

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)

Área de Toxicologia

Resposta de múltiplos biomarcadores em *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae)
expostos a uma cianobactéria produtora de guanitoxina

Larissa Souza Passos

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Ernani Pinto Junior

São Paulo

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)

Área de Toxicologia

Resposta de múltiplos biomarcadores em *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae)
expostos a uma cianobactéria produtora de guanitoxina

Larissa Souza Passos

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Ernani Pinto Junior

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Passos, Larissa

P289r Resposta de múltiplos biomarcadores em *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae) expostos a uma cianobactéria produtora de guanitoxina / Larissa Passos. - São Paulo, 2022.

90 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Pinto, Ernani

1. Estresse oxidativo. 2. Genotoxicidade. 3. Osmorregulação. 4. Peixes. 5. Toxinas. I. T. II. Pinto, Ernani, orientador.

Larissa Souza Passos

Resposta de múltiplos biomarcadores em *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae)
expostos a uma cianobactéria produtora de guanitoxina

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Ernani Pinto Junior
orientador/presidente

Profª. Dra. Adriana Regina Chippari Gomes

1o. examinador

Prof. Dr. Rafael Mendonça Duarte

2o. examinador

Dr. Levi Pompermayer Machado

3o. examinador

São Paulo, 28 de janeiro de 2022.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Ernani Pinto, por todo o apoio, pelos conhecimentos transmitidos, pela confiança depositada e por todas as oportunidades e incentivos para que eu sempre desse o meu melhor. Obrigada por todos os ensinamentos que levarei não só no âmbito profissional, mas também para a minha vida pessoal. Sou muito grata pela sua orientação.

Aos amigos do Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas, que me apoiaram desde o início e contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho. Em especial à Éryka Costa, Felipe Garcia, Fernanda Jacinavicius, Mariana Torres, Rhuana Médice e Vanessa Geraldes. Agradeço também aos alunos e funcionários do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental pelo apoio na realização do projeto.

Aos professores Eurico Cyrino e Brunno Cerozi, do setor de Piscicultura do Departamento de Zootecnia da ESALQ-USP, pela parceria e apoio na realização dos bioensaios. Também gostaria de agradecer aos alunos do setor, principalmente a Angélica e a Tamira, e ao técnico Júnior.

Ao professor Levy Gomes, da Universidade Vila Velha (UVV), que sempre me apoiou durante a graduação e continuou me apoiando durante o mestrado.

À professora Helen Sadauskas, da Universidade Santa Cecília e ao professor Antonio Ostrensky e ao pós-doc Giorgi Dal Pont, da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pela disponibilidade em ensinar e ajudar na realização das análises de osmorregulação.

À professora Gisela Umbuzeiro Aragão, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pela parceria com a realização do teste de Ames.

À minha mãe, Luzia Amaral, que foi extremamente importante para que eu finalizasse a dissertação. Obrigada pelo apoio de sempre, você foi muito essencial nessa trajetória.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro concedido através do processo número 2020/00109-6.

RESUMO

PASSOS, S. P. **Resposta de múltiplos biomarcadores em *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae) expostos a uma cianobactéria produtora de guanitoxina.**

Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Mudanças nas condições ambientais dos ecossistemas aquáticos causadas por ações antrópicas podem modificar a composição dos produtores primários, promovendo a proliferação excessiva de cianobactérias. Esses organismos podem formar florações, que afetam diretamente a vida aquática. O presente estudo investigou a mutagenicidade da cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* (cepa ITEP-024) produtora de guanitoxina (organofosforado natural) e os efeitos subletais em peixes em concentrações ambientalmente relevantes. Para isso, o teste de Ames (*Salmonella*/microsoma) foi realizado como um ensaio mutagênico para extratos da cepa ITEP-024. Espécimes de *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae) foram submetidos à exposição aguda de 96 horas a diferentes concentrações do extrato aquoso da cepa: C = grupo controle; T1 = 31,25 mg/L; T2 = 62,5 mg/L; T3 = 125 mg/L e T4 = 250 mg/L. Biomarcadores genotóxicos, bioquímicos, osmorregulatórios e fisiológicos foram analisados. Nossos resultados mostraram que a cianobactéria apresentou uma resposta mutagênica fraca para a cepa TA102 de *Salmonella* com e sem ativação metabólica por S9. As cepas TA98 e TA100 não foram alteradas. Os peixes dos tratamentos T3 e T4 apresentaram alterações no estresse oxidativo (enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione S-transferase), inibição da enzima acetilcolinesterase, formação de micronúcleos e alterações osmorregulatórias (ativação das enzimas anidrase carbônica e HA⁺ ATPase). Nenhum acúmulo de guanitoxina foi detectado nos diferentes tecidos de *O. niloticus* por LC-MS/MS. Nossos resultados mostraram dados de mutagenicidade inéditos para uma cianobactéria produtora de guanitoxina e alterações bioquímicas, osmorregulatórias e genotóxicas em peixes. Apesar da grande preocupação relacionada a presença de guanitoxina em florações em ecossistemas de água doce, até o momento, não existem planos de monitoramento e sua concentração ainda não é regulamentada.

Palavras-chave: estresse oxidativo, genotoxicidade, osmorregulação, peixes, toxinas.

ABSTRACT

PASSOS, S. P. **Multiple biomarkers response of *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae) exposed to a guanitoxin-producing cyanobacterial strain.** Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Changes in environmental conditions in aquatic ecosystems caused by anthropic actions can modify the composition of primary producers, promoting the excessive proliferation of cyanobacteria. These organisms can form cyanobacterial blooms, which directly affect aquatic life. The present study investigated the mutagenicity of the cyanobacterium *Sphaerospermopsis torques-reginae* (strain ITEP-024) guanitoxin-producing (natural organophosphate) and sublethal effects on fish in relevant environment concentrations. For this, Ames test (*Salmonella*/microsome) was performed as a mutagenic assay for extracts of ITEP-024 strain. Specimens of *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae) were subjected to acute 96-hour exposure to different concentrations of aqueous extract of the strain: C = control group; T1 = 31.25 mg L⁻¹; T2 = 62.5 mg L⁻¹; T3 = 125 mg L⁻¹, and T4 = 250 mg L⁻¹. Genotoxic, biochemical, osmoregulatory, and physiologic biomarkers were analyzed. Our results showed that the cyanobacterium had a weak mutagenic response for TA102 strain of *Salmonella* with and without metabolic activation by S9. Strains TA98 and TA100 were not affected. Fish from treatments T3 and T4 showed changes in oxidative stress (CAT, SOD, and GST enzymes), inhibition of the enzyme AChE activity, micronucleus formation, and osmoregulatory disorders. No guanitoxin accumulation was detected in the different tissues of *O. niloticus* by LC-MS/MS. Our results showed unprecedented mutagenicity data of the cyanobacteria guanitoxin-producing by Ames test and biochemical, osmoregulatory, and genotoxic disorders in fish, providing efficient aquatic contamination biomarkers. Despite the great concern related to the presence of guanitoxin in blooms in freshwater ecosystems, there is no monitoring, and its concentration is not yet regulated.

Keywords: fish, genotoxicity, osmoregulation, oxidative stress, toxins.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Características genéticas das cepas de *Salmonella enterica* estudadas (TA100, TA98 e TA102) no teste de Ames (*Salmonella*/microsoma).....33
- Tabela 2 - Controles positivos utilizados na ausência ou presença de ativação metabólica por S9 no teste de Ames. As concentrações da cepa ITEP-024 foram testadas para cada cepa de *Salmonella* e condição.....34
- Tabela 3 - Análise de mutagenicidade para a cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* (cepa ITEP-024), pelo teste de Ames, na ausência (-S9) e presença (+S9) de ativação metabólica para a cepa TA98. Os dados estão apresentados como a média de revertentes por poço \pm desvio padrão ($n = 4$). O valor de P também é representado.....46
- Tabela 4 - Análise de mutagenicidade para a cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* (cepa ITEP-024), pelo teste de Ames, na ausência (-S9) e presença (+S9) de ativação metabólica para a cepa TA100. Os dados estão apresentados como a média de revertentes por poço \pm desvio padrão ($n = 4$). O valor de P também é representado.....47
- Tabela 5 - Parâmetros físico-químicos da água nos tratamentos estudados: C = grupo controle; T1 = 31,25 mg/L; T2 = 62,5 mg/L; T3 = 125 mg/L e T4 = 250 mg/L dos extratos aquosos da cepa ITEP-024. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. Letras distintas representam diferenças significativas por ANOVA e pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$). O valor P de cada análise também é representado.....49

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Cianobactéria da espécie *Sphaerospermopsis torques-reginae* (Fonte: Werner et al., 2012)..... 21
- Figura 2 - Estrutura química da guanitoxina (A) e sinapse neuromuscular mostrando os processos envolvidos na inibição da enzima acetilcolinesterase pela guanitoxina (B) (Adaptado de Carmichael, 1994)..... 23
- Figura 3 - Espécime de *Oreochromis niloticus* utilizado como organismo bioindicador no estudo (Fonte: acervo pessoal)..... 25
- Figura 4 - Produção de tilápia do Nilo em piscicultura do tipo tanque-rede no litoral norte do Estado do Espírito Santo, Brasil (Fonte: acervo pessoal)..... 27
- Figura 5 - Análise de mutagenicidade da cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* (cepa ITEP-024), pelo teste de Ames, na ausência (-S9) e presença (+S9) de ativação metabólica para a cepa TA102 (A) e repetição da análise para confirmação da mutagenicidade (B). Os dados estão apresentados como média de revertentes por poço \pm desvio padrão ($n = 4$). Os asteriscos (*) representam diferença significativa analisada por ANOVA One-way e pós-teste de Tukey..... 48
- Figura 6 - Detecção da guanitoxina na biomassa da cepa ITEP-024 por LC-MS/MS no modo MRM (+ESI). As transições utilizadas foram m/z 253>58 $[M+H]^+$ e m/z 253>159 $[M+H]^+$. Os dados estão apresentados por meio de um cromatograma..... 50

Figura 7 - Conteúdo relativo da guanitoxina (%) na água no início e no final do período experimental (n = 6). A análise foi realizada por meio de LC-MS/MS no modo MRM (+ESI). A transição utilizada para o cálculo foi m/z 253>58 $[M+H]^+$ (transição mais abundante). Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. As Letras distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos e os asteriscos (*) representam diferenças estatísticas entre os tempos inicial (0 h) e final (96 h) do experimento (ANOVA Two-way e pós-teste de Tukey)..... 51

Figura 8 - Atividade da H^+ ATPase – HA (A) e $Na^+ K^+$ ATPase – NKA (B) em brânquias e rim de *Oreochromis niloticus* expostos a diferentes concentrações da cepa ITEP-024, após 96 horas, nos seguintes tratamentos: C = grupo controle; T1 = 31,25 mg/L; T2 = 62,5 mg/L; T3 = 125 mg/L e T4 = 250 mg/L de extratos da ITEP-024 (n = 6). Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. Letras distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA One-way e pós-teste de Tukey)..... 52

Figura 9 - Atividade da anidrase carbônica (AC) em brânquias e rim de *Oreochromis niloticus* expostos a diferentes concentrações da cepa ITEP-024, após 96 horas, nos seguintes tratamentos: C = grupo controle; T1 = 31,25 mg/L; T2 = 62,5 mg/L; T3 = 125 mg/L e T4 = 250 mg/L de extratos da ITEP-024 (n = 6). Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. Letras distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA One-way e pós-teste de Tukey).....53

Figura 10 - Catalase – CAT (A), superóxido dismutase – SOD (B), glutathiona peroxidase – GPx (C) e glutathiona S-transferase – GST (D) em brânquias de *Oreochromis niloticus* expostos a diferentes concentrações da cepa ITEP-024, após 96 horas, nos seguintes

tratamentos: C = grupo controle; T1 = 31,25 mg/L; T2 = 62,5 mg/L; T3 = 125 mg/L e T4 = 250 mg/L de extratos da ITEP-024 (n = 6). Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão. Letras distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA One-way e pós-teste de Tukey)..... 54

Figura 11 – Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) em brânquias de *Oreochromis niloticus* expostos a diferentes concentrações da cepa ITEP-024, após 96 horas, nos seguintes tratamentos: C = grupo controle; T1 = 31,25 mg/L; T2 = 62,5 mg/L; T3 = 125 mg/L e T4 = 250 mg/L de extratos da ITEP-024 (n = 6). Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão. Letras distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA One-way e pós-teste de Tukey)..... 57

Figura 12 - Atividade da acetilcolinesterase (AChE) em cérebro e músculo de *Oreochromis niloticus* expostos a diferentes concentrações da cepa ITEP-024, após 96 horas, nos seguintes tratamentos: C = grupo controle; T1 = 31,25 mg/L; T2 = 62,5 mg/L; T3 = 125 mg/L e T4 = 250 mg/L de extratos da ITEP-024 (n = 6). Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão. Letras distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA One-way e pós-teste de Tukey)..... 58

Figura 13 - Frequência média de micronúcleos (%) e anormalidades nucleares eritrocíticas (ENA) em *Oreochromis niloticus* expostos a diferentes concentrações da cepa ITEP-024, após 96 horas, nos seguintes tratamentos: C = grupo controle; T1 = 31,25 mg/L; T2 = 62,5 mg/L; T3 = 125 mg/L e T4 = 250 mg/L de extratos da ITEP-024 (n = 8). MN = micronúcleos; BC = células binucleadas; SN = núcleos segmentados; LN = núcleos lobulados e KN = núcleos em formato de rim. Os dados estão apresentados como

média ± desvio padrão. Letras distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA One-way e pós-teste de Tukey)..... 59

Figura 14 - Índice de Resposta de Biomarcadores Integrados – Versão 2 (IBRv2) para guanitoxina na água (início e final do experimento), GST, CAT, GPx, SOD, AChE, TBARS, ENA, MN, CA, NKA e HA em espécimes de *Oreochromis niloticus* expostos a diferentes concentrações da cepa ITEP-024 (T1 = 31,25 mg/L; T2 = 62,5 mg/L; T3 = 125 mg/L e T4 = 250 mg/L). Os resultados dos biomarcadores estão apresentados em relação ao tratamento de referência (grupo controle). As linhas azuis e vermelhas indicam regulação positiva e negativa, respectivamente..... 60

LISTA DE SIGLAS

AC Anidrase Carbônica

ACh Acetilcolina

AChE Acetilcolinesterase

APHA Associação Americana de Saúde Pública

BC Células Binucleadas

CAT Catalase

CENA Centro de Energia Nuclear na Agricultura

CEUA Comitê de Ética no Uso de Animais

ENA Anormalidades Nucleares Eritrocíticas

EROs Espécies Reativas de Oxigênio

ESALQ Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz

ESI Ionização por Electrospray

GPx Glutathione Peroxidase

GST Glutathione S-transferase

IBRv2 Índice de Biomarcadores Integrados – versão 2

KN Núcleo em Formato de Rim

LC-MS/MS Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas

LN Núcleos Lobulados

MAAs Micosporinas

MN Micronúcleo

MRM Monitoramento de Reações Múltiplas

SN Núcleo Segmentado

SOD Superóxido Dismutase

TBARS Substâncias Reativas do Ácido tiobarbitúrico

LISTA DE SÍMBOLOS

CaCO_3 carbonato de cálcio

CDNB 1-chloro-2,4-dinitrobenzene

EDTA ácido etilenodiamino tetra-acético

GSH glutationa

H_2O_2 peróxido de hidrogênio

HA H^+ ATPase

HCl ácido clorídrico

NaOH hidróxido de sódio

NH_4OH hidróxido de amônio

NKA Na^+ K^+ ATPase

O_2^- ânion superóxido

$\cdot\text{OH}$ radical hidroxila

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1 Impactos ambientais	20
2.2 Cianobactérias e produtos naturais	20
2.3 <i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i> (Cyanobacteria: Nostocales)	21
2.4 Guanitoxina	22
2.5 Toxicologia genética	24
2.6 Bioindicadores	25
2.7 <i>Oreochromis niloticus</i> (Teleostei: Cichlidae)	26
2.8 Biomarcadores	27
3 OBJETIVO GERAL	30
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 HIPÓTESE	31
5 MATERIAL E MÉTODOS	32
5.1 Produção da cepa ITEP-024 (<i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i>)	32
5.2 Teste de Ames (<i>Salmonella</i> /microsoma)	32
5.2.1 Condições de teste	33
5.2.2 Sistema de ativação metabólica e meio	34
5.3 Extração de biomassa da cepa ITEP-024 para bioensaio de toxicidade	34
5.4 Aclimação dos peixes	35
5.5 Desenho experimental	36
5.6 Análises químicas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS).....	37
5.6.1 Reagentes	37
5.6.2 Preparo das amostras de água do bioensaio e da biomassa da ITEP-024 para detecção de guanitoxina (LC-MS/MS)	37
5.6.3 Preparo dos tecidos dos peixes para detecção de guanitoxina (LC-MS/MS)	38
5.6.4 Detecção de guanitoxina na biomassa, água e tecidos dos peixes (LC-MS/MS)	39

5.7 Biomarcadores de osmorregulação	40
5.8 Biomarcadores bioquímicos.....	41
5.8.1 Biomarcadores de estresse oxidativo e detoxificação	41
5.8.2 Biomarcadores de neurotoxicidade	42
5.9 Proteínas totais	43
5.10 Biomarcadores de genotoxicidade	43
5.11 Índice de resposta de biomarcadores integrados - versão 2 (IBRv2)	43
5.12 Análises estatísticas.....	44
6 RESULTADOS.....	46
6.1 Teste de Ames (<i>Salmonella</i> /microsoma)	46
6.2 Parâmetros físico-químicos da água do bioensaio	49
6.3 Análises químicas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS).....	50
6.4 Biomarcadores de osmorregulação	51
6.5 Biomarcadores de estresse oxidativo e detoxificação.....	53
6.6 Biomarcadores de neurotoxicidade.....	57
6.7 Biomarcadores de genotoxicidade	58
6.8 Índice de resposta de biomarcadores integrados - versão 2 (IBRv2).....	60
7 DISCUSSÃO.....	62
8 CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS.....	70

1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias são organismos procariotos e fotossintetizantes, com seus primeiros registros datando de 3,5 bilhões de anos, compreendendo o grupo de organismos mais abundantes do planeta, com cerca de 150 gêneros identificados até o momento (Chittora et al., 2020). Com as condições ambientais favoráveis (i.e., aumento de fósforo e nitrogênio), algumas espécies de cianobactérias podem se proliferar rapidamente, formando as florações (“bloom” em inglês). Devido a poluição e as mudanças climáticas causadas pelas ações antrópicas, é esperado que a proliferação de cianobactérias se intensifique cada vez mais nos ecossistemas aquáticos de água doce (Aguilera et al., 2018). Conseqüentemente, essas variações ambientais podem deteriorar os ecossistemas, colocando a biota aquática em risco (Sotton et al., 2019).

As cianobactérias podem produzir várias substâncias tóxicas conhecidas como cianotoxinas, classificadas do ponto de vista farmacológico como citotoxinas, hepatotoxinas, neurotoxinas e toxinas irritantes ao contato (Chorus e Welker, 2021; Codd et al., 2005). As neurotoxinas atuam especificamente no sistema nervoso por diferentes mecanismos fisiológicos e podem levar à morte mesmo em baixas concentrações e de forma rápida (minutos a algumas horas) (Zhang e Whalen, 2020). Vários estudos vêm demonstrando o efeito tóxico das cianobactérias em organismos aquáticos, que são diretamente expostos durante as florações nos ecossistemas (Le Manach et al., 2019; Marie, 2020; Qiao et al., 2016).

