

Elisabete Maria Álvaro Fernandes

Avaliação da Toxicidade de Cianobactérias para
Brachydanio rerio Utilizando Ensaio a Diferentes
Níveis de Organização Biológica



Departamento de Zoologia e Antropologia
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Mestrado em Ecologia Aplicada

Porto, 2001

Elisabete Maria Álvaro Fernandes

Avaliação da Toxicidade de Cianobactérias para
Brachydanio rerio Utilizando Ensaio a Diferentes
Níveis de Organização Biológica



Departamento de Zoologia e Antropologia
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Mestrado em Ecologia Aplicada

Porto, 2001

Elisabete Maria Álvaro Fernandes

Avaliação da Toxicidade de Cianobactérias para
Brachydanio rerio utilizando ensaios a diferentes níveis
de organização biológica

Dissertação para obtenção do Grau de
Mestre em Ecologia Aplicada, apresentada
à Faculdade de Ciências da Universidade do
Porto

Porto, 2001

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não teria sido possível de concretizar sem o contributo de algumas pessoas às quais gostaria de agradecer:

- Ao Prof. Doutor Vítor Vasconcelos e à Prof. Doutora Lúcia Guilhermino pela orientação científica e revisão do texto e por todo o apoio e disponibilidade que demonstraram ao longo da realização deste trabalho.
- Ao Prof. Doutor Paulo Santos, Coordenador do Mestrado Em Ecologia Aplicada, pela apoio e ajuda que sempre me prestou.
- Ao Prof. Doutor João Coimbra pela oportunidade de realizar este trabalho no Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental(CIIMAR).
- A todos os elementos do CIIMAR, em especial aos do laboratório de Ecotoxicologia, pela amizade e boa disposição, e pelo bom ambiente de trabalho que sempre me proporcionaram.
- Ao Bruno Castro e Manuela Frasco pelos esclarecimentos e ajuda nas folhas de Excel.
- À Susana Moreira pelo apoio e ajuda ao longo do trabalho.
- À Inês Machado pela paciência.
- Aos meus amigos pelo incentivo.
- À Claudia, Cristina e Caty.
- Aos meus pais, irmã, cunhado e avó Juvelina por todo o apoio, paciência e incentivo manifestado ao longo deste trabalho.

ÍNDICE

ÍNDICE DAS FIGURAS.....	i
ÍNDICE DAS TABELAS.....	iii
ABREVIATURAS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
I. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Introdução Geral.....	1
1.2. <i>Microcystis aeruginosa</i>	5
1.2.1. Microcistina-LR.....	5
1.3. <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	9
1.3.1. Cilindrospermopsina.....	9
1.4. <i>Brachydanio rerio</i> como organismo teste.....	11
1.5. Testes de avaliação ecotoxicológica	12
1.6. Biomarcadores em Ecotoxicologia.....	15
1.6.1. Acetilcolinesterase (AChE).....	18
1.6.2. Glutathione S-transferase (GST).....	18
1.6.3. Lactato desidrogenase (LDH).....	19
1.6.4. Fosfatase Serine/treonina.....	21
1.7. Objectivos do trabalho.....	22
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
2.1. Manutenção dos peixes em laboratório.....	24
2.2. Espécies utilizadas.....	25
2.3. Isolamento e preparação do material biológico.....	26
2.4. Testes agudos <i>in vitro</i> baseados em biomarcadores.....	27
2.5. Testes agudos <i>in vivo</i> baseados em biomarcadores.....	28
2.6. Teste crónico de 28 dias.....	29
2.7. Determinações enzimáticas.....	31
2.8. Determinação da concentração de proteína.....	34
2.9. Reagentes e compostos químicos.....	34
2.10. Análise estatística dos dados.....	35
III. RESULTADOS.....	36
3.1. Testes agudos <i>in vitro</i> baseados em biomarcadores.....	36
3.1.1. AChE.....	36
3.1.2. GST.....	38

3.1.3. LDH.....	39
3.2. Testes agudos <i>in vivo</i> baseados em biomarcadores.....	40
3.2.1. Parâmetros físico-químicos.....	40
3.2.2. Biomarcadores.....	41
3.2.2.1. AChE.....	41
3.2.2.2. GST.....	43
3.2.2.3. LDH.....	44
3.2.2.4. Fosfatase Serina/Treonina.....	46
3.3. Testes crônicos baseados em biomarcadores.....	47
3.3.1. Parâmetros físico-químicos.....	47
3.3.2. Mortalidade/peso.....	49
3.3.3. Biomarcadores.....	50
3.3.3.1. AChE.....	50
3.3.3.2. GST.....	51
3.3.3.3. LDH.....	53
3.3.3.4. Fosfatase Serina/Treonina.....	54
IV. DISCUSSÃO.....	56
V. REFERÊNCIAS.....	64
VI. ANEXO.....	72

ÍNDICE DAS FIGURAS

	Páginas
Figura 1 - Estrutura molecular da microcistina.....	6
Figura 2 - Estrutura molecular da cilindrospermopsina.....	10
Figura 3 - Fotografia do peixe Zebra, adulto.....	11
Figura 4 - Reacção geral catalizada pela acetilcolinesterase.....	18
Figura 5 - Reacção catalizada pela lactato desidrogenase.....	20
Figura 6 - Esquema do funcionamento da fosforilação proteica.....	21
Figura 7 - Actividade da AChE em função da concentração de MCYST-LR, nos testes <i>in vitro</i>	36
Figura 8 - Actividade da AChE em função da concentração de CYN, nos testes <i>in vitro</i>	37
Figura 9 - Actividade das GST em função da concentração de MCYST-LR (A) e da CYN (B), nos testes <i>in vitro</i>	38
Figura 10 - Actividade da LDH em função da concentração de MCYST-LR (A) e da CYN (B), nos testes <i>in vitro</i>	39
Figura 11 - Actividade da AChE em função da concentração de MCYST-LR, nos testes <i>in vivo</i>	42
Figura 12 - Actividade da AChE em função da concentração de CYN, nos testes <i>in vivo</i>	42
Figura 13 - Actividade das GST em função da concentração de MCYST-LR, nos testes <i>in vivo</i>	43
Figura 14 - Actividade das GST em função da concentração da CYN, nos testes <i>in vivo</i>	44
Figura 15 - Actividade da LDH em função da concentração da MCYST-LR, nos testes <i>in vivo</i>	45

Figura 16 - Actividade da LDH em função da concentração da CYN, nos testes <i>in vivo</i>	45
Figura 17 - Actividade da Fosfatase Serina/Treonina em função da concentração da MCYST-LR, nos testes <i>in vivo</i>	46
Figura 18 - Actividade da Fosfatase Serina/Treonina em função da concentração da CYN, nos testes <i>in vivo</i>	47
Figura 19 - Percentagem de mortalidade de <i>Brachydanio rerio</i> em função da concentração de toxina utilizada.....	49
Figura 20 - Actividade da AChE em função da concentração da MCYST-LR, nos testes crónicos.....	50
Figura 21 - Actividade da AChE em função da concentração da CYN, nos testes crónicos.....	51
Figura 22 - Actividade das GST em função da concentração de MCYST-LR, nos testes crónicos.....	52
Figura 23 - Actividade das GST em função da concentração de CYN, nos testes crónicos.....	52
Figura 24 - Actividade da LDH em função da concentração de MCYST-LR, nos testes crónicos.....	53
Figura 25 - Actividade da LDH em função da concentração de CYN, nos testes crónicos.....	54
Figura 26 - Actividade da Fosfatase Ser/Thr em função da concentração de MCYST-LR, nos testes crónicos.....	55
Figura 27 - Actividade da Fosfatase Ser/Thr em função da concentração de CYN, nos testes crónicos.....	55

ÍNDICE DAS TABELAS

	Páginas
Tabela 1 - Composição do meio ASTM.....	25
Tabela 2 - Valores médios dos parâmetros obtidos para os testes <i>in vivo</i> com MCYST-LR.....	40
Tabela 3 - Valores médios dos parâmetros obtidos para os testes <i>in vivo</i> com CYN.....	41
Tabela 4 - Valores médios dos parâmetros obtidos para os testes crônicos com MCYST-LR.....	48
Tabela 5 - Valores médios dos parâmetros obtidos para os testes crônico com CYN.....	48

ABREVIATURAS

Abreviaturas	Nome Completo
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de variância
ASTM	Água dura proposta pela "American Society of Testing Materials"
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CENO	Concentração de efeito não observado
CEO	Concentração de efeito observado
CYN	Cilindrospermopsina
DTNB	Acido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico
GSH	Glutathiona
GST	Glutathiona S-transferases
LDH	Lactato desidrogenase
<i>M.aeruginosa</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>
MCYST-LR	Microcistina-LR
NaCl	Cloreto de sódio
NAD ⁺	β -nicotinamida adenina dinucleótido oxidada
NADH	β -nicotinamida adenina dinucleótido reduzida
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
Ser-Thr	Serina-Treonina
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)
ϵ	Coefficiente de absorvidade molar

RESUMO

Devido ao aumento da eutrofização das águas que promove o aparecimento de cianobactérias potencialmente tóxicas e aos os riscos inerentes para a saúde pública e para o ambiente, torna-se necessário desenvolver testes efectivos e rápido que permitam detectar a presença de toxinas e avaliar os efeitos destas nos seres vivos.

Neste trabalho pretendeu-se avaliar a toxicidade de toxinas produzidas pelas cianobactérias *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii*, para *Brachydanio rerio*, utilizando testes com biomarcadores. A actividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE), glutathione S-transferase (GST), lactato desidrogenase (LDH) e fosfatase serina/treonina foram usadas como parâmetros indicativos de toxicidade.

A microcistina-LR (MCYST-LR) produzida por *Microcystis aeruginosa* não provocou efeitos significativos na actividade das enzimas AChE, GST e LDH nos testes *in vitro*. Nos testes crónicos verificou-se um aumento da actividade das GST e da LDH, tendo ocorrido uma inibição da fosfatase serina/treonina no teste crónico. Relativamente à AChE, no teste *in vivo*, detectou-se um aumento da actividade desta enzima nos peixes expostos à concentração de 100µg/l.

Com a cilindrospermopsina (CYN) produzida por *Cylindrospermopsis raciborskii* só ocorreu inibição, *in vitro*, na actividade da AChE. Nos testes *in vivo* não ocorreram alterações significativas na actividade das enzimas. Nos testes crónicos apenas se observou um aumento significativo na

actividade da LDH, não tendo sido detectados efeitos nas restantes enzimas.

Verificou-se que *Brachydanio rerio* se apresenta tolerante à toxicidade da MCYST-LR, conseguindo sobreviver e crescer na sua presença. Pelo contrário, na presença da CYN verificou-se uma inibição do crescimento.

ABSTRACT

Due to the increase of the waters eutrophization which promotes the upcoming of potentially toxic cyanobacteria, and due to the risks to public health and to the environment, it is necessary to develop effective and quick tests which allow to detect the presence of toxins and to evaluate the effects of these toxins in the beings.

In this work it was our purpose to evaluate the toxicity of the toxins produced by the *Microcystis aeruginosa* and by the *Cylindrospermopsis raciborskii*, for *Brachydanio rerio* using tests based on biomarkers. The enzymatic activity of acetylcholinesterases (AChE), glutathione S-transferases (GST), lactate dehydrogenase (LDH) and phosphatase serine/threonine were used as indicator parameters of toxicity.

The microcystin-LR (MCYST-LR) produced by *Microcystis aeruginosa* has not provoked any significant effects in the AChE, GST and LDH activities *in vitro* tests. In chronic tests there was an increase of the GST and LDH activity, and it occurred an inhibition of the phosphatase serine/threonine in the chronic test. In which concerns the activity of AChE, in the *in vivo* test was an increase in the activity of this enzyme in the fish exposed to the concentration of 100µg/l.

Concerning the cylindrospermopsin (CYN) produced by *Cylindrospermopsis raciborskii* there was only an *in vitro* inhibition in the activity of the AChE. In the *in vivo* tests there no significant changes in the activity of the enzymes. In the chronic tests there was only a significant increase on the

activity of the LDH. In the remain enzymes there were no effects to be seen.

It was detected that the *Brachydanio rerio* presents itself tolerant to the toxicity of the MCYST-LR,, being able to survive and grow in its presence. On the opposite there is an inhibition of growth in the presence of CYN.

I - INTRODUÇÃO

1.1. Introdução Geral

Pensa-se que as cianobactérias tenham surgido há cerca 3,5 bilhões de anos (Carmichael, 1994) com base em fósseis descobertos em rochas sedimentares do noroeste da Austrália (Azevedo, 1998). As cianobactérias estão, portanto, entre os organismos pioneiros na Terra, sendo provavelmente os primeiros produtores primários a libertar oxigênio elementar na atmosfera primitiva (Chorus, 2000).

As cianobactérias são microorganismos aeróbios fotoautotróficos. Os seus processos vitais requerem somente água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz. A fotossíntese é o seu principal modo de obtenção de energia para o metabolismo (Chorus, 2000).

A capacidade de crescimento nos mais diferentes meios é uma das características notáveis das cianobactérias. Várias espécies vivem em solos e rochas onde desempenham um importante papel nos processos funcionais do ecossistema e na reciclagem de nutrientes. No entanto, ambientes de água doce são os mais importantes para o crescimento de cianobactéria, visto que a maioria das espécies apresenta um crescimento ótimo em águas alcalinas, de temperatura entre 15 e 30°C e elevada concentração de nutrientes, principalmente azoto e fósforo (Carmichael, 1994).

Nas últimas décadas tem vindo a verificar-se uma crescente eutrofização dos ambientes aquáticos devido a actividades humanas que causam um enriquecimento artificial desses ecossistemas. As principais fontes desse enriquecimento têm sido identificadas como sendo descargas de esgotos domésticos, industriais e agrícolas de centros urbanos e de regiões agrícolas. O aparecimento de cianobactérias em grandes concentrações formam os "blooms" ou florescências (Carmichael, 1994). A eutrofização produz mudanças na qualidades da água, incluindo a redução de oxigénio dissolvido, aumento de custo de tratamento, morte extensiva de peixes e aumento da incidência de florescências de microalgas e cianobactérias (Codd & Bell, 1985; Keijola, 1988).

As florescências surgem geralmente no Verão. Uma vez que as cianobactérias se movimentam na coluna de água em busca de luz, podem flutuar até à superfície, sendo concentradas e transportadas pelo vento até às margens, onde podem ser ingeridas em quantidades significativas por animais. Em determinadas circunstâncias, algumas estirpes produzem toxinas susceptíveis de provocar intoxicações de gravidade variável em animais e no Homem. Efectivamente, diversos casos de morte de organismos aquáticos e terrestres provocados pela ingestão de cianobactérias têm sido referenciados por diversos autores (Barica, 1975; Francis, 1878; Carmichael, 1997). As águas doces de superfície são utilizadas para consumo animal, actividades recreativas e como fontes de abastecimento de água para consumo humano, pelo que a ocorrência de florescências de cianobactérias produtoras de toxinas, representa um problema ambiental com repercussões na Saúde Pública.

Existem diversas espécies de cianobactérias, com uma distribuição mundial alargada (Carmichael *et al.*, 1985) salientando-se, entre as mais estudadas, os géneros: *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nodularia*, *Nostoc* e *Cylindrospermopsis*. Podem formar florescências constituídas por uma ou várias espécies, podendo cada uma delas apresentar estirpes tóxicas ou não tóxicas, em proporções e de toxicidade variáveis ao longo do tempo. Em Portugal, as principais espécies de cianobactérias tóxicas são *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis wesenbergii*, *Anabaena flos-aquae*, *Anabaena scheremetievi* e *Aphanizomenon flos-aquae* (Vasconcelos, 1999).

As toxinas produzidas pelas cianobactérias são metabolitos secundários, desconhecendo-se ao certo a sua função. Pensa-se que poderão servir de protecção contra a predação por parte de elementos do zooplâncton, visto que grande parte das espécies pertencentes a este grupo não as consomem, excepto no caso em que constituem a única fonte de alimento disponível (Carmichael, 1994). Poderão também funcionar como inibidores do crescimento de outros componentes de fitoplâncton (Carmichael, 1992).

Em todo o mundo foram detectadas nos últimos sessenta anos cerca de 40 espécies com produção de toxinas. Estas, pela sua acção classificam-se em três grupos fundamentais: hepatotoxinas, neurotoxinas e irritantes ao contacto.

As hepatotoxinas, que incluem compostos cíclicos de natureza peptídica que actuam essencialmente a nível do fígado. Os géneros de cianobactérias produtoras de hepatotoxinas mais importantes são: *Microcystis*, *Nodularia*

e em menor proporção *Oscillatoria* e *Anabaena*. De igual modo, *Cylindrospermopsis* tem sido referida como hepatotóxica (Hawkins *et al.*, 1985).

As neurotoxinas, que englobam compostos alcaloides e organofosfatos actuam a nível do sistema nervoso central. São produzidas pelos géneros *Anabaena*, *Oscillatoria* e *Aphanizomenon* entre outros. Interferem com a transmissão do impulso nervoso e compreendem cinco tipos de neurotoxinas: a anatoxina-a, anatoxina-a(s), homoanatoxina-a, saxitoxina e neosaxitoxina (Carmichael, 1994), sendo as três primeiras exclusivas das cianobactérias e as duas últimas comuns aos dinoflagelados.

As dermatoxinas são lipopolissacarídeos e proteínas, produzidas por espécies dos géneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* e *Oscillatoria* e podem causar hipersensibilidade cutânea e respiratória, reversíveis (Carmichael, 1994).

Estudos realizados em Portugal parecem demonstrar que as microcistinas são as toxinas dominantes, predominando, dentro destas, as microcistinas-LR seguidas da microcistina-YR e microcistina-RR (Vasconcelos *et al.*, 1996).

O primeiro incidente conhecido com toxinas de cianobactérias ocorreu num lago em Austrália, em 1878, com o surgimento de uma florescência tóxica de *Nodularia spumigena* (Francis, 1878). Um caso de cancro ocorrido na China, em 1996 foi atribuído à contaminação de água de consumo (Ueno *et al.*,

1996). Mais recentemente, a contaminação de água para diálise no Brasil provocou sessenta mortes entre a população humano (Pourir *et al.*, 1998).

1.2. *Microcystis aeruginosa*

Microcystis aeruginosa é uma das espécies de cianobactérias produtoras de substâncias tóxicas amplamente difundida e relativamente bem estudada (Sivonen, 1990). Esta espécie é uma das mais comuns em reservatórios usados para o abastecimento público (Vasconcelos *et al.*, 1993, 1995).

Microcystis aeruginosa é uma espécie produtora de hepatotoxinas de natureza peptídica denominadas de microcistinas (Sivonen, 1990), sendo este o grupo de toxinas mais investigado. No nosso país, as microcistinas ocorrem em concentrações médias de 7,1 µg/mg de peso seco de cianobactérias, em águas doces (Vasconcelos *et al.*, 1996).

1.2.1 Microcistinas

São conhecidas pelo menos 60 variantes de microcistinas identificadas (Sivonen, 1990) e muitas delas podem ser produzidas durante uma florescência. Em Portugal, numa só florescência podemos encontrar entre 2 e 7 microcistinas diferentes (Vasconcelos *et al.*, 1996).

A estrutura química básica das microcistinas inclui cinco aminoácidos constantes (N-metildehidroalanina, B-metilaspártato, alanina, ácido glutâmico e 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienoico-ADDA) e dois aminoácidos que são combinações variáveis de arginina, alanina, leucina, tirosina, triptofano, metionina e fenilalanina (Carmichael, 1992; Vasconcelos *et al.*, 1996). A mais comum contém leucina (L) e arginina (R) e designa-se por MCYST-LR (Figura 1). Esta é a microcistina mais comum a nível mundial e também em Portugal (Vasconcelos *et al.*, 1995).

