

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SAMUEL LIEBEL

**Respostas Celulares de Hepatócitos de *Prochilodus lineatus*  
(Curimbatá) após exposição à Cilindrospermopsina: Sistema de  
Resistência a Multixenobióticos e Ambiente Redox**

CURITIBA  
2011

SAMUEL LIEBEL

**Respostas Celulares de Hepatócitos de *Prochilodus lineatus*  
(Curimbatá) após exposição à Cilindrospermopsina: Sistema de  
Resistência a Multixenobióticos e Ambiente Redox**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro  
Co-orientador: Dr. Francisco Filipak Neto


CURITIBA  
2011


# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia  
Setor de Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Paraná  
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

## PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

  
**Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro**  
Orientador e presidente da banca  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

  
**Prof. Dr. Paulo Dalsenter**  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

  
**Profa. Dra. Lia Sumie Nakao**  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

E tendo como suplente,

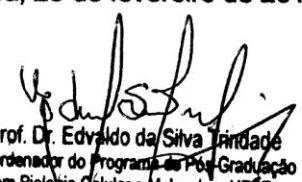
**Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade**  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após argüir o mestrando **Samuel Liebel**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Respostas celulares de hepatócitos de *Prochilodus lineatus* (Curimbatá) após exposição à cilindrospermopsina: sistema de resistência a multixenobióticos e ambiente redox", são de parecer favorável à *Aprovação* do acadêmico, habilitando-o ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.



Curitiba, 25 de fevereiro de 2011

  
Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Molecular - UFPR  
Matr. 185796

CENTRO POLITÉCNICO - CEP 81.531-990 - JARDIM DAS AMÉRICAS - Caixa Postal 19031 -  
FONE: (41) 3361-1676 FAX 3266-2042 - E-Mail- [pgbiocel@ufpr.br](mailto:pgbiocel@ufpr.br) - [www.pgbiocel.ufpr.br](http://www.pgbiocel.ufpr.br) CURITIBA -PR

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof.<sup>o</sup> Dr. Ciro, por abrir as portas do laboratório possibilitando o meu ingresso na vida científica. Agradeço pela sua disponibilidade, orientação e paciência sempre demonstrada;

Ao Prof.<sup>o</sup> Dr. Francisco (Chico) pela confiança no meu trabalho, pela dedicação em transmitir seus conhecimentos, e por sempre estar pronto para ajudar no que for necessário;

A minha estimada família, por sempre me apoiar e incentivar, pelo seu exemplo e por não medir esforços em contribuir nesta trajetória;

A Sandra, minha noiva que esteve sempre ao meu lado, por todo seu amor, carinho, respeito, compreensão, paciência, e por me transmitir força e coragem para superar os desafios;

Aos amigos do laboratório de Toxicologia celular, Inês, Daniel, Loli, Maritana, Dandie, Ellie, Dani, Rodrigo, Mônica, Chuli, Andressa, Flávio, Ana, Flávia, Paola, Isa, Ana Luisa, entre outros, por poder contar com vocês sempre que precisei. Obrigado pelo apoio, e também por compartilharem os sorrisos e as brincadeiras;

Um agradecimento especial a Loli, Sté e o Rodrigo, colegas do cultivo celular, afinal começamos juntos a saga das padronizações. Obrigado por compartilharem os momentos de sucesso e insucesso que a cultura celular proporciona.

A Prof.<sup>a</sup> Marta Margarete e a Wanessa pela ajuda na realização do ensaio cometa;

A Prof.<sup>a</sup> Valéria e ao Rodrigo, pelo fornecimento da cilindrospermopsina purificada;

A Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) e ao Conselho Nacional Científico Tecnológico (CNPQ) pelo suporte na realização do trabalho;

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná;

A Piscicultura Panamá;

A Deus, por estar sempre presente na minha vida e no meu coração;

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho.

## RESUMO

O aumento das atividades antropogênicas vem sendo causa de uma crescente eutrofização dos ambientes aquáticos, levando a floração de cianobactérias, dentre as quais algumas produtoras de cianotoxinas potencialmente tóxicas à vida animal e à saúde humana. Desta forma, o estabelecimento de modelos para avaliação dos principais danos causados pelas toxinas é necessário. Particularmente, modelos *in vitro* empregando hepatócitos de peixes são importantes para a investigação dos mecanismos de toxicidade das cianotoxinas nas células. O objetivo do presente estudo foi estabelecer um protocolo para o isolamento e cultura de hepatócitos de *Prochilodus lineatus* (curimbatá), e a partir deste protocolo investigar os efeitos da cianotoxina cilindrospermopsina, através da avaliação da viabilidade celular, sistema redox e de resistência a multixenobióticos na busca de novas ferramentas na avaliação deste xenobiótico natural. Os procedimentos empregando EDTA, pancreatina ou tripsina não foram eficientes para a dissociação do tecido hepático. Colagenase IV, colagenase IV+dispase e dispase resultaram, respectivamente, em  $1,01 \times 10^7$ ,  $3,58 \times 10^7$ , e  $6,36 \times 10^7$  células.g<sup>-1</sup> de fígado e viabilidades de 88, 90 e 97%, de modo que o método empregando dispase foi selecionado para os testes subsequentes. As microplacas da marca TTP® possibilitaram a melhor adesão celular, e não houve melhoria evidente desta adesão após pré-tratamento com colágeno I ou matrigel. O período de quatro dias foi necessário para recuperação e adesão das células, que puderam ser mantidas por pelo mesmo 7 dias. Após esta padronização, realizaram-se os ensaios toxicológicos. Inicialmente, os hepatócitos foram isolados e cultivados durante os 4 dias pré-estabelecidos. Então, o meio de cultura foi substituído por novo meio contendo três concentrações (0,1 - 1,0 ou 10 µg.l<sup>-1</sup>) de cilindrospermopsina purificada. Após 72 h de exposição, houve diminuição na atividade do sistema de resistência a multixenobióticos (todos os tratamentos), da viabilidade celular (0,1 e 1 µg.l<sup>-1</sup>), e atividades de glutathione S-transferase e glicose 6-fosfato desidrogenase (10 µg.l<sup>-1</sup> com relação às menores concentrações), aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (todos os tratamentos) e danos em lipídeos (10 µg.l<sup>-1</sup>). Não ocorreram alterações na concentração de glutathione (GSH), na razão 2GSH/GSSG (glutathione dissulfeto), na carbonilação de proteínas e na fragmentação do DNA. Sendo assim, os hepatócitos expostos a cilindrospermopsina apresentam uma sensibilização significativa, devido principalmente à redução da capacidade de efluxo de compostos endobióticos e xenobióticos. Além disso, a toxina apresentou efeitos importantes sobre a sobrevivência dos hepatócitos em concentrações mais baixas, enquanto possivelmente ativou mecanismos de proteção no nível mais alto.

Palavras-chave: Cilindrospermopsina. Cultivo primário de hepatócitos. *Prochilodus lineatus*. Sistema de resistência a multixenobióticos. Estresse oxidativo.

## ABSTRACT

The increase of anthropogenic activities has causing eutrophication of aquatic environments, leading to bloom of cyanotoxins producer cyanobacteria that can thread wildlife and human health. Then, the establishment of models to investigate cyanotoxin effects is necessary, particularly *in vitro* models utilizing fish hepatocytes to evaluate the mechanisms of toxicity of cyanotoxins and the cell responses. The aim of the present study was therefore to establish a protocol for isolation and culture of hepatocytes from *Prochilodus lineatus* (curimbatá), and to investigate the effects of the cyanotoxin cylindrospermopsin by assessing the viability, redox milieu and multixenobiotic resistance system. The procedures using EDTA, trypsin or pancreatin were ineffective for the dissociation of liver tissue. Collagenase IV, collagenase IV + dispase and dispase resulted, respectively, in  $1.01 \times 10^7$ ,  $3.58 \times 10^7$ , and  $6.36 \times 10^7$  cells.g<sup>-1</sup> liver and viabilities of 88, 90 and 97%, so that the method using dispase was selected for the subsequent investigation. The microplate brand TTP® resulted in the best cell adhesion, and there was no apparent improvement of cell attachment after collagen I or matrigel pretreatments. Four days was necessary for cell recovery and adhesion, and cells could be maintained for up to 7 days without reduction of cell viability. After establishment of an appropriated protocol, toxicological investigation was conducted. Initially, hepatocytes were isolated and cultured for 4 days. Then, the culture medium was replaced by fresh medium with three concentrations (0.1 - 1.0 or 10 µg.l<sup>-1</sup>) of purified cylindrospermopsin. After 72 h exposure, there were decreases in multixenobiotic resistance system activity (all treatments), cell viability (0.1 and 1 µg.l<sup>-1</sup>), and glutathione S-transferase and glucose 6-phosphate dehydrogenase activities (10 µg.l<sup>-1</sup> with respect to lowest concentrations). Conversely, increases in reactive oxygen/nitrogen species production (all treatments) and lipid peroxidation (10 µg.l<sup>-1</sup>) were observed. No changes occurred in glutathione (GSH) concentration, 2GSH/GSSG (glutathione disulfide) ratio, in protein carbonylation and DNA fragmentation. In conclusion, hepatocytes may be made sensitive to cylindrospermopsin due to reduction of xenobiotics and endobiotics efflux capacity. Additionally, the toxin presented important effects on hepatocytes survival at lowest concentrations, while activated the protective mechanisms at the highest concentration

Key words: Cylindrospermopsin. Hepatocytes primary culture. *Prochilodus lineatus*. Multixenobiotic resistance. Oxidative stress.

## LISTA DE INLUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1.</b> Estrutura química da cilindrospermopsina (MOLICA e AZEVEDO, 2009).....	11
<b>FIGURA 2.</b> Espécime de <i>Prochilodus lineatus</i> – curimatá (SVERLIJ, 2005) .....	15
<b>FIGURA 3.</b> Hepatócitos de <i>P. lineatus</i> sob microscopia de contraste de fase.....	33
<b>FIGURA 4.</b> Hepatócitos de <i>P. lineatus</i> sob microscopia eletrônica de varredura .....	34
<b>FIGURA 5.</b> Viabilidade celular em hepatócitos de <i>P. lineatus</i> expostos à cilindrospermopsina .....	35
<b>FIGURA 6.</b> Atividade específica das GST em hepatócitos de <i>P. lineatus</i> expostos à cilindrospermopsina. ....	36
<b>FIGURA 7.</b> Atividade específica da G6PDH em hepatócitos de <i>P. lineatus</i> expostos à cilindrospermopsina .....	36
<b>FIGURA 8.</b> Concentração de glutathiona em hepatócitos de <i>P. lineatus</i> expostos à cilindrospermopsina .....	37
<b>FIGURA 9.</b> Razão de glutathiona (2GSH/GSSG) em hepatócitos de <i>P. lineatus</i> expostos à cilindrospermopsina .....	37
<b>FIGURA 10.</b> Concentração de GSH e GSSG quantificadas no método modificado .....	38
<b>FIGURA 11.</b> Níveis de espécies reativas em hepatócitos de <i>P. lineatus</i> expostos à cilindrospermopsina. ....	39
<b>FIGURA 12.</b> Atividade da MXR em hepatócitos de <i>P. lineatus</i> expostos à cilindrospermopsina .....	39
<b>FIGURA 13.</b> Carbonilação de Proteínas medida em hepatócitos de <i>P. lineatus</i> expostos à cilindrospermopsina .....	40
<b>FIGURA 14.</b> Peroxidação Lipídica medida em hepatócitos de <i>P. lineatus</i> expostos à cilindrospermopsina .....	41
<b>TABELA 1.</b> Valores médios de rendimento e viabilidade celular para os procedimentos testados no isolamento de hepatócitos de <i>P. lineatus</i> .....	32
<b>TABELA 2.</b> Percentual de nucleóides com escores das classes de danos no DNA (0, 1, 2, 3 e 4) medidos em hepatócitos de <i>P. lineatus</i> expostos à cilindrospermopsina. ....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS

CYN 0,1 - grupo de células expostas a 0,1  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de cilindrospermopsina  
CYN 1 - grupo de células expostas a 1  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de cilindrospermopsina  
CYN 10 - grupo de células expostas a 10  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de cilindrospermopsina  
CYP – Citocromo P450  
DDT - diclorodifeniltricloroetano  
EDTA - Ácido etileno diamino tetracético (do inglês *Ethylenediaminetetracetic Acid*)  
ERON(s) – espécie(s) reativa(s) de oxigênio e nitrogênio  
FOX - do inglês *Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method*  
G6PDH – glucose 6-fosfato desidrogenase  
GPx – glutaciona peroxidase  
GR – glutaciona redutase  
GSH – glutaciona reduzida  
GSSG – glutaciona dissulfeto (glutaciona oxidada)  
GST – glutaciona S-transferase(s)  
HO<sup>•</sup> – radical hidroxila  
LPO – peroxidação lipídica (do inglês *lipid peroxidation*)  
MEV – microscopia eletrônica de varredura  
MDR – mecanismo de resistência a multidroga  
MXR – mecanismo de resistência a multixenobióticos (do inglês *multixenobiotic mechanism resistance*)  
PBS - tampão fosfato salino (do inglês *phosphate buffer saline*)  
PCBs - bifenilas policloradas (do inglês *polychlorinated biphenyls*)  
PCO – carbonilação de proteínas (do inglês *protein carbonyl content or protein carbonylation*)  
pCO<sub>2</sub> – pressão parcial de CO<sub>2</sub>  
PgP – glicoproteína- P



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
3.1 Obtenção e cuidados com os peixes .....	21
3.2 Isolamento e cultura dos hepatócitos .....	21
3.3 Desenho experimental .....	23
3.4 Testes de viabilidade celular .....	23
3.5 Atividade do mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR) .....	24
3.6 Detecção de espécies reativas de oxigênio/ nitrogênio (ERONs) .....	25
3.7 Atividade da Glutathione S-transferase (GST) .....	25
3.8 Atividade da Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) .....	26
3.9 Glutathione total e reduzida .....	27
3.9.1 Validação do método para quantificação da glutathione total .....	27
3.10 Carbonilação de proteínas (PCO) .....	28
3.11 Peroxidação lipídica (LPO) .....	29
3.12 Ensaio Cometa .....	29
3.13 Quantificação de proteínas totais .....	30
3.14 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	31
3.15 Tratamento estatístico dos dados .....	31
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
4.1 Padronização da metodologia para o isolamento e cultivo primário de hepatócitos de <i>P. lineatus</i> .....	32
4.2 Efeitos da cilindrospermopsina .....	35
4.2.1 Viabilidade celular .....	35
4.2.2 Atividade da GST e G6PDH .....	35
4.2.3 Glutathione total e reduzida .....	36
4.2.3.1 Teste do método para quantificação da glutathione total .....	38
4.2.4 Detecção das espécies reativas de oxigênio/ nitrogênio (ERONS) .....	38
4.2.5 Atividade da MXR .....	39
4.2.6 Carbonilação de proteínas, peroxidação de lipídeos e danos no DNA .....	40
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
5.1 Isolamento e cultura dos hepatócitos .....	42
5.2 Efeitos da cilindrospermopsina .....	44
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>52</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O ambiente natural recebe continuamente substâncias químicas liberadas pelas mais diversas atividades antrópicas, como agrícolas, industriais e urbanas. A partir do século XX, diferentes tipos de poluentes orgânicos e inorgânicos como os compostos organoclorados (OCs), bifenilas policloradas (PCBs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), policlorodibenzofuranos (PCDF), policlorobenzodioxinas (PCDD) e metais passaram a ser liberados de forma indiscriminada no ambiente natural. Isso, aliado ao destino inadequado de resíduos sólidos (urbano, agrícola e industrial) e ao tratamento ineficaz ou inexistente de esgoto sanitário (MC ELHINEY e LAWTON, 2005) tem levado à depredação e degradação desses ambientes. Os receptáculos finais da maior parte destas substâncias são os ecossistemas aquáticos, quer seja diretamente ou indiretamente via processos atmosféricos, terrestres e hidrológicos. Não menos importante e, muitas vezes, caracterizando uma consequência do efeito antrópico, a capacidade das cianobactérias de se adaptarem em ambientes inóspitos e eutrofizados<sup>1</sup> tem possibilitado a proliferação destes organismos levando à contaminação de grandes reservas de água. Florações de cianobactérias são comuns em corpos de água doce muito eutrofizados, o que cria um problema significativo, visto que certas espécies de cianobactérias produzem toxinas de grande potencial tóxico para os organismos aquáticos e para as populações humanas que são supridas com essa água ou que se alimentam destes organismos (RAO *et al.*, 2002; BERRY, 2010).

Vários gêneros de cianobactérias (*Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Cylindrospermopsis*, *Nostoc*) são produtoras de cianotoxinas (HERFINDAL, 2005; MOLICA e AZEVEDO, 2009). Estas substâncias têm sido caracterizadas de acordo com seu mecanismo de ação em mamíferos, sendo as hepatotoxinas os principais representantes, seguidas pelas neurotoxinas; das quais as saxitoxinas são as mais conhecidas. As hepatotoxinas são as toxinas mais comumente produzidas pelas cianobactérias e podem ser oligopeptídeos

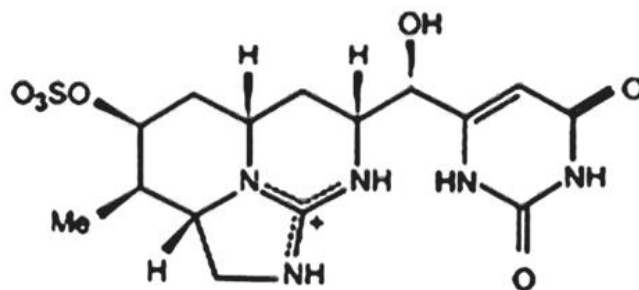
---

<sup>1</sup> A eutrofização caracteriza-se pelo enriquecimento da água por nutrientes, principalmente compostos de nitrogênio e fósforo, que promovem uma alteração no equilíbrio entre os organismos e na qualidade da água (NYENJE, 2010).

cíclicos como as microcistinas e a nodularina ou alcalóides como a cilindropermopsina.