Sphaerospermopsis torques-reginae (Cyanobacteria: Nostocales) é uma espécie de cianobactéria filamentosa encontrada em algumas regiões do continente sul-americano, como Argentina, Brasil e Colômbia (Werner et al., 2012). Essa espécie pode produzir a neurotoxina guanitoxina, anteriormente descrita como anatoxina-a (s) (Fiore et al., 2020). Dentre outros componentes celulares, como pigmentos fotossintéticos, ela possui a

capacidade de produzir vários peptídeos, como anabaenopeptinas (F, B), namalides e spumiginas, além de aminoácidos do tipo micosporinas (MAAs) (Jacinavicius et al., 2020; Sanz et al., 2017). A guanitoxina é o único organofosforado anticolinesterásico de ocorrência natural já relatado, com potencial de ação semelhante ao de inseticidas, como malation e tricolorfon. No entanto, seus efeitos tóxicos em organismos aquáticos ainda não são bem elucidados (Chorus e Welker, 2021; Prugh et al., 2017).

Os organismos aquáticos podem ser expostos a toxinas diretamente por meio do contato após a senescência e lise de células cianobacterianas ou por meio da cadeia trófica (espécies fitoplanctívoras e onívoras) (Chen e Xie, 2016). Os peixes caracterizam-se por serem adequados bioindicadores por estarem diretamente expostos às mudanças ambientais e apresentarem riscos potenciais de acúmulo de compostos tóxicos em seus tecidos, que podem ser biomagnificados ao longo da cadeia trófica (Thompson et al., 2016). *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae) (Linnaeus, 1758) foi a espécie bioindicadora escolhida neste estudo, pois apresenta grande importância na aquicultura, além de possuir características biológicas essenciais, como facilidade de reprodução, rápido crescimento e alta capacidade de resposta frente às variações ambientais (Roriz et al., 2017).

O potencial mutagênico de produtos químicos e de amostras ambientais pode ser analisado por meio do teste de Ames (*Salmonella/microsoma*), uma triagem inicial utilizada mundialmente (Zeiger, 2019), sendo a principal ferramenta da toxicologia genética (Claxton et al., 2010). Além disso, existem diversos biomarcadores de contaminação para avaliação e compreensão dos efeitos causados por xenobióticos nos organismos. Esses parâmetros podem ser bioquímicos (Coppo et al., 2018), genotóxicos (Evans et al., 2019), osmorregulatórios (Tavares et al., 2019) e fisiológicos (Prieto et al., 2020). Um excelente modelo biológico é necessário para responder a esses

biomarcadores, de modo que reflitam as condições ambientais, e os peixes desempenham essa função.

Este estudo levanta a hipótese de que a cianobactéria *S. torques reginae* (cepa ITEP-024) pode ser mutagênica (usando cepas de *Salmonella* TA98, TA100 e TA102 como ensaios mutagênicos) e a exposição de *O. niloticus* a esta cepa de cianobactéria pode apresentar alguns efeitos deletérios nos espécimes, induzindo estresse oxidativo, neurotoxicidade, alterações osmorregulatórias, formação de micronúcleos e bioacumulação de guanitoxina nos tecidos dos animais. Para testar essa hipótese, o teste de Ames foi realizado para detecção de mutagenicidade da cepa ITEP-024, e espécimes de *O. niloticus* foram expostos a essa cepa, investigando as respostas bioquímicas, osmorregulatórias, genotóxicas e fisiológicas.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Impactos ambientais

Os ecossistemas aquáticos vêm sendo amplamente degradados em função de atividades antrópicas, como a entrada de efluentes não tratados e a intensa atividade de parques aquícolas (Miranda et al., 2016). A intervenção antrópica nesses ambientes pode levar a um desequilíbrio nos ciclos naturais, propiciando a intensificação do processo de eutrofização, com um enriquecimento das águas através da entrada de nutrientes, principalmente de fósforo e nitrogênio. Durante esse processo, ocorre conseqüentemente um aumento de biomassa fitoplanctônica (e.g., cianobactérias) (Miranda et al., 2020) e de macrófitas (Sotton et al., 2019), formando as florações.

As cianobactérias podem produzir metabólitos que afetam a qualidade do pescado, alterando o aroma e gosto do produto final (e.g., MIB e geosmina) (Lopes et al., 2020) ou a contaminação por toxinas (cianotoxinas) (Napiórkowska-Krzebietke et al., 2021). As cianotoxinas são conhecidas por se acumularem em peixes, além de provocar distúrbios hepáticos, neurológicos e gastrointestinais em seres humanos em caso de consumo de água contaminada (Błaszczuk et al., 2021; Li et al., 2021; Soliño et al., 2021). No entanto, é importante ressaltar que nem todas as florações de cianobactérias são tóxicas, e algumas podem ser tóxicas apenas por um determinado período, em razão da variação na dominância de cepas tóxicas e não-tóxicas.

2.2 Cianobactérias e produtos naturais

As cianobactérias são extremamente importantes para a determinação dos caminhos evolutivos e as mudanças ecológicas ocorridas na Terra (Miao et al., 2020). Elas podem ter desempenhado papéis fundamentais nos ciclos biogeoquímicos e biológicos que favoreceram a evolução da vida, sendo responsáveis pelo ambiente oxigenado atual.

Diversos estudos vêm demonstrando o potencial biotecnológico dos seus compostos bioativos na indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos (Pagels et al., 2019; Patel et al., 2019).

As cianobactérias também podem produzir cianotoxinas, classificadas do ponto de vista farmacológico como neurotoxinas (anatoxina-a, guanitoxina, saxitoxina e neosaxitoxina), hepatotoxinas (microcistina e nodularina), citotoxinas (cilindrospermopsina) e toxinas irritantes ao contato (lipopolissacarídeos) (Chorus e Welker, 2021; Codd et al., 2005). As neurotoxinas atuam especificamente no sistema nervoso por diferentes mecanismos fisiológicos, e podem levar à morte por parada respiratória, que geralmente ocorre a baixas concentrações e de maneira rápida (minutos a poucas horas) (Rodgers et al., 2018; Zhang e Whalen, 2020). Além das toxinas, as cianobactérias também expressam classes de metabólitos secundários complexos e que apresentam atividades biológicas distintas, que são os cianopeptídeos.

2.3 *Sphaerospermopsis torques-reginae* (Cyanobacteria: Nostocales)

Sphaerospermopsis torques-reginae é uma espécie de cianobactéria filamentosa (Figura 1) encontrada em algumas regiões do continente sul-americano (Werner et al., 2012). Essa espécie possui a capacidade de produzir uma neurotoxina denominada de guanitoxina, anteriormente descrita como anatoxina-a (s) (Fiore et al., 2020), além de diversos peptídeos, como as anabaenopeptinas F e B, os namalides e as spumiginas, além de aminoácidos do tipo micosporinas (MAAs) (Jacinavicius et al., 2020; Sanz et al., 2017). *S. torques-reginae* é a única espécie produtora de guanitoxina atualmente presente em bancos de cultura em laboratório (e.g., cepa ITEP-024) (Fernandes et al, 2020).



Figura 1. Cianobactéria da espécie *Sphaerospermopsis torques-reginae* (Fonte: Werner et al., 2012).

2.4 Guanitoxina

A guanitoxina ((*S*)-5-((dimethylamino)methyl)-2-iminoimidazolidin-1-yl methyl hydrogen phosphate - $C_7H_{17}N_4O_4P$) (Figura 2A) é o único organofosforado anticolinesterásico de ocorrência natural existente, com o potencial de ação similar ao de inseticidas (e.g., paration e triclorfon) (Prugh et al., 2017). A sua composição química inclui grupos guanidina e fosfato. Apesar da alta toxicidade, ainda existe uma lacuna de conhecimento que dificulta o seu monitoramento pelos órgãos de fiscalização ambiental. Até o presente momento, a guanitoxina foi encontrada apenas em cepas de cianobactérias planctônicas de água doce do gênero *Sphaerospermopsis* (Molica et al., 2005) e *Dolichospermum* (anteriormente *Anabaena*) (Carmichael e Gorham, 1978). Ao longo do tempo, pouca atenção foi dada à guanitoxina, e algumas razões incluem a sua instabilidade, a falta de padrão analítico para a sua quantificação, a ausência de conhecimento de seus genes de biossíntese e por haver menos informações sobre eventos de envenenamento comparado às demais cianotoxinas (e.g., microcistinas e saxitoxinas) (Fiore et al., 2020).

A guanitoxina possui em seu mecanismo de ação a capacidade de bloquear a enzima acetilcolinesterase (AChE), impedindo a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) (Figura 3B) (Carmichael et al., 1990). A AChE é responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos, hidrolisando a ACh, evitando assim passagens contínuas dos impulsos nervosos (Chatonnet e Lockridge, 1989). Com a inibição da AChE, ocorre um aumento de ACh no cérebro, que pode levar a superestimulação de receptores colinérgicos, provocando um declínio no controle neural e muscular (Tuček, 1988). Portanto, a presença de guanitoxina no sistema neuromuscular pode causar um desequilíbrio nervoso.

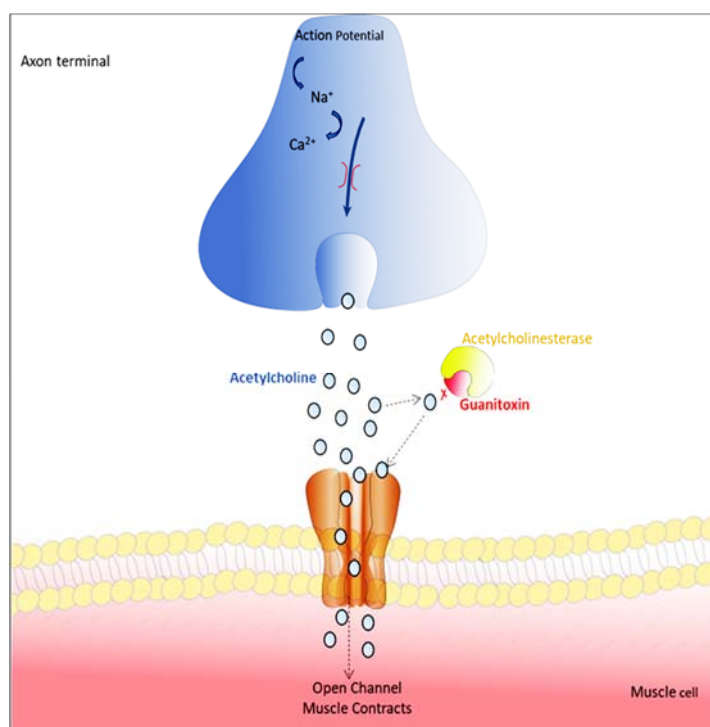
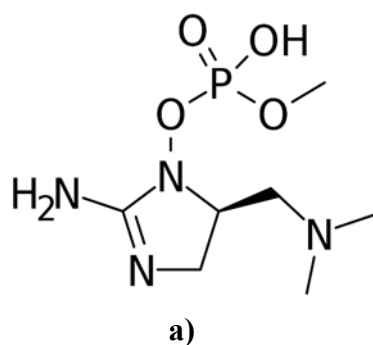


Figura 2. Estrutura química da guanitoxina (A) e sinapse neuromuscular mostrando os processos envolvidos na inibição da enzima acetilcolinesterase pela guanitoxina (B) (Adaptado de Carmichael, 1994).

2.5 Toxicologia genética

Compostos químicos e amostras ambientais, incluindo produtos naturais de cianobactérias, podem causar alterações no material genético dos organismos expostos. Os danos ao DNA podem levar a modificações irreversíveis, como alterações na sequência de nucleotídeos. Quando ocorre um descontrole no ciclo celular desses organismos, aumenta o risco para o câncer (Cardoso et al., 2006; Brambilla, 2009). Desta forma, avaliar a mutagenicidade de compostos químicos é extremamente importante para a toxicologia genética.

O ensaio de mutação bacteriana reversa, teste de Ames, é amplamente utilizado em âmbito mundial como uma triagem inicial para a determinação do potencial mutagênico de produtos químicos e amostras ambientais (Zeiger, 2019). Para isso, são utilizadas linhagens da bactéria *Salmonella*. As cepas TA98, TA100 e TA102 são mais utilizadas nos estudos de toxicidade com o teste de Ames. Elas são modificadas geneticamente para não produzir o aminoácido histidina (His-), via mutações no operon. A exposição destas cepas a agentes mutagênicos pode resultar em mutações no operon modificado, que reverte o quadro mutante, anulando a incapacidade de crescer e formar colônias na ausência de histidina. Desta forma, a atividade normal do gene é restaurada e a bactéria é capacitada novamente a produzir histidina (His+) (Maron, 1983).

O teste de Ames pode ter a adição de ativação metabólica. Devido a incapacidade da *Salmonella* de metabolizar substâncias químicas via citocromo P450, como ocorre em mamíferos e outros vertebrados, um componente é adicionado ao ensaio, um sistema

exógeno de ativação metabólica, a fração microsomal de enzimas S9 de fígado de rato. Com isso, torna-se possível a identificação de xenobióticos mutagênicos de ação indireta, com a detecção de mutagenicidade para os metabólitos resultantes (Mortelmans e Zeiger, 2000).

2.6 Bioindicadores

Indicadores biológicos são utilizados na ecotoxicologia para detecção de danos, através de suas respostas quanto a alterações em seu metabolismo, fisiologia e morfologia. Esses bioindicadores possuem características importantes para a realização dos estudos, como taxonomia bem definida, ampla distribuição geográfica, características ecológicas bem conhecidas e fácil manejo em laboratório (Roriz et al., 2017). Os peixes podem metabolizar e acumular poluentes (Coppo et al., 2018), além de serem responsivos para análises bioquímicas, histológicas, fisiológicas e genotóxicas (Venturoti et al., 2019). Desta forma, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae) (Linnaeus, 1758), uma espécie bem conhecida e de importância na aquicultura foi definida neste estudo como organismo bioindicador (Figura 3).



Figura 3. Espécime de *Oreochromis niloticus* utilizado como organismo bioindicador no estudo (Fonte: acervo pessoal).

2.7 *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae)

Os estoques pesqueiros de forma geral estão diminuindo drasticamente devido à superexploração de seus recursos e, em contrapartida, a demanda global por proteína animal vem se tornando elevada (Fazio, 2018). A atividade de aquicultura, por sua vez, vem ganhando cada vez mais importância e destaque no cenário mundial por suprir as necessidades humanas (Figura 4). Atualmente, os parques aquícolas fornecem cerca de 50% de todos os peixes consumidos mundialmente e, até 2030, pode se tornar a principal fonte de peixe (FAO, 2016), favorecendo a recuperação dos estoques pesqueiros no ambiente.

Com a expansão das atividades aquícolas, a tilápia do Nilo é considerada hoje, como uma das espécies mais importantes na aquicultura tropical, inclusive no Brasil. Devido às características biológicas, à qualidade do pescado e ao aprimoramento de tecnologias voltadas para a produção e manejo, a produção de tilápia ganhou posição de destaque mundial, ficando atrás somente do salmão e do camarão (Garcia et al., 2013).

A tilápia é nativa do continente africano e introduzida no Brasil com grande sucesso adaptativo, sendo encontrada em diversas bacias hidrográficas ao longo do país (Ngonidzashe et al., 2021). Possui como características principais a alta tolerância a condições adversas, facilidade de reprodução e rápida taxa de crescimento. São animais onívoros, com alimentação em níveis tróficos baixos e com capacidade de resposta frente às alterações ambientais (Roriz et al., 2017).



Figura 4. Produção de tilápia do Nilo em piscicultura do tipo tanque-rede no litoral norte do Estado do Espírito Santo, Brasil (Fonte: acervo pessoal).

2.8 Biomarcadores

Existem diversos parâmetros biológicos utilizados para avaliação do grau de impacto e os efeitos causados por contaminantes nos organismos bioindicadores. Essas ferramentas são chamadas de biomarcadores e podem contribuir diretamente para a compreensão dos mecanismos de ação destas substâncias frente à uma variação ambiental (Huang e Zimba, 2019). Os peixes podem absorver contaminantes presentes no ambiente aquático por meio das brânquias, pela epiderme e pelo trato digestório. Com a presença destas substâncias no organismo, diversos problemas podem ser desencadeados, como alterações enzimáticas, alterações osmorregulatórias e danos genotóxicos.

Catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST) e substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) são indicadores do estresse oxidativo. As enzimas CAT, GPx e SOD são constituintes do metabolismo de defesa antioxidante das células, agindo na supressão de espécies reativas de oxigênio (EROs) em excesso, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido (O_2^-) e radicais hidroxila (OH^\cdot). Essas EROS podem causar danos oxidativos às biomoléculas, como lipídios, proteínas e DNA. O aumento de TBARS é um indicativo

de estresse oxidativo, uma vez que a sua quantificação determina a quantidade de metabólitos gerados pelas EROs durante a peroxidação lipídica (Pirinccioglu et al., 2010). A GST por outro lado é uma enzima de biotransformação de fase II, que age na conjugação de substâncias xenobióticas, transformando-as em moléculas polares, a fim de facilitar a excreção dessas substâncias no organismo (Landi, 2000).

Outro biomarcador bioquímico importante para os testes ecotoxicológicos é a enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos. Com a inibição da AChE, pela guanitoxina, por exemplo, ocorre um aumento do neurotransmissor acetilcolina (ACh) no cérebro, que pode levar a superestimulação dos receptores colinérgicos, provocando um declínio no controle neural e muscular (Chatonnet e Lockridge, 1989; Tuček, 1988).

As enzimas de osmorregulação anidrase carbônica (AC), $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATP}$ (NKA) e H^+ ATPase (HA) são de fundamental importância para a manutenção da homeostase nos peixes. A AC é uma enzima crucial para a regulação ácido-base, para a respiração e captação de íons em peixes de água doce. Ela catalisa a rápida conversão de dióxido de carbono (CO_2) em bicarbonato (HCO_3^-) e prótons (H^+) (Ekinci e Beydemir, 2010). As enzimas NKA e HA podem ser consideradas como índices do estado da capacidade ión-regulatória nas brânquias e rim de peixes teleósteos, regulando a entrada e saída de diferentes íons através das membranas para manter as necessidades fisiológicas da célula. A NKA favorece a entrada do Na^+ na célula por gerar um gradiente eletroquímico (Ahern e Morris, 1998), e a HA tem a função de eliminar o excesso de H^+ gerado no processo de hidratação, gerando um desequilíbrio eletrônico que favorece a entrada do Na^+ nas células (Claiborne et al., 2002).

Além de biomarcadores bioquímicos e osmorregulatórios, marcadores genotóxicos também são métodos sensíveis para avaliação dos danos deletérios nos peixes. Por meio do teste do micronúcleo é possível detectar a ação de agentes genotóxicos nos eritrócitos. Essa detecção é possível a partir da identificação de anormalidades nucleares causadas durante a divisão celular quando a membrana nuclear está sendo constituída ao redor dos cromossomos das células-filhas (Grisolia et al., 2005). De acordo com Obiakor et al. (2014), durante a fase de anáfase, fragmentos ou cromátides podem ficar para trás e na telófase, esses fragmentos são incorporados no núcleo das células filhas.