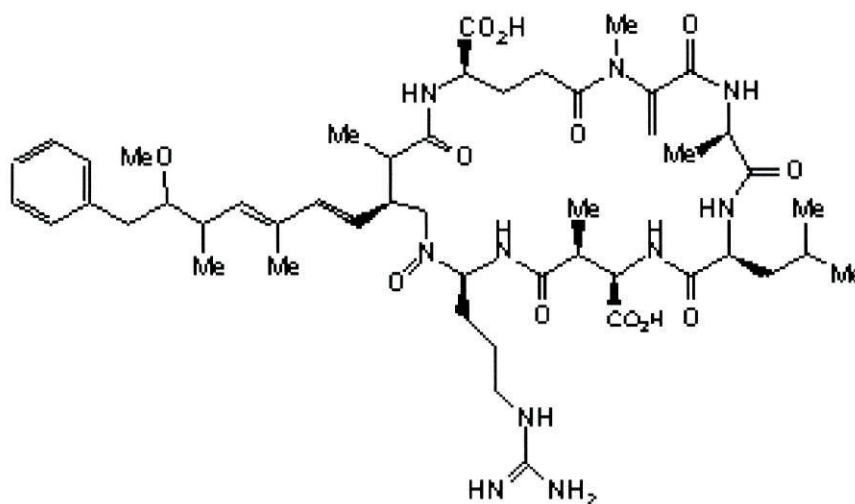


Figura 1 - Estrutura molecular da microcistina-LR

As microcistinas são inibidoras das fosfatases proteicas (PP1 e PP2) dos organismos eucarióticos (Falconer, 1993), podendo provocar hiperfosforilação das proteínas do citoesqueleto (Mackintosh & Mackintosh, 1994), deformação celular (Runnegar & Falconer, 1982; Eriksson *et al.*, 1990; Lampert *et al.*, 1994), alterações no metabolismo enzimático (Falconer, 1994; Mackintosh & Mackintosh, 1994), alterações na permeabilidade dos canais iónicos (Mackintosh & Mackintosh, 1994),

alterações carcinogénicas em animais expostos a doses sub-letais (Falconer, 1991; Falconer, 1993; Carmichael, 1994) e danos teratogénicos, gonatróficos e anormalidades no emparelhamento dos cromatídeos (Kirpenko *et al.*, 1981, *in* Carmichael, 1986). Suspeita-se, também que estes compostos sejam promotores de cancro primário do fígado em humanos expostos por longos períodos a baixas doses na água de consumo (Yu, 1989; Carmichael, 1994).

A MCYST-LR foi a primeira microcistina identificada quimicamente. Até à data a maioria das investigações têm sido efectuadas com microcistina-LR, a qual foi associada, em muitos países, com a maior parte de intoxicações com toxinas de cianobactérias (Faweell *et al.*, 1993, *in* Gupta, 1998). A MCYST-LR é um heptapéptido cíclico com um peso molecular cerca de 1000 daltons (Chorus *et al.*, 1999).

A microcistina-LR foi considerada como um inibidor potente das fosfatases proteicas serina/treonina 1 e 2A, *in vitro* (Honkonen *et al.*, 1990 *in* Gupta *et al.*, 1998) e *in vivo* (Runnegar *et al.*, 1993 *in* Gupta *et al.*, 1998). São consideradas como sendo esteres não-forbol (TPA), um tipo de promotores de tumores. A inibição da fosfatase proteica 2A, pela microcistina-LR pode ser anulada com a presença de anticorpos policlonais contra a MCYST-LR (Lin & Chu, 1994). São desconhecidas implicações na inibição da fosfatases proteicas relacionadas com a exposição a doses baixas de microcistinas (Gupta *et al.*, 1998).

As microcistinas podem ser acumuladas por vertebrados e invertebrados aquáticos, incluindo peixes (Vasconcelos, 1995; Amorim e Vasconcelos,

1999). Os dados relativos à toxicidade para peixes publicados na literatura são por vezes contraditórios. Assim, têm sido descritos casos de mortalidade em massa de espécie em causa após a ocorrência de florescências de *Microcystis aeruginosa* (Tencalla *et al.*, 1994; Gaete *et al.*, 1994). No entanto não há provas suficientes para indicar que as toxinas tenham sido a causa primária da morte, neste caso. No entanto, Penãlozo *et al.* (1990) demonstraram que a morte periódica de *Gambusia affinis* era devido à presença de microcistinas no lago Aculeo.

Estudos laboratoriais demonstraram que a administração intraperitoneal de microcistinas a peixes provocou destruição do fígado (Philips *et al.*, 1985; Sugaya *et al.*, 1990; Rabergh *et al.*, 1991, *in* Bury *et al.*, 1996). Bury *et al.* (1996) sugere que a exposição das brânquias e da superfície do corpo a células lisadas de *M. aeruginosa* é uma das causas mais provável do "stress" induzido em *Salmo Trutta* L.. Rabergh *et al.* (1991) referem o efeito hemorrágico da microcistina-LR no fígado da carpa, não tendo a observação histológica de outros órgãos detectado anormalidades. Kotak *et al.* (1996) observaram lesões no rim de *Oncorhynchus mykiss*, nomeadamente necrose tubular com dilatação da capsula de Bowman. A actividade de Na⁺, K⁺ATPase parece ser inibida pela microcistina-LR, visto que estas toxinas são inibidoras das fosfatases PP1 e PP2, as quais estão envolvidas na etapa de desfosforilação da Na⁺, K⁺ATPase (Bury *et al.*, 1996). Foram também observadas alterações no desenvolvimento embrionário de *Brachydanio rerio* devido à acção directa de toxinas libertadas por cianobactérias (Oberemm *et al.*, 1997).

1.3. *Cylindrospermopsis raciborskii*

A ocorrência de *Cylindrospermopsis raciborskii* foi relatada pela primeira vez, na Austrália, na albufeira de Soloman, em Palm Island, tendo sido relacionada com casos de hepatoenterites ocorrida na população humana dessa ilha (Falconer, 1994; Gupta, 1998). Este foi o pior caso de envenenamento em seres humanos na Austrália resultante da exposição a uma toxina de cianobactérias. *Cylindrospermopsis raciborskii* foi igualmente apontada como causa da doença que ficou conhecida como surgimento Barcoo, na década de 1990 (Hayman, 1992, *in Saker et al.*, 1998). Os efeitos tóxicos desta espécie são hoje atribuídos a uma nova toxina - cilindrospermopsina (CYN).

Cylindrospermopsis raciborskii é um organismo tropical e subtropical que se desenvolve bem entre 27,1°C e 29,5°C (Fabbro e Duivenvoorden, 1996, *in Chiswell et al.*, 1999). No entanto, tem sido também observado em climas temperados nomeadamente na Hungria, França, Portugal e USA (Padisak, 1997 *in Chorus*, 2000).

1.3.1. Cilindrospermopsina

A cilindrospermopsina é um alcalóide que possui uma guanina cíclica ligada a o grupo hidroximetiluracil. Tem um peso molecular de 415 daltons (Chiswell *et al.*, 1999).

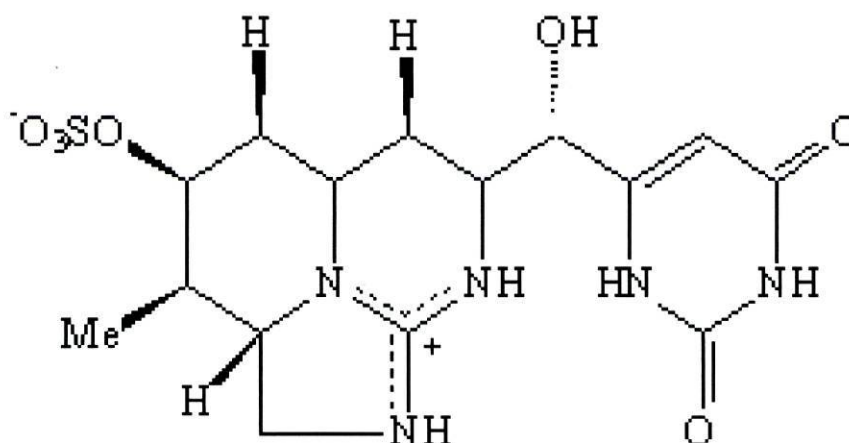


Figura 2 - Estrutura molecular da cilindrospermopsina

Recentemente, novas variantes de cilindrospermopsina foram identificadas, provenientes de extractos da *Cylindrospermopsis raciborskii*, da Austrália, onde foram identificadas como cilindrospermopsina-demethoxy (Chiswell *et al.*, 1999).

A cilindrospermopsina é considerada como sendo uma potencial ameaça à vida selvagem e ao Homem (Chiswell *et al.*, 1999). Foi relacionada com uma série de danos a nível da saúde, desde gastroenterites até doença renal (Falconer, 1994). A cilindrospermopsina pura afecta essencialmente o fígado, embora injeções de extractos de *Cylindrospermopsis raciborskii* ou extractos administrados oralmente a ratos induzem também alterações a nível do rins, timo e coração (Sivonen, 1990). Estudos *in vitro* com cilindrospermopsina pura demonstraram que esta inibe a síntese da

glutathiona e a síntese proteica, em geral (Runnegar *et al.*, 1994, 1995; Terao *et al.*, 1994 in Chorus *et al.*, 1999).

1.4. *Brachydanio rerio* como organismo teste

Brachydanio rerio (Figura 3), vulgarmente conhecido como "peixe zebra", pertence à classe Actinopterygii, à ordem Cypriniformes, à família Cyprinidae.



Figura 3 - Fotografia do peixe Zebra, adulto,

É uma espécie tropical (20 a 24°C), dulçaquícola, proveniente da Índia Oriental e atinge um comprimento máximo de cerca de 6 cm. Tem o dorso verde-azeitona e as zonas lateral e ventral dourado-prateado. As zonas laterais e as barbatanas estão marcados com largas listas longitudinais azuis e a barbatana dorsal é debruada a branco. É um peixe de pouca

profundidade, muito activo e absolutamente pacífico, podendo conviver com outros peixes de pequeno tamanho. O peixe zebra tem sido usado como um modelo em estudos de biologia de Vertebrados (Serra *et al.*, 1999) devido às características que tornam mais fácil a sua exploração relativamente a outros (Vascoto *et al.*, 1997). Um dos seus atributos é o grande número de embriões que podem ser conseguidos, a facilidade de manipulação embrionária, o desenvolvimento rápido e a relativa transparência dos embriões. Outra razão é o facto das suas dimensões serem relativamente reduzidas, o que representa uma economia de espaço em laboratório. O peixe zebra desempenhou um papel fundamental em outras áreas de investigação incluindo estudos do comportamento, reprodução, genética e ecotoxicologia. É considerada uma espécie padrão em ecotoxicologia, sendo recomendada pela OCDE como organismo teste em protocolos internacionais (e.g. OCDE, 2000). As aplicações desta pesquisa incluem manipulações de stocks comerciais de espécies de grande valor económico, avaliação do impacto ambiental de efluentes industriais e estabelecimento de relações causa/efeito de doenças genéticas (Vascoto *et al.*, 1997).

1.5. Testes de avaliação ecotoxicológica

Desde há várias décadas que a ciência recorre à experimentação animal. No entanto, tem vindo a verificar-se um aumento da preocupação relativamente à melhoria das técnicas que visam minimizar "stress", dor e sofrimento dos animais utilizados. Neste sentido, foi introduzido em diversos países regulamentação relativo ao uso animais para fins experimentais, a fim de os

proteger. Um bom exemplo é a directiva 86/609/CEE da União Europeia relativa a disposições legislativas, regulamentares e administrativas dos Estados-membros respeitantes à protecção dos animais utilizados para fins experimentais e educativos.

Em 1959, William Russel e Rex Burch escreveram o livro "Principles of Humane Experimental Technique". Nesta obra, os autores sugerem que um plano experimental correcto deve considerar métodos que diminuam a dor, o "stress", o número de animais necessário para um dado fim ou a sua substituição por modelos não-animais. Esta filosofia ficou conhecida como o conceito dos três "R" de Russel and Burch "Replacement, Reduction & Refinement" (Russel & Burch, 1959). O conceito de *Refinamento* refere-se aos métodos que eliminam ou minimizam a dor ou mal estar tendo em vista melhor o bem estar do animal antes, durante e após o período experimental. O conceito de *Redução* refere-se à diminuição do número de animais utilizado sem perda de informação relevante. O conceito de *Substituição* refere-se à utilização de métodos alternativos que possam substituir o uso de espécies consideradas muito sensíveis e de elevada "consciência" (Russel & Burch, 1959).

Nas últimas décadas, tem vindo a efectuar-se um esforço no sentido de desenvolver métodos alternativos/complementares aos tradicionais testes de ecotoxicidade que sejam mais eficazes do ponto de vista científico mais rápido e económicos. Os testes convencionais com animais *in vivo* testam a resposta de um grupo de organismos considerado significativo. É avaliada a resposta geral do organismo a testar. Podem considerar-se basicamente

dois tipos de ensaios: agudos, de curta duração, em que o critério é a morte do organismo; crônicos, de longa duração, em que são geralmente avaliados os efeitos a nível da reprodução e do crescimento. Os métodos alternativos/complementares, que têm sido desenvolvidos em Ecotoxicologia incluem testes utilizando novos critérios indicativos de toxicidade, sistemas *in vitro* e testes *in situ*. Os critérios indicativos de toxicidade a um nível baixo de organização biológica dão uma resposta precoce. Nos ensaios *in vitro* é avaliada a resposta de células ou sistemas sub-celulares. Um dos tipos de resposta mais utilizado é o efeito na actividade de enzimas-chave em processos fundamentais para a sobrevivência dos organismos (*e.g.* destoxificação, obtenção de energia). Os testes *in situ* efectuados no local em estudo com espécies autoclones ou com espécies padrão são testes com maior relevância ecológica.

O uso de sistemas *in vitro* permite uma maior eficácia no controlo das condições do ensaio, diminui a variabilidade entre as experiências, reduz as quantidades de composto a testar, produz menor quantidade de desperdícios tóxicos e proporciona geralmente a obtenção mais rápida de resultados (Baksi e Frazier, 1990). No entanto, devem ser tidas em consideração as limitações destes sistemas, dos quais se destaca o facto dos métodos *in vitro* não considerarem os efeitos integrados que ocorrem no organismo como um todo (Brady e Gray, 1995) e o efeito da biotransformação dos compostos parentais.

Os sistemas *in vivo* permitem realizar estudos de maior duração, avaliando a resposta geral do organismo à substância a testar, mas geralmente

envolvem um número elevado de animais e frequentemente produzem uma quantidade considerável de resíduos tóxicos (Gulden *et al.*, 1993).

Slabbert *et al.* (1999) demonstraram que actualmente, não existe um método simples que possa satisfazer completamente todos os requisitos. Por esta razão, os testes de toxicidade devem ser aplicados de modo a que uns testes possam complementar outros, sempre que o fim o justifique.

Os métodos de detecção das cianotoxinas mais usados são os bioensaios com ratos, ensaios químicos e técnicas imunoensaios. O bioensaio com ratos que foi o primeiro teste para avaliar a toxicidade de material de fluorescência e em culturas laboratoriais/extractos celulares, têm vindo a ser substituído pelos bioensaios em organismos aquáticos, métodos químicos e imunomonológicos (Carmichael, 1997; Roset *et al.*, 2001). Para além das razões éticas, as maiores desvantagens dos bioensaios com ratos são a de não podem detectar as toxinas a baixas concentrações e de não conseguirem distinguir hepatotoxinas de neurotoxinas, quando estas estão presentes na mesma amostra. Estas limitações levaram ao desenvolvimento de outro tipo de ensaios usando invertebrados, bactérias e linhas de células em cultura (Kiviranta *et al.*, 1992).

1.6. Biomarcadores em Ecotoxicologia

A necessidade de compreender e prever o efeito prejudicial dos poluentes nos organismos e nas populações em virtude do aumento da poluição, levou os

investigadores a procurar parâmetros que permitam detectar os efeitos nocivos antes que eles possam comprometer o funcionamento do ecossistema. O uso de biomarcadores em Ecotoxicologia pretende dar um contributo importante a esta questão funcionando como sistemas de "alerta precoce". No sentido abrangente do termo, biomarcador é definido como uma variação bioquímica, celular, fisiológica ou comportamental que pode ser medida em amostras de tecido, nos fluídos corporais ou no corpo de todo o organismo, susceptível de relacionar o grau de disfunção produzido por um determinado tóxico com o tempo de exposição (Depledge, 1994; Peakall, 1994a; Fossi e Marsili, 1997).

Os biomarcadores podem ser classificados em biomarcadores de exposição, de efeito e de susceptibilidade (Timbrell *et al.*, 1994). Podem também ser divididos em biomarcadores gerais, se têm a capacidade de responder a uma grande variedade de agentes químicos, e biomarcadores específicos, se respondem somente a determinados grupos de substâncias químicas (Livingstone e Goldfarb, 1998). Os biomarcadores gerais incluem qualquer factor que seja alterado pela exposição a vários agentes de "stress". Os biomarcadores específicos podem, ainda, sub-dividir-se em específicos de um órgão e de um tóxico. Dentro dos biomarcadores específicos de órgãos estão incluídos marcadores de funcionamento dos órgãos, enzimas e isoenzimas específicas desses órgãos. Estas enzimas, quando esses órgãos são danificados, surgem em concentrações mais elevadas no sangue e são indicadoras da presença e/ou da extensão da lesão. Os biomarcadores específicos de tóxico referem-se à quantificação de actividade de certas enzimas ou biomoléculas num tecido e são indicadoras do grau de exposição

ou dos possíveis efeitos em virtude de um composto químico ou um grupo de compostos semelhantes. A inibição da actividade da acetilcolinesterase (AChE) por compostos organofosforados é um desses exemplos (Guilhermino *et al.*, 1996a). Os biomarcadores específicos têm possibilitado relacionar os resultados obtidos à exposição de organismos terrestres e aquáticos a compostos químicos no laboratório e no campo (Mayer *et al.*, 1992).

A escolha de um biomarcador para monitorizar a exposição e os efeitos causados para uma determinado tóxico deve ser alvo de uma rigorosa selecção. Mayer e seus colaboradores (Mayer *et al.*, 1992) estabeleceram os seguintes requisitos:

- (a) Deve permitir estabelecer uma relação quantitativa dose/efeito ou tempo/efeito com vista à avaliação da magnitude de algumas alterações.
- (b) Deve ser facilmente mensurável, uma vez que técnicas dispendiosas/morosas poderão inviabilizar a sua utilização por rotina.
- (c) Deve ter um significado biológico, uma vez que só se deverá utilizar biomarcadores que estejam relacionados com processos biológicos importantes.
- (d) Deve ser suficientemente sensível, de modo a evitar o uso de doses letais do tóxico(s) testado(s).
- (e) A sua variabilidade em relação aos outros parâmetros deve ser aceitável dentro de certos limites, como por exemplo a temperatura, estação do ano, sexo, etc.

1.6.1. Acetilcolinesterase (AChE)

A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina (ACh) em colina e acetato nas sinapses colinérgicas após a transmissão do impulso nervoso (Peakall, 1992), pelo que é fundamental para a sobrevivência dos animais. A acetilcolina é libertada da membrana pré-sináptica de um neurónio, ligando-se a uma proteína receptora da membrana pós-sináptica seguinte. Esta ligação permite a transmissão do impulso nervoso, através da sinapse. A ACh é rapidamente hidrolisada em acetato e colina, finalizando deste modo a transmissão sináptica mediada por este neurotransmissor.

