

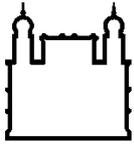
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

EFEITO SUBLETAL DA CIANOBACTÉRIA *Cylindrospermopsis raciborskii* (WOLOSZYNSKA, 1912) NA ATIVIDADE LOCOMOTORA DE *Poecilia vivipara* BLOCH E SCHNEIDER, 1801 (POECILIIDAE) E NA MOTILIDADE DE *Pygidiopsis macrostomum* TRAVASSOS, 1928 (HETEROPHYIDAE)

KARINA CORRÊA LOPES

Rio de Janeiro  
Junho de 2016



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde**

*KARINA CORRÊA LOPES*

Efeito Subletal da Cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska, 1912) na Atividade Locomotora de *Poecilia vivipara* Bloch e Schneider, 1801 (Poeciliidae) e na motilidade de *Pygidiopsis macrostomum* Travassos, 1928 (Heterophyidae)

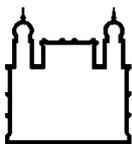
Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Saúde

**Orientadora:** Dra. Cláudia Portes Santos Silva

**Co-orientador:** Dr. Aloysio da Silva Ferrão-Filho

**RIO DE JANEIRO**

Junho de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde**

**Karina Corrêa Lopes**

Efeito Subletal da Cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska, 1912) na Atividade Locomotora de *Poecilia vivipara* Bloch e Schneider, 1801 (Poeciliidae) e na motilidade de *Pygidiopsis macrostomum* Travassos, 1928 (Heterophyidae)

**ORIENTADORA: Dra. Claudia Portes Santos Silva**

**CO-ORIENTADOR: Dr. Aloysio da Silva Ferrão-Filho**

**Aprovada em:** 15 de junho de 2016

**EXAMINADORES:**

Dr Darcílio Fernandes Baptista (FIOCRUZ/RJ) – Presidente

Dra Betina Kozlowsky-Suzuki (UNIRIO/RJ)

Dra Beatriz Brener de Figueiredo (UFF/RJ)

Dra Simone Chincz Cohen (FIOCRUZ/RJ)

Dra Maria Isabel de Almeida Rocha (UNIRIO/RJ)

Rio de Janeiro

Junho de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

L864 Lopes, Karina Corrêa

Efeito subletal da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska, 1912) na atividade locomotora de *Poecilia vivipara* Bloch e Schneider, 1801 (Poeciliidae) e na motilidade de *Pygidiopsis macrostomum* Travassos, 1928 (Heterophyidae) / Karina Corrêa Lopes. – Rio de Janeiro, 2016.

xii, 72 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2016.

Bibliografia: f. 52-59

1. Cianobactéria. 2. Saxitoxina. 3. *Poecilia vivipara*. 4. *Pygidiopsis macrostomum*. I. Título.

CDD 579.39

Dedico esse trabalho à minha filha  
Rafaela, que me motiva a superar todos  
os obstáculos que surgem no caminho e  
a nunca pensar em desistir.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família, aos meus pais e irmãos por todo amor e carinho, ao meu marido Rafael pela ajuda e compreensão. À minha filha Rafaela, por ser uma pessoa tão doce e amável e me mostrar a cada dia que a felicidade está nas coisas mais simples da vida.

À minha orientadora, Dra. Cláudia Portes por ter permitido o meu retorno após três anos afastada do laboratório, pelo apoio em alguns momentos difíceis que passei ao longo desses dois anos e por ser um exemplo de ética e comprometimento com a pesquisa.

Ao meu co-orientador, Dr. Aloysio Ferrão-Filho por ter me apresentado uma área de pesquisa muito importante e interessante e até então desconhecida por mim. Pelos ensinamentos, paciência e disponibilidade em todos os momentos.

Aos meus amigos de laboratório, Ana Carolina, Ana Cristina, Juliana, Everton, Vanessa, Viviane e Ronaldo que foram fundamentais para realização desse projeto.

À todos do Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz (LAPSA-IOC), em especial ao Dr. José Augusto dos Santos, Sr. Rodolfo Cunha, Sr. Fábio Abreu e Msc. Mario Gatti pela imensa ajuda, atenção e gentileza.

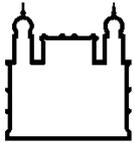
Ao Sr. Orlando Marins da colônia de pescadores da Lagoa Rodrigo de Freitas pela ajuda nas coletas de peixes.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde pelos ensinamentos que contribuíram muito para minha formação acadêmica.

À CAPES, FAPERJ, CNPq e Instituto Oswaldo Cruz pelo fomento ao projeto de pesquisa.

*O significado da vida é aprender algo diferente hoje, algo que nos deixe mais próximo de conhecer o que se pode conhecer do universo, independente de quão distante está o conhecimento total.*

Neil deGrasse Tyson



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

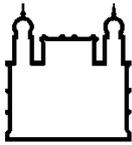
Efeito subletal da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska, 1912) na atividade locomotora de *Poecilia vivipara* Bloch e Schneider, 1801 (Poeciliidae) e na motilidade de *Pygidiopsis macrostomum* Travassos, 1928 (Heterophyidae)

### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Karina Corrêa Lopes

As cianobactérias podem produzir metabólitos secundários potencialmente tóxicos para organismos aquáticos. Nos peixes, essas toxinas podem interferir na reprodução, no crescimento e no comportamento. A cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* pode produzir toxinas hepatotóxicas (cilindrospermopsinas) e neurotóxicas (saxitoxinas). No Brasil só existem relatos da presença de cepas produtoras de saxitoxinas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito subletal da cianobactéria *C. raciborskii* na atividade locomotora de peixes *Poecilia vivipara* e na motilidade de metacercárias do Trematoda *Pygidiopsis macrostomum*. Nos experimentos foram utilizados peixes naturalmente parasitados coletados na Lagoa Rodrigo de Freitas, RJ, filhotes nascidos e criados em laboratório (livres de parasitos) e uma cepa de *C. raciborskii* isolada do reservatório de Funil, Resende, RJ. O biomonitoramento através do sistema de análise de imagem VIDEOMEX-V® foi realizado antes e após a exposição ao extrato liofilizado da cianobactéria nas concentrações de 40 e 400 mg L<sup>-1</sup>, sendo testadas duas culturas diferentes. O teste de motilidade com as metacercárias de *P. macrostomum* presentes em *P. vivipara* provenientes da lagoa, foi realizado após a exposição dos peixes ao extrato da cianobactéria. O extrato liofilizado de *C. raciborskii* alterou a atividade locomotora tanto de *P. vivipara* criados em laboratório como dos peixes coletados da lagoa. Culturas diferentes da mesma cepa de *C. raciborskii* alteraram de forma oposta a atividade locomotora de *P. vivipara*, sugerindo não ser a saxitoxina a substância responsável por essas alterações. As metacercárias de *P. macrostomum* sofreram paralisia temporária causada pela ação da saxitoxina, recuperando a motilidade após 48 horas. A saxitoxina foi encontrada nas vísceras e brânquias de *P. vivipara* analisados imediatamente após à exposição ao extrato e nos peixes mantidos por 48 horas em água limpa. Este estudo evidencia que o extrato bruto de *C. raciborskii* pode ter efeito no comportamento de *P. vivipara* e na motilidade de *P. macrostomum*, podendo influenciar tanto no comportamento dos peixes como no ciclo de vida de seus parasitos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Sublethal effects of cyanobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) in the locomotor activity of *Poecilia vivipara* Bloch e Schneider (Poeciliidae) and in the motility of the metacercariae of *Pygidiopsis macrostomum* Travassos, 1928 (Heterophyidae)

### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN BIODIVERSITY AND HEALTH

Karina Corrêa Lopes

The cyanobacteria can produce secondary metabolites potentially toxic to aquatic organisms. In fish, these toxins may interfere with reproduction, growth and behavior. The cyanobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* can produce hepatotoxic (cylindrospermopsins) and neurotoxic (saxitoxins) toxins. In Brazil there are reports only on the presence of strains producing saxitoxins. The objective of this study was to assess the sublethal effects of cyanobacteria *C. raciborskii* in the locomotor activity of the fish *Poecilia vivipara* and in the motility of the metacercariae of the Trematoda *Pygidiopsis macrostomum*. In the experiments were used fish naturally infected collected in the Rodrigo de Freitas lagoon, RJ, fish born and reared in the laboratory (parasite free) and a strain of *C. raciborskii* isolated from the Funil reservoir, Resende, RJ. The monitoring through an image analysis system VIDEOMEX-V® was conducted before and after exposure to the freeze-dried extract of cyanobacteria at concentrations of 40 and 400 mg L<sup>-1</sup>; two different cultures were tested. The test to assess the motility of the metacercariae of *P. macrostomum* parasite of *P. vivipara* from the lagoon was performed in fish exposed to the extract of cyanobacteria. The freeze-dried extract of *C. raciborskii* changed the locomotor activity of *P. vivipara* reared in laboratory and of fish collected in the lagoon. Different cultures of the same strain of *C. raciborskii* changed, in opposite ways, the locomotor activity of *P. vivipara*, thus suggesting that the saxitoxin was not the substance responsible by these changes. The metacercariae of *P. macrostomum* suffered temporary paralysis caused by the action of saxitoxin, regaining motility after 48 hours. The saxitoxin was found in the guts and gills of *P. vivipara* analyzed immediately after exposure to the extract and fish kept for 48 hours in clean water. This study shows that the crude extract of *C. raciborskii* can have an effect on the behavior of *P. vivipara* and motility of *P. macrostomum* and can influence both the behavior of fish and the life cycle of their parasites.

## ÍNDICE

Resumo	vii
1. Introdução	1
1.1. Ecotoxicologia: conceitos básicos e definições	1
1.2. Toxicologia Comportamental	2
1.3. <i>Poecilia vivipara</i> Bloch e Schneider, 1801 (Poeciliidae)	3
1.4. Cianobactérias e cianotoxinas	6
1.5. <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (Woloszynska, 1912)	7
2. Justificativa	10
3. Objetivos	11
3.1. Objetivo geral	11
3.2. Objetivos específicos	11
4. Material e métodos	12
4.1. Obtenção dos peixes	12
4.2. Cultura e preparo das soluções de cianobactéria	12
4.3. Registro comportamental em tempo real	13
4.4. Teste de motilidade de metacercárias de <i>Pygidiopsis macrostomum</i> de peixes expostos à <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	17
4.5. Determinação quantitativa de saxitoxinas presentes nas soluções e nos tecidos dos peixes	17
4.6. Análise estatística	19
5. Resultados	20
5.1. Atividade locomotora	20
6. Discussão	44
7. Conclusões	51
8. Referências	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Poecilia vivipara</i> _____	5
Figura 2: Ciclo de vida de Opisthorchioidea _____	5
Figura 3: <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> _____	9
Figura 4: VIDEOMEX -V® em vista geral e detalhe das caixas de acrílico ____	14
Figura 5: Organograma dos experimentos comportamentais antes e após a exposição ao extrato liofilizado de <i>C. raciborskii</i> . _____	16
Figura 6: Organograma do teste de motilidade de metacercárias de <i>Pygidiopsis macrostomum</i> de peixes expostos à <i>Cylindrospermopsis raciboorskii</i> _____	18
Figura 7: Registro dos parâmetros distância percorrida, tempo ambulatorial e tempo estereotipado dos peixes criados em laboratório e não expostos ao extrato de cianobactéria (controle), nos dois momentos de monitoramento _	21
Figura 8: Registro dos parâmetros tempo em repouso e velocidade média dos peixes criados em laboratório e não expostos ao extrato de cianobactéria (controle), nos dois momentos de monitoramento _____	22
Figura 9: Registro dos parâmetros distância percorrida, tempo ambulatorial e tempo estereotipado dos peixes coletados da lagoa e não expostos ao extrato de cianobactéria (controle), nos dois momentos de monitoramento _____	24
Figura 10: Registro dos parâmetros tempo em repouso e velocidade média dos peixes coletados da lagoa e não expostos ao extrato de cianobactéria (controle), nos dois momentos de monitoramento _____	25
Figura 11: Registro dos parâmetros distância percorrida, tempo ambulatorial e tempo estereotipado dos peixes criados em laboratório antes e após a exposição à 40 mg L <sup>-1</sup> do extrato de cianobactéria da cultura 1 _____	27
Figura 12: Registro dos parâmetros tempo em repouso e velocidade média dos peixes criados em laboratório antes e após a exposição à 40 mg L <sup>-1</sup> do extrato de cianobactéria da cultura 1 _____	28
Figura 13: Registro dos parâmetros distância percorrida, tempo ambulatorial e tempo estereotipado dos peixes criados em laboratório antes e após a exposição à 400 mg L <sup>-1</sup> do extrato de cianobactéria da cultura 1 _____	29
Figura 14: Registro dos parâmetros tempo em repouso e velocidade média dos peixes criados em laboratório antes e após a exposição à 400 mg L <sup>-1</sup> do extrato de cianobactéria da cultura 1 _____	30
Figura 15: Registro dos parâmetros distância percorrida, tempo ambulatorial e tempo estereotipado dos peixes coletados da lagoa antes e após a exposição à 400 mg L <sup>-1</sup> do extrato de cianobactéria da cultura 1 _____	32
Figura 16: Registro dos parâmetros tempo em repouso e velocidade média dos peixes coletados da lagoa antes e após a exposição à 400 mg L <sup>-1</sup> do extrato de cianobactéria da cultura 1 _____	33
Figura 17: Registro dos parâmetros distância percorrida, tempo ambulatorial e tempo estereotipado dos peixes criados em laboratório antes e após a exposição à 400 mg L <sup>-1</sup> do extrato de cianobactéria da cultura 2 _____	34