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi a avaliação do potencial mutagênico da cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* (cepa ITEP-024) produtora de guanitoxina e a análise dos seus efeitos subletais através de uma exposição aguda em espécimes de *Oreochromis niloticus* por meio de múltiplos biomarcadores.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar a mutagenicidade da cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* (cepa ITEP-024) por meio do teste de Ames (*Salmonella*/microsoma);
2. Avaliar o estresse oxidativo em *Oreochromis niloticus* expostos a cepa ITEP-024 por meio da análise das enzimas catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase e indicadores de peroxidação lipídica;
3. Verificar a inibição da enzima acetilcolinesterase em *Oreochromis niloticus* expostos a cepa ITEP-024;
4. Verificar alterações osmorregulatórias nos peixes expostos a cepa ITEP-024 por meio das enzimas anidrase carbônica, $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase e H^+ ATPase;
5. Determinar a genotoxicidade nos peixes expostos a cepa ITEP-024 por meio do teste do micronúcleo;
6. Detectar a presença de guanitoxina na água e nos tecidos dos animais por meio de técnicas de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS).

4. HIPÓTESE

Sphaerospermopsis torques reginae (cepa ITEP-024) será mutagênica para as cepas de *Salmonella* TA98, TA100 e TA102 e a exposição de *Oreochromis niloticus* à diferentes extratos aquosos da cianobactéria acarretará em efeitos deletérios nos espécimes, com aumento do estresse oxidativo e genotoxicidade e alterações osmorregulatórias e fisiológicas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Produção da cepa ITEP-024 (*Sphaerospermopsis torques-reginae*)

A cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* (cepa ITEP-024) foi isolada de uma floração tóxica no reservatório de Tapacurá, Pernambuco, Brasil (Molica et al., 2005). Essa cepa produz guanitoxina (peso molecular 253,106), previamente verificada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS), conforme descrito por Dorr et al. (2010) e Fernandes et al. (2020). A presença das transições m/z 253>58 $[M+H]^+$ e m/z 253>159 $[M+H]^+$ foi usada para confirmar a presença da guanitoxina em todas as amostras estudadas. A cepa ITEP-024 foi mantida no Laboratório de Toxinas e Produtos de Algas Naturais da Universidade de São Paulo (USP). As condições de cultivo foram meio ASM-1, 24 ± 2 °C, intensidade luminosa de 40 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperíodo 12:12 e aeração constante. Após 20 dias, as suspensões celulares foram concentradas por centrifugação (10000 rpm, 4 °C e 10 minutos) e liofilizadas (L101, Liotop).

5.2 Teste de Ames (*Salmonella*/microsossoma)

Para avaliação da mutagenicidade da cepa ITEP-024, foi aplicado o protocolo proposto por Zwarg et al. (2018). O teste foi realizado em microplacas de 12 poços contendo ágar mínimo, ao contrário das placas de Petri normais. Este método utiliza culturas bacterianas concentradas cinco vezes. O volume de cada tubo é distribuído nas microplacas, gerando quatro réplicas por concentração de teste.

As cepas selecionadas de *Salmonella enterica* serovar (Typhimurium) foram TA100, TA98 e TA102. Todas as cepas foram previamente testadas quanto às suas características genéticas e responderam de acordo (Tabela 1). As culturas de cada cepa cresceram em *overnight* e foram concentradas cinco vezes por centrifugação (10000 g e

4 °C). A viabilidade das culturas foi determinada em placas de ágar com nutrientes e diluições apropriadas. O intervalo aceitável é de $0,5-2 \times 10^{10}$ bactérias/ml.

Tabela 1. Características genéticas das cepas de *Salmonella enterica* estudadas (TA100, TA98 e TA102) no teste de Ames (*Salmonella*/microsoma).

Cepa	Descrição	Evento de reversão	Plasmídeo	Referência
TA100	<i>hisG46</i> , Δ (<i>uvrB</i> , <i>bio</i>), <i>rfa</i> , Ap ^r	<i>Base-pair substitution</i>	pKM101	Mortelmans e Zeiger (2000)
TA98	<i>hisD3052</i> , Δ (<i>uvrB</i> , <i>bio</i>), <i>rfa</i> , Ap ^r	<i>Frameshift</i>	pKM101	Mortelmans e Zeiger (2000)
TA102	<i>hisG428</i> Δ (<i>bio</i>), <i>rfa</i> , Ap ^r , Tc ^r	<i>Base-pair substitution</i>	pKM101, pAQ1	Mortelmans e Zeiger (2000)

**his* – mutação de genes de histidina (operon); Δ *uvrB* – deleção de *uvrB*; Δ *bio* – deleção do gene biotin; *rfa* – uma mutação que causa uma perda parcial da barreira da parede celular do lipopolissacarídeo; Ap^r – resistência a ampicilina e Tc^r – resistência a tetraciclina.

5.2.1 Condições de teste

A solução de teste foi preparada dissolvendo a amostra liofilizada em água ultrapura estéril a 25 mg/ml para testar a solubilidade máxima conforme recomendado pela OECD (2020). A amostra liofilizada foi previamente extraída com água para lise celular seguindo os métodos de extração da biomassa para o bioensaio de toxicidade com *O. niloticus* (item 5.4). A concentração da substância de teste foi expressa em mg/L da mistura de pré-incubação. Foram testadas seis concentrações (1, 5, 10, 50, 100 e 500 mg/L). A confirmação dos resultados do teste para a cepa TA102 foi realizada com diferentes concentrações (5, 10, 50, 100, 250 e 500 mg/L). Os controles negativos consistiram em

água ultrapura esterilizada usada para dissolver o material de teste. Os controles positivos (concentrações únicas) também foram incluídos de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Controles positivos utilizados na ausência ou presença de ativação metabólica por S9 no teste de Ames. As concentrações da cepa ITEP-024 foram testadas para cada cepa de *Salmonella* e condição.

Condição	Cepas	Composto	CAS	Pureza	Concentração mg/L
Sem S9	TA100	4-nitroquinoline 1-oxide	56-57.5	98%	1,25
	TA98				
	TA102	Mitomycin C	50-07-7	95%	5,0
Com S9	TA100	2-aminoanthracene	613-13-8	96%	5,0
	TA98				20
	TA102				

* Fornecedor: Sigma-Aldrich Co. para todos os compostos

5.2.2 Sistema de ativação metabólica e meio

Para o preparo do meio e da mistura S9, foram seguidos os métodos de Mortelmans e Zeiger (2000). A fração de S9 usada foi liofilizada e adquirida pela Molttox, preparado com fígado de rato S9 induzido por Aroclor-1254. A concentração de S9 na mistura foi de 5%.

5.3 Extração da biomassa da cepa ITEP-024 para bioensaio de toxicidade

Uma alíquota da cultura da cepa ITEP-024 foi removida e fixada com Lugol. Essas amostras foram então contadas na Câmara de Neubauer (hemocitômetro) em um microscópio óptico (Zeiss Axiovert 135M, Göttingen, Alemanha). A contagem de células

foi realizada com base em células por fita para calcular a densidade celular (Blakefield e Harris, 1994). A contagem de células encontrada foi de $3,29 \times 10^6$ células/ml.

As células liofilizadas da cepa ITEP-024 foram extraídas com água para simular a contaminação ambiental por cianobactérias usando concentrações ambientalmente relevantes entre 10^6 e 10^7 células/ml (Chorus e Welker, 2021). A concentração de 10^7 células/ml foi equivalente a 500 mg/L de extrato aquoso da cepa ITEP-024, com base em cálculos da densidade celular medida previamente em microscópio óptico. A maior concentração utilizada no teste de Ames também foi de 500 mg/L, seguindo as diretrizes da OCDE (2020). No entanto, um teste piloto com essa concentração resultou em 100% de mortalidade dos peixes ($n = 3$). Portanto, a concentração de 250 mg/L foi definida como a concentração limite, e as demais foram diluições até 31,25 mg/L (todas as concentrações equivalentes a 10^6 células/ml).

As células liofilizadas foram extraídas três vezes com água (2 minutos em vórtex, 10 minutos em ultrassom com sonda e 10 minutos na centrífuga; 4 °C e 10000 rpm) (Geraldês et al., 2020). Para cada concentração, 93,75 mg (31,25 mg/L), 187,5 mg (62,5 mg/L), 375 mg (125 mg/L) e 750 mg (250 mg/L) de biomassa foram utilizados. Os extratos aquosos obtidos foram adicionados à água do aquário (totalizando 3 L de água). Gostaríamos de enfatizar que a biomassa foi extraída apenas para lise celular; nenhuma parte da amostra foi perdida durante o processo.

5.4 Aclimação de peixes

Espécimes juvenis de *O. niloticus* foram adquiridos e mantidos na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP), Piracicaba, Brasil. Os peixes foram aclimatados em tanque de polietileno de 2000 L (densidade de peixes = 0,01 g/L) por dois meses em sistema de recirculação de água e aeração constante. Durante o período de

aclimação, os indivíduos foram alimentados diariamente *ad libitum* com ração balanceada produzida pela ESALQ-USP (36% de proteína). Os parâmetros físico-químicos (temperatura, $28,16 \pm 0,21$ °C; oxigênio dissolvido, $6,86 \pm 0,26$ mg/L; pH, $7,85 \pm 0,30$ e condutividade, $2393 \pm 26,02$ mS/cm) foram medidos usando multiparâmetro ambiental (Thermo Scientific pH Orion 4 Star e YSI EcoSense DO 55). As análises de dureza ($117,3 \pm 1,89$ mg CaCO₃/L) e alcalinidade ($30,6 \pm 0,58$ mg CaCO₃/L) foram realizadas pelo método de titulação, enquanto nitrito ($0,03 \pm 0,005$ mg/L) e amônia total ($1,40 \pm 0,41$ mg/L) pelo método de colorimetria. Todas as análises seguiram os métodos padrão propostos pela APHA (1989).

5.5 Desenho experimental

O experimento foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética, Bioética e Bem-Estar Animal da Universidade de São Paulo (CEUA - CENA/USP n° 003-2020 e CEUA - ESALQ/USP n° 5968220620).

Após o período de aclimação, espécimes de *O. niloticus* (n = 40; $22,97 \pm 0,63$ g e $12,18 \pm 0,17$ cm) foram transferidos para 40 aquários de vidro individuais (6 L), onde permaneceram por 24 h até a contaminação, com aeração constante e alimentação suspensa (3 L - densidade de peixes = 7,65 g/L). Após este período, os animais foram submetidos à exposição aguda a diferentes concentrações da ITEP-024, por 96 horas, divididos em cinco grupos distintos (n = 8 por grupo): grupo controle (C - sem contaminantes), 31,25 mg/L (T1), 62,5 mg/L (T2), 125 mg/L (T3) e 250 mg/L (T4) de extratos aquosos de ITEP-024.

Ao longo do período experimental, os parâmetros físico-químicos da água (alcalinidade, condutividade, oxigênio dissolvido, dureza, pH, nitrito, temperatura e amônia total) foram monitorados uma vez no início do experimento (0 h) e uma vez ao

final do experimento (96 h) (APHA, 1989). Amostras de água de todos os tratamentos foram coletadas no início e ao final do experimento e armazenadas em um freezer a -80 °C até a análise para detecção de guanitoxina por meio de LC-MS/MS (item 5.6 para descrição detalhada).

Durante todo o período experimental, não foram observadas perdas de animais. Após 96 h, os animais foram anestesiados com solução de Benzocaína (0,2 g/L), pesados, medidos e o sangue coletado por punção da veia caudal com seringas heparinizadas. Os animais foram então eutanasiados por secção cervical. Amostras de sangue fresco foram imediatamente utilizadas para a realização do teste de micronúcleo, e o restante foi mantido em freezer a -80 °C para análises químicas por LC-MS/MS. Cérebro, brânquias, rim, fígado e músculo foram extraídos e armazenados a -80 °C até as análises químicas e bioquímicas.

5.6 Análises químicas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS)

5.6.1 Reagentes

Os reagentes utilizados nas análises de LC-MS/MS foram de grau analítico, com alta pureza, obtidos da JT Baker (Phillipsburg, EUA) e Merck (Sigma-Aldrich, Alemanha) (formiato de amônio, acetato de amônio, ácido fórmico, acetonitrila e metanol). A água utilizada foi purificada por um sistema ultrapuro Milli-Q (Millipore).

5.6.2 Preparo das amostras de água do bioensaio e da biomassa da ITEP-024 para detecção de guanitoxina (LC-MS/MS)

As amostras de água do início e final do bioensaio foram filtradas (1 ml) com um filtro PVDF de 0,22 μm (Analytical) dentro de um vial e analisadas por Triplo Quadrupolo LC-MS/MS para detecção da guanitoxina.

Amostras liofilizadas (5 mg) da cepa ITEP-024 foram extraídas com água acidificada (ácido fórmico 0,1% + formiato de amônio 0,2 mM; pH 2,55) para detecção de guanitoxina. As extrações foram realizadas de acordo com Geraldtes et al. (2020). A biomassa foi agitada em vórtex por 1 minuto, seguido de homogeneização em ultrassom com uma sonda (OMNI Sonic Ruptor 400) por 4 minutos. Após esses processos, a solução permaneceu extraindo por 1 hora em temperatura ambiente (22 °C). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (10000 rpm, 10 minutos, 5 °C; Centrífuga Eppendorf 5415 R), filtradas com um filtro PVDF de 0,22 μm (Analytical) para um vial e analisadas por um Triplo Quadrupolo LC-MS/MS. A biomassa foi usada como controle positivo para identificação da guanitoxina em todas as amostras do experimento.

5.6.3 Preparo dos tecidos dos peixes para detecção de guanitoxina (LC-MS/MS)

Os tecidos (sangue, cérebro, brânquias, fígado e músculo) (n = 3) foram homogeneizados (80 mg de cada tecido) com 700 μL de uma solução de ácido fórmico 0,1% e formiato de amônio 0,2 mM em um TissueLyser LT QIAGEN (2 minutos). Em seguida, as amostras foram colocadas em Thermomixer (Comfort Eppendorf), por 30 minutos, a 1100 rpm e temperatura ambiente (22 °C) para homogeneização. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (10000 g, 10 minutos e 4 °C), e o sobrenadante removido e adicionado 1 ml de acetonitrila fria. Essa solução foi levada ao freezer a -20 °C durante 20 minutos para precipitação das proteínas. O sobrenadante foi novamente removido e levado ao Speedvac (CentriVap® Cold Trap) para evaporação do líquido. Após a secagem, a amostra foi ressuspensa em fase móvel (0,1% de ácido fórmico e 0,2 mM de

formiato de amônio), filtrada com o filtro PVDF de 0,22 µm (Analytical) e analisada por Triplo Quadrupolo LC-MS/MS para detecção de guanitoxina.

5.6.4 Detecção de guanitoxina na biomassa, água e tecidos dos peixes (LC-MS/MS)

A detecção da guanitoxina foi realizada por meio de cromatografia líquida (série 1290 equipada com bomba 1290 VL e injetor 1260 HiP ALS) acoplada a um espectrômetro de massas (Agilent Technologies; 6460 Triplo Quadrupolo), com fonte de Ionização por Electrospray (ESI). Para a separação cromatográfica, foi utilizada uma coluna Synergi 4µ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) (Phenomenex, EUA) a 30 °C, sob uma vazão de 0,4 ml/min, utilizando os eluentes A (H₂O + ácido fórmico 0,2%; pH 3,15 com NH₄OH) e B (acetonitrila/H₂O - 9:1 + ácido fórmico 0,1%).

O equipamento Triplo Quadrupolo foi operado pelo software MassHunter Workstation (B.04.01). A seleção do precursor e do íon produto e a otimização das energias de colisão foram realizadas com injeção em fluxo de soluções padrão usando o software MassHunter Optimizer. As condições da fonte de ionização aplicadas em espectrometria de massas foram 300 °C de temperatura do gás de secagem (N₂), fluxo de gás de secagem de 12 ml/min (N₂), pressão do nebulizador de 45 psi, 350 °C de temperatura do gás de revestimento (N₂), fluxo de gás de revestimento de 10 ml/min (N₂), 3500 V de tensão capilar e 500 V de tensão do bico (Dorr et al., 2010). O experimento foi realizado utilizando Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) em modo positivo visando estudos de detecção de guanitoxina, identificados através das transições (íons característicos) m/z 253>58 [M+H]⁺ e m/z 253>159 [M+H]⁺ (Fernandes et al., 2020; Geraldes et al., 2020). Os dados foram processados por meio do software de análise qualitativa e quantitativa MassHunter (Agilent Technologies, EUA).

5.7 Biomarcadores de osmorregulação

As amostras renais e branquiais foram homogeneizadas (1:10 p/v) em tampão SEID a 0,5% (ácido desoxicólico) diluído cinco vezes no tampão SEI (EDTA 10 mM, imidazol 50 mM e sacarose 150 mM; pH 7,5). Os tecidos foram centrifugados (2000 g, 10 minutos e 4 °C) para obtenção dos sobrenadantes, que posteriormente foram subamostrados para as análises de anidrase carbônica (AC) e Na⁺ K⁺ ATPase (NKA) e H⁺ ATPase tipo-v (HA). Todos os reagentes utilizados nas análises foram da Sigma-Aldrich com alta pureza.

A atividade da anidrase carbônica (E.C.4.2.1.1) foi determinada através da diminuição do pH medido por 20 segundos (a cada 4 segundos). O teste foi realizado a 2,5 °C usando um medidor de pH (F-74BW, Horiba Scientific; calibrado com pH 4, 7 e 10) em uma solução enriquecida com CO₂, contendo o meio de reação (10 mM TRIS-base, 10 mM fosfato de sódio monobásico, 75 mM sacarose e 225 mM manitol; pH 7,4) e amostra. A taxa de reação catalisada (b-catalisada) e a taxa de reação não catalisada (b-catalisada) foram calculadas pelo declive estimado na regressão linear entre os valores de pH (amostras e brancos, respectivamente) e o tempo. A atividade específica da AC foi expressa como U/mg proteína. Os métodos utilizados foram de acordo com Vitale et al. (1999).

Na⁺ K⁺ ATPase (E.C.3.6.3.9) e H⁺ ATPase foram medidos com base na inibição da atividade de NKA por ouabaína (2 mmol/l) e da atividade de HA por N-etilmaleimida (NEM, 2 mmol/l) (Kultz e Somero, 1995). Em seguida, foi adicionado a mistura de reação ao homogenado sem inibidores (atividade ATPase total), com ouabaína (NKA) e com NEM (HA). As absorbâncias foram lidas a 340 nm em leitor de microplacas durante 15 minutos (Molecular Devices - Spectramax 190). As atividades de NKA e HA foram calculadas como a diferença entre a atividade de ATPase total e o inibidor da ouabaína, e

a atividade de ATPase total e o inibidor NEM, respectivamente, e expressas como μmol ATP h/mg de proteína.

5.8 Biomarcadores bioquímicos

Os tecidos das brânquias foram homogeneizados (1:5 p/v) com tampão fosfato (pH 7,0) e posteriormente centrifugados (3030 g, 30 minutos e 4 °C) para obtenção dos sobrenadantes para as análises enzimáticas da glutathiona S-transferase (GST), glutathiona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), além das proteínas totais. Para as análises das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), as brânquias foram homogeneizadas (1:20 p/v) com ácido tricloroacético 20%. Os tecidos cerebrais e musculares foram homogeneizados (1:5 p/v) para análise da enzima acetilcolinesterase (AChE) com 50 mM tampão fosfato (pH 7,4) e centrifugados (14 g, 15 minutos e 4 °C). Posteriormente, os sobrenadantes foram centrifugados novamente (2980 g, 15 minutos e 4 °C). Todos os reagentes usados nas análises bioquímicas foram da Sigma-Aldrich com alta pureza.

