

CESAR APARECIDO DA SILVA

**EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DAS SAXITOXINAS EM *Hoplias
malabaricus*: ESTUDOS *IN VIVO* E *IN VITRO***

CURITIBA

2011

CESAR APARECIDO DA SILVA

**EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DAS SAXITOXINAS EM *Hoplias malabaricus*:
ESTUDOS *IN VIVO* E *IN VITRO***

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de doutor, pelo Curso de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr.^a Helena Cristina da Silva de Assis

Co-orientador: Prof Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

CURITIBA

2011

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Silva, Cesar Aparecido da
Efeitos ecotoxicológicos das saxitoxinas em *Hoplias malabaricus*:
estudos *in vivo* e *in vitro* / Cesar Aparecido da Silva. – Curitiba, 2011.
91 f.: il. color. ; 30cm.

Orientador: Helena Cristina da Silva de Assis
Co-orientador: Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

1. Ecotoxicologia 2. Cianotoxinas 3. Neurociência ambiental I. Título II.
Assis, Helena Cristina da Silva III. Ribeiro, Ciro Alberto de Oliviera IV.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa
de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação

CDD (20. ed.) 615.902



Coordenadora do PPG-ECO

Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da banca examinadora da defesa da tese, a que se submeteu Cesar Aparecido da Silva para fins de adquirir o título de Doutor em Ecologia e Conservação, são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do trabalho de conclusão do candidato.

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

Curitiba, 07 de dezembro de 2011.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Helena Cristina da Silva de Assis
Orientadora e Presidente

Prof. Dra. Alessandra Gigli
Membro

Prof. Dra. Carolina Camargo de Oliveira
Membro

Prof. Dra. Maria Margarete Cestari
Membro

Prof. Dra. Lucélia Donatti
Membro

Visto:
Prof. Dra. Lucélia Donatti



Centro Politécnico – Caixa Postal 19031 – CEP: 81531-990, Curitiba/PR
Telefones: (41) 3361-1505 – Fax (41) 3205-2042 – ecologia@ufpr.br
www.ecologia.ufpr.br

Vimos girando do nada, espalhando estrelas como pó,
As estrelas puseram-se em círculo e nós ao centro dançamos com elas,
Como uma pedra de moinho em forma de Deus gira a roda do céu,
Segure um raio dessa roda e terás a mão decepada,
Girando e girando essa roda dissolve todo e qualquer apego,
Se não estivesse apaixonada ela mesma gritaria: Basta!
Até quando hei de seguir esse giro?
Cada átomo gira desnordeado,
Mendigos circulam entre as mesas,
Cães rondam um pedaço de carne,
O amante gira em torno do seu próprio coração.
Envergonhado de tanta beleza giro ao redor de minha vergonha.
O que quer que pensem de nós,
Em nada parecerá o que somos,
Há luz agora, Luz!
Heis o amor verdadeiro que diz a mente: Adeus!
Adeus, este é o dia do adeus, adeus!
Todo coração que arde nesta noite é amigo da música,
E ardendo por teus lábios meu coração transborda da minha boca...
Silêncio! Silêncio,
És feito de pensamento, afeto e paixão,
O que resta é nada além de carne e ossos.
Por que nos falam de templos de oração ou de atos piedosos?
Somos o caçador e a caça, o outono e primavera, a noite e o dia, o Visível e o Invisível.
Somos o tesouro do espírito, a alma do mundo,
Livres do peso que vergasta o corpo.
Prisioneiros não somos do tempo nem do espaço,
Nem mesmo da terra que pisamos.
No amor fomos gerados,
No amor, nascemos."

Rumi, poeta persa 1207 – 1273.

Tenho muito a quem agradecer. Começo pelos amigos, pelos colegas, pelos familiares, aos que compreenderam e aos que não o fizeram também. Agradeço ao invisível, que estranhamente me impulsiona a atingir e a superar meus limites e a desenvolver a tolerância. Foram anos de dificuldades e provações. Convivi com traíras, literalmente falando, mas também fiz amigos verdadeiros, e é o que importa. Novos horizontes se abrem todos os dias, e quando não consigo mover a pedra, apenas a empurro. Contudo, não posso deixar de mencionar alguns nomes importantes que me auxiliaram e tenho certeza que continuarão ainda na minha jornada. Primeiro minha orientadora, que desde sempre me apoiou e mesmo sabendo que eu nada conhecia sobre cultivo celular não desistiu de mim. Meu co-orientador fez o mesmo, e só posso ficar grato por eles terem aparecido em meu caminho. Depois, uma seqüência de boas pessoas surgiu. A Valéria da UFRJ, que me trouxe em mãos as toxinas, o Zanata e seus conselhos valiosos. A Michele e Sofia, que com paciência me instruíram a manusear células. A Beth que me ensinou a identificar os neurônios. E não posso esquecer o professor Masahiko que me trazia as traíras. E o pessoal do laboratório, a Cris, o João, como é bom trabalhar com bom humor! A Sté que trocávamos tantas idéias e lamentações. Eita cultivo primário danado, sô! Quando dá certo contamina. Quando não contamina, nada cresce. O Chico e suas sugestões de última hora que acendia uma lanterninha no final do túnel. Todo esse trabalho tem as mãos dessas pessoas. Essa obra também é delas, com certeza!

Se teu corpo envelhece, o que importa?

É fresca ainda tua alma.

Rumi.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vii
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Cianobactérias	2
1.1.1 <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	3
1.2 Cianotoxinas	5
1.2.1 Neurotoxinas	6
1.2.1.1 Saxitoxinas	6
1.2.1.2 Ocorrências de Saxitoxinas no Paraná	10
1.3 Biomarcadores	10
1.3.1 Superóxido Dismutase	11
1.3.2 Catalase	12
1.3.3 Glutaciona Peroxidase	12
1.3.4 Glutaciona S-transferase	13
1.3.5 Glutaciona Reduzida	13
1.3.6 Lipoperoxidação	14
1.3.7 Carbonilação de Proteína	15
1.3.8 Apoptose	15
1.3.9 Acetilcolinesterase	17
1.3.10 Ensaio Cometa	18
1.4 Testes <i>in vitro</i>	19
1.5 <i>Hoplias malabaricus</i>	21
1.6 Objetivos	22
1.6.1 Objetivo Geral	22
1.6.1.1 Objetivos Específicos	22
2. CAPÍTULO I	23
Primeiro relato sobre exposição trófica de saxitoxinas no peixe dulcícola <i>Hoplias malabaricus</i>	23
3. CAPÍTULO II	24

Método Alternativo Para Avaliar Efeitos Neurológicos em Peixes Dulcícolas Neotropicais	24
3.1 Introdução	24
3.2 Materiais e Métodos.....	25
3.2.1 Isolamento das Células cerebrais.....	25
3.2.2 Avaliação das Proteases de Dissociação de tecido.....	26
3.2.3 Avaliação de Substratos de Aderência	26
3.2.4 Avaliação do Efeito do bFGF nas Culturas Celulares.....	27
3.2.5 Análise Estatística.....	27
3.3 Resultados.....	27
3.4 Discussão	33
4. CAPÍTULO III	36
Exposição de células de cultivo primário de neurônios de <i>Hoplias malabaricus</i> às Saxitoxinas	36
4.1 Introdução	36
4.2 Material e Métodos	37
4.2.1 Obtenção das Saxitoxinas.....	37
4.2.2 Desenho Experimental.....	38
4.2.2.1 Exposição das células às Saxitoxinas.....	38
4.2.3 Imunocitoquímica.....	38
4.2.4 Citotoxicidade.....	40
4.2.5 Biomarcadores	40
4.2.6 Ensaio Cometa.....	41
4.2.7 Análise Estatística.....	41
4.3 Resultados	42
4.4 Discussão	45
4.5 Conclusão.....	48
5. CONCLUSÃO GERAL	49
6. REFERÊNCIAS	50
ANEXO 1 - Normas Para Publicação Da Revista Toxicology In Vitro	74

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 – Imagem sob microscopia de luz de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	4
Figura 1.2 – Estrutura molecular das saxitoxinas..	8
Figura 1.3 – Características morfológicas da necrose e apoptose.....	16
Figura 1.4 – Peixe dulcícola <i>H. malabaricus</i>	21
Figura 3.2.1 - Fluxograma mostrando as principais etapas do protocolo para o isolamento e cultivo das células cerebrais.....	29
Figura 3.3.1 - Proteases para dissociação e isolamento de células cerebrais de <i>H. malabaricus</i>	30
Figura 3.3.2 - Efeito do substrato e fator de crescimento..	31
Figura 3.3.3 - Células plaqueadas.....	32
Figura 4.3.1 - Ensaio imunocitoquímico das células dissociadas do cérebro de <i>H. malabaricus</i>	43
Figura 4.3.2 - Avaliação da citotoxicidade, dos biomarcadores bioquímicos e da genotoxicidade nas células de <i>H. malabaricus</i> expostas às STXs.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variações das saxitoxinas de acordo com o grupo químico <i>R</i>	09
Tabela 2. Ocorrências de Saxitoxinas (STX, NEO, GTX1, GTX2, GTX3,GTX4) em µg/L, nos reservatórios com predominância de cianobactérias no Paraná, entre 2002 a 2003.....	10

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac-DEVD-pNA - acetil-Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroanelina
Ach - acetilcolina
AChE - acetilcolinesterase
BSA - albumina de soro bovino
CAT- catalase,
DAPI - 4,6-Diamidino-2-phenilindol
DMEM/F12-exp - meio modificado de Dulbecco com fatores de crescimento
DMSO - dimetil sulfóxido
ERO - espécie reativa de oxigênio
GPx – glutathiona peroxidase
GSH - glutathiona reduzida
GST - glutathiona S-transferase
GTX - goniautoxinas
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
Hg - mercúrio
K⁺ - íon potássio
LMA - agarose de baixo ponto de fusão
LPO - lipoperodoxidação
MTT - 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) brometo de -2,5-difenil-2H-tetrazólio; sal de tetrazólio
MU - mouse units
Na⁺ - íon sódio
NeoSTX - neosaxitoxina
NGS - soro de cabra
O₂^{•-} - superóxido
OH[•] - radical hidroxil
PBS - solução fosfato salina
PCO - carbonilação de proteína
PFA - paraformaldeído
PSP – veneno paralisante de marisco
RO[•] - alcóxil
ROO[•] - peróxil
SOD- superóxido dismutase

STX – saxitoxina

STXeq – equivalentes de saxitoxina

RESUMO

Florações de cianobactérias produtoras de saxitoxinas (STXs), como a *Cylindrospermopsis raciborskii*, tem se tornado um grave problema ambiental, especialmente no sul do Brasil, onde a espécie já é dominante em reservatório de abastecimento público. As STXs são neurotoxinas que atuam bloqueando os canais de sódio (Na^+) dos neurônios, o que pode levar à morte por parada respiratória. Entretanto, a bioacumulação deste tipo de substância na cadeia trófica e seus efeitos ecotoxicológicos, principalmente na água doce, ainda não estão totalmente esclarecidos. Neste trabalho inicialmente objetivou-se elucidar os efeitos tóxicos e a bioacumulação da STX no peixe dulcícola *Hoplias malabaricus* através de bioensaio com exposição trófica (0,08 $\mu\text{g}/100$ g de equivalentes de STX – STXeq obtido através da lise celular de *C. raciborskii*) utilizando exemplares de *Astyanax* sp. como veículo, por 20 dias com alimentação a cada 5 dias. Os cérebros dos animais foram avaliados através dos biomarcadores de contaminação ambiental: atividades da acetilcolinesterase (AChE), da superóxido dismutase (SOD), da catalase (CAT), da glutatona S-transferase (GST) e da glutatona peroxidase (GPx). Concentração de glutatona (GSH), lipoperoxidação (LPO), carbonilação de proteína (PCO), e ensaio cometa também foram analisados. O músculo foi coletado para análise química de STX. Estabeleceu-se também um protocolo de cultivo primário de neurônios de *H. malabaricus* para possibilitar a avaliação de neurotoxinas diretamente na célula alvo. Em seguida, as células cultivadas foram expostas em meio de cultivo contendo extrato de STXs a 3 $\mu\text{g}/\text{L}$ (valor tolerável no Brasil de equivalentes de STXeq na água de abastecimento público) e 0,3 $\mu\text{g}/\text{L}$ por 24h. O bioensaio sugeriu a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), com aumento da atividade específica da SOD e das concentrações de LPO e PCO, enquanto as atividades específicas da CAT, GST e GPx diminuíram, o que pode ter levado ao estresse oxidativo e aos danos genotóxicos observados pelo ensaio cometa. Entretanto, não foi observada a presença de STXs nos músculos analisados. O protocolo de cultivo celular de neurônios desenvolvido a partir das células cerebrais mostrou que um meio de cultura adequado enriquecido com fator de crescimento fibroblasto (bFGF) e suplementos nutricionais como B27, e uso de enzimas que não causem injúrias celulares como a papaína, além de substrato de aderência como a poli-L-lisina, e segregação celular através de gradientes celulares, permitiu um cultivo com boa viabilidade celular, aproximadamente $2.5 \pm 0.35 \times 10^4$ cel/mg de tecido cerebral (média \pm desvio padrão). Portanto, aptas para ensaios toxicológicos. Após os neurônios serem expostos às STXs, o que correspondeu a cerca de 87% das células isoladas, observou-se citotoxicidade através do ensaio de sal de tetrazólio (MTT), aumento da atividade específica da GPx e dos níveis de LPO, e genotoxicidade (ensaio cometa). No entanto, não foi observado apoptose nos grupos testados. Os resultados obtidos são de grande importância e podem servir de ferramenta a gestão de recursos hídricos uma vez que, embora os efeitos da STX devido ao bloqueio do canal de Na^+ sejam reportados como reversíveis, o tempo de exposição e a concentração das STXs sugerem injúrias celulares, o que pode levar a neuropatologias. Além disso, o estabelecimento do protocolo de cultivo primário de neurônios de peixes possibilita novas aplicações em ecotoxicologia na avaliação de substâncias neurotóxicas em células alvo.

Palavras-chave: novas perspectivas em ensaios ecotoxicológicos, neurociência ambiental, cianotoxinas, traíra, eutrofização.

ABSTRACT

Cyanobacteria blooms saxitoxins (STXs) producers such as *Cylindrospermopsis raciborskii*, has become a serious environmental concern, especially in southern Brazil, where the species has already been dominant in public water supply reservoir. STX is a neurotoxin which blocks neurons sodium (Na^+) channels, leading to death by respiratory fail. However, the bioaccumulation in trophic chain and their ecotoxicological effects, mainly in freshwater, are not completely known. First the aim this work was to elucidate the toxic effects an bioaccumulation of STXs in freshwater fish *Hoplias malabaricus* through trophic bioassay (0.08 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ of STX equivalents – STXeq obtained by lysis of *C. raciborskii* cells) using *Astyanax* sp. as vehicle during 20 days feeding every 5 days. The animals brains were assessed using biomarkers of environmental contamination: activities of acetylcholinesterase (AChE), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) and glutathione peroxidase (GPx). The concentration of glutathione (GSH), lipoperoxidation (LPO), protein carbonylation (PCO), and comet assay were also carried out. Muscles were collected for STX chemical analysis. An in vitro protocol was established using primary culture of neurons from *H. malabaricus* to evaluate neurotoxins directly on target cell. Then, cultured cells were exposed to culture medium containing STXs extract of 3 μL (tolerable concentration of STXeq for public water supply in Brazil) and 0.3 μL for 24h. The results of the bioassay suggested generation of reactive oxygen species (ROS), with increased specific activity of SOD and concentration of LPO and PCO, while the specific activities of CAT, GST and GPx decreased, which may have caused oxidative stress and genotoxic damage measured by comet assay. However, it was not observed STXs contents in muscle samples. The neurons protocol developed showed that a suitable culture medium enriched with fibroblast growth factor (bFGF) and nutritional supplements such as B27, and the use of enzymes that do not provoke cellular injury such as papain, as well substract coating appropriate such as poly-L-Lysine and segregation gradients cells, allows cellular culture with good cell viability. About $2.5 \pm 0.35 \times 10^4$ cell/mg of brain tissue (mean \pm standard deviation), suitable for toxicology assay. After STXs exposure neurons, which corresponds to about 87% of isolated cells, cytotoxicity, was observed evidenced by tetrazolium salt (MTT) cell viability assay, increase in the specific activity of GPx and LPO levels and genotoxicity (comet assay). Apoptosis was not observed in the exposed group. The results are important and can be used as a tool to hidric resources management. Although the STX effects due the blockage of Na^+ channels is reported to be reversible, the time exposure and concentration of STXs suggests cellular injuries which can lead to neuropathology. In addition, the establishment of neurons culture primary protocol enables new applications in fish ecotoxicology in the assessment of neurotoxic substances in the target cells.

Keyword: new perspectives in ecotoxicological assessment, environmental neuroscience, cyanotoxins, traíra, eutrophication.

1. INTRODUÇÃO GERAL¹

O crescimento demográfico desordenado, aliado à falta de saneamento básico, tem causado diversos danos aos ecossistemas aquáticos e à qualidade da potabilidade da água para uso humano.

Processos de eutrofização devido, por exemplo, ao uso de adubos, lançamento de esgoto *in natura* nos recursos hídricos têm tido como efeito, entre outros, a floração de cianobactérias.

Tais florações causam impactos sociais, econômicos e ambientais, não apenas por sua biomassa contribuir para problemas estéticos, como alterações na coloração da água com formação de natas verdes na superfície e odor desagradável, mas também pela liberação ao ambiente de toxinas (cianotoxinas), que podem provocar diversos danos aos organismos aquáticos e aos seres humanos (Magalhães et al., 2001).

Um crescente aumento de registros de danos causados aos ecossistemas aquáticos e à saúde humana pelo desenvolvimento de populações de cianobactérias têm sido relatados, dentre eles, casos graves de intoxicação ocorrido no Canadá, Austrália e Reino Unido (Di Bernardo et al., 2003; Falconer, 1991; Kuiper-Goodman et al., 1999, Panosso e Lüring, 2010; Vidal e Kruk, 2008). Outros relatos incluem a morte de animais silvestres e domésticos, sendo o mais antigo datado em 1878 em um lago na Austrália (Falconer, 1991).

No Brasil, 60 pessoas submetidas a hemodiálise morreram em 1996 por intoxicação hepática causada pela microcistina, toxina produzida por cianobactérias, em uma clínica da cidade de Caruaru (PE) (Carmichael et al., 2001; Jochimsen et al., 1998). Outro episódio que se destacou foi a ocorrência de 200 casos de gastroenterites, sendo que 88 resultaram em mortes, na região de Paulo Afonso, Bahia (Teixeira et al., 1993). Em muitas regiões do país, a situação é alarmante, pois vários reservatórios e açudes apresentam florações de cianobactérias (Carmichael, 1996; Clemente et al., 2010, Di Bernardo et al., 2003, SANEPAR, 2005; Tucci e Sant'Anna, 2003; Yunes et al., 2003).

Os peixes parecem poder bioacumular as cianotoxinas em seus tecidos (Clemente et al., 2010; Jang and Yotsu-Yamashita, 2006; Magalhães et al., 2001; Silva et al., 2011; White, 1981). Porém, ainda são escassos os estudos relatando a biomagnificação ou bioacumulação de tais toxinas, e seus efeitos nos organismos

¹ Esse trabalho segue as normas de formatação, com adaptações, da Revista Toxicology in Vitro, anexo 1.

aquáticos dos níveis mais superiores da cadeia alimentar. Neste caso, as autoridades proibem a pesca durante o período de floração das cianobactérias. Contudo, muitos continuam a realizar a pesca clandestinamente, oferecendo risco à sua própria saúde e a de outrem.

As cianotoxinas normalmente permanecem contidas nas células das cianobactérias, e são liberadas em quantidade considerável após a lise celular, que ocorre durante a fase de senescência, a morte natural, ou devido ao estresse celular, ou ainda ao uso de algicidas, como sulfato de cobre ou cloração (Ibbelings and Chorus, 2007; SANEPAR, 2005). O aumento destas substâncias tóxicas no ambiente pode comprometer a qualidade do ecossistema como um todo.

1.1 Cianobactérias

São microrganismos aeróbios fotoautotróficos, cujas atividades metabólicas requerem somente água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz. O seu sistema fotossintético é semelhante ao das algas (vegetais eucariontes) e, do mesmo modo, apresentam os pigmentos clorofila-a, ficobilinas, ficocianinas, ficoeritrinas e carotenóides que absorvem a energia solar para realização da fotossíntese (Azevedo et al., 1994; Bold e Wynne, 1985; Graham e Wilcox, 2000). Estas "algas-bactérias", sob determinadas condições, podem proliferar de maneira excessiva, originando as denominadas florações ou *blooms*.

A descoberta de fósseis em rochas sedimentares do noroeste da Austrália permite estimar que as cianobactérias tenham surgido há cerca de 3,5 bilhões de anos. Elas estão, portanto, entre os organismos pioneiros na Terra e, muito provavelmente, constituem os primeiros produtores primários de matéria orgânica a liberar oxigênio na atmosfera primitiva (Chorus e Bartram, 1999; Graham e Wilcox, 2000). A capacidade de crescimento nos mais diferentes meios, sejam fontes termais, solo, rochas ou águas de diferentes salinidade e temperaturas, é uma das características marcantes das cianobactérias. As espécies que vivem em solos e rochas desempenham um importante papel nos processos funcionais do ecossistema e na ciclagem de nutrientes (Azevedo et al., 1994; Dolah, 2000).

Ambientes de água doce são, contudo, os mais importantes para o seu crescimento, visto que a maioria das espécies apresenta um melhor crescimento em águas neutro alcalinas (pH 6 a 9), com temperaturas entre 15 e 30 °C e alta

concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo (Carmichael, 1994; Chorus e Bartram, 1999; Graham e Wilcox, 2000, Panosso e Lürling, 2010).

As cianobactérias podem apresentar-se como simples células isoladas, em filamentos ou colônias, com tamanhos variando de 5 µm para as unicelulares a 200 µm para as filamentosas ou coloniais (Graham e Wilcox, 2000).