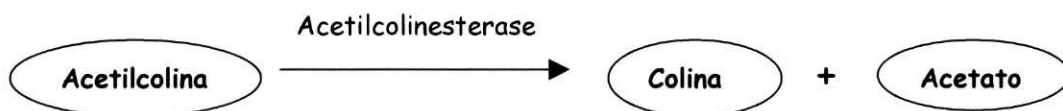


Figura 4 - Reacção geral catalizada pela acetilcolinesterase

A actividade da AChE tem sido usada como biomarcador de agentes neurotóxicos, quer em estudos de laboratório quer em estudos no terreno, sendo utilizado como critério a sua inibição (Barros *et al.*, 1998).

1.6.2. Glutathione S-transferases (GST)

Um grupo importante biomarcadores são os envolvidos no metabolismo dos xenobióticos. Este metabolismo é, normalmente, dividido em duas fases: fase I, das reacções de biotransformação e fase II, das reacções de conjugação (Moore *et al.*, 1986). A fase I envolve a introdução de um grupo

funcional reactivo (*e.g.* -OH, -NH₂, -COOH, etc) à molécula do xenobiótico, por reacções de oxidação, redução, hidrólise, hidroxilação, que permitam a sua conjugação na fase II (Timbrell, 1993). O citocromo P450 pertence a uma das maiores classes de enzimas de destoxificação que vão catalizar as reacções de oxidação (Snyder, 2000). A fase II envolve reacções biosintéticas onde o composto estranho ou o metabolito formado na fase I é covalentemente ligado a moléculas endógenas (Hodgson e Levi, 1997).

As enzimas glutathione S-transferases (GST) pertence à fase II do metabolismo, estando envolvidas na transformação de compostos endógenos e exógenos. As enzimas pertencentes a esta família catalisam a conjugação de moléculas orgânicas, que têm um centro reactivo eletrofílico, com o grupo tiol da glutathione (GSH), um tripéptido constituído pelos aminoácidos glicína, cisteína e glutamato (Di Giulio *et al.*, 1995). Em virtude destas reacções, obtêm-se produtos conjugados mais solúveis em água do que as moléculas lipofílicas, o que facilita a sua excreção (Clark, 1989; Trimbrell, 1993).

A indução destas enzimas, bem como a concentração dos produtos conjugados têm sido utilizados como biomarcadores gerais (Newman, 1998).

1.6.3. Lactato desidrogenase (LDH)

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima que participa no processo glicolítico catalizando a redução reversível do piruvato a lactato, sendo importante na manutenção do potencial redox. Deste modo, resulta a forma

oxidada da coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+), o que vai permitir a continuação da glicólise em anaerobiose (Stryer, 1995).



Figura 5 - Reacção catalizada pela lactato desidrogenase

A enzima LDH é um tetrâmero de 4 subunidades com 4 locais de ligação independentes. Esta existe sob várias formas isoméricas predominando cada forma em diversos tecidos (em aerobiose ou anaerobiose) (Gupta *et al.*, 1991). A LDH é uma enzima intracelular e por isso os seus níveis no soro são normalmente baixos. No entanto, quando ocorrem lesões nos tecidos, pode ocorrer um aumento desta enzima no meio extracelular e no sangue (Peakall, 1992).

A medição da actividade de enzimas reguladoras, como a LDH, pode constituir um indicador útil do estado metabólico do organismo. As alterações da LDH podem estar relacionadas com o mecanismo de acção do tóxico, directa ou indirectamente, e também fornecer indicação do dano causado ao órgão lesado (Gupta *et al.*, 1991).

1.6.4. Fosfatase Serina/Treonina

As fosfatases Serina/Treonina representam uma classe única de enzimas em células eucarióticas que catalizam a desfosforilação de fosfoserina ou resíduos de fosfotreonina (Dawson *et al.*, 1999). Classicamente, estas enzimas foram distinguidas em quatro tipos (PP-1, PP-2A, PP-2B e PP-2C) pela sua sensibilidade aos inibidores e pela especificidade do substrato *in vitro* (Cohen, 1989).

A fosforilação das proteínas desempenha um papel muito importante na regulação de diversos processos celulares, incluindo diferenciação, divisão celular, metabolismo, contractilidade, fertilização e memória (Cohen, 1989). Estas respostas são reguladas por um delicado balanço entre as cinases proteicas e as fosfatases proteicas (Hunter, 1992).

Durante a fosforilação proteica, o grupo fosfato é transferido para a serina, treonina ou resíduos de tirosina da proteína da molécula adenosina trifosfato (ATP) pela proteína Cinase. O grupo fosfato é hidrolisado pelas fosfatases proteicas.

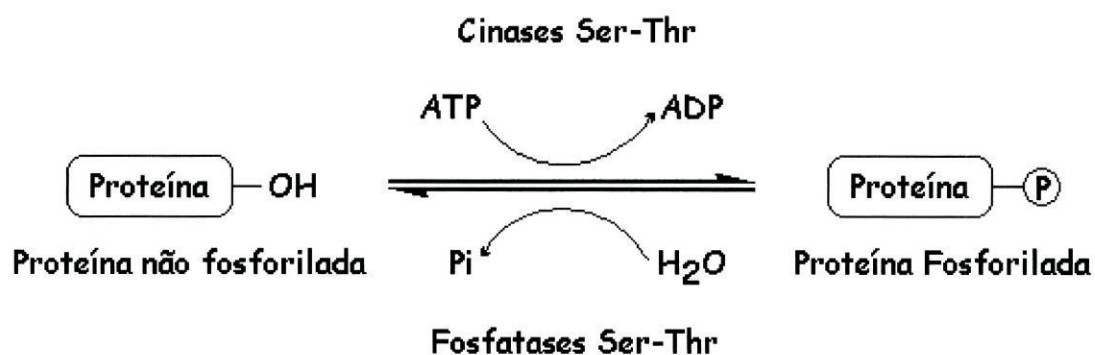


Figura 6 - Esquema do funcionamento da fosforilação proteica

As microcistinas inibem as proteínas fosfatases 1 e 2A (PP1 e PP2A) no fígado dos ratos (Eriksson *et al.*, 1990; Mackintosh *et al.*, 1990). A inibição destas enzimas no fígado está aparentemente associada à deformação dos hepatócitos devido à reorganização dos microfilamentos (Eriksson *et al.*, 1990). A promoção do tumor do fígado pode estar relacionado com a capacidade das toxinas de promover a hiperfosforilação das citoceratinas associadas às mudanças morfológicas em hepatócitos dos ratos (Ohta *et al.*, 1994). No entanto, Takenaka *et al.* (1999) refutaram a teoria de que a inibição das fosfatases proteicas pelas microcistinas conduzem à necrose das células do fígado. Concluíram que o mecanismo da toxicidade nas células do fígado pela microcistina era diferente do mecanismo da promoção do tumor do fígado pela microcistina.

1.7. Objectivos do trabalho

O objectivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade aguda e crónica de substâncias produzidas por cianobactérias, nomeadamente microcistinas e cilindrospermopsina para *Brachydanio rerio* utilizando ensaios a diferentes níveis de organização biológica e diversos parâmetros indicativos. Particular atenção foi conferida ao estudo de parâmetros sub-letais, tais como actividade de enzimas-alvo ou determinantes nos processos de produção de energia ou destoxificação. Estes parâmetros podem ser utilizados como sinais de alerta precoce de potenciais efeitos nefastos a níveis superiores de organização biológica e permitir uma intervenção protectora atempada.

Neste estudo foram utilizadas as enzimas AChE, GST, LDH e fosfatase Serina/Treonina. A enzima acetilcolinesterase foi escolhida uma vez que desempenha papel fundamental nos mecanismos de neurotransmissão. Embora esta enzima seja considerada um biomarcador específico para compostos organofosforados e carbamatos, estudos efectuados nos últimos anos quer em laboratório, quer em campo, têm demonstrado que a enzima pode ser inibida por outros contaminantes ambientais (e.g. detergentes, alguns metais) a concentrações ecologicamente relevantes (Galvani *et al.*, 1992; Labrot *et al.*, 1997; Guilhermino *et al.*, 1998a, 1998b, 2000). As GST foram utilizadas uma vez que a via da glutathione poderia estar envolvida na destoxificação das toxinas estudadas. A LDH foi escolhida por desempenhar função importante na obtenção de energia, particularmente em condições de "stress" químico onde pode ser crucial a obtenção rápida de energia. Finalmente, as fosfatases serina/treonina foram utilizadas uma vez que estudos publicados por diversos autores referem alterações destas enzimas após exposição a microcistinas (Honkonen *et al.*, 1990; Runnegar *et al.*, 1993 in Gupta *et al.*, 1998).

II - MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Manutenção dos peixes em laboratório

Neste trabalho, utilizaram-se peixes da espécie *Brachydanio rerio*, machos, vulgarmente conhecidos como peixe zebra (raça "com véu"), entre 2 a 3 cm de comprimento. Os peixes foram mantidos numa sala climatizada ($20\pm 1^{\circ}\text{C}$), com fotoperíodo controlado (16hL:8hE), em aquários de vidro, com arejamento, durante um período mínimo de sete dias antes do início de cada teste.

Foi utilizada água dura (ASTM, 1980) como meio manutenção e de teste. O meio foi preparado a partir de soluções em água destilada dos compostos hidrogenocarbonato de sódio (19,2 g/l), sulfato de magnésio pentahidratado (12 g/l), cloreto de potássio (0,8 g/l) e sulfato de cálcio dihidratado (0,6 g/l). As três primeiras soluções foram preparadas com antecedência e conservadas no frio (4°C), durante um período máximo de 2 semanas. A solução de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foi sempre preparada na altura da sua utilização. Para cada 20 litros de ASTM foram utilizados 200 ml das soluções de NaHCO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl e 4 litros da solução de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, sendo o restante volume completado com água destilada, obtendo-se no final a composição referida na tabela 1.

Tabela 1 - Composição do meio ASTM (adaptado de Guilhermino *et al.*, 1996a)

Composto Químico	Quantidade (g/l)	Volume de reserva para produzir 20L de meio
NaHCO ₃	19,2	200 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	12	200 ml
KCL	0,8	200 ml
CaSO ₄ .2H ₂ O	2,4	4000 ml
pH : 7,6 - 8		

Os peixes foram alimentados três vezes por semana, tendo sido sujeitos a um jejum 24 horas antes do início de cada ensaio.

2.2. Espécies utilizadas

Neste trabalho foram utilizadas a estirpe IZANCYA 3 da espécie *Microcystis aeruginosa* e a espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*. A estirpe IZANCYA 3, fornecida pelo Laboratório de Ecotoxicologia da Faculdade de Ciências, foi isolada e cultivada em meio Z8 (Kotai, 1972) conforme descrito por Vasconcelos em 1994. A espécie *C. Raciborskii*, fornecido por Dr. M. Saker, do Laboratório de Ecotoxicologia da Faculdade de Ciências tendo sido obtido a partir de uma florescência ocorrida na Austrália (Saker *et al.*, 1999).

2.3. Isolamento e preparação do material biológico de origem animal

O material biológico de origem animal utilizado neste trabalho foi obtido a partir de 1 cabeça, um par de brânquias, músculo e 3 fígado de peixe-zebra. Todas as operações foram efectuadas à temperatura de 4°C.

Para determinação das actividades enzimáticas utilizaram-se quatro tampões: tampão fosfato (0,1M; pH=6,5), tampão fosfato (0,1M; pH=7,1), tampão Tris/NaCl (0,08M Tris, 0,2M NaCl; pH=7,2) e tampão para as fosfatases (50mM Tris, 0,4mM NaCl, 0,5mM EDTA, 0,5mM DTT; pH=7,0). O tampão fosfato foi preparado a partir de duas soluções de reserva: uma solução básica [0.1 M de hidrogenofosfato de dipotássio (K_2HPO_4) em água ultra-pura] à qual se adicionou uma solução ácida [0,1M de dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) em água ultra-pura]. As soluções foram misturadas de modo a obter um valor de pH igual a 7,2 e 6,5. O tampão Tris/NaCl foi preparado a partir da dissolução de 4,92g de Tris e 5,95g de NaCl em água ultra-pura, até perfazer 500ml. A solução foi ajustada a um pH igual a 7,2, com HCl (5mol/l), a 25°C. O tampão para a determinação da fosfatases serina/treonina foi preparado a partir da dissolução de 0,6025g de Tris, 0,0023g de NaCl, 0,0146g de ácido etileno diamino tetracético e 0,0077g de ditiotretol em água ultra-pura, até perfazer 100ml. Foi ajustado o pH para 7,0, com HCl (5mol/l).

Após o sacrifício do peixe, por decapitação, a cabeça, brânquias, músculo e fígado foram isolados, fraccionados em pequenas porções e colocados em tubos de microcentrífuga contendo 1 ml de tampão fosfato (0,1M; pH=7,2), 0,5 ml de tampão fosfato (0,1M; pH=6,5), 1 ml de tampão Tris/NaCl (0,08M

Tris, 0,2M NaCl; pH=7,2) e 0,25 ml de tampão para as fosfatases (50mM Tris, 0,4mM NaCl, 0,5mM EDTA, 0,5mM DTT; pH=7,0), respectivamente. Em seguida as amostras foram homogeneizadas, durante 30 segundos, utilizando um homogeneizador Ystral GmbH Dottingen, tendo sido mantidas em gelo durante a homogeneização, de modo a evitar a desnaturação das enzimas. Os homogeneizados da cabeça e do músculo foram congelados a -20°C por um período máximo de 15 dias, enquanto os homogeneizados das brânquias e do fígado foram conservados a -80°C durante um período máximo de 15 dias. Na altura da realização do ensaio enzimático, o homogeneizado da cabeça foi descongelado e centrifugado a 6000 rpm durante 3 minutos, enquanto o do músculo a 5000 rpm durante 5 minutos, numa centrífuga SIGMA 113, recuperando-se o sobrenadante, em ambos os casos. Os homogeneizados das brânquias e do fígado foram centrifugadas numa centrífuga SIGMA 3K30, refrigerada a 4°C, a 9908 rpm, durante 30 minutos e 16207 rpm durante 1 hora, respectivamente, recuperando-se o sobrenadante.

Após a quantificação da proteína inicial (método de Bradford, ponto 2.8), os homogeneizados da cabeça, das brânquias e do músculo foram normalizados a 0,3mg/ml, 0,6mg/ml e 0,9 mg/ml, respectivamente.

2.4. Testes agudos *in vitro* baseados em biomarcadores

Os peixes foram mantidos em meio sem tóxico e sem alimento durante 24 horas. Após esse período, os peixes foram sacrificados e os homogeneizados preparados conforme descrito no ponto 2.3. Prepararam-se

seis concentrações, de 60 µg/ml a 1920 µg/ml de MCYST-LR e de 15,75 µg/ml a 500 µg/ml de CYN, com um factor de 1,2 entre si, por diluição de uma solução de reserva, preparada dissolvendo o extracto obtido a partir de um liofilizado de células em água ultra-pura. A concentração da toxina é de 91.9%.

Os homogeneizados (0,495 ml) preparados para cada enzima foram incubados, independentemente, durante 30 minutos a 25°C, com 0,005 ml das soluções preparadas a partir da solução de reserva.

Após o período de incubação foram determinadas as actividades de AChE, GST e LDH, conforme indicado no ponto 2.6 utilizando três peixes por tratamento.

Os critérios indicativos de toxicidade foram as alterações da actividade das enzimas AChE, GST e LDH.

2.5. Testes agudos *in vivo* baseados em biomarcadores

Os testes foram efectuados de acordo com as normas de OCDE (1993) utilizando a água dura ASTM (ASTM, 1980) como meio de teste. No início e durante os testes foram medidos a temperatura e o pH utilizando um aparelho portátil WTW pH 340-A/SET-1 e o oxigénio dissolvido utilizando um oxímetro WTW Oxi 320/SET às 0, 24, 48, 72 e 96 horas.

Os peixes foram colocados em recipientes de vidro, num litro de meio, em condições semi-estáticas, com intervalo de renovação do meio de 48 horas, à temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ e utilizando um fotoperíodo de 16 h L: 8 h E, tendo sido utilizados em cada tratamento nove peixes, divididos por três recipientes (três peixes por recipiente).

As concentrações testadas para cada toxina foram obtidas a partir da dissolução do extracto liofilizado em 1L de ASTM. Prepararam-se cinco concentrações, de $15,25\mu\text{g/ml}$ a $100\mu\text{g/ml}$ de MCYST-LR e $9,1\mu\text{g/ml}$ a $69,1\mu\text{g/ml}$ de CYN, com um factor de 1,6. A concentração da toxina é de 91.9%.

Após 96 horas, procedeu-se à preparação dos homogeneizados e sua conservação como descrito no ponto 2.3.

Os critérios indicativos de toxicidade foram as alterações da actividade das enzimas AChE, GST, LDH Fosfatase Serina/Treonina e número de mortes.

2.6. Teste crónico de 28 dias

O teste foi efectuado de acordo com as normas da OCDE (2000) utilizando o ASTM (ASTM, 1980) como meio de teste. No início e durante os testes foram controlados os valores da temperatura e o pH, utilizando um aparelho portátil WTW pH 340-A/SET-1, e o oxigénio dissolvido, utilizando um

oxímetro WTW Oxi 320/SET em todos os recipientes de 8 em 8 dias até perfazer 28 dias.

Os testes foram realizados em recipientes de vidro, num litro de meio, em condições semi-estáticas, com intervalo de renovação de 8 em 8 dias, à temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e utilizando um fotoperíodo de 16 h L: 8 h E, tendo sido utilizados em cada tratamento nove peixes, divididos por três recipientes (três peixes por recipiente).

As concentrações testadas para cada toxina foram obtidas a partir da dissolução do extracto liofilizado em 1L de ASTM. Prepararam-se cinco concentrações, de $2,5\mu\text{g/l}$ a $15,25\mu\text{g/l}$ de MCYST-LR e $2,5\mu\text{g/l}$ a $15,25\mu\text{g/l}$ de CYN, com um factor de 1,6. A concentração da toxina é de 91.9%.

No início e fim do teste procedeu-se à medição do peso conjunto dos três peixes existentes no mesmo recipiente.

Após o fim dos 28 dias, procedeu-se à preparação dos homogeneizados e sua conservação como descrito no ponto 2.3.

Os critérios indicativos de toxicidade foram as alterações da actividade das enzimas AChE, GST, LDH, Fosfatase Serina/Treonina, mortalidade e crescimento (determinado pela diferença entre o peso final e inicial).

2.7. Determinações enzimáticas

AChE

A actividade da enzima AChE foi determinada pelo método espectrofotométrico de Ellman (Ellman *et al.*, 1961), adaptado a microplaca (Guilhermino *et al.*, 1996a). Este método baseia-se na degradação do substrato acetiltiocolina em acetato e tiocolina pela acção da AChE. A tiocolina reage com o ácido 5,5-ditio-bis(2-nitrobenzóico) (DTNB) originando um complexo amarelo ($\epsilon = 1,36 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) cuja formação pode ser monitorizada a um comprimento de onda de 414nm. Em cada ensaio, foram adicionados a 0,05 ml de cada amostra de homogeneizado de cabeça, 0,250 ml da solução de reacção. Esta solução, preparada na altura da realização do ensaio enzimático, consistia em 30 ml de tampão fosfato (0,1M; pH=7,2) aos quais se adicionaram 0,2 ml de uma solução de acetiltiocolina 0,075 M e 1 ml de uma solução de DTNB 10 mM. Foram efectuadas quatro determinações por amostra e a solução de reacção foi usada como branco. A absorvância foi lida, a 25°C, num leitor de microplacas Multiskan EX, a 414 nm, durante 5 minutos, após um período de incubação de 10 minutos. A actividade da enzima foi expressa em Unidades (U) por mg de proteína, correspondendo uma U a uma nanomole de substrato hidrolisado por minuto.