A cilindropermopsina, toxina de interesse neste trabalho, foi identificada pela primeira vez após a sua implicação como agente causador de um grave surto de hepatointerites em seres humanos de *Palm Island*, Austrália, em 1979 (HAWKINS *et al.*, 1985). No Brasil, o caso mais conhecido foi à intoxicação de pacientes em uma clínica de hemodiálise em Pernambuco em 1996. Neste caso, os pacientes tratados na clínica apresentaram perturbações visuais, náuseas e vômitos após o tratamento de hemodiálise de rotina; dos 131 pacientes, 100 desenvolveram insuficiência hepática aguda, sendo registradas posteriormente 76 mortes como consequência da exposição. Investigações na unidade de tratamento de água da clínica detectaram contaminação dos filtros por dois tipos de cianobactérias produtoras das toxinas microcistina e cilindropermopsina (CARMICHAEL *et al.*, 2001).

A cilindropermopsina é um alcalóide hepatotóxico guanidínico cíclico altamente solúvel em água (Figura 1), cujas informações sobre propriedades tóxicas são escassas. No entanto, a estabilidade desta substância é bem conhecida, resistindo a altas temperaturas (não degradada a 100 °C por 15 min) e a vários pHs (25% degradada em pH 4, 7 e 10 somente após 8 semanas; MASTEN e CARSON, 2000), o que aumenta o risco de exposição dos organismos nos ambientes aquáticos, onde condições mais amenas de temperatura e pH permitem a persistência da cilindropermopsina por tempo prolongado.



**FIGURA 1** – Estrutura química da cilindropermopsina ( $C_{15}H_{21}N_5O_7S$ , massa molecular = 415,43 Da). (FONTE: MOLICA e AZEVEDO, 2009)

Toxicologicamente, a cilindropermopsina é um potente inibidor da síntese de proteínas eucarióticas, e neste aspecto, já foi relatada a redução no número de ribossomos aderidos às membranas do retículo endoplasmático granular e uma

menor interação com proteínas solúveis envolvidas na tradução (TERAO *et al.*, 1994; FROSCIO *et al.*, 2008). O fígado é o principal órgão-alvo desta cianotoxina, apresentando necroses centro-lobulares como dano hepático de maior frequência em mamíferos (HAWKINS *et al.*, 1985;. SEAWRIGHT *et al.*, 1999; GRIFFITHS e SAKER, 2003; HUMPAGE e FALCONER, 2003). O comprometimento renal também é frequentemente relatado, e envolve a necrose dos túbulos proximais, bem como outras alterações na arquitetura básica do órgão. Hemorragias têm sido observadas nos pulmões e no coração, assim com a atrofia do timo e necroses no baço (HAWKINS *et al.*, 1985; SEAWRIGHT *et al.*, 1999; BERNARD *et al.*, 2003). Além disso, genotoxicidade, citotoxicidade, ativação de diferentes isoformas do citocromo P450 (CYP), redução da síntese de glutathiona (GSH) e desregulação endócrina têm sido relatados em células de mamíferos (HUMPAGE *et al.*, 2005; BAIN *et al.*, 2007; NEUMANN *et al.*, 2007; FROSCIO *et al.*, 2009). No que refere-se aos organismos aquáticos, poucos dados encontram-se disponíveis para células de peixes, embora estes organismos encontrem-se diretamente expostos à cilindrospermopsina no ambiente natural ou em pisciculturas.

Com relação à legislação brasileira sobre o monitoramento de toxinas de microalgas no Brasil, a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) em colaboração com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) redigiu uma atualização da Portaria 36/MS/90, que definiu as normas e os padrões de potabilidade da água para o consumo humano no Brasil. Essa norma inclui a obrigatoriedade do monitoramento da ocorrência de cianobactérias potencialmente nocivas, testes de toxicidade e análise de algumas cianotoxinas (microcistina, cilindrospermopsina e saxitoxina), tanto na água bruta de manancial, quanto na água tratada para o consumo doméstico. De acordo com a Portaria 1469, de 29 de dezembro de 2000, que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano, e seu padrão de potabilidade, o valor limite aceitável da concentração de cilindrospermopsina é de  $15,0 \mu\text{g.l}^{-1}$ . Esta portaria foi revogada pela Portaria nº 518, de 25 de março de 2004, que não promoveu alterações nos valores limites de cianotoxinas. Nesta portaria, estabelece-se também que se houver contagem de cianobactérias acima de  $20.000 \text{ células.ml}^{-1}$  ( $2 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$  de biovolume) no ponto de captação de água para abastecimento deverá ser realizada análise semanal de cianotoxinas na água, tanto na saída da estação de tratamento como nas entradas (hidrômetros) das clínicas de

hemodiálise e indústrias de injetáveis. Esta análise pode ser dispensada quando não houver comprovação de toxicidade na água bruta por meio da realização semanal de bioensaios em camundongos (BRASIL, 2000, 2005).

Os organismos após captarem agentes tóxicos podem, conforme a natureza química dos compostos e o arsenal enzimático das células em questão, eliminá-los na sua forma química original (sem metabolizá-los) ou podem biotransformá-los em metabólitos geralmente mais hidrossolúveis, que posteriormente serão excretados via sistema renal (BUCHELI e FENT, 1995; BOELSTERLI, 2007). A biotransformação é um processo essencial que determina a toxicidade de muitos compostos, uma vez que estes podem ser convertidos em metabólitos inócuos ou menos tóxicos (biotransformação levando à destoxicação ou destoxificação), ou em metabólitos mais tóxicos que o composto parental (bioativação) (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Além disso, a biotransformação pode determinar parcialmente a taxa de eliminação dos compostos tóxicos das células, por exemplo, por sistemas de transporte transmembrânicos que reconhecem apenas os produtos da biotransformação, como alguns componentes do sistema de resistência a multixenobióticos (MXR) (BARD, 2000). Todos esses processos biológicos são essenciais, uma vez que determinam a capacidade dos organismos de ajustar seus sistemas de defesa para suprimir eventuais efeitos deletérios de xenobióticos. Na impossibilidade de neutralizar os efeitos nocivos, os organismos passam a sofrer lesões que, muitas vezes, põem em risco sua sobrevivência em ecossistemas impactados. Por esse motivo, estudos de monitoramento fazem-se importantes para a preservação da saúde de tais ecossistemas (VAN DER OOST *et al.*, 2003; BOELSTERLI, 2007).

A avaliação *in situ* das condições sanitárias dos reservatórios aquáticos continentais é um trabalho complexo e não pode ser efetuada apenas com análises químicas dos contaminantes, uma vez que estas não possibilitam a determinação definitiva dos riscos ecotoxicológicos iminentes. Para ser completa, a avaliação do risco ambiental deve levar também em consideração as perturbações biológicas induzidas nos organismos (FENT, 2003). As pesquisas em ecotoxicologia moderna focam respostas biológicas precoces sutis ou que ocorrem antes da mortalidade,

descritas sob o termo genérico de biomarcadores<sup>2</sup> (BRAUNBECK *et al.*, 1998 ; VASSEUR e COSSU-LEGUILLE, 2003).

Os biomarcadores podem também ser empregados na análise dos efeitos toxicológicos *in vivo* em laboratório sob condições estritamente controladas, cujos resultados podem, com as devidas validações e cuidados, ser extrapolados para o ambiente. Contudo, embora os estudos *in situ* e os bioensaios/ensaios toxicológicos sejam importantíssimos, estudos *in vitro* com células intactas e isoladas do organismo são importantes para estudos de mecanismos de toxicidade e de efeitos ao nível celular, uma vez que os xenobióticos necessariamente interagem primeiramente a nível celular. Assim, as respostas celulares são informações determinantes que têm sido utilizadas na área biomédica e toxicológica (HIGHTOWER e RENFRO, 1988), e o seu uso nos sistemas *in vitro* tem sido cada vez mais importante na ecotoxicologia (FENT, 2001; FILIPAK NETO *et al.*, 2007).

No caso de hepatotoxinas como a cilindrospermopsina, estudos com células hepáticas fazem-se necessários, e os modelos *in vitro* utilizando hepatócitos são bastante úteis, sobretudo o cultivo primário. O fígado é o principal sítio metabólico de xenobióticos em vertebrados e está intimamente implicado com a manutenção da homeostase nesses organismos. Quando intactamente isolados do fígado, os hepatócitos representam bem o compromisso indispensável entre os ensaios reducionistas *in vitro* e a necessidade do modelo de ser tão próximo quanto possível da situação *in vivo* (SEGNER 1998; ZUCCO *et al.*, 2004, FILIPAK NETO *et al.*, 2006). Logo, o cultivo de hepatócitos translocados para um ambiente adequado, onde as interações sistêmicas são reduzidas, representa um modelo precioso para estudos mecanísticos e de toxicidade de xenobióticos. Neste modelo, as células cultivadas apresentam-se funcionalmente muito semelhantes às células quando presentes no tecido, diferentemente do que geralmente ocorre com as linhagens celulares estabelecidas, que durante o processo de imortalização, podem sofrer alterações na expressão de alguns genes tecido-específicos, sobretudo com relação às enzimas hepáticas de biotransformação (BAKSI e FRAZIER, 1990; SEGNER, 1998).

---

<sup>2</sup> Biomarcadores são definidos como respostas ou alterações biológicas mensuráveis em nível molecular, bioquímico e celular, as quais expressam os efeitos tóxicos causados pela exposição a agentes químicos ambientais (Walker *et al.*, 1996).

Os peixes têm sido amplamente selecionados e utilizados para a análise de respostas biológicas e bioquímicas, após exposição a contaminantes presentes nos ambientes aquáticos (BUSSOLARO *et al.*, 2010; MIRANDA *et al.*, 2008; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2002 e 2005). A distribuição dos peixes nos diferentes níveis tróficos é bastante diversificada, de modo que estes vertebrados possuem um importante papel no transporte energético entre os diferentes níveis da cadeia trófica. Neste caso as espécies que ocupam níveis mais altos da cadeia alimentar funcionam como excelentes integradoras dos poluentes presentes na água, sedimento e biota, através dos processos de bioacumulação e biomagnificação (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Nos peixes, a compreensão do acúmulo e dos efeitos tóxicos e biológicos de contaminantes apresenta uma pertinência ecológica irrefutável, sendo que a utilização destes organismos é incontornável na avaliação dos níveis de poluição dos ecossistemas aquáticos e do estado de saúde dos mesmos. Além disso, por fazerem parte da dieta humana, podem igualmente servir de espécies sentinelas para se estimar o risco de exposição humana (RABITTO, *et al.*, 2011).

A espécie *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Figura 2) é um teleósteo dulcícola de ampla distribuição na América do Sul. Alimenta-se de matéria orgânica e microrganismos associados à lama do fundo de lagos e margens de rios, sendo considerada umas das espécies mais importantes nos rios da região Sul e Sudeste do Brasil, devido ao seu significativo valor econômico para alimentação humana. Popularmente conhecido como curimba ou curimbatá, o *P. lineatus* é um peixe de grande potencial para a piscicultura por apresentar boa capacidade de acomodação aos diferentes ambientes aquáticos, facilidade de fecundação artificial, manejo, regime alimentar, crescimento e resistência a mudanças de pH na água e a baixas temperaturas durante o inverno (FONTENELE, 1953; WINKALER *et al.*, 2007).



**FIGURA 2** - Espécime de *Prochilodus lineatus* – curimbatá  
(FONTE: SVERLIJ, 2005)

Embora o Brasil tenha a maior biodiversidade de peixes do planeta, não há dados sobre os efeitos de cilindrospermopsina para as espécies nativas brasileiras e muito menos dados de citotoxicidade em peixe. Informações sobre o cultivo celular de hepatócitos de peixes encontram-se restritos a duas publicações do Laboratório de Toxicologia Celular/UFPR, referentes a duas espécies, *Hoplias malabaricus* (Traíra) (FILIPAK NETO *et al.* 2006) e *Hypostomus commersoni* (Cascudo) (BUSSOLARO *et al.*, 2010). Conseqüentemente, é importante ampliar e diversificar os métodos para a cultura primária de hepatócitos de outras espécies de diferentes níveis tróficos, criando novas ferramentas com os modelos *in vitro*. Isto vai possibilitar a investigação de aspectos referentes aos mecanismos de resposta ao estresse químico que podem estar associados às diferenças relacionadas a resistência destas espécies nos ambientes impactados pela atividade antrópica.

Nas células, diferentes mecanismos de resposta podem ser ativados por xenobióticos como, por exemplo, alterações nos sistemas antioxidantes e de morte celular. Fisiologicamente, os processos oxidativos são parte fundamental do metabolismo aeróbico dos organismos, e assim as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) são produzidas em pequenas quantidades naturalmente. Além disso, as ERONs possuem funções fundamentais na sinalização celular, em processos oxidativos intracelulares e na destruição de patógenos por fagócitos (PALMER *et al.*, 1987; IRANI *et al.*, 1997; MANNICK e SCHONHOFF, 2002).

No entanto, células quando sob algum tipo de estresse, como a exposição a xenobióticos, podem apresentar uma produção ou acúmulo excessivo de ERONs, o que pode levar a efeitos prejudiciais, tais como danos oxidativos aos lipídeos, proteínas, carboidratos e/ou DNA (VALKO *et al.*, 2006). Dessa forma, o excesso de



ERONs é contrabalanceado por mecanismos antioxidantes ativados nas células ou através de moléculas antioxidantes provenientes da alimentação, que agem no sentido de evitar a ocorrência de diversas patologias.

Os antioxidantes produzidos pelas células agem enzimaticamente como a glutathione peroxidase (GPx) e a Glutathione S-transferase (GST), ou não enzimaticamente como a glutathione reduzida (GSH) (RUNNERGAR *et al.*, 1995). A GST representa uma família de enzimas envolvidas na conjugação de glutathione (GSH) com xenobióticos, inclusive no caso de algumas cianotoxinas, sendo que sua inibição sensibiliza a célula a moléculas que requerem sua atividade de conjugação para serem detoxificadas.

O par GSH / GSSG (glutathione dissulfeto) é o principal determinante não enzimático do ambiente redox celular<sup>3</sup>, com uma concentração molar muito superior a dos demais pares redox (SCHAFER e BUETTNER, 2001). A GSH serve como molécula endobiótica na detoxificação de diversos substratos (ARMSTRONG, 1997; VAN BLADEREN, 2000) e na redução de hidroperóxidos orgânicos pela GST e GPx (ARTEEL e SIES, 2001). Além disso, o GSH participa na redução do próprio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O nas reações catalisadas pela glutathione peroxidase (GPx) e reage prontamente com o radical hidroxila (HO<sup>\*</sup>), tornando a análise da concentração do GSH fundamental à verificação do ambiente redox celular.

A alteração do ambiente redox pode levar a algum dano estrutural da célula, particularmente nas membranas biológicas. Propriedades como fluidez, permeabilidade, potencial elétrico e transporte seletivo (CUI *et al.*, 2004) podem ser alteradas devido à peroxidação lipídica, com a conversão destes em hidroperóxidos lipídicos (ABUJA e ALBERTINI, 2001; STRMAC e BRAUNBECK, 2002). A quantificação da peroxidação lipídica mostra-se importante, uma vez que para a execução dos processos celulares é indispensável a integridade física e funcional das membranas biológicas. Além dos danos nos lipídios, outro importante alvo das alterações no ambiente redox celular são as proteínas, as quais podem sofrer o processo de carbonilação, que consiste na modificação das cadeias laterais dos aminoácidos, com a formação de grupamentos do tipo carbonila.

---

<sup>3</sup> O ambiente redox indica o balanço entre as moléculas oxidadas e reduzidas encontradas na célula. A regulação do ambiente redox celular protege os organismos contra danos oxidativos, mantendo a homeostase celular (VALKO, *et al.*, 2007).

Consequentemente, as proteínas podem ter a estrutura nativa modificada o que interfere com o funcionamento normal da célula (QUINLAN e GUTTERIDGE, 2000).

Assim, alguns biomarcadores podem ser empregados para avaliar se a exposição a determinados agentes estressores contribui para a alteração da concentração de ERONs, e se estes causam danos às células através de alterações na estrutura de macromoléculas como os biomarcadores que quantificam a peroxidação de lipídios (LPO), a carbonilação de proteínas (PCO), os danos ao DNA (ensaio cometa), ou mesmo os que identificam a atividade de enzimas e a concentração de GSH (ARTEEL e SIES, 2001; FILOMENI et al., 2002).

