *M. aeruginosa*;
- (4) Determinar a bioacumulação de microcistinas nos tecidos dos exemplares de *L. acuta*;
- (5) Determinar de transferência das microcistinas na cadeia trófica.

1.2. ÁREA DE ESTUDO

1.2.1. A Lagoa dos Patos

A Lagoa dos Patos é uma laguna (em contato direto com o oceano Atlântico) localizada no extremo sul do Brasil, no estado do Rio Grande do Sul ($30^{\circ}20'S$ a $32^{\circ}10'S$). É o segundo maior corpo de água continental no Brasil e o maior complexo lagunar na América do Sul, apresentando uma extensão de 10.000 Km^2 . Possui aportes fluviais ao norte, destacando-se os rios Jacuí, Caí, Gravataí e Sinos que formam o delta do rio Guaíba, onde aportes, principalmente de esgotos da capital (Porto Alegre), são lançados. À oeste, aportes provenientes da serra dos Tapes e Serra do Herval, destacando-se o rio Camaquã e ao sul, o canal de São Gonçalo (Ihering, 1885). Aproximadamente três milhões de habitantes vivem ao longo de suas margens em diversas cidades e vilas e suas águas são utilizadas para suprimentos domésticos, pesca, lazer, navegação, agricultura, além de ser local de despejos domésticos e industriais (Yunes *et al.*, 1998) (Figura 1.11).

1.2.2. O Estuário da Lagoa dos Patos

A porção sul da Lagoa dos Patos forma um estuário, estrangulado em forma de funil, com uma largura média em torno de 700 m (Figura 1.11). É definido ao norte, por uma linha imaginária ligando a Ilha da Feitoria ($31^{\circ}48'S$) na margem oeste à Ponta dos Lençóis ($31^{\circ}48'S$) na margem leste. Ao sul é limitado pela desembocadura do canal da barra do Rio Grande ($32^{\circ}08'S$ e $52^{\circ}04'W$). A região estuarina da Lagoa dos Patos abrange aproximadamente 10% da área total da laguna e é caracterizada pela existência de dois

ambientes ecologicamente distintos: (1) enseadas marginais protegidas e de águas rasas; e (2) um corpo de água central profundo (Castello, 1978).

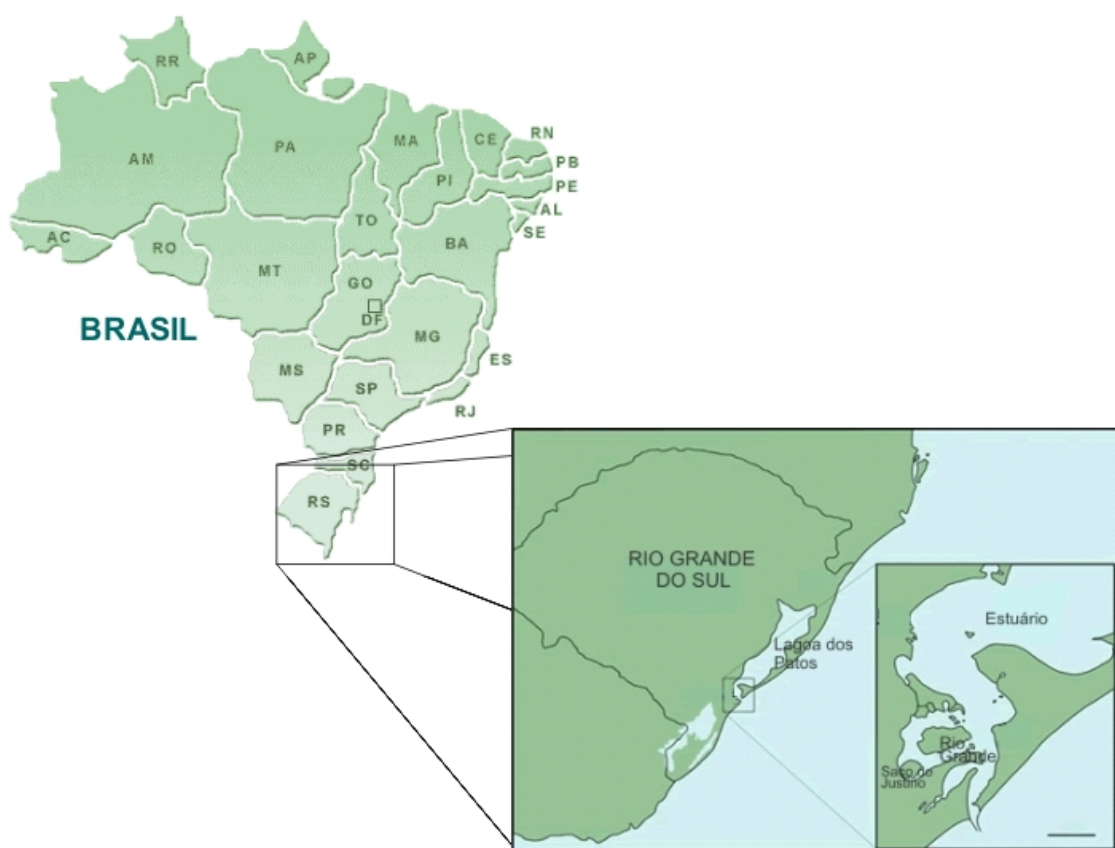


Figura 1.11: Estuário da Lagoa dos Patos.

É considerado um estuário homogêneo e de salinidade baixa em épocas de vazante, homogêneo e salino em períodos de enchentes (épocas de estiagem), sendo estratificado quando as águas continentais escoam pela superfície juntamente com o estabelecimento de uma contra corrente oceânica em profundidade formando uma cunha salina. A entrada dessa cunha salina depende das condições hidrológicas e meteorológicas (como pluviosidade, intensidade e direção dos ventos) da bacia de drenagem (Kantin, 1983)

Devido ao grande aporte de água doce (cerca de 85%) proveniente dos rios tributários localizados na parte superior da lagoa, uma grande parcela de

nutrientes dissolvidos provém da porção norte e transita até a região estuarina. Além disso, no estuário, as concentrações de nutrientes são também provenientes de atividades agrícolas da bacia hidrográfica da Lagoa Mirim, via canal de São Gonçalo, da contaminação por esgotos domésticos e ainda da descarga atmosférica proveniente do parque industrial de Rio Grande (Niencheski *et al*, 1994).

1.3. MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1. Coleta dos Organismos

Os organismos foram coletados de uma área não poluída do estuário da Lagoa dos Patos (Saco do Justino; 32°05'S-52°12'W). Segundo Baumgartem (1987); Baumgartem & Niencheski (1990) e Baumgartem & Niencheski (1998), o Saco do Justino é considerada uma área rasa não impactada, sendo um local de fácil acesso, sem a necessidade de embarcações para a realização das coletas (Figura 1.12).



Figura 1.12: Local de coleta dos organismos (peixes e poliquetos).

1.3.1.1. *Laeonereis acuta*

Os espécimes de *L. acuta* foram coletados manualmente com o auxílio de uma pá e imediatamente trazidos para o laboratório em uma caixa térmica com gelo para redução do metabolismo. Ao chegar no laboratório, os organismos foram aclimatados durante 4 dias em caixas plásticas contendo areia e água (salinidade 10, pH 8,0) (Figura 1.13) e mantidos num ambiente com fotoperíodo de 12hC:12hE e temperatura de 20 °C. Um sistema de aeração foi mantido durante o período de aclimação.

A água utilizada nos testes foi obtida através da diluição de água marinha (salinidade 35) com água destilada, até obter-se a salinidade desejada. Posteriormente o pH foi ajustado para 8,0.

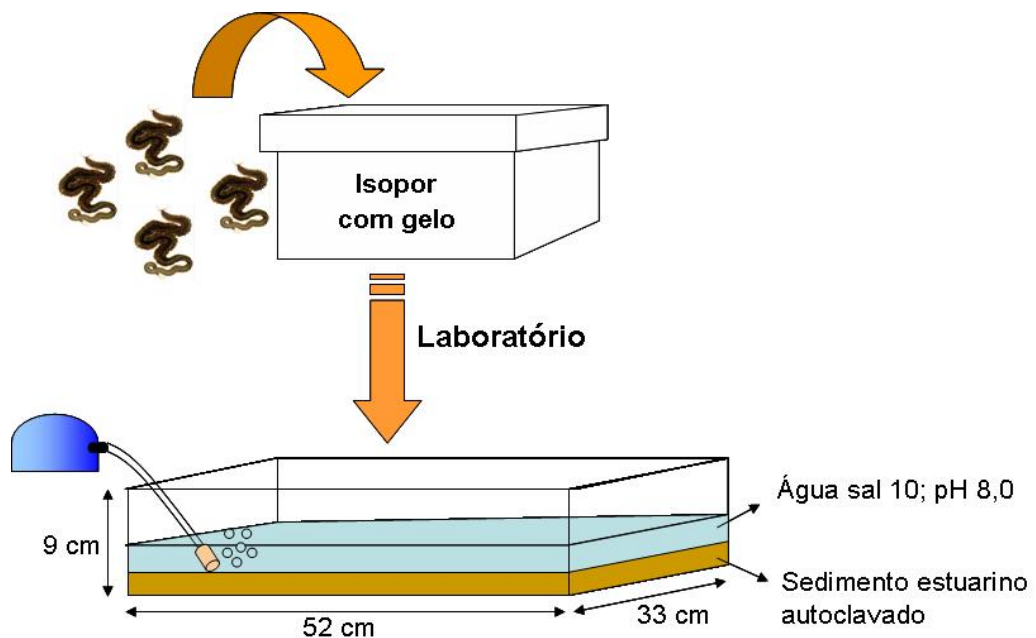


Figura 1.13: Coleta e aclimação dos poliquetos.

1.3.1.2. *Jenynsia multidentata*

Os espécimes de *J. multidentata* utilizados no teste de bioacumulação foram coletados com o auxílio de uma rede, sem a necessidade de infra-estruturas especiais. No laboratório os organismos foram aclimatados durante uma semana em um aquário de 72 L (Figura 1.14) contendo filtro biológico, água (salinidade 5; pH 8,0) e um sistema de aeração. Os peixes foram mantidos num ambiente com fotoperíodo de 12hC:12hE e temperatura de 20 °C.

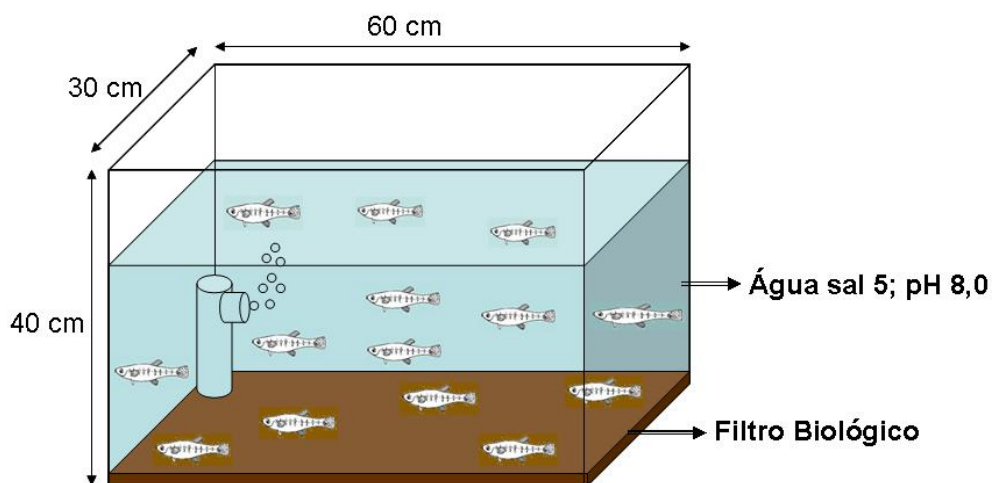


Figura 1.14: Aquário de aclimação dos peixes.

1.3.2. Cultivo das cianobactérias

1.3.2.1. *Microcystis aeruginosa*

Cultivos da cepa tóxica de *M. aeruginosa* (RST9501) isolada da Lagoa dos Patos foram desenvolvidos em laboratório em meio BG11 modificado (com adição de nitrogênio) (Rippka *et al.*, 1979), e utilizados nos tratamentos tóxicos dos testes (Figura 1.15).

1.3.2.2. *Aphanotece* sp.

Cultivos de uma cianobactéria não tóxica, *Aphanotece* sp.(RSM92), também isolada da Lagoa dos Patos, foram desenvolvidos em laboratório também em meio BG11 modificado, e utilizados nos tratamentos não-tóxicos dos testes (Figura 1.15).

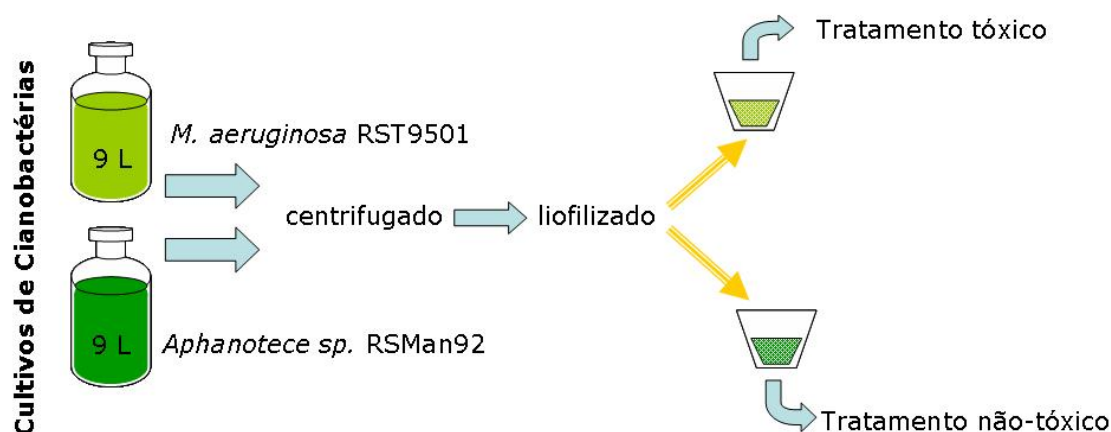


Figura 1.15: Obtenção dos liofilizados (pó) de cianobactérias *Microcystis aeruginosa* (tóxica) e *Aphanotece* sp. (não tóxica).

1.3.3. Exposição dos Organismos

1.3.3.1. Estresse oxidativo

Após aclimação, os organismos foram transferidos para recipientes de vidro (10 cm de diâmetro) contendo 10 g de sedimento estuarino (autoclavado) e 50 mL de água (salinidade 10, pH 8,0) (Figura 1.16). Nesse teste para avaliar as respostas das enzimas antioxidantes bem como possíveis danos, os organismos foram divididos em três tratamentos (n=10): (1) Dez organismos foram expostos à células liofilizadas da cepa tóxica de *M. aeruginosa* (2 g.L^{-1}) atingindo uma concentração de aproximadamente 2 mg.L^{-1} de microcistinas; (2) dez organismos foram expostos à células liofilizadas da cianobactéria não

tóxica, *Aphanotece* sp. (2 g.L^{-1}); e (3) dez organismos não foram expostos à células de cianobactérias (controle) (Figura 1.16). O teste teve a duração de 48 horas, com renovação dos meios a cada 24 horas.

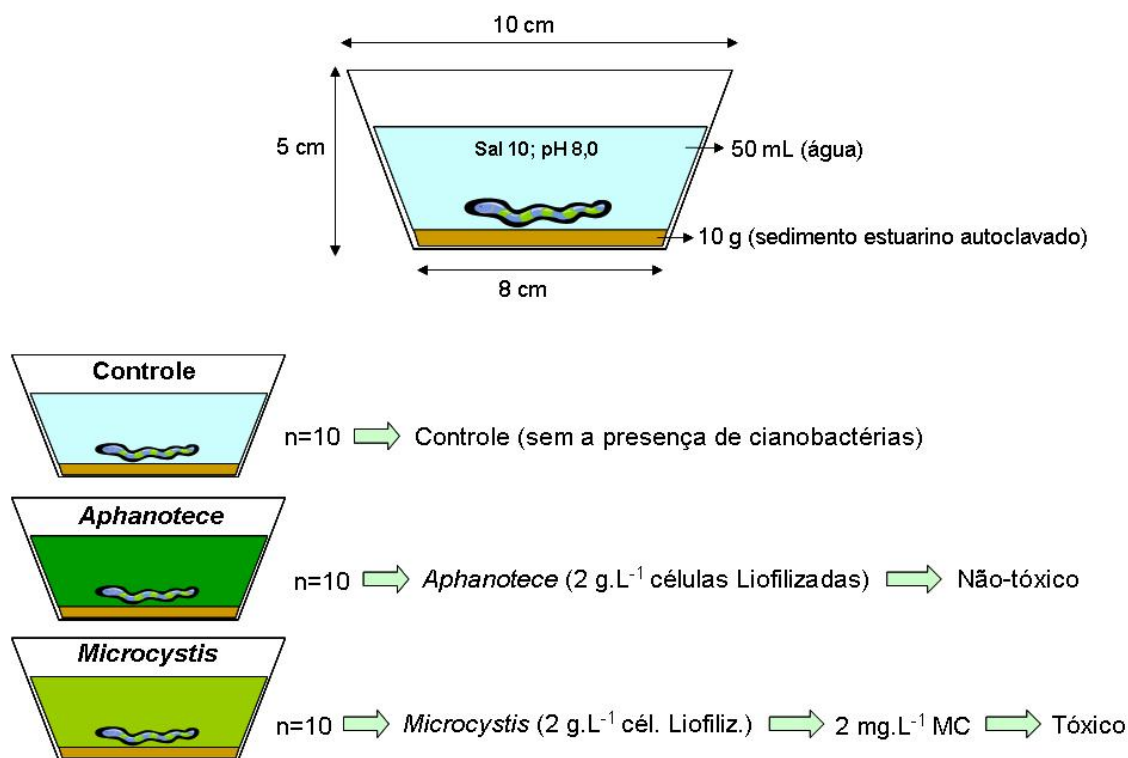


Figura 1.16: Tratamentos utilizados no teste para avaliação da ocorrência de estresse oxidativo no poliqueto *Laeonereis acuta* exposto a uma cepa tóxica de *Microcystis aeruginosa* e uma cepa não-toxica de *Aphanotece* sp., onde MC=microcistina. Para cada tratamento foram utilizados 10 recipientes com um organismo, expostos às mesmas condições.

1.3.3.2. Motilidade e consumo de O_2

Após aclimação os organismos foram transferidos para placas contendo câmaras individuais (Figura 1.17). Nesse teste para avaliar o efeito das microcistinas sobre o consumo de O_2 e sobre a motilidade dos poliquetos os organismos foram divididos em três tratamentos (n=10): (1) Dez organismos

foram expostos à células liofilizadas da cepa tóxica de *M. aeruginosa* (3 g.L^{-1}) atingindo uma concentração de aproximadamente 3 mg.L^{-1} de microcistinas; (2) dez organismos foram expostos à células liofilizadas da cianobactéria não tóxica, *Aphanotece* sp. (3 g.L^{-1}); e (3) dez organismos não foram expostos à células de cianobactérias (controle) (Figura 1.17). Os organismos permaneceram expostos às cianobactérias durante 27 horas (momento em que pararam de se movimentar). Após exposição às cianobactérias os organismos dos três tratamentos foram transferidos para placas com câmaras individuais (iguais as anteriores) contendo uma solução com eserina (um inibidor colinesterásico que estimula o sistema nervoso) numa concentração sub-letal conhecida ($0,02 \text{ mg.L}^{-1}$), a qual os organismos foram expostos por 3 horas. Ao final do experimento os organismos foram congelados à -80°C para determinação da atividade das enzimas fosfatases.

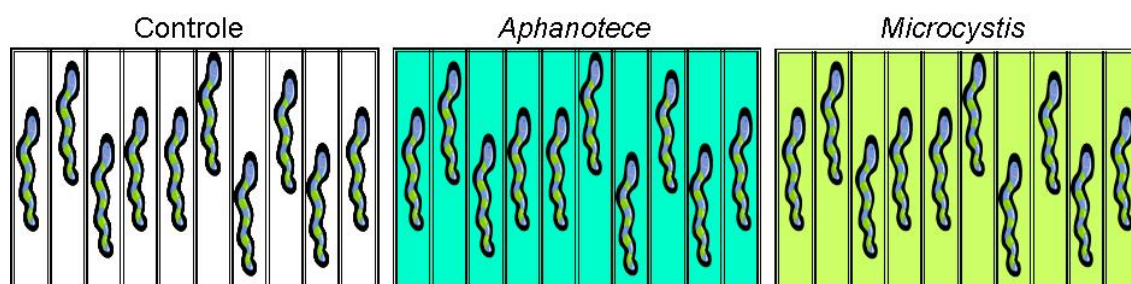


Figura 1.17: Tratamentos utilizados no teste para avaliação do consumo de O_2 e da motilidade do poliqueto *Laeonereis acuta* exposto a uma cepa tóxica de *Microcystis aeruginosa* e uma cepa não-toxica de *Aphanotece* sp.,

Um grupo extra ($n=5$) foi exposto à mesma concentração de células liofilizadas da cepa tóxica *Microcystis* durante 27 horas e posteriormente foi

transferido para uma placa contendo água (salinidade 10 pH 8,0) sem eserina para observação somente da motilidade.

1.3.3.3. Bioacumulação e transferência na cadeia trófica

Após aclimatação, parte dos poliquetos foi pesada (peso fresco total), congelada, liofilizada (Micro Modulyo – Edwards, UK), macerada e pesada (peso seco total), para ser utilizada como controle não tóxico, e parte foi transferida para recipientes contendo água (salinidade 10, pH 8,0) com células liofilizadas de *M. aeruginosa* ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$), atingindo uma concentração de aproximadamente $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de microcistinas. Um sistema de aeração foi mantido durante o período de acumulação. Após 8 dias de acumulação de microcistinas nos poliquetos (tempo em que 100 % dos organismos permaneceram vivos), os organismos foram pesados (peso fresco total), congelados, liofilizados, macerados e pesados (peso seco total). Uma fração do material liofilizado de ambos os grupos (controle e contaminado) foi processada para análise do conteúdo de microcistina.

Após o processo de acumulação de microcistina nos poliquetos, foi feito um experimento de acumulação de microcistinas nos peixes (*J. multidentata*) através de poliquetos contaminados. Nesse teste para avaliar a transferência da toxina em dois níveis da cadeia trófica, os organismos (peixes) foram divididos em três tratamentos (n=15): (1) quinze organismos foram expostos a tecido liofilizado de poliqueto contaminado com microcistina ($0,698 \text{ } \mu\text{g MC.g}^{-1}$ de peso seco) ; (2) quinze organismos foram expostos a tecido liofilizado de poliqueto não contaminado; e (3) quinze organismos não foram expostos a tecido de poliqueto, sendo mantidos com ração comercial (controle). Os grupos

foram divididos em triplicatas, sendo mantidos 5 peixes por recipiente contendo 500 mL de água (salinidade 5, pH 8,0) (Figura 1.18).

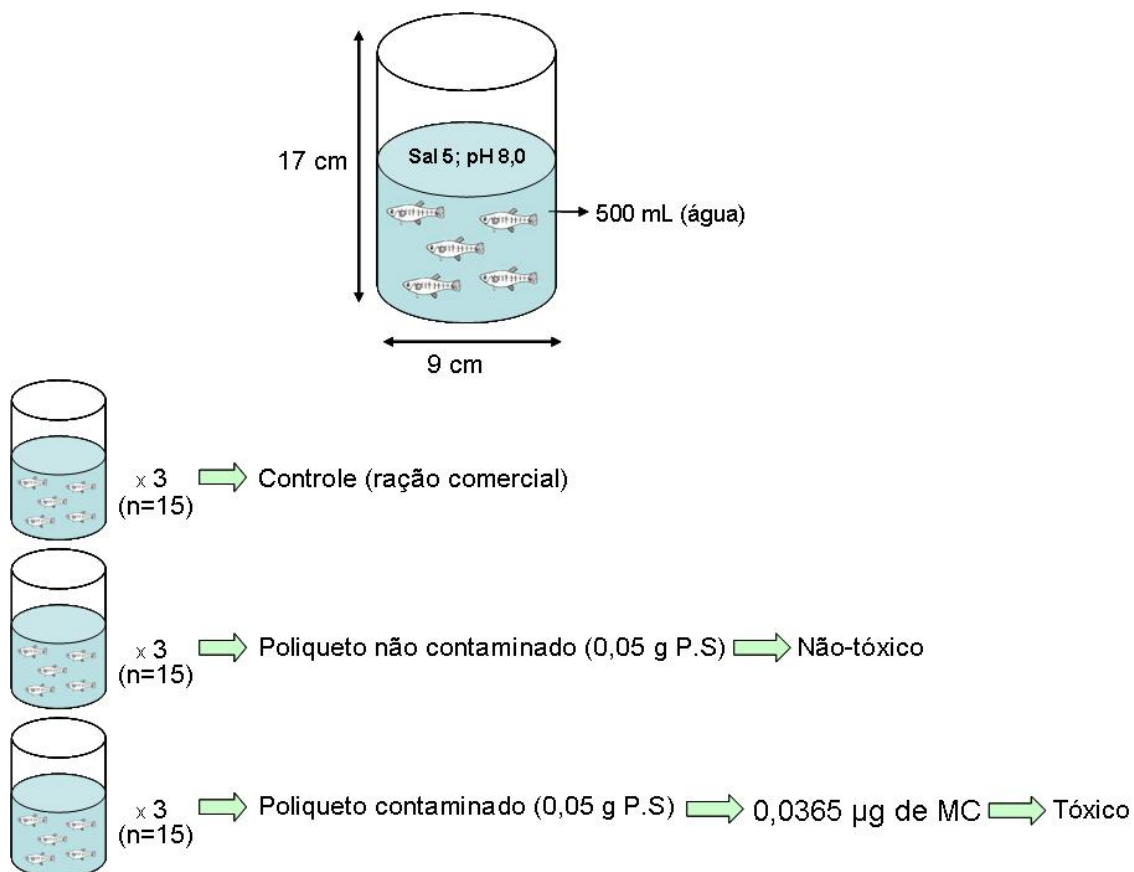


Figura 1.18: Tratamentos utilizados no teste para avaliação da transferência de microcistina do poliqueto (*Laonereis acuta*) para o peixe (*Jenynsia multidentata*), onde P.S.=peso seco do tecido liofilizado do poliqueto e MC=microcistina. Para cada tratamento foram mantidos 3 recipientes com 5 peixes, nas mesmas condições.