Figura 18: Registro dos parâmetros tempo em repouso e velocidade média dos peixes criados em laboratório antes e após a exposição à 400 mg L <sup>-1</sup> do extrato de cianobactéria da cultura 2 _____	35
Figura 19: Registro dos parâmetros distância percorrida, tempo ambulatorial e tempo estereotipado dos peixes coletados da lagoa antes e após a exposição à 400 mg L <sup>-1</sup> do extrato de cianobactéria da cultura 2 _____	37
Figura 20: Registro dos parâmetros tempo em repouso e velocidade média dos peixes coletados da lagoa antes e após a exposição à 400 mg L <sup>-1</sup> do extrato de cianobactéria da cultura 2 _____	38
Figura 21: Fotomicrografia da metacercária de <i>Pygidiopsis macrostomum</i> ___	41

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Resumo dos experimentos com a indicação do valor de significancia ( $p > 0,05$ ) entre os dois momentos de monitoramento e a indicação se os parâmetros de locomoção permaneceram iguais (=), aumentaram (+) ou diminuíram (-) em resposta ao estímulo (R). \_\_\_\_\_ 39

Tabela 2: Número total de metacercárias de *Pygidiopsis macrostomum* móveis e imóveis nas fases 1 e 2 do experimento. \_\_\_\_\_ 41

Tabela 3: Análise quantitativa da saxitoxina presente nas soluções das culturas 1,2 e 3 \_\_\_\_\_ 42

Tabela 4: Análise quantitativa da saxitoxina presente nas vísceras e brânquias dos peixes provenientes da lagoa utilizados no teste de motilidade de metacercárias de *Pygidiopsis macrostomum*. \_\_\_\_\_ 43

## **1. INTRODUÇÃO**

As mudanças climáticas decorrentes do aquecimento global, juntamente com ações antrópicas, resultam na eutrofização dos corpos d'água devido ao aumento da temperatura e ao aporte de nutrientes como nitrogênio e fósforo, favorecendo florações de cianobactérias tóxicas potencialmente nocivas aos organismos aquáticos. (Butterwick et al. 2005, Johnk et al. 2008, Paerl e Huisman, 2008). Em peixes, estas toxinas podem influenciar no crescimento, reprodução e causar alterações comportamentais (Zagatto et al. 2012, Ferrão-Filho e Kozlowsky-Suzuki, 2011). No entanto, nos ecossistemas aquáticos as interações entre peixes e seus parasitos sob influência de cianobactérias ainda não foram estudados.

### **1.1. Ecotoxicologia: conceitos básicos e definições**

A Ecotoxicologia é o estudo dos efeitos de substâncias naturais ou sintéticas sobre os constituintes dos ecossistemas, incluindo as comunidades animais, vegetais e microbióticas, assim como a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem, num contexto integrado (Truhaut 1977). Essa ciência pode ser utilizada como ferramenta no monitoramento ambiental baseada principalmente na resposta a estressores químicos com a finalidade de impedir e prevenir determinadas intoxicações (Azevedo e Chasin, 2003).

Os procedimentos ecotoxicológicos tradicionais são os testes de toxicidade aguda e crônica que procuram caracterizar os efeitos adversos causados por poluentes (Dahms et al. 2011). O teste de toxicidade aguda tem como objetivo avaliar a dose ou a concentração de um agente tóxico que tenha capacidade de produzir efeitos aos organismos expostos em um período de tempo relativamente curto, permitindo estimar os valores de concentração efetiva  $CE_{50}$  (imobilidade a 50% da população) ou de concentração letal  $CL_{50}$  (mortalidade a 50% da população) (Costa et al. 2008). Geralmente os valores de concentrações efetivas e letais são expressos em relação a 50% dos organismos porque estas respostas são mais reprodutíveis, podem ser estimadas com maior grau de confiabilidade e são mais significativas para

serem extrapoladas para uma população. Os testes de toxicidade crônica são realizados para medir os efeitos de substâncias tóxicas por um período que pode abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo-teste, em concentrações subletais (Costa et al. 2008).

Um aspecto importante da Ecotoxicologia aquática é a relação entre a concentração de uma substância química à qual um determinado organismo é exposto e o efeito nocivo que lhe é produzido, conhecida como relação dose-resposta. Essa relação constitui a base fundamental para a avaliação do risco gerado pelas substâncias químicas no meio ambiente porque permite quantificar a toxicidade aguda dessas substâncias (Hodgson, 2004).

## **1.2. Toxicologia Comportamental**

O termo “Toxicologia Comportamental” é definido por mudanças comportamentais de um organismo, induzida pelo estresse, que excede o limite normal de variabilidade (Marcucella e Abramson 1978). Dessa forma, o comportamento é uma resposta toxicológica que reflete o efeito de todos os níveis do organismo e representa a interação de processos fisiológicos com estímulos ambientais (Charoy et al. 1995). A avaliação do comportamento de organismos vivos através do monitoramento da ação de poluentes ambientais é denominada biomonitoramento. O fundamento desse método é que um estímulo ambiental, proveniente de um poluente, provoca reações no organismo vivo que podem acarretar várias alterações em seu funcionamento e sobrevivência. Assim o comportamento do organismo frente a um agente estressor é utilizado na avaliação da qualidade de determinado ambiente (Lima 2000).

Os poluentes ambientais orgânicos e inorgânicos trazem vários riscos para os organismos aquáticos podendo afetar o comportamento e a fisiologia desses indivíduos. Muitos estudos utilizam peixes em bioensaios que avaliam a sobrevivência desses animais frente à exposição a diferentes concentrações de contaminantes, baseando-se apenas na letalidade para se determinar a toxicidade de determinados compostos. No entanto, concentrações subletais podem causar a “morte ecológica” desses organismos, alterando a reprodução,

o crescimento, a relação predador-presa e a atividade locomotora (Zagatto e Bertoletti, 2006, Scott e Sloman, 2004).

O comportamento é uma resposta seletiva que interage com aspectos físicos, químicos e biológicos do ambiente e está relacionado ao sucesso reprodutivo e a eficiência na busca de recursos e habitats (Little e Brewer, 2001). As alterações comportamentais ocasionam distúrbios nos processos bioquímicos e fisiológicos do indivíduo que podem ter efeitos ao nível de população (Bridges 1997). Os peixes são bons modelos de estudo para se avaliar as alterações comportamentais causadas por agentes tóxicos devido à sua relevância ecológica, susceptibilidade a agentes estressores, fácil criação em condições laboratoriais e longa história no uso em estudos toxicológicos (Henry e Atchison, 1986, Little et al. 1993).

Dentre as diferentes respostas comportamentais, a atividade locomotora é um indicador que integra o “status” interno do animal. Seu uso na Ecotoxicologia é baseado no fato de que ela pode ser medida efetivamente para caracterizar as consequências de exposições subletais que podem levar a um aumento da atividade natatória, hiperatividade, ou diminuição da mesma, hipoatividade. Estas respostas são estratégias usadas pelos organismos para resistir às exposições tóxicas e podem ser classificadas dentro de duas categorias gerais de resposta: escape e adaptação (Little et al. 1993).

A atividade natatória de peixes inclui variáveis como velocidade, duração e distância percorrida e é frequentemente utilizada para se avaliar as alterações comportamentais por ser facilmente detectada e por comprometer outros aspectos ecológicos do peixe como a busca por alimento, a reprodução e a habilidade de escapar de predadores (Little e Finger, 1990).

### **1.3. *Poecilia vivipara* Bloch e Schneider, 1801 (Poeciliidae)**

Os peixes *Poecilia vivipara*, comumente chamados de barrigudinhos, são encontrados em água doce e salobra, se reproduzem ao longo de todo o ano e são resistentes às mudanças ambientais e variações de salinidade e temperatura (Mendonça e Andreatta, 2001; Koblitz et al. 2001). São considerados organismos promissores no biomonitoramento de poluentes

aquáticos e têm sido amplamente utilizados em estudos ecotoxicológicos com contaminantes orgânicos e inorgânicos (Ferreira et al. 2012, Machado et al. 2013) (Figura 1).

São hospedeiros intermediários de várias espécies de Trematoda da superfamília Opisthorchioidea Looss, 1899, dentre elas, *Acanthocolaritrema umbilicatum* Travassos, Freitas & Bührnheim, 1965 pertencente à família Cryptogonimidae Ward, 1917, *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* Travassos, 1928 e *Pygidiopsis macrostomum* Travassos, 1928 pertencentes à família Heterophyidae Leiper, 1909 (Simões et al. 2006, 2008, 2009). Em *P. vivipara* as larvas do tipo metacercária são encontradas em diferentes órgãos sendo *A. umbilicatum* sob as escamas e nas nadadeiras, *A. (P.) pindoramensis* nas brânquias e mesentério e *P. macrostomum* no mesentério.

Os Opisthorchioidea apresentam três hospedeiros em seus ciclos de vida, o molusco *Heleobia australis* (d'Orbigny, 1835) como primeiro hospedeiro intermediário, peixes, dentre eles, *P. vivipara* como segundo hospedeiro intermediário e vertebrados (aves, peixes e mamíferos) como hospedeiros definitivos (Simões et al. 2006, 2008, 2009) (Figura 2).

As alterações comportamentais de *P. vivipara* decorrentes do parasitismo de larvas de Trematoda foram reportadas por Santos et al. (2011) e Santos e Santos (2013), que referiram que metacercárias de *A. (P.) pindoramensis* e de *A. umbilicatum* são capazes de diminuir a atividade locomotora dos peixes, aumentando as chances de transmissão do parasito para o próximo hospedeiro.

Tendo em vista que os efeitos comportamentais decorrentes de florações de cianobactérias e suas toxinas ainda não foram testados em peixes coletados em seus ambientes naturais (i.e. parasitados) e criados em laboratório (i.e. não parasitados), *P. vivipara* que já foi referido em estudos ecotoxicológicos e tem metacercárias de *P. macrostomum* facilmente identificáveis, é considerado um bom modelo para ser utilizado.



Figura 1: *Poecilia vivipara*

Fonte: [http://zyworodki.akwarysta.pl/html/galeria/foto/poecilia\\_vivipara.htm](http://zyworodki.akwarysta.pl/html/galeria/foto/poecilia_vivipara.htm)

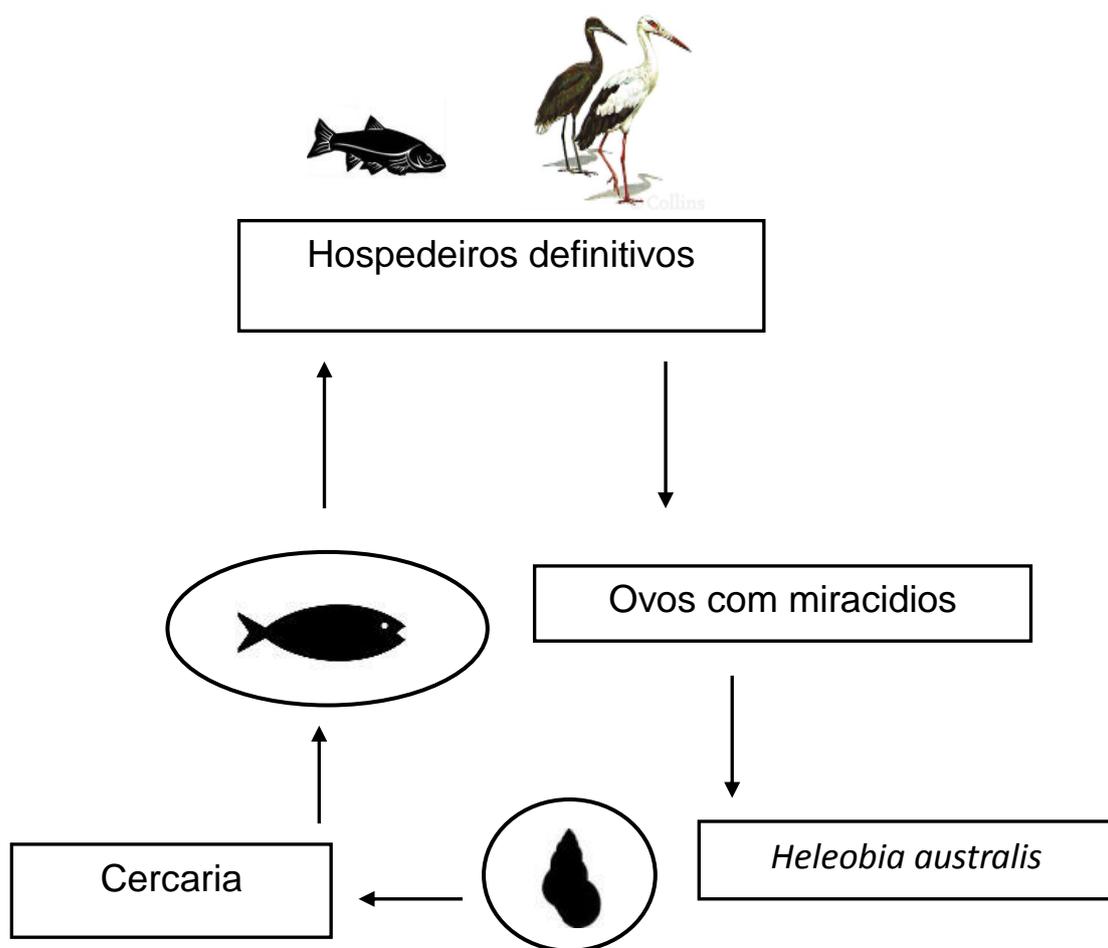


Figura 2: Ciclo de vida de Opisthorchioidea.