Apesar da presença de xenobióticos em diversos ecossistemas aquáticos, muitos organismos são capazes de sobreviver e se reproduzir nestes ambientes indicando que os mesmos possuem mecanismos de defesa celular contra estes tipos de agressões. O mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR) funciona como um destes mecanismos de defesa (KURELEC, 1992), o que o torna um biomarcador molecular bastante interessante. Trata-se, mais do que isso; é um mecanismo biológico natural de defesa de “primeira-linha” para proteção contra toxinas ambientais e endógenas, além de possuir uma grande implicação nos estudos de avaliação de risco por xenobióticos ambientais. Este fenótipo de resistência é modulado pela glicoproteína-P, juntamente com outros transportadores pertencentes a superfamília ABC, e normalmente está confinada nas membranas de superfícies luminais de tecidos secretores, de absorção ou de barreira. Este sistema facilita o efluxo de produtos naturais tóxicos presentes na dieta e de metabólitos endógenos (GOTTESMAN e PASTAN, 1993), atuando na secreção de diversos compostos, de maneira saturável e dependente de energia. Sendo assim, a atividade da MXR pode ser quantificada para verificar se a exposição a determinados compostos é capaz de reduzir ou aumentar a capacidade celular de eliminação de toxinas e poluentes.

Desta forma, são vários os biomarcadores celulares que podem ser empregados na avaliação do efeito de compostos potencialmente tóxicos como a cilindrospermopsina. Destes geralmente são priorizados aqueles que permitem informar sobre os distúrbios que podem comprometer o bom funcionamento celular, como a manutenção do ambiente oxidorreduzidor e da estrutura celular em células-alvo. Assim, o foco da presente dissertação é estabelecer o modelo *in vitro* de

hepatócitos de *P. lineatus* e empregá-lo na avaliação da integridade destas células após a exposição à cilindrospermopsina.

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Avaliação da citotoxicidade da cilindropermopsina em hepatócitos de *Prochilodus lineatus* através de modelos *in vitro*.

### Objetivos Específicos

Padronizar um método de isolamento e cultivo primário de hepatócitos de *P. lineatus* que permita a realização de ensaios toxicológicos *in vitro*.

Avaliar os possíveis efeitos da cilindropermopsina em hepatócitos de *P. lineatus* através dos ensaios de viabilidade celular;

Avaliar os possíveis efeitos da cilindropermopsina em hepatócitos de *P. lineatus* através da avaliação do ambiente redox e alterações em macromoléculas (lipídeos, proteínas e DNA);

Avaliar os possíveis efeitos da cilindropermopsina em hepatócitos de *P. lineatus* na atividade de transportadores envolvidos com o sistema de resistência a multixenobióticos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção e cuidados com os peixes

Os exemplares adultos de *Prochilodus lineatus* (500 - 800 g) foram adquiridos na piscicultura Panamá localizada na cidade de Paulo Lopes (SC) (<http://www.pisciculturapanama.com.br>) e transportados para o Laboratório de Bioensaios do Departamento de Biologia Celular no Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Estes animais foram mantidos coletivamente em tanque de fibrocimento de 3000 litros de água sob aeração e filtro constante, contendo tubos de PVC no fundo para abrigo dos peixes. Os tanques receberam limpeza semanal com troca de 10% da água, a alimentação foi administrada três vezes por semana com ração comercial (Supra Acqua Line<sup>®</sup>, 28% de proteína).

Antes de serem utilizados para a obtenção de células, os peixes permaneceram em jejum por dois dias para facilitar o procedimento de extirpação do fígado e reduzindo o risco de rompimento da parede intestinal e conseqüente contaminação da cultura.

#### 3.2 Isolamento e cultura dos hepatócitos

Para cada cultura primária realizada, três animais foram anestesiados com benzocaina (200 ppm em água). Em seguida, 0,5 ml de heparina (5000 U.l<sup>-1</sup>) foi injetado com auxílio de seringa e agulha na veia caudal de cada indivíduo, que permaneceu em um recipiente contendo somente água filtrada durante cerca de 5 min. Posteriormente, os peixes foram novamente anestesiados e mortos por secção medular logo abaixo do crânio<sup>4</sup>. Após remoção das escamas da região ventral e assepsia com etanol a 70% e clorexidina alcoólica a 2%, os espécimes foram levados ao fluxo laminar, onde os lobos hepáticos foram removidos e mantidos durante 10 min em uma solução de tampão fosfato salino (PBS, pH 7,6, 4°C)

---

<sup>4</sup> Todo o procedimento referente à utilização dos animais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (protocolo n°455).

suplementada com anfotericina-B ( $25 \mu\text{g.l}^{-1}$ ), estreptomicina ( $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) e penicilina ( $100 \text{ U.ml}^{-1}$ ) a fim de eliminar possíveis fontes de contaminação. Em seguida, os fígados dos três animais foram perfundidos manualmente por injeção, com emprego de seringa e agulha, com PBS (pH 7,6 e  $4^\circ\text{C}$ ) acrescido de  $2,0 \text{ mM}$  de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico) e glicose ( $1,0 \text{ g.l}^{-1}$ ) a fim de promover a completa retirada do sangue do órgão. Os fígados foram posteriormente cortados com auxílio de pinças e bisturi e os fragmentos resultantes foram incubados durante aproximadamente 3 h em estufa ( $30^\circ\text{C}$ ) na presença da enzima dispase ( $1,0 \text{ U.l}^{-1}$ ) em PBS suplementado com glicose ( $1,0 \text{ g.l}^{-1}$ ) para promover a dissociação dos hepatócitos. Por fim, as células foram transpassadas por uma tela de metal (60 fios/polegada) para melhor dissociação das células e separação de eventuais fragmentos de tecido. As células obtidas foram coletadas em PBS, centrifugadas em baixa rotação ( $100\text{--}120 \text{ g}$ , 3-5 min), lavadas quatro vezes para remoção de células rompidas e restos do fígado, e ressuspensas para  $1,0 \times 10^6$  células por mililitro em meio de cultura RPMI 1640 ( $2,0 \text{ g.l}^{-1}$  D-glucose, pH 7,6) suplementado com  $\text{NaHCO}_3$  ( $25 \text{ mM}$ ), insulina mista ( $0,1 \text{ U.ml}^{-1}$ ), gentamicina ( $40 \text{ mg.l}^{-1}$ ), estreptomicina ( $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ), penicilina ( $10 \text{ U.ml}^{-1}$ ), anfotericina-B ( $2,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) e soro fetal bovino ( $5\% \text{ v.v}^{-1}$ ). Finalmente,  $2,0 \times 10^5$  e  $1,0 \times 10^6$  células (viabilidade  $> 97\%$ ) foram semeadas respectivamente em microplacas de 96 e 24 poços (TTP® ou Biofil®) de acordo com a quantidade necessária de células para os ensaios, e mantidas a  $24^\circ\text{C}$  uma incubadora ( $\text{pCO}_2$  de  $1,7\%$ ) durante 4 dias para que houvesse adesão, recuperação do procedimento de isolamento e reorganização dos hepatócitos. Após este período, as células foram empregadas para a avaliação dos efeitos da cilindrospermopsina, como descrito no item 3.3.

Porém, antes de se estabelecer esse protocolo, a dissociação não-enzimática, e outras digestões enzimáticas foram testadas para a obtenção dos hepatócitos. Testaram-se soluções contendo apenas EDTA ( $2 \text{ mM}$  em PBS, 30-60 min), tripsina-EDTA ( $0,05\%$  tripsina,  $2 \text{ mM}$  EDTA em PBS, 15-30 min), pancreatina ( $0,25\%$  em PBS, 30 min, temperatura ambiente), colagenase IV ( $0,25 \text{ U.ml}^{-1}$  em PBS, 30 min,  $30^\circ\text{C}$ ), dispase ( $1,0 \text{ U.l}^{-1}$  em PBS, 30 min,  $30^\circ\text{C}$ ) e colagenase IV-dispase ( $0,15 \text{ U.ml}^{-1}$  de colagenase IV,  $0,5 \text{ U.ml}^{-1}$  de dispase em PBS, 30 min,  $30^\circ\text{C}$ ). Depois de selecionar o melhor protocolo de dissociação, as células foram cultivadas em placas de cultura de 24 e 96 poços de três marcas diferentes (TPP®, Biofil®, Corning®), com e sem pré-tratamento, usando matrigel ( $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) ou

colágeno tipo I desnaturado (gelatina) a 1,5%, a fim de determinar a melhor situação de adesão celular.

### 3.3 Desenho experimental

A partir de cada cultura primária foram estabelecidos 4 grupos experimentais: um grupo controle (não exposto a cianotoxina) e três outros grupos expostos a 0,1, 1 e 10  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de cilindrospermopsina purificada<sup>5,6</sup> em meio de cultura. Para isso, as células foram isoladas e cultivadas durante os 4 dias determinados como sendo essenciais para adesão e recuperação celulares. Em seguida, 75% do meio de cultura de todos os grupos foram substituídos por um novo meio contendo as mesmas suplementações, exceto pela presença da cianotoxina nos grupos expostos, e as células foram mantidas durante 72 h nas situações-teste.

Após o período de exposição estar concluído, cada poço da placa foi lavado duas vezes com PBS, e posteriormente a placa inteira foi congelada em freezer a -76 °C para posterior realização dos ensaios bioquímicos. Referente aos testes de viabilidade celular, produção de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ERONs) e atividade da MXR, após a lavagem dos poços das microplacas, as células foram imediatamente utilizadas. Para o ensaio cometa, as células foram tripsinizadas (EDTA dissódico a 0,02%, tripsina a 0,05% em PBS, a 24 °C, 15-20 min) e mantidas protegidas da luz (para evitar quebras adicionais ao DNA).

### 3.4 Testes de viabilidade celular

Dois testes de viabilidade celular foram empregados: o teste de exclusão do azul de tripan para a verificação da viabilidade celular no momento que antecedia o plaqueamento das células, e o teste do vermelho neutro para avaliar a citotoxicidade da cianotoxina ao término do período de exposição.

---

<sup>5</sup> O valor ( $1\mu\text{g.l}^{-1}$ ) é sugeridos pela literatura como valor máximo aceitável, baseado na exposição a camundongos (FALCONER e HUMPAGE, 2005 e 2006), sendo este adotado como valor médio no estudo.

<sup>6</sup> A cilindrospermopsina purificada foi fornecida pelo Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Para a execução do teste de exclusão do corante azul de tripan, 10 µl da suspensão celular e 10 µl do corante azul de tripan a 0,4% foram adicionados a um tubo de 0,5 ml e misturados. Após 1 min, 200 células foram classificadas visualmente em células viáveis e não viáveis sob microscopia de campo claro.

Já para a realização do teste de vermelho neutro, os poços foram lavados com PBS e receberam 200 µl de meio de cultura contendo 50 µg.ml<sup>-1</sup> de vermelho neutro. Após 3 h de incubação em estufa a 24 °C e pCO<sub>2</sub> de 1,7%, os poços foram lavados três vezes com solução contendo formol (15% em água) e cloreto de cálcio (100 g.l<sup>-1</sup>) para remoção do corante não incorporado e fixação das células. Posteriormente, foram adicionados 300 µl de solução de ácido acético a 1% e etanol a 50% aos poços para extração do corante. Após 15 min, o conteúdo de cada poço foi homogeneizado para ressuspensão do corante, aguardou-se 5 min para a precipitação dos restos celulares e 200 µl do sobrenadante, sem restos celulares detectáveis visualmente, foram transferidos para outra microplaca de 96 poços para quantificação da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm.

### **3.5 Atividade do mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR)**

Foi utilizado o método de exclusão da rodamina descrito por CORNIWALL *et al.* (1995), modificado por PESSATTI *et al.* (2002), com algumas modificações adicionais para o emprego com células cultivadas em microplacas. Após a exposição das células cultivadas em microplacas de 96 poços, o meio de cultura foi substituído por uma solução de rodamina B (1,0 µM em PBS), e as células foram incubadas com na presença desta solução durante 30 min a 24°C. A solução foi posteriormente removida, e as células foram lavadas duas vezes com PBS para retirada do excesso de corante. Em seguida, cada poço da microplaca recebeu 250 µl de PBS, e a microplaca foi congelada a -76 °C para o rompimento das células. Após congelamento, o conteúdo dos poços foi descongelado, homogenizado e transferido (200 µl do sobrenadante) para uma microplaca preta. Procedeu-se então a medida da intensidade de fluorescência em espectrofluorímetro ( $\lambda$  de excitação = 485 nm;  $\lambda$  de emissão = 530 nm), e o resultado obtido foi expresso como acúmulo de rodamina em por mg de proteína. Como controle positivo, foi utilizado verapamil (20 µM, 30 min) antes das amostras serem incubadas com rodamina B.



Para assegurar que a presença de fluorescência da rodamina ou sua interação com a amostra não interfere com a determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford, foram realizados testes usando amostras com concentrações de rodamina semelhantes ao estudo.

### **3.6 Detecção de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ERONs)**

Para detectar a produção de ERONs foi utilizado o marcador fluorescente, diclorofluoresceína diacetato ( $H_2DCFDA$ ). A  $H_2DCFDA$  difunde-se passivamente nas células, e é desacetilada ( $DCFH_2$ ) e subsequentemente oxidada principalmente via reação catalisada por  $H_2O_2$ / peroxidase/  $Fe^{2+}$ / citocromo c, e possivelmente diretamente por outras ERONs, originando 2'7'-diclorofluoresceína (DCF) fluorescente (HAUGLAND, 1996; BENOVA *et al.*, 1998).

Após terminar o período de exposição das células à cianotoxina, removeu-se o meio de cultura dos poços e um volume de 200  $\mu$ l de meio de cultura contendo  $H_2DCFDA$  (10 mM preparado em DMSO; concentração final do DMSO = 0,1%) foi adicionado a cada micropoço. Passados 15 min de incubação a 24 °C, as células foram lavadas duas vezes em PBS, e posteriormente foi adicionado em cada poço 250  $\mu$ l de PBS acrescido de 2,0 mM de EDTA. A placa foi congelada a -76 °C, para rompimento das células, descongelada e conteúdos dos micropoços foi ressuspensão. Por fim, 200  $\mu$ l do conteúdo de cada poço foi adicionado em uma microplaca preta para a leitura em espectrofluorímetro ( $\lambda$  de excitação = 488 nm;  $\lambda$  de emissão = 530 nm). Embora este método quantifique principalmente o peróxido de hidrogênio, ele não é totalmente específico para esta espécie reativa de oxigênio, e outras ERONs também podem converter  $H_2DCFDA$  para  $H_2DCF$  fluorescente. Durante todos os procedimentos, as células foram mantidas em gelo protegidas da luz para evitar perda de fluorescência.

### **3.7 Atividade da Glutathione S-transferase (GST)**

A atividade geral das Glutathione S-transferases (GST) foi monitorada através do aumento de absorbância resultante da formação de um tioéter pelos substratos

GSH e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (KEEN *et al.*, 1976). Para isso, as amostras em microplacas foram descongeladas em gelo, sendo em seguida adicionados 150  $\mu$ l de PBS por poço para ressuspensão do conteúdo intracelular (as células são rompidas durante o congelamento), e as microplacas foram centrifugadas a 2800 *g* por 10 min a 4 °C. O volume de 30  $\mu$ l do sobrenadante da amostra foi adicionado a uma nova microplaca (PBS para o branco) e, imediatamente antes das leituras de absorbância, 170  $\mu$ l do meio de reação (GSH a 1,5 mM, CDNB<sup>7</sup> a 2,0 mM, tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 6,5) foi rapidamente acrescentado. O aumento gradual na absorbância foi registrado em intervalos de 12 s durante 2 min a 340 nm para posterior seleção do primeiro intervalo de 1 min com  $r^2 \geq 0,99$  para o cálculo do delta da absorbância por minuto. A atividade da enzima foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 9.6  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### 3.8 Atividade da Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

A G6PDH é uma importante enzima envolvida na redução do  $\text{NADP}^+$  em NADPH, que é cofator na redução de GSSG em GSH pela glutathiona dissulfeto redutase. A atividade da G6PDH foi determinada de acordo com GLOCK E MCLEAN (1953), num método que tem por princípio a detecção do aumento na absorção de luz provocada pela redução da  $\text{NADP}^+$  a NADPH ( $\lambda = 340$  nm) pela enzima G6PDH ao custo de glicose 6-fosfato (G6P). As amostras em placas de 96 poços foram descongeladas em gelo, sendo adicionado em cada poço 150  $\mu$ l de PBS para ressuspensão do conteúdo intracelular. Posteriormente as placas foram centrifugadas a 2800 *g* durante 10 min a 4 °C. Por fim, um volume de 50  $\mu$ l de sobrenadante (PBS para o branco) seguido de 150  $\mu$ l de meio de reação ( $\beta$ -  $\text{NADP}^+$  (nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato) a 1 mM, glicose 6-fosfato a 2 mM e  $\text{MgCl}_2$  a 10 mM em tampão Tris-HCl a 100 mM, pH 8,0 e 25 °C) foram adicionados a uma microplaca. A absorbância foi monitorada ( $\lambda = 340$  nm) durante 3 min em intervalos de 10 s e o primeiro intervalo de 1 min com  $r^2 \geq 0,99$  foi selecionado. O

---

<sup>7</sup> Diluir o CDNB inicialmente em um pouco de etanol (~40-50 mM) antes de adicionar a solução de reação.

coeficiente de extinção molar para o NADPH de  $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  foi utilizado para o cálculo da atividade da G6PDH.