GST

A actividade da enzima GST foi determinada pelo método espectrofotométrico de Habig (Habig *et al.*, 1974) adaptado a microplaca.

Este método baseia-se na conjugação do substrato CDNB com a glutationa (GST), pela acção da GST, originando um produto conjugado cuja formação pode ser monitorizada a um comprimento de onda de 340 nm. No ensaio, foram adicionados 0,2ml de solução reserva a 0,1 ml de amostra do homogeneizado de brânquia. A solução de reserva, preparada na altura da realização do ensaio enzimático, consistia em 4,950 ml de tampão fosfato (0,1 M; pH=6,5) aos quais se adicionaram 0,150 ml de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 10 mM (12,2 mg de CDNB em 1 ml de etanol absoluto) e 0,900 ml de GSH 10 mM (3,1 mg de GSH em 1 ml de tampão fosfato). Foram efectuadas quatro determinações por amostra e a solução de reacção foi usada como branco. A absorvância foi lida, a 25°C, num leitor de microplacas Multiskan EX, a 340 nm, de 20 em 20 segundos, durante 5 minutos. A actividade da enzima, calculada com base na lei de Beer-Lambert, foi expressa em Unidades (U) por mg de proteína, correspondendo uma U a uma nanomole de substrato hidrolisado por minuto.

LDH

A actividade da enzima LDH foi determinada pelo método espectrofotométrico de Vassault (Vassault *et al.*, 1983) adaptado a microplaca (Diamantino *et al.*, *in press*). Este método baseia-se na conjugação do substrato piruvato com NADH, pela acção da LDH, originando lactato e NAD⁺, cuja formação pode ser monitorizada a um comprimento de onda de 340 nm. Em cada ensaio, a 0,04 ml de amostra de homogeneizado de músculo foram adicionados 0,25 ml de solução Tris/NaCl/NADH e 0,04 ml de solução Tris/NaCl/Piruvato. A solução Tris/NaCl/NADH, preparada na altura da realização do ensaio enzimático, foi obtida por dissolução de

0,17mg de NADH em 1 ml de tampão Tris/NaCl. Esta solução foi mantida num banho termoestabilizado a 25°C durante 30 minutos. A solução Tris/NaCl/Piruvato preparada por dissolução de 1,07g de piruvato em 1 ml de tampão Tris/NaCl. Foram feitas quatro determinações por amostra e a solução de reacção foi usada como branco. A absorvância foi lida, a 25°C, num leitor de microplacas Multiskan EX, a 340 nm, de 20 em 20 segundos, durante 5 minutos. A actividade da enzima, calculada com base na lei de Beer-Lambert, foi expressa em Unidades (U) por mg de proteína, correspondendo uma U a uma micromole de substrato hidrolisado por minuto.

Fosfatases Serina/Treonina

A actividade das fosfatases serina/treonina foi determinada pelo método espectrofotométrico de Ekman (Ekman *et al.*, 1993) adaptado a microplaca. Este método baseia-se na conjugação do malaquite-verde com os fosfatos livres na presença de molibdato, originando o complexo molibdato-verde malaquite-fosfato que pode ser monitorizado a um comprimento de onda de 600 nm. Na determinação da actividade das fosfatases foi utilizado um conjunto de reacção "Serine/Threonine Phosphatase Assay System". Em cada ensaio, foram adicionados a uma mistura de reacção (A) 0,005 ml de amostra de homogeneizado de fígado e 0,05 ml de uma mistura tinta/aditivo de molibdato. A mistura A foi preparada na altura da realização do ensaio enzimático, por adição de 0,01 ml de tampão para as fosfatases a 0,005 ml de 1mM fosfopéptido. A mistura tinta/aditivo consistia em 0,01 ml de aditivo de tinta molibdato em 1 ml de solução de tinta de molibdato. Foram

feitas três determinações por amostra e a mistura foi usada como branco. A absorvância foi lida, a 25°C, num leitor de microplacas Multiskan EX, a 600 nm, após um período de incubação de 15 minutos. A actividade da enzima, calculada com base na lei de Beer-Lambert, foi expressa em μmol fosfato hidrolisado por minuto por mg de proteína.

2.8. Determinação da concentração de proteína

A concentração da proteína das amostras foi determinada, em triplicado, pelo método de Bradford (Bradford, 1976), adaptado a microplaca (Herbet *et al.*, 1995/96) utilizando γ -globulinas de bovino como padrão. Resumidamente, a 0,01 ml de amostra foram adicionado 0,250 ml de uma solução de Bio-Rad diluído em água ultra-pura numa proporção de 6:24. Foram efectuadas quadro padrões com diferentes concentrações da solução-padrão de γ -globulinas de bovino em água ultra-pura. Foram feitas quatro determinações por amostra. A absorvância foi lida num leitor de microplacas Multiskan EX, a 600 nm, após um período de incubação de 15 minutos.

2.9 Reagentes e compostos químicos utilizados

O hidrogenocarbonato de sódio, o sulfato de magnésio pentahidratado, o cloreto de potássio, o sulfato de cálcio dihidratado, o hidrogenofosfato de

dipotássio, o dihidrogenofosfato de potássio, o etanol, o tris-(hidroximetil)metilamina e cloreto de sódio foram fornecidos pela MERCK (Alemanha). A acetiltiocolina, o ácido 5,5-ditio-bis(2-nitrobenzóico), a glutationa, o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, o NADH, o piruvato, o EDTA, o DTT e as γ -globulinas de bovino foram fornecidos pela SIGMA (USA). O reagente para a determinação da proteína (reagente de Bradford) foi fornecido pela BIO-RAD (Alemanha). O conjunto de reacção para determinação das fosfatases serina/treonina foi fornecido por Promega (USA).

2.10. Análise estatística dos dados

Em cada ensaio, os diferentes tratamentos utilizados em cada teste de toxicidade foram comparados utilizando a Análise de Variância (ANOVA) Unifactorial. Os valores da Concentração de Efeito Não Observado (CENO) e da Concentração de Efeito Observado (CEO) foram determinados utilizando o teste de Dunnet (Zar, 1996).

III - RESULTADOS

3.1. Testes agudos *in vitro* baseados em biomarcadores

3.1.1. AChE

Na figura 7 estão representadas as médias de actividade da AChE obtidas para cada tratamento de concentração de MCYST-LR, com as respectivas barras de erro-padrão. Não foram encontradas diferenças significativas na actividade da AChE entre os vários tratamentos ($F=0,87$; g.l.=6, 14; $p>0,05$).

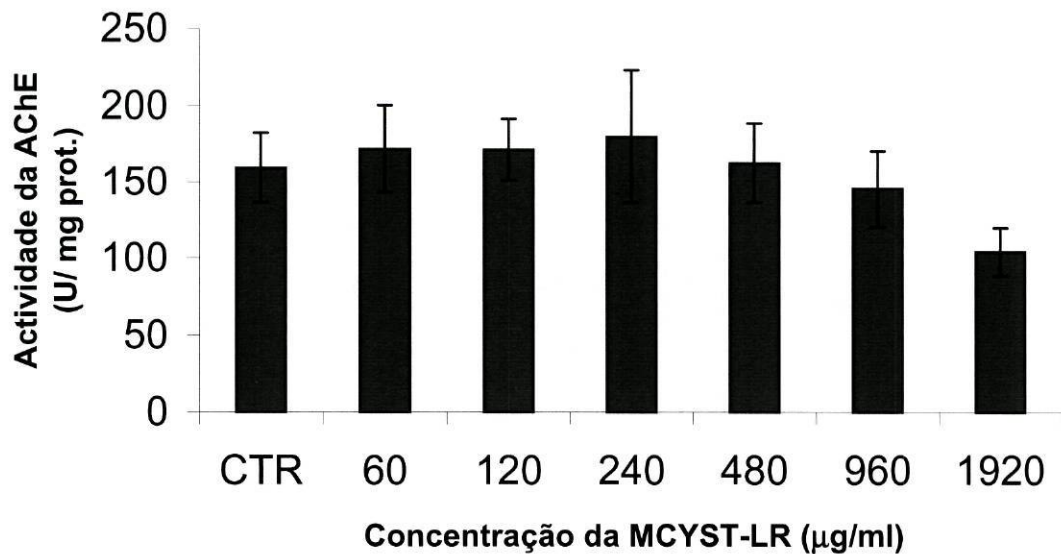


Figura 7: Actividade da AChE em função da concentração de MCYST-LR. Os valores correspondem à média de 3 réplicas (3 peixes) com as respectivas barras de erro-padrão.

Em relação à variação da actividade da AChE em função da concentração de CYN foram encontradas diferenças significativas na sua actividade ($F=10,19$; g.l.=6, 14; $p<0,05$) (Figura 8), sendo o valor de CEO igual a $250 \mu\text{g/ml}$ e o de CENO igual a $125 \mu\text{g/ml}$.

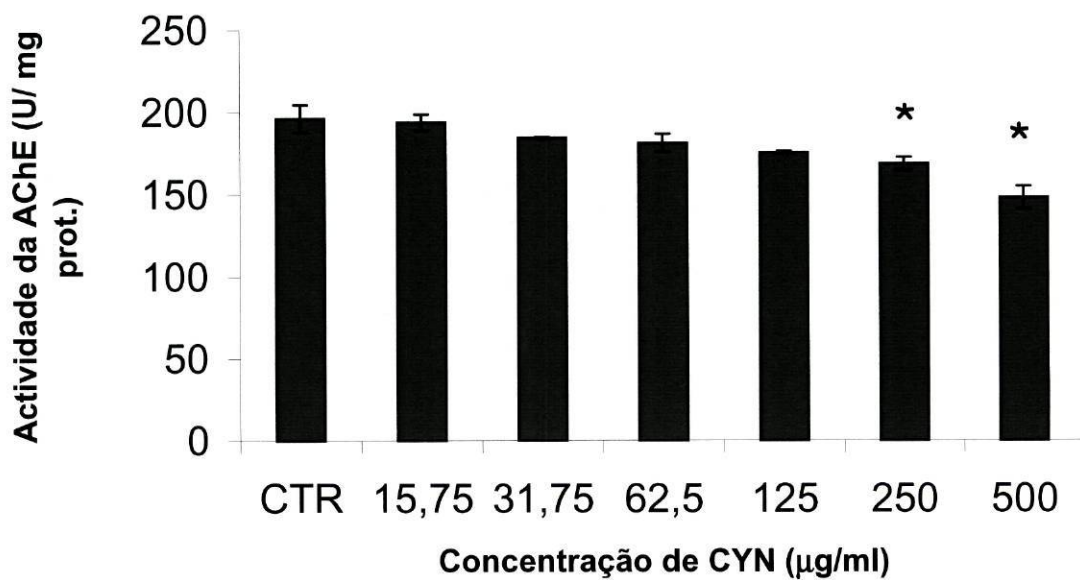


Figura 8: Actividade da AChE em função da concentração de CYN. Os valores correspondem à média de 3 réplicas (3 peixes) com as respectivas barras de erro-padrão.

* significativamente diferente do controlo ($p<0,05$)

3.1.2. GST

Não foram encontradas diferenças significativas na actividade das GST em função da variação da concentração de MCYST-LR ($F=0,02$; g.l.=6, 14; $p>0,05$) (Figura 9A) e da CYN ($F=0,03$; g.l.=6, 14; $p>0,05$) (Figura 9B).

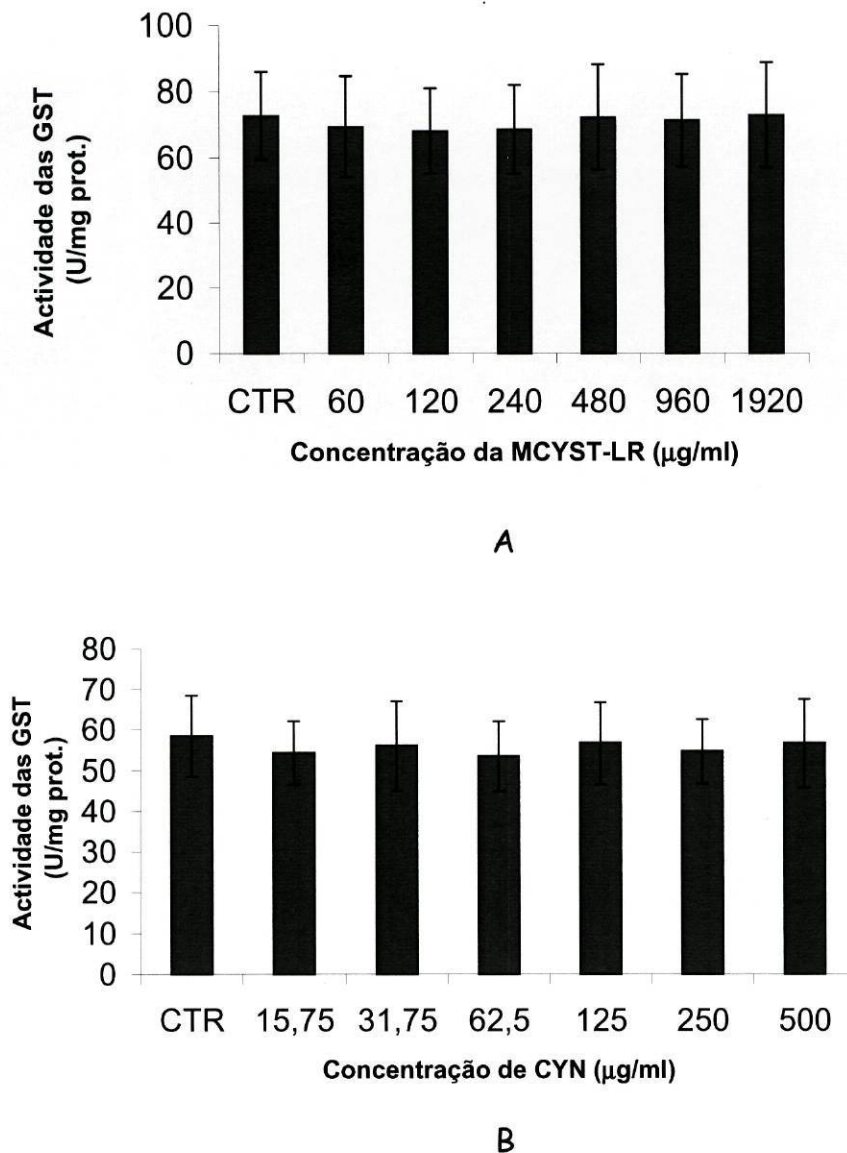
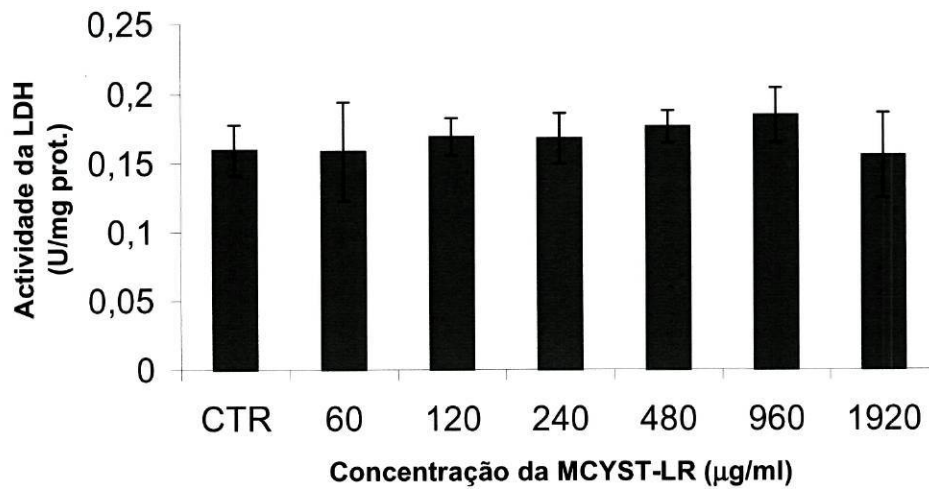


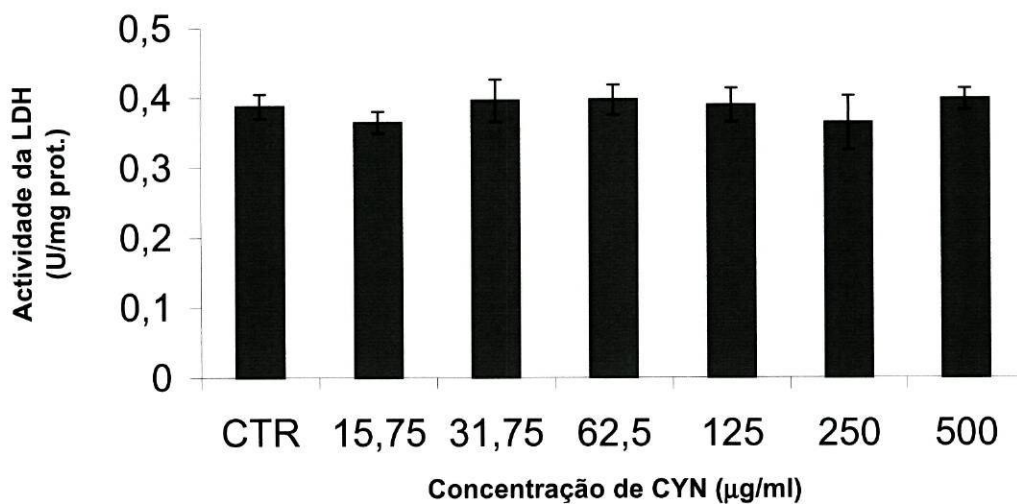
Figura 9: Actividade das GST em função da concentração de MCYST-LR (A) e da CYN (B). Os valores correspondem à média de 3 réplicas (3 peixes) com as respectivas barras de erro-padrão.

3.1.2. LDH

Não foram registadas diferenças significativas na actividade da LDH em função da concentração de MCYST-LR ($F=0,33$; g.l.=6, 14; $p>0,05$) (Figura 10A) e da CYN ($F=0,36$; g.l.=6, 14; $p>0,05$) (Figura 10B).



A



B

Figura 10: Actividade da LDH em função da concentração de MCYST-LR (A) e da CYN (B). Os valores correspondem à média de 3 réplicas (3 peixes) com as respectivas barras de erro-padrão.

3.2. Testes agudos *in vivo* baseados em biomarcadores

3.2.1. Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos registados no decorrer das 96 horas dos testes *in vivo* com MCYST-LR e CYN estão apresentados nas tabelas 2 e 3. Os valores representam as médias das leituras efectuadas no decorrer dos quatro dias de teste, em cada um dos recipientes teste, com os respectivos erros-padrão.

Tabela 2. Valores médios e respectivos erros-padrão obtidos para os parâmetros dos testes *in vivo* com MCYST-LR.