Ao longo de 6 dias, foi adicionado, diariamente, 0,05 g de tecido liofilizado de poliquetos contaminado (0,0365 µg microcistina) em cada recipiente do grupo de peixes contaminados, 0,05 g de tecido liofilizado de poliquetos não contaminado em cada recipiente do grupo de peixes não contaminados e 0,05 g de ração comercial em cada recipiente do grupo de

peixes controle. Ao final de 6 dias (tempo em que 100 % dos organismos permaneceram vivos), os peixes foram retirados dos recipientes e pesados ($0,297 \text{ g} \pm 0,151$) (peso fresco total). Os organismos foram congelados e liofilizados (individualmente) para o processo de extração e análise de microcistina.

1.3.4. Análises dos conteúdos de microcistinas

1.3.4.1. Na água e nos extratos

As amostras de água (do ambiente) e dos extratos de *Microcystis* e *Aphanotece* foram submetidas ao ultrassom durante 3 minutos, para rompimento das células, e posteriormente foram centrifugadas à $14.000 \times g$ por 10 minutos. Os sobrenadantes foram analisados em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC-CLAE) com detector de UV (Shimadzu SCL-10Avp), controlado pelo programa CLASS-VP 6.21 SP5, a um comprimento de onda de 238 nm.

1.3.4.2. Nos tecidos de peixes e poliquetos

A metodologia de extração de microcistinas dos tecidos de peixe e poliqueto foi baseada no trabalho de Xie *et al* (2007).

As amostras foram congeladas a -30°C , liofilizadas e pesadas (peso seco), não ultrapassando 50 mg. O material foi diluído em 10 mL de uma solução BuOH:MeOH:H₂O (1:4:15, v:v:v), expostos ao ultrassom por 3 minutos (30% de amplitude, 60 W, 20 kHz), centrifugados a $3.200 \times g$ por 20 minutos em temperatura ambiente e os sobrenadantes foram separados. O processo de extração foi repetido 3 vezes e os sobrenadantes resultantes foram reunidos, evaporados e ressuspensos em 1 mL de água ultra-pura. Os extratos obtidos

com tecido dos organismos foram analisados através de Imunoensaio Específico para Microcistinas (ELISA) com resolução entre 0,1 e 1,6 ppb (ENVIROLOGIX, Portland, USA), devido aos baixos valores, não-detectáveis em HPLC.

Os cálculos para as concentrações de toxinas nos tecidos foram realizados utilizando a seguinte fórmula:

$$\mu\text{g MC.g}^{-1} \text{ PS} = \frac{\mu\text{g.L}^{-1}/1000}{\text{PS}_{\text{am}}}$$

Onde:

$\mu\text{g MC.g}^{-1} \text{ PS}$ = concentração de microcistinas em 1 g de tecido liofilizado (PS).

$\mu\text{g.L}^{-1}$ = concentração de microcistina em 1 L do extrato de tecido analisado.

PS_{am} = peso seco da amostra processada.

1.3.5. Avaliação Fisiológica

1.3.5.1. Consumo de O_2

O consumo de O_2 foi medido polarograficamente (Kolthoff & Lingane, 1952) com um eletrodo tipo Clark (Clark, 1956), o qual consiste de um cátodo de platina circundado por um ânodo de prata. O ânodo e o cátodo são conectados por uma ponte de KCl e o fluxo de elétrons é proporcional ao oxigênio consumido (Figura 1.19).

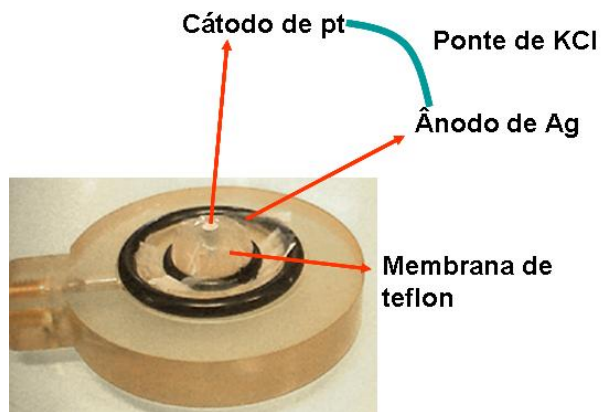


Figura 1.19: Eletrodo tipo Clark.

Cada organismo foi colocado individualmente em um aparelho para avaliação do consumo de O_2 (Figura 1.20).



Figura 1.20: Aparelho utilizado para medir o consumo de oxigênio.

Os cálculos para determinar o consumo de oxigênio foram realizados utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Consumo de } O_2 = \frac{[(L_{\text{final}} - L_{\text{inicial}})/10] \times [O_2]_{\text{total}} \times 0,01}{P.F.}$$

Onde:

L_{inicial} = Leitura inicial

L_{final} = Leitura final

$[O_2]_{\text{total}}$ = concentração total de O_2 na água saturada

P.F. = peso fresco do organismo.

1.3.5.2. Motilidade

A motilidade foi medida através da contagem da oscilação da cabeça durante um minuto (Figura 1.21). A contagem foi feita utilizando imagens obtidas através de filmagens (Sony Cyber shot – DSC P73) realizadas ao longo da exposição. As imagens foram tratadas utilizando a edição livre do programa Slow Motion (www.goodervideo.com).



Figura 1.21: Método empregado para avaliação da motilidade dos poliquetos ($\text{oscilações} \cdot \text{min}^{-1}$). A seta indica a oscilação da cabeça através da linha central.

1.3.6. Análises Bioquímicas

Para determinação das proteínas totais e análise das atividades enzimáticas (com exceção das fosfatases) cada organismo foi homogeneizado (20% p:v) em uma solução tampão contendo Tris base (20 mM), EDTA (1mM), ditioneitol (1mM, Sigma), sacarose (0,5 mM) diluídos em água ultrapura em pH 7,6. As amostras foram centrifugadas a 9.000 x g (4 °C) por 30 minutos e os sobrenadantes foram empregados como fonte enzimática. Uma unidade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 µmol de produto por minuto, sob condições definidas.

1.3.6.1. Proteínas totais

As proteínas totais foram medidas utilizando um kit DOLES, através do método de biureto (550nm). As leituras foram feitas em triplicada, usando um leitor de microplaca (Biotek LX 800).

1.3.6.2. Atividade da catalase (CAT)

Para determinação da atividade da CAT foi empregada a técnica descrita por Beutler (1975), que quantifica a velocidade de decomposição de H₂O₂ pela enzima contida na amostra (Bainy *et al.*, 1996)

Foi preparada uma solução tampão para o meio de reação contendo Tris base (1M) e EDTA (5mM) diluídos em água ultrapura (MilliQ) em pH 8,0.

Meio de Reação: Foi preparada uma solução (solução 1) adicionando-se 50 µL de H₂O₂ 30% em 50 mL de água ultrapura (concentração 10 mM). Descartou-se 5 mL do volume total dessa solução 1 e posteriormente adicionou-se 2,5 mL do tampão e 2 mL de água ultrapura.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Micronal B382) a 240 nm utilizando cubetas de quartzo, onde era adicionado 5 µL de extrato de tecido (amostra) e 1 mL de meio de reação.

Os cálculos foram realizados utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade específica (U CAT)} = \frac{\Delta \text{ Abs} \times \text{diluição}}{0,071 \times \text{vol amostra} \times [\text{proteína}]}$$

Onde:

$\Delta \text{ Abs}$ = Absorbância média por minuto;

diluição = diluição da mostra;

0,071 = coeficiente de extinção molar do H_2O_2 a 240 nm;

Vol amostra = volume da amostra adicionado na cubeta;

[proteína] = concentração de proteínas totais.

1.3.6.3. Atividade da glutathiona-S-transferase (GST)

A dosagem de GST foi baseada nos trabalhos de Habig *et al.* (1974) e Habig & Jakoby (1981).

Foi preparada uma solução tampão para o meio de reação contendo KH_2PO_4^- (50 mM), K_2HPO_4^- (50 mM) diluídos em água ultrapura em pH 7,0. A metodologia consistiu em analisar a conjugação de 1 mM de GSH (glutathiona reduzida) diluída no tampão fosfato com 50 mM de 1-cloro-2,4 dinitro benzeno (CDNB) diluído em etanol 100%, processo catalisado pela GST. O complexo formado possui uma absorbância máxima em 340 nm.

A dosagem foi realizada em microplaca transparente de 96 poços onde foi adicionado 5 µL de extrato de tecido (amostra), 235 µL de solução

tampão+CDNB (1 mM) e 10 µL de GSH (25 mM). A leitura foi realizada em fluorímetro (Perkin Elmer Wallac Vitor2 - 1420 Multilabel Counter) a 340 nm.

Os cálculos foram realizados utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade específica (U GST)} = \frac{\Delta \text{ Abs} \times \text{diluição}}{9,6 \times \text{vol amostra} \times [\text{proteína}]}$$

Onde:

$\Delta \text{ Abs}$ = Absorbância média por minuto;

diluição = diluição da mostra;

9,6 = coeficiente de extinção molar da GSH;

Vol amostra = volume da amostra adicionado no poço;

[proteína] = concentração de proteínas totais.

1.3.6.4. Atividade da glutathiona redutase (GR)

A dosagem de GR foi baseada nos trabalhos de Gallagher *et al.* (1992) e Nagalakshmi & Prasad (2001).

Foi preparada uma solução tampão contendo NaH₂PO₄ (0,1 M) e NaHPO₄ (0,1 M) diluídos em água ultrapura em pH 7,5. A metodologia consistiu em analisar a redução de 10 mM de GSSG (glutathiona oxidada) por 1 mM de NADPH, processo catalisado pela GR.

A dosagem foi realizada em microplaca transparente de 96 poços onde foi adicionado 100 µl de tampão de reação (previamente aquecido a 25°C), 36 µl de extrato de tecido (amostra) ou tampão de homogeneização (brancos), 20 µl de GSSG (10 mM) e 20 µl de NADPH (1 mM). A leitura foi feita em leitor de microplaca a 340 nm.

Os cálculos foram realizados utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade específica (U GR)} = \frac{\text{Abs} \times \text{diluição} \times 1000000}{6,22 \times \text{vol amostra} \times [\text{proteína}] \times 1000}$$

Onde:

Abs = Absorbância média;

diluição = diluição da mostra;

6,22 = coeficiente de extinção molar do GSSG;

Vol amostra = volume da amostra adicionado no poço;

[proteína] = concentração de proteínas totais.

1.3.6.5. Atividade das fosfatases (PP)

A determinação da atividade das PP foi baseada nos trabalhos de Carmichael (1994) e Chen *et al* (2006).

Para a dosagem das PP, cada organismo foi homogeneizado (33% p:v) em uma solução tampão contendo Tris-HCL (50 mM), EDTA (0,1 mM), dithiothreitol (5 mM), MnCl₂ (0,2 mM) e albumina do soro bovino (BSA) (0,2 mg.mL⁻¹) diluídos em água ultrapura em pH 7,0. As amostras foram centrifugadas a 9.000 x g (4 °C) por 30 minutos e os sobrenadantes foram empregados como fonte enzimática.

A metodologia consistiu em analisar a hidrólise de 22,2 mM de *para*-nitrofenol fosfato (*p*-NPP) diluído na solução tampão, processo catalisado pelas PP.

A dosagem foi realizada em microplaca transparente de 96 poços onde foi adicionado 20 µL de extrato de tecido (amostra) diluído em 1:1 (v:v) na

solução tampão e 180 µL da solução contendo *p*-NPP (22,2 mM). O tempo de incubação foi de 30 minutos no escuro e em temperatura ambiente. A leitura foi feita em leitor de microplaca a 405 nm.

Os cálculos foram realizados utilizando a seguinte fórmula

$$\text{Atividade específica (U PP)} = \frac{2 \times [\text{Abs} / (1,78 \times 10^4) \times \text{vol substrato} / 1000]}{[\text{proteína}] / (\text{diluição} \times \text{vol amostra}) \times 1000000}$$

Onde:

Abs = Absorbância média;

$(1,78 \times 10^4)$ = coeficiente de extinção molar do *p*-NPP;

vol substrato = volume do substrato adicionado no poço;

[proteína] = concentração de proteínas totais.

diluição = diluição da amostra;

Vol amostra = volume da amostra adicionado no poço.

1.3.6.6. Lipoperoxidação (LPO)

A Peroxidação de lipídios foi determinada de acordo com Hermes-Lima *et al.* (1995) e Monserrat *et al.* (2003). O método foi baseado na oxidação do Fe(II) pelos lipídios hidropoxidados (ensaio FOX) a pH ácido na presença de Fe(III) e laranja de xilenol.

As amostras foram homogeneizadas em 10% (v:v) de metanol aquoso (4°C), centrifugadas a 1.000 x g por 5 min, à 4°C e o sobrenadante foi usado para a determinação de lipídios peroxidados. O hidroperóxido de cumeno (CPH, Sigma) foi empregado como padrão.

A dosagem foi realizada em microplaca transparente de 96 poços onde foi adicionado 90 µL de FeSO₄ (1 mM), 35 µL de H₂SO₄ 0,25 mM, 35 µL de

laranja de xilenol (1 mM), 170 µL de água ultrapura e 20 µL de extrato de tecido (amostra). Durante a dosagem foram utilizados 16 brancos. Para os brancos foi adicionado 20 µL de metanol. Após 15 minutos de incubação foi feita a leitura em espectrofotômetro a 580 nm. Posteriormente, adicionou-se 10 µL de CHP (0,1 mM) diluído em metanol 40% em metade dos brancos e em todas as amostras. Após mais 15 minutos de incubação foi feita a leitura em leitor de microplaca a 580 nm. A LPO foi quantificada em termos de equivalentes de CHP.

Os cálculos foram realizados utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{nmol CHP.g}^{-1} \text{ p.u.} = (\text{Abs amS} / \text{Abs brC}) \times 1 \times (\text{vol total} / \text{vol amostra}) \times 10 \times \text{FC}$$

Onde:

Abs AmS = Absorbância média da amostra sem CHP;

Abs brC = Absorbância média dos brancos com CHP;

vol total = volume total adicionado no poço;

vol amostra = volume da amostra adicionado no poço;

FC (fator de correção) = $(\text{Abs brC} - \text{Abs brS}) / (\text{Abs AmC} - \text{Abs AmS})$.

1.3.6.7. Conjugados DNA-proteína (DNA-pc)

A metodologia para a determinação de conjugados DNA-proteína foi baseada nos trabalhos de Zhitkovich & Costa (1992), Schoenfeld & Witz (1999) e Barker *et al.* (2005).

Foram utilizadas 4 soluções:

Solução 1: contendo KCl (100 mM) e Tris-HCL (20 mM) diluídos em água ultrapura em pH 7,5;

Solução 2: contendo KCl (100 mM) e EDTA dissódico (10 mM) diluídos em água ultrapura em pH 7,5;

Solução 3: contendo 0,15 mg proteinase K por mL da solução 2.

Solução 4: contendo 0,2 mg de albumina do soro bovino (BSA) por mL de SDS (dodecil sulfato de sódio) (0,5 %).

Para a lise celular, as amostras foram diluídas em 500 µL de SDS (0,5%) e agitadas por 10 segundo em vórtex e mantidas a -80 °C por 10 minutos. Após descongeladas, as amostras foram novamente agitadas por 10 segundos no vórtex.

Após o processo de lise celular, as amostras e os brancos foram passados 5 vezes em uma agulha 22G 1 ¾ (em seringa de 1 mL) para a abertura das fitas de DNA, evitando a formação de espuma. Posteriormente foram mantidas a 65 °C em banho maria por 10 minutos. Depois de retiradas do banho, foi adicionado em cada amostra e branco 500 µL da solução 1 e posteriormente foram colocadas em gelo por 10 minutos.

Depois de retiradas do gelo, as amostras foram centrifugadas à 3.000 x g por 5 minutos a 4 °C, os sobrenadantes (DNA livre) foram passados para

tubos falcon. Os precipitados (DNA-pc) foram ressuspensos em 1 mL da solução 1 e agitados em vórtex. Esse passo de separação do DNA livre e DNA-pc foi feito 4 vezes, atingindo um total de 4 mL solução com DNA livre.

Após a separação do DNA livre e DNA-pc, foi adicionado, aos precipitados finais, 1 mL da solução 4, agitando-se vagarosamente e incubando por 3 horas a 45 °C. Após o período de incubação as amostras foram centrifugadas a 6.000 x g por 5 minutos a 4 °C.

A dosagem foi feita em microplaca transparente de 96 poços onde foi adicionado 250 µL do extrato de DNA (amostra) e 30 µL do corante CYBR Gold (0,0001 %). O tempo de incubação foi de 15 minutos e a leitura foi feita em fluorímetro num comprimento de excitação a 365 nm e de emissão a 450-460 nm.

A média dos resultados obtidos com a leitura foi convertida em porcentagem.

CAPÍTULO II

-Estresse Oxidativo-

Artigo Publicado na revista “Marine Environmental Research” (anexo 1)

TÍTULO: “Microcystin-Induced Oxidative stress in *Laeonereis acuta* (Polichaeta, Nereididae)”.

AUTORES: Leão, J. C.; Geracitano, L. A.; Monserrat, J. M.; Amado, L. L.; Yunes, J. S.

2.1. RESUMO

A indução de estresse oxidativo por microcistinas foi avaliada em um poliqueto estuarino, *Laeonereis acuta* (Nereididae). Dez organismos foram expostos a células liofilizadas de uma cepa tóxica de *Microcystis aeruginosa* RST9501 ($\approx 2 \text{ mg.L}^{-1}$ microcistina); dez organismos foram expostos a células liofilizadas de uma cepa não tóxica de *Aphanotece* sp. RSM92 e dez foram mantidos sem células de cianobactérias. O tempo de exposição foi de 48 horas. As defesas antioxidantes enzimáticas, assim como danos oxidativos, foram analisados. Os organismos expostos tanto a cianobactéria tóxica como a não tóxica apresentaram uma diminuição na atividade da catalase, sem alteração da atividade da glutathione redutase ou da glutathione-S-transferase. Essa situação pode ter levado a um acúmulo intracelular de toxina no grupo exposto à *Microcystis*, o que pode favorecer a geração de estresse oxidativo, evidenciado pelos altos níveis de lipídios peroxidados. Além disso, foram observados altos níveis de conjugados DNA-proteína.

Palavra chave: Microcistina, *Microcystis*, *Laeonereis*, Estresse Oxidativo, Lipoperoxidação, Conjugados DNA-proteína.

2.2. INTRODUÇÃO

As microcistinas, cianotoxinas hepatotóxicas, são conhecidas por inibir as enzimas PP1 e 2A e por induzir estresse oxidativo em diferentes organismos gerando danos celulares (Pflugmacher, 2004; Pietro *et al.*, 2006).

A poluição antropogênica tem promovido florações tóxicas de cianobactérias em corpos de água do mundo inteiro. Diversas florações contendo células tóxicas de cianobactérias têm ocorrido na Lagoa dos Patos (Sul do Brasil) nas últimas três décadas, afetando a vida aquática. Alterações fisiológicas e comportamentais com a morte de algumas espécies têm sido observadas; tal fato pode levar à redução da biodiversidade (Yunes *et al.*, 1998; Dewes *et al.*, 2006).

O poliqueto *L. acuta* tem sido considerado como um importante bioindicador presente na Lagoa dos Patos. Sua abundância ambiental e suas características fisiológicas, como a capacidade de modular seu sistema de defesa antioxidante frente a diversos poluentes, tornam esse organismo uma importante ferramenta para os estudos ecotoxicológicos (Geracitano *et al.*, 2004).

O presente estudo teve como objetivo avaliar alguns parâmetros enzimáticos antioxidantes e possíveis danos oxidativos, em *L. acuta* expostos a níveis agudos de microcistinas.

2.3. MATERIAL E MÉTODOS

Células da cepa tóxica *M. aeruginosa* (RST9501) foram cultivadas e empregadas como fonte de microcistinas. Células de uma cianobactéria não tóxica, *Aphanotece* sp. (RSMa92), foram cultivadas em paralelo com os cultivos de *M. aeruginosa*.

Espécimes de *L. acuta* foram coletados em uma área não-poluída da Lagoa dos Patos e imediatamente transferidos para o laboratório em uma caixa térmica com gelo. Após 4 dias de aclimação em caixas plásticas com areia e água (salinidade 10, pH 8,0), os organismos foram transferidos para recipientes individuais (10 cm de diâmetro) contendo 50 mL de água (salinidade 10, pH 8,0) e 10 g de areia esterilizada a uma temperatura (20 °C) e fotoperíodo (12hC:12hE) fixos.

Três grupos (n=10) foram testados; o primeiro foi exposto a células liofilizadas da cepa tóxica de *M. aeruginosa* (2 g.L⁻¹) atingindo aproximadamente 2 mg.L⁻¹ de microcistinas, o segundo foi exposto à células liofilizadas da cianobactéria não tóxica, *Aphanotece* sp. (2 g.L⁻¹), e o terceiro grupo foi o controle. Os testes duraram 48 h.

De acordo com Matthiensen *et al.* (2000), [D-Leu⁻¹]MC-LR é a principal variante de microcistina produzida por essa cepa de *Microcystis*, e apresenta um valor de DL₅₀ de 71 µg/Kg em bioensaio com camundongos. Devido às concentrações utilizadas, os testes foram considerados agudos.

Para as análises das concentrações de proteínas e atividades enzimáticas, cada organismo foi homogeneizado (20% p:v) em uma solução tampão [Tris Base (20mM), EDTA (1mM), ditiotretol (1mM, Sigma), sacarose

(0.5 mM), KCl (150 mM); pH 7.6]. As amostras foram centrifugadas à 9,000 x g (4 °C) por 30 minutos e os sobrenadantes foram empregados como fonte enzimática.

Os seguintes parâmetros foram medidos: atividade das enzimas Glutathione-S-transferase (GST), catalase (CAT) (Geracitano *et al.*, 2004) e Glutathione Redutase (GR) (Nagalakshmi & Prasad, 2001); níveis de lipoperóxidos (LPO) (Geracitano *et al.*, 2004) e de conjugados DNA-proteína (DNA-pc) (Barker *et al.*, 2005). Os dados foram analisados através do teste ANOVA ($\alpha=0.05$).

2.4. RESULTADOS

Após 48 horas de exposição, a atividade da CAT foi reduzida ($p<0,05$) em ambos os grupos expostos a células de cianobactérias, enquanto que as atividades das enzimas GST e GR não apresentaram diferença quando comparado com o grupo controle ($p>0,05$); (Figura 2.1). Somente o grupo exposto à *Microcystis* apresentou altos níveis de LPO e DNA-pc, quando comparado com o grupo controle ($p<0,05$; Figura 2.2).

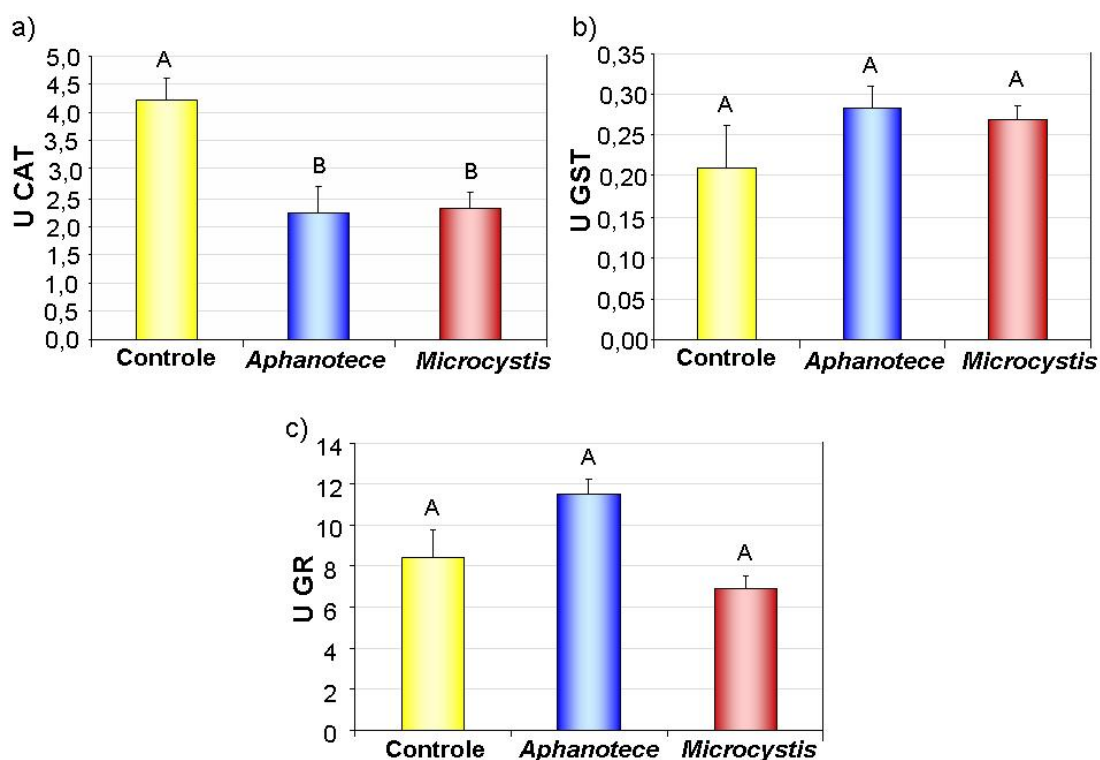


Figura 2.1: Atividade enzimática após 48 horas de exposição à 2 g.L⁻¹ de células liofilizadas da cepa tóxica de *Microcystis aeruginosa* (≈2 mg.L⁻¹ de microcistinas), 2 g.L⁻¹ de células liofilizadas da cianobactéria não tóxica *Aphanotece* sp., e ausência de cianobactérias (controle). (a) catalase (CAT); (b) glutationa-S-transferase (GST) e (c) glutationa redutase (GR). Os dados são expressos em unidade enzimática (U) como média + erro padrão. Letras similares indicam ausência de diferença significativa ($p \geq 0,05$).