#### **1.4. Cianobactérias e cianotoxinas**

As cianobactérias são organismos procariotos fotossintetizantes que, devido a uma longa história evolutiva, desenvolveram alterações morfológicas, fisiológicas, ecológicas e bioquímicas que propiciaram sua colonização em diferentes tipos de habitat (Lee, 1999).

As cianobactérias podem produzir lipopolissacarídeos que geralmente são componentes de bactérias gram-negativas. Eles são potencialmente irritantes e podem causar reações alérgicas em tecidos animais e humanos, podendo também provocar gastroenterites e inflamações (Chorus e Bartram, 1999, Duy et al. 2000).

Algumas cianobactérias podem também produzir cianotoxinas, classificadas de acordo com sua ação em animais como: hepatotóxicas (microcistinas e nodularinas) e neurotóxicas (anatoxinas e saxitoxinas), citotóxicas (cilindrospermopsinas) ou alergênicas (aplisiatoxinas e lingbiatoxinas) (Hudnell, 2008). Essas toxinas são consideradas nocivas por se acumularem na rede trófica e afetarem os organismos aquáticos, causando efeitos agudos como a inibição da taxa de filtração ou alteração dos movimentos natatórios, podendo chegar até à paralisia completa (Landsberg, 2002). Os efeitos crônicos incluem a redução das taxas de sobrevivência, fecundidade e crescimento populacional, efeitos que também podem se manifestar em concentrações subletais (Chorus e Bartram, 1999; Ferrão-Filho et al. 2000; Codd, 2000; Magalhães et al. 2003).

O aumento populacional de cianobactérias em ambientes aquáticos depende da disponibilidade principalmente de luz e nutrientes, sendo que a turbulência, a temperatura, o pH e fatores ecológicos como predação e competição também podem desencadear florações (Codd, 2000). Seu intenso crescimento na superfície dos corpos d'água também pode ser causado pelo processo de eutrofização que provoca mudanças nas condições físicas, químicas e biológicas da água como redução da penetração de luz, aumento da atividade de bactérias heterotróficas, alteração da concentração de oxigênio dissolvido e mortandade de peixes (Tundisi, 2003, Sigeo, 2005).

A ocorrência de florações de cianobactérias tóxicas tem sido comumente registrada em reservatórios de abastecimento de água dos estados do nordeste, sudeste e sul do país, representando, dessa forma, um grande risco para saúde pública (Huszar et al. 2000, Costa et al. 2006, Ferrão-Filho et al. 2008, Bakke et al. 2010). No Brasil, entre março e abril de 1988, 2.000 pessoas foram intoxicadas e 88 morreram após o consumo de água do reservatório de Itaparica (BA), onde foram visualizadas florações de cianobactérias sem, no entanto, ter sido feita análise da água. Teixeira et al. (1993) descreveram que havia forte evidência da correlação das intoxicações e mortes com as florações de cianobactérias.

O primeiro caso confirmado de mortes humanas causadas por cianotoxinas no Brasil ocorreu no início de 1996, quando 130 pacientes submetidos a sessões de hemodiálise em uma clínica da cidade de Caruaru (PE), passaram a apresentar graves disfunções hepáticas. Desses, 60 pacientes vieram a falecer até 10 meses após o início dos sintomas (Carmichael et al. 2001). Casos de intoxicações pelo consumo de água contaminada com cianobactérias também foram referidos em países como Austrália, Inglaterra, China e África do Sul (Bruno, 2013).

Além da contaminação humana por consumo de água, existe a possibilidade de chegarem ao homem através do consumo de peixe. As cianobactérias constituem uma parte importante da dieta alimentar de muitas espécies de crustáceos e peixes, e essas toxinas podem se acumular e assim serem transferidas ao homem através da cadeia trófica (Magalhães et al. 2003, Soares et al. 2004, Bieczynski et al. 2013).

### **1.5. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska, 1912)**

*Cylindrospermopsis raciborskii* é uma espécie de cianobactéria invasora com ampla distribuição global, sendo encontradas na Europa, Nova Zelândia, África do Sul e nas Américas do Norte e do Sul (Bouvy et al. 2000, Wiedner, 2002, Ryan et al. 2003, Vidal e Kruk, 2008) (Figura 3). No Brasil, estão difundidas por reservatórios de água de várias regiões, principalmente no Nordeste e na região Semiárida, apresentando florações cada vez mais

frequentes, o que torna esta espécie um dos mais importantes componentes das comunidades fitoplanctônicas (Bouvy et al. 2000, Padisák, 1997).

Esta cianobactéria apresenta uma plasticidade ecofisiológica que garante a sua existência em diversos habitats com adaptações específicas que lhes permitem resistirem a alterações climáticas que resultam no aumento da temperatura da água (Briand et al. 2004, Chonudomkul et al. 2004, Bonilla et al. 2012). Necessita de uma baixa concentração de nitrogênio, o que também lhe confere vantagens competitivas em relação a outras espécies, possibilitando sua dominância no ecossistema aquático (Gomes et al. 2013).

Podem produzir dois tipos de toxinas: cilindrospermopsina, um alcalóide com ação hepática e renal cujo mecanismo de ação se dá pela inibição da síntese proteica e as saxitoxinas (Paralytic Shellfish Toxins - PST) que são potentes paralisantes que agem no sistema neuromuscular, inibindo a condução nervosa através do bloqueio dos canais de sódio e cálcio, afetando a permeabilidade ao potássio (Carmichael, 1994, Terao et al. 1994, Apeldoorn et al. 2007). No Brasil, até o momento só foram isoladas cepas produtoras de saxitoxinas. As saxitoxinas são responsáveis por casos de intoxicação humana pelo consumo de frutos do mar, como moluscos e peixes, os quais acumulam essas toxinas (Ibelings & Chorus, 2007; Etheridge, 2010).

As saxitoxinas são reconhecidas como uma das toxinas mais potentes, com uma dose letal para camundongo em torno de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  em injeção intraperitoneal (Chorus & Bartram, 1999). Os sinais e sintomas da PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) em humanos pode variar de formigamento dos lábios, boca e língua, dormência das extremidades, parestesia, fraqueza, ataxia, náuseas, falta de ar, tonturas, vômitos, dor de cabeça, disfagia e disartria. Em casos de ingestão letal, parada respiratória e morte pode ocorrer em 3-4 horas (Etheridge, 2010).

Tendo em vista a toxicidade e a importância de *C. raciborskii* nas áreas de saúde e ambiente, a espécie foi escolhida para ser utilizada em testes comportamentais com peixes *P. vivipara*.



Figura 3: *Cylindrospermopsis raciborskii*

Fonte: Sant'Anna et al. 2012

## 2. JUSTIFICATIVA

As florações de cianobactérias têm grande impacto econômico e ecológico, alterando a qualidade da água e causando a morte de diversas espécies. As cianobactérias podem produzir cianotoxinas capazes de provocar efeitos agudos e crônicos, alterações bioquímicas e comportamentais em diferentes organismos aquáticos. As cianotoxinas podem trazer riscos à saúde animal e humana através da ingestão de água ou peixes contaminados através da teia trófica.

*Poecilia vivipara* convivem em seus ambientes naturais com diversos microrganismos, dentre eles parasitos e cianobactérias, no entanto, pouco se sabe do efeito que estes dois fatores podem causar na sua atividade locomotora.

Neste contexto, é preciso entender como essa cianobactéria pode influenciar na atividade locomotora de *P. vivipara* criados em laboratório (não parasitados) e coletados de seu ambiente natural (naturalmente parasitados), assim como na motilidade das metacercárias de *P. macrostomum*.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar o efeito subletal da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* na atividade locomotora de peixes *Poecilia vivipara* e na motilidade de metacercárias de *Pygidiopsis macrostomum*.

#### **3.2. Objetivos específicos**

1. Avaliar a atividade locomotora de *P. vivipara* criados em laboratório (não parasitados) sem a presença do extrato *C. raciborskii*;
2. Avaliar a atividade locomotora de *P. vivipara* criados em laboratório (não parasitados) expostos ao extrato de culturas diferentes de *C. raciborskii*.
3. Avaliar a atividade locomotora de *P. vivipara* coletados na lagoa (parasitados) sem a presença do extrato *C. raciborskii*;
4. Avaliar a atividade locomotora de *P. vivipara* coletados na lagoa (parasitados) expostos ao extrato de culturas diferentes de *C. raciborskii*.
5. Avaliar a motilidade das metacercárias de *P. macrostomum* de peixes coletados na lagoa expostos à *C. raciborskii*.
6. Avaliar o acúmulo de saxitoxina nos órgãos dos peixes coletados na lagoa expostos à *C. raciborskii*.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Obtenção dos peixes**

Um total de 85 peixes foram coletados na Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, Brasil (22°57'02"S, 43°11'09"W), transportados ao laboratório e mantidos em aquários com água filtrada e desclorada. As fêmeas grávidas foram isoladas para a obtenção e criação de peixes não parasitados. No total, foram utilizados 28 peixes não parasitados, nascidos e criados em laboratório. O comprimento total e o peso dos peixes são apresentados com valor mínimo e máximo seguido da média entre parênteses.

Ao final dos experimentos, os peixes foram necropsiados e os órgãos separados em placas de Petri contendo solução fisiológica (NaCl) a 0,7% para serem examinados ao microscópio estereoscópico Leica Zoom 2000. As metacercárias foram mecanicamente isoladas dos tecidos com auxílio de estiletes para estudos de motilidade.

A coleta e a utilização dos peixes estão licenciadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA autorização nº 02/2004) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ nº L-020/2015).

### **4.2. Cultura e preparo das soluções de cianobactéria**

Uma cepa de *C. raciborskii* (CYRF-01) foi originalmente isolada do reservatório de Funil, RJ e cedidas pelo banco de cultivo do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC), do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/IBCCF/UFRJ.

Foram realizadas 3 culturas de 8 L cada, utilizando o meio artificial ASM-1 (Zagatto e Aragão, 1992) com pH 8,0 incubadas a 24°C com fotoperíodo de 12/12 h (Incubadora Bod, Solab SL 224). Cada cultura foi fracionada em garrafas de 300 mL e congeladas a -30°C para serem liofilizadas (Liotop L101, Liobrás ou Edwards Modulyo). Após a liofilização de cada cultura, o extrato obtido foi homogeneizado e congelado para utilização posterior.

A cultura 1 e a cultura 2 foram utilizadas nos testes comportamentais e a cultura 3 foi utilizada no teste de motilidade de metacercárias de *P. macrostomum*. O extrato liofilizado de todas as culturas foi diluído em água desclorada dos aquários para preparação de soluções concentradas de 40 e 400 mg L<sup>-1</sup>. As concentrações dos extratos estão expressas em miligramas de peso seco de material liofilizado por litro (mg PS L<sup>-1</sup>).

#### **4.3. Registro comportamental em tempo real**

O sistema de biomonitoramento por análise de imagem (Figura 4) está baseado no VIDEOMEX-V® (Columbus Instruments, Ohio, USA) usando o programa *Travelled Distance of Multiple Objects* seguindo os parâmetros de Santos et al. (2011). As análises estatísticas foram realizadas usando as medidas de cinco parâmetros comportamentais: Distância Percorrida, Tempo Ambulatorial, Tempo Estereotipado, Tempo em Repouso e Velocidade Média. 'Distância Percorrida' é a distância total (mm) percorrida pelo animal durante um intervalo. 'Tempo Ambulatorial' é o número total em segundos durante um intervalo em que um animal gasta se deslocando. 'Tempo Estereotipado' é o número total em segundos durante um intervalo em que o animal faz alguma atividade que não seja se deslocar. 'Tempo em Repouso' é o número total de segundos durante um intervalo gasto sem se mover. "Velocidade Média" de um animal é calculada como a distância percorrida dividida pelo tempo ambulatorial.

A cabine de gravação é feita de acrílico e mantém uma câmera de vídeo analógica e distribuição de luz fraca. Dentro dela, há um aquário de vidro opaco de 30L de capacidade (35 × 35 × 25cm) que contém quatro caixas de contenção (9,5 × 5,5 × 2cm cada) feitas de acrílico opaco com orifícios de 3mm, onde os peixes são colocados individualmente durante os experimentos. Os peixes foram mantidos em água filtrada e desclorada. Cada experimento teve duração de 4h, com 1h de período de aclimação e 3h de gravação. O período de monitoramento foi gravado em 60 intervalos de 3 min. cada e os valores de cada parâmetro foram usados nos testes estatísticos.