Entre os fatores que levam as cianobactérias predominarem sobre os outros grupos fitoplanctônicos (microalgas), destacam-se as características fisiológicas pelas quais as cianobactérias assimilam os nutrientes nitrogênio e fósforo do meio aquático. De maneira geral, as cianobactérias são menos eficientes na assimilação desses nutrientes do que as microalgas (algas verdes ou diatomáceas, por exemplo). No entanto, ao produzir uma descarga excessiva de nutrientes nos reservatórios, ocorre a eutrofização e facilita a assimilação destes pelas cianobactérias (FUNASA, 2003; Melo Filho, 2006; Padisač, 1997).

O crescimento intenso desses microrganismos na superfície da água geralmente se dá com predomínio de poucas ou mesmo de apenas uma espécie de cianobactéria produtora de toxinas, ou de outros metabólitos, que inibem a sua predação por microcrustáceos, larvas de peixes, moluscos, etc. Esses consumidores primários vão preferir consumir as microalgas não tóxicas e com maior valor nutricional, contribuindo com isso para a redução das populações dessas, o que, por sua vez, resultará numa diminuição drástica da comunidade dos consumidores primários, com conseqüências em toda a cadeia alimentar do ambiente aquático (FUNASA, 2003).

Dentre as florações comuns, Yunes et al. (2003) citam as seguintes espécies nocivas: *Anabaena flos-aquae*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa*, *Nodularia spumigena*, *Planktothrix agardhii* e *Cylindrospermopsis raciborskii*.

1.1.1 *Cylindrospermopsis raciborskii*

O gênero *Cylindrospermopsis* pertence à ordem Nostocales, caracterizado por ser uma cianobactéria cilíndrica filamentosa, apresentando filamentos secretores; heterócitos, responsáveis pela assimilação e fixação do nitrogênio gasoso, e acinetos que podem agir com esporos para a reprodução celular (Padisač, 1997; Panosso e Lürling, 2010; Rai, 1990; Rippka, 1988).

C. raciborskii (Fig. 1.1), apresenta tricomas reto e espiralado, com extremidades ligeiramente estreitas e heterócitos dispostos apicalmente, uma das

características típicas da espécie (Padisák, 1997). Sua alta competitividade em ambientes eutrofizados, aliada a capacidade de formar florações e produzir toxinas, fazem de *C. raciborskii* uma das espécies de cianobactérias mais estudadas tanto do ponto de vista ecológico como de saúde pública (Tucci e Sant'Anna, 2003).



Figura 1.1 – Imagem sob microscopia de luz de *Cyndrospermopsis raciborskii*. Fonte: Vidal e Kruk (2008).

A capacidade de migração na coluna d'água devido a existência de aerótopos presentes nas células de *C. raciborskii* que possibilitam a sua movimentação na zona eufótica; a tolerância à baixa luminosidade; a habilidade em aproveitar de elementos essenciais como o fósforo para seu rápido crescimento e fixar nitrogênio atmosférico; a resistência a herbivoria pelo zooplâncton, e sua alta capacidade de adaptação às condições ambientais muitas vezes adversas às outras espécies, faz da *C. raciborskii* uma cianobactéria de grande plasticidade, garantindo o sucesso de suas florações nos recursos hídricos (Calijuri et al., 2006; Panosso e Lüring, 2010; Padisák, 1997).

Inicialmente, acreditava-se que a espécie cresceria somente em ambientes tropicais, pois seu desenvolvimento ótimo está em torno de 25 °C, sendo primeiramente reportada sua floração na Indonésia (Briand et al., 2004; Vidal e Kruk, 2008). No entanto, florações de *C. raciborskii* têm sido registradas em diversas partes do mundo tanto em ambiente tropical como subtropical e temperado, tais como o norte da Europa,

África do Sul, América do Norte e América do Sul (Fastner et al., 2003; Hamilton et al., 2005; Vidal e Kruk, 2008; Wiedner et al., 2002).

No Brasil, a espécie tem sido relatada desde a região sul até o nordeste do país, com florações permanentes, por exemplo, no reservatório de abastecimento público Alagados, localizado na cidade de Ponta Grossa, Estado do Paraná (Carmichael, 1996; Clemente et al., 2010, Tucci e Sant'Anna, 2003; Yunes et al., 2003).

Basicamente *C. raciborskii* é capaz de produzir dois tipos principais de cianotoxinas: cilindropermopsinas e saxitoxinas (Panosso e Lürling, 2010; Rai, 1990; Rippka, 1988; Tucci e Sant'anna, 2003).

1.2 Cianotoxinas

A razão da síntese das cianotoxinas nas cianobactérias ainda não está esclarecida, mas sugere-se que seja para minimizar o efeito da herbivoria, como acontece com os vegetais superiores (FUNASA, 2003; SANEPAR, 2005).

Intoxicações de animais domésticos rurais e selvagens devido às florações de cianobactérias já foram reportadas em países como Austrália, Estados Unidos, Canada, Finlândia, Rússia, África do Sul, Bermuda, Nova Zelândia, Inglaterra, Argentina, França, Escócia e Alemanha (Yoo et al., 1995). No Brasil, diversos reservatórios de abastecimento público têm tido sua qualidade ambiental comprometida devido a florações de cianobactérias produtoras de cianotoxinas e, em alguns casos, permanentes, como ocorre na região sul do país (Clemente et al., 2010; Tucci e Sant'Anna, 2003; Yunes et al., 2003).

Os efeitos da exposição humana às cianotoxinas através da ingestão da água são pouco conhecidos. Mesmo assim, o Brasil é um dos poucos países que possuem uma lei federal a respeito: a Portaria MS 518 de 2004 – do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004), que obriga a detecção das cianobactérias e das cianotoxinas na água destinada ao abastecimento público. A lei prevê uma investigação semanal de cianotoxinas na saída do tratamento sempre que o número de cianobactérias na água do manancial exceder a 20.000 células/mL.

As cianotoxinas são divididas de acordo com os seus mecanismos de ação em três grupos: Neurotoxinas, Hepatotoxinas e Dermatotoxinas.

1.2.1 Neurotoxinas

As neurotoxinas já identificadas são produzidas por espécies e cepas incluídas nos gêneros: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Trichodesmium*, *Lyngbya* e *Cylindrospermopsis* (Carmichael et al., 1994; Lagos et al., 1999, Mahmood e Carmichael, 1986; Sivonen et al., 1989).

Tais toxinas têm uma ação rápida, e manifestam-se sob a forma de tontura e perda de coordenação motora, podendo ocasionar paralisação dos músculos da respiração, o que pode causar morte por parada respiratória poucos minutos após a exposição à substância (Gad, 2005; Ibbelings e Chorus, 2007; Llewellyn, 2006).

Atuam no sistema nervoso e estão descritos três tipos: Anatoxina-a (alcalóide), Anatoxina-a(s) (organofosforado natural) e Saxitoxinas (carbamatos alcalóides).

1.2.1.1 Saxitoxinas

As saxitoxinas pertencem a um grupo de neurotoxinas conhecido popularmente como “venenos paralisantes de mariscos”, ou PSPs, que foram primeiramente isoladas de dinoflagelados marinhos, responsáveis pela ocorrência de marés vermelhas (Chorus e Barthram, 1999). O nome Saxitoxina é atribuído ao molusco *Saxidomus giganteus*, do qual foi primeiramente identificada (Gad, 2005).

Essas neurotoxinas formam um grupo de alcalóides carbamatos que possuem uma estrutura química básica (Fig. 1.2A), no entanto, diferentes grupos químicos podem se ligar na molécula, formando substâncias similares, mas com graus de toxicidades diferentes (Tabela 1). Podem ser divididas em não sulfatados como, por exemplo, a Saxitoxina (STX) e as neosaxitoxinas (Neo-STX), com um único grupamento sulfato (G-toxinas) ou com dois grupamentos sulfatos (C-toxinas). Além dessas, estruturas com grupamentos decarbamoil (dcSTX ou dcGTX) e novas toxinas relacionadas têm sido recentemente isoladas, sendo reportadas dezenas de análogos à STX (Chorus e Barthram, 1999; Ibbelings e Chorus, 2007; Llewellyn, 2006; Wiese et al., 2010).

Entre as espécies de cianobactérias capazes de produzir STXs destacam-se as seguintes (Llewellyn, 2006): *Anabaena circinalis*, *Anabaena lemmermannii*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Aphanizomenon gracile*, *Aphanizomenon issatschenkoi*, *Lyngbya wollei*, *Planktothri* sp. e *C. raciborskii*.

A STX é uma substância solúvel em água, estável termicamente e instável em pH alcalino, com fórmula e peso molecular de $C_{10}H_{17}N_7O_4$, 299 g/mol, respectivamente.

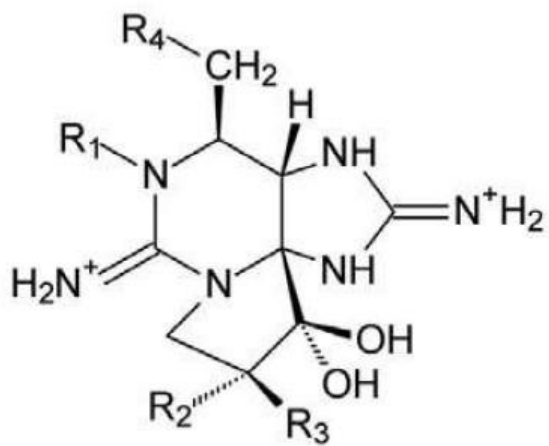
Tem estrutura básica formada por hidropurinas e grupos guanidínicos que são carregados eletricamente com carga positiva (Fig. 1.2B) que são sugeridos como ligação às cargas negativas dos grupos carboxilas na membrana plasmática extracelular do canal de sódio (Na^+) dos neurônios, bloqueando o influxo de Na^+ . Conseqüentemente, interfere na transmissão sináptica e resulta em paralisia dos músculos responsáveis pelo processo de respiração (Gad, 2005; Hille, 1975; Kao, 1986; Llewellyn, 2006).

No meio ambiente, a saxitoxina raramente é encontrada isoladamente, e por isso, nas análises químicas, este grupo de substâncias é diagnosticada como equivalentes de saxitoxina (STXeq), uma vez que a toxicidade destes alcalóides varia, sendo a saxitoxina a mais potente, enquanto as C-toxinas possuem baixa toxicidade (Oshima, 1995). A toxicidade é mensurada normalmente em camundongos e expressa como Mouse Units (MU) que equivale à quantidade mínima da toxina injetada intraperitonealmente (ip) causando a morte do animal em aproximadamente 15 minutos (Schantz, 1986). A dose letal 50% (DL50) (ip) em camundongos para saxitoxina purificada é de 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso corpóreo, enquanto que por consumo oral a DL50 é de 263,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso corpóreo (Chorus e Barthram, 1999).

Os sinais clínicos de intoxicação humana incluem tontura, adormecimento da boca e de extremidades, fraqueza muscular, náusea, vômito, sede e em altas doses pode levar à morte por parada respiratória (Llewellyn, 2006). Não se tem ainda relatos sobre a existência de um antídoto específico para intoxicação por essas neurotoxinas.

A agência Food and Agriculture Organization (FAO) recomenda como dose diária o limite de até 800 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de STXeq (Chorus e Barthram, 1999). Em trabalho publicado por Fitzgerald et al. (1999) considerou-se que 124 μg de STXeq foi capaz de provocar efeitos adversos em seres humanos, baseados em relatos publicados de monitoramento de PSPs, e que a probabilidade de se ingerir água contendo essas neurotoxinas seja de 50% em locais que contenham florações de cianobactérias, e um consumo de 2 L de água diária e peso do indivíduo variando entre 60 e 70 Kg, estimou um limite de segurança para STXeq de 3,0 $\mu\text{g}/\text{L}$. Isto corresponde a cerca de 20000 cel/mL de florações da espécie de *Anabaena circinalis* produtora de STX. Esses limites sugeridos foram adotados no Brasil para controle de potabilidade da água (BRASIL, 2004). Apesar deste valor ter sido aceito legalmente, não existem trabalhos que sustentem que o limite aceitável de STXeq não cause danos aos neurônios de humanos ou animais em exposição aguda, sub-crônica ou crônica.

A



B

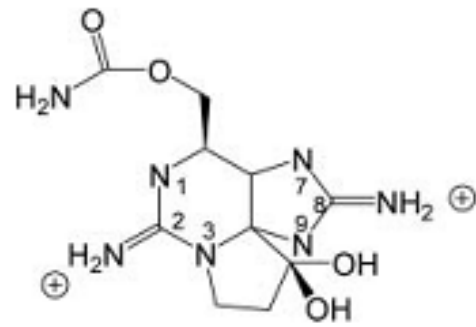


Figura 1.2 – Estrutura molecular das saxitoxinas. A: Estrutura básica das saxitoxinas, R são regiões da molécula que podem se ligar a diferentes grupos químicos. B: Estrutura molecular da STX, de maior potência tóxica. Fonte: Llewellyn (2006).

1.2.1.2 Ocorrências de Saxitoxinas no Paraná

No estado do Paraná registrou-se a incidência de cianobactérias produtoras de saxitoxinas em dois mananciais de abastecimento público: Iraí, localizado em Curitiba, e Alagados, em Ponta Grossa, onde, neste último observou-se floração da espécie *C. raciborskii*, na qual foi confirmada a presença na água de pelo menos cinco tipo de saxitoxinas (Tabela 2) (SANEPAR, 2005).

Tabela 2 – Ocorrências de Saxitoxinas (STX, NEO, GTX1, GTX2, GTX3, GTX4) em µg/L, nos reservatórios com predominância de cianobactérias no Paraná, entre 2002 a 2003, de acordo com SANEPAR (2005).

Local	Datas de Coletas:				
	02/06/2002	17/06/2002	06/01/2003	24/02/2003	01/12/2003
Represa Alagados, Ponta Grossa	4,95 (STX)	76,7 (STX)	0,2 (STX)	0,9 (STX)	
		92,6 (NEO)	1,9 (NEO)	1,3 (NEO)	
		470,3 (GTX1)	0,1 (GTX3)	0,2 (GTX2)	
		5,3 (GTX2)	0,1 (GTX4)	0,1 (GTX3)	
				0,2 (GTX4)	
Represa Iraí, Curitiba					11,6 (GTX3)
					2,3 (GTX4)

Monitoramento da água do reservatório de Alagados realizado por Clemente et al. (2010) nos anos de 2007 e 2008, indicou a presença de STXs (GTX1, 3, 4, 5) devido a floração permanente de *C. raciborskii* naquela região, sugerindo riscos a saúde pública e animal.

1.3 Biomarcadores

Os biomarcadores podem ser definidos como respostas biológicas aos poluentes ambientais que podem ser mensurados indicando a presença, o efeito e, em alguns casos, o grau de contaminação (Walker et al., 2001). Após introduzida a substância química no ambiente, os organismos expostos podem incorporar o contaminante por diversas vias de absorção.

Os efeitos iniciais dos poluentes são observados nas respostas bioquímicas e moleculares, ou seja, no nível bioquímico celular, desta forma, as alterações dos poluentes podem ser reversíveis, e assim, medidas preventivas podem ser tomadas evitando o comprometimento mais severo do ambiente (Huggett et al., 1992). Entre os biomarcadores de qualidade ambiental, citam-se os de estresse oxidativo, genotoxicidade e neurotoxicidade, por exemplo.

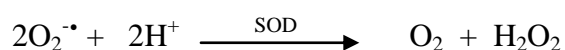
O estresse oxidativo se dá quando a geração de radicais livres provocados por substâncias poluentes, ou xenobióticos, é maior que a capacidade antioxidante da célula. Promovendo assim, a oxidação dos constituintes celulares, tais como os lipídios das membranas, as proteínas e o DNA (Avci et al., 2005). Entre os biomarcadores mais comumente utilizados para se avaliar o estresse oxidativo estão a atividade enzimática da catalase (CAT), da superóxido dismutase (SOD), e da glutathione S-transferase (GST) que atua na conjugação de substâncias eletrofílicas (Keen et al., 1976; Huggett et al., 1992).

Alguns biomarcadores podem ainda ser utilizados para verificar a oxidação dos lipídios, como a lipoperoxidação (LPO), e a oxidação de proteínas tal como a carbonilação de proteínas (PCO) (Quinlan e Gutteridge, 2000).

A ineficiência do sistema antioxidante pode levar a danos genotóxicos, que podem ser avaliados através do ensaio cometa (Singh et al., 1988). Já a morte celular devido ao programa apoptótico, pode ser avaliada através do desencadeamento da cascata das caspases (Bortner e Cidlowski, 2007; Enari et al., 1998; Sakahira et al., 1998).

1.3.1 Superóxido Dismutase

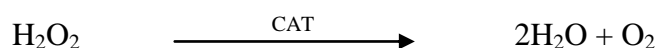
O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é gerado devido à redução do O_2 durante as reações enzimáticas intracelulares ou devido à radiação ionizante. A enzima superóxido dismutase (SOD), que pertence ao grupo de metalenzimas, realiza a conversão, ou dismutação, do $O_2^{\cdot-}$ com produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que mais tarde é convertido em água e oxigênio através da ação das enzimas CAT e/ou glutathione peroxidase (GPx) (Hayes et al., 1997):



A importância da atuação da SOD se deve a evitar que o $O_2^{\cdot-}$ atue na oxidação dos constituintes celulares, ou na formação de outros radicais livres como o radical hidroxil (OH^{\cdot}), e que pode causar danos em macromoléculas como lipídios e proteínas, devido a sua alta reatividade (Hayes et al., 1997; Halliwell e Gutteridge, 2000).

1.3.2 Catalase

A catalase é uma enzima tetramérica que é encontrada em todos os organismos vivos. Devido à sua ampla distribuição e capacidade de degradar rapidamente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água (Halliwell e Gutteridge, 2000):



A CAT parece desempenhar um papel fundamental nos sistemas que capacitam os organismos a viverem em ambientes aeróbicos (Mallick e Rai, 1999).

Além disso, ela é a única entre as enzimas degradantes de H_2O_2 , que não consome equivalentes redutores celulares e possui um mecanismo muito eficiente para remover o peróxido de hidrogênio formado nas células sob condições de estresse (Mallick e Rai, 1999). A atividade da catalase está associada com os peroxissomos ou pequenos corpos que estão associados ao metabolismo de ácidos graxos. Durante a oxidação do ácido graxo peroxissomal é produzido H_2O_2 , e a CAT atua degradando esse peróxido a fim de evitar que o mesmo venha a formar OH^{\cdot} que pode vir a causar danos às membranas (Hugget et al., 1992).

1.3.3 Glutathione Peroxidase

A enzima glutathione peroxidase é normalmente encontrada nas mitocôndrias, e apresenta o metal selênio na sua constituição protéica, e é utilizada para reduzir diversos tipos de peróxidos, inclusive hidroperóxidos levando-os aos seus correspondentes alcoóis, empregando a glutathione (GSH) como co-fator e gerando glutathione oxidada (GSSG) como produto (Hayes et al., 1997; Halliwell e Gutteridge, 2000):



Onde: R pode ser hidrogênio, lipídeo ou éster.

A GPx tem sido utilizada como uma importante ferramenta de indicação de estresse oxidativo, uma vez que não somente atua na redução de peróxido de hidrogênio devido a ação da dismutação do $O_2^{\cdot -}$ realizada pela SOD, como ocorre com a CAT, mas também a uma gama maior de peróxidos, ampliando o seu espectro de aplicação de bioensaios para a avaliação de exposição a poluentes ambientais (Mourente, 2002; Van Der Oost et al., 2003).

1.3.4 Glutathione S-transferase

A glutathione S-transferase é uma enzima essencial para a proteção aos danos de compostos potencialmente reativos, conjugando-os para posteriormente serem eliminados do organismo (George, 1993; Marionnet et al., 2006).

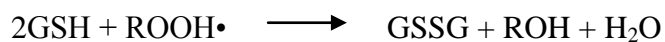
Diversas glutathione S-transferase (GSTs) foram caracterizadas em animais, associadas a metabolização de compostos xenobióticos e toxinas (George, 1993; Halliwell e Gutteridge, 2000). Além de participarem em processos de desintoxicação por formação de conjugados com a glutathione reduzida (GSH), as GSTs possuem papel no metabolismo de produtos secundários, incluindo a estabilização de flavonóides; atuam com peroxidase na redução de hidroperóxidos a monohidróxi-álcool durante o estresse oxidativo (Dixon e Laphorn, 2002).

As GSTs são codificadas por uma superfamília de genes, cada uma produzindo isoenzimas com ampla especificidade de substratos. Apesar de catalisarem reações similares, as GSTs possuem pouca identidade de seqüência de aminoácidos, e estão presentes no citosol de muitas células catalisando a conjugação do tripeptídeo glutathione em uma variedade de compostos (Riol et al., 2000).

1.3.5 Glutathione Reduzida

A glutathione é um tiol não protéico muito abundante no conteúdo celular (George, 1993). É reconhecida como um antioxidante chave em diversas reações com substâncias eletrofílicas, atuando algumas vezes como co-fator para algumas enzimas, como a GPx e na conjugação de radicais xenobióticos para substâncias inertes e hidrossolúveis através da enzima GST (Van Der Oost et al., 2003).

Também protege a célula contra ação de íons diversos e substâncias danosas como os hidroperóxidos. Durante o processo de detoxificação a GSH é oxidada a GSSG, e por isso, a relação GSH/GSSG pode ser utilizada como um indicador de estresse oxidativo, conforme reação (Hermes-Lima, 2004):



Onde: ROOH• é um hidroperóxido.

Após a formação da GSSG, a ação da glutathione redutase a reduz para a forma GSH, disponibilizando novamente a glutathione ao conteúdo celular, fechando o ciclo (Hayes et al., 1997; Halliwell Gutteridge, 2000).

Como atua na síntese de DNA e de proteínas diversas, sua depreciação provocada pela ação de poluentes pode afetar a transcrição de enzimas de detoxificação, o que pode provocar danos irreversíveis à célula e levar ao processo apoptótico (Van Der Oost et al., 2003).