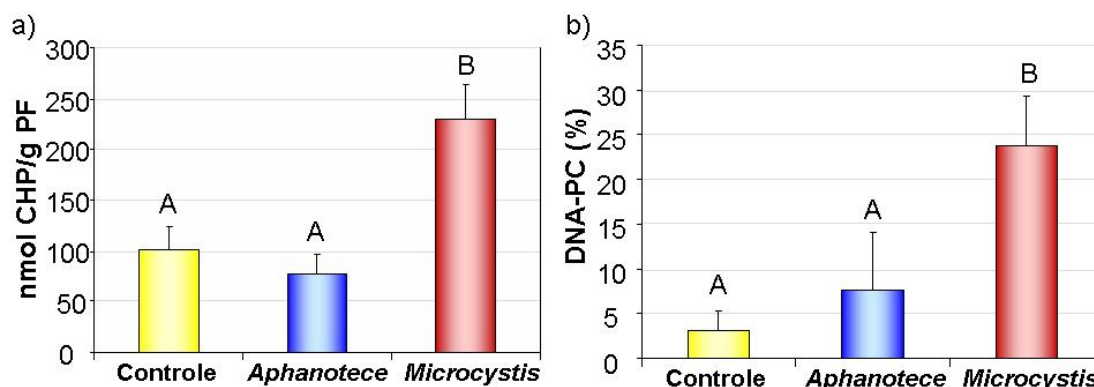


Figura 2.2: Danos oxidativos após 48 horas de exposição à 2 g.L^{-1} de células liofilizadas da cepa tóxica de *Microcystis aeruginosa* ($\approx 2 \text{ mg.L}^{-1}$ de microcistinas), 2 g.L^{-1} de células liofilizadas da cianobactéria não tóxica *Aphanotece sp.*, e ausência de cianobactérias (controle). (a) Níveis de lipoperóxidos (LPO), onde PF = peso fresco; (b) Níveis de conjugados DNA-proteína (DNA-pc). Os dados são expressos em média + erro padrão. Letras similares indicam ausência de diferença significativa ($p \geq 0,05$). O hidroperóxido de cumeno (CHP) foi empregado como padrão nas análises de LPO.

2.5. DISCUSSÃO

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas durante diversos processos bioquímicos, assim, um sistema de defesa antioxidante é necessário para proteger o organismo. CAT é uma enzima que catalisa a degradação do H_2O_2 (precursor do $\text{HO}^\bullet$, a ERO mais tóxica). GST catalisa a conjugação de produtos oxidados com a glutathiona reduzida (GSH). GST também catalisa o processo de detoxificação através da conjugação das microcistinas com a GSH, enquanto que a GR catalisa a regeneração da GSH a partir da GSSG (glutathiona oxidada) (Pflugmacher, 2004).

No presente trabalho, as microcistinas não ativaram o sistema de defesa antioxidante; na verdade, a atividade da CAT foi diminuída. Por outro lado, a GST inalterada pode induzir o acúmulo intracelular das microcistinas, promovendo uma condição de estresse oxidativo. Além disso, altos níveis de ERO como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet}$) pode inibir a atividade da CAT (Kono & Fridovich, 1982). Dewes *et al.* (2006) reportou a ocorrência de estresse oxidativo em um caranguejo estuarino oralmente exposto à microcistinas. Pflugmacher (2004) e Pietro *et al.* (2006) observaram estresse oxidativo induzido por microcistinas na macrófita aquática *Ceratophyllum demersum* e no peixe *Oreochromis sp.* (tilápia). A ausência de respostas antioxidantes em *L. acuta* levou o organismo a uma condição de estresse oxidativo após exposição aguda a microcistinas, evidenciado pelos altos níveis de LPO. Além disso, foram observados altos níveis de DNA-pc que, embora não seja um dano exclusivamente oxidativo, mostra o potencial geonotóxico dessas toxinas.

Uma condição de estresse oxidativo é induzida por um desequilíbrio entre pro-oxidantes e capacidade antioxidante em favor dos pro-oxidantes. Nesse trabalho, altos níveis de LPO e DNA-pc foram observados. Altos níveis de LPO induzidos por microcistinas foram observados em caranguejos e peixes por Dewes *et al.* (2006) e Pietro *et al.* (2006). Não há na literatura evidências de formação de DNA-pc induzida por microcistinas e, além disso, esse tipo de dano não é exclusivamente oxidativo. Entretanto, Zegura *et al.* (2004) observou que a genotoxicidade das microcistinas está relacionada com a indução da produção de ERO.

2.6. CONCLUSÃO

A alteração dessas variáveis após exposição à microcistinas indica a existência de respostas desencadeadas por organismos aquáticos, sugerindo que não somente o acúmulo de microcistinas nos tecidos deve ser analisado, mas também as variáveis bioquímicas, com o objetivo de estimar os riscos toxicológicos para as populações expostas a essas toxinas.

CAPÍTULO III

-Alteração na Motilidade-

Artigo em revisão na revista “Environmental Research” (ANEXO 2)

TÍTULO: MOTILITY CHANGES INDUCED BY MICROCISTIN IN *Laeonereis acuta* (POLYCHAETA, NEREIDIDAE) FROM THE PATOS LAGOON (BRASIL).

AUTORES: Leão, J. C.; Geracitano, L. A.; Monserrat, J. M.; Amado, L. L.; Barros, D. M.; Colvara, W. A.; Yunes, J. S.

3.1. RESUMO

As microcistinas, cianotoxinas hepatotóxicas, são conhecidas por inibirem as fosfatases PP1 e 2A e por induzirem estresse oxidativo em diferentes organismos. Alterações na motilidade induzidas por microcistinas foram avaliadas no poliqueto estuarino, *Laeonereis acuta*, (Nereididae) proveniente do estuário Lagoa dos Patos (Sul do Brasil). Dez organismos foram expostos a células liofilizadas de uma cepa tóxica de *Microcystis aeruginosa* RST9501 ($\approx 3 \text{ mg.L}^{-1}$ de microcistinas); dez organismos foram expostos a células liofilizadas de uma cepa não tóxica de *Aphanotece* sp. RSMAN92 e dez foram mantidos sem células de cianobactérias (controle), durante 27 horas. Após exposição às cianobactérias, os organismos foram transferidos para recipientes contendo eserina ($0,02 \text{ mg.L}^{-1}$), um composto anticolinesterásico, durante 3 horas. A motilidade, o consumo de oxigênio e a atividade das enzimas PP foram avaliados. Após 11 horas de exposição, o consumo de oxigênio foi menor ($p < 0,05$) nos grupos expostos a células de *Microcystis* e *Aphanotece*, e posteriormente foi levemente aumentado, somente no grupo exposto a células de *Microcystis*. Durante exposição à eserina, o consumo de

oxigênio foi novamente diminuído em ambos os grupos ($p < 0,05$). A motilidade foi aumentada ($p < 0,05$) no início do teste somente no grupo exposto a células de *Microcystis* e depois foi fortemente diminuída ($p < 0,05$). Após 27 horas de exposição a células de *Microcystis*, os poliquetos perderam completamente a motilidade, a qual foi parcialmente recuperada após 3 horas de exposição à eserina. A atividade das PP foi diminuída somente no grupo exposto as células de *Microcystis* ($p < 0,05$). Os resultados indicam que não somente os parâmetros bioquímicos clássicos são afetados após exposição a microcistinas mas também parâmetros fisiológicos e variáveis ecologicamente importantes.

Palavras-chave: microcistina, *Laeonereis*, motilidade, consumo de oxigênio, fosfatase.

3.2. INTRODUÇÃO

As microcistinas, cianotoxinas hepatotóxicas, são conhecidas por inibir as fosfatases PP1 e 2A e por induzir estresse oxidativo em diferentes organismos como macrófitas, poliquetos, caranguejos e peixes (Pflugmacher, 2004; Dewes *et al.*, 2006, Pietro *et al.*, 2006, Leão *et al.*, 2008).

A poluição antropogênica tem promovido florações tóxicas de cianobactérias em corpos de água do mundo inteiro. Diversas florações contendo *Microcystis aeruginosa* tóxica têm sido observadas na Lagoa dos Patos (Sul do Brasil) nas últimas três décadas com efeitos sobre os organismos aquáticos. Alterações fisiológicas e comportamentais com a morte de algumas espécies, incluindo o poliqueto *Laeonereis acuta* têm sido observadas (Yunes

et al., 1998; Pinho *et al.*, 2005; Rosa *et al.*, 2005; Dewes *et al.*, 2006, Leão *et al.*, 2008).

Uma vez que o comportamento é o elo entre processos ecológicos e fisiológicos, pode funcionar como uma ferramenta importante para o estudo do estresse primário promovido por compostos tóxicos presentes no ambiente (Scott & Sloman, 2004). Alguns trabalhos têm mostrado alterações nas atividades natatória e reprodutiva dos peixes *Jenynsia multidentata* e *Danio rerio* promovidas por exposição à microcistinas, o que indica que essa toxina pode afetar o comportamento (Baganz *et al.*, 1998; Cazenave *et al.*, 2008).

Trabalhos recentes mostraram que alterações comportamentais são associadas com efeitos neurotóxicos de compostos tóxicos, como diversos tipos de pesticidas e cianotoxinas. Algumas neurotoxinas, como as saxitoxinas, geram paralisia e outras, como a anatoxina-a e a(s) e a eserina, provocam um superestímulo (Carmichael, 1994; Monserrat & Bianchini, 2001, Bushnell & Moser, 2006, Kirkpatrick *et al.*, 2006, Shepherd *et al.* 2006).

O poliqueto *Laeonereis acuta* é considerado como um bioindicador importante na Lagoa dos Patos. Sua abundância ambiental e características fisiológicas diante de diversos poluentes fazem desse organismo uma importante ferramenta para estudos ecotoxicológicos (Geracitano *et al.*, 2004).

O presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações na motilidade do poliqueto *L. acuta* exposto a células tóxicas de *M. aeruginosa* isolada da Lagoa dos Patos, associada com o consumo de oxigênio e atividade das enzimas PP.

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

Células de uma cepa tóxica de *M. aeruginosa* (RST9501) isolada da Lagoa dos Patos (Matthiensen *et al.*, 2000) foram cultivadas e empregadas como fonte de microcistinas. Células de uma cianobactéria não tóxica, *Aphanotece* sp. (RSMAN92), foram cultivadas paralelamente. Ambas as culturas foram mantidas em meio BG-11 modificado (Rippka *et al.*, 1979).

Amostras da água de superfície de áreas impactadas (“São Lourenço do Sul” e “Barragem de Santa Bárbara”) localizadas na região sul do Brasil (estado do Rio Grande do Sul), incluindo a Lagoa dos Patos, foram coletadas durante eventos de florações em 2006 (Figura 3.1 e Tabela 3.1).

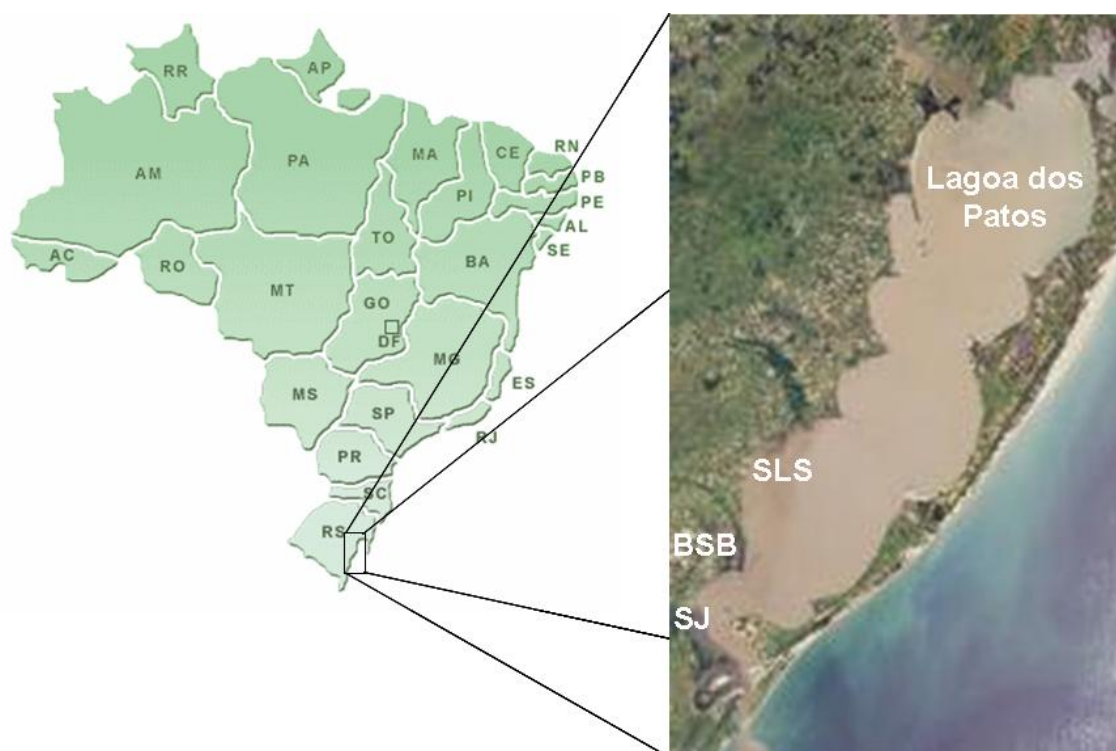


Figura 3.1: Área de coleta das amostras de água de superfície e dos espécimes de poliqueto, onde SLS significa “São Lourenço do Sul”, BSB significa “Barragem de Santa Bárbara” e SJ significa “Saco do Justino”.

Tabela 3.1: Concentrações de microcistinas nas amostras de água de superfície coletadas de áreas impactadas localizadas na região sul do Brasil (estado do Rio Grande do Sul), incluindo a Lagoa dos Patos, durante eventos de florações. MC=microcistina

Área	Data	Mg.L ⁻¹ MC
São Lourenço do Sul	Março/2006	19
São Lourenço do Sul	Março/2006	29
Barragem de Santa Bárbara	Novembro/2006	44

As altas concentrações de microcistinas utilizadas no presente trabalho foram baseadas nas altas concentrações de microcistinas observadas no ambiente.

De acordo com Matthiensen *et al.* (2000), [D-Leu¹]microcistina-LR é a principal variante produzida por essa cepa de *Microcystis*. Essa variante apresenta um valor de DL₅₀ de 71 µg.Kg⁻¹, enquanto que as variantes microcistinas-LR e -RR apresentam valores de DL₅₀ de 50 e 320 µg.Kg⁻¹, respectivamente, em bioensaio com camundongo (Chen *et al.*, 2006). Devido às concentrações de microcistinas usadas, os testes foram considerados agudos.

Espécimes de *L. acuta* foram coletados de uma área não poluída do estuário da Lagoa dos Patos (“Saco do Justino”) (Geracitano *et al.*, 2004) e imediatamente transferidos para o laboratório em uma caixa de isopor com gelo, com o intuito de reduzir o metabolismo. Durante 4 dias de aclimação no laboratório, os poliquetos foram mantidos em caixas plásticas com areia e água (salinidade 10, pH 8,0), a uma temperatura (20 °C) e fotoperíodo (12C:12E)

fixos. Após aclimação, os poliquetos foram transferidos para recipientes contendo câmaras individuais, os quais foram utilizados durante o teste.

Três grupos (n=10) foram testados: O primeiro foi exposto a células liofilizadas da *M. aeruginosa* tóxica (3 g.L^{-1}) atingindo aproximadamente 3 mg.L^{-1} de microcistinas; o segundo grupo foi exposto a células liofilizadas da cianobactéria não tóxica, *Aphanotece* sp. (3 g.L^{-1}), e o terceiro grupo foi mantido sem células de cianobactérias (controle). Após 27 horas (momento em que os organismos expostos a células de *Microcystis* pararam de se mover), todos os organismos foram transferidos para recipientes contendo eserina ($0,02 \text{ mg.L}^{-1}$), um inibidor colinesterásico que indiretamente estimula tanto os receptores nicotínicos como muscarínicos (Monserat & Bianchini, 2001). Os poliquetos permaneceram expostos à eserina durante 3 horas.

Um grupo extra (n=5) foi exposto a células tóxicas de *Microcystis*, na mesma concentração e mesmo tempo de exposição do primeiro grupo. Após a exposição, os organismos foram transferidos para recipientes contendo água (salinidade 10; pH 8,0) sem eserina e mantidos durante 3 horas para observação da motilidade.

Dentro dos mesmos intervalos de tempo foi medido o consumo de oxigênio e a motilidade. Ao final do teste, foi dosada a atividade das PP.

O consumo de oxigênio foi avaliado polarograficamente (Kolthoff & Lingane, 1952) usando oxímetros equipados com eletrodo tipo Clark (Clark, 1956). Cada poliqueto foi pesado e o consumo de oxigênio foi medido durante 10 minutos.

A motilidade foi medida através de filmagem (Sony Cyber shot – DSC P73) das oscilações dos poliquetos nas câmaras durante um minuto. Os vídeos foram tratados usando o a edição livre do programa Slow Motion (www.goodervideo.com) e o número de oscilações por minuto foi contado. Após os testes, os poliquetos foram congelados a -80 °C para análises enzimáticas.

A determinação da atividade das PP foi baseada nos trabalhos de Carmichael (1994) e Chen *et al* (2006).

As amostras da água de superfície e os extratos de cianobactérias foram analisados em CLAE-HPLC com detector de UV (Shimadzu SCL-10Avp), para determinação dos conteúdos de microcistinas.

Os dados de consumo de oxigênio e motilidade foram analisados através do teste de ANOVA para medidas repetidas ao longo do tempo, onde o fator principal foi o tratamento com as cianobactérias (antes da exposição à eserina). Os dados da atividade das PP foram analisados através do teste de ANOVA de uma via. Em todos os casos, as médias foram comparadas através do teste *post-hoc* HSD de Tukey ($\alpha=0,05$).

3.4. RESULTADOS

Nenhuma diferença significativa no consumo de oxigênio ($p \geq 0,05$) foi observada até 7 horas de exposição. Após esse período, houve uma diminuição do consumo nos grupos expostos às cianobactérias ($p < 0,05$), quando comparados com o grupo controle. Após 21 horas de exposição, o consumo de oxigênio foi levemente aumentado somente no grupo exposto a

células de *Microcystis*. Durante a exposição à eserina, o consumo foi menor em ambos os grupos expostos às cianobactérias ($p<0,05$) (Figura 3.2). No início do teste a motilidade foi aumentada somente no grupo exposto a células de *Microcystis* e posteriormente (4 horas de exposição) foi diminuída, quando comparado com o grupo exposto a células de *Aphanotece* e o grupo controle ($p<0,05$). Essa diferença se manteve até o final do teste. Após 27 horas de exposição a células de *Microcystis*, os poliquetos perderam completamente a motilidade, a qual foi levemente recuperada após 3 horas de exposição à eserina (Figura 3.3). Os organismos expostos a células de *Microcystis* durante 27 horas e expostos à água sem eserina durante 3 horas, não recuperaram a motilidade (dado não apresentado).

Após exposição a células de cianobactérias e à eserina, a atividade das PP foi menor somente no grupo exposto a células de *Microcystis*, quando comparado como o grupo exposto a células de *Aphanotece* e o grupo controle ($p<0,05$) (Figura 3.4).

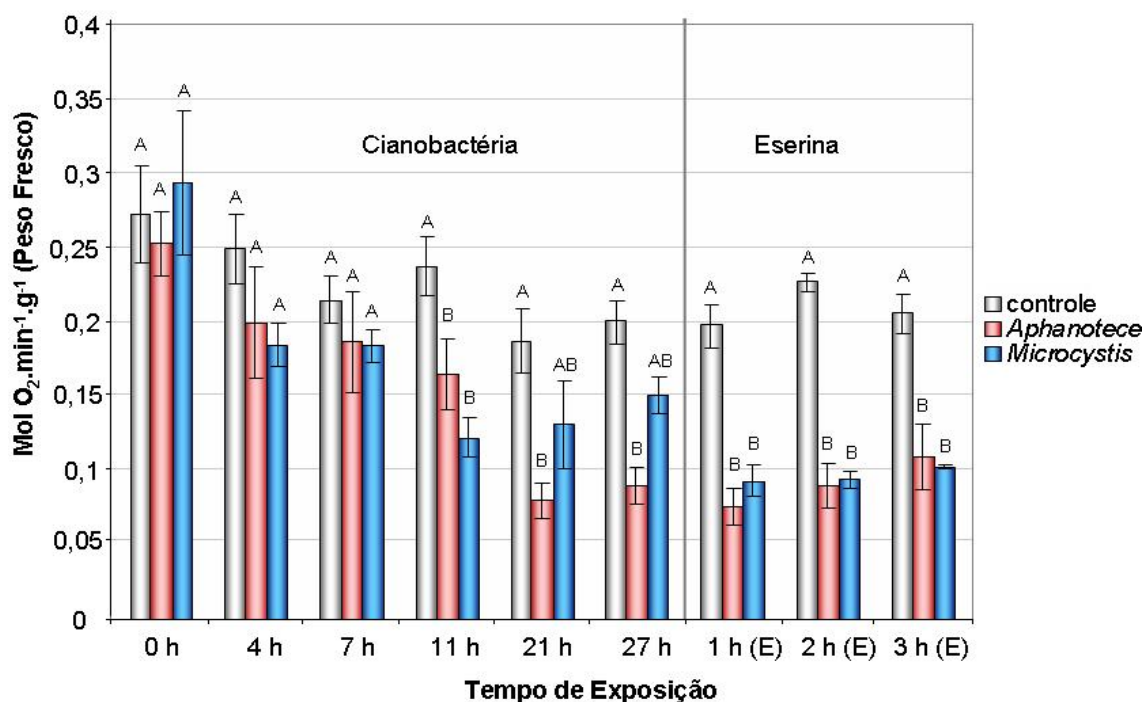


Figura 3.2: Taxas de consumo de oxigênio nos poliqueto *Laeonereis acuta* expostos a 3 g.L⁻¹ de células liofilizadas de *Microcystis aeruginosa* tóxica (≈3 mg.L⁻¹ de microcistinas), 3 g.L⁻¹ de células liofilizadas de *Aphanotece* sp. não tóxica, e ausência de células de cianobactérias (controle), durante 27 horas, e expostos à eserina (0,02 mg.L⁻¹), durante 3 horas (após exposição às cianobactérias). Os dados são expressos em média + erro padrão. As letras similares indicam ausência de diferença significativa (p≥0,05), para cada intervalo de exposição.

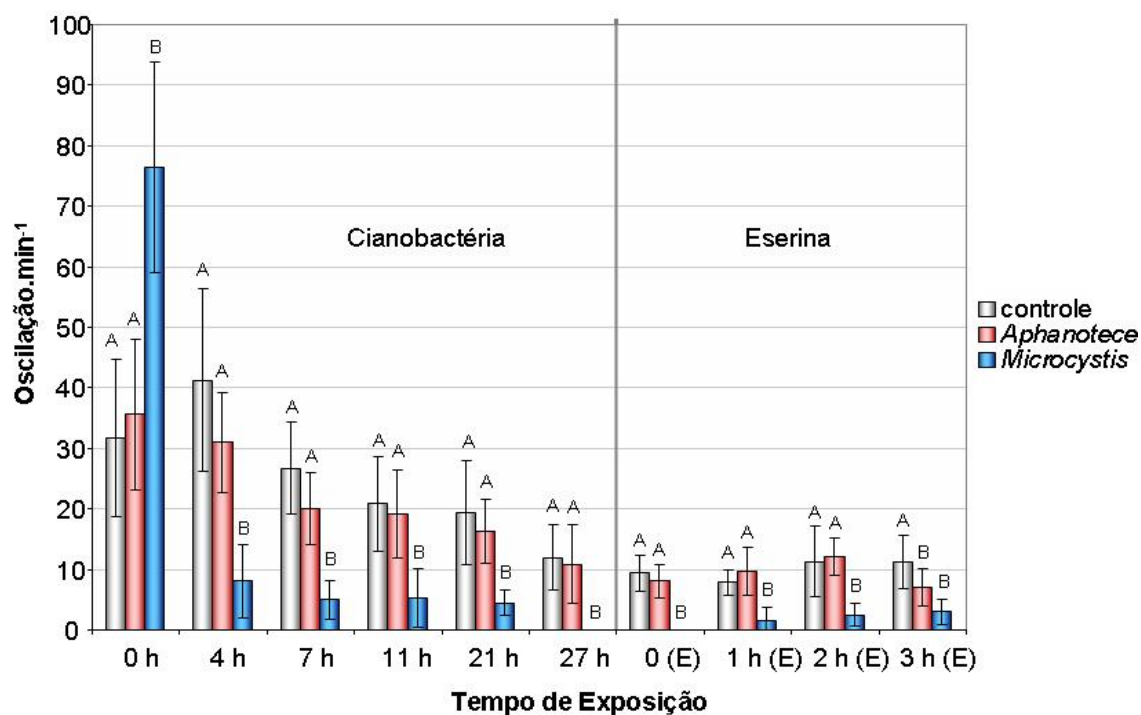


Figura 3.3: motilidade dos poliquetos *Laeonereis acuta* expostos a 3 g.L⁻¹ de células liofilizadas de *Microcystis aeruginosa* tóxica (≈ 3 mg.L⁻¹ de microcistinas), 3 g.L⁻¹ de células liofilizadas de *Aphanotece* sp. não tóxica, e ausência de células de cianobactérias (controle), durante 27 horas, e expostos à eserina (0,02 mg.L⁻¹), durante 3 horas (após exposição às cianobactérias). Os dados são expressos em média + erro padrão. As letras similares indicam ausência de diferença significativa ($p \geq 0,05$), para cada intervalo de exposição.

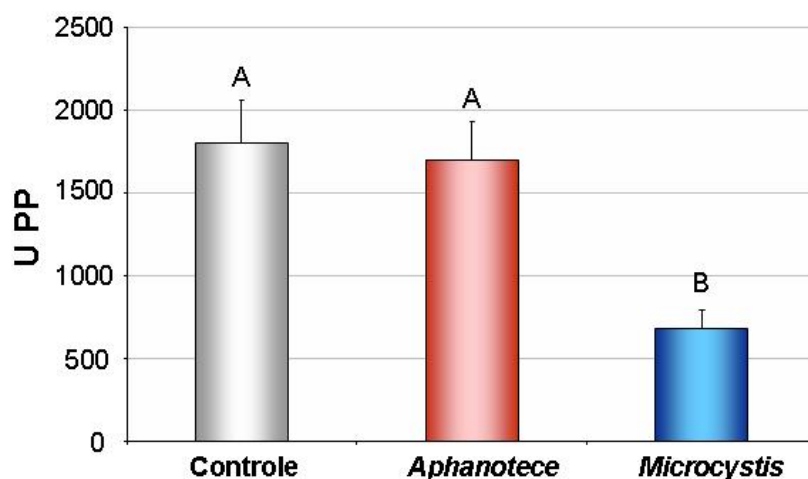


Figura 3.5: Atividade das enzimas fosfatases (PP) nos poliquetos *Laeonereis acuta* expostos a 3 g.L^{-1} de células liofilizadas de *Microcystis aeruginosa* tóxica ($\approx 3 \text{ mg.L}^{-1}$ de microcistinas), 3 g.L^{-1} de células liofilizadas de *Aphanotece sp.* não tóxica, e ausência de células de cianobactérias (controle), durante 27 horas, e expostos à eserina ($0,02 \text{ mg.L}^{-1}$), durante 3 horas (após exposição às cianobactérias). Os dados são expressos em média + erro padrão. As letras similares indicam ausência de diferença significativa ($p \geq 0,05$).