5.8.1 Biomarcadores de estresse oxidativo e detoxificação

A atividade da CAT (E.C.1.11.1.6) foi avaliada pela observação contínua da diminuição da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Aebi, 1984). Para isso, foi utilizado o meio de reação (H_2O_2) e tampão TE (1M TRIS HCl e 5 mM EDTA). As amostras foram lidas em espectrofotômetro (Biospectro SP - 220) no comprimento de onda de 240 nm, e os resultados foram expressos em μmol H_2O_2 metabolizado/min/mg de proteína.

A atividade da SOD (E.C.1.15.1.1) foi medida usando as soluções de 1 mM xantina, 0,2 U/ml xantina oxidase e mistura reativa. A atividade cinética foi calculada pela

absorção no comprimento de onda de 550 nm em espectrofotômetro. A atividade enzimática absoluta foi estimada usando o coeficiente de redução do citocromo c. Os resultados foram expressos em U/min/mg de proteína (Flohé e Ötting, 1984).

A atividade da GPx (E.C.1.11.1.9) foi estimada pelo coeficiente de redução do NADPH. Soluções de 5 mM azida sódica, 50 U GR e meio de reação foram usadas no ensaio. As amostras foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm. Os resultados foram expressos em μmol NADPH oxidado/min/mg de proteína (Hopkins e Tudhope, 1973).

A atividade da GST (E.C.2.5.1.18) foi estimada usando o coeficiente de extinção do CDNB. Tampão de fosfato (pH 7,0), 1 mM 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e 1 mM GSH (substrato) foram usados no ensaio. Sua atividade foi calculada a partir da leitura da absorbância em um leitor de microplacas (Molecular Devices - Spectramax 190) no comprimento de onda de 340 nm (Habig et al., 1974). Os resultados obtidos foram expressos em U/mg de proteína/min.

TBARS foram quantificadas como índice de peroxidação lipídica de acordo com o proposto por Hermes-Lima et al. (1995). O homogenado foi misturado com uma solução contendo 0,75% de ácido tiobarbitúrico, 50 mM NaOH e 0,1 nmol/l de solução de hidroxitolueno butilado 7% (p/v) de ácido tricloroacético. Em seguida, as amostras foram aquecidas por 20 min a 98 °C e centrifugadas a 2000 g, por 5 minutos. Três nmol/l de HCl substituíram a solução de ácido tiobarbitúrico para a leitura do branco. As absorbâncias foram lidas em um leitor de microplacas em comprimentos de onda de 532 e 600 nm. Os valores de TBARS totais foram expressos pelo coeficiente de extinção de 156 mM/cm em nmol/gww (Orr et al., 2009; Ramos-Vasconcelos e Hermes-Lima, 2003).

5.8.2 Biomarcadores de neurotoxicidade

A atividade da AChE (E.C.3.1.1.7) foi determinada de acordo com os critérios propostos por Ellman et al. (1961), determinando a taxa de produção de tiocolina. O iodeto de acetilcolina (substrato da AChE) é hidrolisado, liberando tiocolina e acetato. A leitura da absorbância foi realizada em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 412 nm. Os resultados foram expressos em nmol/min/ml.

5.9 Proteínas totais

As proteínas totais foram quantificadas pelo método proposto por Bradford (1976). O reagente de Bradford e a albumina bovina foram utilizados para determinar o conteúdo das proteínas. A absorbância das proteínas foi lida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 595 nm. As análises de proteínas totais são necessárias para o cálculo final das atividades enzimáticas (CAT, SOD, GPx, GST, NKA, HA e AC). Os resultados foram expressos em µg/ml.

5.10 Biomarcadores de genotoxicidade

A ocorrência de anormalidades nucleares eritrocitárias (“ENA” em inglês) foi determinada de acordo com Carrasco et al. (1990). A ocorrência de micronúcleos (MN), núcleos segmentados (SN), núcleos em formato de rim (KN), núcleos lobulados (LN) e células binucleadas (BC) foram observadas em microscópio de fluorescência. Mil células sanguíneas (eritrócitos) foram contadas por lâmina (duas lâminas para cada animal). Após a análise de todas as lâminas, foram calculadas as frequências (%) de MN e ENA.

5.11 Índice de resposta de biomarcadores integrados - versão 2 (IBRv2)

Um índice de resposta de biomarcadores integrados (IBR) descrito por Beliaeff e Burgeot (2002) e modificado por Sanchez et al. (2013) em uma versão 2 (IBRv2) foi

usado neste estudo para correlacionar a resposta de múltiplos biomarcadores em *O. niloticus*. A proporção dos resultados para todos os biomarcadores estudados foi transformada em log (Y_i). Em seguida, a média geral (μ) e o desvio padrão (s) foram calculados. Os valores de Y_i foram padronizados pela fórmula $Z_i = (Y_i - \mu)/s$. Em seguida, o valor de A foi calculado pela fórmula $A = Z_i - Z_0$, em que Z_0 corresponde ao grupo controle. Por fim, os valores de IBRV2 foram determinados pela soma dos valores absolutos A ($|A|$) e apresentados por meio de um gráfico radar. A área fora da linha zero representa uma regulação positiva e a área dentro da linha zero indica uma regulação negativa dos biomarcadores.

5.12 Análises estatísticas

A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os parâmetros bioquímicos (enzimas CAT e SOD) apresentaram distribuição não normal e foram transformados em log₁₀. Todos os dados foram comparados entre os tratamentos, e suas diferenças detectadas pela análise de variância ANOVA One-Way, seguida pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações.

Os dados da área da guanitoxina analisados por LC-MS/MS foram previamente normalizados (%). Os dados da concentração relativa da guanitoxina foram comparados entre os tratamentos (C, T1, T2, T3 e T4) e entre os tempos inicial e final de exposição (0h e 96h). As diferenças foram detectadas por meio da análise de variância ANOVA Two-Way, seguida pelo pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software SigmaPlot 12.5 e as diferenças significativas foram consideradas quando $p \leq 0,05$.

Para o teste de Ames, foi utilizada a análise ANOVA One-Way, seguida do pós-teste de Tukey. Os dados com o $p \leq 0,05$ indicam diferenças entre as concentrações

testadas e o controle negativo. Os dados também foram analisados para o modelo linear do tipo Bernstein (regressão linear), onde $p > 0,05$ indica que o modelo teve um bom ajuste (Bernstein et al., 1982). O valor P da inclinação na origem foi calculado; quanto menor for o valor, maior a concentração-resposta. Os dados foram analisados no programa Salanal.

6. RESULTADOS

6.1 Teste de Ames (*Salmonella*/ microsoma)

A amostra testada não foi mutagênica para as cepas TA98 e TA100 (Tabelas 3 e 4, respectivamente). Por outro lado, a cepa TA102 apresentou uma resposta positiva fraca, com diferenças estatísticas entre as concentrações mais altas e os controles negativos, tanto na ausência (-S9) ($p \leq 0,001$) quanto na presença (+S9) ($p=0,01$) de ativação metabólica (Figura 5A). O teste foi repetido para confirmação do efeito mutagênico observado (Figura 5B), e os resultados positivos foram confirmados tanto na ausência ($p=0,02$) quanto na presença de S9 ($p=0,01$). O modelo de Bernstein mostrou um bom ajuste para as análises da cepa TA102. O primeiro teste apresentou valores de $p=0,29$ e $p=0,06$ para -S9 e +S9, respectivamente. A repetição do teste apresentou valores de $p=0,13$ e $p=0,051$ para -S9 e +S9, respectivamente.

A viabilidade da cultura estava na faixa esperada para todos os testes. Os dados obtidos para os controles positivos indicaram que as cepas e o sistema metabólico S9 responderam adequadamente.

Tabela 3. Análise de mutagenicidade para a cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* (cepa ITEP-024), pelo teste de Ames, na ausência (-S9) e presença (+S9) de ativação metabólica para a cepa TA98. Os dados estão apresentados como média de revertentes por poço \pm desvio padrão ($n = 4$). O valor de P também é apresentado.

Cepa TA98		
Concentração (mg/L)	Revertentes por poço	
	-S9	+S9
Controle negativo	2,50 \pm 0,58	2,25 \pm 1,50
1	3,50 \pm 1,29	2,00 \pm 1,41

5	2,25 ± 1,50	3,00 ± 1,63
10	2,25 ± 1,89	1,75 ± 0,96
50	2,25 ± 0,96	2,50 ± 1,00
100	1,50 ± 1,00	2,75 ± 1,26
500	2,00 ± 1,41	1,75 ± 0,50
Controle positivo	80,00 ± 6,05	107,50 ± 6,40
P-valor	0,63	0,71

Tabela 4. Análise de mutagenicidade para a cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* (cepa ITEP-024), pelo teste de Ames, na ausência (-S9) e presença (+S9) de ativação metabólica para a cepa TA100. Os dados estão apresentados como média de revertentes por poço ± desvio padrão (n = 4). O valor de P também é representado.

Cepa TA100		
Concentração (mg/L)	Revertentes por poço	
	-S9	+S9
Controle negativo	13,75 ± 1,89	12,00 ± 2,31
1	16,50 ± 4,12	13,00 ± 2,16
5	16,00 ± 2,45	13,00 ± 2,16
10	20,50 ± 1,29	14,75 ± 4,35
50	17,75 ± 3,30	13,75 ± 1,50
100	15,50 ± 4,12	12,50 ± 1,29
500	18,25 ± 0,96	13,75 ± 1,71
Controle positivo	150,00 ± 0,00	150,00 ± 0,00
P-valor	0,09	0,73

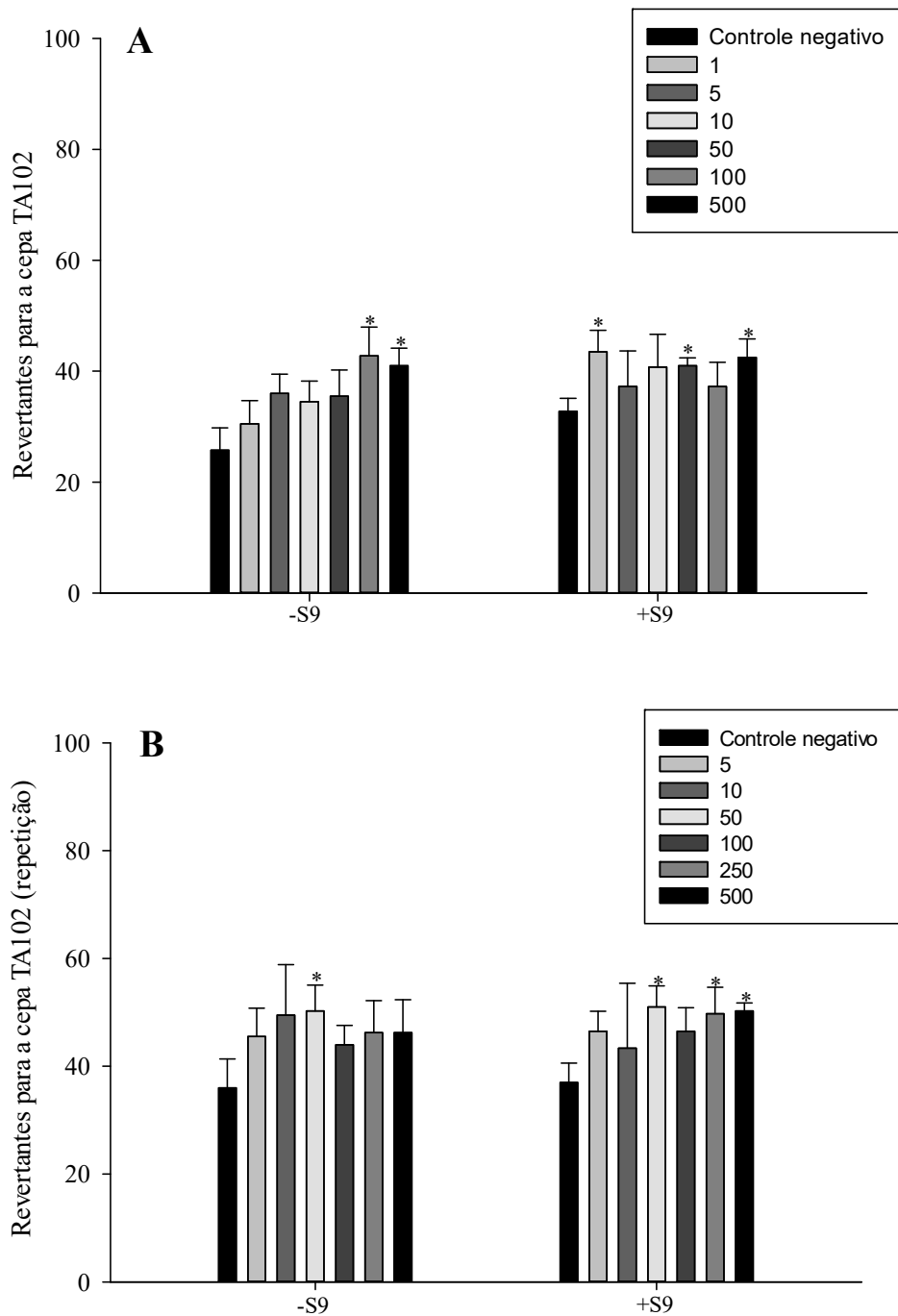


Figura 5. Análise de mutagenicidade da cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* (cepa ITEP-024), pelo teste de Ames, na ausência (-S9) e presença (+S9) de ativação metabólica para a cepa TA102 (A) e repetição da análise para confirmação da mutagenicidade (B). Os dados estão apresentados como média de revertentes por poço \pm

desvio padrão (n = 4). Os asteriscos (*) representam diferenças significativas analisada por ANOVA One-way e pós-teste de Tukey.

6.2 Parâmetros físico-químicos da água do bioensaio

Durante o período experimental, os valores de temperatura, pH e amônia total permaneceram semelhantes entre os tratamentos. O oxigênio dissolvido foi estatisticamente menor para os tratamentos T3 e T4, e a dureza foi maior para o tratamento T4. A condutividade foi menor nos tratamentos contaminados em relação ao grupo controle; a alcalinidade foi maior nos tratamentos T1 e T2, e o nitrito foi maior nos tratamentos T2, T3 e T4. Os dados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros físico-químicos da água nos tratamentos estudados: C = grupo controle; T1 = 31,25 mg/L; T2 = 62,5 mg/L; T3 = 125 mg/L e T4 = 250 mg/L dos extratos aquosos da cepa ITEP-024. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. Letras distintas representam diferenças significativas analisadas por ANOVA One-Way e pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$). O P-valor de cada análise também é apresentado.

Parâmetros	C	T1	T2	T3	T4	P-valor
Oxigênio dissolvido (mg/L)	7,01 \pm 0,21 ^a	6,68 \pm 0,50 ^a	6,71 \pm 0,24 ^a	6,54 \pm 0,31 ^b	6,60 \pm 0,35 ^b	0,04
Temperatura (°C)	27,95 \pm 0,09 ^a	27,90 \pm 0,29 ^a	27,85 \pm 0,26 ^a	26,97 \pm 0,13 ^a	27,95 \pm 0,19 ^a	0,36
pH	8,23 \pm 0,27 ^a	8,21 \pm 0,08 ^a	8,25 \pm 0,08 ^a	8,22 \pm 0,05 ^a	8,18 \pm 0,04 ^a	0,54
Condutividade (μ S/cm)	2391 \pm 16,23 ^a	2332 \pm 13,59 ^b	2346 \pm 19,32 ^{ab}	2322 \pm 13,80 ^b	2287 \pm 35,82 ^b	$\leq 0,001$
Dureza (mg CaCO ₃ /L)	116,7 \pm 1,45 ^a	116,0 \pm 4,81 ^a	118,7 \pm 1,53 ^{ab}	116,4 \pm 3,86 ^a	129,0 \pm 2,62 ^b	$\leq 0,001$
Alcalinidade (mg CaCO ₃ /L)	30,5 \pm 0,53 ^a	33,5 \pm 1,58 ^b	33,5 \pm 1,31 ^b	31,5 \pm 0,89 ^{ab}	31,9 \pm 0,90 ^{ab}	$\leq 0,001$
Nitrito (mg/L)	0,03 \pm 0,01 ^a	0,04 \pm 0,00 ^{ab}	0,08 \pm 0,10 ^b	0,07 \pm 0,06 ^b	0,09 \pm 0,03 ^b	$\leq 0,001$

6.3 Análises químicas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS)

A guanitoxina foi detectada na biomassa da cepa ITEP-024 (Figura 6) e na água do experimento nos períodos inicial (0 h) e final (96 h). A quantificação da guanitoxina não pode ser realizada devido à ausência de padrões analíticos até o momento, portanto, foi calculada apenas a sua concentração relativa (o fragmento mais abundante da guanitoxina - m/z 58 $[M+H]^+$) (Figura 7). No início do experimento, foi encontrado um aumento significativo na concentração relativa da guanitoxina entre os tratamentos T2, T3 e T4, em relação ao grupo controle. No final do experimento, houve um aumento significativo apenas para o T4. Em relação aos tempos inicial e final, foi encontrada uma redução significativa no final do experimento em relação ao período inicial apenas nos tratamentos T3 e T4. Por outro lado, a guanitoxina não foi detectada nos tecidos dos peixes analisados (sangue, cérebro, brânquias, fígado e músculo).

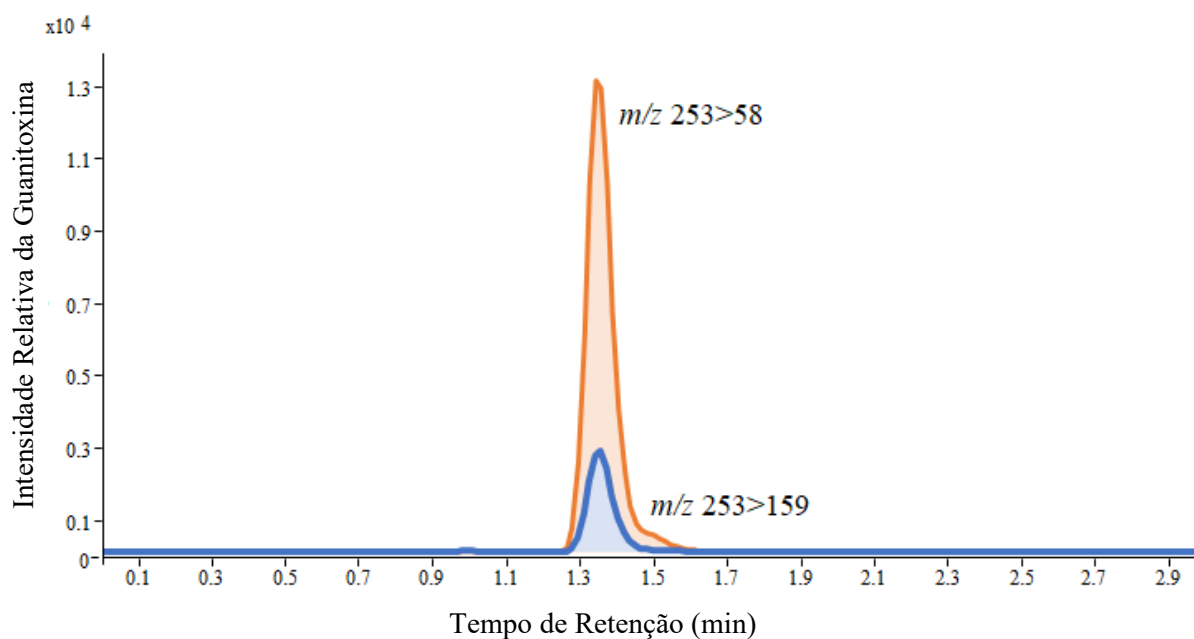


Figura 6. Detecção da guanitoxina na biomassa da cepa ITEP-024 por LC-MS/MS no modo MRM (+ESI). As transições utilizadas foram m/z 253>58 $[M+H]^+$ e m/z 253>159 $[M+H]^+$. Os dados estão apresentados por meio de um cromatograma.