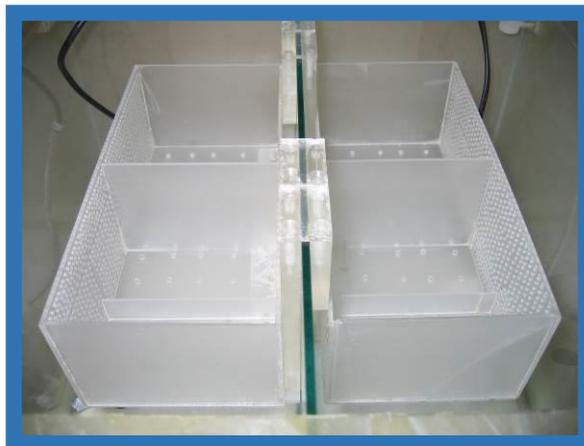
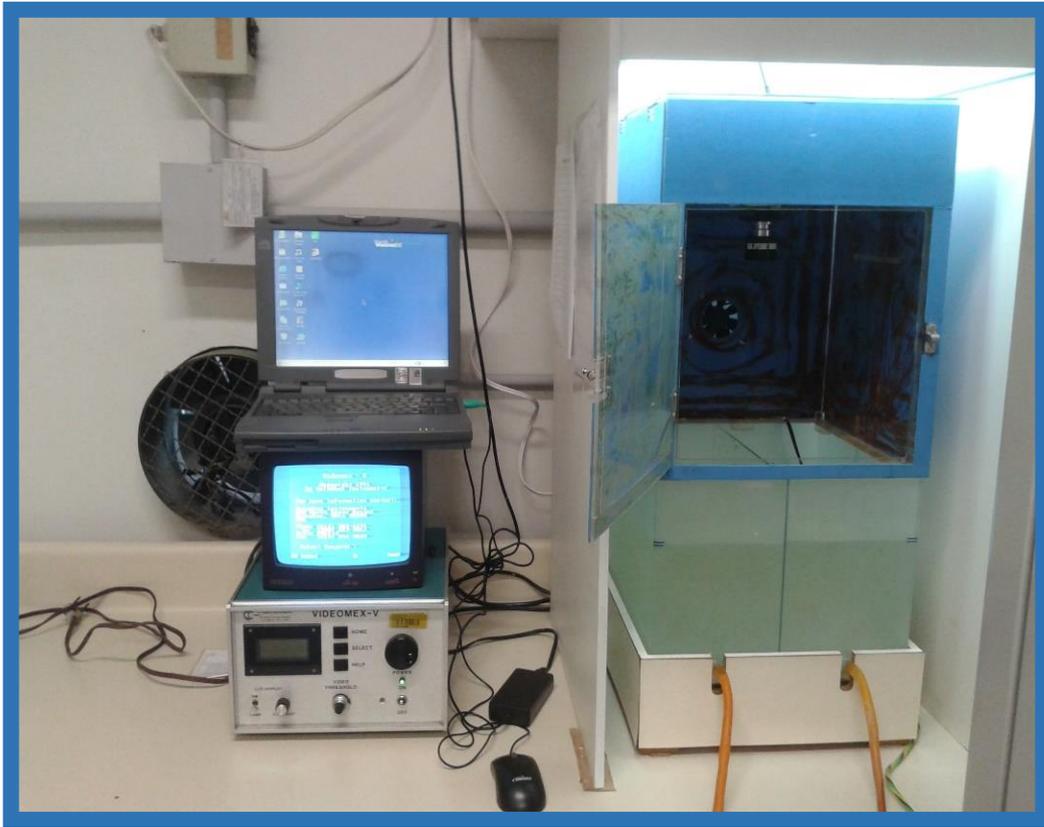


Figura 4: VIDEOMEX -V® em vista geral e detalhe das caixas de acrílico

Foram realizados um total de 7 experimentos. No primeiro e no segundo experimento foram utilizados peixes criados em laboratório (n = 8) e coletados na lagoa (n = 10) para determinar a atividade locomotora sem exposição ao extrato de cianobactéria (grupo controle). Esses experimentos foram realizados para determinar se existem alterações na atividade locomotora antes e após o acondicionamento em água filtrada e desclorada dos aquários. O terceiro, o quarto e o quinto experimento foram conduzidos utilizando uma cultura da cepa CYRF-01, denominada de cultura 1, em duas concentrações diferentes do extrato: 40 e 400 mg L<sup>-1</sup>; *P. vivipara* criados em laboratório (n = 6 em cada concentração) foram analisados em ambas concentrações e os coletados na lagoa (n = 8) foram expostos apenas à concentração de 400 mg L<sup>-1</sup>. No sexto e sétimo experimentos foram utilizadas uma outra cultura da cepa CYRF-01, denominada de cultura 2 para a análise de peixes criados em laboratório (n = 8) e peixes coletados na lagoa (n = 8) expostos à concentração de 400 mg L<sup>-1</sup>.

Em todos os experimentos, os peixes foram primeiramente monitorados no Videomex-V® sem exposição às culturas da cepa CYRF. Em seguida, foram expostos ao extrato por 48 horas com uma troca de 100% da solução de cianobactéria após 24 horas e alimentados com ração comercial. Após o término da exposição, cada grupo foi novamente monitorado para obtenção de dados comportamentais. Em cada experimento havia sempre um grupo controle, que era submetido ao mesmo procedimento que os tratamentos, exceto que a água de exposição era a própria água de cultivo (Figura 5).

Foram controlados os parâmetros físico-químicos da água utilizada nos testes, como pH (Incibrás pH1400), condutividade (M.S.Mistura MSM 150), oxigênio (Jenway, Barloworld Scientific) e temperatura. Ao final dos experimentos, os peixes foram necropsiados, pesados e medidos. A presença de metarcárias de Opisthorchioidea foi confirmada no exame dos peixes coletados na lagoa.

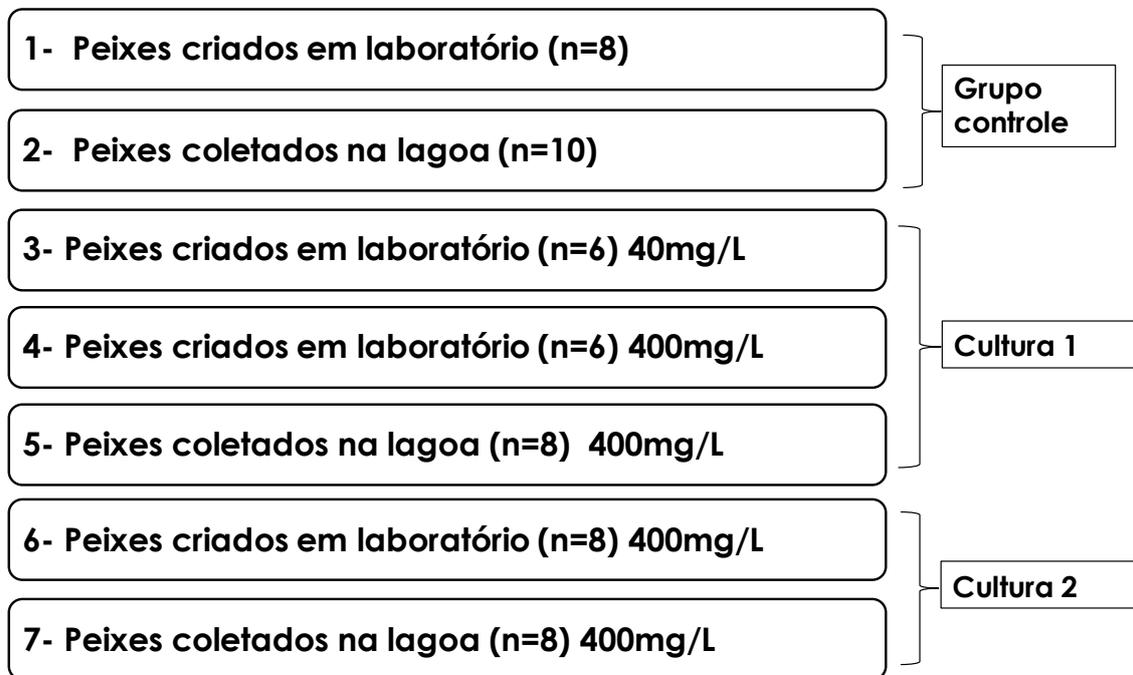


Figura 5: Organograma dos experimentos comportamentais antes e após a exposição ao extrato liofilizado de *C. raciborskii*.

#### **4.4. Teste de motilidade de metacercárias de *Pygidiopsis macrostomum* de peixes expostos à *Cylindrospermopsis raciborskii***

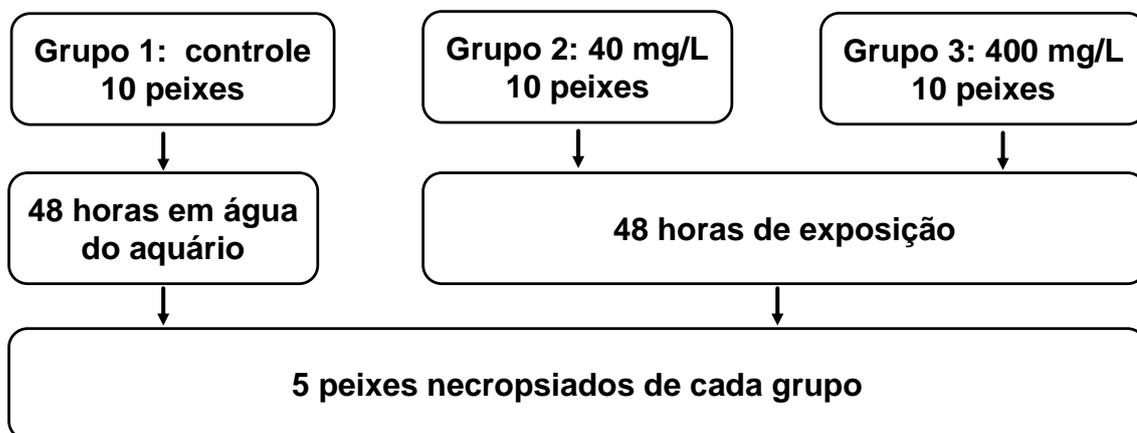
Nesse experimento foram utilizados um total de 30 peixes coletados na lagoa e separados em 3 grupos de 10 peixes cada. O grupo 1 não foi exposto ao extrato da cianobactéria (grupo controle). O grupo 2 foi exposto à 40 mg L<sup>-1</sup> do extrato liofilizado da cultura 3 e o grupo 3 foi exposto à 400 mg L<sup>-1</sup> por 48h com oxigenação, alimentação e troca de 100% da solução do extrato após 24h de exposição. Após o término da exposição, cinco peixes de cada grupo foram necropsiados para contagem e verificação da motilidade das metacercárias (fase 1). Os outros cinco peixes foram necropsiados após serem mantidos por mais 48h em água limpa dos aquários (fase 2) (Figura 6).

#### **4.5. Determinação quantitativa de saxitoxinas presentes nas soluções e nos tecidos dos peixes**

A análise de saxitoxinas foi realizada nas soluções dos extratos liofilizados das culturas de cianobactérias 1, 2 e 3, nas brânquias e vísceras dos peixes utilizados no teste de motilidade de *P. macrostomum* previamente congelados à -30°C. Para a extração de saxitoxinas presentes nas soluções, as amostras foram apenas submetidas à sonicação por 15 min.

As amostras de tecidos foram retiradas dos cinco peixes da fase 1 e dos cinco peixes da fase 2. Cada amostra de tecido foi dividida em duas com pesos semelhantes para serem usadas como réplicas. Para a extração de saxitoxinas, as amostras de tecidos previamente pesadas foram individualmente homogeneizadas (Ultrax-Turrax®T18, IKA®WORKS) com adição de 5 mL de ácido acético 0,1 N. Posteriormente, as amostras foram sonicadas (Maxiclean 1600 Unique) por 15 min e centrifugadas (Centribio 80-2B) a 6.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi retirado e liofilizado (Edwards Modulyo); o material obtido foi diluído em 1 mL de água ionizada e utilizado nas dosagens.

### Fase 1



### Fase 2

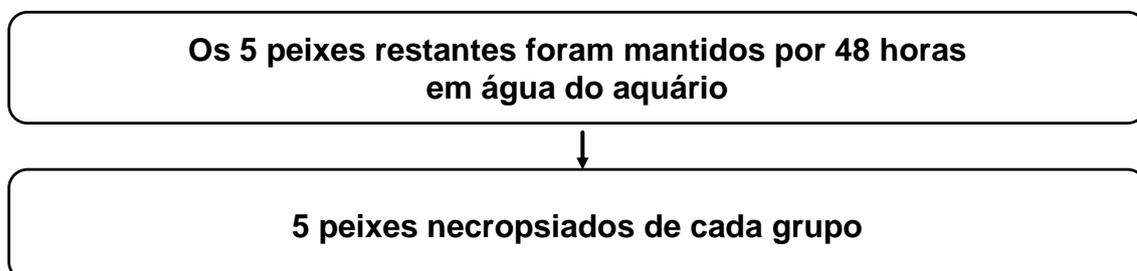


Figura 6: Organograma do teste de motilidade de metacercárias de *Pygidiopsis macrostomum* de peixes expostos à *Cylindrospermopsis raciboorskii*

A detecção e quantificação da saxitoxina presente nas amostras de tecidos e soluções foram realizadas através de Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima (ELISA) com auxílio do Kit Beacon Saxitoxina Placa (Beacon Analytical Systems) de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.6. Análise estatística**

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa R, versão 3.2.2 (R Development Core Team, 2015) com auxílio do pacote “geepack” e “ggplot2” (Wickham, 2009). O nível de significância assumido nos testes estatísticos foi de 5%.