3.5. DISCUSSÃO

As microcistinas são conhecidas por induzir estresse oxidativo em diferentes organismos (Pflugmacher, 2004; Dewes *et al.*, 2006, Pietro *et al.*, 2006, Leão *et al.*, 2008). Montagnolli *et al.* (2004) observou um aumento significativo no consumo de oxigênio do crustáceo detritívoro *Kalliapseudes schubartii* exposto a concentrações agudas de extratos obtidos com células liofilizadas da cepa *M. aeruginosa* RST9501 ($0,8$ e $1,2 \text{ g.L}^{-1}$). Pinho *et al.* (2005) e Dewes *et al.* (2006) observaram que o consumo de oxigênio no

caranguejo *Chasmagnathus granulatus* foi elevado após exposição a microcistinas.

No presente estudo o efeito oposto foi observado nos grupos expostos as células de cianobactérias. Uma vez que *L. acuta* é um oxiconformador, a diminuição no consumo de oxigênio pode estar relacionado com o oxigênio dissolvido nos meios, por exemplo, com efeito da presença de bactérias aeróbicas que degradam células cianobacteriais (Rosa *et al.* 2005). Após algumas horas o consumo de oxigênio foi levemente aumentado somente no grupo exposto a células de *Microcystis* e, posteriormente, foi diminuído durante a exposição à eserina. Apesar das variações observadas no consumo de oxigênio nos grupos expostos a células de cianobactéria, tais variações não estiveram associadas com a perda da motilidade no grupo exposto a células de *Microcystis*.

O estresse ambiental pode provocar alterações comportamentais nos organismos, como uma forma primária de defesa. Normalmente, os organismos tentarão evitar as perturbações e reduzir a probabilidade de morte ou custo metabólico através da manutenção da homeostase fisiológica (Schreck *et al.*, 1997; Scott & Sloman, 2004). As alterações comportamentais refletem o quanto o animal reage ao ambiente em que vive. Dessa maneira, as mudanças no comportamento podem *a priori* serem consideradas sensíveis biomarcadores do estresse imposto aos organismos pelo ambiente (Schreck *et al.*, 1997; Scott & Sloman, 2004, Cazenave *et al.*, 2008).

No presente estudo, os poliquetos apresentaram alteração na motilidade quando expostos a células de *Microcystis*, mostrando um aumento inicial

(76 oscilações.min⁻¹) com uma subsequente diminuição (8 oscilações.min⁻¹). Após 27 horas de exposição, tal grupo apresentou-se completamente imóvel (0 oscilações.min⁻¹), porém recuperou a motilidade após 3 horas de exposição à eserina (3 oscilações.min⁻¹).

As neurotoxinas produzidas pelas cianobactérias, como as saxitoxinas, atuam bloqueando o canal de sódio das sinapses nervosas, gerando perda da motilidade. Outras neurotoxinas atuam inibindo a ação da enzima colinesterase (AChE), como as anatoxinas a e a(s), levando a um superestímulo, mesmo efeito gerado pela eserina (Charmichael, 1994; Monserrat & Bianchini, 2001).

A perda da motilidade dos poliquetos expostos a células de *Microcystis*, e a recuperação após exposição à eserina, indica um possível efeito neurotóxico, uma vez que a eserina estimula o sistema nervoso e os organismos expostos à água sem eserina não recuperaram a motilidade.

Alguns trabalhos têm mostrado que diversos tipos de compostos tóxicos afetam a função celular através de alterações citoesqueléticas (Cima *et al.*, 1998; Batista *et al.*, 2003; Gómez-Mendikute & Cajaraville, 2003; Carbonell *et al.*, 2004; Franchine *et al.*, 2004; Moretto *et al.*, 2005; Rudolf *et al.*, 2005).

O citoesqueleto está envolvido na determinação da forma distintiva das células e na regulação da função celular. Os principais componentes do citoesqueleto, como os microfilamentos e os microtúbulos exercem um importante papel na motilidade das células eucarióticas e são os alvos primários de algumas toxinas. Alguns compostos tóxicos se ligam aos componentes do citoesqueleto causando tanto uma quebra do polímero nos seus elementos constitutivos, como uma estabilização das fibras. Ambos os

rearranjos estruturais afetam a forma e a motilidade celular. Contudo, algumas alterações no citoesqueleto estão relacionadas com efeitos secundários, como a inibição das enzimas PP (Scapigliati *et al.*, 1988; Eriksson *et al.*, 1990).

Várias famílias de compostos naturais e derivados são toxinas bem conhecidas com mecanismos específicos de ação sobre o citoesqueleto, porém nos últimos anos, diversas substâncias ambientais ou poluentes têm sido reveladas como geradoras de desordem dos componentes do citoesqueleto (Syversen *et al.*, 1984; Scapigliati *et al.*, 1988, Eriksson *et al.*, 1990).

As microcistinas são conhecidas por gerarem efeitos hepatotóxicos em mamíferos através da inibição das enzimas PP1 e 2A, aumentando a fosforilação protéica (Carmichael, 2004). As enzimas PP1 e 2A estão envolvidas na desfosforilação das proteínas, a qual tem sido reconhecida como uma das principais vias responsáveis pela regulação celular. A inibição dessas enzimas resulta na hiperfosforilação e reorganização dos microfilamentos celulares (Eriksson *et al.*, 1990).

Dessa forma, essas enzimas estão associadas com diversos processos biológicos importantes. Alguns estudos têm mostrado que as enzimas fosfatases regulam a motilidade de células importantes dos organismos como espermatozóides e macrófagos alveolares em mamíferos. Wilson *et al.* (1991) correlacionaram um aumento na fosforilação protéica (gerado pela redução da atividade das PP) com uma redução na motilidade dos macrófagos alveolares. Assim, eles sugerem que a inibição das PP pode reduzir a motilidade devido à reorganização do citoesqueleto. Contudo, Smith *et al.* (1996) observaram que a

inibição da atividade das PP1 pode aumentar a motilidade de espermatozóides humanos e de macacos rhesus.

A fosforilação protéica é um processo bioquímico chave envolvido na plasticidade sináptica responsável pelo balanço entre a ação das proteínas kinases e proteínas fosfatases (Milner *et al*, 1998). A fosforilação/desfosforilação protéica regula eventos pré-sinápticos e pós-sinápticos em neurônios excitatórios e inibitórios. Nesses locais, os substratos fosfatásicos mais relevantes incluem os canais iônicos e os receptores de proteínas-G, os quais suas propriedades funcionais, transporte e organização sináptica são controlados pela fosforilação reversível (Swope *et al*, 1999)

Alguns estudos recentes têm investigado o papel das PP1 no aprendizado e memória, em ratos. A inibição genética da PP1 pela expressão temporária controlada do inibidor I (I1) endógeno da PP1, demonstrou uma conexão entre o aprendizado repetitivo e as fosfatases nos neurônios do cérebro frontal (Munton *et al*, 2004). Mallerest *et al*. (2001) demonstraram o efeito da inibição genética da PP2B na plasticidade e memória. Maidana *et al* (2006) observaram efeito amnésico na recuperação da capacidade de aprendizagem espacial, em ratos expostos a doses subletais de microcistinas, o que pode estar relacionado com efeitos neurotóxicos gerados pela inibição das PP presentes no sistema nervoso.

Alterações comportamentais geradas por microcistinas foram observadas em peixes. Baganz *et al*. (1998) observaram que a uma concentração de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas, o peixe zebra *Danio rerio* parou de desovar e nenhum ovo eclodido foi encontrado. Cazenave *et al*. (2008),

mostraram que a atividade natatória e o sistema de enzimas de detoxificação do peixe *Jenynsia multidentata* foram afetados após exposição a doses subletais de micristina-RR. Isso mostra que a exposição à microcistinas, freqüente durante as florações de cianobactérias, pode afetar adversamente não somente parâmetros bioquímicos, mas também o comportamento dos organismos, com efeitos na composição das comunidades.

No presente trabalho, foi observado que somente o grupo exposto a células de *Microcystis* apresentou uma diminuição da atividade das PP. Uma vez que somente esse grupo apresentou perda da motilidade após 27 horas de exposição, essa redução enzimática provavelmente está associada com essa paralisia, através de alterações das funções das células nervosas.

Cianobactérias tóxicas, inclusive produtoras de microcistinas, têm sido observadas em corpos de água de todo o mundo, mesmo sem ocorrência de floração (Funari & Testai, 2008). Diversos trabalhos têm mostrado a ocorrência de microcistinas em águas de superfície. As concentrações totais dessa toxina em águas de superfície variam em um amplo gradiente de valores (de traços até vários miligramas por litro). Contudo, os maiores níveis de microcistinas têm sido observados durante a ocorrência de florações (Funari & Testai, 2008).

Altas concentrações de microcistinas atingindo $7,3 \text{ mg.L}^{-1}$ foram encontradas na China e Portugal (Nagata *et al.*, 1997; Fastner *et al.*, 1999). Estudos registraram concentrações de microcistinas variando de 15,6 a 25 mg.L^{-1} no Japão e Alemanha (Chorus, 1998). Diversas florações de cianobactérias contendo *M. aeruginosa* tóxica têm ocorrido na Lagoa dos Patos nas últimas três décadas. Diferentes concentrações de microcistinas têm sido

observadas durante essas florações (Yunes *et al.*, 1996). Altas concentrações de microcistinas foram observadas nas amostras de água de superfície coletadas de áreas impactadas localizadas na região sul do Brasil, incluindo a Lagoa dos Patos, durante eventos de florações em 2006.

No presente trabalho, os organismos apresentaram perda da motilidade quando expostos a uma concentração de 3 mg.L⁻¹ de microcistinas, a qual é considerada aguda. Embora altos valores de microcistinas tenham sido observados na nata superficial formada durante as florações de *Microcystis*, essa toxina provavelmente está presente em altas concentrações ao longo de toda a coluna d'água, incluindo o sedimento do fundo. Dessa forma, baseado nos resultados observados na tabela 1, altas concentrações de microcistinas induzindo efeitos agudos sobre os organismos afetados por um evento de floração, é um cenário possível de ser encontrado no ambiente.

3.6. CONCLUSÃO

Os resultados mostram que as microcistinas provocam alterações na motilidade do poliqueto *L. acuta* caracterizado pela perda da motilidade. Apesar da variação no consumo de oxigênio nos grupos expostos a células de cianobactérias, essa variação não foi relacionada com a paralisia. A recuperação da motilidade após exposição à eserina indica um possível efeito neurotóxico gerado pela exposição a células de *Microcystis*, uma vez que os organismos não recuperaram a motilidade quando expostos à água sem eserina. Contudo, somente o grupo exposto a células de *Microcystis* apresentou uma diminuição da atividade das PP, indicando que essa

diminuição enzimática pode estar relacionada com a paralisia através de alterações das funções das células nervosas. Os presentes resultados mostram a importância de se avaliar as alterações comportamentais dos organismos como um biomarcador primário do estresse tóxico gerado pelas microcistinas. A perda da motilidade, associada com alguns efeitos clássicos induzidos pelas microcistinas, como a inibição das PP, pode levar a consequências ecologicamente importantes. Assim, os organismos presentes nesse ambiente estão expostos ao estresse gerado pelas altas concentrações de microcistinas, comuns nas florações, tornando-se alvos fáceis de predadores.

CAPÍTULO IV
-Bioacumulação e Transferência na
Cadeia Trófica-

4.1 RESUMO

As microcistinas, cianotoxinas comuns em florações com dominância de espécies do gênero *Microcystis*, são hepatotoxinas conhecidas por inibirem as enzimas PP1 e 2A, e promoverem a geração de estresse oxidativo e a formação de tumores. Alguns trabalhos mencionam uma possível transferência dessa toxina ao longo da cadeia trófica. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a transferência de microcistina do poliqueto *Laeonereis acuta* para o peixe *Jenynsia multidentata*. Os peixes foram divididos em três tratamentos (n=15): (1) quinze organismos foram expostos a tecido liofilizado de poliqueto contaminado com microcistina ($\approx 0,698 \mu\text{g}$ de MC.g⁻¹ de peso seco); (2) quinze organismos foram expostos a tecido liofilizado de poliqueto não contaminado; e (3) quinze organismos não foram expostos a tecido de poliqueto, sendo mantidos com ração comercial (controle). O teste teve a duração de 6 dias. No presente trabalho, foi observado um acúmulo de microcistinas no tecido dos peixes alimentados com poliquetos contaminados ($0,006 \mu\text{g.g}^{-1} \pm 0,0006$), indicando uma transferência de toxina do poliqueto para o peixe. Considerando que o total de microcistina oferecida para cada peixe ao final de 6 dias foi de aproximadamente $0,044 \mu\text{g}$, significa que aproximadamente 13 % da toxina foram acumulados no tecido do peixe, mostrando que a toxina pode ser transferida neste nível da cadeia alimentar.

4.2. INTRODUÇÃO

A poluição antropogênica, associada com a descarga de produtos agrícolas e esgotos domésticos e industriais em corpos de água, vem gerando o aumento da carga de material orgânico, levando à eutrofização artificial nesses ambientes. O aumento da carga de nutrientes em ambientes aquáticos promove a formação de florações de cianobactérias, que vem ocorrendo freqüentemente no mundo todo (Carmichael *et al.*, 1993; Chorus, 1993; Dokulil *et al.*, 2000).

A ocorrência desses eventos vem gerando efeitos de grande importância, uma vez que muitas espécies de cianobactérias são capazes de produzir toxinas prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana (Chorus, 1993; Carmichael, 1994; Bartram *et al.* 1999; Sivonen & Jones, 1999).

As microcistinas, cianotoxinas comuns em florações com dominância de espécies do gênero *Microcystis*, são hepatotoxinas conhecidas por inibirem as enzimas PP1 e 2A, promover a geração de estresse oxidativo e a formação de tumores (Pflugmacher, 2004; Dewes *et al.*, 2006, Pietro *et al.*, 2006, Leão *et al.*, 2008).

Diversas florações contendo a espécie *Microcystis aeruginosa*, vêm sendo observadas na Lagoa dos Patos nas últimas 3 décadas, o que tornou esse ambiente alvo de diversos estudos, os quais já observaram efeitos tóxicos em espécies de crustáceos e peixes, além de ter sido observado um potencial bioacumulador dessa toxina em moluscos filtradores nativos desse ambiente (Yunes *et al.*, 1996; Yogui *et al.*, 1998; Montagnolli *et al.*, 2004; Monteiro, 2001; Leão, 2004; Dewes *et al.*, 2006).

Diversos trabalhos vêm mencionando efeitos tóxicos em organismos de diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar (Kiviranta *et al.* 1993; Reinekainen *et al.* 1995; Christoffersen, 1996b; Yogui *et al.*, 1998; Eler *et al.*, 2001; Best *et al.*, 2003; Pinho *et al.*, 2005; Dewes *et al.*, 2006; Leão *et al.*; 2008). Alguns autores mencionam a possibilidade de transferência dessa toxina ao longo da cadeia trófica (Vasconcelos, 1995; Christoffersen, 1996a; Amorim & Vasconcelos, 1999; Leão, 2004; Ibelings & Chorus, 2007). Contudo nenhum trabalho foi feito no sentido de se observar a transferência de microcistinas de um nível trófico para outro.

O poliqueto *Laeonereis acuta* é um animal epifaunal com ampla distribuição no bentos. É uma espécie tipicamente estuarina encontrada em águas rasas que se destaca pela frequência de ocorrência e dominância, tanto em ambientes poluídos como não poluídos. Na cadeia trófica, está incluído no primeiro nível de consumidores detritívoros pouco seletivos (Bemvenuti, 1998a e 1998b).

A espécie de peixe *Jenynsia multidentata*, comum no estuário da Lagoa dos Patos, possui hábito alimentar bastante diversificado, e inclui em sua dieta organismos epifaunais como o poliqueto *L. acuta* (Mai *et al.*, 2006).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial acumulativo de microcistinas pelo poliqueto *L. acuta*, bem como a transferência da toxina para o peixe *J. multidentata* alimentado com poliquetos contaminados.

4.3. MATERIAL E MÉTODOS

Os organismos (poliquetos e peixes) foram coletados em uma área não impactada do estuário da Lagoa dos Patos (Saco do Justino; 32°05'S-52°12'W) e imediatamente transferidos para o laboratório.

Após 4 dias de aclimação em caixa plástica contendo areia e água (salinidade 10, pH 8,0) à temperatura (20 °C) e fotoperíodo (12C:12E) fixos, uma fração dos poliquetos foi pesada (peso fresco total), congelada, liofilizada, macerada e pesada (peso seco total) para ser utilizada como controle não tóxico, e uma fração foi transferida para recipientes contendo água (salinidade 10, pH 8,0) com células liofilizadas de *M. aeruginosa* (0,2 g.L⁻¹), atingindo uma concentração de aproximadamente 0,2 mg.L⁻¹ de microcistinas, sendo mantidos durante 8 dias. Após 8 dias de acumulação, os poliquetos foram pesados (peso fresco total), congelados, liofilizados, macerados e novamente pesados (peso seco total).

Uma fração do material liofilizado de ambos os grupos (controle e contaminado) foi processada, utilizando uma adaptação da metodologia descrita por Xie *et al.* (2007), para análise do conteúdo de microcistina em ELISA. As análises foram feitas em triplicatas.

Após o processo de acumulação de microcistina nos poliquetos, foi feito um experimento para avaliar a transferência de microcistinas dos poliquetos contaminados para os peixes (*J. multidentata*). Os peixes foram divididos em três tratamentos (n=15): (1) quinze organismos foram expostos a tecido liofilizado de poliqueto contaminado com microcistina (0,698 µg de MC.g⁻¹ de peso seco); (2) quinze organismos foram expostos a tecido liofilizado de

poliqueto não contaminado; e (3) quinze organismos não foram expostos a tecido de poliqueto, sendo mantidos com ração comercial (controle). Os grupos foram divididos em triplicatas, sendo mantidos 5 peixes por recipiente contendo 500 mL de água (salinidade 5, pH 8,0)

Ao longo de 6 dias, foi adicionado, diariamente, 0,05 g de tecido liofilizado de poliquetos contaminado (0,0365 µg de microcistina) em cada recipiente do grupo de peixes contaminados, 0,05 g de tecido liofilizado de poliquetos não contaminado em cada recipiente do grupo de peixes não contaminados e 0,05 g de ração comercial em cada recipiente do grupo de peixes controle. Ao final de 6 dias, os peixes foram retirados dos recipientes, lavados com água destilada, para retirada do material aderido, pesados (peso fresco total), congelados a -30 °C e liofilizados para o processo de extração e análise de microcistina utilizando a adaptação da metodologia descrita por Xie *et al.* (2007).

Os resultados foram analisados através do teste de ANOVA ($\alpha=0.05$) seguido do teste *Pos hoc* HSD de Tukey.

4.4. RESULTADOS

A capacidade dos poliquetos acumularem microcistinas (0,698 µg MC.g⁻¹ de peso seco) foi observada após 8 dias de exposição a células tóxicas de *Microcystis* (0,2 g.L⁻¹), a uma concentração de aproximadamente 0,2 mg.L⁻¹ de microcistinas.

Nos peixes controle e nos peixes expostos aos poliquetos não contaminados, foram observadas concentrações muito baixas de microcistinas,

ao final de 6 dias de exposição. Não houve diferença significativa entre ambos os grupos ($p \geq 0,05$). Entretanto, pode ser observado que as concentrações de microcistinas nos peixes do grupo exposto aos poliquetos contaminados com microcistina foram significativamente maiores que nos outros dois grupos ($p < 0,05$) (Figura 4.1).

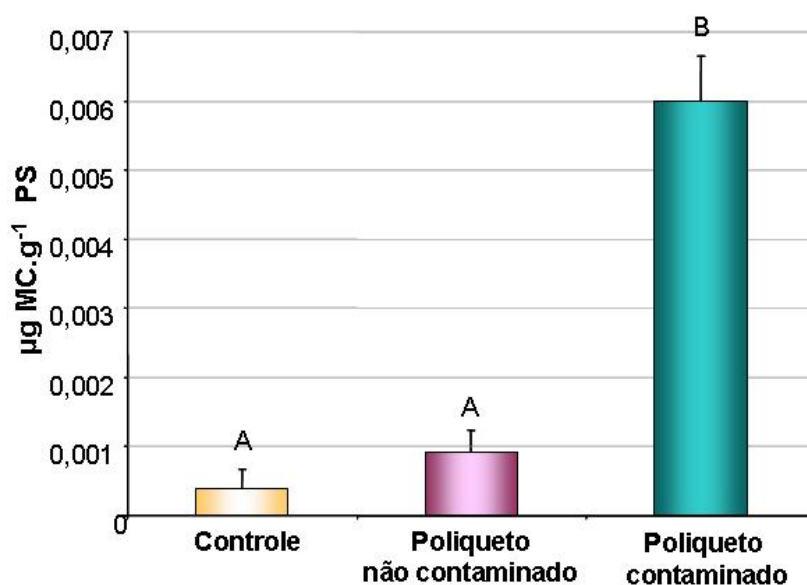


Figura 4.1: Concentração de microcistinas (MC) no tecido dos peixes controle (alimentados com ração comercial), dos peixes alimentados com poliquetos não contaminados e dos peixes alimentados com poliquetos contaminados com microcistinas ($0,698 \mu\text{g de MC.g}^{-1}$ de peso seco), após 6 dias de exposição. Os dados são expressos em média + erro padrão. Letras similares indicam ausência de diferença significativa ($p \geq 0,05$).

4.5. DISCUSSÃO

Alguns trabalhos mencionam a possibilidade das microcistinas serem acumuladas nos tecidos de organismos aquáticos e, dessa forma, serem transferidas na cadeia trófica (Christoffersen, 1996a; Ibelings & Chorus, 2007). Vasconcelos (1995) e Amorim & Vasconcelos (1999) observaram a dinâmica da microcistina no mexilhão *Mytilus galloprovincialis*, avaliando o processo de bioacumulação bem como o processo de depuração após exposição a células vivas de *M. aeruginosa*. Mohamed (2001) verificou que a espécie *Daphnia parvula* pode eventualmente se alimentar de células tóxicas de *M. aeruginosa* acumulando microcistinas em seu organismo. Magalhães *et al.* (2003) observaram acumulação de microcistina em peixes e crustáceos provenientes da Baía de Sepetiba, durante períodos de floração. Li *et al.* (2004) observaram acumulação de microcistinas na carpa *Cyprinus carpio* oralmente expostos à *M. aeruginosa*. Leão (2004) observou a acumulação de microcistinas no mexilhão *Perna perna* e no marisco *Mesodesma mactroides*, provenientes do estuário da Lagoa dos Patos, expostos a células vivas de *M. aeruginosa*. Cazenave *et al.* (2005) avaliaram a acumulação e distribuição da microcistina-RR em diferentes tecidos dos peixes *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* e *Odontesthes bonarienses* expostos à toxina dissolvida na água (50 µg MC.L⁻¹). Durante uma revisão, Christoffersen (1996a) avaliou o efeito das microcistinas em organismos de diferentes níveis da cadeia trófica, mostrando o potencial de bioacumulação dessas toxinas nos organismos expostos.

A espécie *J. multidentata*, comum no estuário da Lagoa dos Patos, é um peixe de hábito alimentar bastante diversificado, tendo como uma de suas presas principais o poliqueto *L. acuta* (Mai *et al.*, 2006). Apesar dos peixes terem sido alimentados com poliquetos liofilizados, com o intuito de se controlar a quantidade de toxina que era oferecida, foi observado em laboratório que *J. multidentata* come o poliqueto fresco com a mesma voracidade.

No presente trabalho, foi observado um acúmulo de microcistinas no tecido dos poliquetos expostos a células tóxicas de *Microcystis*, bem como no tecido dos peixes alimentados com poliquetos contaminados, indicando uma transferência do poliqueto para o peixe. Apesar de ter sido observada a ocorrência de microcistinas no tecido dos peixes controle (alimentados com ração comercial) e dos peixes alimentados com poliquetos não-contaminados, os valores foram significativamente mais baixos que nos peixes alimentados com poliquetos contaminados.

Uma vez que foi observado um acúmulo de $0,698 \mu\text{g.g}^{-1}$ de microcistina no tecido dos poliquetos (peso seco), e que 0,05g de poliqueto liofilizado era adicionado diariamente em cada recipiente contendo 5 peixes, indica que aproximadamente $0,0365 \mu\text{g}$ de toxina (contida no poliqueto) era oferecida aos 5 peixes. Se considerarmos (hipoteticamente) que os peixes comeram quantidades iguais de poliquetos, significa que eles estariam ingerindo uma quantidade de $0,0073 \mu\text{g}$ de microcistinas por dia, o que levaria a um valor de $0,044 \mu\text{g}$ ao final de 6 dias. Uma vez que o valor médio de microcistinas encontrado no tecido dos peixes ao final de 6 dias de exposição foi de

0,006 $\mu\text{g MC.g}^{-1}$ (peso seco), significa que aproximadamente 13,% da toxina total oferecida foi acumulada no tecido dos peixes.

É importante lembrar que os organismos apresentam um sistema de detoxificação através de enzimas, como a GST, que catalisa a conjugação da microcistina com a GSH, para que a toxina seja eliminada (Pflugmacher, 2004). Quando os organismos não conseguem depurar toda a toxina ingerida, esta ficará acumulada nos tecidos, tornando-se disponível ao nível trófico seguinte. Assim, quando pequenas quantidades são transferidas de um nível trófico a outro, o efeito tóxico pode ser potencializado.

4.6. CONCLUSÃO

O presente trabalho mostra uma bioacumulação de microcistina ao longo de dois níveis tróficos da cadeia alimentar. Peixes alimentados com poliquetos contaminados com microcistinas apresentaram acúmulo de aproximadamente 13% da toxina em seus tecidos. Os resultados indicam que muitos animais podem entrar em contato com a toxina através de outros organismos contaminados, tendo o efeito tóxico potencializado pela transferência na cadeia trófica.

CAPÍTULO V

-Considerações Finais e Perspectivas Futuras-

5.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A carga orgânica gerada pela ação antropogênica tem promovido a ocorrência de florações de cianobactérias na Lagoa dos Patos. Diversas florações contendo a espécie tóxica *Microcystis aeruginosa*, vêm sendo observadas nesse ambiente, com a ocorrência de microcistinas desde baixas concentrações (traços) até concentrações elevadas (44 mg.L⁻¹).