### 3.9 Glutathiona total e reduzida

Para determinar o conteúdo de glutathiona total as células cultivadas em placas de 24 poços foram lavadas com PBS e congeladas a  $-76^{\circ}\text{C}$ . O lisado celular foi suspenso em  $100 \mu\text{l}$  de PBS gelado, e os conteúdos de dois poços foram misturados (para aumentar a quantidade de amostra) e transferidos para tubos de  $1,5 \text{ ml}$ . Após centrifugação<sup>8</sup>,  $50 \mu\text{l}$  do sobrenadante foram separados para quantificação de proteínas totais e  $150 \mu\text{l}$  do sobrenadante recebeu  $30 \mu\text{l}$  de ácido tricloroacético a 50% para a precipitação de proteínas após uma nova centrifugação<sup>6</sup>. Em seguida,  $150 \mu\text{l}$  do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo e o pH foi neutralizado com  $390 \mu\text{l}$  de Tris ( $0,4 \text{ M}$ , pH 8,9). Finalmente,  $200 \mu\text{l}$  da solução neutralizada foram separadas em dois tubos de  $1,5 \text{ ml}$  para a quantificação da glutathiona total e da glutathiona reduzida, respectivamente. No primeiro tubo, foi adicionado  $26 \mu\text{l}$  de solução contendo  $0,9 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$  de glutathiona dissulfeto redutase e  $1,8 \text{ mM}$  de NADPH em tampão Tris ( $0,4 \text{ M}$ , pH 8,9). O segundo tubo recebeu  $26 \mu\text{l}$  de tampão Tris ( $0,4 \text{ M}$ , pH 8,9). Após 10 min de incubação à temperatura ambiente,  $200 \mu\text{l}$  do conteúdo dos tubos foram colocados em microplacas de 96 poços e receberam  $20 \mu\text{l}$  DTNB ( $2,5 \text{ mM}$  de 5,5'-dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico) em metanol 25%). Após 5 min, a absorbância foi medida a  $415 \text{ nm}$  para o cálculo do conteúdo de GSH por comparação com uma curva-padrão. A concentração de glutathiona dissulfeto foi calculada pela diferença entre o conteúdo da glutathiona total e da GSH sendo possível estabelecer a razão 2GSH/GSSG (SEDLAK E LINDSAY (1968) e GRIFFITH (1980) com modificações).

#### 3.9.1 Validação do método para quantificação da glutathiona total

A fim de confirmar se o teste descrito acima é eficiente para determinar a concentração de glutathiona total e assim possibilitar a determinação da concentração

---

<sup>8</sup>  $10.000 \text{ g}$ , 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$

da GSSG a partir da diferença entre GSH e glutathiona total, foi realizado um teste prévio utilizando concentrações conhecidas de GSH e GSSG. Para isso, foram usadas três concentrações de GSH e GSSG (5, 10 e 20 mM). As amostras em cada uma das concentrações foram misturadas e divididas em dois grupos. O grupo A recebeu 26 µl de tampão Tris (0,4 M, pH 8,9) e o grupo B 26 µl de solução contendo 0,9 U.ml<sup>-1</sup> de glutathiona dissulfeto redutase e 1,8 mM de NADPH. Após 10 min de incubação à temperatura ambiente, 200 µl do conteúdo dos tubos foram colocados em microplacas de 96 poços. As absorbâncias foram medidas a 415 nm após decorridos 5 min da adição de 20 µl DTNB (2,5 mM de 5,5'- ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) em metanol 25%). A concentração de glutathiona dissulfeto foi calculada pela diferença entre a glutathiona total medida no grupo B e a GSH (medida no grupo A), sendo possível estabelecer a razão 2GSH/GSSG.

### 3.10 Carbonilação de proteínas (PCO)

Proteínas podem ser carboniladas durante processo de estresse oxidativo. A carbonilação consiste na modificação das cadeias laterais de aminoácidos com a formação de grupamentos do tipo aldeídos, cetonas, amidas, carboxilas e ésteres. Estes danos na estrutura protéica (especificamente a formação de grupamentos aldeídicos e cetônicos) foram avaliados de acordo com LEVINE *et al.* (1994) e QUINLAN e GUTTERIDGE (2000). As células cultivadas em placas de 24 poços foram lavadas com PBS e congeladas a -76°C. O lisado celular foi ressuscitado em 300 µl de PBS gelado, sendo transferido para um tubo de 1,5 ml e centrifugado (12.000 g, 20 min, 4 °C). Após isto, 200 µl do sobrenadante das amostras foram colocados em tubos, e um volume de 500 µl de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (10 mM DNPH em 2 M de HCl) ou de HCl (2 M, sem DNPH) foram adicionados aos tubos usados para a reação e para os respectivos brancos, sendo o conteúdo misturado em *vortex* por 5 min e mantidas a 30 °C por 1,5 h. As proteínas foram precipitadas pela adição de 1 ml de ácido tricloroacético a 28 % e centrifugadas a 9.000 g por 10 min. Os *pellets* de proteínas foram lavados três vezes pela suspensão em etanol/etil acetado (1:1), misturados em *vortex* e centrifugados novamente. As proteínas foram então solubilizadas em 6 M de cloreto de guanidina e centrifugadas em 9.000 g por 5 min para remover traços de material insolúvel. A presença de carbonilas foi

medida espectrofotometricamente a 360 nm e a concentração de carbonilas determinadas usando o coeficiente de absorção molar de  $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  para hidrazonas e normalizada pelo conteúdo total de proteínas, quantificadas em uma alíquota reservada da primeira centrifugação.

### 3.11 Peroxidação lipídica (LPO)

Danos aos lipídios com formação de hidroperóxidos lipídicos podem ser detectados pelo método FOX (*Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method*). Este método baseia-se na rápida oxidação do  $\text{Fe}^{+2}$  mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo  $\text{Fe}^{+3}$  - laranja de xilenol (fonte de absorção de luz) na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado (JIANG *et al.*, 1992).

Células cultivadas em placas de 24 poços foram lavadas com PBS e congeladas a  $-76^\circ \text{C}$ . As amostras foram descongeladas em gelo e em cada poço foram adicionados 250  $\mu\text{l}$  de PBS para ressuspensão do conteúdo, que foi removido para tubos de 1,5 ml, os quais foram centrifugados a 1000 g por 5 min a  $4^\circ\text{C}$ . Após a centrifugação, 200  $\mu\text{l}$  do sobrenadante (PBS para o branco) foi removido para novos tubos, nos quais foram adicionados 500  $\mu\text{l}$  de meio de reação [(laranja de xilenol a 100  $\mu\text{M}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 25 mM, BHT (hidroxitolueno butilado) a 4 mM,  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{NH}_4$  (sulfato ferroso amoniacal) a 250  $\mu\text{M}$  (acrescentados na sequência descrita em metanol PA)]. Após incubação durante 20 min, as amostras foram centrifugadas novamente a 10.000 g durante 5 min a  $4^\circ\text{C}$ . Em seguida, adicionou-se 250  $\mu\text{l}$  do sobrenadante a uma microplaca, procedendo-se a medida de absorbância a 570 nm.

### 3.12 Ensaio Cometa

Para o ensaio cometa foi utilizado o protocolo proposto por SINGH *et al.* (1988) com modificações. As células foram tripsinizadas (tripsina 0,05%, 2 mM de EDTA) em temperatura ambiente, lavadas com PBS, ressuspendidas em agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% e estendidas, com o emprego de lamínula, sobre lâminas de vidro cobertas previamente com agarose de ponto de fusão normal a 1,5%. Após a solidificação da agarose, as lamínulas foram cuidadosamente

removidas e as lâminas colocadas em solução de lise (NaCl a 220 mM, EDTA a 9 mM, Tris-base a 0,9 mM, Triton X-100 a 1%, DMSO a 10%, sarcosinato de sódio a 0,9%, pH 10) por 24 h a 4°C. Em seguida, as lâminas foram reservadas em tampão de eletroforese para permitir o desenrolamento do DNA por 25 min, período após o qual um campo elétrico de diferença de potencial de 25 V e intensidade de corrente de 300 mA foi aplicado durante 25 min. Ao término da eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com solução tampão e preservadas em etanol. Em seguida, o DNA corado com brometo de etídio. Em cada lâmina, 100 nucleóides foram visualmente classificados de acordo com o comprimento do rastro de migração sob microscópio de fluorescência e um escore para cada lâmina foi calculado através de uma média ponderada da classe do dano pela porcentagem de incidência do mesmo (Escore =  $\sum(\text{classe do dano} \times \% \text{ de incidência})$ ). Foram reconhecidas 4 classes de danos (classes 0, 1, 2 e 3) de acordo com o grau de fragmentação do DNA, o que é identificado como um deslocamento maior no gel da eletroforese.

### 3.13 Quantificação de proteínas totais

Com a finalidade de normalizar os dados obtidos nos diferentes ensaios bioquímicos, a quantificação de proteínas totais nas amostras foi necessária. Para a quantificação de proteínas utilizaram-se os sobrenadantes das amostras obtidos após centrifugação, cuja velocidade e tempo foram os mesmos empregados para cada ensaio específico. Como o metanol e o TCA em altas concentrações precipitam proteínas, para quantificação de proteínas nos ensaios de LPO e GSH foram reservadas alíquotas em separado.

Em uma microplaca, adicionaram-se 10  $\mu\text{l}$  do sobrenadante das amostras seguidos de 250  $\mu\text{l}$  do reativo de *Bradford* (*Coomassie brilliant blue* BG-250) e procedem-se as leituras de absorvância em 595 nm. Como branco utilizou-se PBS. A concentração de proteínas foi determinada a partir da comparação dos valores de absorvância com aqueles provenientes de curva-padrão de BSA (albumina de soro bovina) nas concentrações de 0, 125, 250, 500, 750 e 1000  $\mu\text{g}$  de BSA por mililitro de volume final de solução (BRADFORD, 1976). A curva-padrão incluía pelo menos quatro réplicas por concentração de BSA e esteve presente em todos os ensaios de quantificação de proteínas.

### 3.14 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com a finalidade de avaliar a morfologia e a disposição das células formando cordões depois de cultivadas por sete dias, as células foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura. Estas foram fixadas na própria placa de cultura com imersão em glutaraldeído a 3% durante 1 h e preservadas em etanol a 70% na geladeira. Em momento propício, o fundo das placas foi cuidadosamente cortado e as células aderidas sobre os pedaços de plástico foram desidratadas em série crescente de etanol (Merck) (50, 70, 80, 90, 100, 100%) por 5 min cada, saturadas de CO<sub>2</sub> líquido (ponto crítico) e metalizadas com ouro para observação sob o microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM – 6360 LV no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

### 3.15 Tratamento estatístico dos dados

Para cada biomarcador analisado, foram realizados três experimentos independentes; em cada experimento foi empregado um *pool* de células provenientes do fígado de 3 peixes. Uma série de 24 repetições por experimento foram utilizadas para os ensaios de viabilidade celular, atividades da MXR, GST e G6PDH, e determinação da concentração de ERONS, totalizando 72 repetições (24 repetições x 3 experimentos), enquanto que 6 repetições por experimento foram utilizadas para determinação da concentração das glutatiónas, peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e danos no DNA, totalizando 18 repetições. Para o ensaio cometa empregou-se o teste de Kruskal-Wallis, enquanto que para os demais ensaios foi utilizado a Análise de Variância de uma Via (*one-way ANOVA*) seguida, quando aplicável, do pós-teste de *Tukey-Kramer*.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Padronização da metodologia para o isolamento e cultivo primário de hepatócitos de *P. lineatus*

Para o estabelecimento da metodologia de dissociação de hepatócitos de *P. lineatus*, seis protocolos diferentes foram testados. A dissociação não enzimática com EDTA não foi satisfatória devido à lise da maioria das células durante o processo. O mesmo inconveniente aconteceu após o uso das enzimas tripsina e pancreatina. No entanto, as enzimas colagenase IV, colagenase IV associada com dispase, e somente dispase resultaram em bom rendimento e viabilidade celulares (Tabela 1). O protocolo utilizando colagenase IV apresentou uma viabilidade celular de 88% e rendimento de  $1,01 \times 10^7$  hepatócitos por grama de fígado, enquanto que as enzimas colagenase IV e dispase associadas resultaram em um aumento aproximado de três vezes na quantidade de hepatócitos obtidos por grama de fígado (Tabela 1). No entanto, o melhor resultado obtido foi utilizando apenas a enzima dispase com uma viabilidade de 97% (~ 7% maior que nos outros testes) e um total de  $6,36 \times 10^7$  hepatócitos por grama de fígado (~ 77% maior que a associação da colagenase IV com a dispase) ao final do processo (Tabela 1). Logo, a metodologia empregando dispase mostrou-se melhor e mais adequada para os ensaios de exposição às cianotoxinas pretendidos no presente estudo, e por isso este protocolo foi adotado para os testes subseqüentes de adesão e exposição.

**TABELA 1** – Valores médios de rendimento e viabilidade celulares para os procedimentos testados no isolamento de hepatócitos de *P. lineatus*.

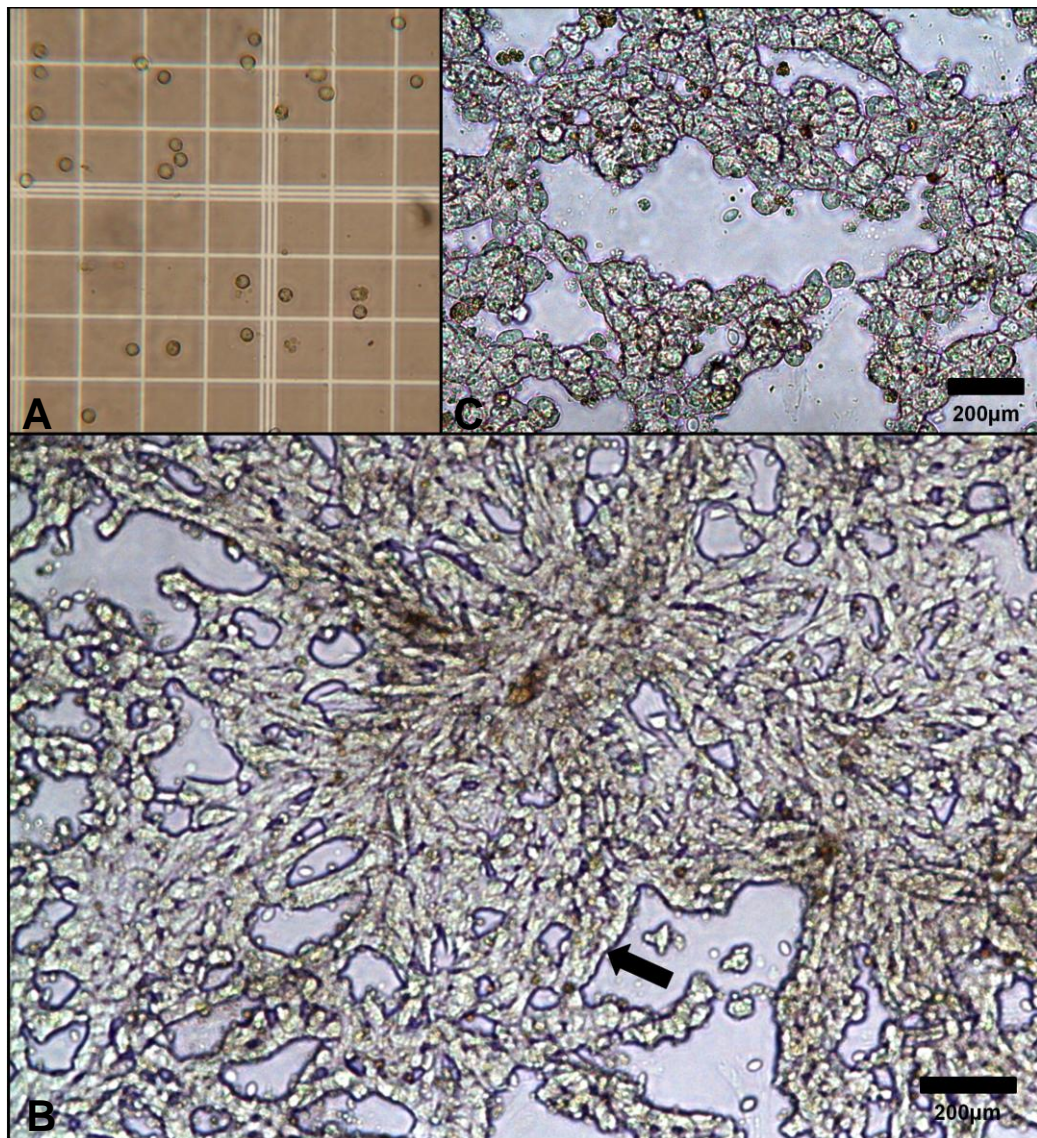
Procedimento	Células por grama de fígado	Viabilidade
EDTA	nd	nd
Tripsina	nd	nd
Pancreatina	nd	nd
Colagenase IV	$1,01 \times 10^7 \pm 0,3$	$88\% \pm 0,5\%$
Colagenase IV + Dispase	$3,58 \times 10^7 \pm 0,5$	$90\% \pm 2\%$
Dispase	$6,36 \times 10^7 \pm 0,6$	$97\% \pm 1\%$

Rendimento e viabilidade celular de hepatócitos de *P. lineatus*. Média  $\pm$  Desvio padrão.