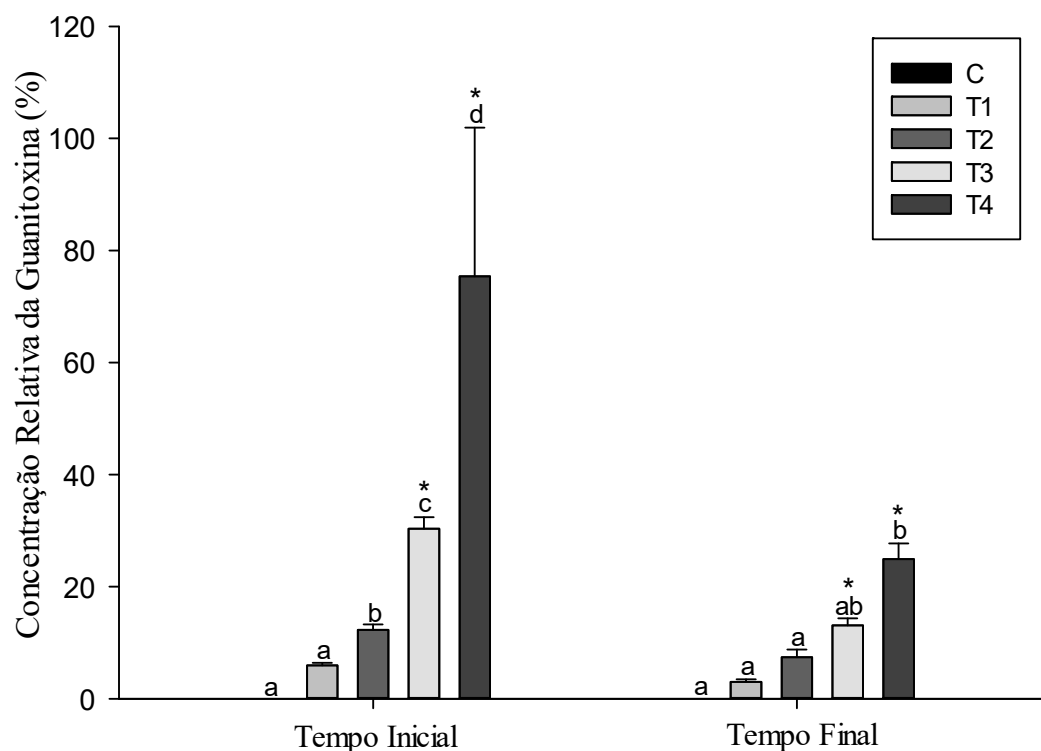


Figura 7. Conteúdo relativo da guanitoxina (%) na água no início e no final do período experimental (n = 6). A análise foi realizada por meio de LC-MS/MS no modo MRM (+ESI). A transição utilizada para o cálculo foi m/z 253>58 $[M+H]^+$ (transição mais abundante). Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. As letras distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos e os asteriscos (*) representam diferenças estatísticas entre os tempos inicial (0 h) e final (96 h) do experimento (ANOVA Two-way e pós-teste de Tukey).

6.4 Biomarcadores de osmorregulação

A HA aumentou nos tratamentos T2 e T4 no rim ($p=0,002$) e nas brânquias apenas no tratamento T4 ($p=0,02$), em relação ao grupo controle (Figura 8A). Por outro lado, a NKA não foi alterada nas brânquias ($p=0,21$) ou no rim ($p=0,56$) (Figura 8B). A AC aumentou nos tratamentos T2, T3 e T4 no rim ($p\leq 0,001$) em relação ao grupo controle, enquanto nas brânquias não houve alteração ($p=0,33$) (Figura 9).

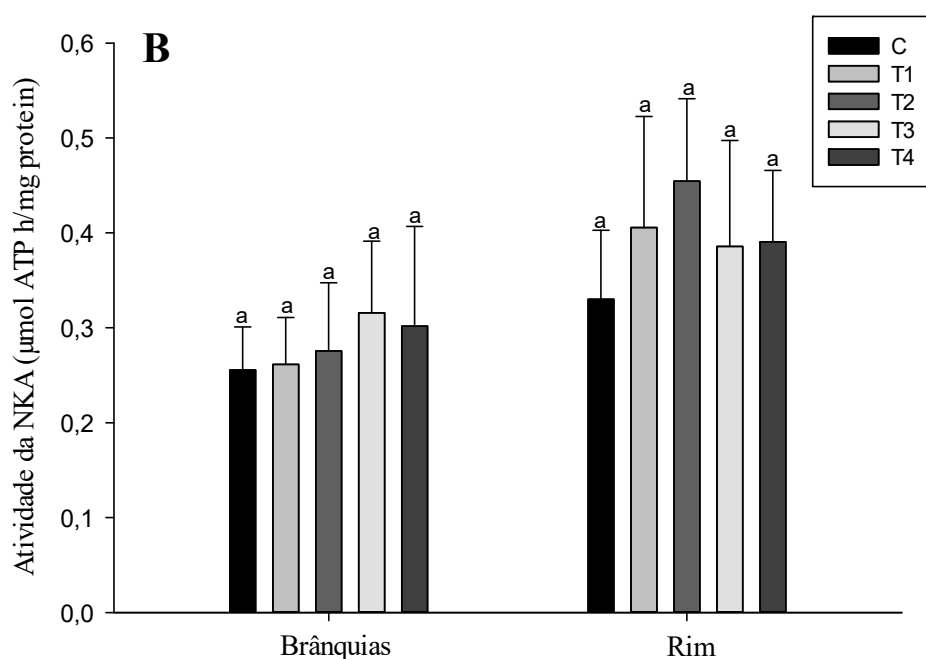
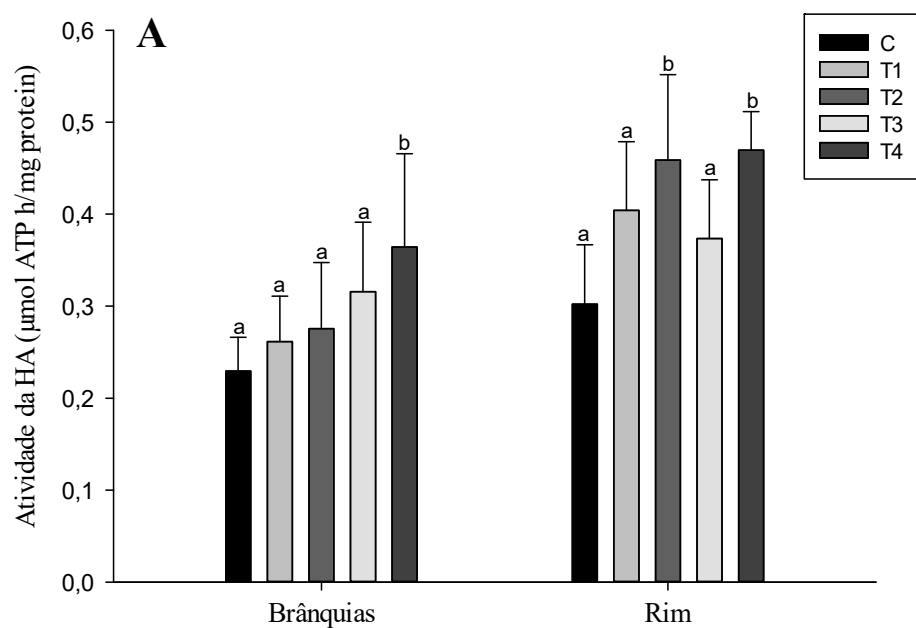


Figura 8. Atividade da H^+ ATPase – NKA (A) e $Na^+ K^+$ ATPase – HA (B) em brânquias e rim de *Oreochromis niloticus* expostos a diferentes concentrações da cepa ITEP-024, após 96 horas, nos seguintes tratamentos: C = grupo controle; T1 = 31,25 mg/L; T2 = 62,5 mg/L; T3 = 125 mg/L e T4 = 250 mg/L de extratos da ITEP-024 (n = 6). Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. Letras distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA One-way e pós-teste de Tukey).

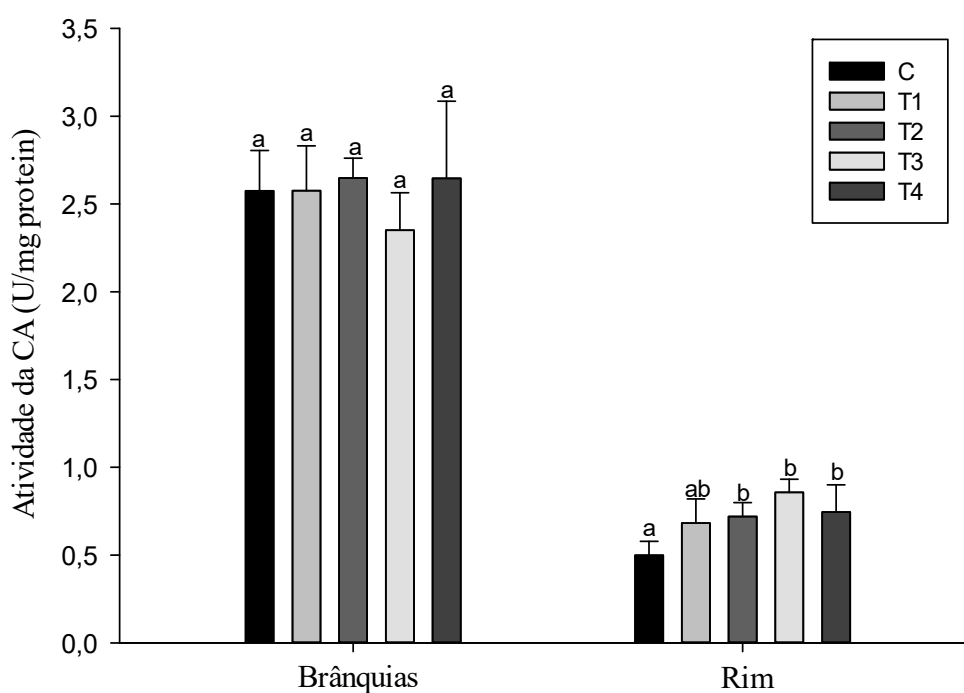
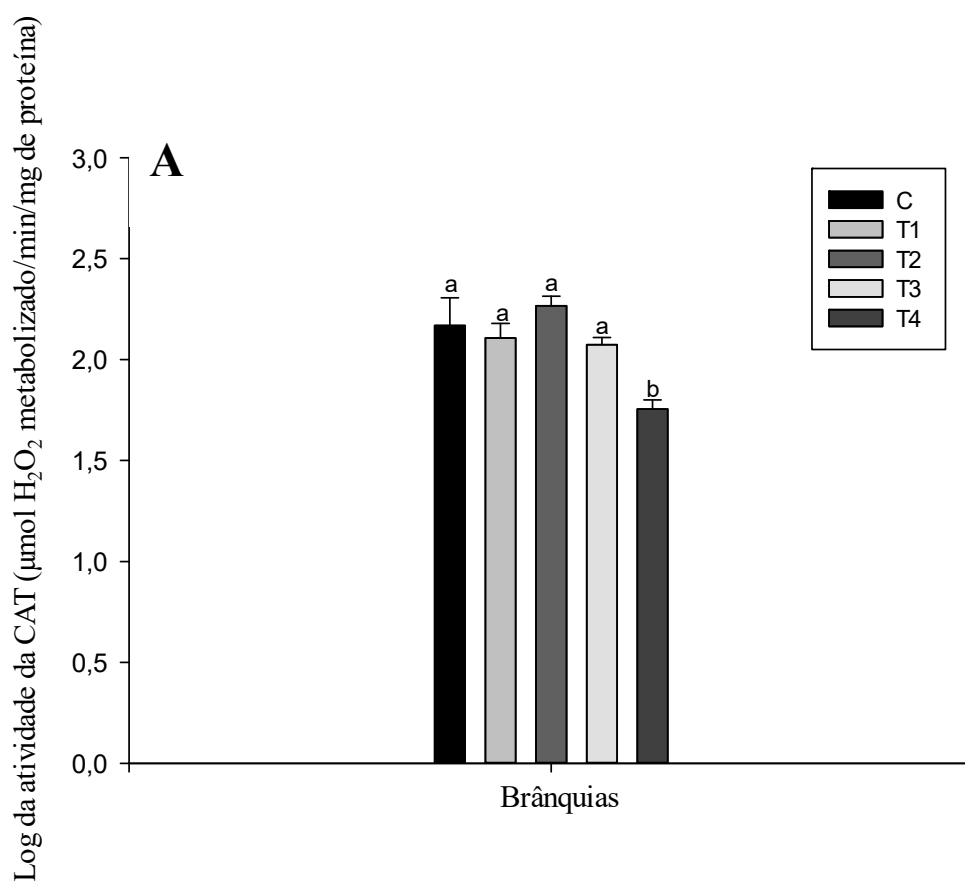
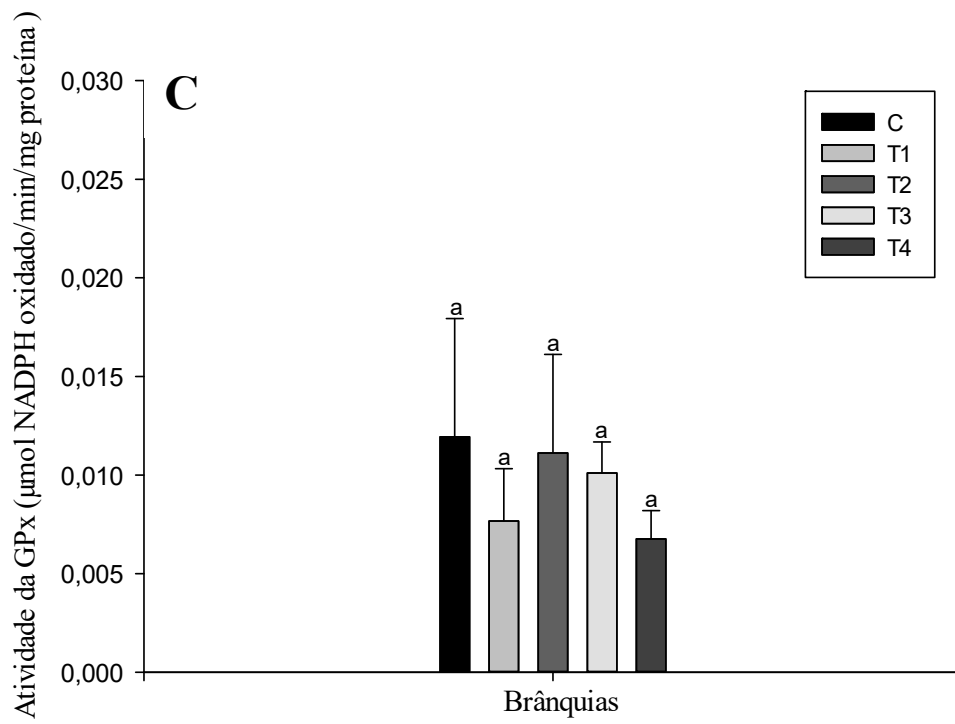
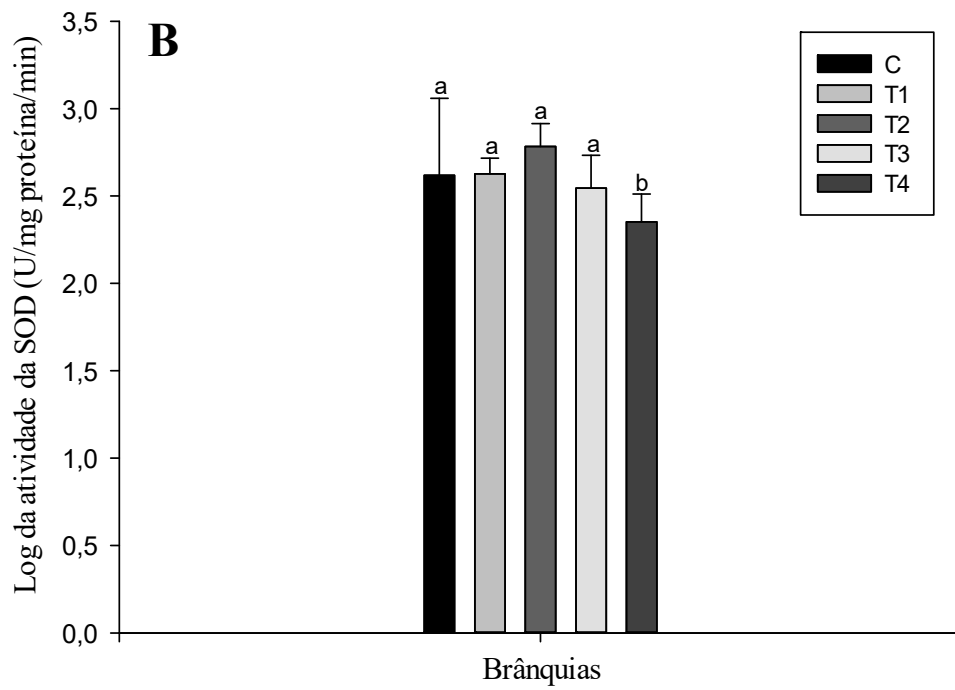


Figura 9. Atividade da anidrase carbônica (AC) em brânquias e rim de *Oreochromis niloticus* expostos a diferentes concentrações da cepa ITEP-024, após 96 horas, nos seguintes tratamentos: C = grupo controle; T1 = 31,25 mg/L; T2 = 62,5 mg/L; T3 = 125 mg/L e T4 = 250 mg/L de extratos da ITEP-024 (n = 6). Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. Letras distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA One-way e pós-teste de Tukey).

6.5 Biomarcadores de estresse oxidativo e detoxificação

As enzimas antioxidantes CAT e SOD (Figura 10A e 10B, respectivamente) apresentaram diminuição da atividade no tratamento T4 ($p=0,003$ e $p=0,02$, respectivamente) em relação ao grupo controle. Pelo contrário, a GPx (Figura 10C) não mostrou diferenças significativas entre os tratamentos analisados ($p=0,39$). A enzima de detoxificação GST aumentou em T3 e T4, com maior aumento para T3 ($p=0,008$), em relação ao grupo controle (Figura 10C). O indicador de peroxidação lipídica (TBARS) não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos ($p=0,58$) (Figura 11).