O poliqueto *L. acuta* é considerado como um importante bioindicador de efeitos biológicos na Lagoa dos Patos. Sua abundância ambiental, com frequência de ocorrência durante o ano todo, além das características bioquímicas e fisiológicas frente a diversos poluentes, fazem desse organismo uma importante ferramenta para estudos ecotoxicológicos (Geracitano *et al.*, 2004).

Os efeitos tóxicos das microcistinas sobre os organismos vêm sendo observados em diversos estudos. As microcistinas são hepatotoxinas conhecidas por inibir as enzimas PP1 e PP2 e por gerarem estresse oxidativo em diferentes organismos, como macrófitas aquáticas, caranguejos e peixes (Pflugmacher, 2004; Dewes *et al.*, 2006, Pietro *et al.*, 2006). No presente estudo foi observada a geração de estresse oxidativo induzido por microcistinas no poliqueto *L. acuta*, observado pelos altos níveis de lipídios peroxidados, no grupo exposto a células liofilizadas de *Microcystis*. Além disso, foram observados altos níveis de conjugados DNA-proteína, que apesar de não ser um dano exclusivamente oxidativo, evidencia a capacidade genotóxica das microcistinas.

O estresse oxidativo gerado pelas microcistinas provavelmente é devido à falta de resposta das enzimas antioxidantes, observada no capítulo I, além das alterações no consumo de oxigênio, observado no capítulo II. Uma vez, que as microcistinas provocam alterações no consumo de O₂ e redução das concentrações de GSH (detoxificação da toxina), a falta de resposta das enzimas relacionadas ao SDA diante da presença das microcistinas agrava o estado de estresse oxidativo, gerando danos.

Diversos compostos tóxicos presentes no meio ambiente, podem provocar alteração comportamentais nos organismos ali presentes. Mudanças no comportamento estão geralmente associadas com efeitos neurotóxicos de compostos tóxicos, como diversos tipos de pesticidas e cianotoxinas. Algumas neurotoxinas levam a perda da motilidade e outras, podem levar a um superestímulo nervoso (Carmichael, 1994; Monserrat & Bianchini, 2001, Bushnell and Moser, 2006, Kirkpatrick *et al.*, 2006, Shepherd *et al.* 2006). Foi observado no presente estudo uma perda da motilidade dos poliquetos expostos a células liofilizadas de *Microcystis*, a qual foi recuperada (parcialmente) após exposição à eserina. Isso indica um possível efeito neurotóxico, pois os organismos expostos a água sem eserina (após exposição às cianobactérias) não recuperaram a motilidade.

O efeito clássico e bem conhecido gerado pelas microcistinas é a inibição da atividade das enzimas PP (Carmichael, 1994). No presente estudo foi observada uma redução da atividade das enzimas PP nos organismos expostos a células de *Microcystis*. Uma vez que as PP são enzimas responsáveis pela regulação da fosforilação protéica, são essenciais nas vias

de sinalização celular. Essa inibição enzimática leva a uma hiperfosforilação protéica, provocando uma desordem dos componentes do citoesqueleto, entre vários outros efeitos (Syversen *et al.*, 1984; Scapigliati *et al.*, 1988, Eriksson *et al.*, 1990). A inibição da atividade das PP provavelmente está associada com a perda da motilidade dos organismos através de alterações funcionais das células nervosas.

Alguns trabalhos vêm mencionando a possibilidade das microcistinas serem acumuladas nos tecidos de organismos aquáticos e, dessa forma, serem transferidas na cadeia trófica (Christoffersen, 1996a; Ibelings & Chorus, 2007). Efeitos tóxicos gerados pelas microcistinas têm sido observados em organismos de diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar, desde zooplâncton herbívoros (que se alimentam das microalgas tóxicas) até peixes que se alimentam de outros organismos expostos à toxina, indicando uma possível bioacumulação ao longo da cadeia trófica (Christoffersen, 1996a).

No presente estudo foi observada a acumulação de microcistinas no poliqueto *L. acuta*, assim como foi observada a transferência de microcistinas do poliqueto para o peixe *J. multidentata*, mostrando que os organismos podem entrar em contato com essa toxina sem estarem expostos diretamente.

O estresse gerado nos poliquetos expostos as células de *Microcystis*, associado à perda da motilidade, faz com que os organismos se tornem alvos fáceis de predadores. Assim, o estresse induzido pela presença das microcistinas associado com efeitos clássicos, como a inibição das PP, provocando perda da motilidade, pode levar a consequências ecologicamente importantes. Uma vez que foi observado que as microcistinas podem ser

acumuladas nos tecidos dos poliquetos, esses organismos se tornam vetores dessa toxina, transferindo-as para os níveis tróficos seguintes.

Os efeitos gerados pelas microcistinas observados no presente estudo indicam que não somente o acúmulo de microcistinas nos tecidos deve ser analisado, mas também possíveis efeitos bioquímicos e fisiológicos, com o objetivo de avaliar os riscos toxicológicos para as populações expostas a essas toxinas.

5.2. PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo mostra a necessidade de maiores conhecimentos com relação aos efeitos das microcistinas nos organismos expostos, bem como nas comunidades afetadas.

A formação de conjugados DNA-proteína induzida por microcistinas é um fato inédito. Isso mostra a necessidade de maiores investigações para se determinar como as microcistinas induzem a geração desse tipo de dano.

O efeito das microcistinas sobre a motilidade, indicando um possível efeito neurotóxico, ainda é muito prévio, e necessita de maiores estudos.

Não existem informações de pesquisa científica sobre a transferência de microcistinas de um nível trófico a outro. Assim, maiores estudos precisam ser realizados com essa abordagem, enfatizando os efeitos da toxina nos diferentes níveis tróficos à medida que é transferida ao longo da cadeia alimentar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abele-Oeschger, D. & Oeschger, R. (1995). Hypoxia-induced autoxidation of haemoglobin in the benthic invertebrates *Arenicola marina* (Polychaeta) and *Astarte borealis* (Bivalvia) and the possible effects of sulphide. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 187 (1): 63-80
- Amorim, A & Vasconcelos, V. (1999). Dynamics of Microcystins in the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*, 37: 1041-1052.
- Azevedo, S. M. F. O.; Evans, W. R.; Carmichael, W. W. & Namikochi, M. (1994). First Report of Microcystins from Brazilian Isolate of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology*, 6: 261-265.
- Baganz, D.; Staaks, G. & Steinberg, C. (1998). Impact of the Cyanobacteria Toxin, Microcystin-LR on Behaviour of Zabrash, *Danio rerio*. *Water Research*, 32(3): 948-952.
- Bainy, A. C. D; Saito, E.; Carvalho, P. S. M. & Junqueira, V. B. C..(1996). Oxidative stress in gill, erithrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquatic Toxicology*, 34: 151-162.
- Barker, S.; Murray, D.; Zheng, J.; Li, L. & Weinfeld, M. (2005). A method for the isolation of covalent DNA–protein crosslinks suitable for proteomics analysis. *Analytical Biochemistry*, 344 (2): 204-215

- Bartram, J.; Carmichael, W. W.; Jones, G. & Skulberg, O. M. (1999). Introduction. In: Chorus, I. & Bartram, J. (Eds). *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. WHO, E. & FN Spon, London: 1-14.
- Batista, T.; Sousa, G.; Suput, J. S.; Rahmani, R. & Suput, D. (2003). Microcystin-LR causes the collapse of actin filaments in primary human hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 65: 85-91
- Baumgarten, M. G. Z. (1987). Avaliação de *Balanus improvisus* como Indicador dos Níveis Metálicos do Estuário da Lagoa dos Patos (RS – Brasil). Tese (Mestrado) – Pós Graduação em Oceanografia Biológica – FURG, 187p.
- Baumgarten, M. G. Z. & Niencheski, L. F. (1990) Avaliação da Capacidade Bioindicadora de *Balanus improvisus* para os Metais Chumbo, Cobre e Manganês presentes no Estuário da Lagoa dos Patos (RS-Brasil). *Atlântica*, 12 (2): 5-19.
- Baumgarten, M. G. Z. & Niencheski, L. F. (1998). Avaliação da qualidade hidroquímica da área portuária da cidade do Rio Grande (RS). *Documentos técnicos – Oceanografia* 9, 66p.
- Beasley, V. R.; Dahlem, A. M.; Cook, W. O.; Valentine, W. M.; Lovell, R. A.; Hooser, S. B.; Harada, K.; Suzuki, M. & Carmichael, W. W. (1989) Diagnostic and clinically important aspects of cyanobacterial (blue-green algae) toxicoses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1 (4): 359–365.

- Bemvenuti, C. E. (1998a). Fluxo de energia e habitats no estuário da Lagoa dos Patos: Estrutura trófica. *In: Os ecossistemas costeiros e marinho do extremo sul do Brasil*. Seeliger, U.; Odebrecht, C; Castello, J. (Eds). Editora Ecoscientia, Rio Grande, 341p.
- Bemvenuti, C. E. (1998b). O ambiente e a biota do estuário da Lagoa dos Patos: Estrutura trófica. *In: Os ecossistemas costeiros e marinho do extremo sul do Brasil*. Seeliger, U.; Odebrecht, C; Castello, J. (Eds). Editora Ecoscientia, Rio Grande, 341p.
- Best, J. H.; Eddy, F. B. & Codd, G. A. (2003). Effects of *Microcystis* Cells, Cell Extracts and Lipopolysaccharide on Drinking and Liver function in Rainbow Trout *Onchorhynchus mikiss* Walbaum. *Aquatic toxicology*, 64: 419-426.
- Beutler, E. (1975). The preparation of red cells for assay. *In: Beutler, E. (Ed.) Red cell metabolism: A manual of biochemical methods*. Grune & Straton, New York, 8-18.
- Blom, J. F. & Jüttner, F. (2005). High crustacean toxicity of microcystin congeners does not correlate with high protein phosphatase inhibitory activity. *Toxicon*, 46 (4): 465-470.
- Botha, N.; Gehringer, M. M.; Downing, T. G.; Venter, M. V. & Shephard, E. G. (2004). The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo2 cells. *Toxicon*, 43: 85-92.
- Bouaicha, N. & Maatouk, I. (2004). Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathionealteration, reactive oxygen species production and lipidperoxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicology Letters*, 148: 53-63

- Bushnell, P. J. & Moser, V. C. (2006). Chapter 24 - Behavioral Toxicity of Cholinesterase Inhibitors. *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds*, pp: 347-360
- Carbonell, G. V.; Falcón, R.; Yamada, A. T.; Fonseca, D. A. L. & Yano, T. (2004). Morphological and intracellular alterations induced by *Serratia marcescens* cytotoxin. *Research in Microbiology*, 155 (1): 25-30.
- Carmichael, W. W. (1992). A status report on planktonic cyanobacteria (blue-green algae) and their toxins. *Journal of applied bacteriology*, 72: 445-459.
- Carmichael, W. W. (1994). The Toxins of Cyanobacteria. *Scientific America*, 270:64-72.
- Carmichael, W. W. & Schwartz, L. D. (1984). Preventing livestock deaths from blue-green algae poisoning. *Farmers Bulletin 2275*, Washington, DC: US Dept. of Agriculture.
- Carmichael, W. W. & Falconer, I. R. (1993). Diseases Related to Freshwater Blue-Green Algal Toxins, and Control Measures. *Algal Toxins in Seafood Drinking Water*. Academic Press. Ltd.
- Castello, J. P. (coord.). (1978). *Projeto Lagoa*. Relatório do 1º ao 15º Cruzeiro, Fundação Universidade do Rio Grande, B. O. A., Sér. Rel., pp: 1-9.
- Cazenave, J.; Wunderlin, D. A.; Bistoni, M. L. A; Amé, M. V.; Krause, E.; Pflugmacher, E. & Wiegand, C. (2005). Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*: A field and laboratory study. *Aquatic Toxicology*, 75 (2): 178-190

- Cazenave, J.; Nores, M. L.; Miceli, M.; Díaz, M. P.; Wunderlin, D. A. & Bistoni, M. A. (2008). Changes in the swimming activity and the glutathione S-transferase activity of *Jenynsia multidentata* fed with microcystin-RR. *Water Research*, 42: 1299 – 1307
- Chen, Y-M.; Lee, T-H; Lee; S-J.; Huang, H-B.; Huang; R. & Chou, H-N. (2006). Comparison of protein phosphatase inhibition activities and mouse toxicities of microcystins. *Toxicon*, 47: 742–746
- Chorus, I. (1993). Algal Metabolites and Water Quality: Toxins, Allergens, and Test-and-Odor-Substances. *Memorie dell Istituto Italiano di Idrobiologia. International Journal of Limnology*, 52: 257-280.
- Chorus, I. (1998). Die Blaualgen (“Cyanobakterien”) – Eine Berliner Besonderheit Welcher Zusammenhang Zwischen dem Massenhaften Auftreten vom Blaualgen und der Nutzung vom Badegewässern? In: Nachhaltigkeit in Wasserweswn in der Mitte Europas, Symposium Berlin (D).
- Christoffersen, K. (1996a). Ecological Implications of Cyanobacterial Toxins in Aquatic Food Webs. *Phycologia*, 35: 42-50.
- Christoffersen, K. (1996b). Effect of Microcystin on Growth of Single Species and on Mixed Natural Populations of Heterotrophic Nanoflagellates. *Natural Toxins*, 4: 215-220.
- Cima, F.; Ballarin, L.; Bressa, G. & Burighel, P. (1998). Cytoskeleton Alterations by Tributyltin (TBT) in Tunicate Phagocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 40: 160-165.
- Clark, L. C. Jr. (1956). Monitor and control of blood and tissue organ tensions. *Transactions - American Society for Artificial Internal Organs*, 2: 41-57.

- Cohen, P. (2000) The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25 year update. *Trends in Biochemical Sciences*, 12: 596–601.
- Devlin, J. P.; Edwards, O. E.; Gorham, P. R., Hunter, N. R.; Pike, R. K. & Stavrich, B. (1977). Anatoxin-a a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44 th. *Canadian Journal of Chemistry*,. 55:1367-1371.
- Dewes, L. J.; Sandrini, J. Z.; Monserrat, J. M. & Yunes, J. S. (2006). Biochemical and physiological responses after exposure to microcystins in the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Brachyura). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65: 201–208
- Ding, W-X & Ong, C. N. (2003). Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEMS Microbiology Letters*, 220: 1-7
- Dokulil, M.; Chen W. & Cai, Q. (2000). Anthropogenic Impacts to Large Lakes in China: The Tai Hu Example. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 3: 81-94.
- Eler, M. N.; Ceccarelli, P. S.; Bufon, A. G. M.; Espíndola & E. L. G. (2001). Mortandade de Peixes (Matrinxã, *Brycon cephalus*, e Pacu, *Piaractus mesopotâmicus*) Associada a uma floração de Cianobactérias em Pesque-Pague, Município de Descalvado, Estado de São Paulo, Brasil. *Boletim Técnico do CEPTA, Pirasununga*, 14: 35-45.
- Eriksson, J. E., Gronberg, L., Nygard, S., Slotte, J. P. & Meriluoto, J. A. O. (1990). Hepatocellular uptake of ^3H -dihydromicrocystin-LR a cyclic hepatotoxin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1025: 60–66

- Ernst, B.; Hoeger, S. J.; O'Brien, E. & Dietrich, D. R. (2006). Oral toxicity of the microcystin-containing cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in European whitefish (*Coregonus lavaretus*). *Aquatic Toxicology*, 79 (1): 31-40.
- Falconer, I. R. (1991). Tumor Promotion and Liver Injury Caused by Oral Consumption of Cyanobacteria. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 6: 177-184.
- Falconer, I. R. (1993). Mechanism of Toxicity of Cyclic Peptide Toxins from Blue-Green Algae. In: *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. FALKONER, I. R. (Ed). Academic Press, London, pp. 177-186.
- Falconer, I. A. (1999). An Overview of Problems Caused by Toxic Blue-Green Algae (Cyanobacteria) in Drinking and Recreation Water. *Environment Toxicology*, 14(1): 5-12.
- Fastner, J.; Neumann, U.; Wirsing, B.; Wecksser, J.; Wiedner, C.; Nixdorf, B. & Chorus, I. (1999). Microcystin (Hepatotoxic Heptapeptides) in German Fresh Water. *Environmental Toxicology*, 14: 13-22.
- Ferrão-Filho, A. da S.; Kozlowsky-Suzuki, B. & Azevedo, S. M. F. O. (2002). Accumulation of Microcystins by a Tropical Zooplankton Community. *Aquatic Toxicology*, 59: 201-208.
- Franchini, A.; Marchesini, E.; Poletti, R. & Ottavian, E. (2004). Acute toxic effect of the algal yessotoxin on Purkinje cells from the cerebellum of Swiss CD1 mice. *Toxicon*, 43: 347-352
- Fujiki, H. (1992). Is the inhibition of Protein Phosphatase 1 and 2A activities a general mechanism of tumor promotion in human cancer development? *Molecular Carcinogenesis*, 5: 91-94.

- Funari, E. & Testai, E. (2008). Human Health Risk Assessment Related. *Critical Reviews in Toxicology*, 38: 97-125.
- Geracitano, L. A.; Monserrat, J. M.; Bainy, A. C. D. & Bianchini, A. (2001). Avaliação do estresse oxidativo em *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereidae): Condições de manutenção dos animais em laboratório In: *Ecotoxicologia: Perspectivas para o Século XXI* ed.São Carlos : RiMa, pp. 129-145.
- Geracitano, L.; Monserrat, J. M. & Bianchini, A. (2002). Physiological and antioxidant enzyme responses to acute and chronic exposure of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereidae) to copper. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 277: 145-156.
- Geracitano, L. A., Monserrat, J. M. & Bianchini, A. (2004a). Oxidative stress in *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae): environmental and seasonal effect. *Marine Environmental Research*, 58 (2-5): 625 – 630.
- Geracitano, L. A., Bocchetti, R., Monserrat, J. M., Regoli, F. & Bianchini, A. (2004b). Oxidative stress responses in two populations of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) after acute and chronic exposure to copper. *Marine Environmental Research*, 58 (1): 1 - 17.
- Gilbert, J. J. (1996). Effect of Temperature on the Response of Planktonic Rotifers to a Toxic Cyanobacterium. *Ecology* 77 (4): 1174-1180.
- Gregor, J. & Marsálek, B. (2004). Freshwater Phytoplankton Quantification by Chlorophyll a: A Comparative Study of in Vitro, in Vivo and in Situ Methods. *Water Research*, 38: 517-522.

- Gómez-Mendikute, A. & Cajaraville, M. P. (2003). Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicology in Vitro*, 17: 539–546
- Habig, W. H., Pabst, M. J. & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-Transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Biologic Chemistry*, 249: 7130-7139.
- Habig, W. H. & Jakoby, W. B. (1981). Assays for differentiation of glutathione S-transferase. *Methods in Enzymology*, 77: 398-405.
- Halliwell, B & Gutteridge, J. M. C. (1999). Free radical in biology and medicine. Editora Oxford University Press. 936p.
- Hermes-Lima, M.; Willmore, W. G. & Storey, K. B. (1995). Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylene orange complex formation. *Free Radicals in Biology & Medicine*, 19: 271-280.
- Hooser, S. B.; Beasley, V. R.; Waite, L. L.; Kuklenschmidt, M. S.; Carmichael, W. W. & Haschek, W. M. (1991). Actin filament alterations in rat hepatocytes induced *in vivo* and *in vitro* by microcystin-LR, a hepatotoxin from the blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. *Veterinary Pathology*, 28: 259-266.
- Ibelings, B. W. & Chorus, I. (2007). Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: A review. *Environmental Pollution*, 150 (1): 177-192.
- Ihering, H. (1885). Die Lagoa dos Patos. *Deutsche Geographische Blätter*, Bremen, Deutschland

- Jochimsen, E. M.; Carmichael, W. W.; An, J.; Cardo, D. M.; Cookson, S. T.; Holmes, C. E. M.; Antunes, M. B. C.; Filho, D. A. M.; Lyra, T. M.; Barreto, V. S. T.; Azevedo, S. M. F. O. & Jarvis, W. R. (1998). Liver Failure and Death after Exposure to Microcystis at a Haemodialysis Center in Brazil. *New England Journal Medicine*, 338(13): 873-878.
- Kantin, R. (1983). Hydrologie et qualité des eaux de la region sud de la Lagune dos Patos (Brasil) et de la plataforma continental adjacente. Tese de Doutorado. Universidade de Bordeaux, França, 185 p.
- Kirkpatrick, A. J.; Gerhardt, A.; Dick, J. T. A.; McKenna, M. & Berges, J. A. (2006). Use of the multispecies freshwater biomonitor to assess behavioral changes of *Corophium volutator* (Pallas, 1766) (Crustacea, Amphipoda) in response to toxicant exposure in sediment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64: 298–303.
- Kiviranta, J.; Abdel-Hameed, A.; Sivonem, K.; Niemelä, S. I. & Carlberg, G. (1993). Toxicity of Cyanobacteria to Mosquito Larvae-Screening of Active Compounds. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 8: 63-71.
- Kolthoff, I. M. & Lingane, J. J. (1952). Polarography, vol. I, II. Interscience, N.Y and London.
- Kono, Y. & Fridovich, I. (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 257 (10): 5751-5754.
- Kujbida, P. Hatanaka, E.; Campa, A.; Curi, R.; Farsky, S. H. P. & Pinto, E. (2008). Analysis of Chemokines and Reactive Oxygen Species Formation by Rat and Human Neutrophils Induced by Microcystin-LA, -YR and -LR. *Toxicon*, 51: 1274-1280.

- Lagos, N.; Liberona, J. L.; Andrinolo, D.; Zagatto, P. A.; Soares, R. M. & Azevedo, S. M. F. O. (1999). First evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* isolated from Brazil. *Toxicon*, 37 (10): 1359-1373.
- Leão, J. C. (2004). Bioacumulação de microcistinas em filtradores nativos do estuário e costa adjacente da Lagoa dos Patos. Tese (Mestrado) – Pós-Graduação Oceanografia Biológica – Fundação Universidade Federal do Rio Grande 93p.
- Leão, J. C.; Geracitano, L. A.; Monserrat, J. M.; Amado, L. L. & Yunes, J. S. (2008) Microcystin-Induced Oxidative Stress in *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae). *Marine Environmental Research*. 66: 92-94.
- Li, X. Y.; Chung, I. K.; Kim, J. I. & Lee, J. A. (2004). Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions, *Toxicon* 44: 821–827.
- Mackintosh, C.; Beattie, K. A.; Klumpp, S.; Cohen, P. & Codd, G. A. (1990). Cyanobacterial Microcystin-LR is a Potent and Specific Inhibitor of Protein Phosphatases 1 and 2A from Both Mammals and Higher Plants. *FEBS Letters*, 264(2): 187-191.
- Magalhaes, V. F.; Marinho, M. M.; Domingos, P.; Oliveira, A. C.; Costa, S. M.; Azevedo, L. O. & Azevedo, S.M.F.O. (2003). Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ), *Toxicon*, 42: 289–295.

- Mai, A. C.; Garcia, A. M. & Vieira, J. P. (2006). Ecologia Alimentar do Barrigudinho *Jenynsia multidentata* (Jenys, 1842) (Pisces, Cyprinodontiforme) no estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil. *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS. Série Zoologia*, Porto Alegre, pp: 3-18.
- Maidana, M.; Carlis, V.; Galhardi, F. G.; Yunes, J.S.; Geracitano, L.; Monserrat, J. M. & Barros, D.M. (2006). Effects of microcystins over short- and long-term memory and oxidative stress generation in hippocampus of rats. *Chemico-Biological Interactions*, 159: 223-234
- Malbrouck, C.; Trausch, G.; Devos, P. & Kestemont, P. (2004). Effect of microcystin-LR on protein phosphatase activity in fed and fasted juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Toxicon*, 43: 295-301.
- Malleret, G.; Haditsch, U.; Genoux, D.; Jones, M. W.; Bliss, T. V. P.; Vanhoose, A. M.; Weitlauf, C.; Kandel, E. R.; Winder, D. G. & Mansuy, I. M. (2001). Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell* 104, 675–686.
- Matsunaga, S.; Moore, R. E.; Miezcza, W. P. & Carmichael, W. W. (1989). Anatoxin-a(s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. *Journal of American Chemical Society*. 111: 8021-8023.
- Matthiensen, A. (1996). Ocorrência, Distribuição e Toxicidade de *Microcystis aeruginosa* (Kutz. Emend. Elenkin.) no Estuário da Lagoa dos Patos. Tese (Mestrado) – Pós-Graduação em Oceanografia Biológica – FURG, 117p.

- Matthiensen, A.; Beattie, K. A.; Yunes, J. S.; Kaya, K. & Codd, G. A. (2000). [D-Leu¹]Microcystin-LR, from the cyanobacterium *Microcystis* RST 9501 and from a *Microcystis* bloom in the Patos Lagoon estuary, Brazil *Phytochemistry*, 55:383-387.
- McCord, J. M. & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythocuprein (hemocuprein). *Journal of Biologic Chemistry*, 244: 6049-6055.
- Metcalf, J. S. & Codd, G. A. (2004). Cyanobacterial Toxins in the Water Environment. A review of current knowledge. Foundation for Water Research, Marlow, UK. 36p.
- Milner, B.; Squire, L.R. & Kandel, E.R. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, 20(3): 445-468.
- Mohamed, Z. A. (2001). Accumulation of Cyanobacterial Hepatotoxins by *Daphnia* in Some Egyptian Irrigation Canals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 50:4-8.
- Monserat, J. M. & Bianchine, A. 2001. Anticholinesterase Effect of Eserine (Physostigmine) in Fish and Crustacean Species. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 44(1): 63 – 68.
- Monserat, J. M.; Geracitano, L. A; Pinho, G. L. L.; Vinagre, T. M.; Faleiros, M.; Alciani, J. C. & Bianchini, A. (2003). Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe(III) xylene orange complex formation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45 (2): 177-183.