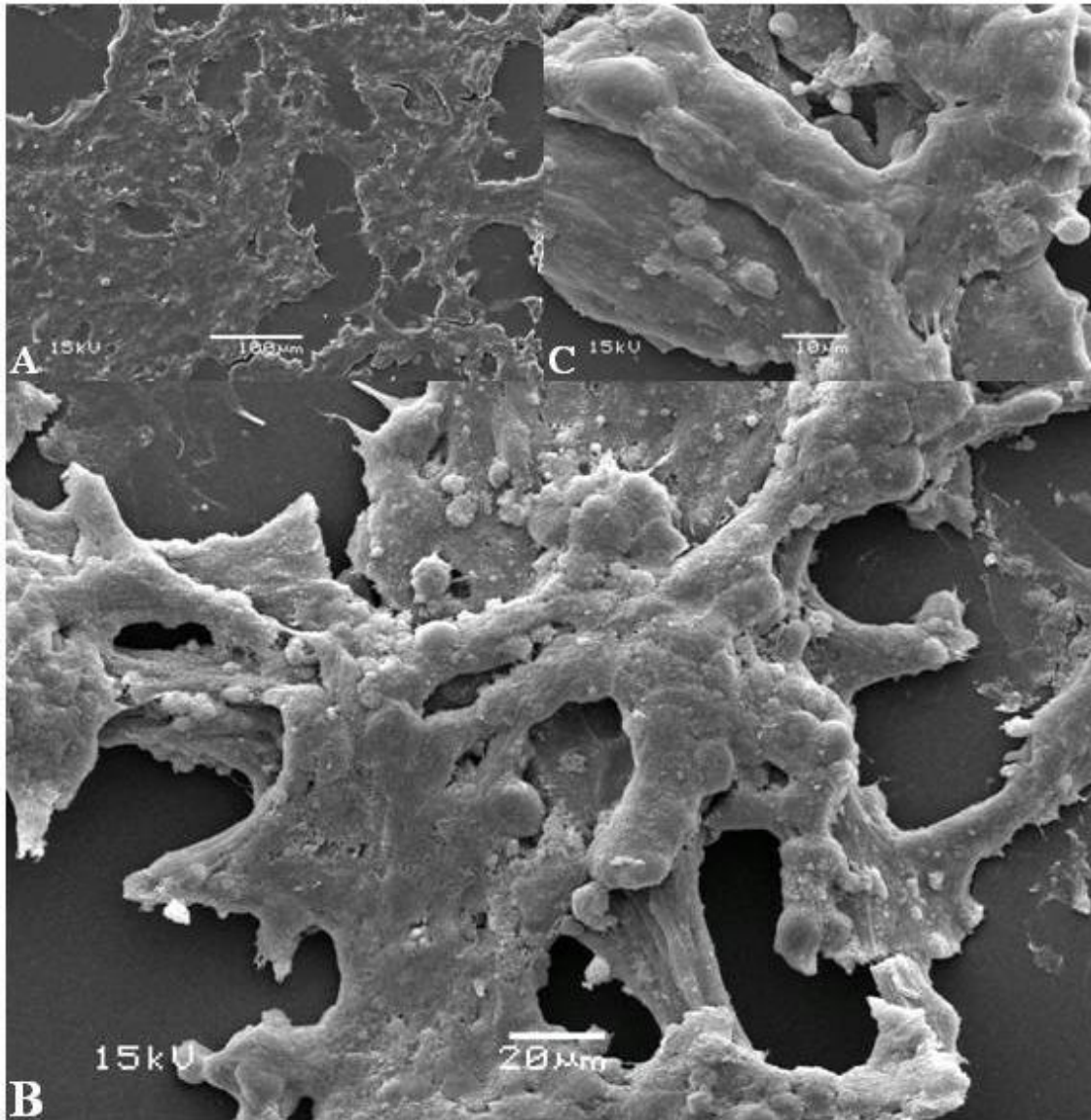
Nd – Não determinado devido à lise da maioria das células obtidas após a dissociação.



Os hepatócitos aderiram adequadamente em duas das três marcas de placas de cultura testadas, TTP<sup>®</sup> e Biofil<sup>®</sup>, sendo que a adesão na TTP<sup>®</sup> apresentou-se melhor do que na Biofil<sup>®</sup>. No entanto, não houve benefícios em se cobrir as placas de cultura com matrigel ou colágeno I, por não haver melhora evidente na adesão celular, conforme foi observado sob microscopia de contraste de fase. Além disso, independentemente das condições de adesão testadas, são necessários quatro dias para que haja recuperação do procedimento de isolamento e uma boa adesão das células, uma vez que grandes agrupamentos de hepatócitos formando cordões de células podem ser observados apenas após esse período (Figuras 3 e 4).



**FIGURA 3** - Hepatócitos de *P. lineatus* sob microscopia de contraste de fase. Células após a dissociação na câmara de Neubauer (**A**); após sete dias de cultura os hepatócitos apresentam grupamentos formando cordões de células (**B** - seta); detalhe dos cordões de hepatócitos (**C**).



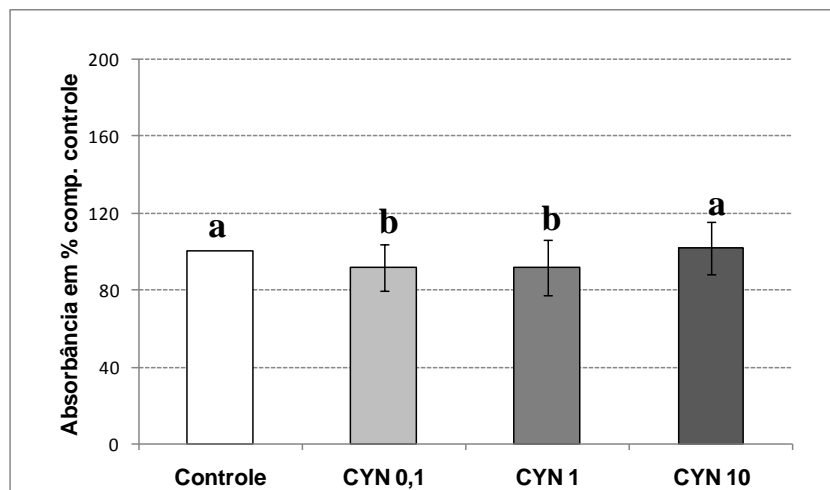
**FIGURA 4** - Hepatócitos de *P. lineatus* após sete dias de cultura sob microscopia eletrônica de varredura. Aspecto geral da cultura com hepatócitos organizados em cordões (A) formando agregados (B); (C) detalhe de um grupo de hepatócitos agregados.

## 4.2 Efeitos da cilindropermopsina

### 4.2.1 Viabilidade celular

A viabilidade celular dos hepatócitos de *P. lineatus* medida após exposição à cilindropermopsina sofreu redução significativa nas concentrações de 0,1 (8,2%) e 1,0  $\mu\text{g.l}^{-1}$  (8,0%), quando comparados com o controle, embora não tenha havido diferenças significativas entre os grupos controle e exposto a 10  $\mu\text{g.l}^{-1}$  (Figura 5).

**FIGURA 5** - Viabilidade celular em hepatócitos de *P. lineatus* expostos à cilindropermopsina

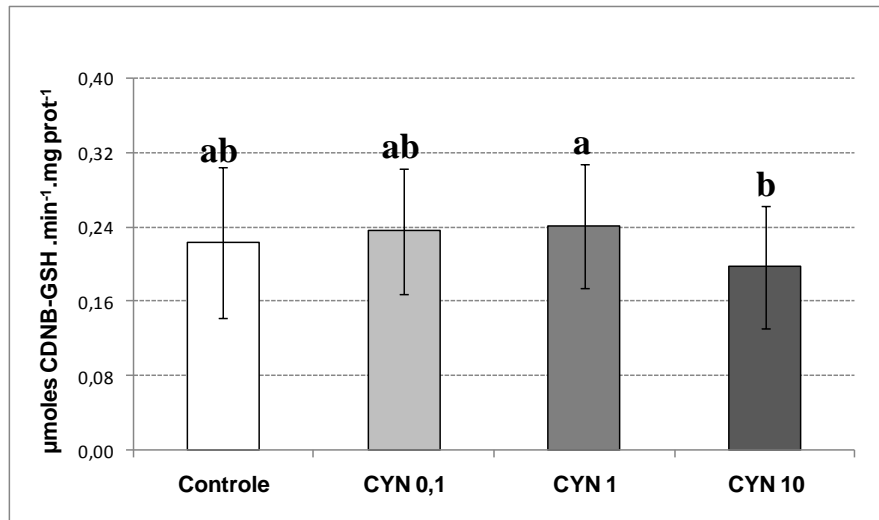


Viabilidade celular em porcentagem comparado com o controle. Média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes (a, b) indicam grupos estatisticamente distintos.  $p < 0,05$ .

### 4.2.2 Atividades da GST e G6PDH

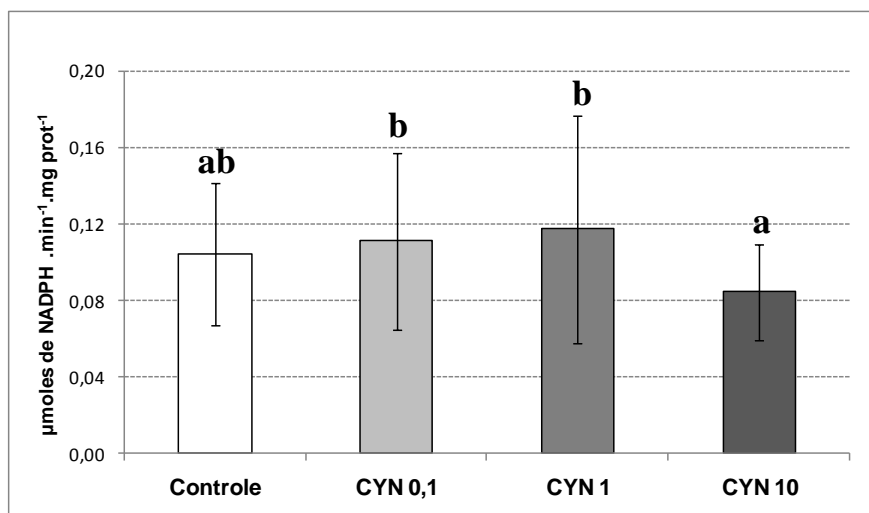
Quando comparado, o grupo controle e os expostos a cilindropermopsina apresentaram valores similares para as atividades da GST e da G6PDH. Por outro lado, atividade da GST sofreu redução (12%) no grupo exposto a 10  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de cilindropermopsina em comparação a concentração (1  $\mu\text{g.l}^{-1}$ ) da toxina, enquanto que uma redução significativa da atividade da G6PDH (19%) ocorreu no grupo exposto à maior concentração da toxina com relação às menores concentrações (Figuras 6 e 7).

**FIGURA 6** - Atividade específica das GST em hepatócitos de *P. lineatus* expostos à cilindropermopsina.



Atividade em micromoles do tioéter GSH-CDNB formado por minuto por miligrama de proteínas. Média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes (a, b) indicam grupos estatisticamente distintos.  $p < 0,05$ .

**FIGURA 7** - Atividade específica da G6PDH em hepatócitos de *P. lineatus* expostos à cilindropermopsina.



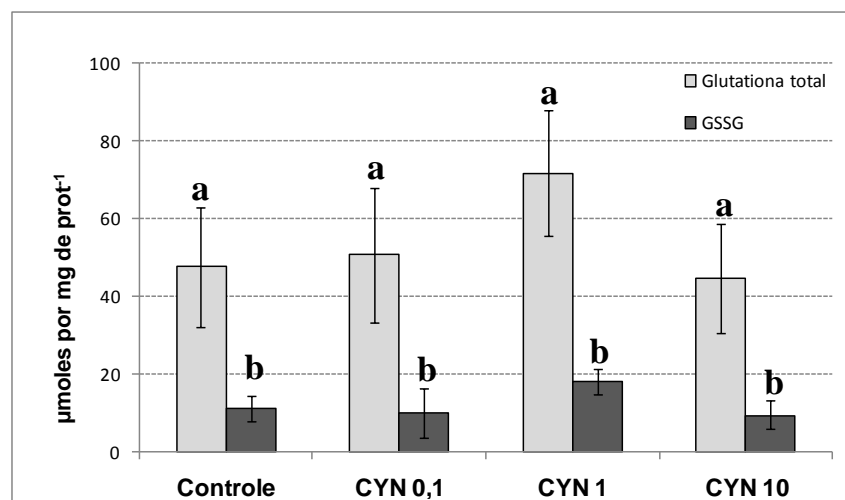
Atividade em micromoles de NADPH formado a partir da redução do NADP<sup>+</sup> por minuto por miligrama de proteínas totais. Média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes (a, b) indicam grupos estatisticamente distintos.  $p < 0,05$ .

#### 4.2.3 Glutaciona total reduzida

Não foram observadas alterações na concentração da glutaciona total e da glutaciona dissulfeto decorrentes da exposição à cilindropermopsina. A concentração média de glutaciona total e dissulfeto em hepatócitos cultivados de *P.*

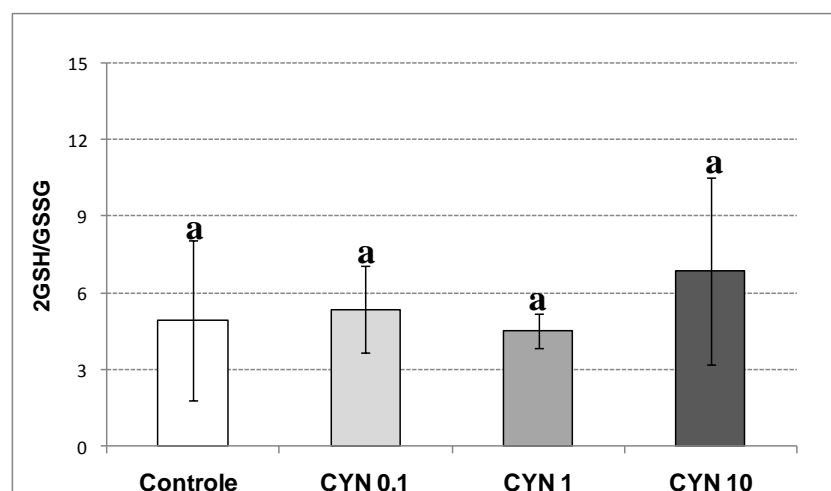
*lineatus* foi, respectivamente, de  $53,6 \pm 15,8$  e  $12,15 \pm 4,14$   $\mu\text{moles}$  de tióis não proteicos por mg de proteína (Figura 8). Como esperado por estes resultados, a razão entre a glutathiona reduzida e oxidada (2GSH/GSSG) também não sofreu alterações, mantendo-se em torno de  $5,4 \pm 2,3$   $\mu\text{moles}$  de tióis não proteicos por mg de proteína (Figura 9).

**FIGURA 8-** Concentração de glutathiona em hepatócitos de *P. lineatus* expostos à cilindrospormopsina.



Concentração em micromoles de glutathiona total / glutathiona dissulfeto (GSSG) por miligrama de proteína. Média  $\pm$  desvio padrão.  $p < 0,05$ .

**FIGURA 9 -** Razão de glutathiona (2GSH/GSSG) em hepatócitos de *P. lineatus* expostos à cilindrospormopsina.

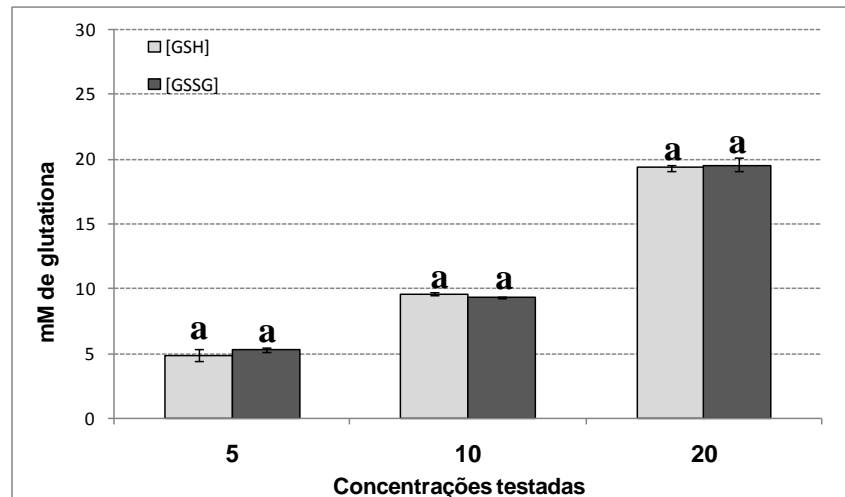


Razão entre glutathiona reduzida e dissulfeto. Média  $\pm$  desvio padrão.  $p < 0,05$ .

#### 4.2.3.1 Teste do método para a quantificação da glutatona total

A avaliação do teste da glutatona total mostrou-se positivo como pode ser observado na figura 10, que mostra que os valores obtidos são similares às concentrações de GSH e GSSG empregadas.