As análises dos parâmetros comportamentais foram realizadas com o uso do Modelo Linear Generalizado (MLG) com estimativas através das Equações de Estimação Generalizada (EEG). Este teste analisou as medidas repetidas da atividade locomotora estimando os parâmetros de regressão e variância em um tempo dependente. Então, o modelo foi feito usando cada parâmetro comportamental como uma variável resposta com erro de distribuição Gaussiana. Foram também analisadas as variáveis explicativas comprimento e peso dos peixes não expostos e expostos.

O teste Qui-quadrado foi utilizado para investigar a proporção de metacercárias que se tornaram imóveis após exposição ao extrato da cianobactéria no teste de motilidade de *P. macrostomum*.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Atividade locomotora

A atividade locomotora dos peixes criados em laboratório (livres de infecção parasitária) e dos coletados na lagoa (naturalmente parasitados) foi monitorada antes e após a exposição ao extrato liofilizado de *C. raciborskii*. Antes de iniciar os experimentos com as cianobactérias, foram feitos experimentos utilizando peixes das duas origens, mantendo todas as condições experimentais padrão, mas sem uso das cianobactérias. Esta análise preliminar foi realizada para avaliar as possíveis variações individuais.

O comprimento total dos peixes criados em laboratório variou de 2,1 a 3,5 (2,8) cm e o peso de 0,10 a 0,73 (0,37) g. O comprimento total dos peixes coletados na lagoa variou de 3,5 a 4,6 (4,0) cm e o peso de 0,33 a 1,18 (0,77) g. Os valores médios dos parâmetros físico-químicos controlados da água do aquário sem o extrato da cianobactéria foram: oxigênio 7,6 ( $\pm 0,3$ ) mg L<sup>-1</sup>, condutividade 88,9 ( $\pm 9,5$ )  $\mu$ S/cm e pH 5,5 ( $\pm 0,3$ ). Os valores médios dos parâmetros da água com extrato de cianobactéria foram oxigênio 7,4 ( $\pm 0,3$ ) mg L<sup>-1</sup>, condutividade 233,3 ( $\pm 22,3$ )  $\mu$ S/cm e pH 6,8 ( $\pm 0,6$ ). A temperatura se manteve constante em torno de 24°C.

As análises do EEG não encontraram influência do peso ou do comprimento total na atividade locomotora dos peixes em nenhum dos experimentos. A presença de metacercárias de Trematoda foi confirmada em todos os peixes coletados na Lagoa Rodrigo de Freitas.

No primeiro experimento, os peixes criados em laboratório e não expostos ao extrato de cianobactéria foram monitorados em dois momentos (grupo controle). Os valores médios dos parâmetros no primeiro momento de monitoramento foram: distância percorrida 363,22 ( $\pm 303,5$ ) mm, tempo ambulatorial 27,82 ( $\pm 22,6$ ) s, tempo estereotipado 88,31 ( $\pm 49,96$ ) s, tempo em repouso 63,76 ( $\pm 65,96$ ) s e velocidade média 10,28 ( $\pm 5,15$ ) mm/s. Os valores médios no segundo momento foram: distância percorrida 172,06 ( $\pm 336,83$ ) mm,

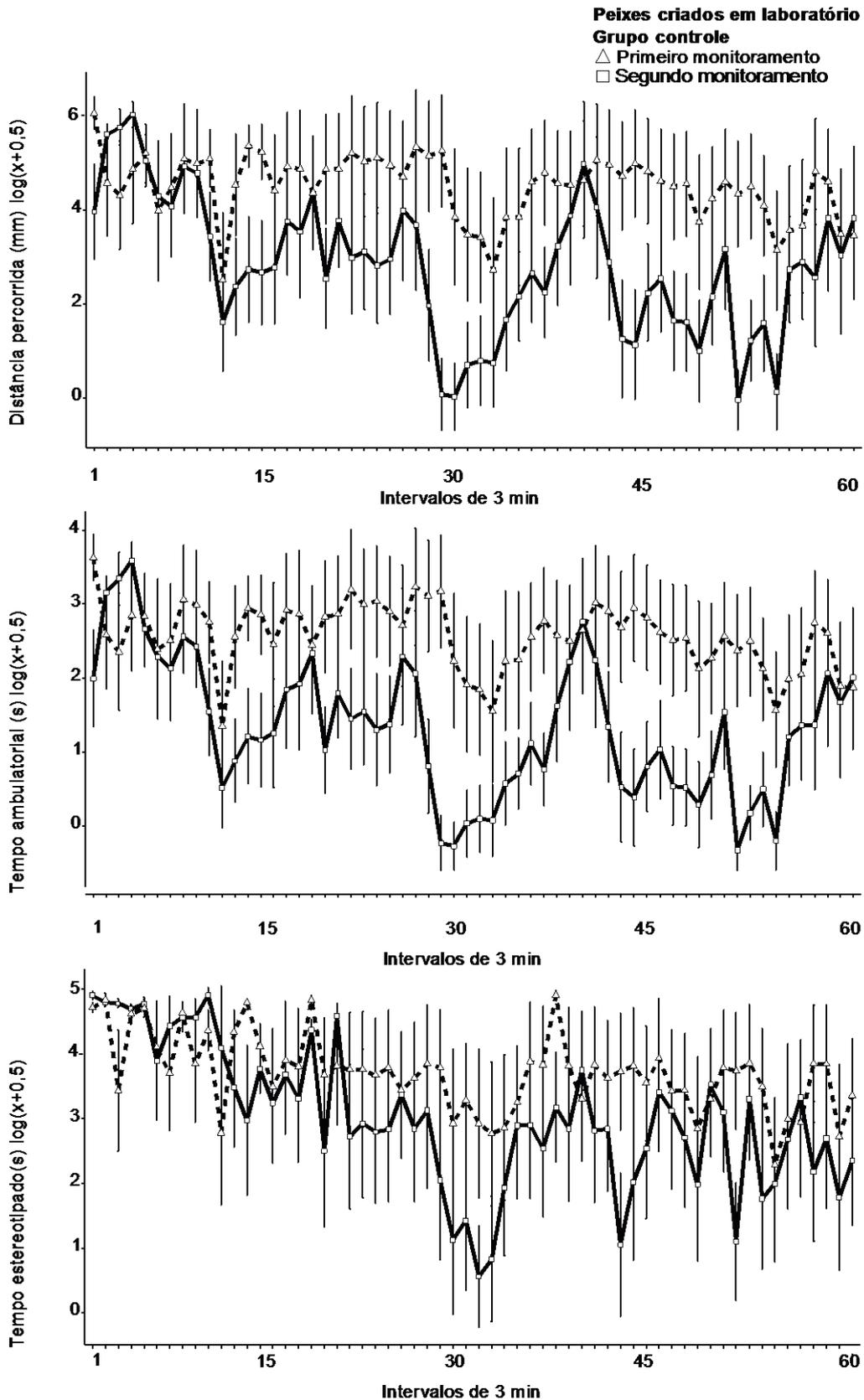


Figura 7: Registro dos parâmetros distância percorrida, tempo ambulatorial e tempo estereotipado dos peixes criados em laboratório e não expostos ao extrato de cianobactéria (controle), nos dois momentos de monitoramento.

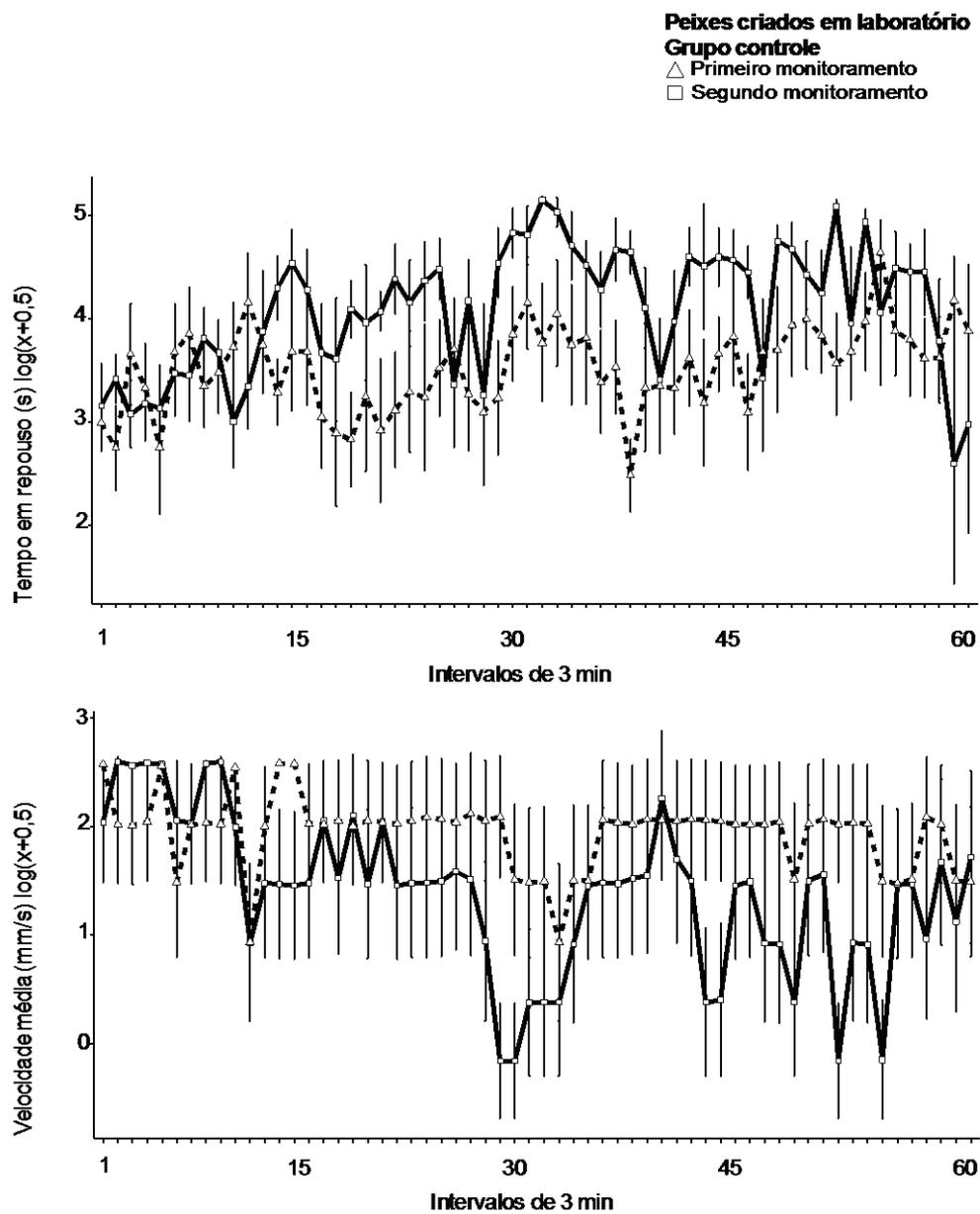


Figura 8: Registro dos parâmetros tempo em repouso e velocidade média dos peixes criados em laboratório e não expostos ao extrato de cianobactéria (controle), nos dois momentos de monitoramento.

tempo ambulatorial 11,65 ( $\pm 17,61$ ) s, tempo estereotipado 73,86 ( $\pm 59,48$ ) s, tempo em repouso 93,18 ( $\pm 68,26$ ) s e velocidade média 8,44 ( $\pm 7,34$ ) mm/s (Figuras 7 e 8).

A análise estatística comparativa entre estes dois momentos de monitoramento não exibiu diferenças significativas: distância percorrida (coeficiente estimado =  $0,66 \pm 0,40$ , Wald = 2,68,  $P= 0,10$ ), tempo ambulatorial (coeficiente estimado =  $0,75 \pm 0,39$ , Wald = 3,61,  $P= 0,05$ ), tempo estereotipado (coeficiente estimado =  $0,10 \pm 0,14$ , Wald = 0,59,  $P= 0,44$ ), tempo em repouso (coeficiente estimado =  $-0,15 \pm 0,11$ , Wald = 1,85,  $P= 0,17$ ) e velocidade média (coeficiente estimado =  $0,15 \pm 0,16$ , Wald = 0,81,  $P= 0,36$ ).

No segundo experimento, os peixes coletados na lagoa e não expostos ao extrato de cianobactéria foram monitorados em dois momentos (grupo controle). Os valores médios dos parâmetros no primeiro momento de monitoramento foram: distância percorrida 686 ( $\pm 378$ ) mm, tempo ambulatorial 52,3 ( $\pm 27,2$ ) s, tempo estereotipado 107,2 ( $\pm 23,6$ ) s, tempo em repouso 20,5 ( $\pm 27,2$ ) s e velocidade média 12,7 ( $\pm 1,47$ ) mm/s. Os valores médios no segundo momento foram: distância percorrida 674 ( $\pm 403$ ) mm, tempo ambulatorial 49,7 ( $\pm 28,4$ ) s, tempo estereotipado 92,1 ( $\pm 40,00$ ) s, tempo em repouso 37,5 ( $\pm 58,3$ ) s e velocidade média 11,6 ( $\pm 4,69$ ) mm/s (Figuras 9 e 10).