- Montagnolli, W.; Zamboni, A.; Luvizotto-Santos, R. & Yunes, J. S. (2004). Acute Effects of *Microcystis aeruginosa* from the Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil, on the Microcrustacean *Kalliapseudes schubartii* (Crustacea: Tanaidacea). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46: 463-469.
- Monteiro, N. J. C. (2001). Estudo da Toxicidade da Cepa de *Microcystis aeruginosa* RST9501 da Lagoa dos Patos sobre Cladoceras. Tese (Mestrado) – Pós-Graduação em Ecologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 174p.
- Moretto, M. B.; Funchal C.; Zeni G.; Rocha, J. B. T. & Pessoa-Pureur, R. (2005). Organoselenium compounds prevent hyperphosphorylation of cytoskeletal proteins induced by the neurotoxic agent diphenyl ditelluride in cerebral cortex of young rats. *Toxicology*, 210: 213–222
- Munton, R. P.; Vizi, S. & Mansuy I. M. (2004). The role of protein phosphatase-1 in a modulation of synaptic and structural plasticity. *FEBS Letters*. 567: 121-128.
- Mur, L. C.; Skulberg, O. M. & Utkilen, H. (1999). Cyanobacteria in the Environment. In: Chorus, I. & BARTRAN, J. (Eds). *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. WHO, E. & FN Spon, London: 15-40 .
- Nagalakshmi, N. & Prasad, M. N. V. (2001). Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress In: *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Science*, 160 (2): 291-299.

- Nagata, S.; Tsutsumi, T.; Hasegawa, A.; Yoshida, F.; Ueno, Y. & Watanabe, M. F. (1997). Enzyme Immunoassay for direct determination of microcystins in environmental water. *Journal of AOAC International*, 80: 408-417.
- Niencheski L. F., Windom H. L. & Smith R. (1994) Distribution of particulate trace metal in Patos Lagoon Estuary (Brazil). *Marine Pollution Bulletin*, 28: 96–102
- Nishiwaki-Matsushima, R.; Ohta, T.; Nishiwaki, S.; Sugunuma, M.; Kohyama, K.; Ishikawa, T.; Carmichael, W.W. & Fujiki, H. (1992). Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 118:420-424.
- Pearson, M. J. (1990). Toxic Blue-Green Algae. National Rivers Authority – Water Quality Series 2.
- Pflugmacher S. (2004). Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Aquatic Toxicology*, 70: 169–178
- Pietro, A. I.; Jos, A.; Pichardo, S.; Moreno, I. & Cameán, A. M. (2006). Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*). *Aquatic Toxicology*, 77: 314–321
- Pinho, G. L. L.; Rosa, C. M.; Maciel, F. E.; Bianchini, A.; Yunes, J. S.; Proença, L. A. O. & Monserrat, J. M. (2005). Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61: 353–360

- Reinikainen, M.; Ketola, M.; Jantunen, M. & Walls, M. (1995). Effects of *Microcystis aeruginosa* exposure and Nutritional Status on Reproduction of *Daphnia pulex*. *Journal of Plankton Research*, 17(2): 431-436.
- Reynolds, C. S. (1987). Cyanobacterial Water-Blooms. *Advances in Botanical Research*. Vol. 13. Academic Press Inc. (London) Ltd.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. & Stanier, R. Y. (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *The Journal of general and applied microbiology*, 111: 1-61.
- Rosa, C. E.; Souza, M. S.; Yunes, J. S.; Proença, L. A. O; Nery, L. E. M. & Monserrat, J. M. (2005). Cyanobacterial blooms in estuarine ecosystems: Characteristics and effects on *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae). *Marine Pollution Bulletin*, 50: 956–964
- Rudolf, E.; Cervinka, M.; Cerman, J. & Schroterova, L. (2005). Hexavalent chromium disrupts the actin cytoskeleton and induces mitochondria-dependent apoptosis in human dermal fibroblasts. *Toxicology in Vitro*, 19: 713–723
- Runnegar, M. T. C. & Falconer, I. R. (1986). Effects of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. *Toxicon*, 24: 109-115.
- Scapigliati, G., Rappuoli, R., Silvestri, S., & Pallini, V. (1988). Cytoskeletal alterations as a parameter for assessment of toxicity. *Xenobiotica*, 18: 715-724.

- Schreck, C. B.; Olla, B. L. & Davis, M. W., (1997). Behavioral responses to stress. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds.), *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 145–170.
- Schoenfeld, H. A. & Witz, G. (1999). DNA-protein cross-link levels in bone marrow cells of mice treated with benzene or trans, trans-muconaldehyde. *Journal of toxicology and environmental health*, 56 (6): 379-395.
- Schopf, J. W. & Walter, M. R. (1982). Origin and Early Evolution of Cyanobacteria: The Geological Evidence. In: Carr, N. G. & Whitton, B. A. *The Biology of Cyanobacteria*. Blackwell Scientific Publications.
- Scott, G. R. & Sloman, K. A., (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology*, 68: 369–392
- Shepherd, K. R; Lee, E-S Y; Schmued, L.; Jiao, Y; Ali, S. F.; Oriaku, E. T; Lamango, N. S.; Soliman, K. F. A. & Charlton, C. G. (2006). The potentiating effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on paraquat-induced neurochemical and behavioral changes in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 83 (2006) 349–359.
- Sivonen, K. & Jones, G. (1999) Cyanobacterial Toxins. In: Chorus, I. & Bartram, J. (Eds). *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. WHO, E. & FN Spon, London: 41-111.

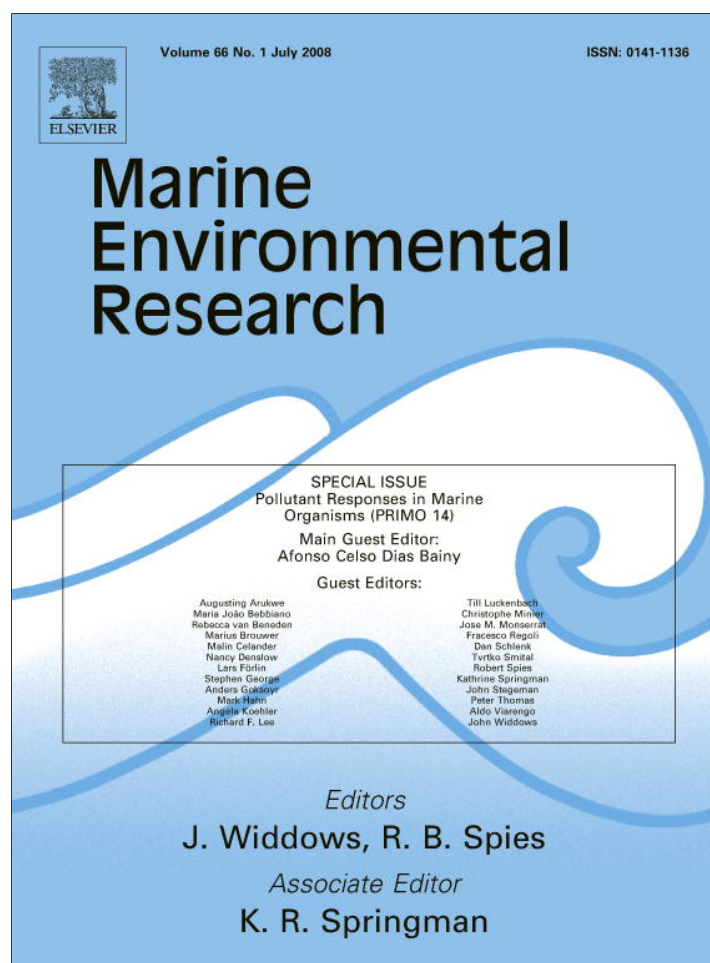
- Smith, G. D.; Wolf, D. P.; Trautman, K. C.; Cruz e Silva, E. F.; Greengard, P. & Vijayaraghavan, S. (1996). Primate Sperm Contain Protein Phosphatase 1, a Biochemical Mediator of Motility. *Biology of Reproduction*, 54: 719-727.
- Storey, K. B. (1996). Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical & Biological Research*, 29:1715-1733.
- Swope, S. L.; Moss, S. J.; Raymond, L. A. & Huganir, R. L. (1999). Regulation of ligandgated ion channels by protein phosphorylation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Research*, 33: 49-78.
- Syversen, T. L. M., Sager, P. R., Clarkson, T. W., Cavanagh, J. B., Elgsaeter, A., Guldborg, H. C., Lee, S. L., Lichtman, M. A., Mottet, N. K. & Olmsted, J. B. (1984). The cytoskeleton as a target for toxic agents. In *the Cytoskeleton: A Target for Toxic Agents* (T. W. Clarkson, P. R. Sager, and T. L. M. Syversen, Eds.) pp: 25-34. *Rochester Series on Environmental Toxicity*, Plenum Press, New York.
- Taylor, P. & Brown, J. H. (2006). Acetylcholine. In: *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects*. (George Siegel, R.Wayne Albers, Scott Brady, Donald Price Eds). 7^o ed. Elsevier Academic Press, pp: 185-209.
- Tencalla, F. & Dietrich, D. (1997). Biochemical Characterization of Microcystin Toxicity in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Toxicon*, 35 (4): 583-595.
- Vasconcelos, V. M. (1995). Uptake and Depuration of the Hepatotoxin Microcystin-LR in *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 32: 227-237.
- WHO (2003). Guidelines for Safe Recreational Water environment,— Coastal and Freshwaters. vol 1, 220p.

- Weng, D., Lu, Y., Wei, Y., Liu, Y. & Shen, P., (2007). The role of ROS in microcystin-LR-induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice. *Toxicology*, 232: 15–23.
- Wiegand, C. & Pflugmacher, S. (2005). Ecotoxicological Effects of Selected Cyanobacterial Secondary Metabolites a Short Review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203: 201-218.
- Wilson, A. K.; Takai, A.; Ruegg, J. C. & Lanerolle, P. (1991). Okadaic acid, a phosphatase inhibitor, decreases macrophage motility. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 260: 105-112
- Xie, L.; Xie, P.; Li, S.; Tang, H. & Liu, H. (2003). The Low TN:TP Ratio, a Cause or a Result of *Microcystis* Blooms? *Water Research*, 37: 2073-2080.
- Xie, L.; Yokoyama, A.; Nakamura, K & Park, H. (2007). Accumulation of microcystins in various organs of the freshwater snail *Sinotaia histrica* and three fishes in a temperate lake, the eutrophic Lake Suwa, Japan. *Toxicon*, 49 (5): 646-652.
- Yogui, G. T.; Salomon, P. S.; Yunes, J. S. & Wasielesky, W. J. (1998). Potencial Tóxico de *Microcystis aeruginosa* (Cianobacteria) sobre Juvenis de Camarão Rosa *Pennaeus paulensis* (Crustaceae: Decapoda). In: XI Semana Nacional de Oceanografia (Rio Grande, RS): Oceanografia e suas Interfaces – Pelotas: Universitária/UFPel. 709p.
- Yunes, J. S. & Melo, S. R. (1987). Cianofíceas Fixadoras de Nitrogênio do Estuário da Lagoa dos Patos, RS: Testes de Cultivo em Laboratório. *Nerítica*, Pontal do Sul, PR, 2(supl.): 159-170.

- Yunes, J. S.; Solomon, P. S.; Matthiensen, A.; Beattie, K. A.; Raggett, S. L. & Codd, G. A. (1996). Toxic Blooms of Cyanobacteria in the Patos Lagoon estuary, Southern Brazil. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 5: 223-229.
- Yunes, J. S.; Matthiensen, A.; Parise, M.; Salomón, P. S.; Raggett, S. L.; Beattie, K. A. & Codd, G. A. (1998). *Microcystis aeruginosa* Growth Stages and the Occurrence of Microcystins in Patos Lagoon, Southern Brazil. Hamful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Comision of UNESCO. pp: 18-21.
- Zegura, B.; Sedmak, B. & Filipic, M. (2003). Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicon*, 41: 41–48.
- Zegura, B.; Lah, T. T. & Filipic, M. (2004). The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. *Toxicology*, 200: 59–68.
- Zegura, B., Lah, T.T. & Filipic, M., (2006). Alteration of intracellular GSH levels and its role in microcystin-LR-induced DNA damage in human hepatoma HepG2 cells. *Mutation Research*, 611: 25-33.
- Zhitkovich, A. & Costa, M. (1993). A simple, sensitive assay to detect DNA-protein crosslink in intact cells and in vivo. *Carcinogenesis*, 13(8):1485–1489.

ANEXOS

ANEXO 1



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Marine Environmental Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/marenvresMicrocystin-induced oxidative stress in *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae)J.C. Leão^a, L.A. Geracitano^b, J.M. Monserrat^b, L.L. Amado^b, J.S. Yunes^{a,*}^a Unidade de Pesquisa em Cianobactérias, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, Rio Grande/RS, Brazil^b Departamento de Ciências Fisiológicas, FURG, Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Rio Grande/RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Microcystin

Microcystis

Laeonereis

Oxidative stress

Lipid peroxidation

DNA–protein cross-link

ABSTRACT

Oxidative stress induced by microcystins was evaluated in an estuarine worm, *Laeonereis acuta* (Nereididae). Ten organisms were exposed to lyophilized cells of a toxic *Microcystis aeruginosa* strain RST9501 ($\approx 2 \mu\text{g/mL}$ microcystins, MC); 10 were exposed to lyophilized cells of a nontoxic *Aphanotece* sp. strain RSMAN92 and 10 were maintained without cyanobacterial cells. Exposure time was 48 h. The enzymatic antioxidant defenses, as well as the oxidative damage, were analyzed. Toxic and nontoxic cyanobacteria lowered catalase activity with no changes in glutathione reductase and glutathione-S-transferase activities. This may have led to toxin intracellular accumulation, which should favor oxidative stress generation, observed by the high lipid peroxide and DNA–protein crosslink levels in the group exposed to MC.

© 2008 Published by Elsevier Ltd.

Microcystins (MC), common cyanobacterial hepatotoxins, are known to inhibit PP1 and 2A enzymes and to induce oxidative stress in different organisms leading to cell damage (Pflugmacher, 2004; Pietro et al., 2006).

Anthropogenic pollution has promoted cyanobacterial toxic blooms in water bodies. Several blooms containing toxic *Microcystis aeruginosa* have occurred in the Patos Lagoon (Southern Brazil) over the last three decades with effects on the aquatic life. Physiological and behavioral changes with the death of some species have been observed; this fact may decrease the biodiversity (Yunes et al., 1998; Dewes et al., 2006).

The worm *Laeonereis acuta* has been regarded as an important bioindicator in the Patos Lagoon. Its environmental abundance and physiological characteristics, such as the ability to modulate its antioxidant defense system to several pollutants, make this worm an important tool for ecotoxicological studies (Geracitano et al., 2004).

The present study aimed to evaluate some antioxidant enzymatic parameters in *L. acuta* exposed to acute MC levels, as well as oxidative damage.

Cells of a toxic *M. aeruginosa* strain (RST 9501) were cultured and employed as a source of MC. Cells of a nontoxic cyanobacterium, *Aphanotece* sp. (RSMAN92), were cultured in parallel with *M. aeruginosa* cultures.

Specimens of *L. acuta* were collected in an unpolluted area of the Patos Lagoon and immediately transferred to the laboratory in an ice-cold box. After 4 days of acclimation in plastic boxes with

sand and water (10‰; pH 8.00), the worms were transferred to individual recipients (10 cm diameter) containing 50 mL water (10‰; pH 8.00) and 10 g sterilized sand at a fixed temperature (20 °C) and photoperiod (12L:12D).

Three groups ($n = 10$) were tested; the first one was exposed to lyophilized cells of toxic *M. aeruginosa* (2 mg/mL) reaching $\approx 2 \mu\text{g}$ MC/mL, the second one to lyophilized cells of the nontoxic cyanobacterium, *Aphanotece* sp. (2 mg/mL), and the third group was the control. All tests lasted 48 h.

According to Matthiessen et al. (2000), [D-Leu¹]MC-LR is the major MC variant produced by this *Microcystis* strain, and it presents an LD₅₀ value of 71 $\mu\text{g/kg}$ in mouse bioassay. In virtue of the MC concentrations used, the assays were considered acute.

For protein concentration and enzyme activity analysis, every organism was homogenized (20% w/v) in a buffer [Tris base (20 mM), EDTA (1 mM), dithiothreitol (1 mM, Sigma), sucrose (0.5 mM), KCl (150 mM); pH 7.6]. Samples were centrifuged at 9000g (4 °C) for 30 min and the supernatants employed as the enzyme source.

The following parameters were measured: activity of glutathione-S-transferase (GST) and catalase (CAT) (Geracitano et al., 2004); glutathione reductase (GR) (Nagalakshmi and Prasad, 2001); lipid peroxides levels (LPO) (Geracitano et al., 2004); and DNA–protein crosslink levels (Barker et al., 2005). Data were subjected to ANOVA ($\alpha = 0.05$).

After 48 h exposure, CAT activity was reduced ($p < 0.05$) whereas GST and GR activities had no difference when compared to the control group ($p > 0.05$; Fig. 1). Only the *Microcystis*-exposed group presented higher lipid peroxides and DNA–protein crosslink levels, when compared to the control group ($p < 0.05$; Fig. 2).

* Corresponding author. Tel./fax: +55 53 3233 6737.

E-mail address: jsyunes@furg.br (J.S. Yunes).

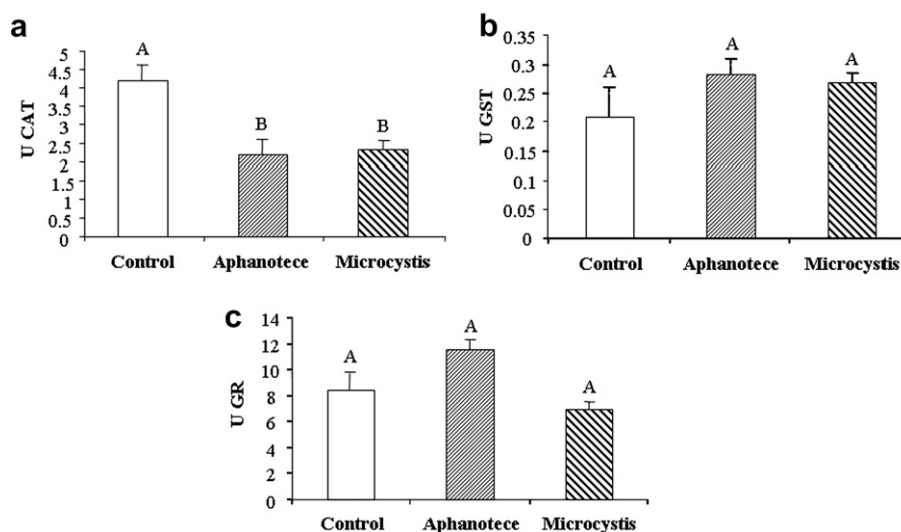


Fig. 1. Enzymatic activity after 48 h exposure to 2 mg/mL lyophilized cells of toxic *M. aeruginosa* ($\approx 2 \mu\text{g/mL}$ microcystins), 2 mg/mL lyophilized cells of nontoxic *Aphanotece* sp., and absence of cyanobacteria (control). (a) Catalase (CAT) activity; (b) glutathione-S-transferase (GST) activity; and (c) glutathione reductase (GR) activity. Data are expressed in enzymatic units (U) as mean + standard error. Similar letters indicate absence of significant differences ($p < 0.05$).

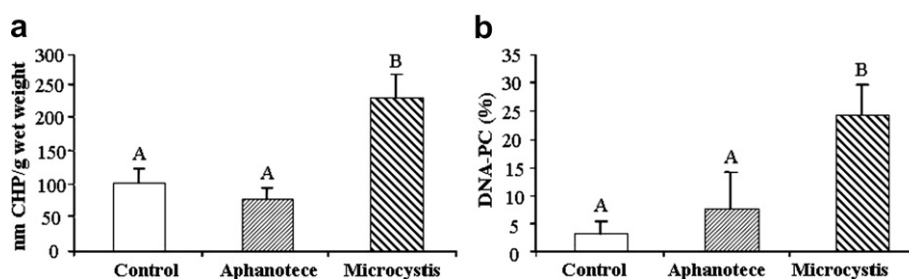


Fig. 2. Induced-oxidative stress damage after 48 h exposure to 2 mg/mL lyophilized cells of toxic *M. aeruginosa* ($\approx 2 \mu\text{g/mL}$ microcystins), 2 mg/mL lyophilized cells of nontoxic *Aphanotece* sp. and absence of cyanobacteria (control). (a) Lipid peroxide levels (LPO); (b) DNA-protein crosslink (DNA-PC) levels. Data are expressed as mean + standard error. Similar letters indicate absence of significant differences ($p < 0.05$). CHP stands for cumene hydroperoxide, employed as standard for LPO measurements.

Reactive oxygen species (ROS) are produced during several biochemical processes, thus an antioxidant system is necessary to protect the organism. CAT is an enzyme that catalyzes H_2O_2 (precursor of $\text{HO}\cdot$, the most toxic ROS) degradation. GST catalyzes the conjugation of oxidized products with reduced glutathione (GSH). GST also catalyzes the detoxification process through the conjugation of MC with GSH, whereas GR catalyzes the regeneration of GSH from GSSG (oxidized glutathione) (Pflugmacher, 2004).

In this work, MC did not activate the antioxidant system; in fact, CAT was diminished. Besides, non-altered GST activity may induce MC intracellular accumulation, leading to an oxidative stress condition. Moreover, high levels of ROS such as superoxide anion may inhibit CAT activity (Kono and Fridovich, 1982). Dewes et al. (2006) have reported the rise of oxidative stress in an estuarine crab orally exposed to MC. Pflugmacher (2004) and Pietro et al. (2006) have observed MC-induced oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* and in the tilapia fish (*Oreochromis* sp.). The absence of antioxidant responses in *L. acuta* led the organism to an oxidative stress condition after acute MC exposure, as evidenced by LPO and DNA-PC damage.

Oxidative stress condition is induced by an unbalance of pro-oxidants and the antioxidant capacity in favor of the pro-oxidant. In this work, high DNA protein crosslinks and LPO levels were observed. Although there is no evidence of MC-induced DNA-protein crosslink damage in the literature, Zegura et al. (2004) have observed that the genotoxicity of MC is mediated by the induction

of ROS production. High LPO levels caused by MC have been observed in crabs and fish by Dewes et al. (2006) and Pietro et al. (2006). The fact that those variables were altered during exposure to MC indicates that there is a common response triggered by aquatic organisms, and also suggests that not only the accumulation of MC in tissues, but also the biochemical variables should be analyzed in order to estimate the toxicological risk to populations exposed to these toxins.

Acknowledgements

We thank the Brazilian agencies CAPES and CNPq for their support during the tenure of the PhD students J.C. Leão and L.L. Amado and for research grants. L.A. Geracitano is recipient of a post-doctoral Grant PRODOC (CAPES program) and J.S. Yunes and J.M. Monserrat are research fellows from CNPq.

References

- Barker, S., Weinfeld, M., Murray, D., 2005. Mutation Research 589, 111–135.
- Dewes, L.J., Sandrini, J.Z., Monserrat, J.M., Yunes, J.S., 2006. Ecotoxicology and Environmental Safety 65, 201–208.
- Geracitano, L.A., Bocchetti, R., Monserrat, J.M., Regoli, F., Bianchini, A., 2004. Marine Environmental Research 58, 1–17.
- Kono, Y., Fridovich, I., 1982. Journal of Biological Chemistry 10, 5751–5754.
- Matthiensen, A., Beattie, K.A., Yunes, J.S., Kaya, K., Codd, G.A., 2000. Phytochemistry 55, 383–387.

Nagalakshmi, N., Prasad, M.N.V., 2001. *Plant Science* 160, 291–299.

Pflugmacher, S., 2004. *Aquatic Toxicology* 70, 169–178.

Pietro, A.I., Jos, A., Pichardo, S., Moreno, I., Cameán, A.M., 2006. *Aquatic Toxicology* 77, 314–321.

Yunes, J.S., Niencheski, L.F.H., Salomon, P.S., Parise, M., Beattie, K.A., Ragget, S.L., et al., 1998. *Verhandlungen Internationalen Vereinigung Limnologie* 26, 1796–1800.

Zegura, B., Lah, T.T., Filipic, M., 2004. *Toxicology* 200, 59–68.

ANEXO 2

Manuscript Number: ER-08-425

Title: MOTILITY CHANGES INDUCED BY MICROCYSTIN IN *Laeonereis acuta* (POLYCHAETA, NEREIDIDAE) FROM THE PATOS LAGOON (BRAZIL)

Article Type: Full Length Article

Section/Category:

Keywords: microcystin, *Laeonereis*, motility, oxygen consumption, phosphatases activity

Corresponding Author: Dr Janaina C Leão, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Unidade de Pesquisa em Cianobactérias, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande/RS, Brasil; Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica

First Author: Janaina C Leão, Ph.D

Order of Authors: Janaina C Leão, Ph.D; Laura A Geracitano, PhD; Jose M Monserrat, PhD; Lílian L Amado, MSc; Daniela M Barros, PhD; Wilson A Colvara, MSc; João S Yunes, PhD

Manuscript Region of Origin:

Abstract: Microcystins (MC), common cyanobacterial hepatotoxins, are known to inhibit protein phosphatases enzymes PP1 and PP2A and to induce oxidative stress in different organisms. Motility changes induced by MC were evaluated in the estuarine worm, *Laeonereis acuta* (Nereididae) originating from the Patos Lagoon (Southern Brazil). Ten organisms were exposed to lyophilized cells of a toxic *Microcystis aeruginosa* strain RST9501 at a concentration of 3 µg MC.mL⁻¹; ten were exposed to lyophilized cells of a nontoxic *Aphanotece* sp. strain RSMAN92 and ten were maintained without cyanobacterial cells, during 27 hours. After cyanobacterial exposure,

organisms were transferred to recipients containing the anticholinesterasic compound eserine ($0.02 \mu\text{g.mL}^{-1}$) during 3 hours. An extra group was exposed to Microcystis cells during 27 hours and then transferred to recipients containing water without eserine, for motility observation. Motility, oxygen consumption and phosphatase enzymes activity were analyzed. After 11-h exposure, oxygen consumption was smaller ($p<0.05$) in groups exposed to Microcystis and Aphanotece cells, then it was slightly increased only in the group exposed to Microcystis cells. During eserine exposure, oxygen consumption was diminished in both groups ($p<0.05$). Motility was increased ($p<0.05$) at the beginning of the test only in the group exposed to Microcystis cells and then it was highly diminished ($p<0.05$). After 27-h exposure to Microcystis cells, worms lost their motility, which was recovered after 3-h exposure to eserine ($p<0.05$). Organisms exposed to water without eserine after cyanobacterial exposure, did not recover their motility. Phosphatases activity was diminished only in the group exposed to Microcystis cells ($p<0.05$). The results indicate that not only classical biochemical parameters are affected after exposure to MC but also physiological ones and ecologically meaningful variables.

To Environmental Research's Editorial Board

Dear Silbergeld,

I am sending a manuscript entitled "Motility changes induced by microcystin in *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) from the Patos Lagoon (Brazil)" with the associated figures and table (figure 1, figure 2, figure 3, figure 4, figure 5 and table 1) by on-line way.