MCYST-LR($\mu\text{g/l}$) Parâmetros	CTR	15.25	24.4	39.0	62.5	100
pH	8,2 \pm 0,02	8,2 \pm 0,03	8,3 \pm 0,02	8,3 \pm 0,01	8,2 \pm 0,01	8,3 \pm 0,02
O ₂ (mg/l)	8,9 \pm 0,02	8,8 \pm 0,03	8,9 \pm 0,02	8,9 \pm 0,03	8,8 \pm 0,02	8,8 \pm 0,02
T (°C)	18,8 \pm 0,21	18,8 \pm 0,11	18,9 \pm 0,23	18,7 \pm 0,12	18,6 \pm 0,23	18,8 \pm 0,24

Tabela 3. Valores médios e respectivos erros-padrão obtidos para os parâmetros dos testes *in vivo* com CYN.

Parâmetros \ CYN($\mu\text{g/l}$)	CYN($\mu\text{g/l}$)					
	CTR	9.5	15.25	24.4	39.0	62.5
pH	8,3 \pm 0,023	8,3 \pm 0,021	8,3 \pm 0,020	8,3 \pm 0,017	8,3 \pm 0,021	8,2 \pm 0,09
O ₂ (mg/l)	8,8 \pm 0,03	8,8 \pm 0,02	8,7 \pm 0,03	8,8 \pm 0,04	8,7 \pm 0,03	8,7 \pm 0,03
T ($^{\circ}\text{C}$)	18,8 \pm 0,20	18,2 \pm 0,11	18,5 \pm 0,11	18,5 \pm 0,11	18,2 \pm 0,09	18,2 \pm 0,12

3.2.2. Biomarcadores

3.2.2.1 AChE

Na figura 11 estão representadas as médias de actividade da AChE obtidas para cada concentração de MCYST-LR com as respectivas barras de erro-padrão. Foram encontradas diferenças significativas na actividade da AChE entre os diversos tratamentos ($F=13,09$; g.l.=5, 48; $p<0,05$).

Houve um decréscimo da actividade da enzima desde a concentração de 15,25 $\mu\text{g/l}$ até 62,5 $\mu\text{g/l}$ de MCYST-LR tendo ocorrido um aumento na última concentração. O valor de CEO é de 100 $\mu\text{g/l}$ e o CENO é igual a 62,5 $\mu\text{g/l}$.

Em relação à variação da actividade da AChE em função da concentração de CYN não foram encontradas diferenças significativas ($F=0,91$; g.l.=5, 48; $p>0,05$) (Figura 12).

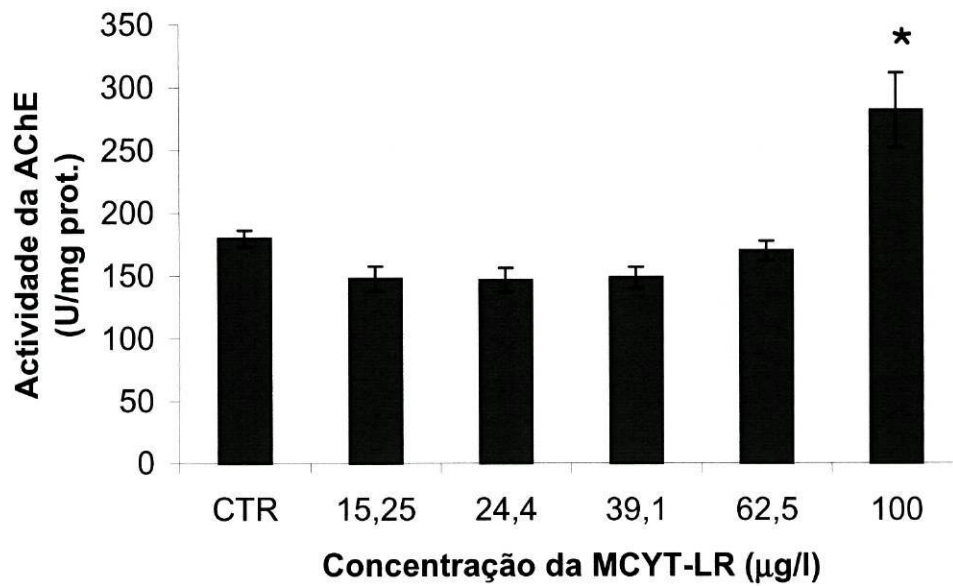


Figura 11 - Actividade da AChE em função da concentração de MCYST-LR. Os valores correspondem à média de 9 réplicas (9 peixes) com as respectivas barras de erro-padrão.

* significativamente diferente do controlo ($p < 0,05$)

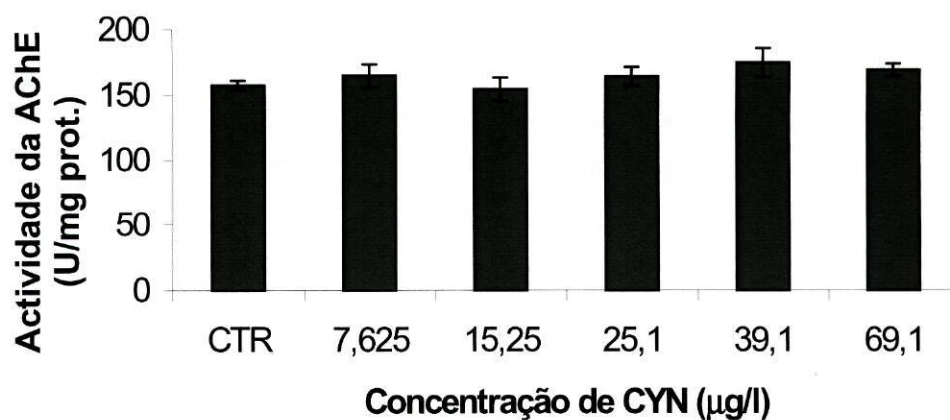


Figura 12 - Actividade da AChE em função da concentração de CYN. Os valores correspondem à média de 9 réplicas (9 peixes) com as respectivas barras de erro-padrão.

3.2.2.2 GST

Na actividade da enzima *GST* não foram encontradas diferenças significativas em função da concentração de MCYST-LR ($F=2,36$; g.l.=5, 48; $p>0,05$) (Figura 13).

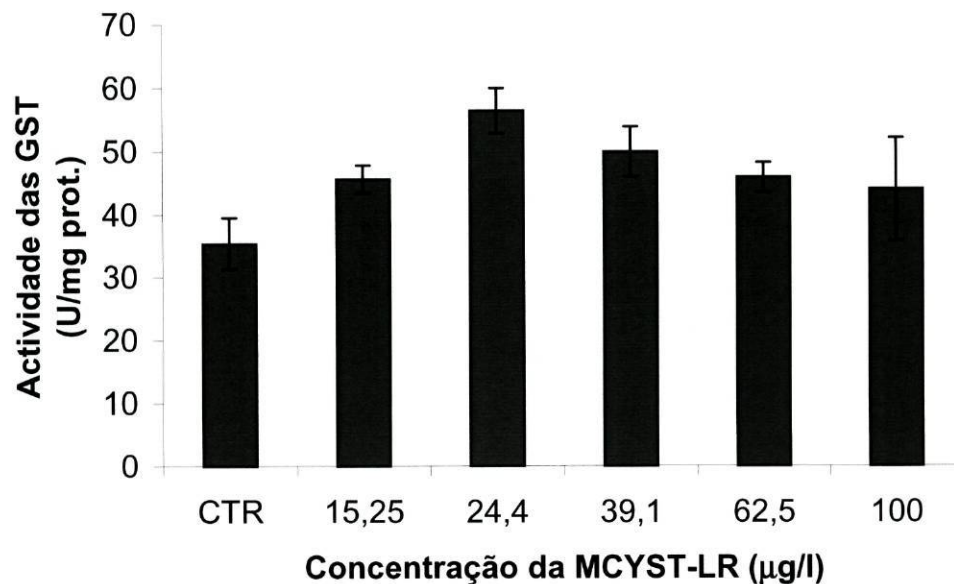


Figura 13 - Actividade das *GST* em função da concentração de MCYST-LR. Os valores correspondem à média de 9 réplicas (9 peixes) com as respectivas barras de erro-padrão.

No que diz respeito à variação das *GST* em função da concentração de CYN não ocorreu variação significativa na sua actividade ($F=2,43$; g.l.=5, 48; $p>0,05$) (Figura 14).

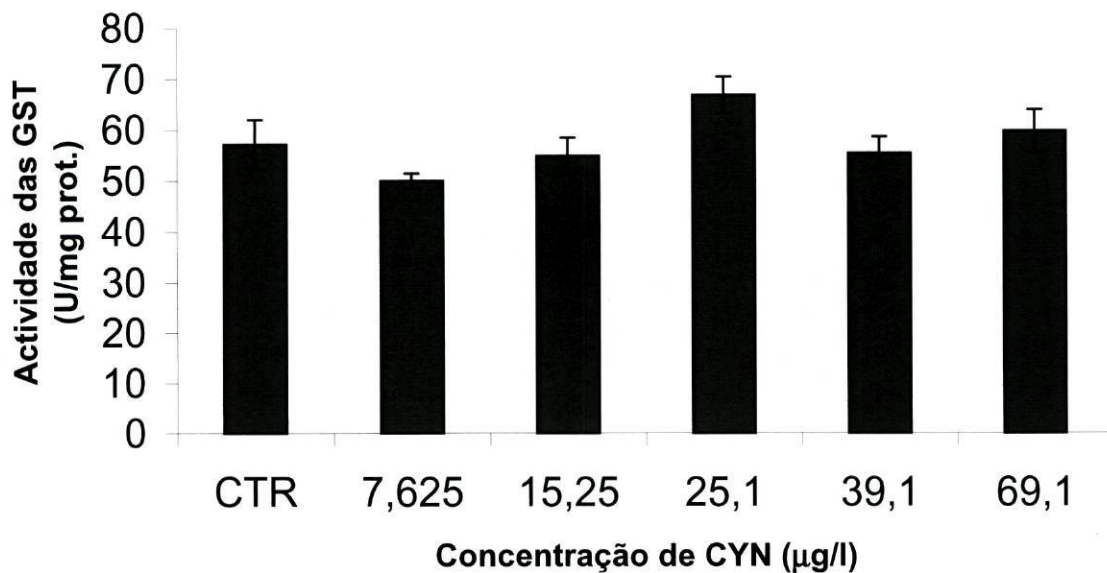


Figura 14 - Actividade das GST em função da concentração da CYN. Os valores correspondem à média de 9 réplicas (9 peixes) com as respectivas barras de erro-padrão.

3.2.2.3. LDH

Na figura 15 está representada a actividade da LDH em função da concentração de MCYST-LR. Houve alterações significativas na actividade da enzima ($F=8,6$; g.l.=5, 48; $p<0,05$) apenas no primeiro tratamento.

No que diz respeito à CYN não ocorreu variação significativa na actividade da enzima LDH ($F=1,32$; g.l.=5, 48; $p>0,05$) (Figura 16).

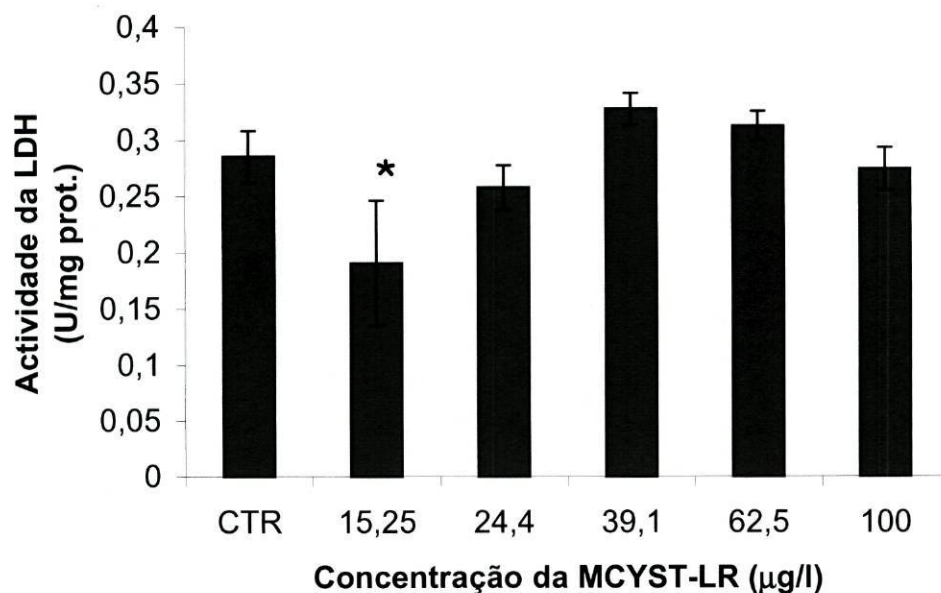


Figura 15 - Actividade da LDH em função da concentração da MCYST-LR. Os valores correspondem à média de 9 réplicas (9 peixes) com as respectivas barras de erro-padrão.

* significativamente diferente do controlo ($p < 0,05$)

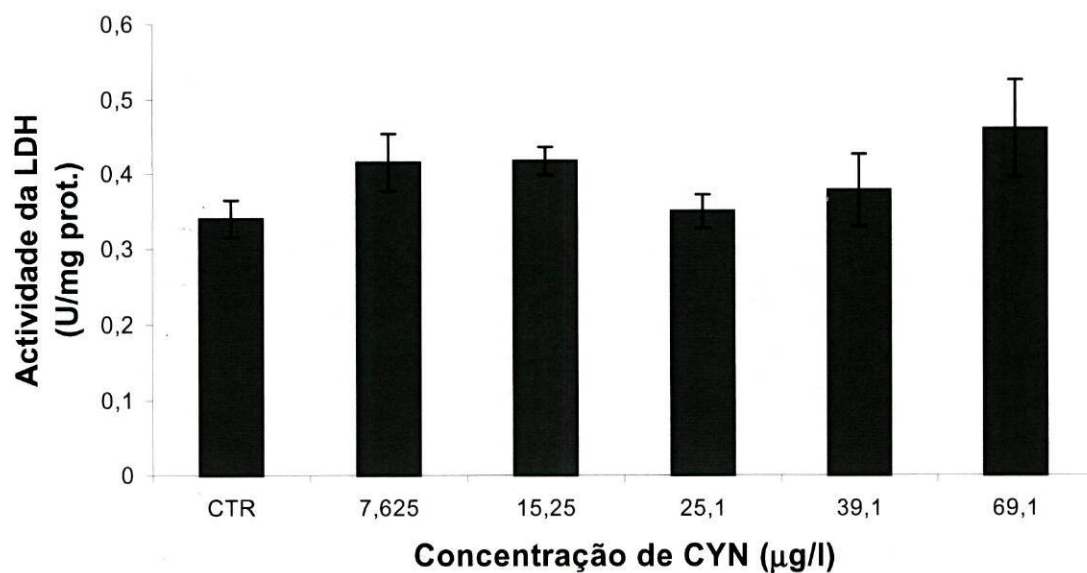


Figura 16 - Actividade da LDH em função da concentração da CYN. Os valores correspondem à média de 9 réplicas (9 peixes) com as respectivas barras de erro-padrão.

3.2.2.4 Fosfatase Serina/Treonina

Nas figuras 17 e 18 são apresentadas as médias da actividade da fosfatase Serina/Treonina em função da concentração da MCYST-LR e de CYN, respectivamente, com as respectivas barras de erro-padrão.

Relativamente à MCYST-LR e à CYN não foram detectadas diferenças significativas nas diversas concentrações ($F=0,8$; g.l.=5, 12; $p>0,05$ e $F=0,08$; g.l.=5, 12; $p>0,05$), respectivamente. Nota-se, no entanto, um ligeiro decréscimo na actividade da enzima em todas as concentrações, no que se refere aos tratamentos realizados com MCYST-LR.

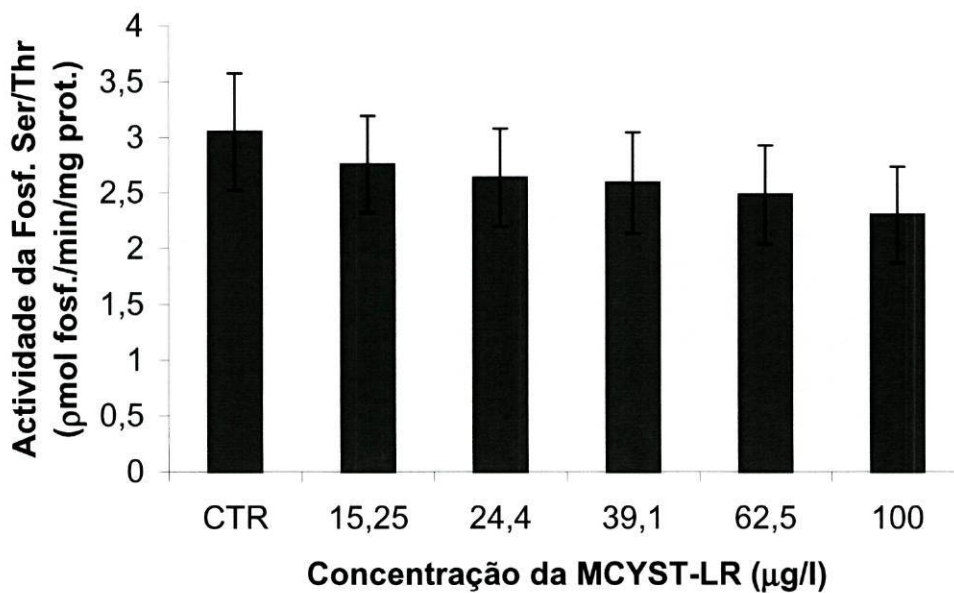


Figura 17 - Actividade da Fosfatase Serina/Treonina em função da concentração da MCYST-LR. Os valores correspondem à média de 9 réplicas (9 peixes) com as respectivas barras de erro-padrão.

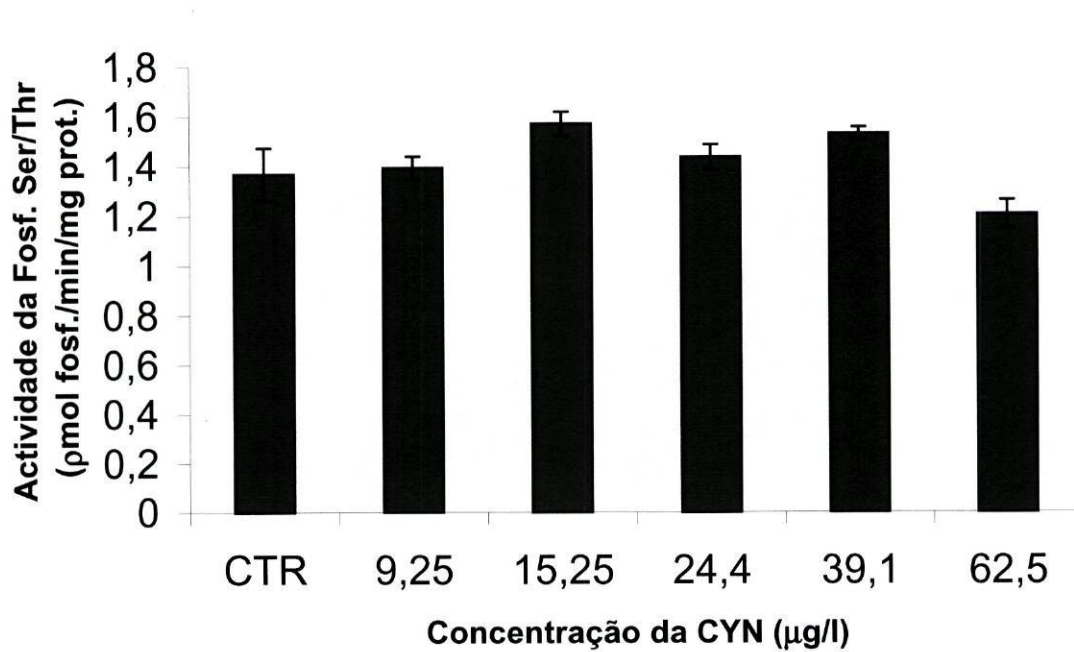


Figura 18 - Actividade de Fosfatase Serina/Treonina em função da concentração da CYN. Os valores correspondem à média de 3 réplicas (3 peixes por réplica) com as respectivas barras de erro-padrão.