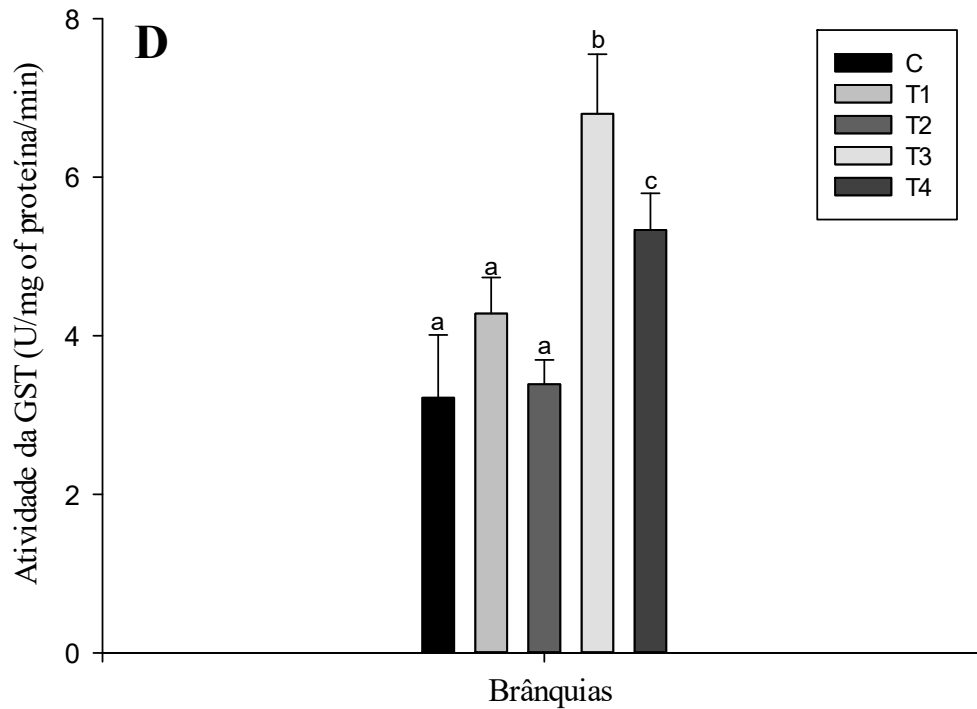


Figura 10. Catalase – CAT (A), superóxido dismutase – SOD (B), glutathione peroxidase – GPx (C) e glutathione S-transferase – GST (D) em brânquias de *Oreochromis niloticus* expostos a diferentes concentrações da cepa ITEP-024, após 96 horas, nos seguintes tratamentos: C = grupo controle; T1 = 31,25 mg/L; T2 = 62,5 mg/L; T3 = 125 mg/L e T4 = 250 mg/L de extratos da ITEP-024 (n = 6). Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. Letras distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA One-way e pós-teste de Tukey).

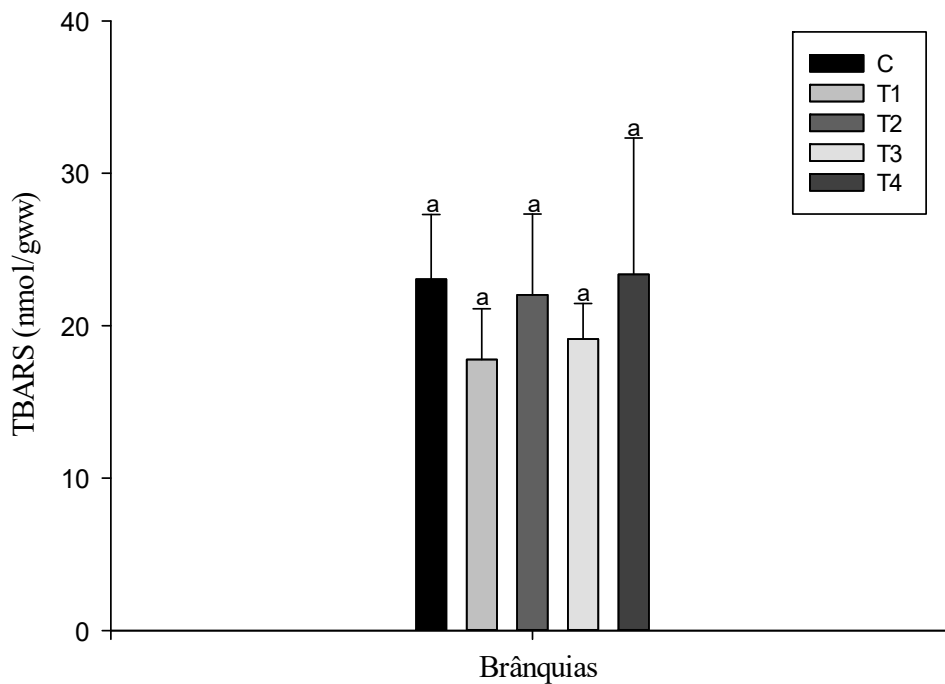


Figura 11. Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) em brânquias de *Oreochromis niloticus* expostos a diferentes concentrações da cepa ITEP-024, após 96 horas, nos seguintes tratamentos: C = grupo controle; T1 = 31,25 mg/L; T2 = 62,5 mg/L; T3 = 125 mg/L e T4 = 250 mg/L de extratos da ITEP-024 (n = 6). Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. Letras distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA One-way e pós-teste de Tukey).

6.6 Biomarcadores de neurotoxicidade

A enzima AChE no cérebro ($p=0,004$) apresentou inibição no tratamento T3, com redução de 47% em sua atividade em relação ao grupo controle. Por outro lado, no músculo ($p=0,04$), houve redução de 32% no tratamento T4 em relação ao grupo controle (Figura 12).

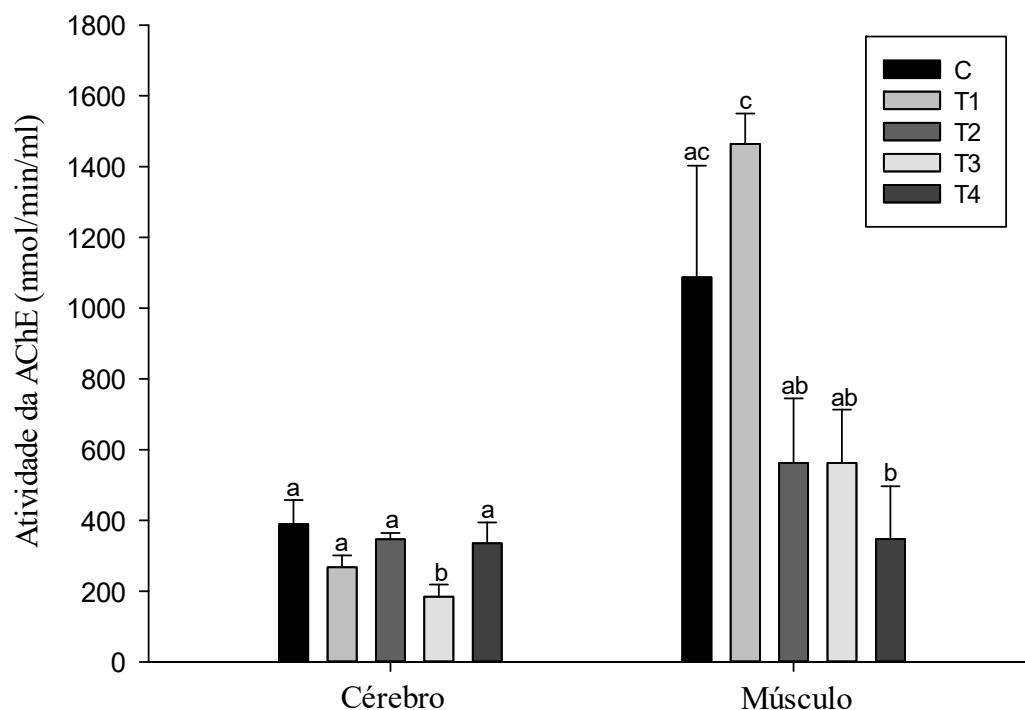


Figura 12. Atividade da acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e músculo de *Oreochromis niloticus* expostos a diferentes concentrações da cepa ITEP-024, após 96 horas, nos seguintes tratamentos: C = grupo controle; T1 = 31,25 mg/L; T2 = 62,5 mg/L; T3 = 125 mg/L e T4 = 250 mg/L de extratos da ITEP-024 (n = 6). Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. Letras distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA One-way e pós-teste de Tukey).

6.7 Biomarcadores de genotoxicidade

Foi detectado um aumento significativo de 3 e 7 vezes na frequência de micronúcleos eritrocitários nas duas maiores concentrações da cepa ITEP-024 testadas (tratamentos T3 e T4, respectivamente) em relação ao grupo controle ($p \leq 0,001$ para ambos). Para as demais anormalidades detectadas, os núcleos lobulados aumentaram 4 e 11 vezes em T3 e T4 em relação ao grupo controle, respectivamente ($p \leq 0,001$ para

ambos). Núcleos em formato de rim ($p \leq 0,001$), células binucleadas ($p = 0,005$) e núcleos segmentados ($p = 0,03$) foram 5, 20 e 34 vezes maiores em T4 em comparação ao grupo controle, respectivamente. A frequência de anormalidades nucleares eritrocitárias (ENAs) apresentou diferença significativa nos tratamentos T3 e T4, aumentando cerca de 4 e 7 vezes em relação ao grupo controle, respectivamente ($p \leq 0,001$) (Figura 13).

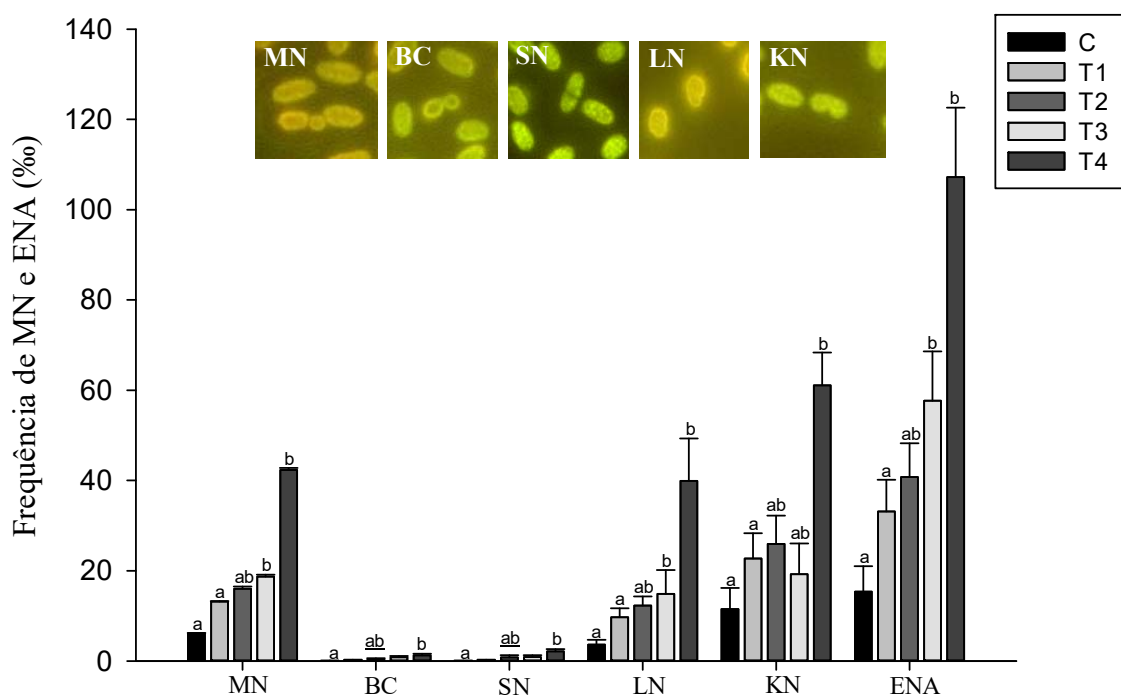


Figura 13. Frequência média de micronúcleos (%) e anormalidades nucleares eritrocitárias (ENA) em *Oreochromis niloticus* expostos a diferentes concentrações da cepa ITEP-024, após 96 horas, nos seguintes tratamentos: C = grupo controle; T1 = 31,25 mg/L; T2 = 62,5 mg/L; T3 = 125 mg/L e T4 = 250 mg/L de extratos da ITEP-024 (n = 8). MN = micronúcleos; BC = células binucleadas; SN = núcleos segmentados; LN = núcleos lobulados e KN = núcleos em formato de rim. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. Letras distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA One-way e pós-teste de Tukey).

6.8 Índice de resposta de biomarcadores integrados - versão 2 (IBRv2)

É possível observar uma regulação positiva (linha azul - T1) para todos os biomarcadores, exceto para AChE no cérebro e SOD e GPx nas brânquias (linha vermelha). Para o tratamento T2, houve uma regulação negativa para a AChE (cérebro e músculo) e SOD nas brânquias. Os tratamentos T3 e T4 mostraram resultados semelhantes com regulação negativa para a AChE (cérebro e músculo) e AC, SOD e GPx nas brânquias. Os maiores valores de IBRv2 foram para os tratamentos T3 e T4 (1,80 e 1,31, respectivamente) (Figura 14).

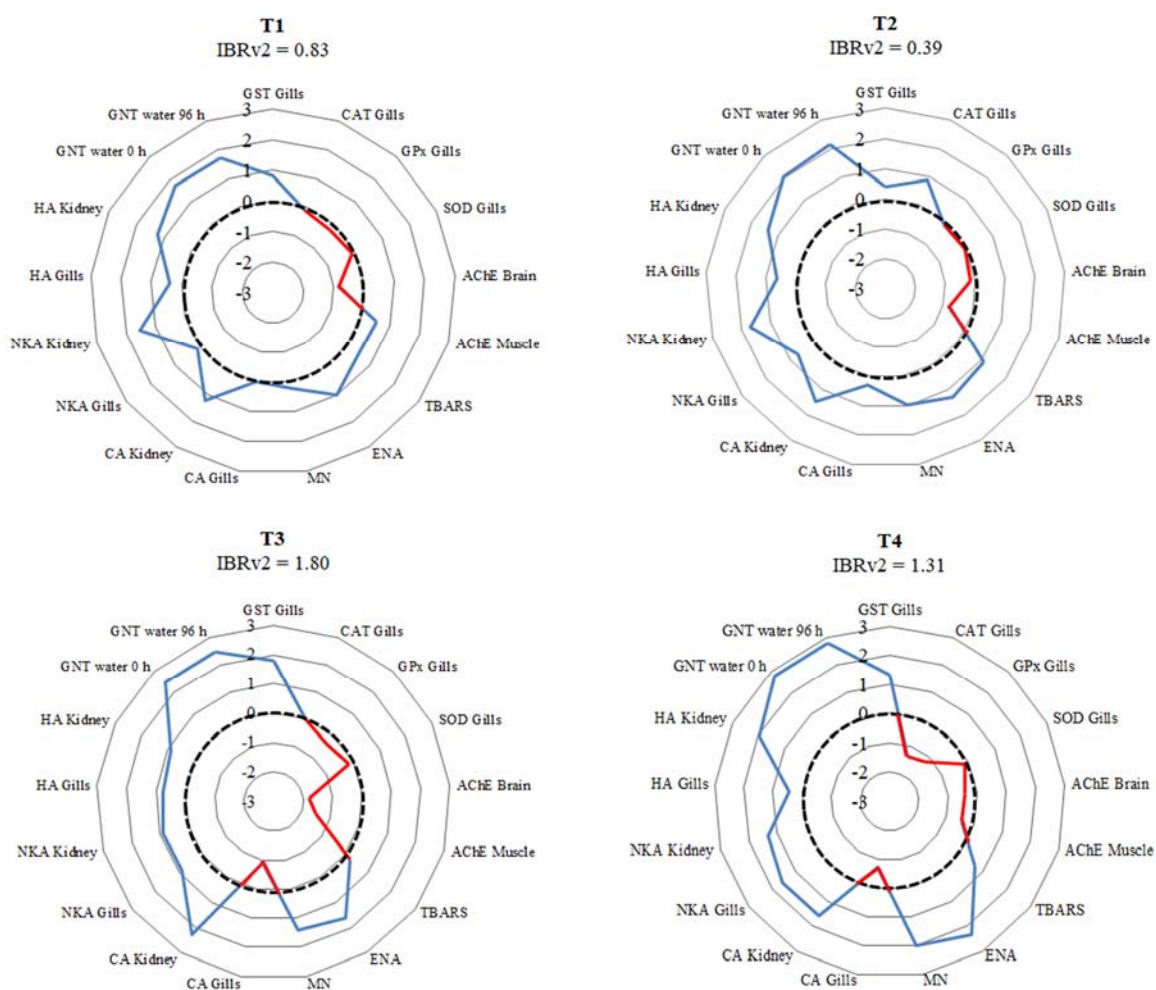


Figura 14. Índice de Resposta de Biomarcadores Integrados – Versão 2 (IBRv2) para guanitoxina na água (inicial e final do experimento), GST, CAT, GPx, SOD, AChE,

TBARS, ENA, MN, AC, NKA e HA em espécimes de *Oreochromis niloticus* expostos a diferentes concentrações da cepa ITEP-024 (T1 = 31,25 mg/L; T2 = 62,5 mg/L; T3 = 125 mg/L e T4 = 250 mg/L). Os resultados dos biomarcadores estão apresentados em relação ao tratamento de referência (grupo controle). As linhas azuis e vermelhas indicam regulação positiva e negativa, respectivamente.

7. DISCUSSÃO

Em nosso estudo, a cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* (cepa ITEP-024) apresentou potencial mutagênico por meio do teste de Ames (*Salmonella*/microsoma). Este ensaio é usado mundialmente como uma triagem inicial para determinar a mutagenicidade de produtos químicos e amostras ambientais (Zeiger, 2019). Nossas amostras testadas mostraram uma resposta positiva fraca para a cepa TA102 com e sem ativação metabólica por S9. Mutações na cepa TA102 podem ser revertidas por mutagênicos que causam danos oxidativos. Portanto, é usada especificamente para relatar estresse oxidativo (Grey e Adlercreutz, 2003; Levin et al., 1984; Mortelmans e Zeiger, 2000). Por outro lado, não houve mutagenicidade para as cepas TA98 e TA100.

Outros estudos também demonstraram o potencial mutagênico de cianobactérias por meio do teste de Ames; no entanto, nosso trabalho relata a primeira evidência de mutagenicidade de uma cepa produtora de guanitoxina. Ding et al. (1999) analisaram extratos de cianobactéria contendo microcistina (MC) e encontraram mutagenicidade para todas as cepas de *Salmonella* estudadas (TA97, TA98, TA100 e TA102). Por outro lado, Sieroslawska (2013) avaliou a mutagenicidade de toxinas puras (MC-LR, anatoxina-a e cilindrospermopsina) e não encontrou mutagenicidade. Já os extratos contendo as toxinas foram mutagênicos para algumas cepas de *Salmonella*. Desta forma, os autores sugerem que pode haver interação sinérgica entre toxinas e outros componentes celulares. Esse fato reforça a importância de estudar a cepa como um todo e não apenas a toxina isolada. As respostas da atividade mutagênica alertam para o risco biológico para a fauna aquática de um ecossistema contaminado com *S. torques-reginae*.

As tilápias estudadas (*O. niloticus*) apresentaram respostas tóxicas aos extratos aquosos da cepa ITEP-024 nas duas maiores concentrações testadas (125 e 250 mg/L).