1.3.6 Lipoperoxidação

O estresse oxidativo pode causar a peroxidação dos ácidos graxos polinsaturados existentes nos fosfolipídios das membranas celulares com formação de novos radicais livres. A peroxidação lipídica, é um dos danos mais importantes causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo as membranas celulares os locais mais susceptíveis a essas reações de oxidação. A peroxidação dos ácidos graxos da membrana inicia-se através da retirada de prótons H^+ do grupo metileno dos fosfolipídios pelos radicais livres, com posterior produção de dienos conjugados e formação de hidroperóxidos lipídicos (Oliveira, 1999):



Onde, LH: lipídeo polinsaturado; R: radical livre; L: lipídeo.



As EROs, reagindo com os lipídios presentes nas membranas causam, entre outros, a perturbação ou destruição da função das membranas das células e organelas

essenciais, incluindo o processo de transporte de nutrientes, a manutenção de gradiente de metabólitos e íons e a transdução de sinais mediada por receptores (Meagher e Fitzgerald, 2000).

Uma vez as membranas liperoxidadas, elas tornam-se rígidas alterando sua permeabilidade e integridade, o que pode levar a célula ao processo apoptótico (Halliwell e Gutteridge, 2000; Hayes et al., 1997).

1.3.7 Carbonilação de Proteína

A carbonilação de proteína é um dos principais marcadores de estresse oxidativo devido aos radicais livres (Pantke et al., 1999).

A carbonilação é a presença de grupos carbonilas, tais como aldeídos e cetonas, nas proteínas quando da interação dessas com açúcares reduzidos ou substâncias oxidadas como os carboidratos e lipídios peroxidados durante o processo da glicolisação (Asraf e Regnier, 2010; Herme-Lima, 2004).

Essas proteínas carboniladas são mais hidrofóbicas e resistentes a proteólise e estão associadas a processos de injúrias e envelhecimento de células e tecidos (Pantke et al., 1999).

1.3.8 Apoptose

Quando uma célula sofre injúrias, seja reversível ou irreversível, o grau do estresse ao qual foi submetida pode levar a dois processos principais de morte celular: necrose e apoptose (Maluf e Pompéia, 2005).

A necrose é entendida como um tipo de morte na qual as células aumentam o volume celular, com agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e conseqüente ruptura celular, e liberação do seu conteúdo causando danos às células vizinhas promovendo uma reação inflamatória no tecido (Fig. 1.3) (Grivicich et al., 2007).

A apoptose pode ser uma espécie de “suicídio celular” a fim de eliminar células indesejáveis, ou desnecessárias, ao organismo mediante a ativação de um programa bioquímico de desmontagem dos componentes celulares, internamente controlado e que não envolve inflamação (Maluf e Pompéia, 2005).

Durante o processo apoptótico, de um modo geral, ocorre a manutenção da integridade de organelas, como a mitocôndria, e ao contrário da necrose, ocorre um “murchamento” celular e com a desintegração do núcleo em fragmentos envoltos pela membrana nuclear, enquanto a membrana se prolonga e se rompe em porções denominados corpos apoptóticos que são rapidamente fagocitados por macrófagos (Fig. 1. 3) (Grivicich et al., 2007; Maluf e Pompéia, 2005).

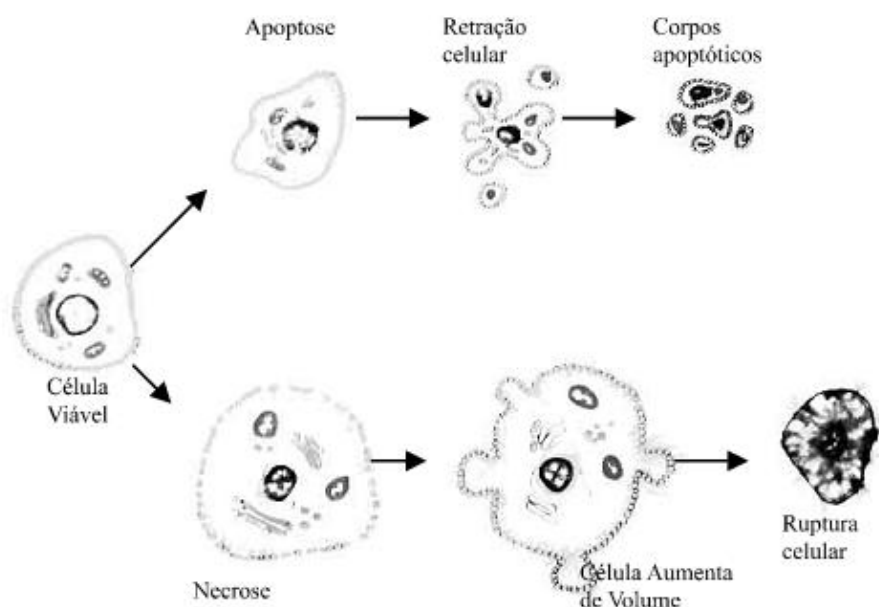


Figura 1.3 – Características morfológicas da necrose e apoptose. Fonte: Grivicich et al., 2007.

A apoptose pode ser ativada por duas vias básicas: intrínseca (mitocondrial, retículo endoplasmático e complexo de golgi) na qual os sinais são originados no interior da própria célula, e extrínseca (ativação dos receptores de morte situados na membrana plasmática), transduzindo um sinal de morte para o interior da célula (Ashkenazi, 2002).

O processo apoptótico inclui a interação de diversos fatores, com uma intensa clivagem de proteínas celulares que são efetuadas pelas caspases, que pertencem à família das cisteínas proteases, isto é, possuem uma cisteína no sítio ativo. Estas possuem a capacidade de atuar sobre substratos específicos ativando ou clivando proteínas o que leva a eventos mais tardios na clivagem e condensação do DNA, assim como na alteração do citoesqueleto celular modificando completamente a estrutura da célula com a conseqüente compartimentalização celular em corpos apoptóticos. A exposição das fosfotidilserina na monocamada externa da membrana plasmática é também conseqüência do mecanismo de morte celular avançado, identificando os

corpos apoptóticos para serem fagocitados por macrófagos (Grivicich et al., 2007; Lockshin e Zakeri, 2001).

As caspases se dividem em três grupos (Maluf e Pompéia, 2005):

- Iniciadoras ou desencadeantes de cascatas: caspases 2, 8, 9, 10 e 12.
- Efetoras ou executoras, que são ativadas pelas iniciadoras, clivam proteínas-chave que processam a apoptose: caspases 3, 6 e 7.
- Função inflamatória às quais seu papel no processo apoptótico ainda não está bem definido: caspases 1, 4 e 5.

Durante a morte celular programada, a apoptose, ocorre um aumento na permeabilidade das membranas mitocondriais, com abertura de um poro de transição, permitindo a saída de componentes mitocondriais como o citocromo c e os fatores indutores de apoptose (Maluf e Pompéia, 2005). A indução da abertura desse poro pode ser promovida por diversas substâncias, entre elas as EROS, que podem desencadear a cascata das caspases levando a célula à morte (Kamata et al., 2005; Lockshin e Zakeri, 2001; Maluf e Pompéia, 2005).

1.3.9 Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima importante para a função neural de diversas espécies de vertebrados. Em peixes, a AChE é encontrada no músculo, cérebro e eritrócitos e tem afinidade em hidrolisar a acetilcolina (ACh) que é um dos principais neurotransmissores do sistema nervoso autônomo (Goodman e Gilman, 1996; Range e Dale, 2000).

A inibição da AChE por poluentes tem sido amplamente estudada e já foi considerada um biomarcador específico para carbamatos e organofosforados, porém outros estudos tem indicado que diversas substâncias como metais pesados, organoclorados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos também podem vir a inibi-la (Akaishi et al., 2004; Martinez-Tabche et al., 1997; Payne et al., 1996).

Essa inibição causada pelo anticolinesterásicos pode ser reversível ou irreversível. Compostos organofosforados, por exemplo, formam um complexo inibidor enzimático muito estável e que não sofre dissociação espontânea significativa, e desta forma, a enzima fica permanentemente fosforilada e a recuperação de sua atividade depende da síntese de nova enzima (Adams, 1992; Goodman e Gilman, 1996; Range e Dale, 2000).

A AChE atua na manutenção e equilíbrio da transmissão dos estímulos nervosos, pois catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, que é transformado em colina e acetato que reage com uma molécula de água e produz ácido acético, e por fim a enzima é reativada e a fração colina é prontamente reabsorvida por um processo de transporte sódio-dependente (Adams, 1992; Beyers e Sikoski, 1994; Habig e Di Giulio, 1991). Quando a atividade da AChE é inibida ocorre um bloqueio na transmissão dos impulsos nervosos, o que pode paralisar algumas funções vitais do organismo (Stenesh, 1998).

1.3.10 Ensaio Cometa

Muitas substâncias, como os metais pesados, são capazes de provocar danos genotóxicos, causando disfunção hereditária ou desencadear alterações biológicas nas células, órgãos ou tecidos (Van Der Oost, 2003).

Em alguns casos não é a substância em si que causa os danos genéticos, mas seus metabólitos ou produtos oriundos do processo de detoxificação que podem ser tão reativos quanto o xenobiótico em si, como é o caso do benzo(a)pireno, que tem como um dos produtos de sua biodegradação o benzo(a)pireno-7-8-diol9,10epóxido, que pode ligar-se com o DNA e formar aduto e desencadear o início do processo de formação do câncer (Lionel e Marta, 2003). Radicais livres como o OH^{\bullet} também são apontados como promotores de quebras de DNA (Van Der Oost, 2003).

Diferentes testes genotóxicos detectam mutações gênicas e cromossômicas, tais como o micronúcleo e o ensaio cometa.

O ensaio cometa, ou Single Cell Gel Eletrophoresis (SCGE) tem sido considerado uma técnica sensível, rápida e de baixo custo para avaliar a genotoxicidade de diversas substâncias como os poluentes ambientais (Singh et al., 1988).

Pode ser utilizado para uma variedade de células provenientes de diversos tecidos, incluindo células de cultivo primário (Liebel et al., 2011; Filipak et al., 2007; Gargioni et al., 2006; Kamer e Rinkevich, 2002; Lazarová et al., 2006). Baseia-se em submeter as células fixadas em uma lâmina a uma determinada corrente elétrica, obrigando a migração de segmentos de DNA, resultantes de quebras para fora do núcleo. Após o processo, as células que apresentam adutos formam uma cauda semelhante a de um cometa, sugerindo dano ao DNA. Quanto maior for o comprimento

ou o espalhamento destes fragmentos, maior será a injúria sofrida pelo DNA (Singh et al., 1988).

As agências reguladoras e normativas têm interesse no conhecimento do potencial genotóxico de substâncias que podem poluir o meio ambiente, pois possibilita normatizar o uso e estabelecer limites toleráveis a presença e/ou descarte visando à proteção ambiental e à saúde pública.

1.4 Testes *in vitro*

A ação de poluentes ambientais tem sido freqüentemente avaliada em testes de toxicidade com animais. Apesar das cianotoxinas serem considerados um problema de saúde pública comprometendo a qualidade da potabilidade da água, a maioria dos trabalhos se concentra no grau de toxicidade em testes intraperitoneal com ratos, que embora traga importantes informações sobre a ação destas nos organismos, incluindo o grau de toxicidade, pouco informa sobre seu real risco para as espécies expostas diretamente a elas ou para o meio ambiente (Calijuri et al., 2006).

Estudos *in vivo*, embora reportem os efeitos dos poluentes sobre a espécie avaliada, são limitados pelo número elevado de animais necessários, a dificuldade de obter linhagens puras, e as diversas interações fisiológicas e ambientais que podem dificultar o entendimento dos mecanismos de ação das substâncias expostas (Salvo et al., 1999).

Por outro lado, ensaios *in vitro* são medidas eficazes para se avaliar o grau dos efeitos de determinado tóxico sem interferência externa, pois a cultura de determinado órgão ou tecido pode ser perfeitamente controlada em laboratório, possibilitando estudar as alterações provocadas pela substância sem a interferência de outras variáveis, além de requerer um número pequeno de animais (Fenech, 2000).

Células de peixes, como os hepatócitos, têm sido utilizadas com sucesso para a avaliação de xenobióticos (Filipak Neto et al., 2006; 2007). Contudo, o isolamento e cultivo primário de células neuronais de peixes ainda são raros, e uma referida padronização é de suma importância no contexto da avaliação de neurotoxinas, por promover novas perspectivas do entendimento sobre os mecanismos de ação destas substâncias sobre a célula alvo.

O sistema nervoso dos vertebrados é constituído principalmente de neurônios e glíócitos. O neurônio é composto por um corpo celular (soma) onde estão concentradas

as principais organelas, por uma haste comprida, o axônio, responsável pelo envio dos sinais às demais células e dendritos que recebem os sinais dos neurônios adjacentes (Lent, 2010). Essa comunicação entre os neurônios recebe o nome de sinapse, que pode ser bioquímica ou elétrica devida a polarização da membrana plasmática, que possui diversos canais iônicos que são macromoléculas embutidas na membrana e capazes de permitir a passagem seletiva de íons (Armstrong e Hille, 1998). Dentre esses, destaca-se os canais de sódio.

Os canais de sódio são estruturas glicopeptídicas variando entre 200-300 quilodaltons (KD) que se agregam às membranas. Tais estruturas são formadas por subunidades que formam os poros, permitindo o influxo de íons Na^+ , e em alguns casos ligações de toxinas, que altera esse fluxo (Armstrong e Hille, 1998; Lent, 2010).

Uma das dificuldades no cultivo celular de neurônio está na presença do segundo tipo de células do sistema nervoso: as glias, ou gliócitos.

As glias são formadas pelas macroglias e microglias. O primeiro tipo constitui-se basicamente dos astrócitos que possuem prolongamentos muito numerosos e que emergem do soma e se ramificam profusamente, e os oligodendrócitos que são células de poucos prolongamentos e que se enrolam em torno dos axônios centrais (Araque, 2009). As microglias, ou microgliócitos, são células especializadas em fagocitose, atuando no sistema imunitário. As células da glia têm a função de conduzir nutrientes, controlar os íons no meio extracelular e armazenar glicogênio, entre outros, dando de certa forma, suporte de vida aos neurônios (Araque, 2009; Kim e Vellis, 2005).

Porém, os neurônios possuem neuroplasticidade, isto é, a capacidade de se adaptar às mudanças do ambiente e de se regenerar, especialmente, nas fases iniciais da vida do indivíduo (Kim e Vellis, 2005). A regeneração consiste na recomposição de axônios lesionados, recompondo-os, entretanto, as células gliais tais como os oligodendrócitos que produzem mielina e os astrócitos que produzem substâncias que dificultam ou até bloqueiam o crescimento dos axônios, evitam o desenvolvimento do neurônio e, com isso, pode levar a célula à morte (Lent, 2010).

Assim, o cultivo primário de células neuronais deve contemplar a segregação dos tipos celulares do tecido cerebral.

As células cultivadas a partir de um tecido, tal como o cérebro, podem ser marcadas com o intuito de diferenciar os tipos celulares aderidos através de testes de imunocitoquímica.

Tais técnicas consistem em marcar determinadas proteínas específicas que constitui uma célula, utilizando anticorpos, ao passo que a proteína a ser marcada se torna um antígeno. Existem anticorpos que se ligam a diferentes partes da mesma proteína, os policlonais, enquanto os monoclonais são especializados em ligar-se somente a uma única região protéica. Utilizam-se basicamente dois tipos de anticorpos num único teste: o anticorpo primário é aquele que reconhece o antígeno, enquanto o secundário se liga ao anticorpo primário, marcando-o e com isso possibilitando o reconhecimento da estrutura através de microscopia, por exemplo, de fluorescência (Simerly et al., 2003).

1.5 *Hoplias malabaricus*

Hoplias malabaricus (Bloch, 1794), também conhecido popularmente como traíra (Fig. 1.4), é um peixe dulcícola que pertence à ordem Characiformes e à família Erythrinidae, e que possui grande capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais e estão amplamente distribuídos nas bacias hidrográficas da América do Sul, sendo encontrados em ambientes lênticos e lóticos (Hensley e Moody, 1975, Magalhães, 1931). Durante seus primeiros estágios de vida é omnívoro, alimentando-se de microcrustáceos, algas e insetos. Já em sua fase adulta, como carnívoro, prefere pequenos peixes como a espécie *Astyanax* sp.

Por ser um predador de topo de cadeia trófica e de fácil manuseio em laboratório, diversos trabalhos têm sido realizados com essa espécie para a avaliação dos efeitos dos mais diversos tipos de poluentes em estudos *in vivo* (Cestari et al., 2004; Costa et al., 2007; Ferraro et al., 2004; Mela et al., 2007; Oliveira Ribeiro, 2006; Ramsdorf et al., 2009; Silva et al., 2009; Silva et al., 2011) e *in vitro* (Filipak Neto et al., 2007; 2008). Contudo, ainda não se tem relatos sobre o desenvolvimento de protocolo de cultivo primário de neurônios da espécie, o que pode abrir novas perspectivas no entendimento dos efeitos de toxinas sobre este tipo de células.

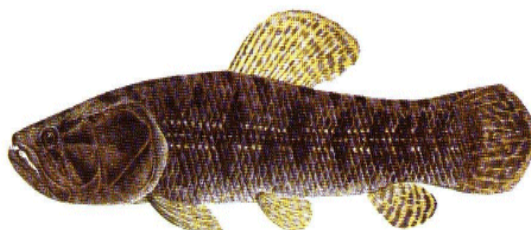


Figura 1.4 – Peixe dulcícola *H. malabaricus*. Fonte: do autor.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos ecotoxicológicos das saxitoxinas em *Hoplias malabaricus* através de ensaios *in vivo* e *in vitro*, visando à saúde pública e animal.

1.6.1.1 Objetivos Específicos

- Avaliar nos cérebros de exemplares de *H. malabaricus* expostos às STXs:
 - A atividade da acetilcolinesterase cerebral.
 - O estresse oxidativo através da análise das atividades específicas de SOD, CAT, GPx, GST, e das concentrações de GSH, LPO e PCO.
 - Os danos genotóxicos através do ensaio cometa.
 - A concentração das cianotoxinas presentes no músculo através de análise química.
- Estabelecimento de metodologia de cultivo primário de neurônios do sistema nervoso de *H. malabaricus* para avaliação de efeitos das saxitoxinas.
- Avaliar nos neurônios cultivados expostos às STXs:
 - A quantificação neuronal das células cultivadas através de teste de imunocitoquímica.
 - O estresse oxidativo através da análise das atividades específicas de SOD, GPx, e concentração de LPO.
 - A viabilidade celular através do ensaio do de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) brometo de -2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT).
 - A morte celular apoptótica através da análise das caspases.
 - A genotoxicidade através do ensaio cometa.

2. CAPÍTULO I

Primeiro relato sobre exposição trófica de saxitoxinas no peixe dulcícola *Hoplias malabaricus**

Resumo

Florações de cianobactérias produtoras de saxitoxina (STX) como a *Cylindrospermopsis raciborskii*, tem se tornado um grave problema de saúde ambiental mundial. Entretanto, a bioacumulação deste tipo de neurotoxina na cadeia trófica ainda não está totalmente esclarecida. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a bioacumulação da STX através de análises químicas e os efeitos tóxicos e trófico utilizando biomarcadores no peixe dulcícola *Hoplias malabaricus*. Os exemplares foram alimentados a cada cinco dias com *Astyanax* sp. inoculados intraperitonealmente com extrato de STX (0,08 µg/100 g) obtida através da lise de cultura tóxica de *C. raciborskii* (T3). Depois de 20 dias, o cérebro foi coletado para análises de acetilcolinesterase (AChE), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), glutathione (GSH), lipoperoxidação (LPO), carbonilação de proteína (PCO), e ensaio cometa. O músculo foi coletado para análise química de STX. A atividade da SOD, e a concentração de PCO e LPO aumentaram. As atividades específicas da CAT, GST e GPx diminuíram. Danos genotóxicos foram observados no grupo experimental. STX não foi detectada nas amostras de músculo. Foi observado um estresse oxidativo no cérebro, levando a danos nos lipídios, proteínas e DNA. O mecanismo de ação da neurotoxina nesta exposição sub-crônica sugere um processo de apoptose celular.

Palavras-chave: eutrofização, traíra, cianotoxina, genotoxicidade, veneno paralisante de marisco.

*Artigo publicado na revista *Toxicon* 57 (2011) 141–147:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004101011000396X>

3. CAPÍTULO II

Método Alternativo Para Avaliar Efeitos Neurológicos em Peixes Dulcícolas Neotropicais

3.1 Introdução

Culturas celulares têm sido utilizadas para elucidar diversas questões da toxicologia. Entretanto, os cultivos primários, dependendo do que se deseja pesquisar podem ser mais úteis que células de linhagens, por representar as células de organismos alvos, como os peixes (Oliveira Ribeiro et al., 2008).

Cultivo primário de células neuronais de mamíferos, especialmente, de embriões e post-natal, têm sido amplamente utilizados para diversos tipos de pesquisas científicas (Ahlemeyer et al., 2000; He et al., 2005; Viero et al., 2008). Os estudos *in vitro* com neurônios podem mostrar os efeitos de poluentes nas células alvo sem interferências externas, levando à elucidação de mecanismos de ação nos receptores celulares (Debeir et al., 1997; Lerea e McCarthy, 1990; Monnerie et al., 2010).

Embora as espécies de mamíferos, como os ratos, sejam utilizadas como modelos para estudos *in vitro*, peixes também têm sido usados para avaliar os efeitos à exposição a poluentes ambientais (Boaru et al., 2006; Bussolaro et al., 2010; Ferraris et al., 2002; Filipak Neto et al., 2006; 2007; 2008; Pichardo et al., 2007; Segner, 1998).

As neurotoxinas, sobretudo, as relacionadas aos poluentes aquáticos que podem causar neuropatologias têm sido estudadas em peixes (Bakke e Horsberg, 2007; Clemente et al., 2010, Naar et al., 2007; Silva et al, 2011), mas alguns mecanismos ainda carecem ser elucidados. Assim, o uso de neurônios de cultivo primário de peixes representa uma interessante ferramenta para esses estudos, porque devido a evolução das espécies, esses organismos estiveram mais expostos às neurotoxinas tais como as saxitoxinas produzidas pelas cianobactérias e que, portanto, sugere que as células de peixes podem ter uma resposta diferente dos ratos, por exemplo.