3.3. Testes crónicos baseados em biomarcadores

3.3.1. Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos registados no decorrer dos 28 dias dos testes crónicos com MCYST-LR e CYN estão representados nas tabelas 4 e 5. Os valores representam as médias das leituras efectuadas no decorrer dos 28 dias do teste, com os respectivos erros-padrão.

Tabela 4. Valores médios e respectivos erros-padrão obtidos para os parâmetros dos testes crônicos com MCYST-LR.

MCYST-LR ($\mu\text{g/l}$) Parâmetros	CTR	2,32	3,72	5,95	9,53	15,25
PH	8,0 \pm 0,113	8,0 \pm 0,116	8,0 \pm 0,121	8,0 \pm 0,127	8,0 \pm 0,129	8,0 \pm 0,132
O ₂ (mg/l)	7,8 \pm 0,06	7,9 \pm 0,06	7,8 \pm 0,06	7,9 \pm 0,06	7,9 \pm 0,05	7,9 \pm 0,06
T (°C)	20 \pm 0,28	20,1 \pm 0,27	20 \pm 0,28	20 \pm 0,27	19,9 \pm 0,27	19,9 \pm 0,22

Tabela 5. Valores médios e respectivos erros-padrão obtidos para os parâmetros dos testes crônico com CYN.

CYN($\mu\text{g/l}$) Parâmetros	CTR	2,32	3,72	5,95	9,53	15,25
PH	8,3 \pm 0,017	8,3 \pm 0,017	8,3 \pm 0,019	8,3 \pm 0,017	8,4 \pm 0,014	8,3 \pm 0,017
O ₂ (mg/l)	6,7 \pm 0,112	6,7 \pm 0,057	6,7 \pm 0,063	6,8 \pm 0,065	6,7 \pm 0,075	6,51 \pm 0,058
T (°C)	21,2 \pm 0,40	21,2 \pm 0,47	21,1 \pm 0,39	21,1 \pm 0,40	21,4 \pm 0,41	21,5 \pm 0,38

3.3.2. Mortalidade/peso

Os valores de mortalidade obtidos após 28 dias de exposição dos peixes aos diferentes tratamentos estão representados na figura 19.

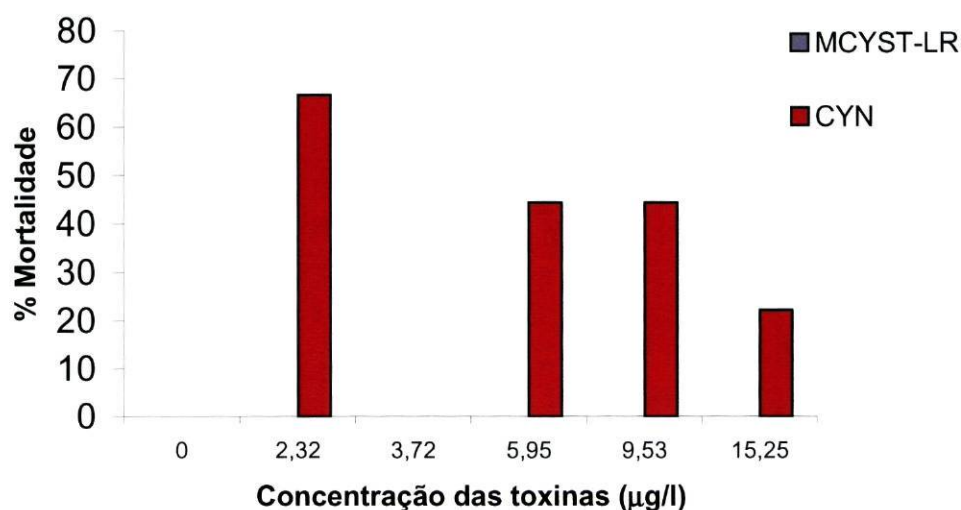


Figura 19 - Percentagem de mortalidade de *Brachydanio rerio* em função da concentração de toxina utilizada

No teste crónico os peixes foram pesados antes do início do teste e no fim do mesmo. Na tabela 6 está representada a variação média dos valores obtidos quer para a microcistina quer para a cilindrospermopsina. O sinal negativo significa perda de peso por parte dos peixes.

Tabela 6. Variação média dos valores do peso (g) no teste crónico.

Concentração(µg/l) Toxina	0	2,32	3,72	5,95	9,53	15,25
MCYST-LR	0,254	0,163	0,327	0,260	0,154	0,172
CYN	0,172	-0,108	-0,069	-0,101	-0,061	-0,063

3.3.3. Biomarcadores

3.3.3.1. AChE

As figura 20 e 21 apresentam as médias da actividade da AChE, obtidas nos testes crónicos, para cada concentração de MCYST-LR e CYN, com as correspondentes barras de erro-padrão. Não foram detectadas diferenças significativas na sua actividade ($F=0,9$; g.l.=5, 48; $p>0,05$ e $F=0,99$; g.l.=5, 12; $p>0,05$, respectivamente).

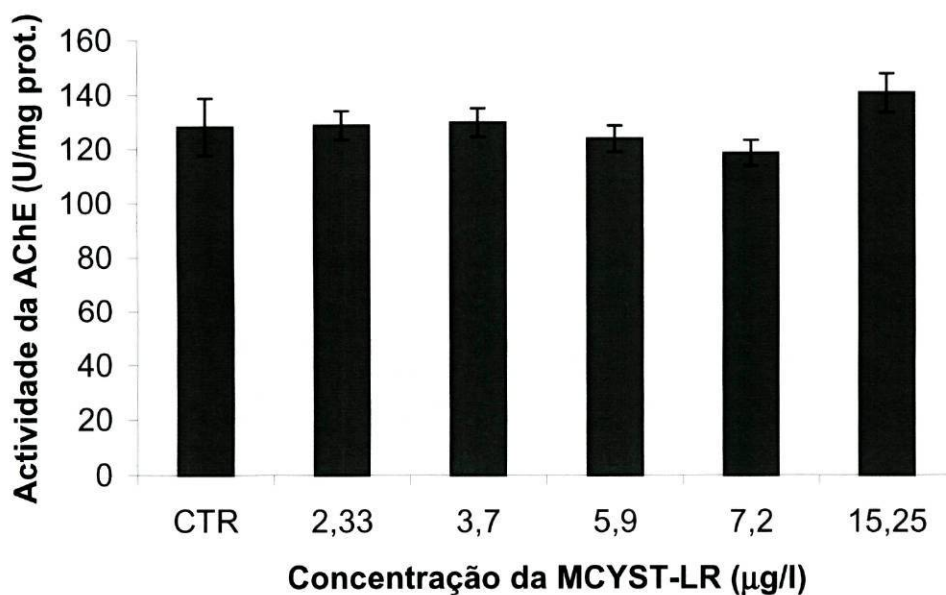


Figura 20 - Actividade da AChE em função da concentração da MCYST-LR. Os valores correspondem à média de 9 réplicas (9 peixes) com as respectivas barras de erro-padrão.

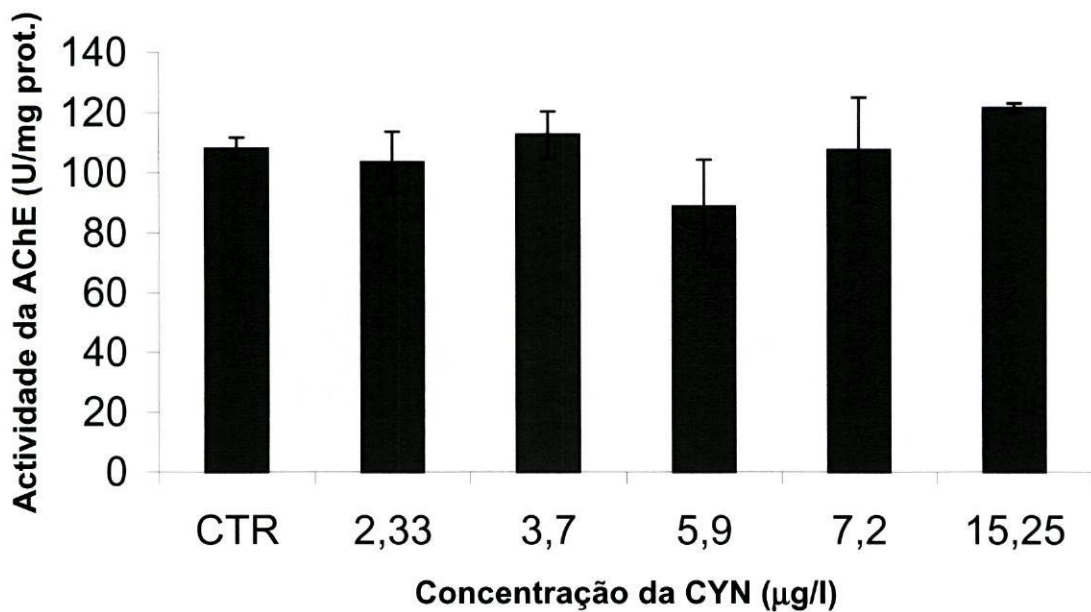
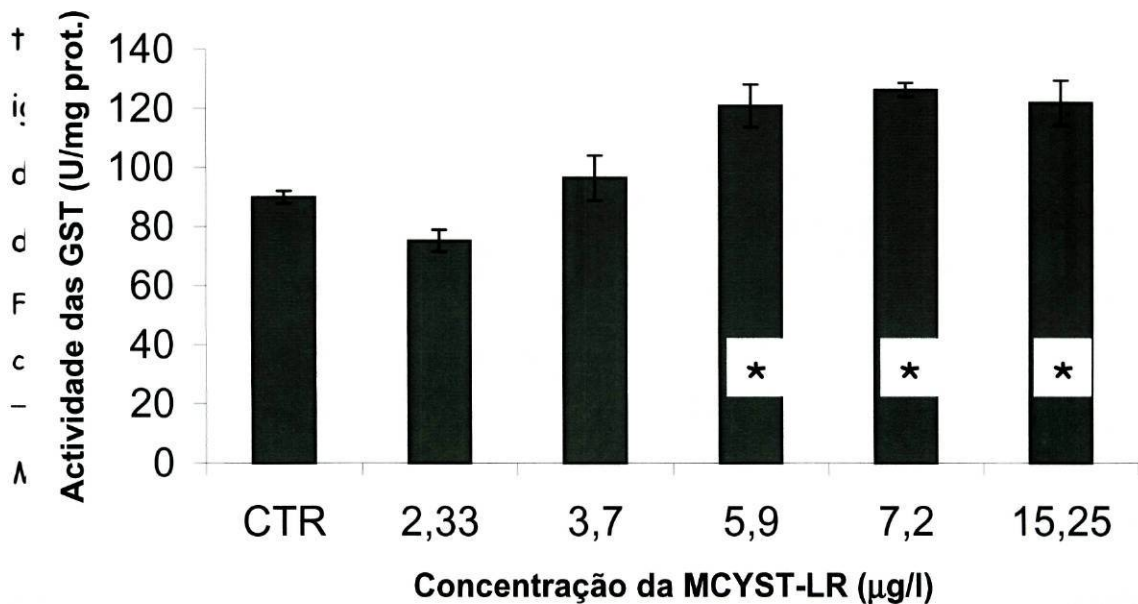


Figura 21 - Actividade da AChE em função da concentração da CYN. Os valores correspondem à média dos sobreviventes com as respectivas barras de erro-padrão.

3.3.3.2. GST

As figuras 22 e 23 apresentam as médias da actividade das GST em função da concentração da MCYST-LR e da CYN, com as respectivas barras de erro-padrão.

Para a MCYST-LR foram registadas diferenças significativas nos últimos



* significativamente diferente do controlo ($p < 0,05$)

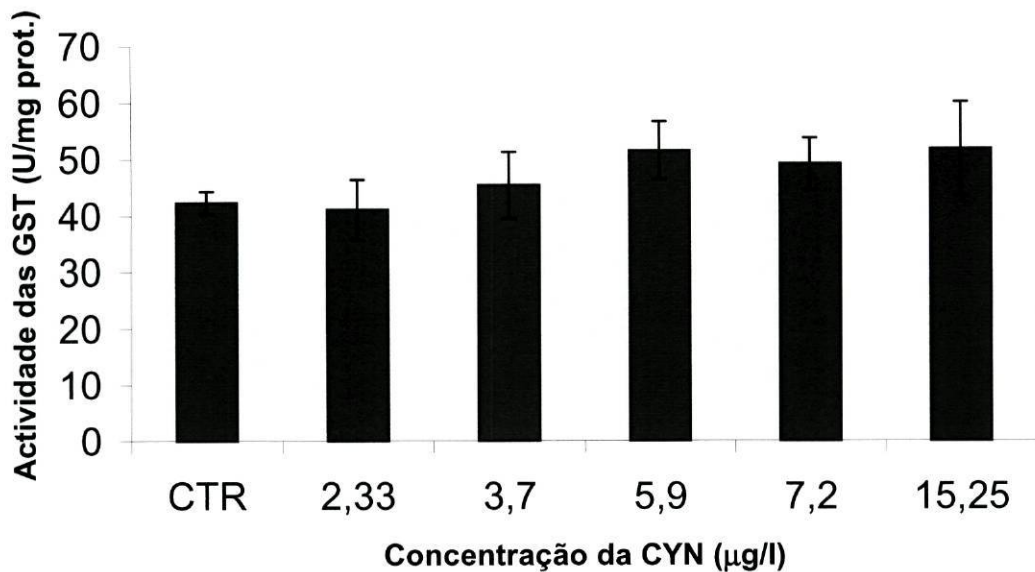
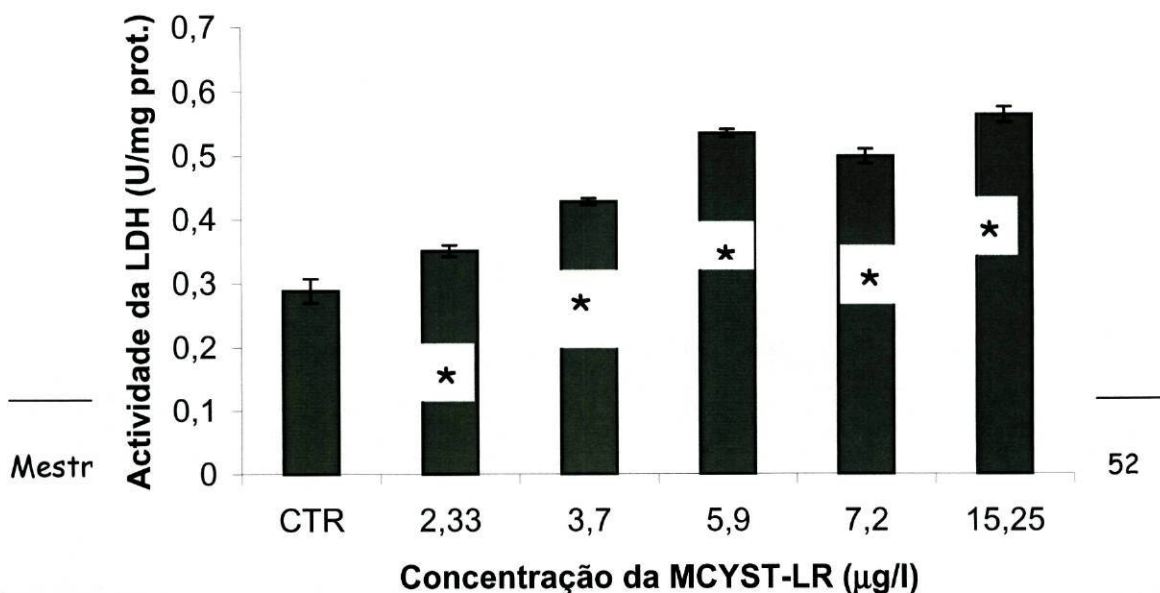


Figura 23 - Actividade das GST em função da concentração de CYN. Os valores correspondem à média dos sobreviventes com as respectivas barras de erro-padrão.

3.3.3.3. LDH

Nas figuras 24 e 25 estão representadas as médias da actividade da LDH obtidas para cada concentração de MCYST-LR e CYN, com as respectivas barras de erro-padrão. Foram detectadas diferenças significativas na actividade da enzima, com MCYST-LR ($F=95,94$; g.l.=5, 48; $p < 0,05$) (Figura



24). Em relação aos tratamentos com CYN foram detectadas diferenças apenas na primeira concentração ($F=3,95$; g.l.=5, 12; $p<0,05$) (Figura 25).

Figura 24 - Actividade da LDH em função da concentração de MCYST-LR. Os valores correspondem à média de 9 réplicas (9 peixes) com as respectivas barras de erro-padrão.

*significativamente diferente do controlo ($p<0,05$)

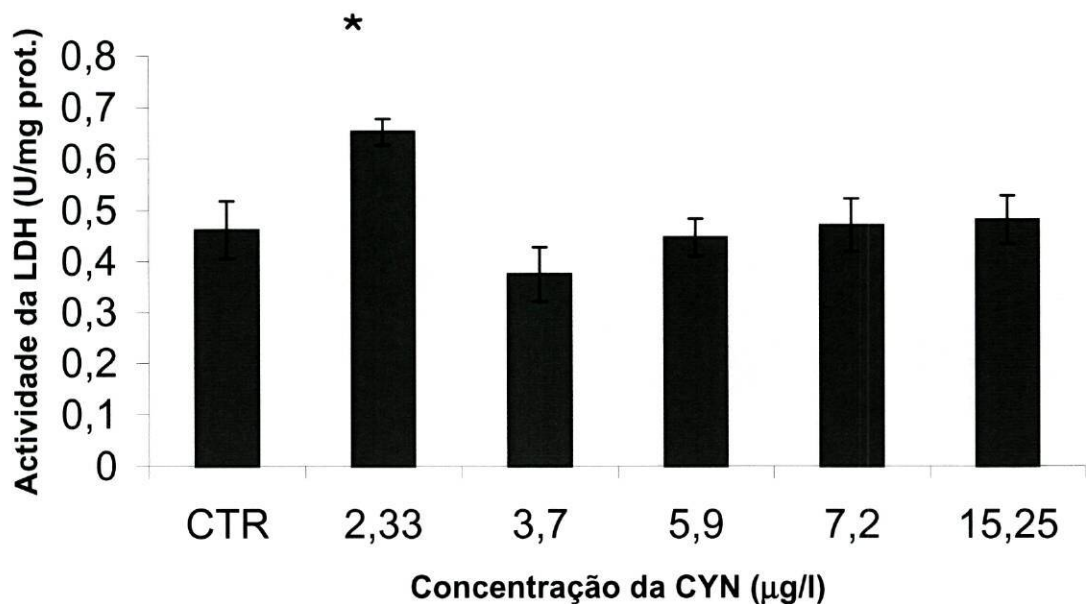


Figura 25 - Actividade da LDH em função da concentração de CYN. Os valores correspondem à média dos sobreviventes com as respectivas barras de erro-padrão.

*significativamente diferente do controlo ($p<0,05$)

3.3.3.4. Fosfatases Serina/Treonina

Pode-se observar as médias da actividade da fosfatase Ser/Thr em função da concentração da MCYST-LR na figura 26 e da CYN na figura 27 com as respectivas barras de erro-padrão.