Relatamos a primeira evidência de estresse oxidativo, genotoxicidade e alterações osmorregulatórias em peixes juvenis causados por uma cepa produtora de guanitoxina. Além disso, houve neurotoxicidade com inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e no músculo dos peixes. No entanto, é importante mencionar que os efeitos tóxicos causados em *O. niloticus* não podem ser atribuídos diretamente à guanitoxina, uma vez que os extratos são compostos também por outros metabólitos cianobacterianos, incluindo cianopeptídeos (anabaenopeptinas F e B, spumiginas e namalides) e aminoácidos do tipo micosporinas (Jacinavicius et al., 2020; Sanz et al., 2017). Os parâmetros físico-químicos da água permaneceram adequados considerando 96 horas de exposição e seguiram valores semelhantes aos encontrados na literatura, indicando boa qualidade (Coppo et al., 2019; Passos et al., 2020).

Notadamente, os peixes expostos à maior concentração do extrato da cepa ITEP-024 apresentaram alteração nas enzimas envolvidas no sistema de desintoxicação (GST) e no aparato antioxidante (CAT e SOD). As enzimas SOD, CAT e GPx atuam na linha de defesa primária do organismo, eliminando diretamente as espécies reativas de oxigênio (EROs) no metabolismo respiratório (Jones, 2006). A produção excessiva de EROs pode resultar em estresse oxidativo se as defesas antioxidantes forem insuficientes para removê-las, e pode ser definida como uma interrupção da sinalização e no controle redox. A SOD catalisa a conversão do ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), enquanto CAT e GPx reduzem H_2O_2 em H_2O (Aebi, 1984; Flohé e Ötting, 1984; Hopkins e Tudhope, 1973). A redução de SOD e CAT encontrada em nosso estudo pode levar ao acúmulo de O_2^- e H_2O_2 no organismo, respectivamente (Hamed et al., 2021). O excesso de H_2O_2 pode ser perigoso ao ser reduzido em radical hidroxila (OH^\cdot) por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, levando à peroxidação lipídica. Embora as enzimas SOD e CAT tenham diminuído no tratamento T4, TBARS (indicadores de

lipoperoxidação) não aumentaram em nenhum tratamento contaminado, indicando preservação das membranas lipídicas.

O aumento da GST encontrado em nosso estudo pode indicar um mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo, sugerindo ativação no sistema de biotransformação de fase II (Bouraoui et al., 2008). A GST é uma enzima que atua na conjugação de substâncias xenobióticas com a glutathiona reduzida (GSH), transformando-as em moléculas polares, para facilitar a degradação e excreção no organismo (Landi, 2000). De acordo com Pflugmacher et al. (1998), a GST também conjuga toxinas em vários organismos aquáticos. Desta forma, a conjugação catalisada pela GST é o primeiro passo para a desintoxicação do organismo (Pflugmacher et al., 1998). Osswald et al. (2013) encontraram um aumento na atividade da GST em *Oncorhynchus mykiss* (Salmonidae) expostos à anatoxina-a por 72 horas, sugerindo o envolvimento da GST na biotransformação desta neurotoxina. A anatoxina-a também induziu um aumento na atividade da GST em plantas aquáticas (Mitrovic et al., 2004). Para uma cepa produtora de guanitoxina, até onde sabemos, este é o primeiro relato de ativação do sistema de biotransformação em espécies de peixes expostos.

Os resultados de estresse oxidativo corroboram os dados do teste de Ames realizado com a ITEP-024, que apresentou resposta positiva à cepa TA102 de *Salmonella* (biomarcador de estresse oxidativo). Reforçamos que GST, SOD e CAT podem ser variáveis na presença de cianotoxinas (Falfushynska et al., 2021; Li et al., 2021; Sakuragui et al., 2019); sendo considerados biomarcadores essenciais no monitoramento da poluição de ambientes eutróficos. Alguns estudos relatam o mecanismo de algumas toxinas cianobacterianas (e.g., microcistinas e saxitoxinas) em organismos aquáticos (Assis et al., 2013; Amado e Monserrat, 2010; Christensen e Khan, 2020; Shahmohamadloo et al., 2022), no entanto, para a guanitoxina, além de seu conhecido

efeito inibidor da AChE, poucos são os relatos que evidenciam seu mecanismo de ação no aumento da formação de EROs e do consequente estresse oxidativo.

Com o estresse oxidativo causado em *O. niloticus*, a homeostase também pode ser prejudicada por cianotoxinas e demais componentes celulares. Quando absorvidos pelas brânquias, os metabólitos podem atingir a corrente sanguínea e afetar órgãos como o rim, causando disfunção celular e danos histopatológicos (Tavares et al., 2019). Os peixes teleósteos possuem mecanismos osmorregulatórios muito eficientes para manter a homeostase interna (Evans et al., 2005).

A anidrase carbônica (AC) foi ativada no rim (T2, T3 e T4), enquanto a H⁺ ATPase (HA) aumentou no rim (T2 e T4) e nas brânquias (T4). No rim, ocorre a absorção de HCO₃⁻ e a secreção de H⁺ para a acidificação da urina (Gilmour e Perry, 2009). Os rins reabsorvem todo o HCO₃⁻, sendo a AC responsável pelo transporte transepitelial. A HA secreta prótons H⁺ para o lúmen nos túbulos proximais, que combinam com o HCO₃⁻ luminal filtrado para formar CO₂ e H₂O (Purkerson e Schwartz, 2007). O aumento de HA e AC no rim pode estar relacionado ao contrabalanceamento da acidose sanguínea, provocada pelo aumento de H⁺ no organismo. Desta forma, o aumento das enzimas pode ter ocorrido para excretar H⁺ das células, e reestabelecer a regulação ácido-base no organismo para manter a homeostase.

Por outro lado, a enzima Na⁺ K⁺ ATPase (NKA) nas brânquias e nos rins permaneceram inalterados em todos os tratamentos, indicando preservação de sua função. Estudos anteriores com cianobactéria (*Microcystis aeruginosa*) e dinoflagelado (*Gymnodinium*) encontraram inibição da NKA em células branquiais cultivadas de truta arco-íris (Bury et al., 1998) e robalo (Sola et al., 1999), respectivamente. Janet et al. (2007) observaram que peixes *Rhabdosargus sarba* (Sparidae) expostos à alga

Chattonella marina apresentaram indução de NKA nas brânquias, indicando aumento da perfusão branquial em resposta ao estresse (Vieira e Martinez, 2018).

Além de estresse oxidativo e alterações osmorregulatórias, os peixes apresentaram danos neurotóxicos. A enzima AChE apresentou inibição de sua atividade cerebral (T3) e muscular (T4). Esta inibição indica que os compostos produzidos pela cepa ITEP-024 podem atravessar a barreira hematoencefálica dos peixes. A AChE é de fundamental importância para a finalização da transmissão dos impulsos nervosos, uma vez que hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina (ACh), impedindo a passagem contínua dos impulsos nervosos (Chatonnet e Lockridge, 1989). O mecanismo de ação da guanitoxina ocorre na junção neuromuscular do organismo (Carmichael, 1994). Depois que a neurotransmissão do neurônio motor para a fibra muscular cessa, a ACh é removida da fenda sináptica e hidrolisada em ácido acético e colina pela AChE. Com a guanitoxina presente no sistema neuromuscular, pode haver interação com a AChE, e a consequente inibição de sua atividade (Tuček, 1988).

O potencial de ação da guanitoxina é semelhante ao de organofosforados sintéticos, ligando-se irreversivelmente por meio de uma ligação covalente à AChE (Mahmood e Carmichael, 1986). Com a sua inibição, ocorre um aumento no acúmulo de ACh no cérebro, levando à superestimulação dos receptores colinérgicos. Essa superestimulação, por sua vez, pode causar um declínio no controle neural e muscular. Esse desequilíbrio pode causar alterações nas funções sinápticas e no sistema central do organismo (Čolović et al., 2013).

Nossos resultados corroboram com estudo de Monserrat et al. (2001), que avaliaram a toxicidade da guanitoxina em camundongos, cérebros de peixes (*Odontesthes argentinensis*) e gânglios torácicos de caranguejo (*Callinectes sapidus*), e detectaram 50% de inibição na atividade da AChE. Santos et al. (2019) analisaram o efeito do extrato

bruto da ITEP-024 contendo guanitoxina em baratas d'água. Eles observaram inibição da AChE, redução da atividade locomotora, além de alterações comportamentais e neuromusculares. Freitas et al. (2016) também relataram inibição da AChE em espécies de *Daphnia* sp, além de mudanças nos níveis populacionais desses organismos.

Além de todos esses efeitos causados pela exposição dos peixes à cepa ITEP-024, foram detectados danos genotóxicos em peixes expostos aos tratamentos T3 e T4. O estresse oxidativo induzido pela cepa ITEP-024, especialmente pelos resultados de CAT, SOD e GST, podem explicar a genotoxicidade observada em eritrócitos de *O. niloticus*, uma vez que as EROs podem levar a defeitos mitóticos. Os xenobióticos podem ter potencial genotóxico ao afetar a integridade cromossômica (Venturoti et al., 2019). Desta forma, os peixes podem sofrer danos que prejudicam a migração cromossômica durante a mitose, resultando na formação de micronúcleos e outras anormalidade nucleares eritrocíticas. Biomarcadores genotóxicos são ferramentas eficientes para detecção de danos em organismos expostos a diferentes tipos de xenobióticos, e vários estudos demonstraram a genotoxicidade de cianobactérias em organismos aquáticos (Calado et al., 2020; Falfushynska et al., 2021; Oyeniran et al., 2021). Esses resultados reforçam o potencial mutagênico da cepa ITEP-024 detectado pelo teste de Ames na cepa TA102 (*Salmonella*).

Apesar dos danos deletérios indicados por diferentes biomarcadores em peixes expostos aos extratos aquosos da cepa ITEP-024, não foi detectada a bioacumulação de guanitoxina nos diferentes tecidos estudados (cérebro, sangue, brânquias, fígado e músculo). Sugerimos que a não detecção da guanitoxina nos tecidos dos peixes pode estar relacionada à sua conjugação com outros compostos, à instabilidade da molécula ou à sua degradação ao longo do período experimental.

Finalmente, o IBRv2 foi calculado para avaliar a resposta dos múltiplos biomarcadores em *O. niloticus* contaminados com a cepa ITEP-024. Os resultados mostraram que os tratamentos T3 e T4 foram os mais nocivos aos peixes, sendo os biomarcadores bioquímicos, genotóxicos e osmorregulatórios, além da guanitoxina na água do experimento, os principais reguladores. Apesar da grande preocupação relacionada à presença da guanitoxina em florações em ecossistemas aquáticos, os estudos relacionados à sua toxicidade em animais aquáticos ainda são escassos e as investigações para o conhecimento dos efeitos deletérios em peixes são quase inexistentes. Portanto, contribuímos com informações sem precedentes para a literatura científica sobre a toxicidade de uma cepa produtora de guanitoxina em *O. niloticus*. É fundamental compreender os danos deletérios nos peixes, um táxon importante para os ecossistemas aquáticos, com diferentes nichos e funções ecológicas.

8. CONCLUSÕES

Em conclusão, *S. torques-reginae* (cepa ITEP-024) foi mutagênica para a cepa TA102 de *Salmonella* e afetou a saúde de *O. niloticus* nas duas maiores concentrações ambientalmente relevantes estudadas (125 e 250 mg/L), resultando em neurotoxicidade (cérebro e músculo), estresse oxidativo (brânquias), danos genotóxicos (eritrócitos) e ativação de enzimas osmorregulatórias (brânquias e rim). Portanto, nosso trabalho apresentou resultados inéditos de mutagenicidade para uma cianobactéria produtora de guanitoxina e contribuiu para o entendimento geral dos aspectos bioquímicos, osmorregulatórios e genotóxicos dessa cepa em tilápias, fornecendo eficientes biomarcadores de contaminação aquática. Finalmente, nossas descobertas aumentam a importância de compreender os efeitos agudos da guanitoxina no meio ambiente, e recomendamos que seu monitoramento faça parte da política de saúde pública governamental.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. 1984. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

[https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3).

AGUILERA, A.; HAAKONSSON, S.; MARTIN, M.V.; SALERNO, G.L.; ECHENIQUE, R.O. Bloom-forming cyanobacteria and cyanotoxins in Argentina: A growing health and environmental concern. **Limnologia**, v. 69, p. 103-114, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.limno.2017.10.006>.

AHERN, M.D.; MORRIS, S. Accumulation of lead and its effects on Na balance in the freshwater crayfish *Cherax destructor*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 281, p. 270-279, 1998. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19980701\)281:4<270::AID-JEZ3>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19980701)281:4<270::AID-JEZ3>3.0.CO;2-L).

AMADO, L.L.; MONSERRAT, J.M. Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: Why and how. **Environmental International**, v. 36, p. 226-235, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.10.010>.

APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, Washington, USA, 1989.

ASSIS, H.C.S.; SILVA, C.A.; OBA, E.T.; PAMPLONA, J.H.; MELA, M.; DORIA, H.B.; GUILOSKI, I.C.; RAMSDORF, W.; CESTARI, M.M. Hematologic and hepatic responses of the freshwater fish *Hoplias malabaricus* after saxitoxin exposure. **Toxicon**, v. 66, p. 25-30, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.01.012>.

BELIAEFF, B.; BURGEOT, T. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, p. 1316-1322, 2002. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210629>.

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, M.C. An empirical approach to the statistical analysis of Mutagenesis data from the *Salmonella* test. **Mutation Research**, v. 97, p. 267-281, 1982. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(82\)90026-7](https://doi.org/10.1016/0165-1161(82)90026-7).

BLAKEFIELD, M.K.; HARRIS, D.O. Delay of cell differentiation in *Anabaena aequalis* caused by uv-b radiation and the role of photoreactivation and excision repair. **Photochemistry and Photobiology**, v. 59, p. 204-208, 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1994.tb05023.x>.

BŁASZCZYK, A.; SIEDLECKA-KROPLEWSKA, K.; WOŹNIAK, M.; MAZUR-MARZEC, H. Presence of β -N-methylamino-L-alanine in cyanobacteria and aquatic organisms from waters of Northern Poland; BMAA toxicity studies. **Toxicon**, v. 194, p. 90-97, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.02.007>.

BOURAOUI, L.; GUTIERREZ, J.; NAVARRO, I. Regulation of proliferation and differentiation of adipocyte precursor cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Endocrinology**, v. 198, p. 459-469, 2008. <https://doi.org/10.1677/joe-08-0264>.

BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Proteine-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of antihypertensive agents. **Mutation Research**, v. 612, p. 115-149, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2005.12.002>.

BURY, N.R.; NEWLANDS, A.D.; EDDY, F.B.; CODD, G.A. In vivo and in vitro intestinal transport of 3H-microcystin-LR, a cyanobacterial toxin, in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, v. 42, p. 139-148, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(98\)00041-1](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00041-1).

CALADO, S.L.M.; SANTOS, G.S.; VICENTINI, M.; DEIVYSON, B.C.B.; PRODOCIMO, V.; MAGALHÃES, V.F.; CESTARI, M.M.; ASSIS, H.C.S. Multiple biomarkers response in a Neotropical fish exposed to paralytic shellfish toxins (PSTs). **Chemosphere**, v. 238, p. 124616, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124616>.

CARDOSO, C.R.P.; CÓLUS, I.M.S.; BERNARDI, C.C.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A. Mutagenic activity promoted by amentoflavone methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Toxicology**, v. 225, p. 55-63, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2006.05.003>.

CARMICHAEL, W.W. The toxins of cyanobacteria. **Scientific American**, v. 270, p. 78-86, 1994. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0194-78>.

CARMICHAEL, W.W.; GORHAM, P.R. Anatoxins from clones of *Anabaena flos-aquae* isolated from lakes of western Canada. **Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie: Mitteilungen**, v. 21, p. 285-295, 1978. <https://doi.org/10.1080/05384680.1978.11903972>.

CARMICHAEL, W.W.; MAHMOOD, N.A.; HYDE, E.G. Natural Toxins from Cyanobacteria (Blue-Green Algae), in: Marine Toxins, ACS Symposium Series. **American Chemical Society**, p. 6-87, 1990. <https://doi.org/10.1021/bk-1990-0418.ch006>.

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; MYERS, M.S. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, p. 2123-2136, 1990. <https://doi.org/10.1139/f90-237>.

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **Biochemical Journal**, v. 260, p. 625-634, 1989. <https://doi.org/10.1042/bj2600625>.

CHEN, L.; XIE, P. Mechanisms of Microcystin-induced Cytotoxicity and Apoptosis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 1018-1031, 2016. <https://doi.org/10.2174/1389557516666160219130407>. PMID: 26891929.

CHITTORA, D.; MEENA, M.; BARUPAL, T.; SWAPNIL, P.; SHARMA, K. Cyanobacteria as a source of biofertilizers for sustainable agriculture. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 22, p. 100737, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100737>.

CHORUS, I.; WELKER, M. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management, second ed. CRC Press, 2021.

CHRISTENSEN, V.G.; KHAN, E. Freshwater neurotoxins and concerns for human, animal, and ecosystem health: A review of anatoxin-a and saxitoxin. **Science of the Total Environment**, v. 736, p. 139515, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139515>.

CLAIBORNE, J.B.; EDWARDS, S.L.; MORRISON-SHETLAR, A.I. Acid–base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. **Journal of Experimental Zoology**, v. 293, p. 302-319, 2002. <https://doi.org/10.1002/jez.10125>.

CLAXTON, L.D.; UMBUZEIRO, G.A.; DEMARINI, D.M. The Salmonella mutagenicity assay: the stethoscope of genetic toxicology for the 21st century. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, p. 1515-1522, 2010. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002336>.

CODD, G.A.; MORRISON, L.F.; METCALF, J.S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, p. 264-272, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.02.016>.

ČOLOVIĆ, M.B.; KRSTIĆ, D.Z.; LAZAREVIĆ-PAŠTI, T.D.; BONDŽIĆ, A.M.; VASIĆ, V.M. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, p. 315-335, 2013. <https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006>.

COPPO, G.C.; PASSOS, L.S.; LOPES, T.O.M.; PEREIRA, T.M.; MERÇON, J.; CABRAL, D.S.; CHIPARI-GOMES, A.R. Genotoxic, biochemical and bioconcentration effects of manganese on *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). **Ecotoxicology**, v. 27, p. 1150-1160, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1970-0>.

DING, W.X.; SHEN, H.M.; ZHU, H.G.; LEE, B.L.; ONG, C.N. Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China. **Mutation Research**, v. 442, p. 69-77, 1999. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(99\)00064-9](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(99)00064-9).

DORR, F.A.; RODRÍGUEZ, V.; MOLICA, R.; HENRIKSEN, P.; KROCK, B.; PINTO, E. Methods for detection of anatoxin-a (s) by liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Toxicon**, v. 55, p. 92-99, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.07.017>.

EKINCI, D.; BEYDEMİR, Ş. Risk assessment of pesticides and fungicides for acid–base regulation and salt transport in rainbow trout tissues. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, p. 66-70, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.12.006>.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.J.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-90, 1961. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).

EVANS, D.H.; PIERMARINI, P.M.; CHOE, K.P. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiological Reviews**, v. 85, p. 97-177, 2005. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2003>.

EVANS, D.M.; HUGHES, J.; JONES, L.F.; MURPHYA, P.J.; FALFUSHYNSKA, H.; HORYN, O.; SOKOLOVA, I.M.; CHRISTENSEN, J.; COLESD, S.J.; RZYMSKI, P. Elucidating cylindrospermopsin toxicity via synthetic analogues: An in vitro approach. **Chemosphere**, v. 234, p. 139-147, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.021>.