Neste estudo, a espécie de peixe dulcícola *Hoplias malabaricus* foi escolhida como modelo para o estabelecimento de cultivo primário de células neuronais porque é amplamente distribuída nos reservatórios e rios brasileiros (Hensley e Moody 1975), ocupa o topo da cadeia trófica, e tem sido utilizado como modelo biológico para estudos *in vivo* (Cestari et al., 2004; Ferraro et al., 2004, Costa et al., 2007; Mela et al., 2007;

Miranda et al., 2008; Oliveira Ribeiro, 2006; Ramsdorf et al., 2009; Silva et al., 2011) e *in vitro* (Filipak Neto et al., 2006; 2007 e 2008) em cultivo primário de hepatócitos.

Com o propósito de estabelecer um protocolo para estudar os mecanismos relacionados com os compostos neurotóxicos em peixes, é relatado neste trabalho, pela primeira vez, um método simples para se obter culturas altamente purificadas de células neuronais de *H. malabaricus*.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Isolamento das Células cerebrais

Para cada experimento, um peixe adulto ($19,2 \pm 1,6$ cm; média \pm dp) foi anestesiado com benzocaína 0,02% e sacrificado por secção medular e, em seguida, lavado com etanol 70%. A cabeça foi novamente lavada com cloroexidina 2% e o cérebro removido, pesado, e transferido para uma solução de Hank (HBSS; Sigma) suplementado com 2 mM de glucose (Sigma) e antibiótico penicilina/estreptomicina (Atb; 50 UL/mL, 50 μ g/mL; Sigma). Em fluxo laminar estéril foram removidas as meninges do cérebro e recortado a aproximadamente 0,5 mm usando bisturis e transferido para um tubo de 15-mL de poliestireno (Corning) com 6 mL de meio Neurobasal-A (Gibco) suplementado com B27 (B27; 1:50; Gibco) e enzimas de dissociação (Veja item 3.2.2). Para dispase e papaína, os tecidos foram digeridos por 30 min a 30 °C, enquanto para a tripsina o período de incubação foi de somente 5 min, e com agitação constante de aproximadamente 12 r.p.m. Em seguida os fragmentos do cérebro foram triturados com uma pipeta Pasteur polida em chama por 1 min e novamente seguida por uma nova digestão por 15 min a 30 °C, exceto para o grupo da tripsina que foi de 5 min. Este procedimento foi repetido por duas vezes sempre seguido por uma nova trituração em pipeta Pasteur com um diâmetro menor, com um tempo total de 1 hora de digestão para os grupos dispase e papaína e de 15 min para a tripsina. Em seguida, a suspensão celular foi transferida para outro tubo de 15-mL contendo 4 mL de gradiente de densidade preparada com Optiprep (Sigma) e meio Neurobasal/B27 de acordo com método descrito por Brewer e Torricelli (2007), e centrifugado a 800 x g por 15 min a 22 °C. Para remover os debris e outros tipos celulares, a parte superior da solução resultante (6,0 mL) e as frações 1 e 2 (entre 2,0 e 4,0 mL), que continham oligodendrócitos e restos celulares, foram aspiradas e descartadas. Então, o conteúdo existente entre os volumes 0,5 mL e 2,0 mL (fração 3) foi transferido para um novo tubo de 15-mL e adicionado 5 mL de meio modificado de Dulbecco (DMEM/F12; Gibco) ou

DMEM/12 + 5% de soro fetal bovino (SFB; Difco) quando a tripsina era utilizada para a dissociação celular, e as células foram centrifugadas a 800 x g por 5 min a 22 °C. Após a primeira centrifugação, o sobrenadante contendo debris foi descartado e o pellet de células foi re-suspendido em 5 mL de DMEM/F12 para lavagem, e novamente centrifugado a 800 x g por 5 min a 22 °C. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet celular resultante foi re-suspendido em aproximadamente 5,0 mL de meio de cultura apropriado e plaqueado em placas de cultivo celular de acordo com os testes que serão descritos nos próximos itens. O procedimento de isolamento e cultivo foi sumarizado no fluxograma apresentado na Figura 3.2.1.

3.2.2 Avaliação das Proteases de Dissociação de tecido

Os fragmentos do cérebro foram tratados com três tipos de proteases em meio NeurobasalA suplementado com B27 e Atb: Tripsina (1.33 mg/mL; Sigma) por 15 min, Dispase (1 U/mL; 5 U/mL; 10 U/mL; Gibco) e Papaína (10 U/mL; 20 U/mL; 30 U/mL; Sigma) durante 1 h. Em seguida, a suspensão celular foi transferida para a solução de gradiente celular e centrifugada conforme descrita anteriormente. O pellet celular foi re-suspendido em 3,0 mL de DMEM/F12 e número total de células dissociadas e as viáveis foram contadas com azul de tripan utilizando câmara de Neubauer (Hu e Fakahany, 1994). Este procedimento foi repetido cinco vezes para cada protease.

3.2.3 Avaliação de Substratos de Aderência

Para determinar o melhor substrato de aderência celular, os poços de placas de cultivo celular (96 poços, Corning) foram tratados por 16 h a 24°C com os seguinte substratos: poli-L-lisina (15 µg/mL, Dibco), fibronectina de plasma humano (15 µg/mL; Sigma) e matrigel (15 µg/mL; Kleinman et al., 1982). Antes do uso, os poços foram lavados três vezes com tampão fosfato (PBS; Gibco). As células viáveis oriundas do processo de digestão utilizando papaína (30 U/mL) foram re-suspendida em DMEM/F12 suplementada com B27 + 5% FBS + Glutamina (0,29 mg/mL; Dibco) + Atb+ fibroblato fator de crescimento (bFGF; 3 ng/mL; Sigma) (DMEM/F12exp) e 2,0 x 10⁵ células foram plaqueadas por poço. O volume total foi ajustado para 100 µL de meio e incubado por 24h a 24°C e 1,7 % de CO₂ em atmosfera umidificada. A viabilidade das células cultivadas foi determinada de acordo com o método do MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) brometo de -2,5-difenil-2H-tetrazólio). O número de células viáveis foi expresso como densidade óptica (OD) a 570 nm (Sarmiento et al.,2004). Em

cada experimento foram incluídos três poços com meio de cultura sem células. Este experimento foi repetido por cinco vezes.

3.2.4 Avaliação do Efeito do bFGF nas Culturas Celulares

Para avaliar o fator de crescimento bFGF para a adesão e diferenciação celular, as células viáveis tratadas com papaína a 30 U/mL foram re-suspendidas em DMEM/F12 suplementado com B27 + 5% FBS + Glutamina (0,29 mg/mL; Dibco) + Atb + bFGF (3 ng/mL; Sigma) para o grupo teste, e 10 poços, de uma placa de 96 poços, previamente tratados com poli-L-lisina foram plaqueados com 2×10^5 células por poço. O mesmo procedimento foi feito para o grupo controle com o meio de cultura com as especificações descritas acima, porém, sem o bFGF. As condições de cultivo celular foram as mesmas descritas anteriormente e o ensaio de MTT foi utilizado para determinar a viabilidade das células plaqueadas após 24h. O experimento foi repetido por cinco vezes. Para acompanhar o desenvolvimento e diferenciação celular, foram obtidas imagens utilizando o fotomicroscópio Leica EC3. A cultura celular foi mantida por 30 dias, e a cada dois dias, metade do volume do meio de cultura antigo foi trocado por meio novo (Fig. 3.2.1).

3.2.5 Análise Estatística

Os parâmetros biológicos foram analisados utilizando o teste Kruskal-Wallis seguido por Dunn's post hoc teste. Os resultados do ensaio do fator de crescimento foram analisados pelo teste de Mann-Whitney test. A regra de decisão α foi de 0,05 para todos os testes aplicados.

3.3 Resultados

A viabilidade celular para o grupo de tripsina (1,33 mg/mL, $2,58 \pm 0,35 \times 10^4$ cels/mg, média \pm dp) foi similar ao número observado para o grupo da dispase (10 U/mL, $2,37 \pm 0,15$) e papaína (30 U/mL, $2,45 \pm 0,37$) (Fig.3.3.1A). Nos demais grupos, observou-se que à medida que a concentração enzimática foi aumentada, a viabilidade celular também aumentava ($P < 0,0001$); o tecido dissociado através do uso da dispase a 1 U/mL e 5 U/mL mostraram um número de células viáveis de $0,61 \pm 0,09$ e $0,90 \pm 0,08$ respectivamente, enquanto os grupos tratados com papaína apresentaram $1,5 \pm 0,23$ (10 U/mL) e $1,81 \pm 0,34$ (20 U/mL) de células viáveis, sugerindo que a concentração

enzimática é um fator importante a ser considerado na dissociação do tecido cerebral. Porém, esses grupos tratados com dispase e papaína mostraram resíduos do tecido cerebral e alta incidência de debris, e após 24 h, a cultura apresentava-se com poucas células aderidas e baixa diferenciação celular.

A viabilidade celular (%) do grupo tratado com tripsina foi menor comparado com os demais tratamentos ($P < 0,05$; Fig. 3.3.1B) sugerindo que essa enzima não é adequada para aplicação à digestão do tecido cerebral do peixe dulcícola *H. malabaricus*. Além disso, após 24 h as células tratadas com tripsina apresentaram baixa adesão celular e não mostraram nenhum desenvolvimento ou diferenciação.

A adesão celular com poli-L-lisina foi maior comparada aos demais tratamentos ($P < 0,0001$), enquanto os grupos matrigel e fibronectina mostraram resultados similares (Fig. 3.3.2A), sugerindo o uso da poli-L-lisina como um substrato de aderência para as células isoladas do cérebro de *H. malabaricus*.

O grupo tratado com bFGF mostrou aumento na adesão e sobrevivência celular ($P < 0,0001$; Fig. 3.3.2B) bem como uma aderência melhor das células na superfície das placas quando comparado ao grupo controle. Esses resultados sugerem que o fator de crescimento a base de fibroblasto é essencial ao cultivo primário de células cerebrais dessa espécie de peixe.

Depois de 24 h em cultura, as células obtidas com papaína (30 U/mL) e cultivadas com poli-L-lisina e bFGF, mostraram-se aderidas à placa como células somáticas esféricas (Fig. 3.3.3A). Após três e sete dias, foram observados sinais de diferenciação celular, tais como prolongamento de axônios (Fig. 3.3.3B, 3.3.3C, respectivamente), enquanto 15 dias depois de plaqueadas, as células estavam completamente diferenciadas (Fig. 3.3.3D) e apresentavam morfologia neuronal característica. Foi possível manter as células em cultura durante 30 dias (Fig. 3.3.3E). Não foi observada diferenciação celular no grupo tratado com tripsina devido à baixa densidade celular aderida. As células tratadas com dispase (10 U/mL) não mostraram nenhuma diferenciação após três dias de cultura.

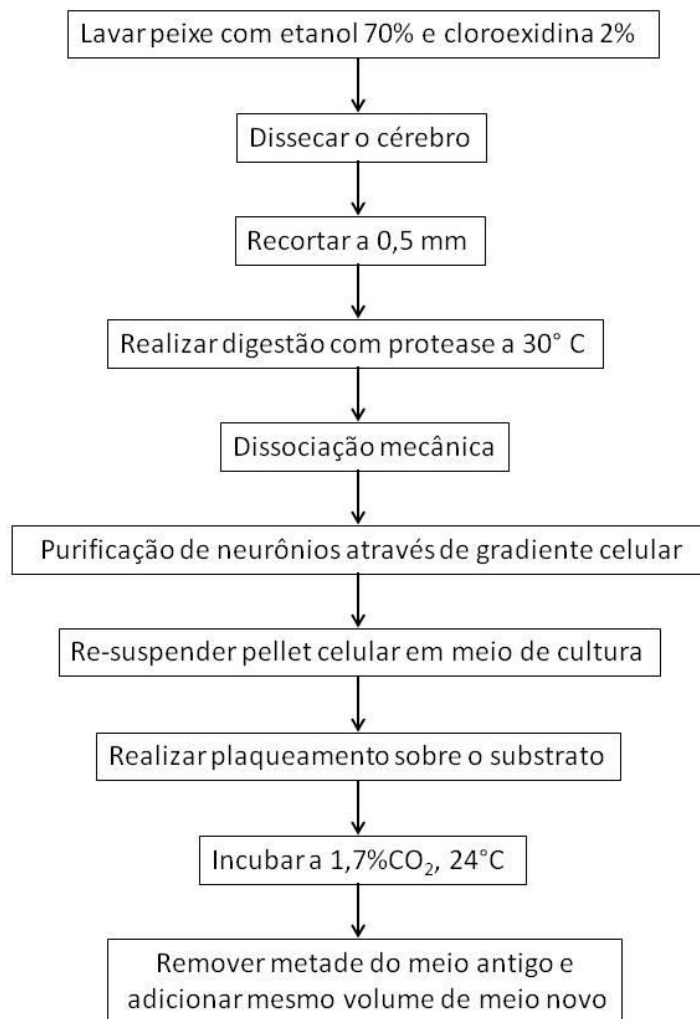


Figura 3.2.1 – Fluxograma mostrando as principais etapas do protocolo para o isolamento e cultivo das células cerebrais.

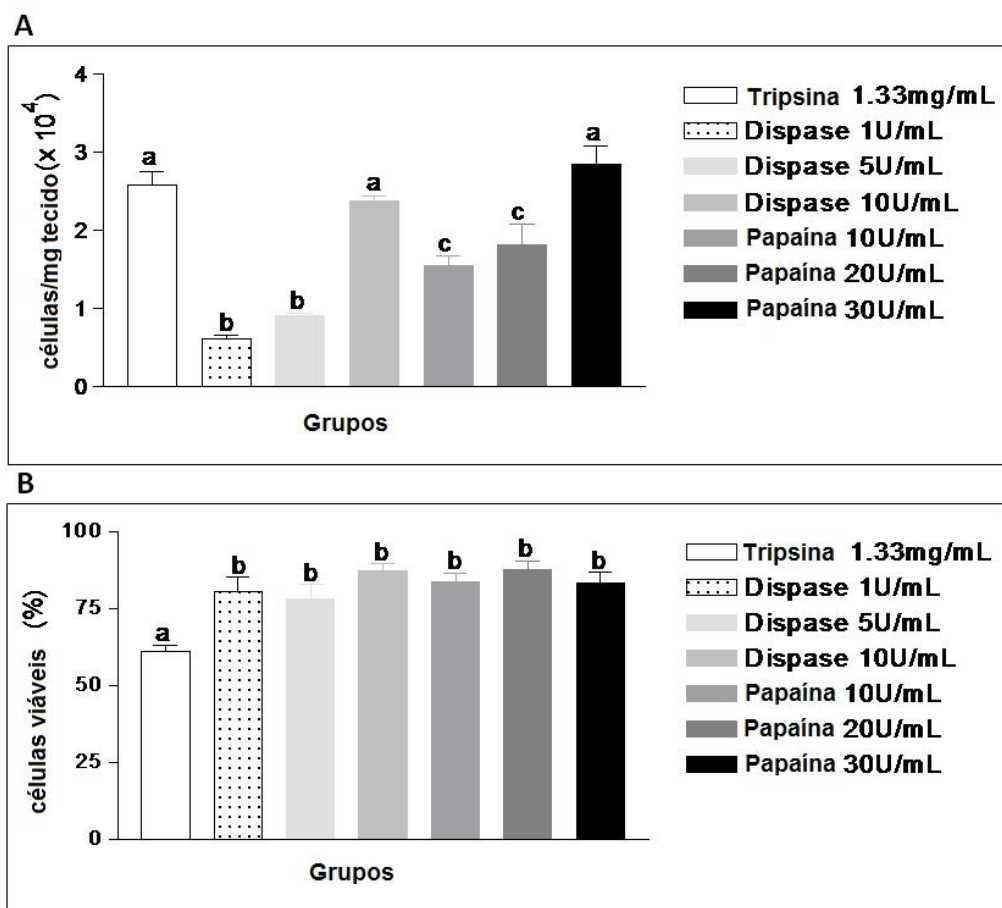


Figura 3.3.1 – Proteases para dissociação e isolamento de células cerebrais de *H. malabaricus*. A: Número de células viáveis; $p < 0,0001$. B: Viabilidade celular; $p < 0,05$. Resultados expressos em mediana para cinco experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos. p calculado por Kruskal-Wallis teste.

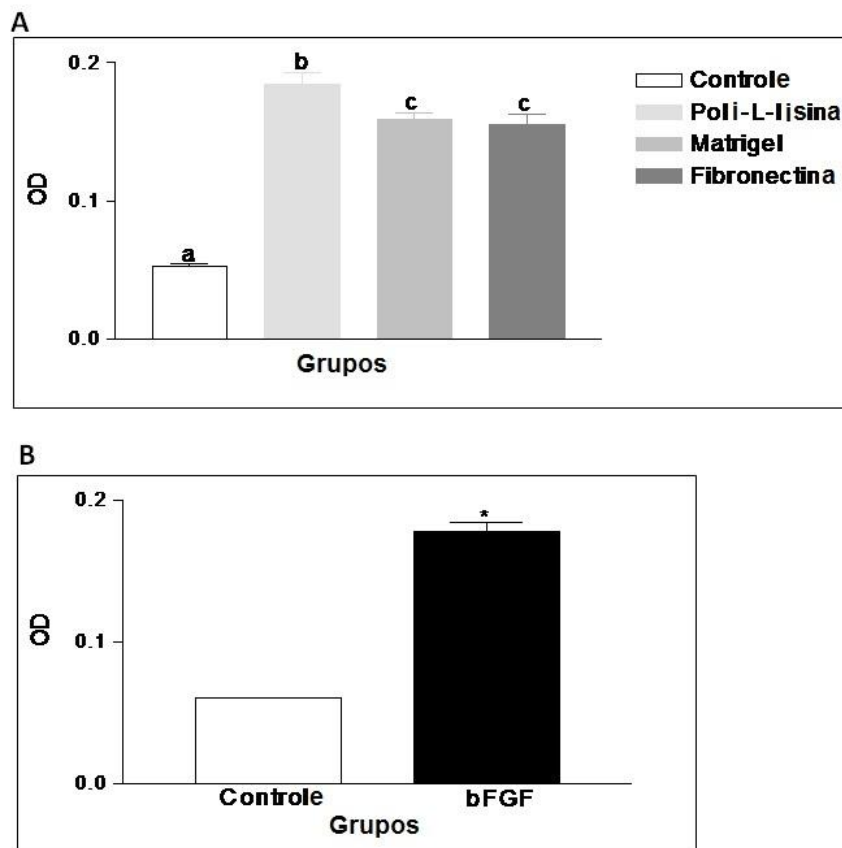


Figura 3.3.2 – Efeito do substrato e fator de crescimento. A: Efeito do substrato na aderência celular após 24 h de cultivo; $p < 0,0001$ por Kruskal-Wallis teste. B - Efeito do fator de crescimento para a aderência celular após 24 h; $p < 0,0001$ por Mann-Whitney teste. Resultados expressos em mediana para cinco experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos. OD: Densidade óptica.

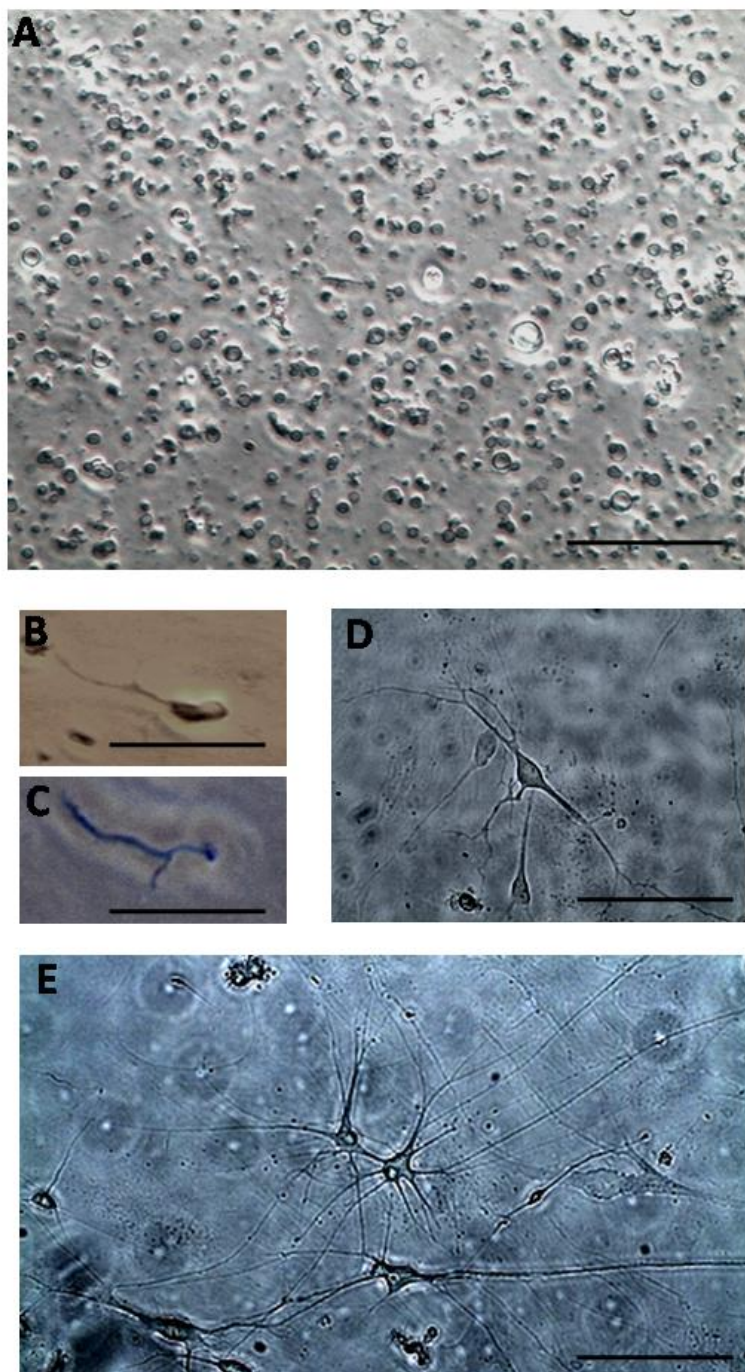


Figura 3.3.3 – Células plaqueadas usando papaína 30 U/mL como enzima de dissociação do tecido cerebral, poli-L-lisina como substrato de aderência e suplementada com bFGF, B27, SFB e glutamina. A: Células somáticas esféricas após 24 h de cultura. B: Célula depois de três dias em cultura mostrando sinais de diferenciação. C: Célula depois de sete dias em cultura. D: Células diferenciadas após 15 dias de cultura. E: Células após 30 dias de cultura. Escala = 50 μ m.