Em relação à MCYST-LR foram detectadas diferenças significativas em diversas concentrações ($F=14,88$; g.l.=5, 12; $p<0,05$), sendo o valor de CEO de $2,33 \mu\text{g/l}$ (Figura 26). Para CYN só se verificara diferenças na última concentração ($F=6,07$; g.l.=5, 12; $p<0,05$), sendo o valor de CEO de $2,33 \mu\text{g/l}$

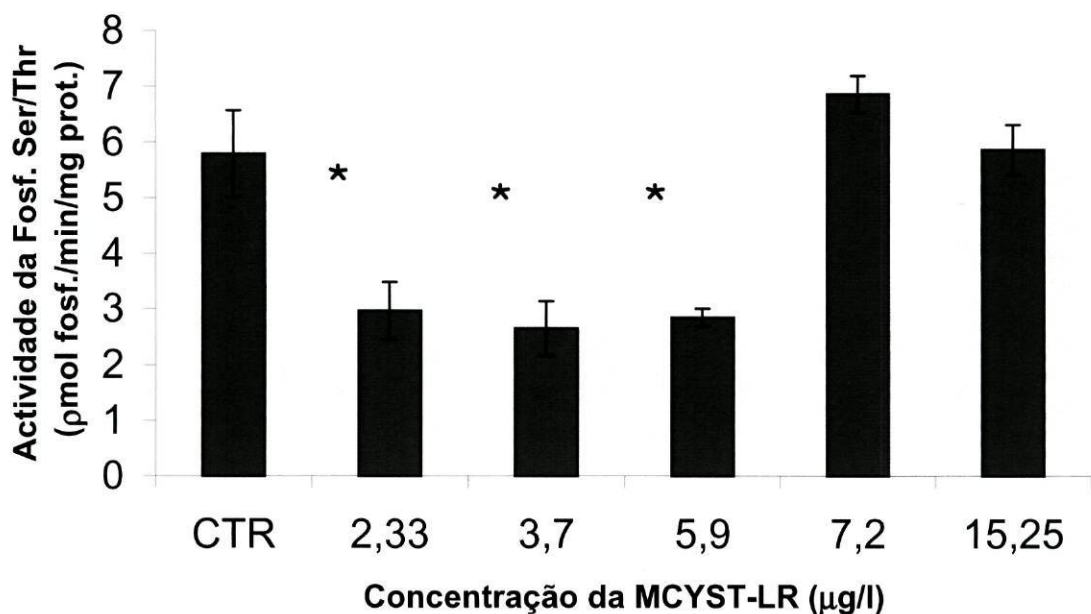


Figura 26 - Actividade da Fosfatase Ser/Thr em função da concentração de MCYST-LR. Os valores correspondem à média de 3 réplicas (3 peixes por réplica) com as respectivas barras de erro-padrão. *significativamente diferente do controlo ($p<0,05$)

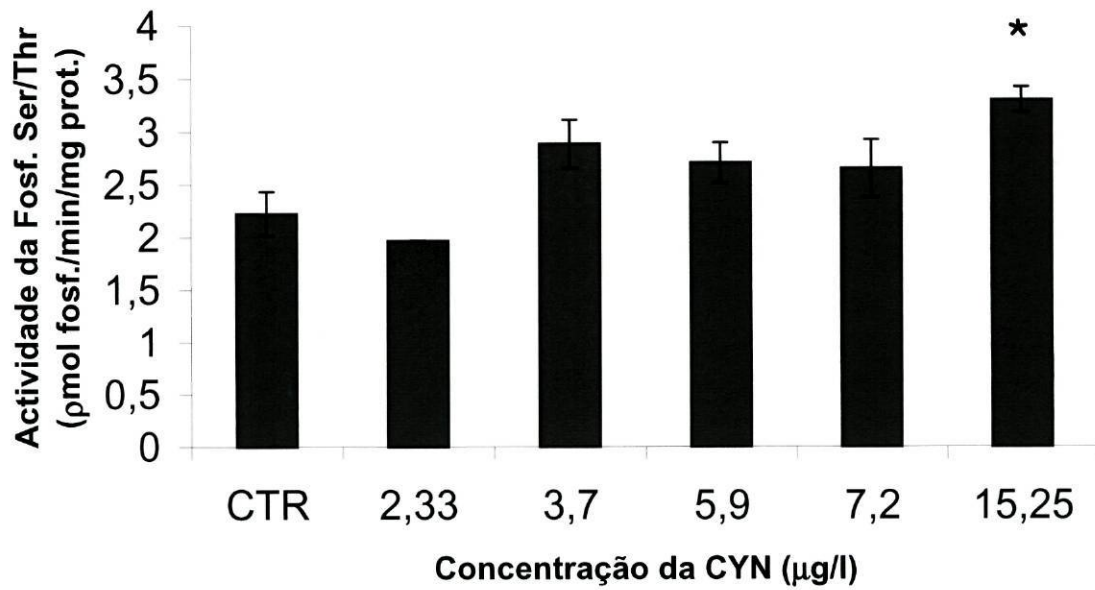


Figura 27 - Actividade da Fosfatase Ser/Thr em função da concentração de CYN. Os valores correspondem à média dos sobreviventes com as respectivas barras de erro-padrão; *significativamente diferente do controlo ($p < 0,05$).

IV - DISCUSSÃO

O aumento da eutrofização das massas de água doce tem levado ao aumento da densidade de cianobactérias. Como as microcistinas são agentes promotores de tumores em animais e no Homem, e atendendo a que a exposição pode ocorrer também por ingestão de água potável, deve ser dada particular atenção aos efeitos subletais destas toxinas. A transferência de toxinas produzidas por cianobactérias ao longo da cadeia trófica atingindo os seres humanos, está bem documentada (Anderson e White, 1992 *in* Amorim e Vasconcelos, 1999). Foi estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (WHO) que o valor máximo permissível de concentração de microcistinas presente em água potável é de 1 µg/L (WHO, 1998). É crucial determinar o efeito a longo prazo de baixas concentrações de microcistinas em água potável. Esta necessidade foi reconhecido pela Organização Mundial de Saúde (WHO) (Chorus *et al.*, 1999). Relativamente à cilindrospermopsina não há dados suficientes sobre a sua toxicidade de modo a estabelecer valores de referência.

Os métodos usados mais usualmente para detecção da toxicidade de cianobactérias são a combinação do método químico - ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) com o ensaio de inibição da proteína fosfatases - PPIA. O seu uso tem algumas vantagens, porque com o método ELISA pode-se confirmar a presença/ausência das microcistinas e com PPIA é possível ter indicação da sua actividade (Carmichael, 1997).

Segundo Bouaicha *et al.* (1998) o ensaio da fosfatase 2A dá uma boa indicação de microcistinas mesmo para concentrações muito baixas, inferiores a 1ng/L. Contudo, a identificação química das toxinas é necessária

como controlo. Técnicas convenientes parecem ser pré-concentrações e electroforese por capilaridade, que utilizam amostras pequenas.

Eynard e seus colaboradores sugerem que além do ensaio de inibição da fosfatase, este deve ser combinado com outro método químico como o HPLC (High-performance liquid chromatography) (Eynard *et al.*, 2000). O consenso entre aqueles que usam os métodos analíticos consiste no facto de um método simples não ser suficiente para a identificação e apuramento correcto da quantificação das microcistinas. A melhor tentativa para monitorizar é usar uma combinação de testes e métodos quantitativos sofisticados. Para detectar as neurotoxinas tem sido utilizado o ensaio de enzimas com anticolinesterase (Carmichael, 1997).

Para identificação e detecção da nova toxina - cilindrospermopsina têm sido usados bioensaios (testes com ratos) para determinar a toxicidade de *C. raciborskii* (Falconer *et al.*, 1999; Seawright *et al.*, 1999). Estes testes fornecem uma indicação da sua toxicidade, embora eles não possam ser usados para quantificar estes compostos na água. Técnicas analíticas tais como HPLC com detecção UV (Harada *et al.*, 1994), podem ser viáveis para determinar a presença de cilindrospermopsina na água.

A inibição da AChE é utilizada, normalmente, como biomarcador indicativo da exposição e/ou contaminação por pesticidas organofosforados e carbamatos. No entanto, nos últimos anos verificou-se que alguns metais (*e.g.* cobre, chumbo, zinco), detergentes e misturas de poluentes podiam também inibir a enzima, a concentrações ecologicamente relevantes (Bocquené *et al.*, 1995; Devi e Fingerman, 1995; Galgani *et al.*, 1992; Garcia *et al.*, 2000; Guilhermino *et al.*, 1996a, 1998a, 1998b). A inibição, a

verificar-se também por hepatotoxinas, poderia inviabilizar o uso desta enzima para diagnosticar a presença de neurotoxinas na água.

Neste estudo não se observou efeitos significativos na actividade da AChE, por acção da toxina MCYST-LR, nos testes *in vitro* e nos testes crónicos. Estes resultados estão de acordo com os obtidos com *Daphnia pulicaria*, em que se verificou que extractos provenientes de *M. aeruginosa*, não inibiam a actividade da AChE (Barros *et al.*, 1998). Relativamente aos resultados obtidos *in vivo* registando-se um aumento na última concentração. Dever-se-á, num futuro, testar concentrações mais elevadas de modo a confirmar estes resultados.

Em relação à CYN a actividade da AChE só foi inibida após incubação (*in vitro*) a concentrações iguais ou superiores a 250µg/ml, não ocorrendo nem nos testes *in vivo* nem nos testes crónicos. Estes resultados sugerem que a CYN a altas concentrações poderá inibir a sua actividade.

Em relação à actividade da enzima GST, apenas se verificou um aumento significativo com a MCYST-LR, o que está de acordo com Vinagre *et al.* (2001) que detectaram a indução da actividade da GST por parte das microcistinas em *Chasmagnathus granulata*.

Trabalhos realizados *in vitro* com a conjugação da glutathiona/cisteína e microcistinas sugerem que esta ligação pode ser importante para o metabolismo e excreção das microcistinas (Carmichael, 1997). No entanto, neste trabalho, não se verificou nenhum efeito *in vitro* na actividade GST quando incubada com MCYST-LR.

Assim, os ensaios enzimáticos realizados *in vitro* e *in vivo* /crónicos com a MCYST-LR revelaram efeitos diferentes. Enquanto que os estudos *in vitro* e

in vivo demonstraram nenhum efeito na actividade das GST na presença de MCYST-LR, o resultado obtido nos testes crónicos demonstraram uma indução dessa mesma actividade. Estes resultados sugerem que não há um efeito directo na enzima mas um aumento da actividade resultante da utilização da via da glutathione durante a destoxificação da toxina.

Efectivamente, trabalhos publicados indicam que a microcistina pode conjugarse com a glutathione (Pflugmacher *et al.*, 1998), o que representa um processo de destoxificação destas substâncias.

Runnegar *et al.* (1994) referem que após uma incubação de 18 horas de cilindrospermopsina com hepatócitos, se verificou uma diminuição da glutathione (GSH), o que sugere que a GSH está envolvida na destoxificação de CYN. No entanto, neste trabalho não se observou alterações da GST após a exposição à CYN. As brânquias parecem ter um papel fundamental, pois são elas que permitem a passagem directa através do epitélio branquial antes de entrar na corrente sanguínea. Assim, o metabolismo branquial pode influenciar grandemente a concentração dos tóxicos no interior do organismo (Bruijn *et al.*, 1993). Nos peixes usados para a CYN observou-se uma alteração e inchaço das brânquias dos peixes o que poderá explicar os resultados na actividade das GST com a CYN, uma vez que estes resultados não seriam os esperados. Além disso, o lote usado para estes ensaios eram diferentes dos usados para as microcistinas.

A LDH intervém no metabolismo energético. Esta enzima actua no processo glicolítico, em anaerobiose, fornecendo assim, energia ao organismo de maneira a que todas as funções vitais continuem em funcionamento. A

alteração na actividade da enzima LDH tem sido considerada como um indicador de "stress" (Guyton, 1992).

Neste trabalho foi observado um aumento da actividade da LDH após exposição à MCYST-LR, após exposição longa, não se verificando alterações na enzima após exposição curta e nos ensaios *in vitro*. Estes dados estão de acordo com Vajcova *et al.* (1998) e Navrátils *et al.* (1998) em que ocorreu um aumento da LDH após a aplicação de uma dose intraperitoneal, em *Hypophthalmichthys molitrix* Val e *Cyprinus carpio* L..

O facto de nos ensaios *in vitro* a actividade da LDH não ter sido alterada, mas em contrapartida ter ocorrido uma indução nos testes crónicos, sugere que não se trata de um efeito directo na enzima mas sim de uma resposta do organismo como um todo, por exemplo, para obter energia de uma forma rápida, recorrendo à via anaeróbica. Estes resultados estão em conformidade com os obtidos por outros autores (Vajcova *et al.*, 1998; Navrátils *et al.*, 1998; Dias *et al.*, 2001).

No que se refere à CYN só se constatou uma alteração nos testes crónicos, ocorrendo um aumento na primeira concentração. Segundo Runnegar *et al.* (1994) a CYN causa morte das células pelo que ocorre a libertação da LDH, devido à ruptura da membrana celular.

A regulação dos níveis da fosforilação proteica nas células é crucial para a manutenção da homeostasia (Dawson *et al.*, 1999) e para muitos processos celulares importantes (Cohen, 1989; Shenolikar, 1995). Devido à natureza reversível da fosforilação, há geralmente uma relação antagónica entre a activação dos processos celulares realizados pelas proteínas cinases e a desactivação dos sinais celulares pelas fosfatases proteicas (Lavigne *et al.*,

2000). As microcistinas são uma família de toxinas potentes para o fígado produzidas pelas cianobactérias. Nestes últimos anos tem-se vindo a concluir que não só os mamíferos, mas também os peixes estão sujeitos a este tipo de toxinas naturais (Tencalla *et al.*, 1997). Foram relatados casos de mortes de peixes (*e.g.* *Cyprinus carpio*) que se alimentavam de cianobactérias (Viala *et al.*, 1986 *in* Tencalla *et al.*, 1997).

Neste estudo observou-se uma inibição da actividade serina/treonina fosfatase apenas nas concentrações de 2,3 a 5,9µg/ml nos testes crónicos com MCYST-LR, ocorrendo uma recuperação da sua actividade a concentrações superiores. Esta recuperação pode ser devido ao facto que nestas duas últimas concentrações a proteína existente nas amostras ser mais elevada. O facto de não se ter observado uma inibição nos testes *in vivo* pode ser devido ao facto de que novas enzimas são produzidas por parte das células hepáticas funcionais de modo a tentar manter um certo equilíbrio, tal como é sugerido por Tencalla *et al.* (1997).

Relativamente à cilindrospermopsina verificou-se um aumento na última concentração e como esta toxina não é considerada como inibidora das fosfatases serina/treonina não se estaria à espera que tal ocorresse.

As concentrações testadas neste trabalho para as diferentes toxinas, nomeadamente nos testes crónicos são ecologicamente relevantes e têm sido detectadas em águas portuguesas (Vasconcelos *et al.*, 1996). No que se refere às concentrações nos testes *in vitro*, estas não são ecologicamente relevantes, pois são concentrações que não aparecem nos ecossistemas aquáticos, mas têm um interesse a um nível bioquímico.

É um facto que um organismo exposto a compostos tóxicos pode levar à depleção das suas reservas energéticas e em consequência afectar o seu crescimento, o seu potencial reprodutivo assim como a sua sobrevivência. Analisando os resultados obtidos em relação à morte/peso dos peixes nos testes crónicos, verificar-se que com a CYN ocorreu uma grande percentagem de mortes, assim como uma diminuição de peso, devido talvez à necessidade de gasto de energia adicionais. Assim, os organismos quando expostos à cilindrospermopsina durante 28 dias apresentaram sinais de toxicidade (e.g. movimentos erráticos e morte). A elevada mortalidade dos peixes em presença da CYN, em comparação com a microcistina, leva a pensar que a sua ocorrência na água de consumo animal ou utilizadas em actividades recreativas pode vir a ser perigosa para os seres vivos que a consumirem. Deverá num futuro realizar-se mais estudos aprofundados sobre esta nova toxina.

Para a MCYST não ocorreu indícios de letalidade ou retardação do crescimento/peso. Estes dados estão de acordo com os de Falconer e seus colaboradores, os quais não forneceram similarmente qualquer indício de mortalidade embrionária ou redução da fertilidade nos ratos expostos à microcistina em doses de 750 µg/Kg de peso corporal por dia administrada através da água que bebiam desde crias até e durante o acasalamento (Falconer *et al.*, 1988 *in* Gupta, 1998).

Em Portugal há um programa de monitorização para as espécies tóxicas do fitoplancton e suas toxinas em bivalves marinhos. Contudo, os ensaios animais ou as técnicas químicas usadas nesses programas são específicos para as neurotoxinas. As hepatotoxinas não são monitorizadas e por isso em estuários eutrofizados como o rio Minho e do Guadiana é possível a

existência hepatotoxinas que não são detectadas (Vasconcelos, 1999). Em virtude disso será necessário encontrar indicadores da sua detecção. A utilização de um conjunto de biomarcadores enzimáticos (*e.g.* AChE, LDH, GST, Fosfatase Ser/Thr) para avaliar a toxicidade de MCYST-LR e CYN na espécie *Brachydanio rerio* demonstrou ser mais eficaz na detecção da MCYST-LR do que da CYN.

V - REFERÊNCIAS

- Amorim, A., Vasconcelos, V. (1999). Dynamics of microcystin in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* **37**: 1041-1052.
- ASTM (1980). Standard practice for conducting acute toxicity test with fishes, macroinvertebrates and amphibians; Report E-790-80; *Americam for the testing and materials*, Philadelphia.
- Azevedo, S.M.F.O . (1998). Toxinas de cianobactérias: Causas e consequências para a Saúde Pública. *Medicina On Line - Revista Virtual de Medicina* **1**: 1-16
- Baksi, S.M.; Frazier, J.M. (1990). Isolated fish hepatocytes - model systems for toxicology research. *Aquatic Toxicology* **16**:229-256.
- Barica, J. (1975). Summerkill risk in prairies ponds and possibilities of its prediction. *J.Fish. Res. Board. Can.*, **32**: 1283-1288.
- Barros, P., Guilhermino, L., Fidalgo, M.L., Soares, A.M.V.M. (1998). Effects of *Anabaena flos-aquae* and *Microcystis aeruginosa* on acetylcholinesterase activity of *Daphnia pulex* in *Harmful Algae*, Blanco, J.; Fernander, M.L., Wyatt, T. (eds). Xunta de Galicia and Inter governmental Oceanographia Commission of Unesco, Spain. Pp: 602-603.
- Bocquené, G., Bellange, C., Cadiou, Y., Galgani, F. (1995). Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species. *Ecotoxicology* **4**: 266-279.
- Bouaïcha, N., Via-Ordorika, L., Vandeveld, T., Fauchon, N., Puiseux-Dao, S. (1998). Toxic Cyanoprocaryotes in resource waters: monitoring of their occurrence and toxin detection. OECD Workshop Molecular methods for Safe Drinking Water.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Brady, M:C; Gray, J.A. (1995). Use of *in vitro* cell systems for the prediction of toxicity and mechanistic studies. *Toxicology and Ecotoxicology News* **2**: 92-95.
- Bruijn, J., Seinen, W., Hermens, J. (1993). Biotransformation of organophosphorus compounds by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver in relation to bioconcentration. *Environmental Toxicology and Chemistry* **12**: 1041-1050.
- Bury, N.R., Eddy, F.B., Codd, G.A. (1996). Stress responses of brown trout, *Salmo trutta* L., to the cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Environmental Toxicology and Water Quality: an International Journal* **11**: 187-193.
- Carmichael, W.W., Jones, C.L.A., Matmood, N.A. &Theiss, W.C. (1985). Algal toxin and water based diseases. *CRC Critical Reviews in Environmental Control* **15**: 275-313.