A análise estatística comparativa entre estes dois momentos de monitoramento não exibiu diferenças significativas: distância percorrida (coeficiente estimado =  $0,28 \pm 0,39$ , Wald = 0,52,  $P= 0,47$ ), tempo ambulatorial (coeficiente estimado =  $0,22 \pm 0,36$ , Wald = 0,37  $P= 0,54$ ), tempo estereotipado (coeficiente estimado =  $0,35 \pm 0,30$ , Wald = 1,35,  $P= 0,25$ ), tempo em repouso (coeficiente estimado =  $-0,29 \pm 0,31$ , Wald = 0,90,  $P= 0,34$ ) e velocidade média (coeficiente estimado =  $0,25 \pm 0,32$ , Wald = 0,62,  $P= 0,43$ ).

No terceiro experimento realizado com *P. vivipara* criados em laboratório e monitorados antes e após a exposição a  $40 \text{ mg L}^{-1}$  do extrato liofilizado da cultura 1, houve diferenças em todos os parâmetros de locomoção. Os valores médios dos parâmetros antes da exposição foram: distância percorrida 798,53 ( $\pm 565,66$ ) mm, tempo ambulatorial 102,69 ( $\pm 43,63$ ) s, tempo estereotipado 46,13 ( $\pm 20,14$ ) tempo em repouso 31,17 ( $\pm 28,89$ ) s e velocidade média 6,98 ( $\pm 2,82$ ) mm/s.

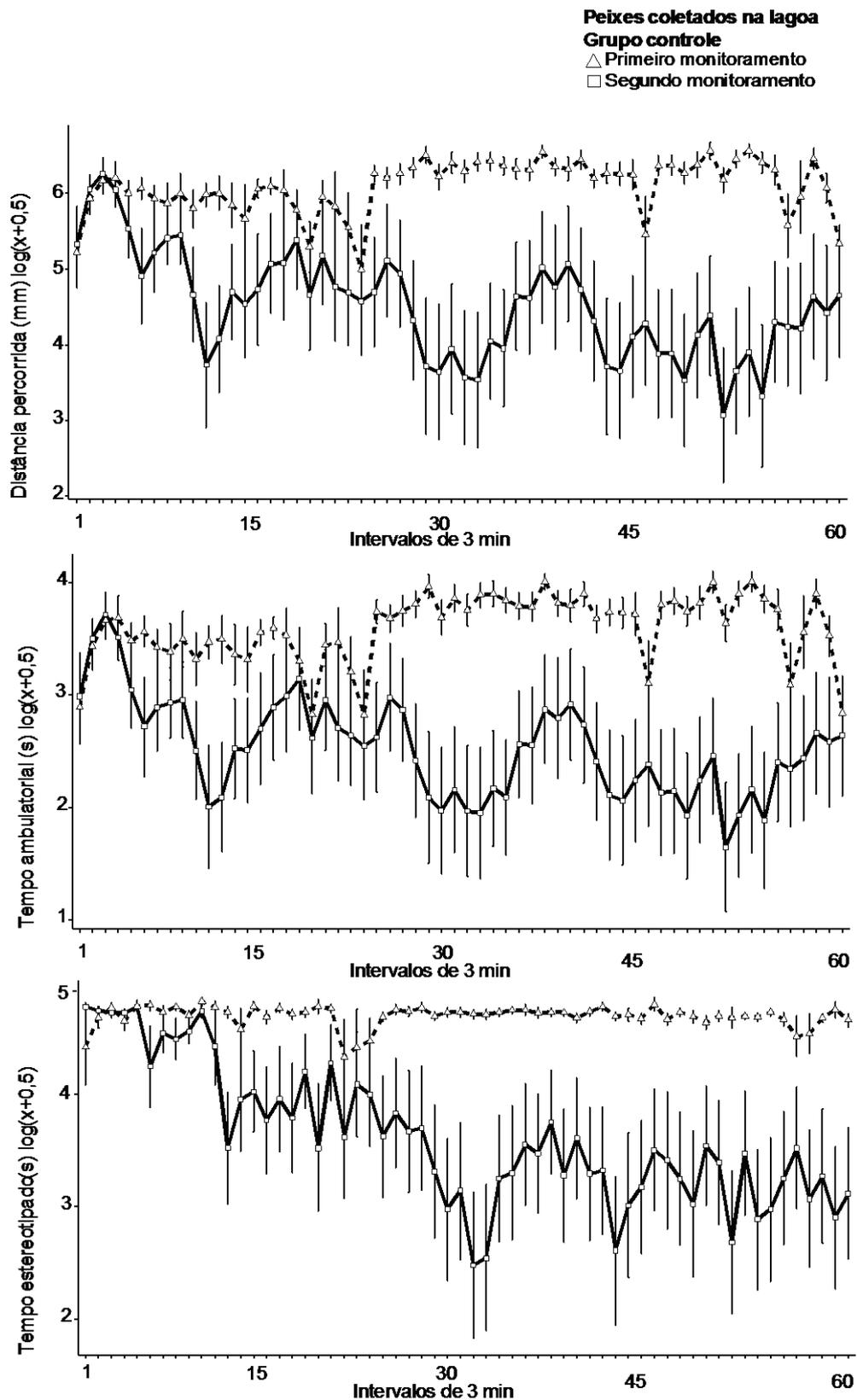


Figura 9: Registro dos parâmetros distância percorrida, tempo ambulatorial e tempo estereotipado dos peixes coletados da lagoa e não expostos ao extrato de cianobactéria (controle), nos dois momentos de monitoramento.

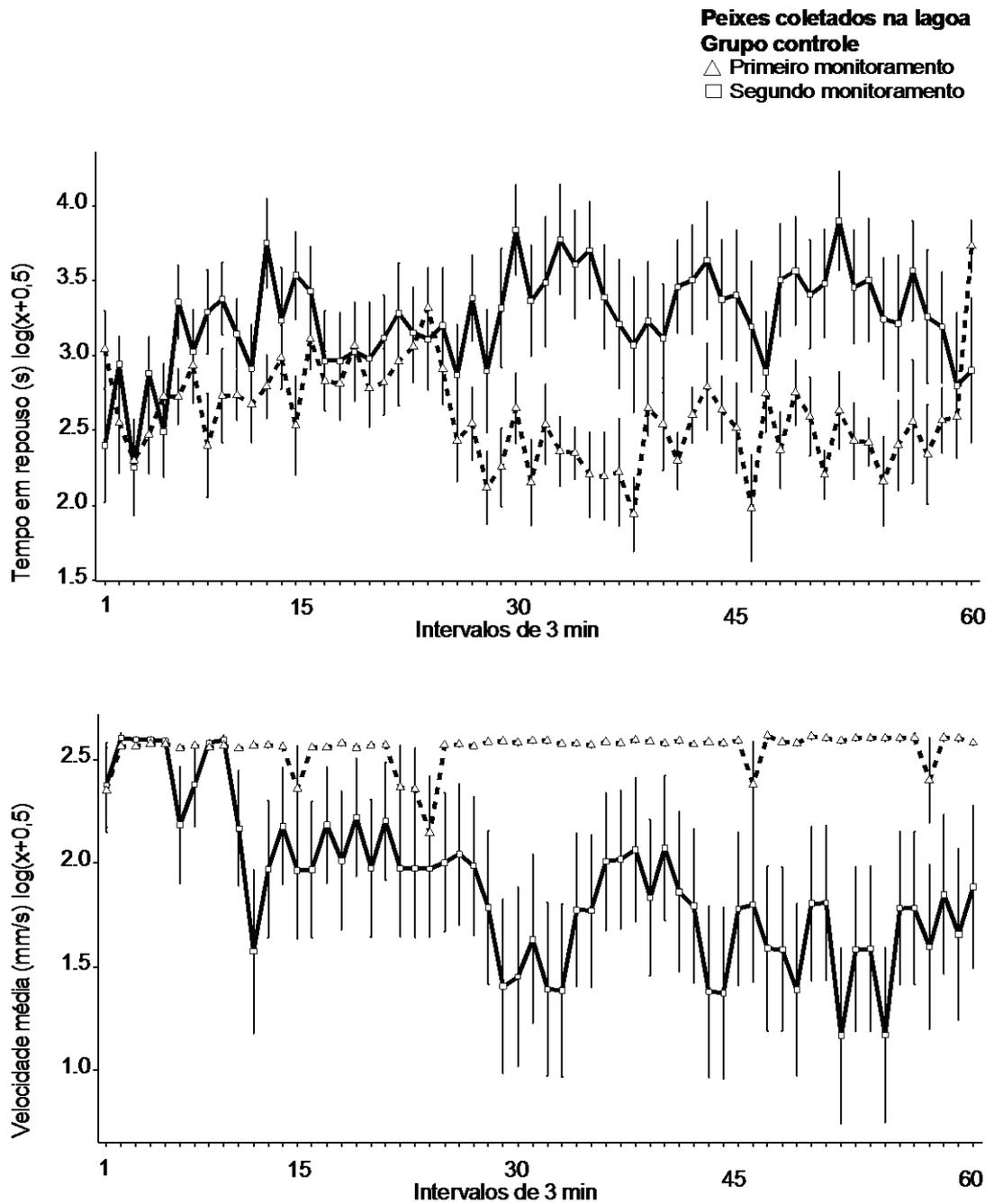


Figura 10: Registro dos parâmetros tempo em repouso e velocidade média dos peixes coletados da lagoa e não expostos ao extrato de cianobactéria (controle), nos dois momentos de monitoramento

Após a exposição os valores médios foram: distância percorrida 1341,63 ( $\pm 528,24$ ) mm, tempo ambulatorial 143,29 ( $\pm 34,44$ ) s, tempo estereotipado 23,67 ( $\pm 14,18$ ) s, tempo em repouso 13,02 ( $\pm 28,73$ ) s e velocidade média 9,41 ( $\pm 3,61$ ) mm/s (Figuras 11 e 12).

A análise estatística comparativa entre estes antes e após a exposição exibiu diferenças significativas em todos os parâmetros: distância percorrida (coeficiente estimado =  $-0,16 \pm 0,07$ , Wald = 5,37,  $P= 0,02$ ), tempo ambulatorial (coeficiente estimado =  $-0,13 \pm 0,06$ , Wald = 5,25  $P= 0,02$ ), tempo estereotipado (coeficiente estimado =  $0,29 \pm 0,06$ , Wald = 22,86,  $P<0,001$ ), tempo em repouso (coeficiente estimado =  $0,44 \pm 0,13$ , Wald = 11,99,  $P<0,001$ ) e velocidade média (coeficiente estimado =  $-0,19 \pm 0,08$ , Wald = 4,71,  $P= 0,03$ ). Os peixes expostos aumentaram sua atividade locomotora (distância percorrida, tempo ambulatorial e velocidade média) e diminuíram o tempo estereotipado e o de repouso (Figuras 11 e 12).

No quarto experimento realizado com *P. vivipara* criados em laboratório e monitorados antes e após a exposição a  $400 \text{ mg L}^{-1}$  do extrato liofilizado da cultura 1, houve um aumento da distância percorrida, do tempo ambulatorial e diminuição do tempo estereotipado e a velocidade média. Os valores médios dos parâmetros antes da exposição foram: distância percorrida 524,11 ( $\pm 201,50$ ) mm, tempo ambulatorial 41,06 ( $\pm 15,38$ ) s, tempo estereotipado 119,37 ( $\pm 14,19$ ) s, tempo em repouso 19,55 ( $\pm 16,43$ ) s e velocidade média 12,75 ( $\pm 0,69$ ) mm/s. Os valores médios após a exposição foram: distância percorrida 1422,73 ( $\pm 660,49$ ) mm, tempo ambulatorial 142,31 ( $\pm 36,56$ ) s, tempo estereotipado 21,86 ( $\pm 14,41$ ) s, tempo em repouso 15,81 ( $\pm 27,28$ ) e velocidade média 9,52 ( $\pm 2,91$ ) mm/s (Figuras 13 e 14).

A análise estatística comparativa entre estes antes e após a exposição exibiu diferenças significativas em todos os parâmetros com exceção do tempo em repouso: distância percorrida (coeficiente estimado =  $-1,93 \pm 0,40$ , Wald = 22,74,  $P<0,001$ ), tempo ambulatorial (coeficiente estimado =  $-3,46 \pm 0,36$ , Wald = 92,76,  $P<0,001$ ), tempo estereotipado (coeficiente estimado =  $0,85 \pm 0,09$ , Wald = 88,10,  $P<0,001$ ), tempo em repouso (coeficiente estimado =  $0,25 \pm 0,18$ , Wald = 2,03,  $P=0,15$ ) e velocidade média (coeficiente estimado =  $0,25 \pm 0,06$ , Wald = 16,92,  $P<0,001$ ).