3.4 Discussão

Diversos tipos de proteases têm sido utilizados para dissociar células de tecidos de mamíferos adultos. Neste estudo, as células tratadas com tripsina mostraram baixa viabilidade, sobrevivência, diferenciação e adesão. O processo proteolítico provocado pela tripsina pode ter causado danos nos receptores celulares durante a dissociação, levando a morte celular devido a falha na adesão ao substrato. Tripsina é reportada como uma eficiente enzima para a digestão de tecidos como o cérebro de mamíferos (Chun-Lei, et al., 2003; Lakard et al., 2005; Turner et al. 1995); Por outro lado, uma baixa adesão celular após tratamento com tripsina também foi reportada por Brewer (1997). Em peixe adulto, a dissociação de células cerebrais da espécie *Apteronotus leptorhynchus* usando tripsina resultou em 50% de células viáveis, sugerindo danos celulares durante o processo de dissociação enzimática (Hinsch e Zupanc, 2006).

Cultivo primário de neurônios derivados de embriões e post-natal de mamíferos são rotineiramente reportados em estudos neurocientíficos (Hogberg et al., 2011; Kashiba et al., 1996; Sotgiu et al, 2008; Webb et al, 2003). Embora Bartlett e Banker (1984), tenham relatado que muitas características de neurônios derivados de tecido embrionário sejam similares aos provenientes de tecido cerebral de animais adultos, Brewer (1997) reportou que o comportamento e desenvolvimento de neurônios adultos podem diferir no cultivo. Como as células embrionárias ainda não estão completamente desenvolvidas, é possível haver dissociação celular sem o uso de enzimas. Entretanto, o mesmo procedimento não pode ser realizado em tecidos cerebrais de organismos adultos, pois existem diversas conexões sinápticas devido aos axônios e interações glias-neurônios, exigindo assim, a ação de proteases para a dissociação celular (Brewer 1997; Brewer et al. 1993). Além disso, estudos com neurônios isolados de ratos neonatais reportam boa sobrevivência celular, mas os neurônios de animais mais velhos não sobrevivem (Huettnner e Baughman, 1986); é possível que devido ao fato dos neurônios adultos já estarem completamente diferenciados restrinja seu desenvolvimento em cultura (Brewer 1997; Black et al. 1994; De Giorgio et al. 1994). Além disso, durante o processo de dissociação enzimática muitos axônios são lesionados, e o ambiente restrito das placas de cultura pode dificultar a recuperação dos mesmos, ainda que as condições de cultivo sejam as mais adequadas (Chen et al., 1996).

Neste estudo, dispase e papaína mostraram resultados similares no número total de células dissociadas e viabilidade celular. Entretanto, as células tratadas com papaína

mostraram melhor desenvolvimento das células aderidas. Este resultado é corroborado por outros estudos que examinaram a isolamento e cultivo primário de neurônios de ratos adultos tratados com papaína (Brewer, 1997; Brewer e Torricelli, 2007). Embora a dispase tenha sido indicada como uma enzima para dissociação cerebral e de outros tecidos, principalmente, de ratos (Dohgu et al., 2011; Matsumura et al., 2011; Shayan et al., 2011), neste presente estudo utilizando peixes as células perderam a adesão após três dias em cultivo. É possível que as concentrações testadas e o tempo de exposição tenham causado danos na estrutura celular na dissociação do tecido cerebral de *H. malabaricus*. Diferentes tipos de tecidos e espécies podem apresentar respostas distintas para tratamentos similares.

O uso de substratos de cobertura às placas de cultivo é usualmente reportado como um importante fator de aderência e sobrevivência para diversos tipos de células de cultivos primários (Ahlemeyer et al., 2000; Haile et al., 2007; Previtiera et al., 2010; He e Bellamkonda, 2005). *In vivo*, as células permanecem aderidas à proteínas e carboidratos presentes na matriz extracelular. Essas estruturas servem de suporte às células e tecidos e servem para regular a comunicação intercelular. Entretanto, quando as células são isoladas dos tecidos e removidas da matriz natural e cultivadas sem um suporte adequado de micronutrientes e um substrato apropriado, elas rapidamente perdem a capacidade de aderência (Zhang et al., 2009). Isto corrobora com este estudo, pois as células plaqueadas sem substrato (grupo controle) mostraram-se pouco aderentes, enquanto as tratadas com poli-L-lisina apresentaram-se com alta aderência às placas de cultura. Apesar da matrigel, que é formada principalmente por laminina e colágeno, e a fibronectina serem reportadas como um bom substrato de aderência para neurônios (Biederer e Scheiffele, 2007; Gilad et al., 1990; Li et al., 2005, Lolait et al., 1983; Mellough et al., in press), no presente estudo, a aderência celular com poli-L-lisina mostrou melhores resultados. Hinsch e Zupanc (2006) encontraram resultados similares após ensaios com células de cérebros de peixes adultos *A. leptorhynchus*. Brewer e Torricelli (2007) também relataram que este substrato melhora a aderência para cultivo primário de neurônios. A susceptibilidade das células em migrar e aderir é determinada pelo seu tipo celular e pela composição da matriz de adesão.

O uso de nutrientes suplementares em meio de cultura tal como o B27 que contém ácidos graxos essenciais, antioxidantes, vitaminas e hormônios aumenta a viabilidade celular (Brewer et al., 1993; Xie et al., 2000). Neste trabalho, o meio de cultura foi suplementado com B27, considerado como um precursor de

desenvolvimento para vários tipos de células cerebrais, incluindo os neurônios (Hinsch e Zupanc, 2006; Xie et al., 2000; Yokose et al., 2011). Além disso, o uso de glutamina e fatores de crescimento, como o fibroblasto, melhora o desenvolvimento e diferenciação de diversos tipos celulares derivados do cérebro (Brewer e Torricelli, 2007; Yokose et al., 2011). Neste presente estudo, o bFGF foi usado para induzir o crescimento neuronal como reportado por Brewer e Torricelli (2007), Kelly et al. (2005), Lin et al. (1997), Perkins e Cain (1995), Sheridan e Adler (2006), Tseng et al. (2006), Tuttle et al. (1994) e Yokose et al. (2011). As células tratadas com bFGF mostraram melhor desenvolvimento com diferenciação a partir de 24 h, sobrevivência de aproximadamente 30 dias e alta adesão celular. Isto sugere que durante o processo de dissociação celular de neurônios maduros provenientes de animais adultos, as células sofrem injúrias tais como fragmentação de axônios e dendritos, levando a deficiência para aderência e crescimento. Resultados semelhantes foram obtidos por Hinsch e Zupanc (2006) em células tratadas com fibroblasto. Em neurônios de ratos adultos, bFGF aumentou a viabilidade entre 40-80% nas células cultivadas por mais de três semanas (Brewer, 1997). Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que os neurônios podem regenerar os axônios e dendritos se o meio de cultura estiver provido com nutrientes adequados como o bFGF, os suplementos encontrados no B27 e outros nutrientes para desenvolvimento celular.

Em síntese, o uso de uma enzima apropriada para a dissociação do tecido (papaína), em associação com um meio adequado para desenvolvimento neuronal acrescido de bFGF, suplementado com B27 e outros nutrientes e um correto substrato de aderência para este tipo celular (poli-L-lisina) pode suportar o crescimento de células neuronais provenientes de animais adultos de *H. malabaricus*. O protocolo descrito neste estudo é uma nova ferramenta para aplicação em pesquisas de ecotoxicologia aquática sobre compostos que afetam o sistema nervoso, tais como as saxitoxinas, anatoxinas e alguns metais. Além disso, pode ser utilizado ainda para avaliar o mecanismo de ação de diversos tipos de poluentes diretamente nas células alvo dos peixes, e que podem provocar neuropatologias na espécie.

4. CAPÍTULO III

Exposição de células de cultivo primário de neurônios de *Hoplias malabaricus* às Saxitoxinas

4.1 Introdução

Florações de cianobactérias têm se tornado um grave problema ambiental por alterar a qualidade da água e colocar em risco o equilíbrio ecológico devido à produção de determinadas cepas produtoras de toxinas, como as saxitoxinas (STXs) (Dolah, 2000; Graham e Wilcox, 2000; Ibbelings e Chorus, 2007; Sephton et al., 1997).

As STXs, também conhecidas como veneno paralisante de mariscos (PSPs), são toxinas hidrossolúveis que atuam bloqueando os canais de Na⁺ dos neurônios, podendo levar em alguns casos à morte por parada respiratória (Hille, 1975; Llewellyn, 2006; White, 1984). Muitos análogos de STX já foram identificados e são produzidos por diversas espécies de cianobactérias como as *Cylindrospermopsis raciborskii*, que é relatada como uma cepa de alta tolerância fisiológica, com crescimento em temperatura entre 20°C e 35°C, com predominância em zonas tropicais e subtropicais, inclusive em ecossistemas de água doce (Hamilton et al., 2005; Padisák, 1997).

No sul do Brasil, por exemplo, tem sido evidenciadas florações da cepa de *C. raciborskii* em reservatórios de abastecimento público o que pode colocar em risco à saúde pública e animal (Clemente et al., 2010). Na tentativa de prevenir danos à população, foi estabelecido o limite máximo aceitável de 3 µg/L de equivalentes de saxitoxinas (STXeq) para água potável (BRASIL, 2004). Alguns estudos *in vivo* já foram realizados relatando a possível bioacumulação desta toxina em peixes (Clemente et al., 2010; Jang and Yotsu- Yamashita; Sephton et al., 2007; Silva et al., 2011), porém, trabalhos utilizando neurônios para verificar o efeito neurotóxico desta toxina em peixes não tem sido relatados. Ensaio *in vitro* têm sido amplamente utilizados para avaliar os efeitos tóxicos de diversos tipos de substâncias em cultivo celular dos mais variados tecidos como fígado, rim, cérebro, entre outros (Belyaeva et al., 2011; Devlin et al., 2005; El-Demerdash, 2011; Fujimoto et al., 2003; Hornberg et al., 1996; Rivedal e Sanner, 1985; Sachana et al., 2011; Seemayer e Hornberg, 1998; Shukla et al., 1983). Avaliações ecotoxicológicas de poluentes ambientais utilizando cultivo primário de peixes têm sido reportadas (Filipak Neto et al., 2007; Jayesh et al., 2011; Navas e

Segner, 2006; Pesonen e Adersson, 1997; Traven et al., 2008), embora o uso de células neuronais provenientes de animais adultos ainda seja raro.

A avaliação de citotoxicidade devido à ação de poluentes utilizando o ensaio de redução do sal de tetrazólio (MTT) tem substituído técnicas convencionais que utilizam substâncias radioativas para mensurar a proliferação e viabilidade celular, uma vez que o MTT é de fácil aplicação na maioria dos protocolos de cultivo de células primárias ou de linhagem celular específica, como células tumorais (Beech et al., 2007; Buttke et al., 1993; Denizot e Lang, 1986; Holst e Oredsson, 2005; Husoy et al., 1993; Hussain et al., 1993; Sidiropoulou et al., 2011).

Biomarcadores de contaminação ambiental, que podem ser entendidos como respostas mensuráveis dos diversos níveis de organização biológica (Walker et al., 1996), tem se tornado uma ferramenta importante para avaliar os efeitos de exposição de poluentes tais como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), metais pesados, organofosforados e STXs em organismos aquáticos (Clemente et al., 2010; Regoli et al., 2005; Roy et al., 2011; Oliveira Ribeiro et al., 2006; Silva et al., 2009; Silva et al., 2011; Sturm et al., 1999).

A espécie de peixe dulcícola *Hoplias malabaricus* tem sido utilizada como um modelo biológico para estudos ecotoxicológicos, pois ocupa um alto nível na cadeia trófica e é amplamente distribuída em rios e reservatórios brasileiros (Cestari et al., 2004; Costa et al., 2007; Dorea et al., 2006; Ferraro et al., 2004; Hensley e Moody, 1975; Mela et al., 2007; Rabitto et al., 2005; Rivaroli et al., 2006; Silva et al., 2011).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos tóxicos das STXs nas células neuronais obtidas a partir do cultivo primário de *H. malabaricus* através de ensaio de citotoxicidade e do uso de biomarcadores de estresse oxidativo e genotoxicidade. Este é o primeiro relato sobre a exposição de células neuronais de *H. malabaricus* às STXs.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Obtenção das Saxitoxinas

Para a obtenção das saxitoxinas foi utilizada a cepa tóxica de *C. raciborskii* (T3) à qual foi cultivada em meio ASM-1 (Gorhan et al., 1964), pH 8.0, temperatura de 23 °C ± 2, intensidade luminosa de 56 $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 h/12 h. Para quantificar as PSPs, as cepas T3 foram congeladas e extraídas com ácido acético 0,5 N (Oshima, 1995). Os extratos foram agitados por 1 h, centrifugados a 40000 x g por 30 min e o sobrenadante foi filtrado usando filtro de celulose de 0,45 mm (Sartorius). O extrato foi

analisado através de cromatografia líquida de alta performance com derivatização de pós-coluna de fluorescência (HPLC-FLD) (Shimadzu), usando uma coluna analítica de fase-reversa LiChrospher 100 RP-18 125 mm x 4 mm x 5 µm (MERCK) (Oshima, 1995). As concentrações de cada análogo encontradas nos extratos foram convertidas em equivalentes de STX comparando a toxicidade de cada variante com a toxicidade da STX (Hall et al., 1990).

4.2.2 Desenho Experimental

O cultivo primário das células neuronais foi realizado através de *pool* de cérebros de três exemplares de *H. malabaricus* conforme procedimento descrito no capítulo 3. Após a contagem das células viáveis utilizando azul de tripan em câmara de Neubauer (Hu e Fakahany, 1994), foi plaqueado $2,0 \times 10^5$ células por poço em placa de 96 poços (Corning) previamente tratados com substrato poli-L-lisina (10 µg/mL, Sigma) por 24h em estufa a 24°C 1,7 % CO₂, exceto para o teste de imunocitoquímica (ver seção 4.2.3). O volume final foi ajustado para 100 µL com meio modificado de Dulbecco com fatores de crescimento (DMEM/F12-exp) e incubado por 24 h a 24°C e 1,7 % CO₂ em estufa com atmosfera umidificada. Este procedimento foi repetido em cinco experimentos independentes.

4.2.2.1 Exposição das células às Saxitoxinas

Após o período de incubação inicial, os poços contendo as células foram lavados com solução fosfato salina (PBS) e adicionado 100 µL de meio DMEM/F12-exp contendo três diferentes concentrações previamente inoculadas com o extrato de *C. raciborskii* contendo PSPs constituído de 97% STX, 3% de neosaxitoxina (NeoSTX) e goniautoxina (GTX2): Grupo A – 0,3 µg/L; Grupo B – 3 µg/L, essa concentração teve como base a recomendação do limite máximo aceitável de STX_{eq} em água para consumo humano (BRASIL, 2004); Grupo Controle, o qual não recebeu STX_{eq}, e incubado por mais 24 h a 24°C e 1,7 % CO₂ em estufa com atmosfera umidificada. As células expostas foram utilizadas para os ensaios de biomarcadores bioquímicos e para os testes de citotoxicidade por MTT e de genotoxicidade pelo ensaio cometa.

4.2.3 Imunocitoquímica

A identificação de neurônios foi realizada através de reação imunocitoquímica. Após realizada a dissociação celular conforme descrito na seção 4.2.2, foram

plaqueadas 3×10^5 células sobre lamínulas de vidro estéreis, previamente dispostas em placas de cultura de 24 poços (TPP) tratadas previamente com o substrato poli-L-lisina ($10\mu\text{g/mL}$, Sigma) por 24h em estufa a 24°C 1,7 % CO_2 em atmosfera umidificada. Foram utilizados três poços por experimento, sendo preenchidos com $300\ \mu\text{L}$ de DMEM/F12exp e a placa incubada por 24 h a 24°C e 1,7% de CO_2 em atmosfera umidificada. Depois deste período, a placa contendo as células aderidas e o meio de cultura foi submetida ao processo de fixação em duas fases: primeiro em vapor de formol por 15 minutos, para fazer a pré-fixação das células e, logo após, imersas em Paraformaldeído (PFA) a 4% (p/v) também por 15 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas três vezes com PBS, imunobloqueados por 1h com uma solução contendo 5% de soro de cabra (NGS; Gibco), 1% de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma), diluídos em PBS, e incubadas pernoite com o anticorpo primário monoclonal classe III β -tubulina (Sigma) diluído (1:200) em PBS, contendo 0,03-0,05% de Triton-X 100 (Reagen, EUA) e 5% de NGS à temperatura de 4°C . Ao término deste período, as células foram lavadas com PBS, três vezes de 5 minutos e incubadas com o anticorpo secundário Texas Red (Molecular Probes) diluído (1:800) em PBS contendo 5% de NGS por 2h em temperatura ambiente.

Em seguida as células foram lavadas com PBS, três vezes de 5 minutos, e incubadas com solução de DAPI (4,6-Diamidino-2-phenilindol; Sigma) a 0,01% em PBS, por 5 minutos para visualização de núcleos celulares. Seguindo o processo, as lamínulas foram retiradas da placa de cultura com auxílio de lâmina de bisturi e pinça, e montadas em lâmina de vidro previamente tratadas com gelatina (Reagen) a 2%, utilizando-se uma solução de N-Propil-galato (Sigma), diluído em tampão fosfato 0,1 M e glicerol, para manter a fluorescência. As lâminas foram analisadas utilizando-se microscópio invertido fluorescente Nikon Eclipse TE 2000 provido de contraste de fase, diferencial interferencial e fluorescência com filtros nos comprimentos de onda de fluoresceína, DAPI e rodamina (Laboratório de Neuroanatomia Celular, UFRJ). As imagens foram obtidas com utilização de câmera fotográfica digital *CoolSNAP-Pro Monochrome Media Cybernetics* acoplada ao microscópio. Foram obtidas imagens de quatro campos aleatórios (com objetiva de 40X, aumento de 800X) que não se sobreponham, tomados próximo ao centro da lamínula. Foram observados quatro campos por lamínula. As imagens foram submetidas para contagem das células utilizando-se o programa Image J, comparando-se as células classe III β -tubulina positivas ao núcleo marcado com DAPI. Poços controle foram preparados utilizando-se

dos mesmos procedimentos descritos sem, no entanto, receber o anticorpo primário. Foram realizados três experimentos independentes.

4.2.4 Citotoxicidade

O método utilizado para avaliar a toxicidade celular provocada pelas STXs baseou-se na transformação de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) brometo de -2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) em cristais azuis de formazan pelas desidrogenases mitocondriais. A acumulação de formazan pelo ensaio do MTT reflete diretamente a atividade mitocondrial e indiretamente o número de células expressas como densidade óptica (OD) a 570 nm de acordo com o método descrito por Sarmento et al. (2004). Em cada experimento foram incluídos três poços com DMEM/F12exp sem células. A absorbância do grupo controle foi considerado como 100% de viabilidade.

4.2.5 Biomarcadores

Após a exposição às STXs, foi removido o meio de cultura dos poços contendo as células e realizado lavagem com PBS por duas vezes, e a placa foi congelada a -80°C para ocorrer a lise celular. As células foram homogeneizadas em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) e centrifugado a 3400 x g por 30 min a 4°C, utilizando rotor de placa.

O sobrenadante foi utilizado para estimar as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e da caspase efetora 3, e a concentração de hidroperóxidos (LPO).

A atividade da SOD foi medida através da habilidade das amostras em inibir a redução de nitroblue tetrazolium (NBT), determinada conforme método descrito por Crouch et al. (1981), enquanto a atividade específica da GPx foi avaliada a 340 nm (Sies et al., 1979).

A análise de LPO foi realizada utilizando o ensaio de oxidação de xilenol Orange a 570 nm, conforme Jiang et al. (1992).

A avaliação da via apoptótica foi realizada utilizando a atividade da caspase efetora 3 (Chemicon, cat. APT131) empregando como substrato o acetil-Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroanelina (Ac-DEVD-pNA) e medida a 405 nm.

A concentração de proteína foi determinada usando o método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

Para cada biomarcador bioquímico foram analisados 4 poços/grupo por experimento.

4.2.6 Ensaio Cometa

A genotoxicidade da STXs sobre as células expostas foi avaliada pelo método descrito por Singh et al. (1996) (ensaio cometa), modificado por Ferraro et al. (2004). Após 24 h de exposição das células às STXs, o meio de cultura foi descartado e adicionado 100 µL de PBS-EDTA a 2 mM para a remoção das células aderidas; em seguida, 10^4 células foram homogeneizadas com 100 µL de soro fetal bovino; 100 µL do homogenato foi diluído em 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMA) e dispensado em lâminas previamente cobertas com agarose. As lâminas foram colocadas em solução estoque de lise celular: NaCl (2.5 M), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA; 100 mM), tris(hidroximetil) aminometano (Tris; 10 mM), NaOH (0.8%), e N-lauroil sarcocinato (1%); solução de trabalho de lise: Triton X-100 (1%), dimetil sulfoxido (DMSO) (10% em solução de lise estoque) por 24 h a 4 °C. As lâminas foram imersas em uma solução de NaOH (10 N) e EDTA (200 mM), pH > 13, por 20 min para causar relaxamento do DNA e submetidas a eletroforese a 300 mA/25 V por 25 min. Depois da neutralização em 0,4 M Tris, pH 7,5 e fixação em etanol por 10 min, as lâminas foram coradas com 0,02 g/ml de brometo de etídio e as quebras de DNA foram avaliadas utilizando microscópio de epifluorescência Leica DMLS2 com magnificação de 400X. Para cada lâmina, 100 células foram visualmente analisadas de acordo com o método de Collins et al. (1997) e registradas em uma das cinco classes de danos: célula sem dano (0) até célula com dano severo (4) pré-definidos com referência à intensidade da cauda observada.