- Carmichael, W.W. (1986). Algal toxins. *Advances in Botanical Research* 12 Academic Press
- Charmichael, W.W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites - The Cyanotoxins. *Journal Applied Bacteriol.* 72: 445-459.
- Carmichael, W.W. (1994). The toxins of cyanobacteria. *Scientific American* 270: 78-86.
- Carmichael, W.W. (1997). The Cyanotoxins. *Advances in Botanical Research* 27: 200-256.
- Chiswell, R.K., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., Smith, M.J., Norris, R.L., Seawright, A.A., Moore, M.R. (1999). Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*: Effect of pH, temperature and sunlight on decomposition. *Environmental Toxicology* 14:155-161.
- Chorus, I. & Bartram, J. (1999). *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences monitoring and management*. E. & FN Spon, Londen. 416pp.
- Chorus, I. (2000). Cyanotoxin - occurrence, effects, controlling. Factors. Springer Publishers, Heidelberg.
- Clark, A.G. (1989). The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from non-vertebrate organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology* 92B:419-446.
- Codd, G.A. & Bell, S.G. (1985). Eutrophication and Toxic cyanobacteria in freshwaters. *Water Pollut. Control* 27: 225-232.
- Cohen, P. (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. *Annual Review Biochemistry* 59: 453-508.
- Dawson, J.F., Holmes, C.F.B. (1999). Molecular Mechanisms underlying inhibition of protein phosphatases by marine toxins. *Frontiers in Bioscience* 4: 646-658.
- Depledge, M.H. (1994). "The rational basis for the use of biomarker as ecotoxicology tools" in *Nondestructive biomarkers in vertebrates*. Fossi, M.C., Leonzion, C. (Eds). Lewis Publishers, London, pp271-295.
- Devi, M., Fingerman, M. (1995). Inhibition of acetylcholinesterase activity in the central nervous system of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, by mercury, cadmium, and lead. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 55: 746-750.
- Diamantino, T.C., Almeida, E., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., (2001). Lactate Dehydrogenase Activity - An effective Parameter in Aquatic Toxicity tests. *Chemosphere (in press)*.
- Dias., E., Pereira, P., Gonçalves, L., Marques, S., Garcia, C., Lagos, N., Franca, S. (2001). Studies on cytotoxicity assays for microcystin detection. *11th Annual Meeting of SETAC Europe*. Madrid, Spain.
- Di Giulio, R.T., Benson, W.H., Sanders, B. M., Van Veld, P. A. (1995). "Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity" in *Fundamentals of Aquatic Toxicology-Effects, Environmental Fate, and Risk-Assessment*. Rand, G.M. (Ed). 2 nd edition. Taylor & Francis.

- Ekman, P., Jäger, O. (1993). Quantification of Subnanomolar Amounts of Phosphate Bound to Seryl and Threonyl Residues in Phosphoproteins Using Alkaline Hydrolysis and Malachite Green. *Analytical Biochemistry* **214**: 138-141.
- Ellman, G. L., Courtney, D., Andres, V. Jr., Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry and Pharmacology* **7**: 88-95.
- Eriksson, J.E., Toivola, D., Merilouto, J.A.O., Karaki, H., Han, Y., and Harstshorne, D. (1990). Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. *Biomedical and Biophysical Research Communication* **173**: 1347-1353.
- Eynard, F., Mez, K., Walther, J.L. (2000). Risk of cyanobacterial toxins in Riga waters (Latvia). *Water Research* **34**: 2979-2988.
- Falconer, I.R. (1991). Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal* **6**: 177-184.
- Falconer, I.R. (1993). Mechanism of toxicity of cyclic peptide toxin from blue-green algae. In *Algal toxins in sea food and drinking water*. Edited by Falconer, I.R. Academic Press 177-185.
- Falconer, I.R. (1994). "Health implications of cyanobacterial (blue-green algal) toxins" in Steffensen, D.A. & Nocholson, B.C., eds. *Toxic Cyanobacteria: Current Status of Research and Management*, Salisbury, Australia, Australian Centre for Water Quality Research, pp: 61-65.
- Falconer, I.R., Hardy, S.J., Humpage, A.R., Froscio, S.M., Toizer, G.J., Hawkins, P.R. (1999). Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male swiss Albino mice. *Environmental Toxicology* **14**: 143-150.
- Fossi, M.C., Marsili, L. (1997). The use of non-destructive biomarkers in the study of marine mammals. *Biomarkers* **2**: 205-216.
- Francis, G. (1878). Poisonous Australian lake. *Nature* **18**: 11-12.
- Gaete, V., Canelo, E., Lagos, N. and Zambrano, F. (1994). Inhibitory effects of *Microcystis aeruginosa* toxin on ion pumps of the gill of freshwater fish. *Toxicon* **32**: 121-127.
- Galgani, F., Bocquené, G., Cadiou, Y. (1992). Evidence of a variation in cholinesterase activity in fish along a pollution gradient in the North Sea. *Marine Ecology Progress Series*. **13**: 77-82.
- Garcia, L.M., Castro, B., Ribeiro, R., Guilhermino, L. (2000). Characterization of cholinesterase from guppy (*Poecilia reticulata*) muscle and its *in vitro* inhibition by environmental contaminants. *Biomarkers* **5**: 274-284.

- Guilhermino, L., Barros, P., Silva, M.C., Soares, A.M.V.M. (1998b). Should use of inhibition of cholinesterase as specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned? *Biomarkers* **3**: 157-163.
- Guilhermino, L., Lacerda, M.N., Diamantino, T.C., Soares, A.M.V.M. (1998a). Inibição não específica da enzima acetilcolinesterase de *Daphnia magna* por diversos tipos de poluentes. *Cuad Invest Biol* (Bilbao) **20**: 59-61.
- Guilhermino, L., Lopes, M.C., Carvalho, A.P., Soares, A.M.V.M. (1996a). Inhibition of acetylcholinesterase activity as effetc criterion in acute test with Juvenil *Daphnia magna*. *Chemosphere*, Vol.32, **4**: 727-738.
- Gulden, W.J.I., Beynen, A.C., Hau, J. (1993). Modelos Animales. In : Principios de la Ciencia del Animal de Laboratorio. Vanzutphen, L. F. M., Baumans, V., Beynen, AC., (eds.). Elsevier, pp211-220.
- Guyton, A. C. (1992). Tratado de Fisiologia Médica. Guanabora Koogan, Rio de Janeiro.
- Gupta, R.C.; Goad, J.T.; Kadel, W.L. (1991). In vivo alterations in lactate dehydrogenase (LDH) and LDH isoenzymes patterns by acute carbofuran intoxication. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **21**:263-269.
- Gupta, S. (1998). "Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR" in *Guidelines for drinking-water quality, Addendum to Vol 2. Health Criteria and Other Supporting Information*, Geneva, World Health Organization, pp.95-110.
- Habig, W., Pabst, M. J., Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-Transferase-the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biology Chemistry* **249**: 7130-7139.
- Harada, K., Ikuko, O., Iwamoto, K., Suzuki, M., Watanabe, M., Terao, K. (1994). Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon* **32**: 73-84.
- Hawkins, P. R., Runnegar, M. T. C., Jackson, A . R. B. & Falconer, I. R. (1985). Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (wołoszynsha) seen and subba raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Applied and Environmental Microbiology* **50**: 1292-1295.
- Herbert, A., Guilhermino, L., Da Silva de Assis, H. C., Mansen, P. D. (1995/96). Acetylcholinesterase activity in aquatic organisms as pollution biomarker. *Zeitschrift für Angewandte Zoologie* **3**: 1-15.
- Hodgson, E., Levi, P.E. (1997). A textbook of Modern Toxicology. 2nd. Ed. Appleton & Lange, Stamford, Connecticut.
- Hunter, T. (1992). Receptor protein tyrosine kinases and phosphatases. *Cold spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **57**:25-30.
- Keijola, A.M. (1988). Removal of cyanobacterial toxins in water treatment process: laboratory and pilot-scale experiments. *Toxicity Assesment: An International Journal* **3**: 643-656.

- Kirivanta, J., Namikoshi, M., Sivonen, K., Evans, W.R., Carmichael, W. & Rinehart, L.L. (1992). Structure determination and toxicity of a new microcystin from *Microcystis aeruginosa* Strain 205. *Toxicon* **30**: 1053-1058.
- Kotak, B. G., Semalulu, S., Fritz, D.L., Prepas, E.E., Hruday, S.E., Coppock, R.W. (1996). Hepatic and renal pathology of intraperitoneally-administered microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicon* **34**: 517-525.
- Kotai, J. (1972). Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. Norwegian Institute for Water Research, Blindern, Oslo 11/69. 5pp (in Vasconcelos et al., 1995).
- Labrot, F., Ribeira, D., Saint Denis, M., narbonne, J.F. (1997). *In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation; acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three nonmammalian species. *Biomarkers* **1**: 21-28.
- Lampert, F.W., Holmes, C.F.B., and Hudrey, S.E. (1994). Microcystin class of toxin: health effects and safety of drinking water supplies. *Environmental Research* **2**: 167-186.
- Lavigne, P., Bagu, J.R., Boyko, R., Willard, L., Holmes, C. F. B., Sykes, B. D. (2000). Structure-based thermodynamic analysis of the dissociation of protein phosphatase-1 catalytic subunit and microcystin-LR docked complexes. *Protein Science* **9**: 252-264. (<http://www.prosci.uci.edu/Articles/Vol9/issue2/9241/9241.html#intro>).
- Lin, J.R., Chu, F.S. (1994). *In vitro* neutralization of the inhibitory effect of microcystin-LR to protein phosphatase 2A by antibody against the toxin. *Toxicon* **32**:605-613.
- Livingstone, D.R., Goldfarb, P.S. (1998). "Biomonitoring in the aquatic environment: use of cytochrome P450IA and other molecular biomarkers in fish and mussels" in *Environmental biomonitoring: the biotechnology-ecotoxicology interface*. Lynch, J.M., Wiseman, A. (Eds). Cambridge University Press, pp:101-129.
- 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 and 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Letters* **264**: 187-192.
- Mackintosh, C. & Mackintosh, R.W. (1994). The inhibition of protein phosphatase by toxins: implications for health and extremely sensitive and rapid bioassay for toxin detection in *Detection methods for cyanobacterial toxins*. Edited by Codd, G.A., Jefferies, T.M., Keevil, C.W., and Potter, E. The Royal Society of Chemistry.
- Mayer, F.L., Versteeg, D.Y., Mckee, M.Y., Folmer, L.C., Graney, R.L., McCume, D.C., Rattner, B.A. (1992). "Physiology and nonspecific biomarkers" in *Biomarkers-biochemical, physiology and histological markers of antropogenic stress*. Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M.Jr., Bergman, H.L. (Eds). Lewis Publishers, Chlesea, pp: 5-87.
- Navrátil, S., Palíková, M., Vajcová, V. (1998). The effect of pure microcystin-LR and biomass of blue-green algae on blood indices of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Vet. Brno* **67**:273-279.

- Newman, M.C. (1998). "Molecular effects and biomarkers" in *Fundamentals of Ecotoxicology*. Newman, M.C. (Ed). Ann Arbor Press, Chelsea, pp:87-102.
- Oberemm, A., Fastner, J., Steinberg, C.E.W. (1997). Effects of microcystin-LR and cyanobacterial crude extracts on embryo-larval development of zebrafish (*Danio rerio*). *Water Research* **31**: 2918-2921.
- OCDE (1993). OCDE Guidelines for testing of chemical; test 203:fish acute toxicity test.
- OCDE (2000). OECD Guideline for the testing of chemicals;test 215: Fish, Juvenile Growth Test.
- Ohta, T., Sueoka, E., Lida, N., Komari, A., Suganuma, M., Nishiwaki, R., Tatematsu, M., Kim, S.-J., Carmichael, W.W., Fujiki, H. (1994). Noduralin, a potent inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A., is a new environmental carcinogen in male F344 rat liver. *Cancer Research* **54**: 6402-6406.
- Peakall, D. (1992). "Biomarkers of the nervous system" in *Animal Biomarkers as Pollution Indicators*. Peakall, D. (Ed). Chapman & Hall, London, pp:19-45.
- Peakall, D.B. (1994a). Biomarkers-the way forward in environmental assessment. *Toxicology & Ecotoxicology News* **1**: 55-60.
- Penãloza, R., Rojas, M., Vila, J., Zambrano, F. (1990). Toxicity of soluble peptide from *Microcystis* sp to zooplankton and fish. *Freshwater Biology* **24**: 233-240.
- Pflumacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K. A., Krause, E., Codd, G. A., Steinberg, E.W. (1998). Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR : the first step of detoxication. *Biochimica et Biophysica Acta* **1425**: 527-533.
- Pourir, S.A . Andrade, J. Barbosa, R. Cavalcanti, V. Barreto, C. Ward, W. Preiser, G. Neid, and G. Codd (1998). Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Carauru, Brasil. *Lancet* **325**: 21-26.
- Raberg, C.M., Bylund, G., Eriksson, J.E. (1991). Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Toxicology* **20**: 131-146.
- Roset, J., Aguayo, S., Muñoz, M.J. (2001). Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. *Revista de Toxicología* **18**: 65-71.
- Russel, W.M.S., Burch, R.L. (1959). *The principles of Humane Experimental Technique*, Methuen CO. Lda., (eds.) Hamilton Close, London.
- Runnegar, M.T. & C., Falconer, I.R. (1982). The in vivo and in vitro biological effects of the peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* . *South African Journal of Science* **78**: 363-366.

- Runnegar, M.T., Kong, S.M., Zhong, Y.Z., Ge, J.L., Lu, S.C. (1994). The Role of Glutathione in the Toxicity of a Novel Cyanobacterial Alkaloid *Cylindrospermopsin* in Cultured Rat hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **201**: 235-241.
- Saker, M. L., Thomas, A. D., Norton, J.H. (1999). Cattle Mortality Attributed to the Toxic Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in an Outback Region of North Queensland. *Environmental Toxicology* **14**: 179-182.
- Seawright, A. A., Nolan, C.C., Shaw, G.R., Chiswell, R.K., Norris, R.L., Moore, M.R., Smith, M.J. (1999). The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska). *Environmental Toxicology* **14**: 135-142.
- Serra, E.L., Medalha, C.C., Mattioli, L. (1999). Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Brazilian Journal of medical and biological research* **32**: 1551-1553.
- Shenolikar S. (1995). Protein serine/threonine phosphatases-new avenues for cell regulation. *Annual Review of Cell Biology* **10**: 55-86.
- Snyder, M.J. (2000). Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions. *Aquatic Toxicology* **48**: 529-547.
- Sivonen, K. (1990). Toxic cianobacteria in Finnish freshwater and the Baltic sea. Dissertação de doutoramento, Universidade de helsinki. Finlândia.
- Slabbert, J.L.; Venter, E.A. (1999). Biological assays for aquatic toxicity testing. *Water Science Technology* **39**:367-373
- Stryer, L. (1995). *Biochemistry* 4th edition; W.H. Freeman and Company, New York.
- Takenaka, S., Otsu, R. (1999). Effects of L-cysteine and reduced glutathione on the toxicities of microcystin-LR: the effect for acute liver failure and inhibition of protein phosphatase 2A activity. *Aquatic Toxicology* **48**: 65-68.
- Tencalla, F, Dietrich, D. (1997). Biochemical Characterization of Microcystin Toxicity in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Toxicon* **35**: 583-595.
- Tencalla, F.G., Dietrich, D.R., Schlatter, C. (1994). Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* **30**: 219-224.
- Timbrell, J.A. (1993). "Biotransformation of Xenobiotics" in *General and Applied Toxicology*. Ballantyne, B., Marrs, T., Turner, P. (Eds). Macgraw-Hill Companies, New York, pp: 89-119.
- Timbrell, J.A., Draper, R., Waterfield, C.J. (1994). Biomarkers in Toxicology, new uses for some old molecules? *Toxicology and Ecotoxicology News* **1**: 248-254.
- Ueno, Y., Nagata, T., Tsutsumi, A., Hasegawa, M.F., Watandable, H.D., Park, G.C., Chen, and S. Zyu (1996). Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sample in Haimen and Fusai, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* **17**: 1317-1321.

- Vajcová, V., Navrátil, S., Palíková, M. (1998). The effect of intraperitoneally applied pure microcystin-LR on haematological and morphological indices of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.). *Acta Vet. Brno* **67**: 281-287.
- Vasconcelos, V.M. (1995). Uptake and depuration of the heptapeptide toxin microcystin-LR in *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* **32**:227-237.
- Vasconcelos, V.M. (1999). Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **32**: 249-254.
- Vasconcelos, V.M., Evans, W.R., Carmichael, W.W. and Namikoshi, M. (1993). Isolation of microcystin-LR from a *Microcystis* (cyanobacteria) waterbloom collected in the drinking water reservoir from Porto, Portugal. *Journal of Environmental Science Health A28*: 2081-2094.
- Vasconcelos, V.M., Sivonen, K., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Namikoshi, M. (1995). Isolation and characterization of microcystins (heptapeptide hepatotoxins) from Portuguese strain of *Microcystis aeruginosa* Kutz. Emend Elekin. *Archiv fuer Hydrobiologie* **135**: 295-305.
- Vasconcelos, V.M., Sivonen, K., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Namikoshi, M. (1996). Hepatotoxic microcystin diversity in cyanobacterial blooms collected in Portuguese freshwater. *Water Research* **30**:2377-2384.
- Vascoto, S.G., Beckham, Y., & Kelly, G.M. (1997). The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. *Biochemical and Cell Biology* **75**: 479-485.
- Vassault, A. (1983). "Lactate Dehydrogenase" in *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. III, Enzymes: Oxireductases Transferases. Academic Press, New York 3rd Ed., 118-126.
- Vinagre, T.M., Sarkis, J.Y., Bianchini, A., Monserrat, J.M. (2001). *In vivo* effects of microcystins on osmoregulation and conjugation enzymes in a estuarine crab. *11th Annual Meeting of SETAC Europe*. Madrid. Spain.
- Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M. and Peakall, D. B. (1996). Principles of Ecotoxicology. Taylor & Francis Publishers. London, p.321.
- WHO (1998). *Guidelines for Drinking water Quality*, 2nd ed World Health Organization, Geneva, Switzerland
- Yu, S.H. (1989). Drinking water and primary liver cancer. In *Primary Liver Cancer*. Z. Y. Tang, M. C. Wu and S.S. Xia, ed., pp 30-37. China Academic Publishers, Springer-Verlag, Berlin.
- Zar, J.H. (1996). Biostatistical Analysis. Prentice-Hall International, London.

VI. ANEXO

Os resultados deste estudo encontram-se parcialmente publicados na forma de resumo:

- Fernandes, E., Vasconcelos, V., Guilhermino, L. (2001). *In vivo* and *In Vitro* Effects of Microcystin on Several Biomarkers of *Brachydanio rerio*, 11th Annual Meeting of SETAC Europe ("From basic science to decision-making "The Environmental Odissey"), pp. 225.
- Fernandes, E.A., Vasconcelos, V., Saker, M., Guilhermino, L. (2001). *In vivo* Effects of Cilindrospermopsin on Biomarkers of *Brachydanio rerio*, *Biomarkers of Environmental Contamination* , pp. 196.