**FIGURA 10** – Concentração de GSH e GSSG quantificadas no método modificado

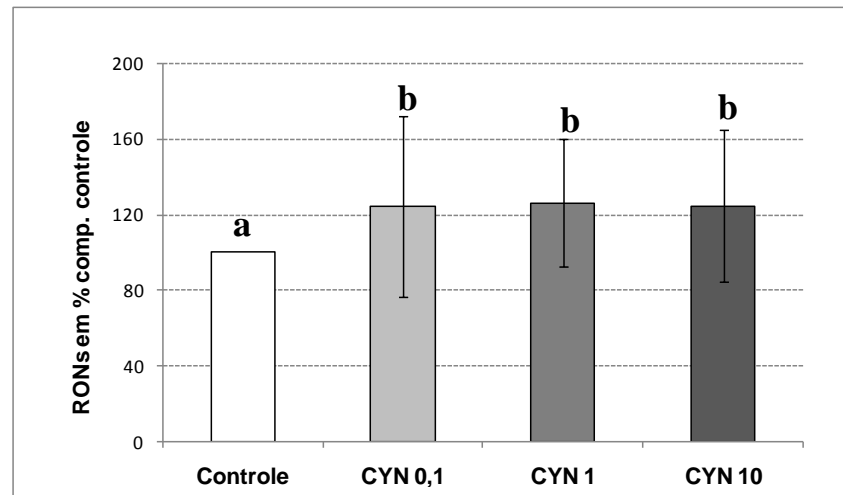


Concentração da glutatona oxidada (obtida a partir da diferença entre glutatona total e GSH) e da GSH. Média  $\pm$  desvio padrão.  $p < 0,05$ .

#### 4.2.4 Detecção das espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ERONS)

Os níveis de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio aumentaram em aproximadamente 25% em todos os grupos expostos à cilindrospermopsina quando comparados com o controle (Figura 11).

**FIGURA 11** – Níveis de espécies reativas em hepatócitos de *P. lineatus* expostos à cilindropermopsina.

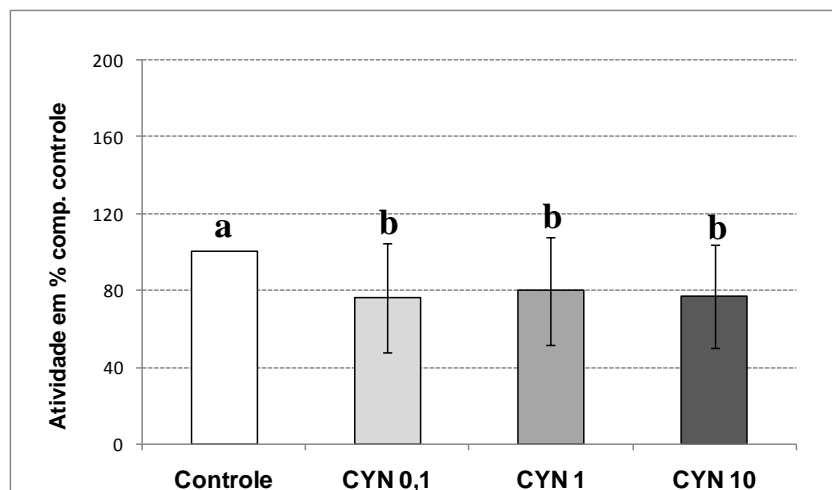


ERONs em porcentagem comparado com o controle. Média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes (a, b) indicam grupos estatisticamente distintos.  $p < 0,05$ .

#### 4.2.5 Atividade da MXR

Ao comparar o grupo controle com os grupos expostos à cilindropermopsina, observou-se que a atividade MXR diminuiu em 22% após a exposição (Figura 12).

**FIGURA 12** - Atividade da MXR em hepatócitos de *P. lineatus* expostos à cilindropermopsina.

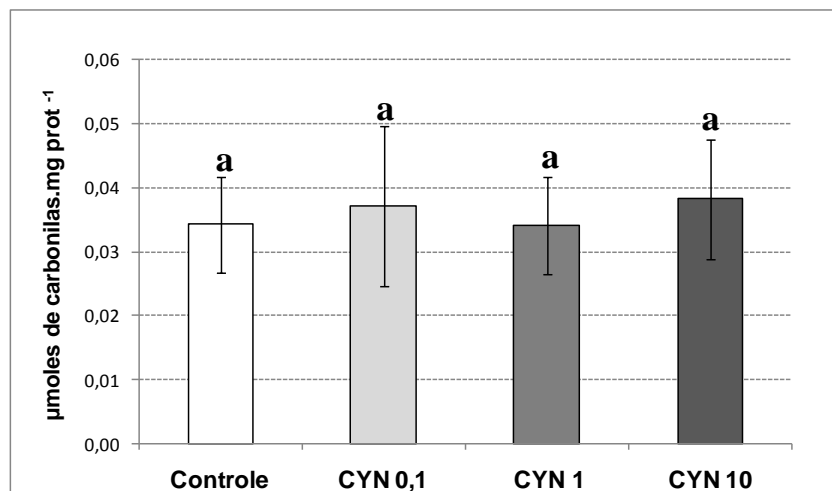


Atividade da MXR em porcentagem comparado com o controle. Média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes (a, b) indicam grupos estatisticamente distintos.  $p < 0,05$ .

#### 4.2.6 Carbonilação de proteínas, peroxidação de lipídeos e danos no DNA

Não foram observadas alterações do tipo carbonilação em proteínas dos hepatócitos decorrentes da exposição à cilindropermopsina. A concentração média de carbonilas em proteínas dos hepatócitos cultivados de *P. lineatus* foi de  $0,036 \pm 0,009$  micromoles de carbonilas por miligrama de proteínas (Figura 13).

**FIGURA 13** - Carbonilação de Proteínas medidas em hepatócitos de *P. lineatus* expostos à cilindropermopsina.



Concentração de proteínas carboniladas em micromoles de carbonilas por miligrama de proteínas. Média  $\pm$  desvio padrão.  $p < 0,05$ .

O mesmo ocorreu com a molécula de DNA, onde o grau de fragmentação determinado pelos escores através do teste cometa não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos. O valor médio foi de  $249,36 \pm 29,8$  (Tabela 2).

**Tabela 2** - Percentual de nucleóides com escores das classes de danos no DNA (0, 1, 2, 3 e 4) medidos em hepatócitos de *P. lineatus* expostos à cilindropermopsina.

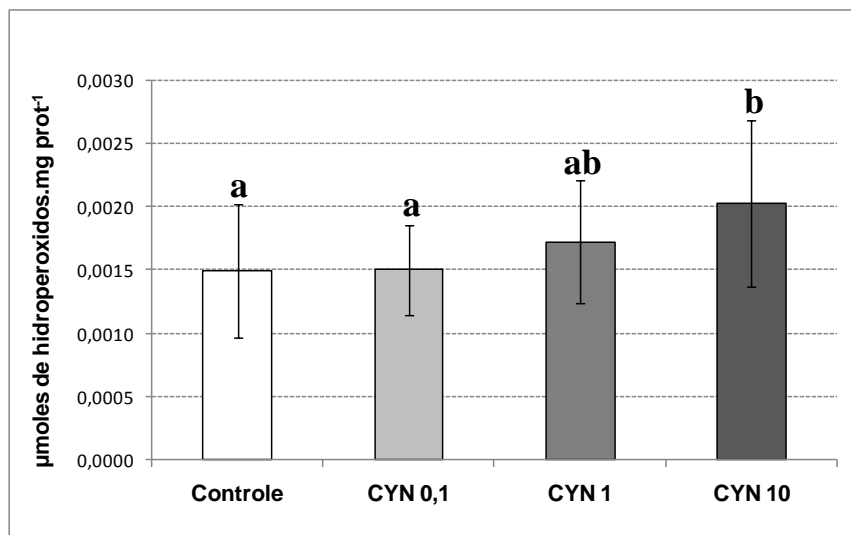
	0	1	2	3	4	Escores
<b>Controle</b>	3,5 $\pm$ 3,1	5,5 $\pm$ 2,9	27,6 $\pm$ 15,1	52,2 $\pm$ 11,8	11,1 $\pm$ 8,1	<b>261,9 <math>\pm</math> 23,5</b>
<b>CYN 0,1</b>	4,8 $\pm$ 5,2	7,2 $\pm$ 6,7	24,8 $\pm$ 8,8	52,2 $\pm$ 15,4	11,0 $\pm$ 5,5	<b>257,4 <math>\pm</math> 36,9</b>
<b>CYN 1,0</b>	8,7 $\pm$ 7,7	7,6 $\pm$ 5,0	38,8 $\pm$ 14,6	37,5 $\pm$ 12,6	7,4 $\pm$ 9,0	<b>227,1 <math>\pm</math> 38,2</b>
<b>CYN 10</b>	6,0 $\pm$ 3,3	7,0 $\pm$ 4,3	27,1 $\pm$ 6,5	50,2 $\pm$ 7,2	9,7 $\pm$ 5,3	<b>251,1 <math>\pm</math> 20,6</b>

Escores =  $\sum$  (classe de dano x porcentagem de incidência). Média  $\pm$  desvio-padrão.



Não houve diferença estatística na peroxidação lipídica entre o grupo controle e as duas menores concentrações de cilindropermopsina (0,1 e 1,0  $\mu\text{g.l}^{-1}$ ). No entanto, o grupo exposto à maior concentração (10  $\mu\text{g.l}^{-1}$ ) da toxina apresentou um aumento de 35% na concentração de hidroperóxidos quando comparado com o controle (Figura 14).

**FIGURA 14** - Peroxidação Lipídica medida em hepatócitos de *P. lineatus* expostos à cilindropermopsina.



Concentração em micromoles de hidroperóxidos por miligrama de proteínas. Média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes (a, b) indicam grupos estatisticamente distintos.  $p < 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Isolamento e cultura dos hepatócitos

No presente estudo, seis procedimentos de isolamento de células distintos foram testados, um empregando apenas quelante de metais divalentes e cinco utilizando diferentes tipos de proteases. Embora a técnica de perfusão em duas fases, que emprega um agente quelante de  $\text{Ca}^{+2}$  como o EDTA junto com a enzima colagenase, seja o método mais utilizado atualmente para obter alto rendimento de células viáveis do fígado para mamíferos e peixes (NAIK *et al.*, 2007; YANHONG *et al.* 2008), a melhor enzima para o isolamento dos hepatócitos de *P. lineatus* foi a dispase na concentração de  $1 \text{ U.ml}^{-1}$ . O método não enzimático e as demais enzimas testadas, embora tenham demonstrado sucesso na dissociação de hepatócitos de outras espécies de peixes durante o estabelecimento de cultura primária (WAARDE *et al.*, 1981; SEDDON e PROSSER, 1999; FILIPAK NETO *et al.*, 2006; YUE *et al.*, 2006; NAIK *et al.*, 2007), não foram tão eficientes quanto a dispase. Particularmente, os protocolos de dissociação não enzimática, com o uso da pancreatina ou da tripsina resultaram no rompimento da grande maioria das células, mesmo após um tempo de incubação inferior ao da dispase, comprovando a forte coesão existente entre as células do fígado de *P. lineatus* e a maior sensibilidade nesta espécie à ação destas enzimas. De fato, o uso de enzimas no processo de dissociação de tecidos deve levar em consideração o tempo e a concentração empregada para não afetar a integridade dos hepatócitos, diminuindo a eficiência do processo (SEDDON e PROSSER, 1999; YANHONG *et al.*, 2008), e neste sentido a dispase apresenta baixa agressividade mesmo após incubação durante 3 h, como verificado pela viabilidade celular.

Em termos de rendimento celular, os valores obtidos para *P. lineatus* foram menores do que o relatado para outra espécie de teleósteo brasileiro, *H. malabaricus*, em protocolos desenvolvidos no Laboratório de Toxicologia Celular-UFPR, onde obteve-se  $9,4 \times 10^{-7}$  hepatócitos por grama de fígado (FILIPAK NETO *et al.*, 2006). No entanto, o método pode ser considerado eficiente para a realização dos ensaios toxicológicos pretendidos, uma vez que esta espécie representa um nível trófico diferente das anteriores. A literatura relata que a espécie doadora de

células tem papel fundamental no sucesso das culturas, seja pelas diferenças interespecíficas com relação ao grau de adesão célula-célula e célula-matriz, ou pela sua fisiologia, peso, sexo e idade do peixe doador, assim como o estado nutricional (MOMMSEN *et al.*, 1994; SEGNER, 1998), o que poderia explicar as diferenças observadas em termos de rendimento de hepatócitos entre as espécies.

Os hepatócitos de *P. lineatus* reorganizaram-se eficientemente em culturas com densidades de  $4 \times 10^5$  células.cm<sup>-2</sup> na superfície da placa ( $1,0 \times 10^6$  células.ml<sup>-1</sup> de meio de cultura), ocupando quase que todo o espaço disponível na superfície das placas de cultura. Esta alta densidade celular, apesar de ser um pouco menor do que a usada em outros peixes teleósteos brasileiros (FILIPAK NETO *et al.*, 2006; BUSSOLARO, *et al.*, 2010) é suficiente e necessária à manutenção da viabilidade celular por pelo menos sete dias, de modo que hepatócitos semeados em baixa densidade desaderem após poucos dias e entram em processo de morte celular. Embora a densidade celular possa afetar a manutenção da funcionalidade e a proliferação de hepatócitos, com um estímulo proliferativo e perda mais rápida de funções específicas em hepatócitos cultivados em densidades mais baixas (NAKAMURA *et al.*, 1983; HAYASHI e OOSHIRO, 1986), não é comum o relato de proliferação celular em culturas primárias com hepatócitos de peixe.

O pré-tratamento das placas de cultura com matrigel ou colágeno I desnaturado não melhorou significativamente a adesão de hepatócitos de *P. lineatus* nas placas de cultura analisadas, conforme observado em microscopia de contraste de fase. No entanto, nas duas situações os hepatócitos conservaram seu formato globular e os contatos intercelulares foram recriados, de modo similar ao observado para *H. malabaricus* e *H. commersoni* (FILIPAK NETO *et al.*, 2006; BUSSOLARO, *et al.*, 2010), o que é necessário para a sobrevivência dos hepatócitos *in vitro*.

Mesmo nas condições padronizadas, os hepatócitos de *P. lineatus* requereram em média quatro dias para aderir à superfície das placas de cultura e se recuperarem do processo de isolamento, reagregando-se e restabelecendo as interações celulares. Em média, um dia a mais do que o necessário para as espécies brasileiras de peixes já padronizadas (FILIPAK NETO *et al.*, 2006; BUSSOLARO, *et al.*, 2010), e isso deve-se, provavelmente, a diferenças interespecíficas e ao tipo de procedimento utilizado na dissociação dos hepatócitos. Após o período de adesão, boa parte das células não aderidas ou mortas e restos celulares podem ser removidos através de lavagem das células com PBS ou meio

de cultura, o que permite a utilização de células funcionais para os ensaios desejados. Além disso, a reorganização celular e a presença de poucos restos celulares observados entre os cordões de hepatócitos são fortes evidências de que as células encontram-se sob condições adequadas de cultura (SEGNER 1998; FILIPAK NETO *et al.*, 2006; NAIK *et al.*, 2007).

A padronização da cultura de hepatócitos de *P. lineatus* é importante, uma vez que *P. lineatus*, *H. malabaricus* e *H. commersoni*, são espécies brasileiras que pertencem a níveis tróficos diferentes e habitam diferentes extratos, estando, portanto, submetidas a diferentes graus e formas de exposição a poluentes em ambientes aquáticos com características físico-químicas e biológicas particulares. Logo, a diversidade de modelos disponíveis permite uma melhor compreensão de diversos aspectos da toxicologia. Além disso, espera-se que estas abordagens *in vitro* possibilitem no futuro diagnosticar ambientes impactados, sendo que a qualidade deste diagnóstico dependerá da escolha dos melhores modelos *in vitro* e das devidas validações.

## 5.2 Efeitos da cilindropermopsina

Embora o limite aceitável de cilindropermopsina em água potável estabelecido pelo Ministério da Saúde em 2004 seja de  $15 \mu\text{g.l}^{-1}$  (Brasil, 2005), alguns pesquisadores como FALCONER e HUMPAGE (2005 e 2006) relatam que ainda não há dados suficientes para se definir um limite máximo admissível para a cilindropermopsina em água destinada ao consumo humano. Segundo estes, com base nos dados provenientes da exposição oral subcrônica em camundongos, o valor não deveria passar de  $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ , valor que já vem sendo adotado como máximo aceitável por outros países, como a Austrália. O alto potencial citotóxico pode ser a razão para a alteração do limite atual, mas poucos estudos têm investigado os efeitos da cilindropermopsina sobre vertebrados aquáticos, como os peixes. Mais especificamente, poucos estudos têm focado nos efeitos desta toxina em um tecido-alvo conhecido como o fígado ou em células-alvo como os hepatócitos. Logo, o modelo de cultura primária de hepatócitos de *P. lineatus* padronizado no presente estudo foi utilizado para investigar os efeitos das concentrações de 0,1; 1 e  $10 \mu\text{g.l}^{-1}$  de cilindropermopsina purificada baseadas nos dados supramencionados.