4.2.7 Análise Estatística

Os parâmetros biológicos foram analisados utilizando o teste de ANOVA seguido de Tukey post hoc teste. Kruskal-Wallis seguido do teste post hoc de Dunn foi utilizado para avaliar os resultados do ensaio cometa, enquanto o teste de Mann-Whitney foi aplicado para comparar as células marcadas com DAPI e classe III β-tubulina. A regra de decisão α foi de 0,05 para todos os testes aplicados.

4.3 Resultados

As células submetidas aos anticorpos no ensaio de imunocitoquímica apresentaram o núcleo marcado (Fig. 4.3.1A), enquanto as células do grupo controle que não receberam o anticorpo primário não apresentaram nenhuma marcação quando avaliadas em microscópio fluorescente (Fig. 4.3.1B), sugerindo que os anticorpos utilizados são adequados para o tipo celular avaliado. Dos núcleos celulares marcados com DAPI (Fig. 4.3.1C), a maioria das células ($p > 0,05$), aproximadamente 87%, foi contabilizada como neurônios (Fig. 4.3.1D).

A aplicação dos anticorpos primário e secundário nas células evidenciou a marcação dos neurônios (Fig. 4.1E, F) sugerindo que o protocolo utilizado para isolamento e cultivo primário de neurônios de *H. malabaricus* é adequado para exposição celular.

As STXs mostraram-se tóxicas para as células neuronais expostas com diminuição de 15% da viabilidade celular para o Grupo B (3 $\mu\text{g/L}$) ($p < 0,05$, Fig. 4.3.2A).

A atividade específica da SOD não mostrou diferença significativa entre os grupos testados ($p > 0,05$), no entanto, a atividade específica da GPx aumentou nos grupos expostos às STXs ($p < 0,001$; Fig. 4.3.2B), enquanto a concentração de hidroperóxidos (LPO) aumentou no grupo exposto com maior concentração de STXs (Grupo B), sugerindo estresse oxidativo às células expostas ($p < 0,05$; Fig. 4.3.2C). Entretanto, não foi evidenciado aumento da atividade específica da capase 3 ($p > 0,05$) em nenhum dos grupos testados.

No grupo B também foi observado aumento nos danos do DNA, evidenciado pelo escore do ensaio cometa ($p < 0,05$; Fig. 4.3.2D), sugerindo a genotoxicidade das STXs inoculadas sobre os neurônios isolados de *H. malabaricus*.

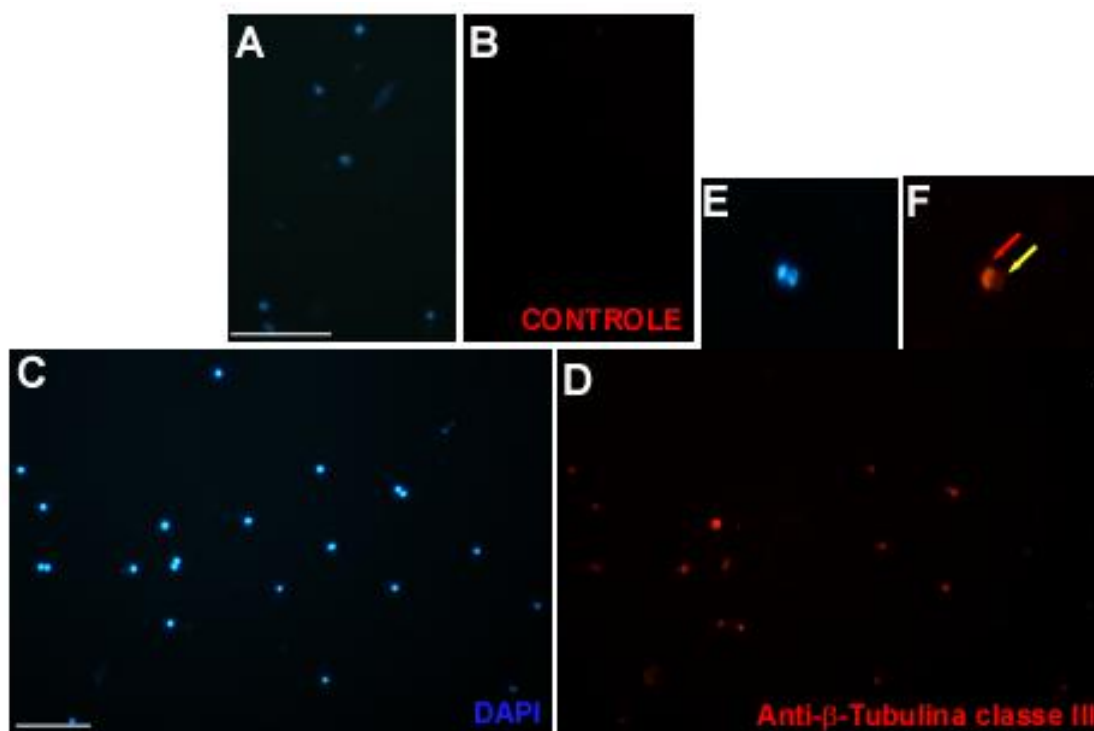


Figura 4.3.1 – Ensaio imunocitoquímico das células dissociadas do cérebro de *H. malabaricus*. A: Células marcadas com uso de anticorpos primário e secundário. B: Células controle, sem anticorpo primário. C: Células com núcleo marcado com DAPI. D: Células com neurofilamentos marcados com anticorpo primário monoclonal Classe III β tubulina. E: Detalhe de duas células com núcleo marcado com DAPI. F: Marcação somente do neurofilamento das duas células marcadas com DAPI; seta amarela indica a que a célula embora tenha tido o núcleo marcado com DAPI não teve neurofilamento distinguido com o anticorpo primário, indicando não ser uma célula neuronal. Escala: 50 μ m.

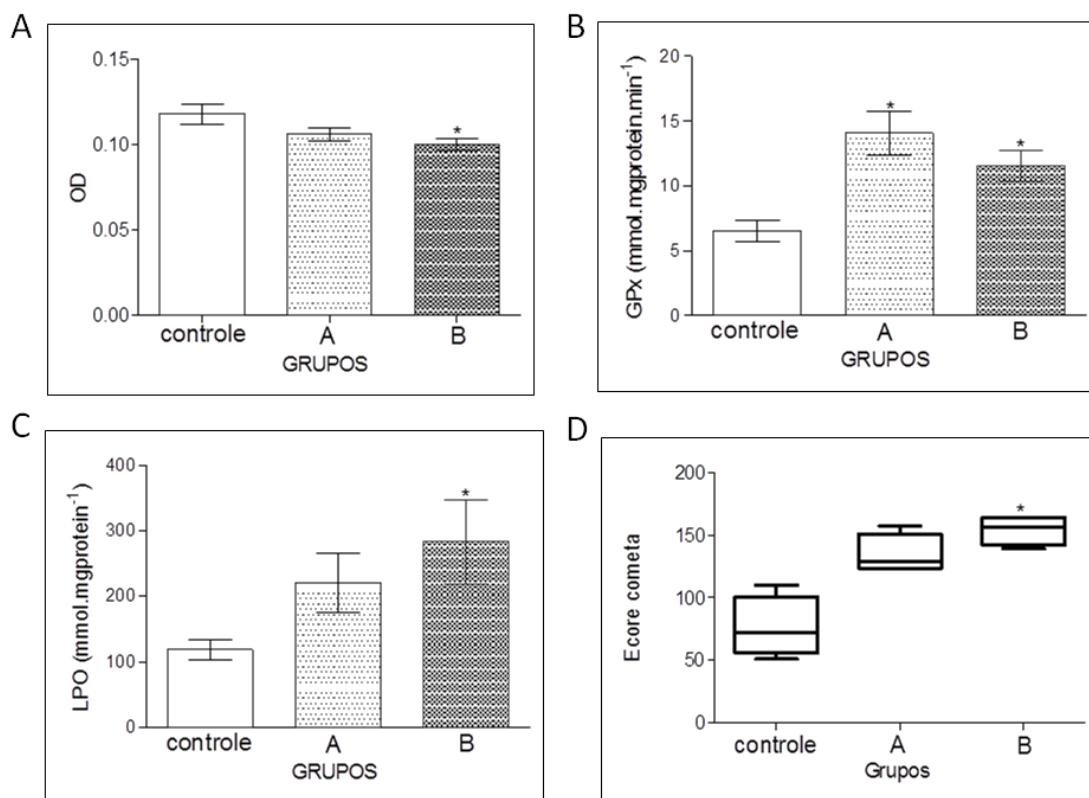


Figura 4.3.2 – Avaliação da citotoxicidade, dos biomarcadores bioquímicos e da genotoxicidade nas células de *H. malabaricus* expostas às STXs. A: Viabilidade celular pelo ensaio MTT (* $p < 0,05$; OD: densidade óptica). B: Atividade específica da Glutationa Peroxidase (GPx; * $p < 0,001$). C: Concentração de hidroperóxidos (LPO; * $p < 0,05$). Resultados expressos como média \pm erro padrão, os valores de * p foram obtidos pelo teste de ANOVA. D: Danos no DNA (ensaio cometa), os resultados foram expressos como mediana/quartil 1 (25%) e 3 (75%); * $p < 0,05$ obtido pelo teste de Kruskal-Wallis. Grupos A = 0,3 $\mu\text{g/L}$; B = 3 $\mu\text{g/L}$.

4.4 Discussão

Ensaio de imunocitoquímica têm se tornado uma ferramenta importante na identificação de tipos celulares para aplicação em estudos toxicológicos, uma vez que determinadas células quando observadas sob microscopia são semelhantes em forma e estrutura (Audebert et al., 2010; Erkekoglu et al., 2011; Fukui et al., 1996; Gazori et al., 2010). Diversos anticorpos têm sido utilizados como marcador de células neuronais em peixes, tais como a Proteína Neuronal Específica Hu (Hinsch e Zupanc, 2006) e o Receptor androgênico PG21 (Moga et al., 2000; Pouso et al., 2010). Apesar disso, neste trabalho, o uso do anticorpo primário monoclonal Classe III β tubulina para marcar os neurofilamentos das células dissociadas do cérebro de *H. malabaricus* mostrou-se eficiente, sugerindo sua aplicação como marcador de neurônio para células do tecido cerebral de peixes.

As saxitoxinas presentes no extrato obtido pela lise da cepa de *C. raciborskii* mostraram-se tóxicas às células expostas de neurônios de *H. malabaricus*. Outras substâncias, tais como extratos herbários (Shoemaker et al., 2004), formaldeído (Eiskjaer e Arenholt-Bindslev, 1994; Grafstrom, 1990), cilindropermopsina (Liebel et al., 2011), pesticidas (Triglia et al., 1991) e metais pesados (Cabell et al., 2003; Fotakis e Timbrell, 2006), têm sido relatadas como citotóxicas. Neste estudo, o teste de MTT mostrou-se eficiente para avaliar a citotoxicidade das STXs inoculadas.

MTT tem sido empregado para avaliar os efeitos de diversas substâncias no crescimento de cultura celular (Abe e Matsuki, 2000; Kawakami et al., 2011; Kerokoski et al., 2001; Takahashi et al., 2002; Verma et al., 2010). Sandt et al. (1993), por exemplo, avaliaram a ação de 11 tipos de substâncias sobre o desenvolvimento celular utilizando os testes de vermelho neutro e MTT, e somente o teste de MTT foi capaz de mostrar a citotoxicidade já nas culturas iniciais e em baixas concentrações. Resultado similar foi obtido por Fotakis e Timbrell (2006) que avaliaram diversos ensaios de citotoxicidade em células expostas à cloreto de Cádmio, sugerindo que o ensaio de MTT é recomendável para avaliar efeitos deletérios de substâncias em exposições de curto espaço de tempo e em pequenas concentrações, como foi o caso deste presente estudo.

Embora a SOD seja relatada como uma importante via de defesa antioxidante uma vez que atua na dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) evitando a geração do radical hidroxil ($OH^{\cdot-}$) (Halliwell e Gutteridge, 2000; Hayes et al., 1997) e, por conseguinte, danos celulares devido ao estresse oxidativo em células expostas à

substâncias tóxicas (Cabell et al., 2004; Jin et al., 2011; Marabini et al., 2011; Miller e Hontela, 2011), neste trabalho não houve aumento da atividade específica para nenhum dos grupos testados. Isto pode ter ocorrido devido a baixa concentração das STXs inoculadas e ao curto tempo de exposição. A sensibilidade de um biomarcador bioquímico está relacionada a diversos fatores como a via e o tempo de exposição, a espécie, o órgão alvo, o grau de toxicidade da substância, entre outros (Van der Oost et al. 2003).

A GPx é uma importante enzima que atua na redução de substâncias eletrofílicas evitando a produção de peróxidos e protegendo as células aos danos que podem ser causados devido a ação de xenobióticos, especialmente, no processo de detoxificação celular (Hermes-Lima, 2004; Lauterburg et al., 1983). Neste presente estudo, a atividade específica da GPx encontrada nos grupos expostos às STXs aumentou sugerindo a presença de radicais livres. Entretanto, em experimento de exposição trófica em *H. malabaricus* com extrato de *C. raciborskii* contendo STXs por 20 dias, realizado por Silva et al. (2011), foi encontrado diminuição da atividade específica da GPx, sugerindo que esse biomarcador bioquímico pode alterar sua resposta de acordo com a via e o tipo de exposição.

O aumento da concentração de hidroperóxidos sugere estresse oxidativo provocado pelas STXs às células neuronais de *H. malabaricus* indicando que o sistema antioxidante não foi suficiente para evitar a lipoperoxidação. O estresse oxidativo tem sido relacionado à exposição a poluentes ambientais (Johnstone et al., 2006; Lushchak, 2011; Valavanidis et al., 2006). Estudo realizado por Silva et al. (2011) em exposição *in vivo* da espécie *H. malabaricus* às STXs, sugeriu que as STXs pode comprometer o sistema antioxidante das células cerebrais.

Além disso, o fato de haver uma diminuição na viabilidade celular para o grupo de maior concentração de STXs e a ausência de evidências para a morte celular programada, sugere que nesta dose as células estejam morrendo por necrose, o que é corroborado pelos danos observados na membrana (LPO). Isto pode estar associado a uma falha do sistema antioxidante permitindo que radicais livres oxidem componentes celulares como os lipídios, o que pode provocar a perda da permeabilidade da membrana celular com alteração no fluxo de íons transmembrana, influxo excessivo de cálcio e posterior ativação de enzimas como as proteases, fosfolipases e nucleases que, autoliticamente produzem colapso das estruturas celulares e oxidação de proteínas, e

pode também desencadear processo apoptótico (Halliwell e Gutteridge, 2000; Hayes et al., 1997; Hermes-Lima, 2004; Meagher e Fitzgerald, 2000).

Embora neste trabalho tenha sido evidenciado citotoxicidade às células expostas às STXs e estresse oxidativo, e que esse seja reportado como indutor de apoptose (Bortner e Cidowski, 2007; Butterfield et al., 1994; Grivicich et al., 2007; Jablonski et al., 2007; Xuan et al. 2009), contudo, não foi observado aumento da atividade da caspase 3 testada. É possível que outras vias de ativação de caspases efetoras como as caspases 6 ou 7 estejam atuando, ou caspases indutoras de cascatas como a caspase 9 podem estar ainda iniciando o processo apoptótico (Cohen, 1997). Sugere-se a realização de novos estudos *in vitro* para esclarecer a via apoptótica envolvida em que as STXs possam induzir às células neuronais expostas, ou ainda, constatar a morte celular por necrose.

As STXs inoculadas nas células neuronais de *H. malabaricus* provocaram danos ao DNA. Diversos autores têm associado a genotoxicidade ao estresse oxidativo (Barzilai e Yamamoto, 2004; Chen et al., 2005; Jin et al., 2011; Kryston et al., 2011; Lin et al., 2007; Mai et al., 2010) como a evidenciada neste estudo. Muitas substâncias podem causar genotoxicidade em células de peixes tais como os befenilpoliclorados, pesticidas, metais pesados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Jin et al., 2011; Jung et al., 2009; Marabini et al., 2011; Monteiro et al., 2011). Cianotoxinas também são relatadas como capazes de provocar quebras de DNA (Zegura et al., 2008), dentre elas destaca-se a nodularina que foi reportada por Wojcik et al. (2006) como genotóxica às células expostas. Estudos *in vivo* e *in vitro* com microcistina mostraram a capacidade desta cianotoxina em provocar lipoperoxidação e adutos de DNA (Brzuzan et al., 2009; Karim et al., 2011; Malécot et al., 2009). Em estudo *in vivo*, exposição às STXs provocou estresse oxidativo e danos ao DNA no tecido cerebral de *H. malabaricus* (Silva et al., 2011), corroborando com os resultados obtidos.

Em síntese, este estudo sugere que apesar dos efeitos das STXs serem reportados como reversíveis (Hille, 1992; Llewellyn, 2006), a concentração e o tempo de exposição à célula pode provocar citotoxicidade, estresse oxidativo e genotoxicidade levando a injúrias celulares, o que pode ocasionar morte celular.

Os resultados sugerem ainda um efeito concentração e resposta de acordo com a exposição às STX. Este é um resultado importante, pois este tipo de experimento como avaliado neste trabalho pode se tornar uma ferramenta no gerenciamento de limites

toleráveis às STXs, embora a extrapolação de ensaios *in vitro* para tolerância *in vivo* ainda não esteja estabelecida.

4.5 Conclusão

O protocolo de isolamento e cultivo primário das células neuronais mostrou-se eficiente com alta viabilidade de neurônios aptos à exposição às substâncias neurotóxicas, enquanto os biomarcadores de contaminação ambiental, amplamente utilizada em ensaios *in vivo*, apresentaram-se aplicáveis na avaliação dos efeitos adversos devido a ação das STXs em estudo *in vitro*. Os ensaios de MTT e cometa demonstraram ação citotóxica e genotóxica, respectivamente, sugerindo que o bloqueio dos canais de Na⁺ provocado pelas STXs pode causar severos danos celulares.

Agradecimentos

Ao Instituto Carlos Chagas da Universidade Federal do Rio de Janeiro pela obtenção e caracterização química do extrato de *C. raciborskii*.

5. CONCLUSÃO GERAL

- A espécie de peixe *H. malabaricus* confirmou ser um bom modelo biológico para estudos ecotoxicológicos.
- Através do bioensaio realizado com exposição trófica às STXs foi possível verificar a ação dessas toxinas no tecido cerebral, sugerindo a indução de estresse oxidativo evidenciado pelo aumento da atividade específica da SOD. Alterações do sistema antioxidante do tecido cerebral de *H. malabaricus* provocado pela exposição às STXs pode ter levado a lipoperoxidação, a carbonilação de proteínas e aos danos do DNA.
- O protocolo de cultivo primário de neurônios de *H. malabaricus* possibilitou a obtenção de células altamente viáveis, trazendo, portanto, novas perspectivas na avaliação de poluentes ambientais diretamente nas células alvo dos organismos que estão sujeitas a ação de diversas substâncias neurotóxicas, possibilitando a criação de um novo campo de pesquisa: a neurociência ambiental.
- A exposição das células neuronais ao extrato de STXs mostrou que essas substâncias são capazes de induzir danos celulares, tais como a citotoxicidade, a lipoperoxidação e genotoxicidade. Contudo, não foi possível verificar o tipo de morte celular associado.
- Esse trabalho mostrou que embora as STXs tenham sua ação considerada reversível, os danos provocados devido à exposição levam a injúrias celulares, o que pode comprometer a saúde animal e resultar em alterações ecológicas nos ecossistemas aquáticos que venham a conter essas substâncias avaliadas.

6. REFERÊNCIAS

- Abe, K., Matsuki, N., 2000. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neurosci. Res.* 38 ,325-329.
- Adams, H.R., 1992. Drogas que atuam sobre os sistemas nervosos somático e autonômico. In: *Farmacologia e Terapêutica em Veterinária*. Booth, N.H., McDonald, L.E. (Eds). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Ahlemeyer, B. Fischer, D. Kissel, T., Krieglstein, J., 2000. Staurosporine-induced apoptosis in cultured chick embryonic neurons is reduced by polyethylenimine of low molecular weight used as a coating substrate. *Neurosci. Res.* 37, 245-253.
- Akaishi, F.M., Silva de Assis, H.C., Jakobi, S.C.G., Eiras-Stofella, D.R., St-Jean, S.D., Courtenay, S.C., Lima, E.F., Wagener, A.L.R., Scofield, A.L., Oliveira Ribeiro, C.A., 2004. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax sp.*) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (wsf) of crude oil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 244–253.
- Araque, A., 2009. Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biol.* 4, 3-10.
- Armstrong, C.M., Hille, B., 1998. Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron.* 20, 371-380.
- Ashkenazi, A. 2002. Targeting death and decoy receptors of the tumor –necrosis factor superfamily. *Nat. Rev. Cancer.* 2, 420-30.
- Ashraf, G.M., Regnier, F.E., 2010. Proteomic Identification of Carbonylated Proteins and Their Oxidation Sites. *J. Prot. Res.* 9, 3766–3780.
- Audebert, M.A., Jacques, C., Hillenweck, A., Jamin, E.L., Zalko, D., Cravedi J.P., 2010. Use of the γ H2AX assay for assessing the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell lines. *Toxicol. Lett.* 199, 182-192.

Avci, A., Kamaz, M., Duraka, I., 2005. Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 01-105.

Azevedo, S.M.F.O., 2003. Manual de curso, ecotoxicologia de cianobacterias e qualidade de água. 63p.

Azevedo, S.M.F.O., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Namikoshi, M., 1994. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the *cyanobacterium Microcystis aeruginosa*. *J. Applied Phycol.* 6, 261-265.

Bakke, M., Horsberg, T.E., 2007. Effects of algal-produced neurotoxins on metabolic activity in telencephalon, optic tectum and cerebellum of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicol.* 85, 96-103.

Bartlett, W.P., Banker, G.A., 1984. An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. I. Cells which develop without intercellular contacts. *J. Neurosci.* 4, 1944–1953.