FALFUSHYNSKA, H.; OKSANA, H.; INNA, O.; PIOTR, R.; ŁUKASZ, W.; DZIUBA, M.K.; SOKOLOVA, I.M. Multibiomarker-based assessment of toxicity of central European strains of filamentous cyanobacteria *Aphanizomenon gracile* and *Raphidiopsis raciborskii* to zebrafish *Danio rerio*. **Water Research**, v. 194, p. 116923, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116923>.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture. Contributing to food security and nutrition for all. Rome, 2016. <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>.

FAZIO, F. Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: A review. **Aquaculture**, v. 500, p. 237-242, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.030>.

FERNANDES, K.; FERRAZ, H.; VERAU, F.; PINTO, E. Availability of Guanitoxin in Water Samples Containing *Sphaerospermopsis torques-reginae* Cells Submitted to Dissolution Tests. **Pharmaceuticals**, v. 13, p. 402, 2020. <https://doi.org/10.3390/ph13110402>.

FIGLIORE, M.F.; LIMA, S.T.; CARMICHAEL, W.W.; MCKINNIE, S.M.K.; CHEKAN, J.R.; MOORE, B.S. Guanitoxin, re-naming a cyanobacterial organophosphate toxin. **Harmful Algae**, v. 92, p. 101737, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101737>.

FLOHÉ, L.; OTTING, F. Superoxide Dismutase assay. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-125, 1984. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05013-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05013-8).

FREITAS, E.C.; PRINTES, L.B.; ROCHA, O. Use of cholinesterase activity as an ecotoxicological marker to assess anatoxin-a (s) exposure: Responses of two cladoceran species belonging to contrasting geographical regions. **Harmful Algae**, v. 55, p. 150-162, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.03.005>.

GARCIA, F.; ROMERA, D.M.; GOZI, K.S.; ONAKA, E.M.; FONSECA, F.S.; SCHALCH, S.H.C.; PORTELLA, M.C. Stocking density of Nile tilapia in cages placed in a hydroelectric reservoir. **Aquaculture**, v. 410-411, p. 51-56, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.06.010>.

GERALDES, V.; JACINAVICIUS, F.R.; GENUÁRIO, D.B.; PINTO, E. Identification and distribution of mycosporine-like amino acids in Brazilian cyanobacteria by UHPLC-DAD-QTOF. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 34, p. 8634, 2019. <https://doi.org/10.1002/rcm.8634>.

GILMOUR, K.M.; PERRY, S.F. Carbonic anhydrase and acid–base regulation in fish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 212, p. 1647-1661, 2009. <https://doi.org/10.1242/jeb.029181>.

GREY, C.E.; ADLERCREUTZ, P. Ability of antioxidants to prevent oxidative mutations in *Salmonella typhimurium* TA102. **Mutation. Research**, v. 527, p. 27-36, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(03\)00054-X](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(03)00054-X).

GRISOLIA, C.K.; OLIVEIRA, A.B.B.; BONFIM, H.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M.N. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. **Genetic Molecular Biology**, v. 28, p. 334-338, 2005. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572005000200026>.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

HAMED, H.S.; ISMAL, S.M.; FAGGIO, C. Effect of allicin on antioxidant defense system, and immune response after carbofuran exposure in Nile tilapia, *Oreochromis*

niloticus. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology**, v. 240, p. 108919, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108919>.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W.G.; STOREY, K.B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylenol orange complex formation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, p. 271-280, 1995. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)00020-X](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)00020-X).

HOPKINS, J.; TUDHOPE, G.R. Glutathione Peroxidase in human red cells in health and disease. **British Journal of Haematology**, v. 25, p. 563-575, 1973. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1973.tb01768.x>.

HUANG, I.S.; ZIMBA, P.V. Cyanobacterial bioactive metabolites - A review of their chemistry and biology. **Harmful Algae**, v. 83, p. 42-94, 2019. <https://doi:10.1016/j.hal.2018.11.008>.

JACINAVICIUS, F.R.; GERALDES, V.; CRNKOVIC, C.M.; ENDREWS, D.; FIORE, M.F.; PINTO, E. Effect of ultraviolet radiation on the metabolomic profiles of potentially toxic cyanobacteria. **FEMS Microbiology and Ecology**, v. 97, p. 1-16, 2020. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa243>.

JANET Y.M.; TANG, C.K.C.; WONG, D.; AU, W.T. The ichthyotoxic alga *Chattonella marina* induces Na⁺, K⁺-ATPase, and CFTR proteins expression in fish gill chloride cells in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 353, p. 98-103, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.126>.

JONES, D.P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, p. 1865-1879, 2006. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1865>.

KULTZ, D.; SOMERO, G.N. Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 198, p. 1883-1894, 1995. <https://doi.org/10.1242/jeb.198.9.1883>.

LANDI, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 463, p. 247-283, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(00\)00050-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(00)00050-8).

LE MANACH, S.; DUVAL, C.; MARIE, A.; DJEDIAT, C.; CATHERINE, A.; EDERY, M.; MARIE, B. Global Metabolomic Characterizations of *Microcystis* spp. Highlights Clonal Diversity in Natural Bloom-Forming Populations and Expands Metabolite Structural Diversity. **Frontiers in Microbiology**, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00791>.

LEVIN, D.E.; MARNETT, L.J.; AMES, B.N. Spontaneous and mutagen-induced deletions: mechanistic studies in *Salmonella* tester strain TA102. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, p. 4457-4461, 1984. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.14.4457>.

LI, H.; GU, X.; CHEN, H.; MAO, Z.; ZENG, Q.; YANG, H.; KAN, K. Comparative toxicological effects of planktonic *Microcystis* and benthic *Oscillatoria* on zebrafish

embryonic development: Implications for cyanobacteria risk assessment. **Environment Pollution**, v. 274, p. 115852, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115852>.

LOPES, T.O.M.; PASSOS, L.S.; VIEIRA, L.V.; PINTO, E.; DORR, F.; SCHERER, R.; SALUSTRIANO, N.A.; CARNEIRO, M.T.W.D.; POSTAY, L.F.; GOMES, L.C. Metals, arsenic, pesticides, and microcystins in tilapia (*Oreochromis niloticus*) from aquaculture parks in Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 127, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08493-x>.

MAHMOOD, N.A.; CARMICHAEL, W.W. The pharmacology of anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. **Toxicon**, v. 24, p. 425-434, 1986. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(86\)90074-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(86)90074-7).

MARIE, B. Disentangling of the ecotoxicological signal using “omics” analyses, a lesson from the survey of the impact of cyanobacterial proliferations on fishes. **Science of the Total Environment**, p. 139701, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139701>.

MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, p. 173-215, 1983. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9).

MIAO, R.; XIE, H.; LIU, X.; LINDBERG, P.; LINDBLAD, P. Current processes and future challenges of photoautotrophic production of acetyl-CoA-derived solar fuels and

chemicals in cyanobacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 59, p. 69-76, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.04.013>.

MIRANDA, T.O.; LIMA, H.S.; GALON, B.; VERONEZ, A.C.; MORETTI, M.S.; ROPER, J.; GOMES, L.C. Changes in water quality and the phytoplankton community associated with tilapia cage farming in tropical lakes. **Aquatic Living Resources**, v. 29, p. 403, 2016. <https://doi.org/10.1051/alr/2016029>.

MITROVIC, S.M.; PFLUGMACHER, S.; JAMES, K.J.; FUREY, A. Anatoxin-a elicits an increase in peroxidase and glutathione S-transferase activity in aquatic plants. **Aquatic Toxicology**, v. 68, p. 185-192, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.017>.

MOLICA, R.J.R.; OLIVEIRA, E.J.A.; CARVALHO, P.V.V.C.; COSTA, A.N.S.F.; CUNHA, M.C.C.; MELO, G.L.; AZEVEDO, S.M.F.O. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. **Harmful Algae**, v. 4, p. 743-753, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2004.11.001>.

MONSERRAT, J.M.; YUNES, J.S.; BIANCHINI, A. Effects of *Anabaena spiroides* (cyanobacteria) aqueous extracts on the acetylcholinesterase activity of aquatic species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 1228-1235, 2001. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200611>.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, p. 29-60, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00064-6).

NAPIÓRKOWSKA-KRZEBIETKE, A; KALINOWSKA, K.; BOGACKA-KAPUSTA, E.; STAWECKI, K.; TRACZUK, P. Persistent blooms of filamentous cyanobacteria in a cormorant-affected aquatic ecosystem: Ecological indicators and consequences. **Ecological Indicators**, v. 124, p. 107421, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107421>.

NGONIDZASHE, A.G.; MMADITSHABA, M.; RAPATSA, M. A review of the factors affecting tilapia aquaculture production in Southern Africa. **Aquaculture**, v. 535, p. 736386, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736386>.

OBIAKOR, M.O.; OKONKWO, J.C.; EZEONYEJIAKU, C.D. Genotoxicity of freshwater ecosystem shows DNA damage in preponderant fish as validated by in vivo micronucleus induction in gill and kidney erythrocytes. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 775-776, p. 20-30, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.09.010>.

OECD. Test n° 471: Bacterial Reverse Mutation Test, 2020. <https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>.

ORR, A.L.; LOHSE, L.A.; DREW, K.L.; HERMES-LIMA, M. Physiology oxidative stress after arousal from hibernation in Arctic ground squirrel. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular**, v. 153, p. 213-221, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.02.016>.

OSSWALD, J.; CARVALHO, A.P.; GUIMARÃES, L.; GUILHERMINO, L. Toxic effects of pure anatoxin-a on biomarkers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Toxicon**, v. 70, p. 162-169, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.04.014>.

OYENIRAN, D.O.; TEMITOPE, O.; SOGBANMU, A.T.A. Antibiotics, algal evaluations and subacute effects of abattoir wastewater on liver function enzymes, genetic and haematologic biomarkers in the freshwater fish, *Clarias gariepinus*. **Ecotoxicology and Environment Safety**, v. 212, p. 111982, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.111982>.

PAGELS, F.A.; GUEDES, C.; AMARO, H.M.; KIJJOA, A.; VASCONCELOS, V. Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 37, p. 422-443, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.010>.

PASSOS, L.S.; GNOCCHI, K.G.; PEREIRA, T.M.; COPPO, G.C.; CABRAL, D.S.; GOMES, L.C. Is the Doce River elutriate or its water toxic to *Astyanax lacustris* (Teleostei: Characidae) three years after the Samarco mining dam collapse? **Science of the Total Environment**, v. 736, p. 139644, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139644>.

PATEL, A.; MATSAKAS, L.; ROVA, U.; CHRISTAKOPOULOS, P. A perspective on biotechnological applications of thermophilic microalgae and cyanobacteria. **Bioresource Technology**, v. 278, p. 424-434, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.063>.

PFLUGMACHER, S.; WIEGAND, C.; OBEREMM, A.; BEATTIE, K.A.; KRAUSE, E.; CODD, G.A.; STEINBERG, C.E.W. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. **Aquatic Toxicology**, v. 1425, p. 527-533, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(98\)00107-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(98)00107-X).

PIRINCCIOGLU, A. G.; GÖKALP, D.; PIRINCCIOGLU, M.; KIZIL, G.; KIZIL, M. Malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl (PCO) levels as biomarkers of oxidative stress in subjects with familial hypercholesterolemia. **Clinical biochemistry**, v. 43, p. 1220-1224, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.07.022>.

PRIETO, A.L.; GUZMÁN-GUILLÉN, R.; JOS, A.; CAMEÁN, A.M.; ROSA, J.M.; GONZÁLEZ-PÉREZ, J.A. Detection of cylindrospermopsin and its decomposition products in raw and cooked fish (*Oreochromis niloticus*) by analytical pyrolysis (Py-GC/MS). **Chemosphere**, v. 244, p. 125469, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125469>.

PRODOCIMO, V.; SINZKER, R.C.; STREY, L.; FREIRE, C.A. Physiological biomarkers in a resident and a non-resident estuarine teleosts species: a comparison between fish from an industrially impacted site and a non-impacted site. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 48, p. 117-134, 2015. <https://doi.org/10.1080/10236244.2015.1018022>.

PRUGH, A.M.; COLE, S.D.; GLAROS, T.; ANGELINI, D.J. Effects of organophosphates on the regulation of mesenchymal stem cell proliferation and

differentiation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 266, p. 38–46, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.01.020>.

PURKERSON, J.M.; SCHWARTZ, G.J. The role of carbonic anhydrases in renal physiology. **Kidney International**, v. 71, 103-115, 2007. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002020>.

QIAO, Q.; LE MANACH, S.; HUET, H.; DUVERNOIS-BERTHET, E.; CHAOUCH, S.; DUVAL, C.; MARIE, B. An integrated omic analysis of hepatic alteration in medaka fish chronically exposed to cyanotoxins with possible mechanisms of reproductive toxicity. **Environmental Pollution**, v. 219, p. 119-131, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.029>.

RAMOS-VASCONCELOS, G.R.; HERMES-LIMA, M. Hypometabolism antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa*. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, p. 675-685, 2003. <https://doi.org/10.1242/jeb.00124>.

RODGERS, K.J.; MAIN B.J.; SAMARDZIC K. Cyanobacterial neurotoxins: their occurrence and 724 mechanisms of toxicity. **Neurotoxicity Research**, v. 33, p. 168-177, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9757-2>.

RORIZ, G.D.; DELPHINO, M.K.G.C.; GARDNER, I.A.; GONÇALVES, V.S.P. Characterization of tilapia farming in net cages at a tropical reservoir in Brazil. **Aquaculture Reports**, v. 6, p. 43-48, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.03.002>.

SAKURAGUI, M.M.; PAULINO, M.G.; SOUZA, N.E.S.; TAVARES, D.; TEREZAN, A.P.; PESENTI, E.; GIANI, A.; FERNANDES, J.B.; CESTARI, M.M.; FERNANDES, M.N. Crude extract of cyanobacterium *Radiocystis fernandoi* strain R28 induces anemia and oxidative stress in fish erythrocytes. **Toxicon**, v. 169, p. 18-24, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.08.002>.

SANCHEZ, W.; BURGEOT, T.; PORCHER, J.M. A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, p. 2721-2725, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1359-1>.

SANTOS, D.S.; ROSA, M.E.; ZANATTA, A.P.; OLIVEIRA, R.S.; ALMEIDA, C.G.M.; LEAL, A.P.; SANZ, M.; FERNANDES, K.A.; SOUZA, V.Q.; ASSIS, D.R.; PINTO, E.; BELO, C.A.D. Neurotoxic effects of sublethal concentrations of cyanobacterial extract containing anatoxin-a (s) on *Nauphoeta cinerea* cockroaches. *Ecotoxicology Environmental and Safety*, v. 171, p. 138-145, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.068>.

SANZ, M.; SALINAS, R.K.; PINTO, E. Namalides B and C and Spumigins K-N from the Cultured Freshwater Cyanobacterium *Sphaerospermopsis torques-reginae*. **Journal of Natural Products**, v. 80, p. 2492-2501, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00370>.

SHAHMOHAMADLOO, R.S.; ALMIRALL, X.O.; SIMMONS, D.B.D.; POIRIER, D.G.; BHAVSAR, S.P.; SIBLEY, P.K. Fish tissue accumulation and proteomic response

to microcystins is species-dependent. **Chemosphere**, v. 287, p. 132028, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132028>.

SIEROSLAWSKA, A. Assessment of the mutagenic potential of cyanobacterial extracts and pure cyanotoxins. **Toxicon**, v. 74, p. 76-82, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.07.029>.

SOLA, F.; MASONI, A.; FOSSAT, B.; PORTHÉ-NIBELLE, J.; GENTIEN, P.; BODENNEC, G. Toxicity of fatty acid 18: 5n3 from *Gymnodinium cf. mikimotoi*: I. Morphological and biochemical aspects on *Dicentrarchus labrax* gills and intestine. **Journal of Applied Toxicology**, v. 19, p. 279-284, 1999.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1263\(199907/08\)19:4<279::AIDJAT579>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1263(199907/08)19:4<279::AIDJAT579>3.0.CO;2-X).

SOLIÑO, L.; GOUVEIA, N.; TIMÓTEO, V.; COSTA, P.R. New insights into the occurrence of paralytic shellfish toxins in the oceanic pufferfish *Lagocephalus lagocephalus* (Linnaeus, 1758) from Madeira Island, Portugal. **Regional Studies in Marine Science**, v. 42, p. 101657, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101657>.

SOTTON, B.; PARIS, A.; MANACH, S.L.; BLOND, A.; DUVAL, C.; QIAO, Q.; CATHERINE, A.; COMBES, A.; PICHON, V.; BERNARD, C.; MARIE, B. Specificity of the metabolic signatures of fish from cyanobacteria rich lakes. **Chemosphere**, v. 226, p. 183-191, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.115>.

TAVARES, D.; PAULINO, M.G.; TEREZAN, A.P.; FERNANDES, J.B.; GIANI, A.; FERNANDES, M.N. Osmoregulatory disturbance in Neotropical fish exposed to the crude extracts of the cyanobacterium, *Radiocystis fernandoi*. **Aquatic Toxicology**, v. 216, p. 105315, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105315>.

THOMPSON, R.A.; ISIN, E.M.; OGESE, M.O.; METTETAL, J.T.; WILLIAMS, D.P. Reactive Metabolites: Current and Emerging Risk and Hazard Assessments. **Chemical Research in Toxicology**, v. 18, p. 505-533, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00410>.

TUČEK, S. Choline Acetyltransferase and the Synthesis of Acetylcholine. **Handbook of Experimental Pharmacology**, p. 125-165, 1988. https://doi.org/10.1007/978-3-642-73220-1_7.

VENTUROTI, G.P.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; KIFFER, W.P.; FRANCISCO, A.P.; GOMES, A.S.; GOMES, L.C. Toxic effects of ornamental stone processing waste effluents on *Geophagus brasiliensis* (Teleostei: Cichlidae). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 72, p. 103268, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103268>.

VIEIRA, C.E.D.; MARTINEZ, C.B.R. The pyrethroid λ -cyhalothrin induces biochemical, genotoxic, and physiological alterations in the teleost *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 210, p. 958-967, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.115>.

VITALE, A.M.; MONSERRAT, J.M.; CASTILHO, P.; RODRIGUEZ, E.M. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 122, p. 121-129, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(98\)10094-4](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(98)10094-4).

WERNER, V.R.; LAUGHINGHOUSE, H.D.; FIORE, M.F.; SANT'ANNA, C.L.; HOFF, C.; SANTOS, K.R.S.; NEUHAUS, E.B.; MOLICA, R.J.R.; HONDA, R.Y.; ECHENIQUE, R.O. Morphological and molecular studies of *Sphaerospermopsis torques-reginae* (Cyanobacteria, Nostocales) from South American water blooms. **Phycologia**, v. 51, p. 228-238, 2012. <https://doi.org/10.2216/11-32.1>.

ZEIGER, E. The test that changed the world: The Ames test and the regulation of chemicals. **Mutation Research**, v. 841, p. 43-48, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.05.007>.

ZHANG, Y.; WHALEN, J.K. Production of the neurotoxin beta-N-methylamino-l-alanine may be triggered by agricultural nutrients: An emerging public health issue. **Water Research**, v. 170, p. 115335, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115335>.

ZWARG, J.R.R.M.; MORALES, D.A.; MASELLI, B.S.; BRACK, W.; UMBUZEIRO, G.A. Miniaturization of the microsuspension *Salmonella*/microsome assay in agar microplates. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 59, p. 488-501, 2018. <https://doi.org/10.1002/em.22195>.