Thank you for your attention

Dr. Janaina de Castro Leão

Unidade de Pesquisa em Cianobactérias
Fundação Universidade Federal do Rio Grande
Rio Grande, RS – Brazil.
e-mail: jana_oceano@yahoo.com.br
Phone/Fax: +55 53 233-6737

**MOTILITY CHANGES INDUCED BY MICROCYSTIN IN *Laeonereis acuta*
(POLYCHAETA, NEREIDIDAE) FROM THE PATOS LAGOON (BRAZIL)**

J.C. Leão^{ab}; L.A. Geracitano^e; J.M. Monserrat^{d,e}; L.L. Amado^e; D.M. Barros^{d,e}; W.A.
Colvara^{a,c}; J.S. Yunes^{a,b,c*}

^aUnidade de Pesquisa em Cianobactérias, Universidade Federal do Rio Grande -FURG, Rio Grande/RS, Brasil; ^bPrograma de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica; ^cPrograma de Pós Graduação em Oceanografia Química, Física e Geológica; ^dDepartamento de Ciências Fisiológicas, FURG, Rio Grande/RS, Brasil; and ^ePrograma de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada.

*Corresponding author. Tel/Fax: +55-53-3233-6737

E-mail address: jsyunes@furg.br (J.S. Yunes)

Abstract

Microcystins (MC), common cyanobacterial hepatotoxins, are known to inhibit protein phosphatases enzymes PP1 and PP2A and to induce oxidative stress in different organisms. Motility changes induced by MC were evaluated in the estuarine worm, *Laeonereis acuta* (Nereididae) originating from the Patos Lagoon (Southern Brazil). Ten organisms were exposed to lyophilized cells of a toxic *Microcystis aeruginosa* strain RST9501 at a concentration of 3 $\mu\text{g MC.mL}^{-1}$; ten were exposed to lyophilized cells of a nontoxic *Aphanotece* sp. strain RSMAN92 and ten were maintained without cyanobacterial cells, during 27 hours. After cyanobacterial exposure, organisms were transferred to recipients containing the anticholinesterasic compound eserine (0.02 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) during 3 hours. An extra group was exposed to *Microcystis* cells during 27 hours and then transferred to recipients containing water without eserine, for motility observation. Motility, oxygen consumption and phosphatase enzymes activity were analyzed. After 11-h exposure, oxygen consumption was smaller ($p<0.05$) in groups exposed to *Microcystis* and *Aphanotece* cells, then it was slightly increased only in the group exposed to *Microcystis* cells. During eserine exposure, oxygen consumption was diminished in both groups ($p<0.05$). Motility was increased ($p<0.05$) at the beginning of the test only in the group exposed to *Microcystis* cells and then it was highly diminished ($p<0.05$). After 27-h exposure to *Microcystis* cells, worms lost their motility, which was recovered after 3-h exposure to eserine ($p<0.05$). Organisms exposed to water without eserine after cyanobacterial exposure, did not recover their motility. Phosphatases activity was diminished only in the group exposed to *Microcystis* cells ($p<0.05$). The results indicate that not only classical biochemical parameters are affected after exposure to MC but also physiological ones and ecologically meaningful variables.

Key words: microcystin, *Laeonereis*, motility, oxygen consumption, phosphatases activity

Support:

This work has been supported by the Brazilian agencies CAPES and CNPq, which have provided the PhD grants to the students J. C. Leão, L. L. Amado and W. A. Colvara and a research grants. Besides, L. A. Geracitano is recipient of a post-doctoral grant PRODOC (CAPES program) and J. S. Yunes, J. M. Monserrat and D. M. Barros are research fellows from CNPq.

1. Introduction

Microcystins (MC), common cyanobacterial hepatotoxins, are known to inhibit protein phosphatases enzymes PP1 and PP2A and to induce oxidative stress in different organisms like macrophytes, polychaetes, crab and fish, leading to cell damage (Pflugmacher, 2004; Dewes *et al.*, 2006, Pietro *et al.*, 2006, Leão *et al.*, 2008).

Anthropogenic pollution has promoted cyanobacterial toxic blooms in water bodies of world. Several blooms containing toxic *Microcystis aeruginosa* have occurred in the Patos Lagoon (Southern Brazil) over the last three decades with effects on the aquatic life (Yunes *et al.*, 1996; Matthiensen *et al.*, 2000). Biochemical and physiological changes with the death of some species, including the estuarine worm *Laeonereis acuta*, have been observed (Yunes *et al.*, 1998; Pinho *et al.*, 2005; Rosa *et al.*, 2005; Dewes *et al.*, 2006, Leão *et al.*, 2008).

Since behavior is a link between physiological and ecological organization levels, it may works as an important tool to study the early stress promoted by environmental pollutants (Scott & Sloman, 2004). Some studies have shown changes in swimming and reproductive activities of the fishes *Jenynsia multidentata* and *Danio rerio* promoted by MC exposure, which indicate that this toxin may affect their behavior (Baganz *et al.*, 1998; Cazenave *et al.*, 2008).

Recent works have shown that behavioral alterations are associated with neurotoxic effect of the pollutants, such as several kinds of pesticides and cyanotoxins. Some neurotoxins, such as saxitoxins, generate a paralysis and others, such as anatoxin-a and a(s) and the eserine, lead to a super stimulation (Carmichael, 1994; Monserrat and Bianchini, 2001; Bushnell and Moser, 2006, Kirkpatrick *et al.*, 2006, Shepherd *et al.* 2006).

The worm *L. acuta* has been regarded as an important bioindicator in the Patos Lagoon (Southern, Brazil). Its environmental abundance and physiological characteristics

face to several pollutants make this worm an important tool for ecotoxicological studies (Geracitano *et al.*, 2004).

In light of this, the study aimed to evaluate motility changes in *L. acuta* exposed to toxic cells of *M. aeruginosa* isolated from de Patos Lagoon, associated to oxygen consumption and phosphatases activity.

2. Material and Methods

Cells of a toxic *M. aeruginosa* strain (RST 9501) isolated from the Patos Lagoon (Matthiensen *et al.*, 2000) were cultured and employed as source of MC. Cells of a nontoxic cyanobacteria *Aphanotece sp.* (RSMAN92) were cultured in parallel. Both cultures were maintained on modified BG-11 medium (Rippka *et al.*, 1979).

Samples of the surface water from impacted areas (“São Lourenço do Sul” and “Santa Bárbara Reservoir”) located in Brazil’s southern region (Rio Grande do Sul state), including the Patos Lagoon, were collected during blooms events in 2006 (Figure 1 and table 1). MC concentrations used in this work were based in the high concentrations observed in the environment during the surface water sampling.

According to Matthiensen *et al.* (2000), [D-Leu¹]MC-LR is the major MC variant produced by this *Microcystis* strain, and it presents an LD₅₀ value of 71 µg/kg, while MC-LR and MC-RR presents LD₅₀ values of 50 and 320 µg/kg, respectively, in mouse bioassay (Chen *et al.*, 2006). In virtue of the MC concentrations used, the assays were regarded as acute.

Specimens of *L. acuta* were collected from an unpolluted area of the Patos Lagoon estuary (“Saco do Justino”) (Geracitano *et al.*, 2004) (Figure 1) and immediately transferred to the laboratory in an ice-cold box, in order to reduce their metabolism. During 4 days of acclimation, the worms were maintained in plastic boxes with sand and water (10%; pH

8.0), at a fixed temperature (20°C) and photoperiod (12L:12D). After acclimation, the worms were transferred to recipients containing individual chambers, which were used in the test (figure 2).

Three groups (n=10) were tested: the first one was exposed to lyophilized cells of toxic *M. aeruginosa* (3 mg.mL⁻¹), reaching $\approx 3 \mu\text{g MC.mL}^{-1}$, the second one was exposed to lyophilized cells of the non-toxic cyanobacterium, *Aphanotece sp.* (3 mg.mL⁻¹), and the third group was maintained without cyanobacterial cells (control). After 27 hours (when worms exposed to *Microcystis* cells stopped to move), all organisms were transferred to recipients containing eserine (0.02 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), a cholinesterase inhibitor that indirectly stimulates both nicotinic and muscarinic receptors (Monserrat and Bianchini, 2001). Worms remained exposed to eserine during 3 hours.

An extra group (n=5) was exposed to toxic *Microcystis* cells at the same concentration and exposure time as in the first group. After then, organisms were transferred to recipients containing water (10%; pH 8.0) without eserine and kept during 3 hours for motility observation.

During the same time intervals, oxygen consumption and motility were measured. After the test, phosphatases activity was analysed.

Oxygen consumption was evaluated by polarography (Kolthoff & Lingane (1952) using an oxymeter equipped with Clark electrode (Clark, 1956). Each worm was weighted and its oxygen consumption was measured during 10 min.

Motility was measured by filming the worm oscillation during one minute. Videos were treated using the free software “Slow Motion Program” (www.goodervideo.com) and the number of oscillation per minute was counted (Figure 2). After the tests, worms were frozen at -80 °C for enzymatic measurements.

Phosphatase activity was measured according to Carmichael (1994) and Chen *et al.* (2006). Every worm was homogenized (20% w/v) in a buffer solution containing 50 mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, 5 mM dithiothreitol, 0.2 mM MnCl₂, and 0.2 mg mL⁻¹ bovine serum albumin at pH 7.0. Samples were centrifuged at 9,000 x g (4 °C) for 20 min and the supernatants employed as enzyme source. One unit (U) is defined as the PP activity that hydrolyzes 1 nmol of *p*-nitrophenyl phosphate (*p*-NPP) min⁻¹. The substrate *p*-NPP was prepared at a final concentration of 22.2 mM in the Tris-HCl buffer with the additives described above. Phosphatases activity assay was carried out in a 96-well transparent microplate. For each reaction, 20 µL of the worm extract (diluted 1:1 in the buffer solution described above) was added, and then mixed with 180 µL of the *p*-NPP solution (22.2 mM). Plates were incubated for 30 min, in the dark. To account for the change in absorbance due to the *p*-NPP decomposition, a blank reaction without worm extract was prepared. The absorbance of each reaction mixture was determined at 405 nm using an ELISA reader (Tecan, Grodig, Australia), and all treatments were analyzed in triplicate. Phosphatases activity was calculated by the change in absorbance using the molar extinction coefficient for *p*-NPP of 1,78 x 10⁴ L.mol.cm⁻¹.

The surface water samples and the cyanobacterial extracts were sonicated during 3 min, in order to extract MC from cells. After extraction process, the samples and the extracts were centrifuged at 14,000 x g for 10 minutes and the supernatants were analyzed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with UV detector (Shimadzu SCL-10Avp), for MC contents evaluation.

Oxygen consumption and motility data were subjected to ANOVA for repeated measures over time, where the main factor was the cyanobacteria treatment (before and after eserine exposure). Phosphatases activity data were subject to one-way ANOVA. In all cases, mean comparison was performed by the Tukey HSD *post-hoc* test ($\alpha=0.05$)

3. Results

No difference in oxygen consumption ($p \geq 0.05$) was observed until 7 hours of exposure. After this period, oxygen consumption was diminished in both groups exposed to cyanobacteria cells ($p < 0.05$), when compared to the control group. After 21-h exposure, oxygen consumption was slightly increased only in the group exposed to *Microcystis* cells. During the eserine exposure, oxygen consumption was diminished in both groups exposed to cyanobacterial cells ($p < 0.05$) (Figure 3).

Motility was increased ($p < 0.05$) at the beginning of the test only in the group exposed to *Microcystis* cells and after 4 hours it was highly diminished in comparison to the control and *Aphanotece* groups ($p < 0.05$). Such difference was maintained until the end of the test. After 27-h exposure to *Microcystis* cells, the worms lost their motility. Motility was slightly recovered after 3-h exposure to eserine when compared to the beginning of the eserine exposure ($p < 0.05$) (Figure 4). Organisms exposed to *Microcystis* cells during 27 hours and exposed to water without eserine during 3 hours, did not recover their motility (data not shown).

After cyanobacterial and eserine exposure, phosphatases activity was diminished only in the group exposed to *Microcystis* cells, when compared to the control and *Aphanotece* groups ($p < 0.05$) (Figure 5).

4. Discussion

MCs are known to induce oxidative stress in different organisms (Pflugmacher, 2004; Dewes *et al.*, 2006, Pietro *et al.*, 2006, Leão *et al.*, 2008). Montagnolli *et al.* (2004) have observed a significant increase in oxygen consumption of the crustacean *Kalliapseudes schubartii* exposed to acute concentrations of extracts obtained by lyophilized cells of the *M. aeruginosa* RST9501 strain (0.8 e 1.2 mg.mL⁻¹). Pinho *et al.*

(2005) and Dewes *et al.* (2006) have observed that oxygen consumption in the crab *Chasmagnathus granulatus* was increased after MC exposure. In this study the opposite effect was observed in both groups exposed to cyanobacterial cells. Since *L. acuta* is an oxyconformer, the reduction of oxygen consumption may be related to a decrease of dissolved oxygen in the media, for example, by the presence of aerobic bacteria which degrade cyanobacterial cells (Rosa *et al.*, 2005). After few hours, oxygen consumption was slightly increased only in the group exposed to *Microcystis* cells, but it was again diminished during eserine exposure. Although variations in oxygen consumption has been observed in the groups exposed to cyanobacteria cells, such range has not been associated to the lost of motility observed in the group exposed to *Microcystis* cells.

Environmental stress may lead to behavioral changes of the organisms as a first line defense. Most often, the organisms will try to avoid the perturbation and to reduce the probability of death or metabolic costs by maintaining physiological homeostasis (Schreck *et al.*, 1997; Scott & Sloman, 2004). Behavioral alterations reflect how the animal reacts to its environment. In light of this, changes of the behavior can *a priori* be considered a very sensitive biomarker of stress imposed to the organisms by the environment (Schreck *et al.*, 1997; Scott & Sloman, 2004, Cazenave *et al.*, 2008).

In this study, the worms presented motility alteration when exposed to *Microcystis* cells, showing an initial increase (76 oscillation.min⁻¹) with a following highly reduction of their motility (8 oscillation.min⁻¹). After 27-h exposure, this group was completely immotile (0 oscillation.min⁻¹), but the motility was recovered after 3-h eserine exposure (3 oscillation.min⁻¹).

Neurotoxins produced by cyanobacteria, such as saxitoxins, act blocking the sodium channel of the neuronal synapses, generating a lost of motility. Others act inhibiting the

cholinesterase action, such as anatoxins-a and a(s), leading to super-stimulation, the same effect generated by eserine (Charmichael, 1994; Monserrat and Bianchini, 2001).

Lost of motility followed by the recovery during eserine exposure has been observed only in the group exposed to *Microcystis* cells. This situation indicates a possible neurotoxic effect since eserine stimulates the neural system and the organisms exposed to water instead eserine solution did not recover their motility.

Some studies have shown that several kinds of toxic compounds affect cell function by cytoskeletal alteration (Cima *et al.*, 1998; Batista *et al.*, 2003; Gómez-Mendikute & Cajaraville, 2003; Carbonel *et al.*, 2004; Franchine *et al.*, 2004; Moretto *et al.*, 2005; Rudolf *et al.*, 2005). The cytoskeleton is involved in determining the distinctive shape of cells and in regulating cell function. The main components of the cytoskeleton, such as microfilaments and microtubules assemblies play a major role in eukaryotic cell motility and are the primary targets of some toxins. Some toxic compounds bind to cytoskeleton components, causing either breakdown of the polymer into its constitutive elements or stabilization of the fibers. Both structural rearrangements affect cell shape and motility. Nevertheless, some changes in the cytoskeleton are related to secondary effect, such as inhibition of phosphatases enzymes. Various families of natural and derived compounds are well-known toxins with specific mechanisms of action on the cytoskeleton, but in recent years, several environmental relevant substances, including pollutants have been revealed to generate disorders of cytoskeletal components (Syversen *et al.*, 1984; Scapigliati *et al.*, 1988, Eriksson *et al.*, 1990).

MCs are known to generate hepatotoxic effect in mammals by phosphatase (PP1 and 2A) enzymes inhibition, enhancing protein phosphorylation (Carmichael, 1994). PP1 and 2A enzymes are involved on the dephosphorylation of proteins, which has been recognized as one of the major pathway of cellular regulation and function. Their inhibition

results in hyperphosphorylation and reorganization of the cell microfilaments (Eriksson *et al.*, 1990). In light of this, these enzymes are associated with several important biological processes. Some studies have shown that phosphatases enzymes regulate the motility of important cells of the organisms like spermatozooids and alveolar macrophage in mammals. Wilson *et al.* (1991) have correlated an increase in protein phosphorylation (generated by a reduction of phosphatases activity) with a decrease in rat alveolar macrophage motility. Furthermore, they suggest that phosphatase inhibition may prevent motility by uncoupling coordinated processes, such as cytoskeletal reorganization, that are essential for macrophage motility. However Smith *et al.* (1996) have observed that an inhibition of PP1 activity can enhance the motility of human and rhesus monkey sperm.

Protein phosphorylation is a key biochemical process involved in synaptic plasticity that operates through a tight balance between the action of protein kinases and protein phosphatases. The role of protein phosphatases in biological systems is often considered secondary compared to the role of protein kinases simply because kinases are the primary effectors of phosphorylation, while phosphatases are the effectors of dephosphorylation. However, protein phosphorylation/dephosphorylation is a dynamic process that relies equally on protein kinases and phosphatases and more specifically, on a delicate and concerted balance between these proteins (Milner *et al.*, 1998). Phosphorylation/dephosphorylation of proteins regulates presynaptic and postsynaptic events in excitatory and inhibitory neurons. At these sites, most relevant phosphatasic substrates include ligand-gated ion channels and G-proteincoupled receptors, whose functional properties, trafficking and synaptic organization are controlled by reversible phosphorylation (Swope *et al.*, 1999).

Some recent studies have investigated the role of PP1 in learning and memory in mice. The genetic inhibition of PP1 by temporally controlled expression of the endogenous

PP1 inhibitor I (I1) demonstrated a connection between repetitive learning and phosphatases in forebrain neurons (Munton *et al.*, 2004). Malleret *et al.* (2001) demonstrated the effect of genetically inhibiting calcineurin on plasticity and memory. Maidana *et al* (2006) have observed neurotoxic effect induced by MC in rats. Amnesic effects in retrieval of inhibitory avoidance task and in spatial learning evaluated in Morris water maze have been observed. These events can be related to the neurotoxic effects generated by MC through phosphatases inhibition.

Behavioral and physiological effects generated by MC have been observed in fish. Baganz *et al.* (1998) have observed that at a concentration of 50 $\mu\text{g MC.L}^{-1}$, zebrafish stopped spawning and no spawned eggs could be found. Cazenave *et al.* (2008) have shown that swimming activity and the detoxification enzyme system of the fish *J. multidentata* were affected by exposure to sub-lethal doses of MC-RR. These results indicate that MC exposure, occurring frequently during cyanobacterial blooms, may adversely affect not only biochemical parameters but also the behavior of organisms, with effects at the community composition.

In this work, only the group exposed to *Microcystis* cells had the phosphatasic activity diminished and presented lost of motility, after 27-h exposure. This situation indicates that this enzymatic decrease probably is associated to the paralysis due to cell function alterations.

Toxic cyanobacteria, including MC producers, have been observed in water bodies of whole world, even without blooms occurrences (Funari & Testai, 2008). Several works have shown the occurrence of MC in surface waters. Total MC concentrations in surface water vary in a very wide range of values (from trace to several milligrams per liter), being strongly influenced by the occurrence of these forms of biomass. However, the highest total MC levels have been found in blooms and scums (Funari & Testai, 2008). High

concentrations of 7.3 mg MC.L⁻¹ have been found in China and Portugal (Nagata *et al.*, 1997; Fastner *et al.*, 1999). Other studies have registered concentrations of MC varying from 15.6 to 25 mg.L⁻¹ in Japan and Germany (Chorus, 1998). Several cyanobacterial blooms containing toxic *M. aeruginosa* have occurred in the Patos Lagoon over the last 30 years. Different concentrations of MC have been observed during these blooms (Yunes *et al.*, 1996). For instance, also high concentrations of MC have been found in the samples of the surface water collected from impacted areas located in Brazil's southern region, including the Patos Lagoon, during blooms occurrence in 2006.

In this study, the worms presented lost of motility at 3 mg MC.L⁻¹, which is regarded as acute. Although the high MC values found are from the surface mat formed during the *Microcystis* bloom, this toxin must be present in high concentration along the water column including the bottom sediment. Thereby, based on the results observed in the Table 1, high concentrations of MC inducing acute effects on the surrounding organisms affected by a bloom event is a possible scenario to be found in the environment.

5. Conclusion

These results show that MC has provoked motility changes in the worm *L. acuta*, characterized by a complete paralysis. Although variations in oxygen consumption has been observed in both groups exposed to cyanobacterial cells, such range has not been associated to the lost of motility. The recovery of the motility after eserine exposure indicates a possible neurotoxic effect generated by the *Microcystis* cells exposure, since the worms did not recover their motility when exposed to water instead eserine solution. Furthermore, only the group exposed to *Microcystis* cells has presented the phosphatasic activity diminished, indicating that this enzymatic decrease may play an important role in this lost of motility due to cell function alterations. These results show the importance of evaluating

behavioral alterations in organisms as biomarker of microcystin-induced toxic stress. Lost of motility associated with some classical effects induced by MC, such as phosphatases inhibition, may lead to important ecological consequences. Thus, the organisms living in this environment are exposed to stress generated by high concentrations of MC, common in blooms events, becoming easy targets to predators.

Acknowledgements

We thank to the Brazilian agencies CAPES and CNPq for their support during the tenure of the PhD students J. C. Leão, L. L. Amado and W. A. Colvara and for research grants. L. A. Geracitano is recipient of a post-doctoral grant PRODOC (CAPES program) and J. S. Yunes, J. M. Monserrat and D. M. Barros are research fellows from CNPq.

References:

- Baganz, D., Staaks, G., Steinberg, C., 1998. Impact of the cyanobacteria toxin, microcystin-LR on behaviour of zebrafish, *Danio rerio*. Water Res. 32 (3), 948-952.
- Batista, T., Sousa, G., Suput, J.S., Rahmani, R., Suput, D., 2003. Microcystin-LR causes the collapse of actin filaments in primary human hepatocytes. Aquat. Toxicol. 65, 85-91
- Bushnell, P.J., Moser, V.C., 2006. Chapter 24 - Behavioral toxicity of cholinesterase inhibitors. Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds, pp. 347-360
- Carbonell, G.V., Falcón, R., Yamada A.T., Fonseca, B.A.L., Yano, T., 2004. Morphological and intracellular alterations induced by *Serratia marcescens* cytotoxin. Res. Microbiol. 155, 25–30
- Carmichael, W.W., 1994. The toxins of cyanobacteria. Sci. Am. 270, 64-72.
- Cazenave, J., Nores, M.L., Miceli, M., Díaz, M.P., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., 2008. Changes in the swimming activity and the glutathione-S-transferase activity of *Jenynsia multidentata* fed with microcystin-RR. Water Res. 42, 1299 – 1307
- Chen, Y-M., Lee, T-H, Lee; S-J., Huang, H-B., Huang, R., Chou, H-N., 2006. Comparison of protein phosphatase inhibition activities and mouse toxicities of microcystins. Toxicon 47, 742–746
- Chorus, I., 1998. Die Blaualgen (“Cyanobakterien”) – Eine Berliner Besonderheit Welcher Zusammenhang Zwischen dem Massenhaften Auftreten vom Blaualgen und der Nutzung vom Badegewässern? In: Nachhaltigkeit in Wasserweswn in der Mitte Europas, Symposium Berlin (D).
- Cima, F., Ballarin, L., Bressa, G., Burighel, P., 1998. Cytoskeleton alterations by tributyltin (TBT) in tunicate phagocytes. Ecotoxicol. Environ. Saf. 40, 160-165.
- Clark, L. C. Jr., 1956. Monitor and control of blood and tissue organ tensions. Trans Am Soc. Artificial. Internal Organs 2, 41-57.

- Dewes, L.J., Sandrini, J.Z., Monserrat, J.M., Yunes, J.S., 2006. Biochemical and physiological responses after exposure to microcystins in the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Brachyura). *Ecotoxicol. and Environ. Saf.* 65, 201-208
- Eriksson, J.E., Gronberg, L., Nygard, S., Slotte, J.P., Meriloto, J.A.O., 1990. Hepatocellular uptake of ^3H -dihydromicrocystin-LR a cyclic hepatotoxin. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*, 1025, 60–66
- Fastner, J., Neumann, U., Wirsing, B., Wecksser, J., Wiedner, C., Nixdorf, B., Chorus, I., 1999. Microcystin (Hepatotoxic Heptapeptides) in German Fresh Water. *Environ. Toxicol.* 14, 13-22.
- Franchini, A., Marchesini, E., Poletti, R., Ottavian, E., 2004. Acute toxic effect of the algal yessotoxin on Purkinje cells from the cerebellum of Swiss CD1 mice. *Toxicon* 43, 347–352
- Geracitano, L.A., Bocchetti, R., Monserrat, J.M., Regoli, F., Bianchini, A., 2004. Oxidative stress responses in two populations of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) after acute and chronic exposure to copper. *Mar. Environ. Res.* 58 (1), 1 – 17
- Gómez-Mendikute, A., Cajaraville, M.P., 2003. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicol. in Vitro* 17, 539–546
- Kirkpatrick, A.J., Gerhardt, A., Dick, J.T.A., McKenna, M., Berges, J.A., 2006. Use of the multispecies freshwater biomonitor to assess behavioral changes of *Corophium volutator* (Pallas, 1766) (Crustacea, Amphipoda) in response to toxicant exposure in sediment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 298–303.
- Kolthoff, I. M., Lingane, J. J., 1952. Polarography, Vol. I, 2nd. ed. Interscience, N. Y.