Barzilai, A., Yamamoto, K., 2004. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Rep.* 3, 1109-1115.

Beech, J. S., Wheeler, D.W., Reckless, J., Grant, A.J., Price, J., Mastroeni, P., Menon, D.K., 2007. The MHP36 line of murine neural stem cells expresses functional CXCR1 chemokine receptors that initiate chemotaxis in vitro. *J. Neuroimmunol.* 184, 198-208.

Belyaeva, E.A., Korotkov, S.M., Saris, N., 2011. In vitro modulation of heavy metal-induced rat liver mitochondria dysfunction: A comparison of copper and mercury with cadmium. *J. Trac. Element. Med. Biol.* 25, 63-73.

Beyers, D.W., Sikoski, P.J., 1994. Acetylcholinesterase inhibition in federally endangered Colorado squawfish exposed to cararyl and malathion. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 935–939.

Biederer, T., Scheiffele, P.A., 2007. Mixed-culture assays for analyzing neuronal synapse formation. *Nature Prot.* 2, 670-677.

- Bloch, M.E., 1794. Naturgeschichte der ausländischen Fische. Berlin, 8, 74 p.
- Boaru, D.A., Dragos, N., Schirmer, K., 2006. Microcystin-LR induced cellular effects in mammalian and fish primary hepatocyte cultures and cell lines: A comparative study. *Toxicology*. 218, 134-148.
- Bold, H.D; Wynne, M.J., 1985. Introduction to the algae, structure and reproduction. 2 ed. New Jersey: Prentice Hall, 720p.
- Bortner, C.D., Cidlowski, J.A., 2007. Cell shrinkage and monovalent cation fluxes: role in apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 462, 176–188.
- Bouvy, M., Falcão, D., Marinho, M., Pagano, M., Moura, A. 2000. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanocabertia) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. *Aquat. Microb. Ecol.* 23, 13-27.
- Bouvy, M., Molica, R., Oliveira, S., Marinho, M., Becher, B., 1999. Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil. *Aquat. Microb. Ecol.* 20, 285-297.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2004. Portaria nº518, de 25 de março de 2004. Diário Oficial da União nº 59, seção I: 166. Brasília, DF.
- Brewer, C.J., Torricelli, J.R., Evege, E.K., Price, P.J., 1993. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res.* 35, 567-576.
- Brewer, G.J., 1997. Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *J. Neurosci Meth.* 71, 143–155.
- Brewer, G.J., Torricelli, J.R., 2007. Isolation and culture of adult neurons and neurospheres. *Nature*. 2, 1490-1498.

- Briand, J.F., Leboulanger, C., Humbert, J.F., Bernard, C., Dufour, P., 2004. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? *J. Phycol.* 40, 231-238.
- Brzuzan, P., Woźny, M., Ciesielski, M.K., Góra, M., Kuźmiński, H., Dobosz, S., 2009. Microcystin-LR induced apoptosis and mRNA expression of p53 and cdkn1a in liver of whitefish (*Coregonus lavaretus* L.). *Toxicon* 54,170-183.
- Bussolaro, D., Filipak Neto, F., Oliveira Ribeiro, C.A. 2010. Responses of hepatocytes to DDT and methyl mercury exposure. *Toxicol. in Vitro.* 24, 1491-1497.
- Buttke, T.M., McCubrey, J.A., Owen, T.C., 1993. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *J. Immunol. Meth.*, 157, 233-240.
- Cabell, L., Ferguson, C. Luginbill, D., Kern, M., Weingart, A., Gerald Audesirk, G., 2004. Differential induction of heme oxygenase and other stress proteins in cultured hippocampal astrocytes and neurons by inorganic lead. *Toxicol. App. Pharmacol.* 198, 49-60.
- Calijuri, M. C., Alves, M.S.A., Santos, A.C.A., 2006. Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais. Ed. Rima, São Carlos, 118p.
- Carmichael, W.W., 1994. The toxins of Cyanobacteria. *Scientific American.* 1, 78-86.
- Carmichael, W.W. Toxic Microcystis and the environment. In: Toxic Microcystis. M.F. (Ed). New York: CRC Press. p.1-11. 1996.
- Carmichael, W.W., Azevedo, S.M.F.O., An, J.S., Molica, R.J.R., Jochimsen, E.M., Lau, S., Rinehart, K.I., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ. Health Perspect.* 7, 109-112.
- Cestari, M.M, Lemos, P.M.M, Oliveira Ribeiro, C.A., Costa, J.R.M.A., Pelletier, E., Ferraro, M.V., Mantovani, M.S., Fenocchio, A.S., 2004. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes,

Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. *Genet. Mol. Biol.* 27, 270-274.

Chen, D.F., Jhaveri, S., Schneider, G.E., 1996. Intrinsic changes in developing retina result in regenerative failure of their axons. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 92, 7287–7291.

Chen, J., Ozanne, S. E., C. Hales, C.N., 2005. Heterogeneity in premature senescence by oxidative stress correlates with differential DNA damage during the cell cycle. *DNA Rep.* 4, 1140-1148.

Chorus, I., Bartram, J., 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water – A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management.* E and FN Spon, London and New York.

Chun-Lei, G., SunJin, S., Jian-Hai, X., 2003. Primary culture and characteristic morphologies medulla terminalis neurons in the eyestalks of Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 290, 71–80.

Clemente, Z., Busato, R., Oliveira Ribeiro, C.A., Cestari, M. M., Ramsdorf, W., Magalhães, V. F., Silva de Assis, H.C., 2010. Analyses of paralytic shellfish toxins and biomarkers in a Southern Brazilian reservoir. *Toxicon* 55, 396-406.

Cohen, G.M., 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326, 1-16.

Collins, A., Dusinská, M., Franklin, M., Somorovská, M., Petrovská, H., Duthie, S., Fillion, L., Panayiotidis, M., Raslová, K., Vaughan, N., 1997. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications. *Environ. Mol. Mutagen.* 30, 139–146.

Costa, J.R.M.A., Mela, M., Silva de Assis, H.C., Pelletier, E., Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Enzymatic inhibition and morphological aspects as biomarker to dietary lead (II) and methylmercury exposure to neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 82-88.

Crouch, R.K., Gandy, S.C., Kimsey, G., 1981. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes* 30, 235–241.

De Giorgio, L.A., Sheu, K.F.R., Blass, J.P., 1994. Culture from human leptomeninges of cells containing neurofilament protein and neuron-specific enolase, *J. Neurol. Sci.* 124, 141–148.

Debeir, T., Benavides, J., Vigé, X., 1997. Involvement of protease-activated receptor-1 in the in vitro development of mesencephalic dopaminergic neurons. *Neurosci.* 82, 739-752.

Denizot, F., Lang, R., 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods.* 89, 271-277.

Devlin, R.B., Frampton, M.L., Ghio, A.J., 2005. In vitro studies: What is their role in toxicology? *Exp. Toxicol. Pathol.* 57, 183-188.

Di Bernardo, L., Mendes, C.G.N., Brandão, C.C.S.; Sens, M.L., Pádua, V.L., 2003. Tratamento de água para abastecimento por filtração direta. *PROSAB 3: ABES, RIMA Editora, Rio de Janeiro, 498p.*

Dixon, D.P., Laphorn, A., 2002. Plant glutathione transferases. *Genome Biol.* 3, 1-10.

Dohgu, S., Nishioku, T., Shuto H., Yamauchi, A., Kataoka, Y., 2011. Autocrine and paracrine up-regulation of blood–brain barrier function by plasminogen activator inhibitor-1. *Mic. Res.* 81, 103-107.

Dolah, F.M.V., 2000. Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. *Environ. Health Perspect.* 108, 133-140.

Dorea, J.G., Barbosa, A.C., Silva, G.S., 2006. Fish mercury bioaccumulation as a function of feeding behavior and hydrological cycles of the Rio Negro, Amazon. *Comparat. Bioch. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* 142, 2006, 275-283.

Gad., S.E., 2005. Saxitoxin. *Encyclopedia of Toxicology (2nd Ed.)*. 769 p.

Eiskjaer, M., Arenholt-Bindslev D., 1994. Cytotoxicity of formaldehyde in cultures of three different human cell types. *J. Dent. Res.* 73, 952-954.

El-Demerdash, F.M., 2011. Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. *Food Chem. Toxicology* 49, 1346-1352.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S.A., 1998. Caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. 39, 43-50.

Erkekoglu, P., Rachidi, W., Yüzügüllü, O.G, Giray, B., Öztürk, M., Favier, A., Hincal, F., 2011. Induction of ROS, p53, p21 in DEHP- and MEHP-exposed LNCaP cells-protection by selenium compounds. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1565-1571.

Falconer, I.R., 1991. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 6,177-184.

Fastner, J., Heinze, R., Humpage, A.R., Mischke, U., Eaglesham, G.K., Chorus, I. 2003. *Cylindrospermopsis* occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. *Toxicon*, 42: 313-21.

Fenech, M., 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mut. Res.* 455, 81-95.

Ferraris, M., Radice, S., Catalani, P., Francolini, M., Marabini, L., Chiesara, E., 2002. Early oxidative damage in primary cultured trout hepatocytes: a time course study. *Aquatic Toxicol.* 59, 283-296.

Ferraro, M.V.M., Fenocchio, A.S., Mantovani, M.S., Oliveira Ribeiro, C.A., Cestari, M.M., 2004. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Gen. Mol. Biol.* 27, 103-107.

Filipak Neto, F., Zanata, S. M., Randi, M.A.F., Pelletier, E., Oliveira Ribeiro, C.A., 2006. Hepatocytes primary culture from neotropical fish species *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794). *J. Fish Biol.* 69, 1-9.

Filipak Neto, F., Zanata, S.M, Silva de Assis, H.C, Nakao, L., Randi, M. Oliveira Ribeiro, C. A., 2008. Toxic effects of DDT and methyl Mercury on the hepatocytes from *Hoplias malabaricus*. *Toxicol. in Vitro.* 22, 1705-1713.

Filipak Neto, F., Zanata, S.M, Silva de Assis, H.C., Bussolaro, D., Ferraro, M.V., Costa, J.R.M.A., Cestari, M.M., Roche, H., Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Use of hepatocytes from *Hoplias malabaricus* to characterize the toxicity of a complex mixture of lipophilic halogenated compounds. *Toxicol. in Vitro.* 21, 706-715.

Fitzgerald, J., Cunliffe, D.A, D. Burch, M.D., 1999. Development of Health Alerts for Cyanobacteria and Related Toxins in Drinking Water in South Australia. *Environ. Toxicol.* 13, 203-209.

Fotakis, G., Timbrell, J.A., 2006. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.* 160, 171-177.

Fujimoto, T., Kitamura, S., Sanoh, S., Sugihara, K., Yoshihara, S., Fujimoto, N., Ohta, S., 2003. Estrogenic activity of an environmental pollutant, 2-nitrofluorene, after metabolic activation by rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 303, 419-426.

Fukui, K., Utsumi, H., Tamada, Y., Nakajima, T., Ibata, Y. 1996. Selective increase in astrocytic elements in the rat dentate gyrus after chronic toluene exposure studied by GFAP immunocytochemistry and electron microscopy. *Neurosci. Lett.* 203, 85-88.

FUNASA – MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL., 2003. Cianobactérias tóxicas: Impacto na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano. Brasília. 170p.

Gazori, T., Haririan, I., Fouladdel, S., Namazi, A., Ebrahim Azizi, E., 2010. Inhibition of EGFR expression with chitosan/alginate nanoparticles encapsulating antisense oligonucleotides in T47D cell line using RT-PCR and immunocytochemistry. *Carb. Pol.* 80, 1042-1047.

George, S.G., 1993. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic – conjugating enzymes in fish. In: Aquatic Toxicology. Malins, C.D., Ostrander, G.R. (Eds) Boca Ranton, London.

Gilad, G.M., Shanker, G., Dahl, D. H. Gilad, V., 1990. Dibutyryl cyclic AMP-induced changes in neuron-astroglia interactions and fibronectin immunocytochemistry in dissociated rat cerebellar cultures. *Brain Res.* 508, 215-224.

Goodman, A., Gilman, P., 1996. As bases Farmacológicas da Terapêutica. Santadaert, D.G., Young, A.B. (Eds). 9 ed. McGraw-Hill, Rio de Janeiro, pp. 373-374.

Gorhan, P.R., Maclachlav, J.R., Hammer, V.T., Kim, W.K., 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Ver-handlungen der Internationalen Vereinigung fur Theoretische und Angewandte. Limnologie* 15, 796–804.

Grafstrom, R.C., 1990. In vitro studies of aldehyde effects related to human respiratory carcinogenesis. *Mutat. Res.* 238, 175 – 84.

Graham, L.E. , Wilcox, L.W., 2000. *Algae*. Prentice Hall, New York, 650p.

Grivicich, I., Regner, A., Rocha, A.B., 2007. Morte celular por apoptose. *Rev. Bras. Cancerol.* 53, 335-343.

Habig, C., Di Giulio, R.T., 1991. Biochemical characteristics of cholinesterase in aquatic organisms. In: Mineau, P. (Ed), *Cholinesterase inhibition insecticides: their impact on wildlife in the environment*. Elsevier, New York, pp. 19–33.

Haile, Y., Haastert, K., Cesnulevicius, K., Timmer, M., Berski, S., Dräger, G., Gerardy-Schahn, R., Grothe, C., 2007. Culturing of glial and neuronal cells on polysialic acid. *Biomaterials.* 28, 1163-1173.

Hall, S., Stricharz, G., Moczydlowski, E., Ravindran, A., Reichardt, P.B., 1990. The saxitoxins: sources, chemistry and pharmacology. In: Hall, S., Stricharz, G. (Eds.), *Marine Toxins: Origin, Structure and Molecular Pharmacology*, vol. 418. American Chemical Society Symposium Series, Washington, DC, pp. 29–65.

Hamilton, P. B., Ley, L. M., Dean, S., 2005. The occurrence of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Constance Lake, an exotic cyanoprokaryote new to Canada. *Phycol.* 44, 17–25.

Hayes, M.A., Timmins, A.C., Yau, E.H., Palazzo, M., Watson, D., Hinds, C.J., 1997. Oxygen transport patterns in patients with sepsis syndrome or septic shock: influence of treatment and relationship to outcome. *Crit. Care. Med.* 25, 926–936.

He, W., Bellamkonda, R.V., 2005. Nanoscale neuro-integrative coatings for neural implants. *Biomaterials.* 26, 2983-2990.

Hensley, D.A., Moody, D.P., 1975. Occurrence and possible establishment of *Hoplais malabaricus* (Characoidei, Erythrinidae) in Florida. *Fla. Sci.* 38, 122–128.

Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: *Functional metabolism: Regulation and adaptation.* Storey, K.B. (Ed). Wiley-Liss, Hoboken, New Jersey, pp. 319-368.

Hille, B., 1975. Receptor for tetrodotoxin and saxitoxin structural hypothesis. *Biophys* 15, 615–619.

Hinsch, K., Zupanc, K.H., 2006. Isolation, cultivation, and differentiation of neural stem cells from adult fish brain. *J. Neurosci. Meth.* 158, 75–88.

Hogberg, H.T., Sobanski, T., Novellino, A., Whelan, M., Weiss, D.G., Bal-Price, A.K., 2011. Application of micro-electrode arrays (MEAs) as an emerging technology for developmental neurotoxicity: Evaluation of domoic acid-induced effects in primary cultures of rat cortical neurons. *Neurotoxicology.* 32, 158-168.

Holst, C.M., Oredsson, S.M., 2005. Comparison of three cytotoxicity tests in the evaluation of the cytotoxicity of a spermine analogue on human breast cancer cell lines. *Toxicol. in Vitro,* 19, 379-387.

Hornberg, C., Maciuleviciute, L., Seemayer, H., 1996. Sister chromatid exchanges in rodent tracheal epithelium exposed in vitro to environmental pollutants. *Toxicol. Lett.* 88, 45-53.

- Hu, J., Fakahany, E. E., 1994. An artifact associated with using trypan blue exclusion to measure effects of amyloid β on neuron viability. *Life Sci.*, 55, 1009-1016.
- Huettner, J., Baughman, R., 1986. Primary culture of identified neurons from the visual cortex of postnatal rats, *J. Neurosci.* 6, 3044–3060.
- Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M., 1992. Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Bergman, H.L. (Ed). Boca Raton, FL, USA.
- Husoy, T., Syversen, T., Jenssen, J., 1993. Comparisons of four *in vitro* cytotoxicity tests: The MTT assay, NR assay, uridine incorporation and protein measurements. *Toxicol. in Vitro.* 7, 149-154.
- Hussain, R.F., Nouri, A.M., Oliver, E.R.T.D. 1993. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *J. Immunol. Meth.*, 160, 89-96.
- Ibbelings, B.W., Chorus, I., 2007. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: a review. *Environ. Pollut.* 150, 177–192.
- Jang, J., Yotsu-Yamashita, M., 2006. Distribution of tetrodotoxin, saxitoxin, and their analogs among tissues of the puffer fish *Fugu pardalis*. *Toxicon* 48, 980-987.
- Jiang, Z.Y., Hunt, J.V., Wolf, S.P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* 202, 384–389.
- Jin, Y., Zheng, S., Pu, Y., Shu, L., Sun, L., Liu, W., Fu, Z., 2011. Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 82, 398-404.
- Jochimsen, E.M., Carmichael, W.W., An, J.; Cardo, D., Cookson, S.T., Holmes, C.E.M., Antunes, M.B.C., Melo Filho, D.A., Lyra, T.M., Barreto, V., Azevedo, S.M.F.O., Jarvis, W.R., 1998. Liver failure and death following exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. *New Eng. J. Med.* 36, 373-378.

Johnstone, C., Day, J.G., Staines, H., Benson, E.E., 2006. An *in vitro* oxidative estress test for determining pollutant tolerance tolerance in algae. *Ecol. Ind.* 6, 770-779.

Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., Karin, M., 2005. Reactive oxygen species promote $\text{tnf}\alpha$ -induced death and sustained activation by inhibiting map kinase phosphatase. *Cell.* 120, 649-661.

Kamer, I., Rinkevich, B., 2002. In vitro application of the coment assay for aquatic genotoxicity: considering a primary cultre versus a cell line *Toxicol. in Vitro.* 16, 177-184.

Kao, C.Y., 1986. Structure-activity relations of TTX, STX and analogues. *Acad. Sci.*, 479, 52-67.

Karim, M., Puiseux-Dao, S., Edery, M., 2011. Toxins and stress in fish: proteomic analyses and response network. *Toxicon* 57, 959-969.

Kashiba, H., Ueda, Y., Senba, E., 1996. Systemic capsaicin in the adult rat differentially affects gene expression for neuropeptides and neurotrophin receptors in primary sensory neurons. *Neurosci.* 76, 299-312.

Kawakami, Z. Hitomi Kanno, H. Ikarashi, Y., Yoshio Kase, Y. 2011. Kampo medicine, protects against glutamate cytotoxicity due to oxidative stress in PC12 cells. *J. Ethnopharmacol.* 134, 74-81.

Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. *J. Biol. Chem.* 251, 6183-6188.

Kelly, C.M., Tyers, P., Borg, M., Svendsen, C.N, Dunnett, S.B., Rosser, A.E., 2005. EGF and FGF-2 responsiveness of rat and mouse neural precursors derived from the embryonic CNS. *Brain Res. Bull.* 68, 83-94.

Kerokoski, P., Soininen, H., Pirttilä, T., 2001. β -Amyloid (1–42) affects MTT reduction in astrocytes: implications for vesicular trafficking and cell functionality. *Neuroch. Internat.* 38, 127-134.

Kim, S.U., Vellis, J., 2005. Microglia in health and disease. *J. Neuronsci. Res.* 81, 302-313.

- Kleinman, H.K., McGarvey, M.L., Liotta, L.A., Robey, P.G., Tryggvason, K., Martin, G.R., 1982. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Bioch.* 21, 6188–6193.
- Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P., Georgakilas, A.G. 2011. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mut. Res.* 711, 193-201.
- Kuiper-Goodman, T.I., Fitzgerald, J., 1999. Human health aspects. In: Chrous, I., Bartran, J. (Eds.). *Toxic Cyanobacteria in water: a guide line to public health significance, monitoring and management.* World Health Organization, London. 601p.
- Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P.A., Andrinolo, D., Azevedo, S.M.F.O., Oshima, Y., 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater *cyanobacterium* *Cylindrospermopsis raciborskii* isolated from Brazil. *Toxicon* 37, 1359-1373.
- Lakard, S., Herlem, G. Michel, G.; Propper, A.; Gharbi, T.; Fahys, B., 2005. Culture of neural cells on polymers coated surfaces for biosensor applications. *Bios. Bioelect.* 20, 1946-1954.
- Lerea, L.S., McCarthy, K.D., 1990. Neuron-associated astroglial cells express β - and α_1 -adrenergic receptors *in vitro*. *Brain Res.* 521, 7-14.
- Lazarová, M., Lábaj, J., Eckl, P., Slameňová, D., 2006. Comparative evaluation of DNA damage by genotoxicants in primary rat cells applying the comet assay. *Toxicol. Letters.* 164, 54-62.
- Lent, R., 2010. *Cem bilhões de neurônios? conceitos fundamentais de neurociência.* 2. Ed. Atheneu, São Paulo, 765p.
- Li, Y., Cui, K., Li, N., Zheng, Z., Wang, Y., Yuan, X., 2005. Essential Role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor. *Nature.* 434, 894-898.
- Lin, A., Zhang, X., Chen, M., Qing Cao, Q. 2007. Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. *J. Environ. Sc.* 19, 596-602.

Lin, T.N, Te, J., Lee, M., Sun, G.Y, Y. Hsu, C.Y., 1997. Induction of basic fibroblast growth factor (bFGF) expression following focal cerebral ischemia. *Mol. Brain Res.* 49, 255-265.

Liebel, S., Oliveira Ribeiro, C.A., Silva, R.C., Ramsdorf, W.A., Cestari, M.M., Magalhães, V.F., Garcia, J.R.E., Esquivel, B.M., Filipak, F.N., 2011. Cellular responses of *Prochilodus lineatus* hepatocytes after cylindrospermopsin exposure. *Toxicol. in Vitro.* 25, 1493-1500.