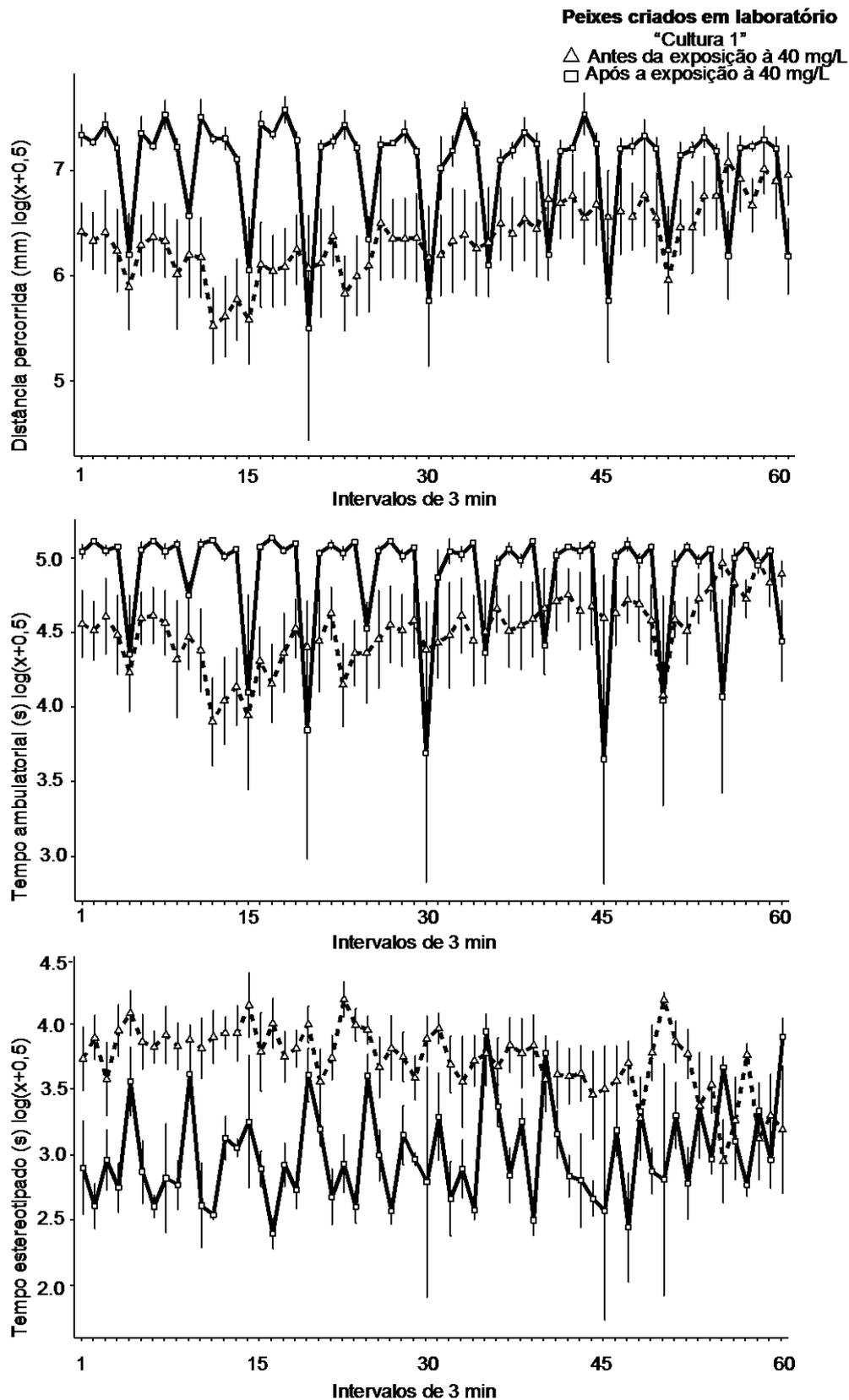


Figura 11: Registro dos parâmetros distância percorrida, tempo ambulatório e tempo estereotipado dos peixes criados em laboratório antes e após a exposição à 40 mg L<sup>-1</sup> do extrato de cianobactéria da cultura 1

**Peixes criados em laboratório**  
**"Cultura 1"**  
△ Antes da exposição à 40 mg/L  
□ Após a exposição à 40 mg/L

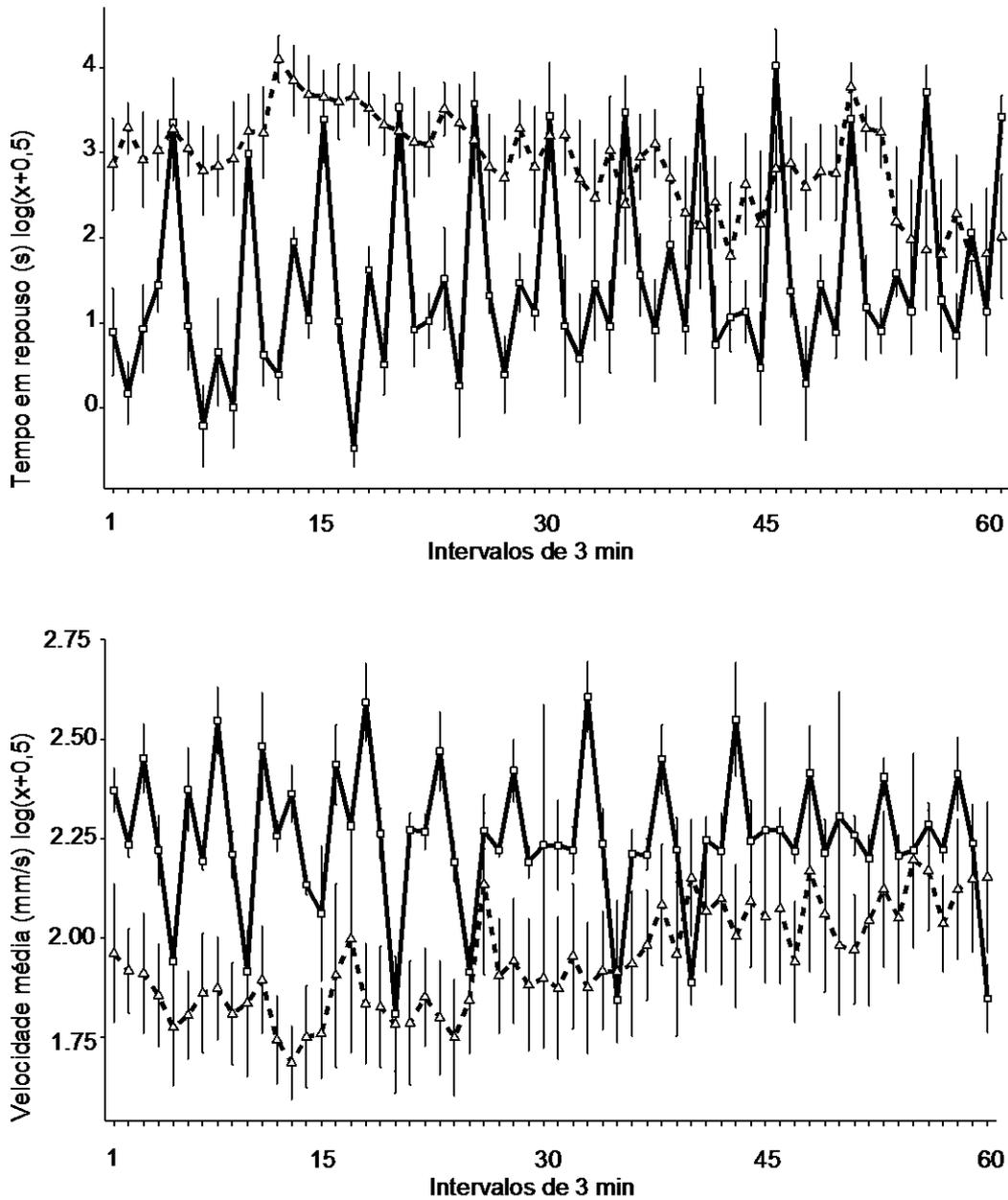


Figura 12: Registro dos parâmetros tempo em repouso e velocidade média dos peixes criados em laboratório antes e após a exposição à 40 mg L<sup>-1</sup> do extrato de cianobactéria da cultura 1

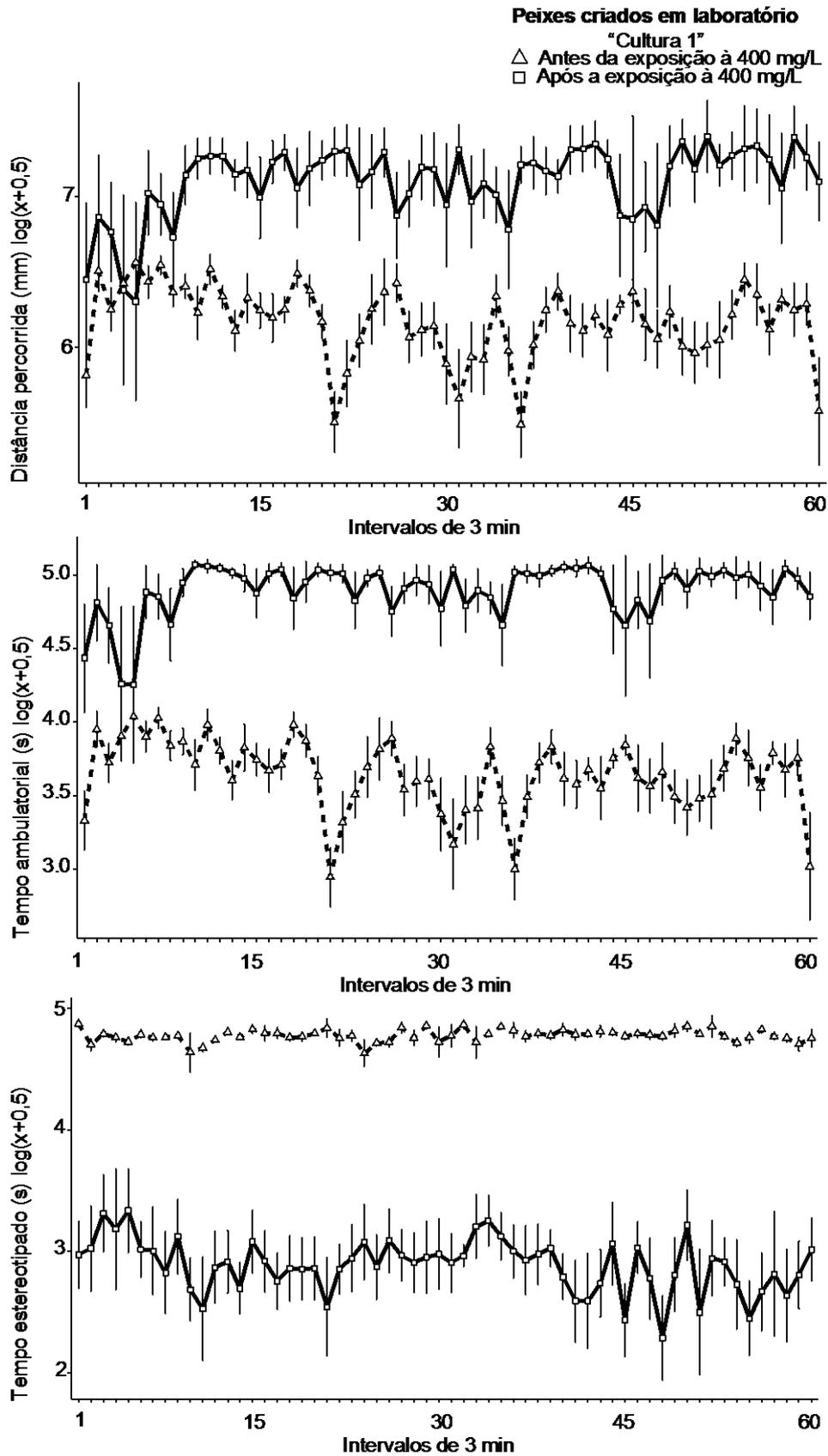


Figura 13: Registro dos parâmetros distância percorrida, tempo ambulatório e tempo estereotipado dos peixes criados em laboratório antes e após a exposição à 400 mg L<sup>-1</sup> do extrato de cianobactéria da cultura 1

**Peixes criados em laboratório**

“Cultura 1”