Após exposição por 72 h, a atividade reduzida da MXR encontrada neste trabalho mostrou que o mecanismo biológico natural de defesa de “primeira linha” presente nas células, responsável pela efluxo de xenobióticos, toxinas, drogas e metabólitos endobioticos (KURELEC, 1992) foi afetado. Embora as células normalmente respondam às muitas formas de estresse químico pelo aumento da atividade da MXR, a fim de facilitar o efluxo de substâncias tóxicas (GOTTESMAN e PASTAN, 1993), como quando expostas a alguns tipos de pesticidas (*Arochlor*, DDT e PCBs), ou metais pesados (chumbo, arsênio e cádmio) (CHIN *et al.*, 1990; CORNWALL, *et al.*, 1995; PESSATTI, *et al.*, 2002; ), a redução da atividade observada, similar ao encontrado em células expostas a óleo diesel (SMITAL e KURELEC, 1998), pode provocar acúmulo de cianotoxinas, já que algumas destas tem a capacidade de serem transportadas pelo mecanismo da MXR (CONTARDO-JARA *et al.*, 2008), logo a cilindrospermopsina, poderia também estar sendo acumulada no interior dos hepatócitos, além de outras substâncias endobióticas e xenobióticas e, conseqüentemente, sensibilizando as células a outros estressores químicos, alterando a homeostase celular. Sendo assim, os hepatócitos de *P. lineatus* expostos à cilindrospermopsina apresentaram uma sensibilidade significativa e podem sucumbir mais rapidamente a uma eventual exposição à xenobióticos ou a outros metabólitos que são substratos para os transportadores da superfamília ABC, que funcionam no mecanismo MXR. Esse mecanismo é considerado como uma fase III da “biotransformação” de drogas e xenobióticos (BARD, 2000), atuando no transporte (expulsão) de metabólitos e xenobióticos. Em altas concentrações, alguns xenobióticos acumulam-se e são metabolizados por uma ou mais isoformas do P450. Estes metabólitos hidroxilados podem ser removidos por transportadores como a Pgp, ou podem ainda serem modificados pela conjugação da glutathione (GSH) ou outras moléculas endobióticas como ácido glucurônico, sulfato etc, sendo o conjugado expulso da célula pela MRP. A expulsão do xenobiótico pode ser também de forma direta, sem a necessidade de passar pelas enzimas do citocromo P450. (BARD, 2000; VAN DER OOST *et al.*, 2003) Ou seja, o fígado claramente depende deste sistema de efluxo de xenobióticos e a sensibilização destas células aumenta a possibilidade de ocorrência de insuficiência hepática.

O efeito de inibidores deste mecanismo presentes na água de ambientes naturais já foi relatado (SMITAL *et al.*, 2000), demonstrando haver uma relação entre

o grau de poluição e a atividade de transporte do mecanismo MXR. O mecanismo de defesa é induzível, aumentando sua atividade em águas poluídas; contudo, é frágil, pois seu efeito protetor é anulado na presença de determinados xenobióticos ou quimiossensibilizadores<sup>9</sup>. Assim, um determinado composto, tido até então como não tóxico, que seja um bom substrato ou inibidor da Pgp, pode também sensibilizar a célula a compostos já presentes em um ecossistema poluído e, conseqüentemente, aumentar os efeitos tóxicos destes xenobióticos (MÜLLER et al, 1998).

Reconhecer que a presença de um xenobiótico, que seja um bom substrato para a Pgp, pode inibir ou bloquear o efluxo de outro(s) xenobiótico(s), pode facilitar o entendimento e interpretação dos dados de bioacumulação, biodisponibilidade, metabolismo, toxicidade, relação dose-efeito e outros parâmetros relacionados. O efeito da adição de um composto, que seja bom substrato para Pgp, a um ecossistema já poluído pode causar efeitos tóxicos em várias espécies. Tais efeitos poderiam ser inesperados e inexplicáveis pelos níveis de substâncias tóxicas estarem abaixo dos limites estabelecidos. Além disso, o bloqueio da função fisiológica da Pgp de extrusão de substâncias tóxicas, por quimiossensibilizadores, poderia causar uma auto-intoxicação de um organismo com seus próprios metabólitos endógenos (KURELEC, 1997). Sendo assim, fica claro que a utilização do sistema MXR como biomarcador em hepatócitos cultivados representa uma ferramenta importante na investigação de efeitos de misturas complexas, devido ao seu papel fundamental para o funcionamento celular. Esse biomarcador pode contribuir substancialmente para a avaliação dos efeitos de misturas complexas presentes no ambiente natural, visto que este mecanismo está envolvido com a resistência celular e toxicidade dos mais diversos xenobióticos, e é um biomarcador cuja análise é prática e rápida.

A alteração do ambiente redox celular é um importante mecanismo envolvido na disfunção celular e tecidual induzida por diferentes compostos, e o aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ERONs) observado poderia ser consequência direta da ação intracelular da cilindrospermopsina, ou

---

<sup>9</sup> Substâncias não tóxicas, capazes de bloquear o bombeamento dependente de energia pela Pgp e, desse modo, sensibilizar a célula a diferentes xenobióticos e aos próprios metabólitos endógenos (KURELEC, 1997).

indireta da redução da atividade da MXR, como o acúmulo de substâncias endobióticas que necessitam deste sistema para serem efluxadas.

As ERONs desempenham papel fisiológico fundamental em processos de sinalização celular (PALMER et al., 1987; SUNDARESAN et al., 1995; ZEGURA et al., 2004), bem como deletérios à estrutura e funcionamento celulares, particularmente por estarem intimamente envolvidos com dano às biomoléculas como os lipídeos, proteínas e o próprio DNA. Isto poderia explicar o porquê do aumento da peroxidação lipídica nos hepatócitos expostos à maior concentração de cilindrospermopsina, mesmo não sendo suficiente para resultar na morte das células. Os hidroperóxidos lipídicos formados podem interagir com outros ácidos graxos, principalmente os poliinsaturados, gerando uma cadeia autocatalítica de peroxidação lipídica, a qual pode levar à modificação estrutural das construções complexas de lipídeos e proteínas como as membranas biológicas (ABUJA e ALBERTINI, 2001; KÜHN e BORCHERT, 2002; PRIETO et al., 2007). Como a integridade física dessas membranas são pré-requisito indispensável à regulação de muitos processos celulares, a alteração de importantes parâmetros celulares como a fluidez, a permeabilidade, o transporte e o potencial elétrico, devido à peroxidação lipídica, trazem consequências sérias às células. Consequentemente, os hepatócitos expostos à cilindrospermopsina devem estar suportando uma peroxidação lipídica leve como comprovado pela manutenção da viabilidade celular semelhante ao controle, provavelmente devido à ativação de mecanismos de defesa de neutralização destes distúrbios. Além disso, embora a atividade da glutathione S-transferase (enzima responsável pela degradação de hidroperóxidos lipídicos) e da glicose 6-fosfato desidrogenase terem diminuído nos hepatócitos expostos à concentração de  $10 \mu\text{g.l}^{-1}$  de cilindrospermopsina, comparativamente às menores concentrações, as reduções não foram diferentes do grupo controle, nem suficientes para prejudicar a sobrevivência das células.

Além dos lipídeos, as proteínas e o DNA são importantes alvos de estressores químicos que podem agir através de alterações no equilíbrio redox celular. A carbonilação protéica e fragmentação do DNA são lesões comuns em decorrência da exposição a certas classes de poluentes, podendo interferir significativamente no funcionamento celular.

Sabe-se que as ERONs geradas durante o metabolismo oxidativo reagem com vários aminoácidos (ÇAKATAY et al., 2001), o que favorece o aparecimento de

enzimas modificadas ou menos ativas e, em alguns casos, proteínas desnaturadas ou não funcionais (BUTTERFIELD et al., 1998). As ERONs podem afetar diretamente a conformação e/ou a atividade de moléculas contendo grupamentos SH (sulfidril) por oxidação da porção tiol (NORDBERG e ARNÉR, 2001). A modificação oxidativa de proteínas pode afetar uma grande variedade de funções celulares e contribuir para a ocorrência de danos secundários a outras biomoléculas, como ao DNA pela inativação e/ou redução da funcionalidade de enzimas de reparo do DNA e/ou perda da fidelidade das DNA polimerases na replicação (EVANS et al., 1999). Enzimas de reparo do DNA como a endonuclease III (FU et al., 1992) e a poli ADP-ribose polimerase I (HUGHES, 2002) possuem grupamentos sulfidril cruciais, que, caso afetados, poderiam reduzir o reconhecimento do dano ao DNA e, conseqüentemente, impossibilitar seu reparo. Entretanto, a exposição à cilindrospermopsina não alterou a integridade das proteínas e do DNA nos hepatócitos de *P. lineatus*, o que poderia ser explicado por duas hipóteses. 1) Ou os mecanismos de toxicidade da cilindrospermopsina, nesta espécie e nas condições e concentrações testadas, não envolvem a carbonilação de proteínas e quebras do DNA; ou, 2) o nível de efluxo de cilindrospermopsina ou de possíveis metabólitos tóxicos não foi suficientemente prejudicado pela diminuição da atividade da MXR de modo a provocar o acúmulo de toxinas em níveis suficientes para causar danos celulares através das alterações no equilíbrio óxido-redutor. Por outro lado a localização mais interna nas células (no caso do DNA e da maioria das proteínas em termos quantitativos), as diferenças quanto à sensibilidade destas macromoléculas ao estresse químico pode compor parte da explicação dos dados de peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e quebras do DNA, com diferentes níveis de potenciais danos.

De fato, os lipídeos na membrana plasmática estão em contato direto com a cilindrospermopsina presente no meio de cultura e o intenso fluxo de membranas existente nas células eucariotas poderia deslocar lipídeos peroxidados para as membranas internas e estes iniciarem ou propagarem o processo de peroxidação, independentemente do acúmulo intracelular. Já o DNA nuclear está menos exposto no interior do núcleo ao efeito direto da toxina além de contar com um sistema de reparo extremamente eficiente. Além disso, o tipo celular e as diferenças interespecíficas de toxicidade da cilindrospermopsina podem ocorrer, uma vez que a exposição de células de mamíferos na mesma concentração ( $10 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) de



cilindrospermopsina conduziram a danos no DNA dependente da concentração (HUMPAGE *et al.*, 2000; LANKOFF, *et al.*, 2007).

Ausências de danos no DNA e nas proteínas são corroboradas pelas concentrações inalteradas de GSH e da razão 2GSH/GSSG. Estes dados permitem sugerir que não houve comprometimento da síntese e ciclagem desse importante antioxidante não enzimático e cofator para enzimas glutatona-dependentes. A GSH está diretamente envolvida com a destoxificação de muitos xenobióticos, de produtos de peroxidação lipídica, manutenção dos grupos sulfidril/tiol (SH) de proteínas e de diversos compostos em suas formas reduzidas, assim como a redução de ribonucleotídeos aos desoxirribonucleotídeos (VAN BLADEREN, 2000; ARTEEL e SIES, 2001). Logo, a síntese e reparo do DNA e a correta conformação de proteínas recém-sintetizadas incluem-se também nos papéis diretos ou indiretos da glutatona nas células.

No ambiente redox intracelular, a manutenção apropriada da relação entre glutatona reduzida e dissulfeto (2GSH/GSSG) é mantida na ordem de 100/1 ou superior (SCHAFER e BUETTNER, 2001; FILOMENI *et al.*, 2002). Para manter esse balanço, a GSSG é reduzida a GSH pela enzima glutatona redutase (GR) ao custo de NADPH, que pode ser regenerado, entre outras vias, pela G6PDH (KLETZIEN *et al.*, 1994; SCHAFER e BUETTNER, 2001). Então, para que a GSH mantenha-se em concentrações apropriadas é imprescindível o funcionamento orquestrado entre enzimas supridoras de NADPH (como a G6PDH) e a GR (PASTORE *et al.*, 2003). Quando isso não acontece, estudos mostram que os valores da razão 2GSH/GSSG podem ficar abaixo do normal (PASTORE *et al.*, 2003; DALLE-DONNE *et al.*, 2006), e conseqüentemente sensibilizar as células. Logo, a utilização da razão 2GSH/GSSG como biomarcador é importante, e apesar do método utilizado não ser totalmente específico para a determinação de GSH, visto que outros grupos tióis não protéicos são quantificados conjuntamente, a GSH representa a maior parte destes grupamentos tióis.

Por outro lado, apesar da cilindrospermopsina diminuir as concentrações de GSH em hepatócitos de ratos (RUNNEGAR *et al.*, 1995), a maioria dos estudos sobre o assunto indicam que o comprometimento da homeostase de GSH não é o principal mecanismo tóxico da cilindrospermopsina (NORRIS *et al.*, 2002), o que foi corroborado em hepatócitos de *P. lineatus*.

Finalmente, embora a cilindrospermopsina não tenha apresentado resultados expressivos em alguns dos biomarcadores indicando maiores distúrbios celulares no presente estudo, um aumento nos níveis de ERONs e a diminuição da atividade da MXR representam riscos importantes à homeostase celular. Tais riscos são comprovados quando é observada uma diminuição da viabilidade celular nos hepatócitos expostos às concentrações mais baixas da cianotoxina. Na maior concentração, a cilindrospermopsina pode ter levado a uma ativação de mecanismos de defesa, o que resultou na manutenção da viabilidade celular. Estas respostas podem estar associadas ao fenômeno de “*Hormesis*”, a qual segundo NASCARELLA e CALABRESE, (2009), pode ser definida, como uma relação dose-resposta, caracterizada por uma estimulação em baixas doses, e uma inibição em doses elevadas, resultando na formação de curvas dose-resposta em forma de U, ou U-invertido, ou seja, em determinadas situações um indivíduo exposto a baixas concentrações de toxinas, poluentes ou outros fatores estressantes, podem apresentar um efeito oposto ao encontrado em concentrações mais elevadas destes mesmos xenobióticos. Segundo BOELSTERLI (2007), isto se deve a um conjunto de fatores e mecanismos celulares que são desencadeados a partir de determinadas concentrações do agente químico ou tempos de exposição, levando a estas curvas de concentração-resposta ou tempo-resposta atípicas. Outro aspecto é que talvez haja a ocorrência de resultados diferentes caso as células sejam expostas a extratos de cilindrospermopsina não purificados, como já observado para hepatócitos de *H. malabaricus* (SILVA *et al.*, 2010), ou caso haja coexposição das células à toxina e outros xenobióticos, configurando uma situação mais realística. Sendo assim, este efeito observado sobre o sistema MXR pode ter consequências muito mais desastrosas para os hepatócitos. Isto configura, no entanto um próximo passo a ser investigado futuramente.

## 6. CONCLUSÕES

1. Os hepatócitos de *P. lineatus* foram dissociados eficientemente com o uso da enzima dispase, e cultivados durante um período de tempo suficiente para o emprego destas células como modelos *in vitro* nos estudos de exposição a xenobióticos;
2. Para os desenhos experimentais deve ser considerado o mínimo de quatro dias para que ocorram a recuperação e adesão celular;
3. A exposição dos hepatócitos de *P. lineatus* à cilindropermopsina purificada levou a diminuição da atividade MXR, levando a uma sensibilização das células expostas às concentrações testadas neste trabalho;
4. O aumento da concentração de ERONs e a redução da viabilidade celular demonstram o potencial deletério desta cianotoxina à homeostase celular;
5. O mecanismo tóxico da cilindropermopsina não envolveu alterações das concentrações de glutathione, das atividades da GST e G6PDH, fragmentação do DNA ou carbonilação de proteínas nos hepatócitos de *P. lineatus*, considerando o desenho experimental adotado;
6. O fato da viabilidade celular não ser significativamente diminuída na maior concentração de cilindropermopsina possivelmente deve-se a outros mecanismos de resposta celular não considerados neste trabalho ou ao fenômeno de “*hormesis*”, também não comprovado;
7. A padronização do uso dos hepatócitos de *P. lineatus* em testes de toxicidade *in vitro*, juntamente com os métodos já desenvolvidos para *Hoplias malabaricus* e *Hipostomus commersoni*, potencializa os estudos de avaliação de efeitos de xenobióticos em espécies de peixes nativos do Brasil.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUJA, P.M.; ALBERTINI, R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. **Clin. Chim. Acta**, v.306, p.1-17, 2001.

ARMSTRONG, R.N. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. **Chem. Res. Toxicol.**, v.10, p.2–18, 1997.

ARTEEL, G.E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v.10, p.153-158, 2001.

BAIN, P.; SHAW, G.; PATEL, B. Induction of p53-regulated gene expression in human cell lines exposed to the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. **J. Toxicol. Environ. Health.**, v.70, p.1687-1693, 2007.

BAKSI, S.M.; FRAZIER, J.M. Isolated fish hepatocytes - model systems for toxicology research: review. **Aquat. Toxicol.**, v.16, p.229-256, 1990.

BARD, S. M. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms **Aquatic. Toxicol.**, v. 48, p. 357-389, 2000.

BENOV, L.; SZTEINBERG, L.; FRIDOVICH, I. Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. **Free Radic. Biol. Med.**, v.25, p.826-831, 1998.

BERNARD, C.; HARVEY, M.; BRIAND, J.F.; BIRE, R.; KRYS, S.; FONTAINE, J.J. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. **Environ. Toxicol.**, v.18, p.176–186, 2003.

BERRY, J. P.; LIND, O. First evidence of “paralytic shellfish toxins” and cylindrospermopsin in a Mexican freshwater system, Lago Catemaco, and apparent bioaccumulation of the toxins in “tegegolo” snails (*Pomacea patula catemacensis*). **Toxicon**, v.55, p. 930 – 938, 2010.

BOELSTERLI, A. **Mechanistic toxicology**: the molecular basis of how chemicals disrupt biological targets. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**, v.72, p. 248-254, 1976.

BRASIL, 2000. Ministério da Saúde. **Portaria n. 1469 de 29 de dezembro de 2000**, 1. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2000.

BRASIL, 2005. Ministério da Saúde. **Portaria n. 518 de 25 de Março de 2004**, 1. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005.

BRAUNBECK, D. E.; HINTON, D.E.; STREIT, B. **Fish Ecotoxicol.**, Nat. Birkhäuser Base: Berlin. p.61-140, 1998.

BUCHELI, T.D.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.**, v.25, p.201-268, 1995.

BUSSOLARO, D.; FILIPAK NETO, F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Responses of hepatocytes to DDT and methyl mercury exposure. **Toxicol. In Vitro**, v.24, p.1491-1497, 2010.