Lionel, G., Marta, A., 2003. Genomics and proteomics offers new hopes towards a personalized approach to lung cancer prevention and treatment. *Electron Biot.* 6, 168-173.

Llewellyn, L.E., 2006. Saxitoxin, a toxic marine natural that targets a multitude of receptors. *Royal Soc. Chem.* 23, 200–222.

Lockshin, R.A., Zakeri, Z., 2001. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 545-50.

Lolait, S.J., Lim, A.T., Dahl, D.D., Funder, J.W., 1983. Cells in neonatal rat hypothalamus primary culture - ab immunofluorescence study. *Neurosci. Let.* 43, 137-142.

Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat.Toxicol.* 101, 13-30.

Magalhães, A.C., 1931. Monografia brasileira de peixes fluviais. Graphicars, São Paulo. 100p.

Magalhães, V.F., Soares, R.M., Azevedo, S.M.F.O., 2001. Microcystin contamination in fish from Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon.* 39, 1077-1085.

Mahmood, N.A., Carmichael, W.W., 1986. Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5. *Toxicon.* 24, 175-186.

- Mai, W., Yan, J., Wang, L., Zheng, Y., Xin, Y., Wang, W., 2010. Acute acidic exposure induces p53-mediated oxidative stress and DNA damage in tilapia (*Oreochromis niloticus*) blood cells. *Aquat. Toxicol.* 100, 271-281.
- Malécot, M., Mezhoud, K., Marie, A., Praseuth, D., Puiseux-Dao, S., Edery, M., 2009. Proteomic study of the effects of microcystin-LR on organelle and membrane proteins in medaka fish liver. *Aquat. Toxicol.* 94, 153–161.
- Mallick, N., Rai, L.C., 1999. Response of the antioxidant systems of the nitrogen fixing *Cyanobacterium anabaena dociolum* to copper. *J. Plant physiol.* 155, 30-34.
- Maluf, L.M.P, Pompéia, C., 2005. Morte celular: apoptose e necrose. In: como cultivar células. Peres, C.M., Curi, R. (Eds). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 283p.
- Marabini, L., Calò, R., Fucile, S., 2011. Genotoxic effects of polychlorinated biphenyls (PCB 153, 138, 101, 118) in a fish cell line (RTG-2). *Toxicol. in Vitro*, 25, 1045-1052.
- Marionnet, D., Deschaux, P., Reynaud, S., 2006. Possible implication of macrophages in the regulation of cytochrome P450 activities in carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Shellfish Immunol.* 21, 80-91.
- Martinez-Tabche, L., Ramírez, B.M., Germán-Faz, C., Galar, C.I., Madrigal, O. M., Ulloa, G.V., Orozco, F.M., 1997. Toxic effect of sodium dodecylbencensulphonate, lead, petroleum and their mixtures on the activity of acetylcholinesterase of *Moina macrocopa in vitro*. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 12, 1–5.
- Matsumura, K., Takaharu Taketomi, T, Daigo Yoshiga, D., Yoshimura, A., Nakamura, S., 2011. Sprouty2 controls proliferation of palate mesenchymal cells via fibroblast growth factor signaling. *Biochem. Biophys.Res. Communic.* 404, 1076-1082.
- Meagher, E.A., Fitzgerald, G.A., 2000. Indices of lipid peroxidation *in vivo*: Strengths and limitation. *Free Rad. Biol. Med.* 26, 202-226.
- Mela, M., Randi, M. A.F, Ventura, D.F., Carvalho, C.V., Pelletier, E., Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Dietary and sub-chronic effects of methylmercury on neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicol. Environ Saf.* 68, 426-435.

Mellough, C.B., Cho, S., Wood, A., Przyborski, S., 2011. Neurite formation by neurons derived from adult rat hippocampal progenitor cells is susceptible to myelin inhibition. *Neurochem. Intern. In press.*

Melo Filho, L.C., 2006. Avaliação da ozonização como pré ou pós-tratamento à filtração direta descendente na remoção de cianobactérias e saxitoxinas. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Brasil. 130p.

Miller, L.L., Hontela, 2011. A Species-specific sensitivity to selenium-induced impairment of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 253, 137-144.

Miranda, A.L, Roche, H., Randi, M.A.F., Menezes, M.L., Oliveira Ribeiro, C.A., 2008. Bioaccumulation of organochlorine pesticides, pcbs, hcb and ddt in tropical freshwater fish species *Hoplias malabaricus* related to histopathological, physiological and immunological findings. *Environ. Intern.* 34, 939-949.

Moga, M.M, Geib, B.M., Zhou, D., Prins, G.S., 2000. Androgen receptor-immunoreactivity in the forebrain of the Eastern Fence lizard (*Sceloporus undulatus*). *Brain Res.* 879, 174-182.

Monnerie, H., Hsu, F.C., Coulter, D.A., Le Roux, P.D., 2010. Role of the NR2A/2B subunits of the N-methyl-D-aspartate receptor in glutamate-induced glutamic acid decarboxylase alteration in cortical GABAergic neurons *in vitro*. *Neurosci.* 171, 1075-1090.

Mourente, G., Díaz-Salvago, E., Bell, J.G., Tocher, D.R., 2002. Increased activities of hepatic antioxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidised oil: attenuation by dietary vitamin E. *Aquaculture.* 214, 343-361.

Naar, J.P., Leanne, J., Henry, M., Gannon, D., Henry, M., Pierce, R., Wolny, J., Landsberg, J.H. 2007. Brevetoxins, like ciguatoxins, are potent ichthyotoxic neurotoxins that accumulate in fish. *Toxicon.* 50, 707-723.

Navas, J.M., Segner, H., 2006. Vitellogenin synthesis in primary cultures of fish liver cells as endpoint for in vitro screening of the (anti)estrogenic activity of chemical substances. *Aquat. Toxicol.* 80, 1-22.

Oliveira Ribeiro, C.A, Filipak Neto, F., Mela, M., Silva, P.H., Randi, M.A.F., Costa, J.R.M.A., Pelletier, E., 2006. Haematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead and tributyltin chloride. *Environ. Res.* 101, 74-80.

Oliveira, C.P.M.S., 1999. Efeito da silimarina e verapamil no modelo murino de isquemia e reperfusão hepática: citoproteção e redução do estresse oxidativo. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. São Paulo. 112p.

Oshima, Y., 1995. Post-column derivatization HPLC methods for paralytic shellfish toxins. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*, 33. IOC Manuals and Guides, pp. 81–94.

Padisák, J., 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptative cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Arch. Hydrobiol.* 107, 563–593.

Panosso, R., Lürling, M., 2010. *Daphnia magna* feeding on *Cylindrospermopsis raciborskii*: the role of food composition, filament length and body size. *J. Plankton Res.* 32, 1393–1404.

Pantke, U., Volk, T., Schmutzler, M., Kox, W.J., Sitte, N., Grune, T., 1999. Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 1080-1086.

Payne, J.F., Fancey L., Rahimtula, A., Porter, E., 1987. Review and perspective on the use of mixed function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comp. Biochem. Physiol.* 86, 233-240.

Perkins, L.A., Cain, L.A., 1995. Basic fibroblast growth factor (bFGF) increases the survival of embryonic and postnatal basal forebrain cholinergic neurons in primary culture. *Intern. J. Develop. Neurosci.* 13, 51-61.

- Pesonen, M., Andersson, T.B. 1997. Fish primary hepatocyte culture; an important model for xenobiotic metabolism and toxicity studies. *Aquat. Toxicol.* 37, 253-267.
- Pichardo, S., Jos, A., Zurita, J.L., Salguero, M., Cameán, A.M., Repetto, G., 2007. Acute and subacute toxic effects produced by microcystin-YR on the fish cell lines RTG-2 and PLHC-1. *Toxicol. in Vitro.* 21, 1460-1467.
- Pouso, P., Quintana, L., Bolatto, C., Silva, A.C., 2010. Brain androgen receptor expression correlates with seasonal changes in the behavior of a weakly electric fish, *Brachyhypopomus gauderio*. *Horm. Beh.*, 58, 2010, 729-736.
- Previtera, M.L., Christopher, G., Firestein, B.L., 2010. Effects of substrate stiffness and cell density on primary hippocampal cultures. *J. Biosc. Bioeng.* 110, 459-470.
- Quinlan, G.J., Gutteridge, J.M.C., 2000. Carbonyl assay for oxidative damage to proteins. In: Taniguchi, N., Gutteridge, J.M.C. (Eds.), *Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species*. Oxford University, New York, pp. 257–258.
- Rabitto, I.S., Alves Costa, J.R.M., Silva de Assis, H. C., Pelletier, É. Akaishi, F.M., Anjos, A., Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C.A., 2005. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, Pages 147-156.
- Ramsdorf, W.A., Ferraro, M.V., Oliveira-Ribeiro, C.A.; Costa, J.R.M.A., Cestari, M.M., 2009. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. *Environ. Mon. Assess.* 158, 77-85.
- Range, H.P., Dale, M.M., 2000. *Farmacologia*. 5^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 321p.
- Riol, M.J.M., Valiñas, M.C.N., Fernández, M.A.G., López, M.P., 2000. Glutathione S-transferases from rainbow liver and freshly isolated hepatocytes: purification and characterization. *Comparat. Biochem. Physiol.* 1, 227-235.
- Rippka, R., 1988. Recognition and identification of cyanobacteria. *Meth. Enzymol.* 167, 28-76.

Rivaroli, L., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2006. Cardiac function of two ecologically distinct Neotropical freshwater fish: Curimbata, *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae), and trahira, *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae). *Comparat. Bioch. Physiol. Mol. Int. Physiol.* 145, 322-327.

Rivedal, E., Sanner, T., 1985. In vitro cell transformation by air pollutants. *Environ. Internat.* 11, 317-321.

Rai, N.C.C., 1990. Handbook of symbiotic cyanobacteria. Boca Ranton. CRC Press, 253p.

Roy, N.K., Walker, N., Chambers, C., Wirgin, 2011. Characterization and expression of cytochrome P4501A in Atlantic sturgeon and shortnose sturgeon experimentally exposed to coplanar PCB 126 and TCDD. *Aquat. Toxicol.* 104, 23-31.

Sachana, M. Flaskos, J., Hargreaves, A.J., 2011. *In vitro* biomarkers of developmental neurotoxicity. *Rep. Develop. Toxicol.* 3, 227-252.

Salvo, L.M, Richartz, R.R.T.B., Joineau, M.E.G., Malucelli, M.I.C., Bacila, M., 1999. Citotoxicidade "in vitro" de clorofenoxiacetato com células hepáticas de *Metynnis roosevelti* (pisces, characidae) em cultivo. *Arch. Vet. Scienc.* 4, 45-49.

Sandt, J.J.M. Rutten, A.A.J.J.L, Koëter, H.B.W.M., 1993. Cutaneous toxicity testing in organ culture: Neutral red uptake and reduction of tetrazolium salt (MTT). *Toxicol. in Vitro.* 7, 81-86.

SANEPAR. 2005. Gestão integrada de mananciais de abastecimento eutrofizados. Andreoli, C., Carneiro, C. (Eds). Curitiba, 500p.

Sarmiento, A., Marques, F., Ellis, A.E., Afonso, A., 2004. Modulation of the activity of sea bass head-kidney macrophage activating factor and LPS. *Fish Selfish Immunol.* 16, 79-92.

Schantz, E.J., 1986. Chemistry and biology of saxitoxins and related toxins. *Acad. Sci.*, 479, 15-23.

Seemayer, N.H., Hornberg, C., 1998. Malignant transformation of Syrian hamster kidney cells *in vitro* by interaction of airborne particulates and simian virus (SV-) 40. *Toxicol. Lett.* 96, 231-238.

Segner, H., 1998. Isolation and primary culture of teleost hepatocytes *Comp. Bioch. Physiol.* 120, 71-81.

Shayan, G. Shuler, M.L., Lee, K.H., 2011. Murine *in vitro* model of the blood–brain barrier for evaluating drug transport. *Eur. J. Pharm. Sci.* 42, 148-155.

Sheridan, R.E., Adler, M., 2006. Growth factor dependent cholinergic function and survival in primary mouse spinal cord cultures. *Life Sci.*, 79, 591-595.

Shoemaker, M., Cohen, I., Campbell, M. 2004. Reduction of MTT by aqueous herbal extracts in the absence of cells. *J. Ethnopharmacol.* 93, 381-384.

Shukla, G.S., Malhotra, K.M., Satya V., Chandra, S.V., 1983. Effects of manganese on rat brain microsomal Mg^{2+} – Na^{+} – K^{+} -ATPase: *In Vivo* and *in vitro* studies. *Environ. Res.* 32, 212-219.

Sidiropoulou, E., Sachana, M., Flaskos, J., Harris, W., Hargreaves, A.J., Woldehiwet, Z., 2011. Fipronil interferes with the differentiation of mouse N2a neuroblastoma cells. *Toxicol. Lett.*, 201, 86-91.

Sies, H., Koch, O.R., Martino, E., Boveris, A., 1979. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. *FEBS. Lett.* 103, 287–290.

Silva, C.A., Oba, E.T., Ramsdorf, W.A., Magalhães, V.F., Cestari, M.M., Oliveira Ribeiro, C.A., Silva de Assis. H.C., 2011. First report about saxitoxins in freshwater fish *Hoplias malabaricus* through trophic exposure. *Toxicon.* 57, 141–147.

Silva, C.A., Oliveira Ribeiro, C.A., Katsumiti, A., Araujo, M.L.P., Zandona, E. M., Costa Silva, G.P., Maschio, J., Roche, H., Silva de Assis, H.C., 2009. Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 400–409.

Simerly, C.R., Moreno, R., Ramalho-Santos, J., Hewitson, L. & Schatten, G., 2003. Confocal imaging of structural molecules in mammalian gametes. In: *A Laboratory Guide of the Mammalian Embryo*. Gardner, D.K., Lane, M. (Eds). Oxford University Press, pp. 165-183.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Sch, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175 (1), 184–191.

Singh, Y., Cooke, J.B., Hinton, D.E., Miller, M.G., 1996. Trout liver slices for metabolism and toxicity studies. *Drug Metab. Dispos.* 24, 7-14.

Sotgiu, M.L., Valente, M., Storchi, R., Caramenti, G., Biella, G.E.M., 2008. Contribution by DRt descending facilitatory Pathways to maintenance of spinal neuron sensitization. *Brain Res.*, 1188, 69-75.

Stenesh, J., 1998. *Biochemistry*. Plenum. New York, EUA. 596p.

Sturm, A, Silva de Assis H.C., Hansen, P.D., 1999. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Mar Environ Res* 47: 389-398.

Takahashi, S., Abe, T., Gotoh, J., Fukuuchi, Y., 2002. Substrate-dependence of reduction of MTT: a tetrazolium dye differs in cultured astroglia and neurons. *Neuroch. Int.* 40, 441-448.

Teixeira, M.G.L.C., Costa, M.C.N., Carvalho, V.L.P., Pereira, M.S., Hage, E., 1993. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica, Bahia, Brazil. *Bull. PAHO.* 3, 244-253.

Traven, L., Žaja, R., Lončar, J; Smital, T., Mićović, V., 2008. CYP1A induction potential and the concentration of priority pollutants in marine sediment samples – In vitro evaluation using the PLHC-1 fish hepatoma cell line. *Toxicol. in Vitro.* 22, 1648-1656.

- Triglia, D.; Braa, S. S.; Yonan, C.; Naughton, G. K. 1991. Cytotoxicity testing using neutral red and MTT assays on a three-dimensional human skin substrate. *Toxicol in Vitro*. 5, 573-578.
- Tseng, H.C., Ruegg, S.J., Maronski, M., Messam, C.A., Grinspan, J. B., Dichter, M.A. 2006. Injuring neurons induces neuronal differentiation in a population of hippocampal precursor cells in culture. *Neurobiol. Dis.* 22, 88-97.
- Tucci, A., Sant'Anna, C.L., 2003. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju Cyanobacteria: variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. *Rev. Brasil. Bot.* 26, 97-112.
- Turner, R.W, Borg, L., Naweed, I., Syed, A., 1995. Technique for the primary dissociation of neurons from restricted regions of the vertebrate CNS. *J. Neurosci Meth.* 56, 57-711.
- Tuttle, J.B, Mackey, T. Steers. W.D., 1994. NGF, bFGF and CNTF increase survival of major pelvic ganglion neurons cultured from the adult rat. *Neurosci. Let.* 173, 94-98.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178-189.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.
- Verma, A., Prasad, K.N., Singh, A.K., Nyati, K.K., Gupta, R.K., Paliwal, V.K., 2010. Evaluation of the MTT lymphocyte proliferation assay for the diagnosis of neurocysticercosis. *J. Microb. Meth.* 81, 2010, 175-178.
- Vidal, L., Kruk, C., 2008. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34°53'S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. *Pan-American J. Aquatic Sci.* 3, 142-151.

- Viero, C., Kraushaar, U. Ruppenthal, S., Kaestner, L., Lipp, P., 2008. A primary culture system for sustained expression of a calcium sensor in preserved adult rat ventricular myocytes *Or. Cell Calcium*. 43, 59-71.
- Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B., 2001. *Principles of Ecotoxicology*. 2nd Ed. Taylor and Francis. London. 549p.
- Webb, B., Walker, D.W., Heaton, M.B., 2003. Nerve growth factor and chronic ethanol treatment alter calcium homeostasis in developing rat septal neurons. *Develop. Brain Res.*, 143, 57-71.
- White, A.W., 1981. Sensitivity of marine fishes to toxins from the red-tide dinoflagellate *Gonyaulax excavata* and implications for fish kills. *Mar. Biol.* 65, 255-260.
- White, A.W., 1984. Paralytic shellfish toxins and finfish. In: Ragelis, E.P. (Ed.), *Seafood Toxins*, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 171–180.
- Wiedner, C., Nixdorf, B., Heinze, R., Wirsing, B., Neumann, U., Weckesser, J., 2002. Regulation of cyanobacteria and microcystin dynamics in polymictic shallow lakes. *Arch. Hydrobiol.* 155, 383-400.
- Wiese, M., D'Agostino, P. M. , Mihali, T.K., Moffitt, M.C., Neilan, B.A., 2010. Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analogs. *Mar. Drugs*. 8, 2185-2211.
- Xie, C., Markesbery, W.R., Lovell, M.A., 2000. Survival of hippocampal and cortical neurons in a mixture of MEM+ and B27-supplemented neurobasal medium. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 665-672.
- Yokose, J., Ishizuka, T., Yoshida, T., Aoki, J., Koyanagi, Y., Yawo, H., 2011. Lineage analysis of newly generated neurons in organotypic culture of rat hippocampus. *Neurosci. Res.* 69, 223-233.
- Yoo, R.S., Carmichael, W.W., Hoehn, R.C., Hrudey, S., 1995. *Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins: A Resource Guide*. Reserch Foundation and American Water Works Association. 229p.

Yunes, J.S., Cunha, N.T., Barros, L.P., 2003. Cyanobacterial neurotoxins from Southern Brazil. *Com. Toxicol.* 9, 103-115.

Zegura, B., Zajc, I., Lah, T.T., Filipic, M., 2008. Patterns of microcystin-LR induced alteration of the expression of genes involved in response to DNA damage and apoptosis. *Toxicon* 15, 615-623.

Zhang, Y., He, Y., Bharadwaj, S., Hammam, N., Dyke, M. 2009. Tissue-specific extracellular matrix coating for the promotion of cell proliferation and maintenance of cell phenotype. *Biomaterials*. 30, 4021-4028.

ANEXO 1 - Normas Para Publicação Da Revista Toxicology In Vitro²

² http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/800/authorinstructions

Manuscript Format

Manuscripts should be written in clear and concise English; incomprehensible submissions will be returned to authors for revision. All pages must be numbered, including the Title Page, which should carry the title of the paper, the surnames and initials of the authors, and the names and address of the institutions where the work was done (with the affiliation of each author clearly indicated). Titles consisting of declarative or interrogative sentences are not acceptable. Please do not add line numbering to your source file as this will be added automatically by the EES system upon building of the PDF.

Introduction

Introduction: A concise and clear statement on the background, purposes and significance of the work.

Material and methods

Materials and Methods: A detailed description of the experimental design and of any new or improved methods. Well-established methods and techniques may be identified by reference only.

Results

Results: Presented concisely with the aid of tables or figures where appropriate. Duplication between this section and the Discussion must be avoided.

Discussion

Discussion: A succinct interpretation of the data. Extensive literature reviews and highly speculative comments are discouraged.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Each author's academic or professional

qualifications should also be listed. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address.

Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

Abstract: A self-contained summary of the objectives, results and significance of the study, not exceeding 200 words. Uninformative sentences such as "the significance of the results is discussed" are not acceptable.

Highlights

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are *optional* and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters including spaces)..

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Abbreviations should be used sparingly. Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Acknowledgements: Providing recognition of sources of funding and donations of materials, and including any thanks the authors may wish to accord for advisory, technical or other assistance, since authorship should be limited to those who have made a major contribution to the study and to the preparation of the paper. Authors are advised to obtain approval for the wording of any acknowledgement from those whose help is noted.

Nomenclature

The metric system is the standard for all measurements. Test chemicals and enzymes must be clearly identified, wherever possible, with the aid of CAS Registry and EC numbers.

No information that can be included in the legend should appear on the figure; the following standard symbols are preferred for line drawings: (closed triangle), (open triangle), (closed square), (open square), (closed circle), (open circle), (open circle with a dot in the middle), +, (open diamond). The legends for photomicrographs must state the staining method and magnification. Authors should bear in mind that the figures they submit may be subjected to photographic reduction. If figures that have already been published under copyright are to be reproduced in the Journal (e.g. in reviews), copies of letters from the first publisher and the original author giving permission for such reproduction must always accompany the submitted manuscript.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Tables should be intelligible without reference to the text and should be planned to fit the page size of the Journal. The same data may not be reproduced in both a table and a figure. Each table must have a title and on each column there should be a heading that clearly identifies the data therein.

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).

Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article,

in: Jones, B.S., Smith , R.Z. (Eds.), Introduction to the Electronic Age. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.