- Leão, J.C., Geracitano, L.A., Monserrat, J.M., Amado, L.L., Yunes, J.S., 2008. Microcystin-induced oxidative stress in *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae). Mar. Environ. Res. 66, 92-94.
- Maidana M., Carlis V., Galhardi F.G., Yunes J.S., Geracitano L., Monserrat J.M., Barros D.M., 2006. Effects of microcystins over short- and long-term memory and oxidative stress generation in hippocampus of rats. Chem.-Biol. Interact. 159, 223-234.
- Malleret, G., Haditsch, U., Genoux, D., Jones, M.W., Bliss, T.V.P., Vanhose, A.M., Weitlauf, C., Kandel, E.R., Winder, D.G., Mansuy, I.M., 2001. Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. Cell 104, 675–686.
- Matthiensen, A., Beattie, K.A., Yunes, J.S., Kaya, K., Codd, G.A., 2000. [D-Leu¹]Microcystin-LR, from the cyanobacterium *Microcystis* RST 9501 and from a *Microcystis* bloom in the Patos Lagoon estuary, Brazil. Phytochemistry 55,383-387.
- Milner, B., Squire, L.R., Kandel, E.R., 1998. Cognitive neuroscience and the study of memory. Neuron 20(3), 445-468.
- Monserrat, J.M., Bianchine, A., 2001. Anticholinesterase effect of eserine (hysostigmine) in fish and crustacean species. Braz. Arch. Biol. Technol. 44(1), 63-68.
- Montagnolli, W., Zamboni, A., Luvizotto-Santos, R., Yunes, J.S., 2004. Acute Effects of *Microcystis aeruginosa* from the Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil, on the Microcrustacean *Kalliapseudes schubartii* (Crustacea: Tanaidacea). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 46, 463-469.
- Moretto, M.B., Funchal C., Zeni G., Rocha, J.B.T., Pessoa-Pureur, R., 2005. Organoselenium compounds prevent hyperphosphorylation of cytoskeletal proteins induced by the neurotoxic agent diphenyl ditelluride in cerebral cortex of young rats. Toxicology 210, 213–222

- Munton, R.P., Vizi, S., Mansuy, I.M., 2004. The role of protein phosphatase-1 in a modulation of synaptic and structural plasticity. *FEBS Lett.* 567, 121-128.
- Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Yoshida, F., Ueno, Y., Watanabe, M.F., 1997. Enzyme Immunoassay for direct determination of microcystins in environmental water. *J. AOAC Int.* 80, 408-417.
- Pflugmacher S., 2004. Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Aquat. Toxicol.* 70, 169–178
- Pietro, A.I., Jos, A., Pichardo, S., Moreno, I., Cameán, A.M., 2006. Differential oxidative stress responses to microcystins-LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.). *Aquat. Toxicol.* 77, 314–321
- Pinho, G.L.L., Rosa, C.M., Maciel, F.E., Bianchini, A., Yunes, J.S., Proença, L.A.O., Monserrat, J.M., 2005. Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 353–360
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., Stanier, R.Y., 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 111, 1-61.
- Rosa, C.E., Souza, M.S., Yunes, J.S., Proença, L.A.O, Nery, L.E.M., Monserrat, J.M., 2005. Cyanobacterial blooms in estuarine ecosystems: Characteristics and effects on *Laonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae). *Mar. Pollut. Bull.* 50, 956–964
- Rudolf, E., Cervinka, M., Cerman, J., Schroterova, L., 2005. Hexavalent chromium disrupts the actin cytoskeleton and induces mitochondria-dependent apoptosis in human dermal fibroblasts. *Toxicol. in Vitro* 19, 713–723

- Scapigliati, G., Rappuoli, R., Silvestri, S., and Pallini, V., 1988. Cytoskeletal alterations as a parameter for assessment of toxicity. *Xenobiotica* 18, 715-724.
- Schreck, C.B., Olla, B.L., Davis, M.W., 1997. Behavioral responses to stress. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds.), *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 145–170.
- Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.* 68, 369–392
- Shepherd, K.R., Lee, E-S.Y., Schmued, L., Jiao, Y., Ali, S.F., Oriaku, E.T., Lamango, N.S., Soliman, K.F.A., Charlton, C.G., 2006. The potentiating effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on paraquat-induced neurochemical and behavioral changes in mice. *Pharmacol., Biochem.Behav.* 83, 349–359.
- Smith, G.D., Wolf, D.P., Trautman, K.C., Cruz e Silva, E.F., Greengard, P., Vijayaraghavan, S., 1996. Primate sperm contain protein phosphatase 1, a biochemical mediator of motility. *Biol. Reprod.* 54, 719-727.
- Swope, S.L., Moss, S.J., Raymond, L.A., Huganir, R.L., 1999. Regulation of ligandgated ion channels by protein phosphorylation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 33, 49-78.
- Syversen, T.L.M., Sager, P.R., Clarkson, T.W., Cavanagh, J.B., Elgsaeter, A., Guldberg, H.C., Lee, S.L., Lichtman, M.A., Mottet, N.K., Olmsted, J.B., 1984. The cytoskeleton as a target for toxic agents. In Clarkson, T.W., Sager, P.R., Syversen, T.L.M. (Eds.). *The Cytoskeleton: A Target for Toxic Agents*. Rochester Series on Environmental Toxicity, Plenum Press, New York. pp. 25-34.

- Wilson, A.K., Takai, A., Ruegg, J.C., Lanerolle, P., 1991. Okadaic acid, a phosphatase inhibitor, decreases macrophage motility. *Am. J. Physiol. - Lung Cellular and Molecular Physiology* 260, 105-112
- Yunes, J.S., Salomon, P.S., Matthiensen, A., Beattie, K.A., Ragget, S.L., Codd, G.A., 1996. Toxic blooms of cyanobacteria in the patos lagoon estuary, southern Brazil. *J. Aquat. Ecosys. Health* 5, 223-229.
- Yunes, J.S., Matthiensen, A., Parise, M., Salomón, P.S., Raggett, S.L., Beattie, K.A., Codd, G.A., 1998. *Microcystis aeruginosa* growth stages and the occurrence of microcystins in Patos Lagoon, southern Brazil. *Hamful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanografic Comisión of UNESCO*, pp. 18-21.

Figure Captions

Figure 1: Sampling area of the surface water samples and the worm specimens, where SLS means “São Lourenço do Sul”, SBR means “Santa Bárbara Reservoir” and SJ means “Saco do Justino”.

Figure 2: Device employed to quantify the number of oscillation per minute of each worm. Arrows indicates the oscillations of the head through the central line that were counted to analyze worm motility.

Figure 3: Oxygen consumption rates in the worm *Laeonereis acuta* exposed to 3 mg.mL⁻¹ lyophilized cells of toxic *Microcystis aeruginosa* ($\approx 3 \mu\text{g MC.mL}^{-1}$), 3 mg.mL⁻¹ lyophilized cells of nontoxic *Aphanotece sp.*, and absence of cyanobacteria (control), during 27 hours, and exposed to eserine (0.02 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), during 3 hours (after cyanobacterial exposure). Data are expressed as mean + standard error. Identical letters indicate absence of statistical significance ($p \geq 0.05$) for each exposure interval.

Figure 4: Motility of the worm *Laeonereis acuta* exposed to 3 mg.mL⁻¹ lyophilized cells of toxic *Microcystis aeruginosa* ($\approx 3 \mu\text{g MC.mL}^{-1}$), 3 mg.mL⁻¹ lyophilized cells of nontoxic *Aphanotece sp.* and absence of cyanobacteria (control), during 27 hours, and exposed to eserine (0.02 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), during 3 hours (after cyanobacterial exposure). Data are expressed as mean + standard error. Identical letters indicate absence of statistical significance ($p \geq 0.05$) for each exposure interval.

Figure 5: Phosphatase activity of the worm *Laeonereis acuta* after exposure to 3 mg.mL⁻¹ lyophilized cells of toxic *Microcystis aeruginosa* ($\approx 3 \mu\text{g MC.mL}^{-1}$), 3 mg.mL⁻¹ lyophilized cells of nontoxic *Aphanotece sp.*, and absence of cyanobacteria (control), during 27 hours, and after exposure to eserine (0.02 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), during 3 hours (after cyanobacterial exposure). Data are expressed as mean + standard error. Identical letters indicate absence of statistical significance ($p \geq 0.05$).

Table Caption

Table 1: MC concentrations in the samples collected from some impacted areas located in Brazil's southern region (Rio Grande do Sul state), including the Patos Lagoon, during blooms events.

Figure 1

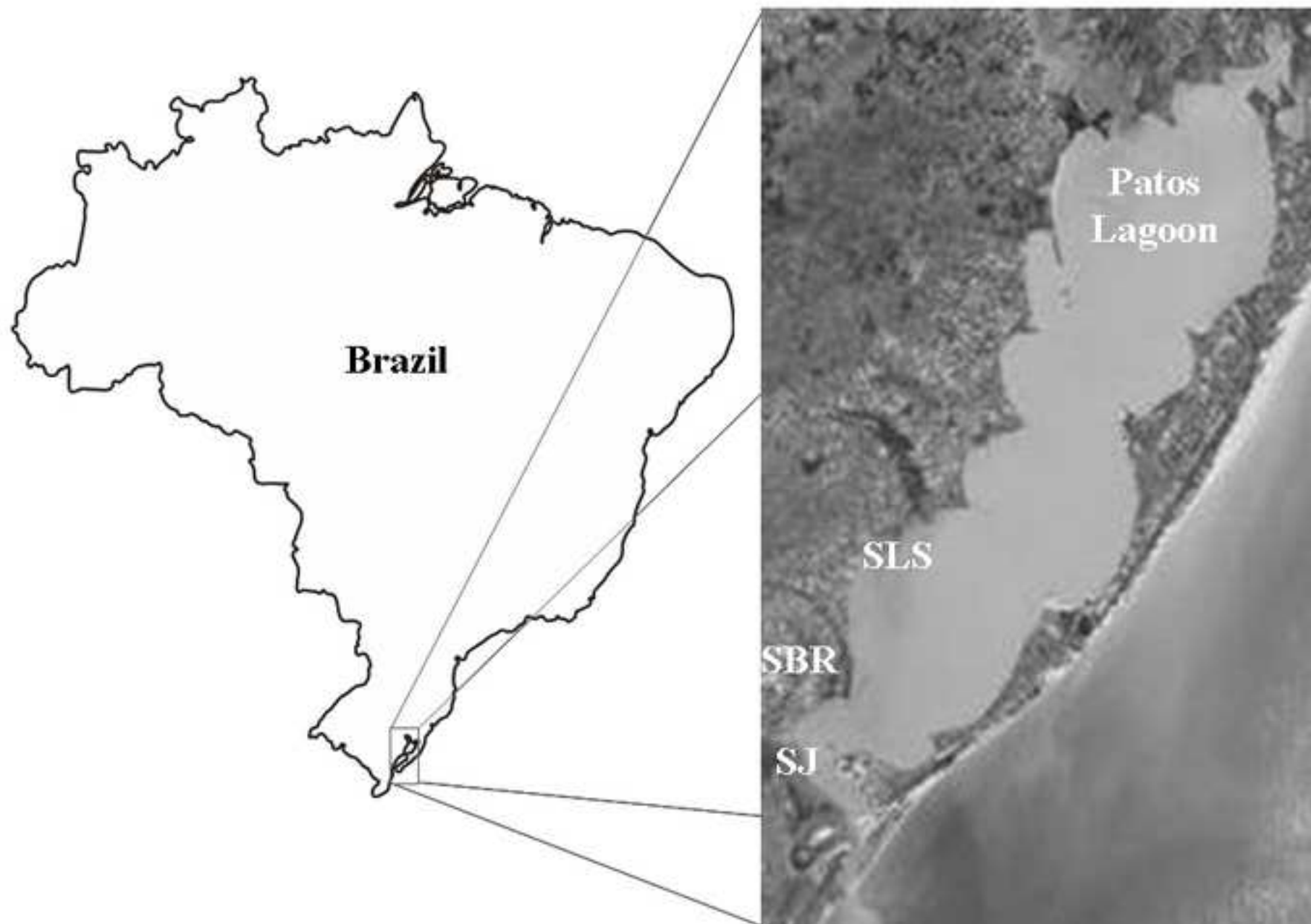


Figure 2

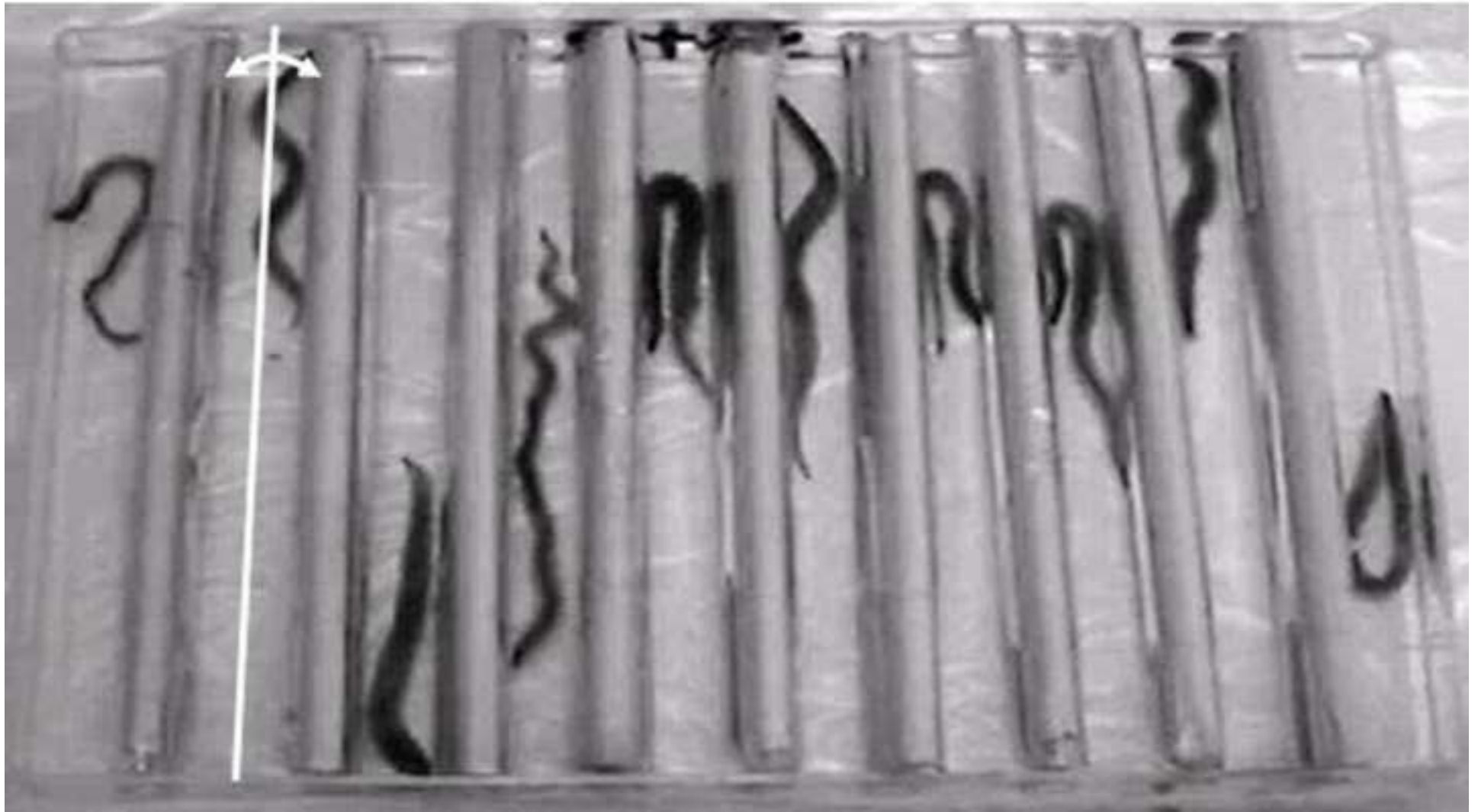


Figure 3

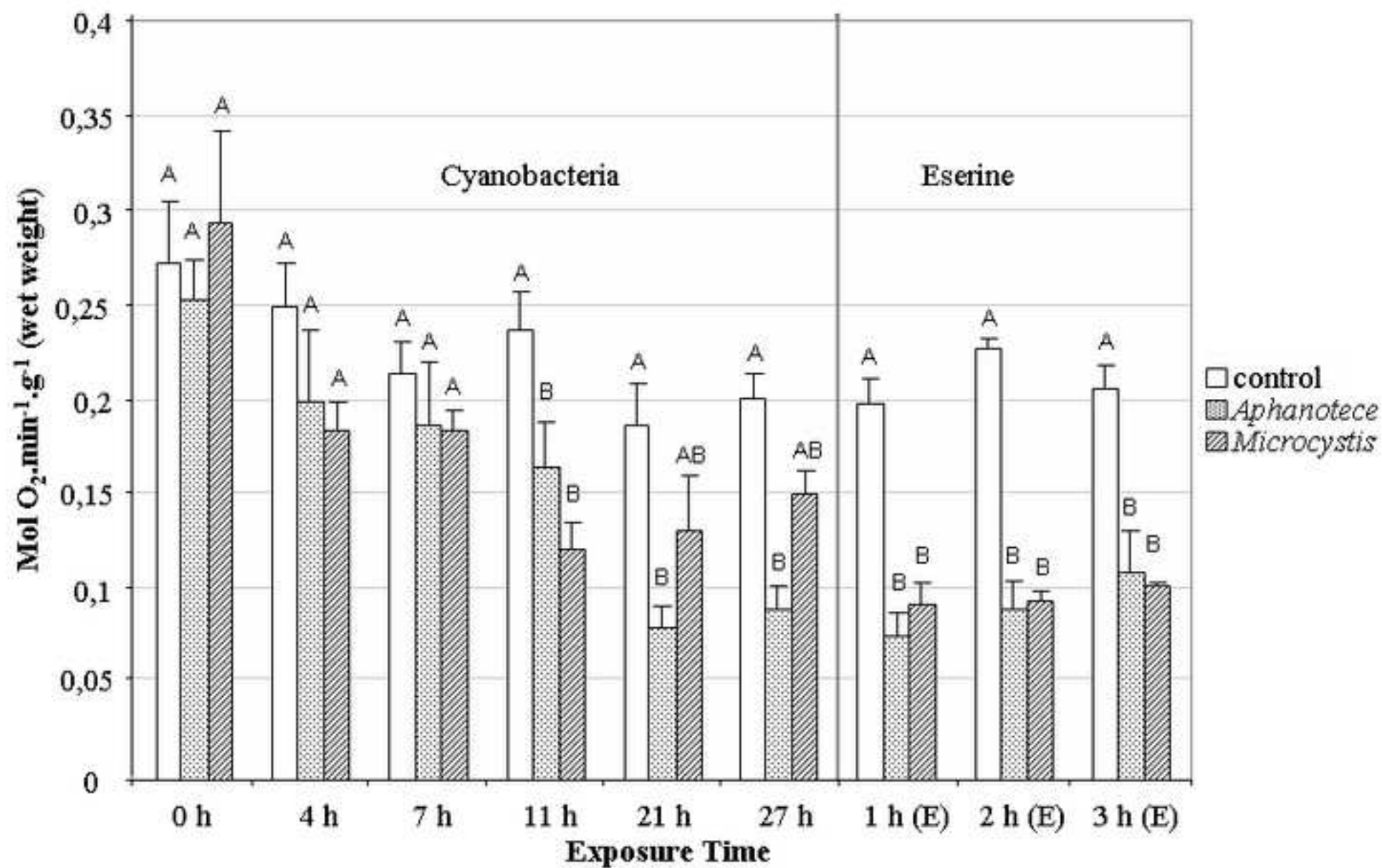


Figure 4

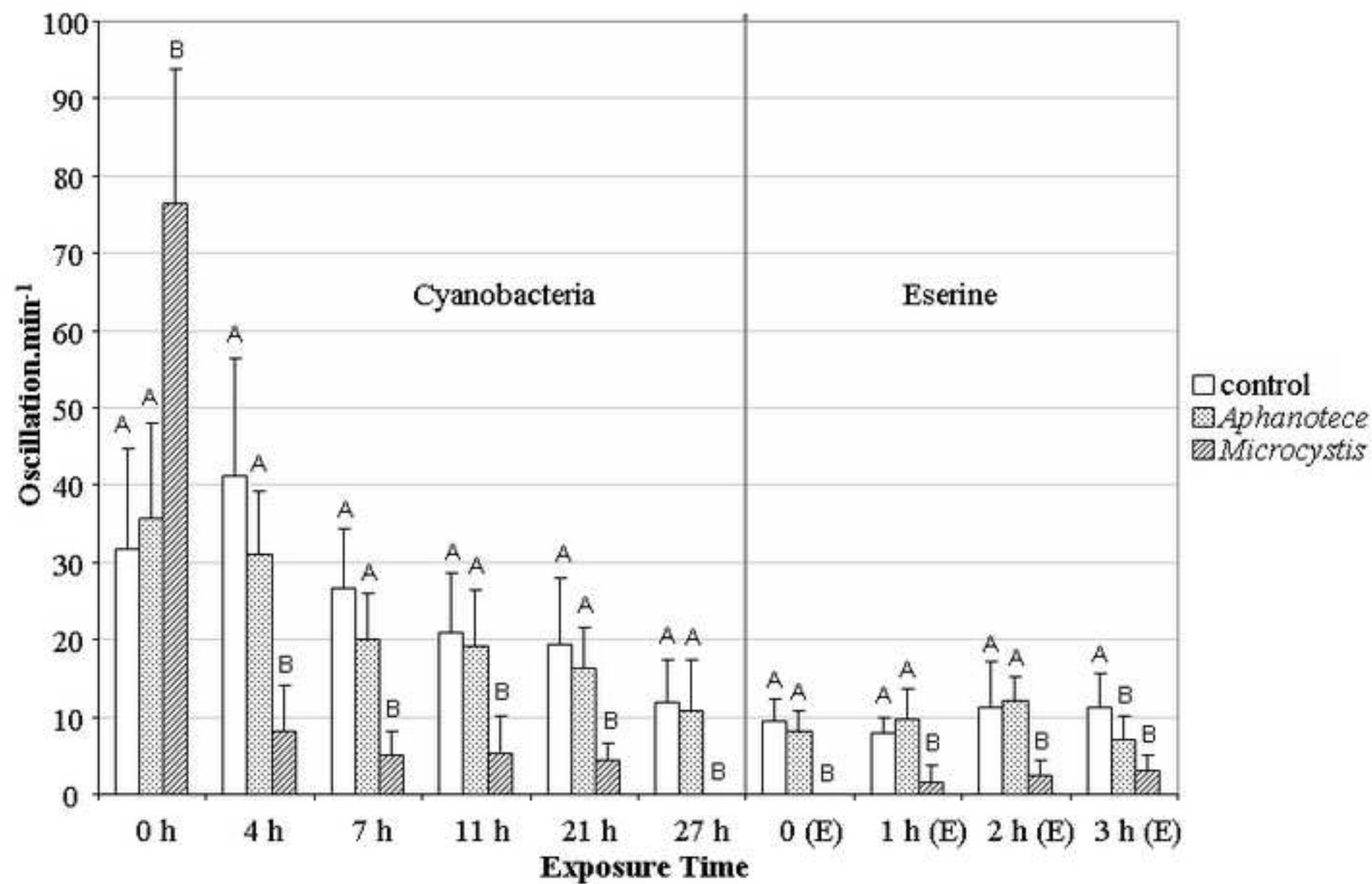
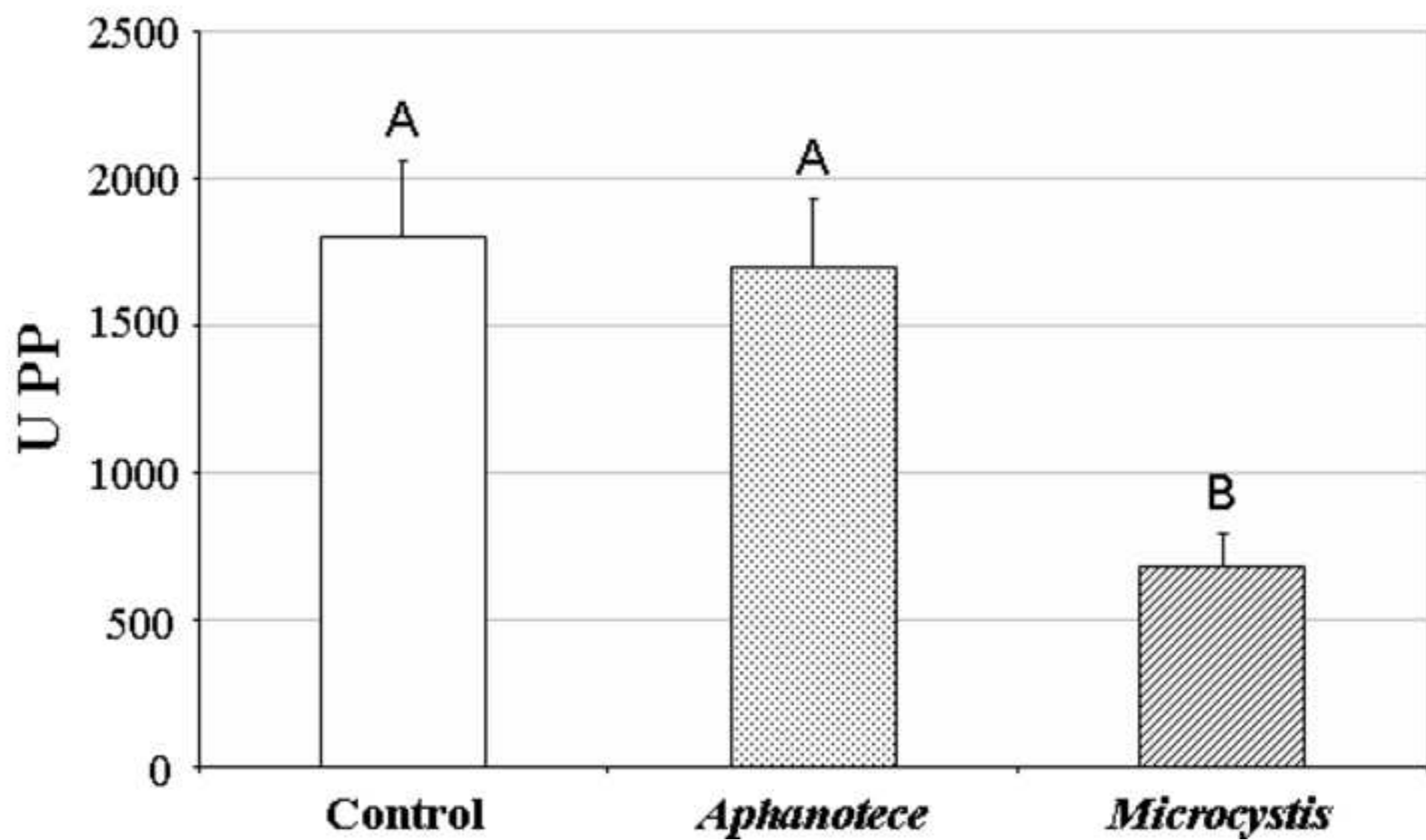


Figure 5



Place	Date	Mg MC/L
São Lourenço do Sul	March/2006	19
São Lourenço do Sul	March/2006	29
Santa Bárbara Barrage	November/2006	44

Table 1