BUTTERFIELD, D.A.; KOPPAL, T.; HOWARD, B.; SUBRAMANIAM, R.; HALL, N.; HENSLEY, K.; YATIN, S.; ALLEN, K.; AKSENOV, M.; AKSENOV, A.; CAI, J.; JONES, D.P. Superoxide in apoptosis: mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. **J. Biol. Chem.**, v.273, p.11401-11404, 1998.

ÇAKATAY, U.; TELCI, A.; KAYALI, R.; TEKELI, F.; AKÇAY, T.; SIVAS, A. Relation of oxidative protein damage and nitrotyrosine levels in the aging rat brain. **Exp. Gerontol.**, v.36, p.221-229, 2001.

CARMICHAEL, W. W.; AZEVEDO, S. M. F. O., AN, J. S.; MOLICA, R. J. R.; JOCHIMSEN, E. M.; LAU, S.; RINEHARDT, K. L.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human Fatalities from Cyanobacteria: Chemical and Biological Evidence for Cyanotoxins. **Environ. Health Perspect.**, v.109, p.663-668, 2001.

CHIN, K. V.; TANAKA, S.; DARLINGTON, G.; PASTAN, I.; GOTTESMAN, M. M. Heat-shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (mdr1) gene in human carcinoma cells. **J. Biol. Chem.** v. 265, p. 221-226, 1990.

CONTARDO-JARA, V; PFLUGMACHER, S.; WIEGAND, C. Multi-xenobiotic-resistance a possible explanation for the insensitivity of bivalves towards cyanobacterial toxins. **Toxicol.**, v. 52, p. 936-943, 2008.

CORNWALL, R.; TOOMEY, B.H.; BARD, S.; BACON, C.; JARMAN, W.M.; EPEL, D. Characterization of multixenobiotic/multidrug transport in the gills of the mussel *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates. **Aquatic Toxicol.**, v. 31, p. 277-296, 1995.

CUI, K.; LUO, X.; XU, K.; VEN MURTHY, M.R. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Prog. Neuropsychopharmacol.* **Biol. Psychiatry**, v.28, p.771-799, 2004.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clin. Chem.**, v. 52, p. 601–623, 2006.

EVANS, P.; LYRAS, L.; HALLIWELL, B. Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. **Methods Enzymol.**, v.300, p.145–156, 1999.

FALCONER, I.R.; HUMPAGE, A.R. Health risk assessment of cyanobacterial (blue-green algal) toxins in drinking water. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v.2, p.43-50, 2005.

FALCONER, I.R.; HUMPAGE, A.R. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: cylindrospermopsins. **Environ. Toxicol.**, v.21, p.299- 304, 2006.

FENT, K. Fish cells lines as versatile tools in ecotoxicology assessment of cytotoxicity, cytochrome P450 A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. **Toxicol. In Vitro**, v.15, p.477-488, 2001.

FENT, K. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. **Toxicol. Lett.**, v.140, p. 353-365, 2003.

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

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

FILOMENI, G.; ROTILIO, G.; CIRIOLO, M.R. Cell signaling and the glutathione redox system. **Biochem. Pharmacol.**, v.64, p.1057–1064, 2002.

FONTENELE, O. Contribuição para o Conhecimento da Biologia da Curimatã Pacu, "*Prochilodus argenteus*", Spix in Spix & Agassiz (Pisces: Characidae, Prochilodinae). **Rev. Bras. Biol.**, v.13, p.87-102, 1953.

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

FROSCIO, S.M.; CANNON, E.; LAU, H.M.; HUMPAGE, A.R. Limited uptake of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin by Vero cells. **Toxicon**, v.54, p.862-868, 2009.

FU, W.; O'HANDLEY, S.; CUNNINGHAM, R.P.; JOHNSON, M.K. The role of the iron-sulfur cluster in Escherichia coli endonuclease III. A resonance Raman study. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p.16135–16137, 1992.

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

GOTTESMAN, M.M.; PASTAN, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. **Annu. Rev. Biochem.**, v.62, p.385-427, 1993.

GRIFFITH, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Anal. Biochem.**, v.106, p.207-212, 1980.

GRIFFITHS, D.J.; SAKER, M.L. The Palm Island Mystery Disease 20 years on: a review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. **Environ. Toxicol.**, v.18, p.78–93, 2003.

HAUGLAND, R.P. **Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals**, Molecular Probes, Leiden, 1996.

HAWKINS, P.R.; RUNNEGAR, M.T.C.; JACKSON, A.R.B.; FALCONER, I.R. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenava and SubbaRaju isolated from a domestic water-supply reservoir. **Appl. Environ Microbiol.**, v.50, p.1292-1295, 1985.

HAYASHI, S.; OOSHIRO, Z. Primary culture of the eel hepatocytes in the serum-free medium. **Nippon Suisan Gakk.**, v.52, p.1641-1651, 1986.

HERFINDAL, L.; OFTEDAL, L.; SELHEIM, F.; WAHLSTEN, M.; SIVONEN, K.; DOSKELAND, S.O. A high proportion of Baltic Sea benthic cyanobacterial isolates contain apoptogens able to induce to rapid death of isolated rat hepatocytes. **Toxicol.**, v.46, p.252-260, 2005.

HIGHTOWER, L.E.; RENFRO, J.L. Recent applications of fish cell culture to biomedical research. **J. Exp. Zoo.** v. 248, p. 290-302, 1988.

HUGHES, M.F. Arsenic toxicity and potential mechanism of action. **Toxicol. Lett.**, v.133, p.1- 16, 2002.

HUMPAGE, A.R.; FENECH, M.; THOMAS, P.; FALCONER, I.R. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. **Mutat. Res.**, v.472, p.155-161, 2000.

HUMPAGE, A.R.; FALCONER, I.R. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss Albino Mice: determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. **Environ. Toxicol.**, v. 18, p.94- 103, 2003.

HUMPAGE, A.R.; FONTAINE, F.; FROSCIO, S.; BURCHAM, P.; FALCONER, I.R. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: role of cytochrome P-450 and oxidative stress. **J. Toxicol. Environ. Health A.**, v.68, p.739-753, 2005.

IRANI, K.; XIA, Y.; ZWEIER, J.L.; SOLLITT, S.J.; DER, C.J.; FEARON, E.R.; SUNDARESAN, M.; FINKEL, T.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P.J. Mitogenic Signaling Mediated by Oxidants in Ras-Transformed Fibroblasts. **Science**, v.275, p.1649-1652, 1997.

JIANG, Z. Y.; HUNT, J.V.; WOLV, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Anal. Biochem.**, v.202, p.384-389, 1992.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione Stransferases. **J. Biol. Chem.**, v.251, p.6183-6188, 1976.

KLETZIEN, R.F.; HARRIS, P.K.; FOELLM, L.A. Glucose-6-phosphatedehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. **FASEB J.**, v.8, p.174-181, 1994.

KÜHN, H.; BORCHERT, A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. **Free Radic. Biol. Med.**, v.33, p.154-172, 2002.

KURELEC, B. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. **Crit. Rev. Toxicol.**, v.22, p.23-43, 1992.

KURELEC, B.; SMITAL, T.; BRITVIC, S.; PIVCEVIC, B.; KRCA, S.; JELASKA, S.B.; SAUERBORN, R.; MUSTAJBEGOVIC, S. Multixenobiotic defense mechanism in aquatic organisms. **Period. Biol.**, v. 99, p. 319-328, 1997.

LANKOFF, A.; WOJCIK, A.; LISOWSKA, H.; BIALCZYK, J.; DZIGA, D.; CARMICHAEL, W.W. No induction of structural chromosomal aberrations in cylindrospermopsin-treated CHO-K1 cells without and with metabolic activation. **Toxicol.**, v.50, p.1105-1115, 2007.

LEVINE, R.L.; WILLIAMS, J.A.; STADTMAN, E.P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods. Enzymol.**, v.233, p.346-357, 1994.

- MANNICK, J.B.; SCHONHOFF, C.M. Nitrosylation: the next phosphorylation? *Arch. Biochem. Biophysics*, v.408, p.1-6, 2002.
- MASTEN, S.; CARSON, B. Review of toxicological literature. Final Report. U.S. **Environmental Protection Agency**. Integrated Laboratory Systems. USA. p.37, 2000.
- Mc ELHINEY, J., LAWTON, L.A. Detection of cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicol. App. Pharmacol.*, v.203, p. 219-230, 2005.
- MIRANDA, A.L.; ROCHE, H.; RANDI, M.A.F.; MENEZES, M.L.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological, physiological, and immunological findings. *Environ. Int.*, v. 34, p. 939-949, 2008.
- MOLICA, R.; AZEVEDO, S. Ecofisiologia de Cianobactérias produtoras de Cianotoxinas. *Oecol. Bras.*, v.13, p. 229-246, 2009.
- MOMMSEN, T.P.; MOON, T.W.; WALSH, P.J. Hepatocytes: isolation, maintenance and utilization. In: HOCHACHKA, P.W.; MOMMSEN, T.P. (Eds), **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, Analytical Techniques. Elsevier, Amsterdam. v.3, p.355–372, 1994.
- MÜLLER, W.; RIEMER, S.; KURELEC, B.; SMODLAKA, N.; PUSKARIC, S.; JAGIC, B.; MÜLLER-NIKLAS, G.; QUERIC, N. Chemosensitizers of the multixenobiotic resistance in amorphous aggregates (marine snow): etiology of mass killing on the benthos in the Northern Adriatic? *Environ. Toxicol. Chem.*, v.6, p.229-238, 1998.
- NAIK, B. M.; GAY A. N.; ZHU, X.; YU, L.; CASS, D. L.; OLUTOYE, O. O. Age-dependent recruitment of neutrophils by fetal endothelial cells: implications in scarless wound healing. *J. Pediatr. Surg.*, v.42, p.166-171, 2007.
- NAKAMURA, T.; TOMITA, Y.; ICHIHARA, A. Density-dependent growth control of adult rat hepatocytes in primary culture. *J. Biochem.*, v.94, p.1029-1035, 1983.
- NASCARELLA, M.A.; CALABRESE, E.J. The relationship between the IC(50), toxic threshold, and the magnitude of stimulatory response in biphasic (hormetic) dose-responses. *Regul Toxicol Pharmacol.*, v. 54, p. 229- 233. 2009.
- NEUMANN, C.; BAIN, P.; SHAW, G. Studies of the comparative in vitro toxicology of the cyanobacterial metabolite deoxycylindrospermopsin. *J. Toxicol. Environ. Health A.*, v.70, p.1679-1686, 2007.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.*, v.31, p.1287-13121, 2001.
- NORRIS, R. L. G.; SEAWRIGHT, A. A.; SHAW, G. R.; SENOGLES, P.; EAGLESHAM, G. K.; SMITH, M. J.; CHISWELL, R. K.; MOORE, M. R. Hepatic xenobiotic metabolism of cylindrospermopsin in vivo in the mouse. *Toxicol.*, v.40, p.471-476, 2002.
- NYENJE, P.M.; FOPPEN, J.W.; UHLENBROOK, S.; KULABAKO, R.; MUWANGA A. Eutrophication and nutrient release in urban areas of sub-Saharan Africa - A Review. *Sci. Total Environ.*, v.408, p. 447-455, 2010.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; BELGER, L.; PELLETIER É.; ROULEAU, C. Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environ. Res.*, v. 90, p. 217-225, 2002.



OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquat. Toxicol.**, v. 4, p. 53-69, 2005.

PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v.327, p.524-526, 1987.

PASTORE, A.; FEDERICI, G.; BERTINI, E.; PIEMONTE, F. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. **Clin. Chim. Acta.**, v.333, p.19–39, 2003.

PESSATTI, M.L.; RESGALLA Jr., C.; REIS Fo., R.W.; KUEHN, J.; SALOMÃO, L.C.; FONTANA, J.D. Variability of rates of filtration, respiration and assimilation and multixenobiotic mechanism resistance (MXR) of mussel *Perna perna* under lead influence. **Braz. J. Biol.** v. 62, p.651-656, 2002.

PRIETO, A. I.; PICHARDO, S.; JOS, A.; MORENO, I.; CAMEÁN, A. M. Time-dependent oxidative stress responses after acute exposure to toxic cyanobacterial cells containing microcystins in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) under laboratory conditions. **Aquat. Toxicol.**, v.84, p.337–345, 2007.

QUINLAN, G.J.; GUTTERIDGE, J.M.C. Carbonyl assay for oxidative damage to proteins, in: TANIGUCHI, N.; GUTTERIDGE, J.M.C. (Eds.). **Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species**. New York: Oxford University, 2000. p. 257-258.

RABITTO, I. S.; BASTOS, W. R.; ANJOS, R. A., A.; HOLANDA, Í.B. B.; GALVÃO, R. C. F.; FILIPAK NETO, F.; MENEZES, M. L.; SANTOS, C. A. M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Mercury and DDT exposure risk to fish-eating human populations in Amazon. **Environ. Int.**, v.37, p. 56-65, 2011.

RAO, P.V.; GUPTA, N.; BHASKAR, A.S.; JAYARAJ, R. Toxins and bioactive compounds from cyanobacteria and their implications on human health. **J. Environ. Biol.**, v.23, p.215-224, 2002.

RUNNEGAR, M.T.; KONG S.M.; ZHONG, Y.Z.; LU, S.C. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. **Biochem. Pharmacol.**, v.49, p.219-225, 1995.

SCHAFFER, F.Q.; BUETTNER, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic. Biol. Med.**, v.30, p.1191-1212, 2001.

SEAWRIGHT, A.A., NOLAN, C.C., SHAW, G.R., CHISWELL, R.K., NORRIS, R.L., MOORE, M.R., SMITH, M.J. The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska). **Environ. Toxicol.**, v.14, p.135–142, 1999.

SEDDON, W.L.; PROSSER, C.L. Non-enzymatic isolation and culture of channel catfish hepatocytes. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.123A, p.9-15, 1999.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.**, v.25, p.192-205, 1968.

SEGNER, H. Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.120A, p.71-81, 1998.

SILVA, R. DE C. da; LIEBEL, S.; OLIVEIRA, H. H. P. de; COSTA, D. D. M.; RIBEIRO, C. A. de O.; FILIPAK NETO, F.; MAGALHÃES, V. F. de. Oxidative stress and cell death on primary cultured hepatocytes of the neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to cylindrospermopsin (cyanotoxin). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 15., 2010, Bombinhas. **Anais...** Bombinhas: Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia, 2010. 1 CD-ROM.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v.175, p.184-191, 1988.

SMITAL, T., KURELEC, B. The activity of multixenobiotic resistance mechanism determined by rhodamine B - efflux method as a biomarker of exposure. **Mar. Environ. Res.**, v.45, p.443 – 447, 1998.

SMITAL, T.; SAUERBORN, R.; PIVCEVIC, B.; KURELEC, B. Inhibition of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms by commercially used pesticides. **Mar. Environ. Res.**, v.50, p.331-335, 2000.

STRMAC, M.; BRAUNBECK, T. Cytological and biochemical effects of a mixture of 20 pollutants on isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.53, p.293-304, 2002.

SUNDARESAN, M.; YU, Z-X.; FERRANS, V.J.; IRANI, K.; FINKEL, T. Requirement for Generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for Platelet-Derived Growth Factor Signal Transduction. **Science**, v.270, p.296-299, 1995.

SVERLIJ, S. B. *Prochilodus lineatus*. 2005. 1 fotografia, color. Disponível em: <[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Prochilodus\\_lineatus.jpg#file](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Prochilodus_lineatus.jpg#file)>. Acesso em: 30/12/2010.

TERAO, K.; OHMORI, S.; IGARASHI, K. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. **Toxicon**, v.32, p.833- 843, 1994.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MANZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem-Biol Interact.**, v.160, p.1–40, 2006.

VAN BLADEREN, P.J. Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. **Chem. Biol. Interact.**, v.129, p.61-76, 2000.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : a review. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v.13, p.57-149. 2003.

VASSEUR P ; COSSU-LEGUILLE C. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. **Environ. Int.** v.28, p.711-717, 2003.

WAARDE, A.; KESBEKE, F. Nitrogen metabolism in goldfish, *Carassius auratus* (L.). Influence of added substrates and enzyme inhibitors on ammonia production of isolated hepatocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v.70, p.499-507, 1981.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M. E. PEAKALL, D. B. **Principles of Ecotoxicology**. Londres: Taylor e Francis. 1996. 321pp.

WINKALER, E. U.; SANTOS, T. R.M.; MACHADO-NETO, J. G.; MARTINEZ, C. B.R. Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comp. Biochem. Phys. C.**, v.145, p.236-244, 2007.

YANHONG, F.; CHENGHUA, H.; GUOFANG, L.; Z. HAIBIN. Optimization of the isolation and cultivation of *Cyprinus carpio* primary hepatocytes. **Cytotechnology**, v.58, p.85-92, 2008.

YUE, L.; GUANGZHI, M; ZHANQIANG, F. Primary culture of swordtail fish hepatocytes. **Chin. J. Comp. Med.**, v.16, p.185–187, 2006.

ZEGURA, B.; LAH, T.T.; FILIPIC, M. The role of reactive oxygen species in microcystin -LR-induced DNA damage. **Toxicology**, v. 200, p.59–68, 2004.

ZUCCO, F.; ANGELIS, I.; TESTAI, E.; STAMMATI, A. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. **Toxicol In Vitro**, v.18, p.153-163, 2004.