- △ Antes da exposição à 400 mg/L
- Após a exposição à 400 mg/L

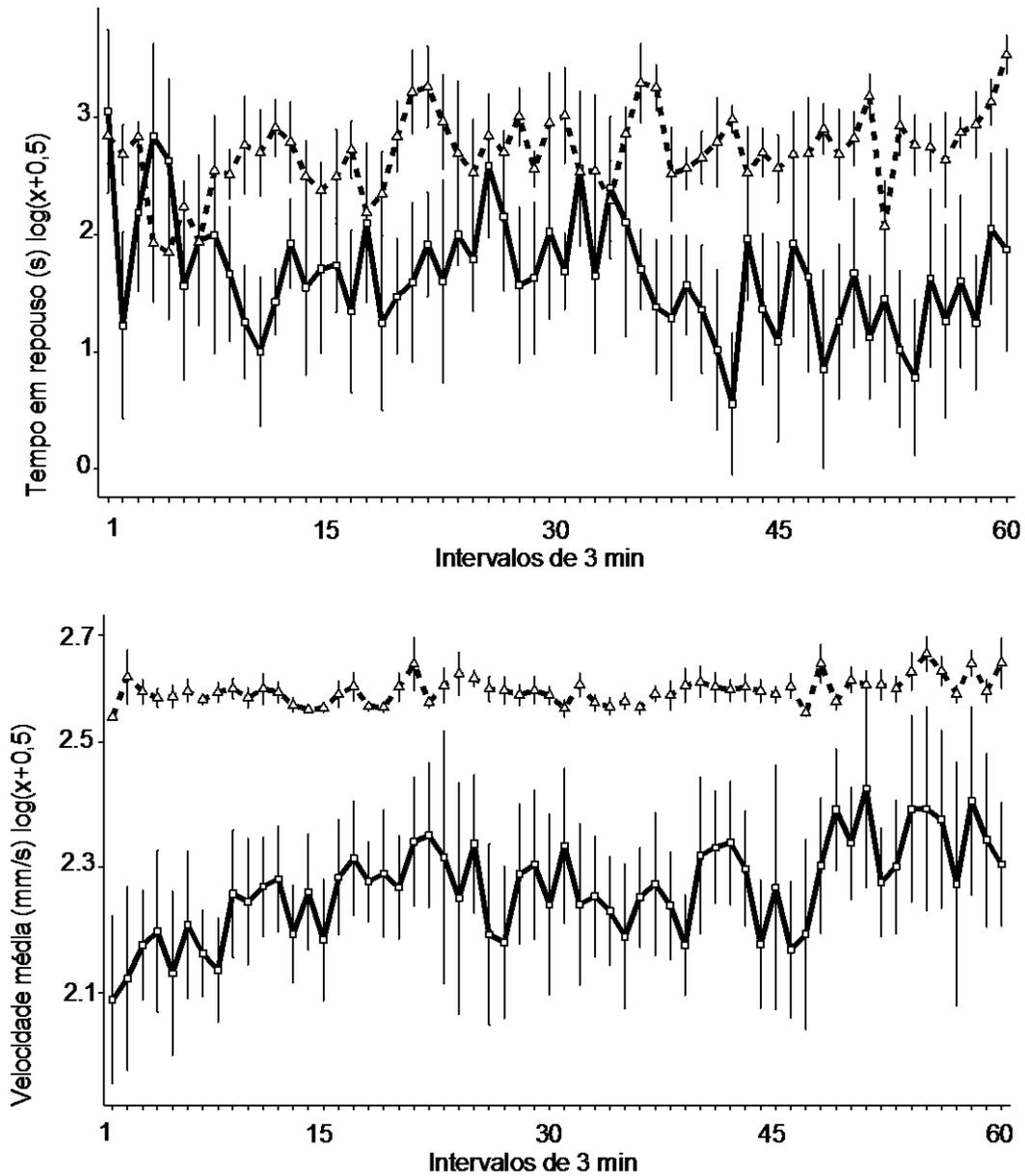


Figura 14: Registro dos parâmetros tempo em repouso e velocidade média dos peixes criados em laboratório antes e após a exposição à 400 mg L<sup>-1</sup> do extrato de cianobactéria da cultura 1

No quinto experimento realizado com *P. vivipara* coletados da lagoa e monitorados antes e após a exposição a 400 mg L<sup>-1</sup> do extrato liofilizado da cultura 1, a atividade locomotora aumentou em todos os parâmetros com exceção do tempo em repouso. O tempo ambulatorial foi o único que não apresentou diferença significativa. Os valores médios dos parâmetros antes da exposição foram: distância percorrida 406,78 (±405,67) mm, tempo ambulatorial 30,00 (±28,96) s, tempo estereotipado 98,33 (±44,07) s, tempo em repouso 51,66 (57,80) e velocidade média 9,87 (±5,78). Os valores médios dos parâmetros após a exposição foram: distância percorrida 412,87 (±185,00) mm, tempo ambulatorial 33,07 (±14,35) s, tempo estereotipado 122,78 (±18,29) s, tempo em repouso 24,13 (±20,75) e velocidade média 12,35 (±1,05) mm/s (Figuras 15 e 16).

A análise estatística comparativa entre estes antes e após a exposição exibiu diferenças significativas em todos os parâmetros com exceção do tempo ambulatorial: distância percorrida (coeficiente estimado = -0,66 ± 0,30, Wald = 4,68, *P*=0,03), tempo ambulatorial (coeficiente estimado = -0,54 ± 0,27, Wald = 3,80, *P*=0,05), tempo estereotipado (coeficiente estimado = -0,67 ± 0,17, Wald = 15,24, *P*<0,001), tempo em repouso (coeficiente estimado = 0,15 ± 0,07, Wald = 4,77, *P*=0,02) e velocidade média (coeficiente estimado = -0,70 ± 0,22, Wald = 9,49, *P*=0,002).

No sexto experimento realizado com *P. vivipara* criados em laboratório e monitorados antes e após a exposição a 400 mg L<sup>-1</sup> do extrato liofilizado da cultura 2, todos os parâmetros da atividade locomotora diminuíram com exceção do tempo em repouso. Os valores médios dos parâmetros antes da exposição foram: distância percorrida 836,30 (±482,38) mm, tempo ambulatorial 57,66 (±28,97) s, tempo estereotipado 100,81 (±25,87) s, tempo em repouso 21,49 (±34,42) s e velocidade média 13,65 (±3,41). Os valores médios dos parâmetros após a exposição foram: distância percorrida 368,91 (±325,13) mm, tempo ambulatorial 27,90 (±21,21) s, tempo estereotipado 95,45 (±47,85) s, tempo em repouso 56,57 (±61,70) e velocidade média 10,72 (±5,01) mm/s (Figuras 17 e 18).

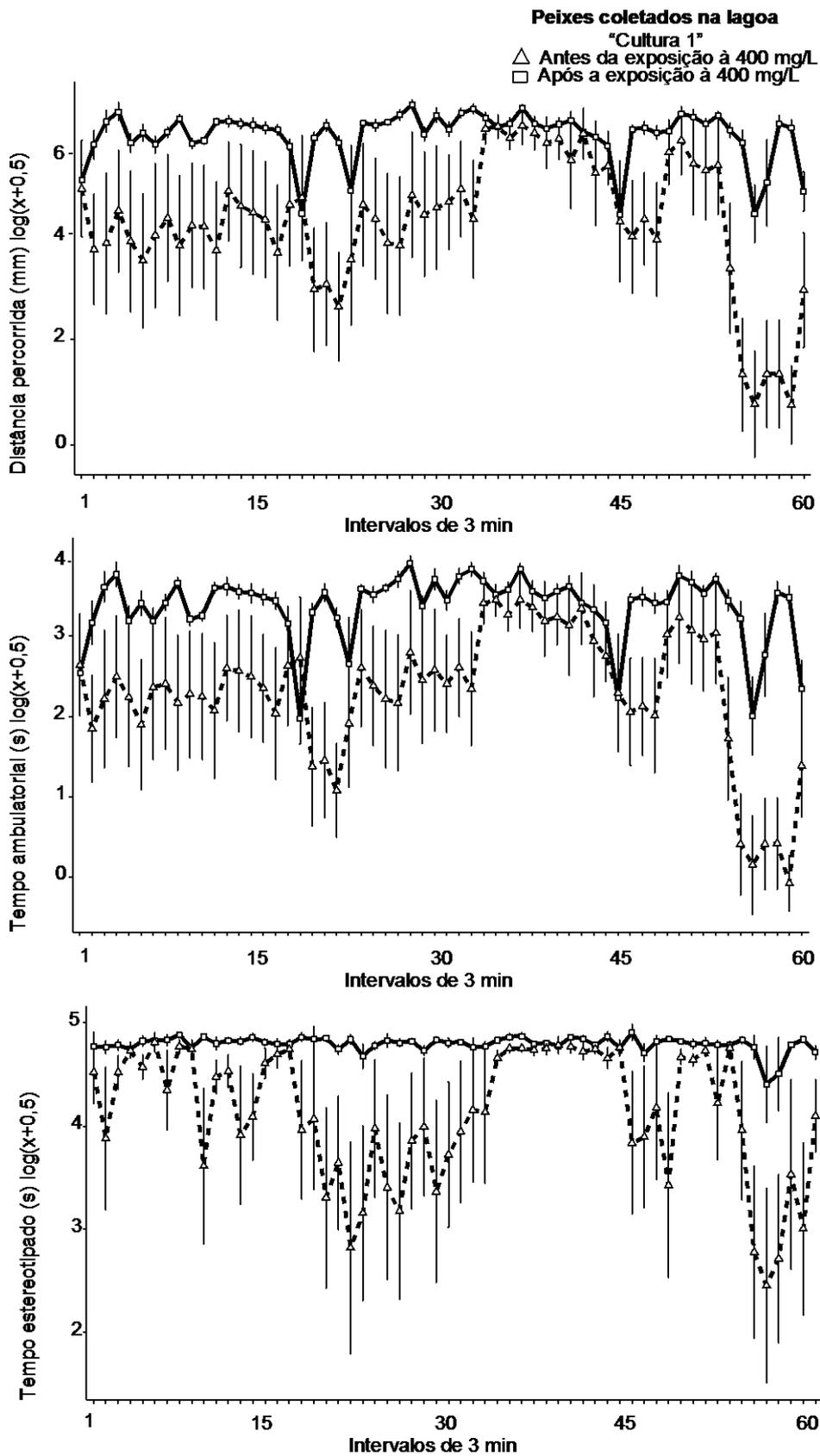


Figura 15: Registro dos parâmetros distância percorrida, tempo ambulatório e tempo estereotipado dos peixes coletados da lagoa antes e após a exposição à  $400 \text{ mg L}^{-1}$  do extrato de cianobactéria da cultura 1

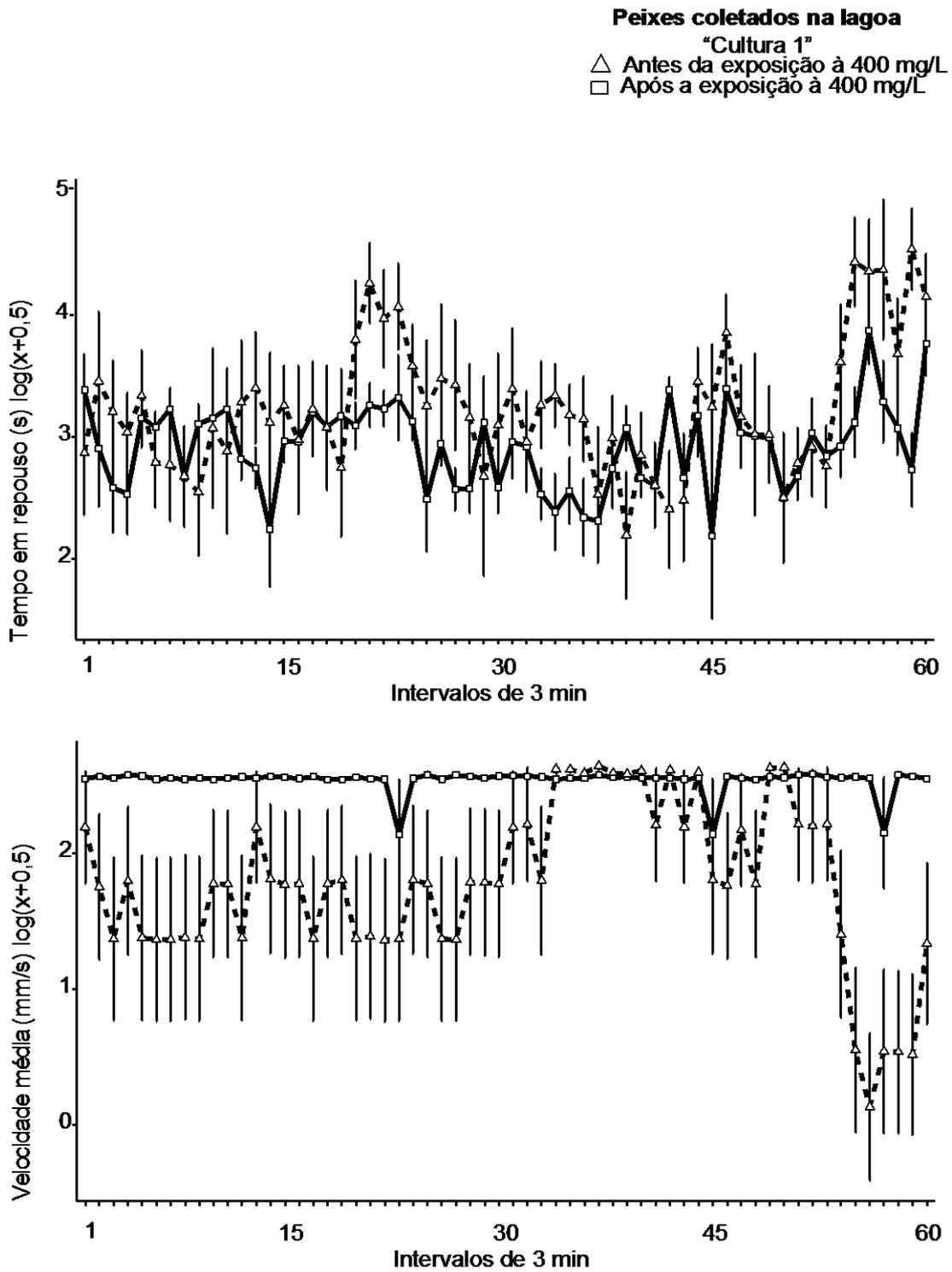


Figura 16: Registro dos parâmetros tempo em repouso e velocidade média dos peixes coletados da lagoa antes e após a exposição à 400 mg L<sup>-1</sup> do extrato de cianobactéria da cultura 1

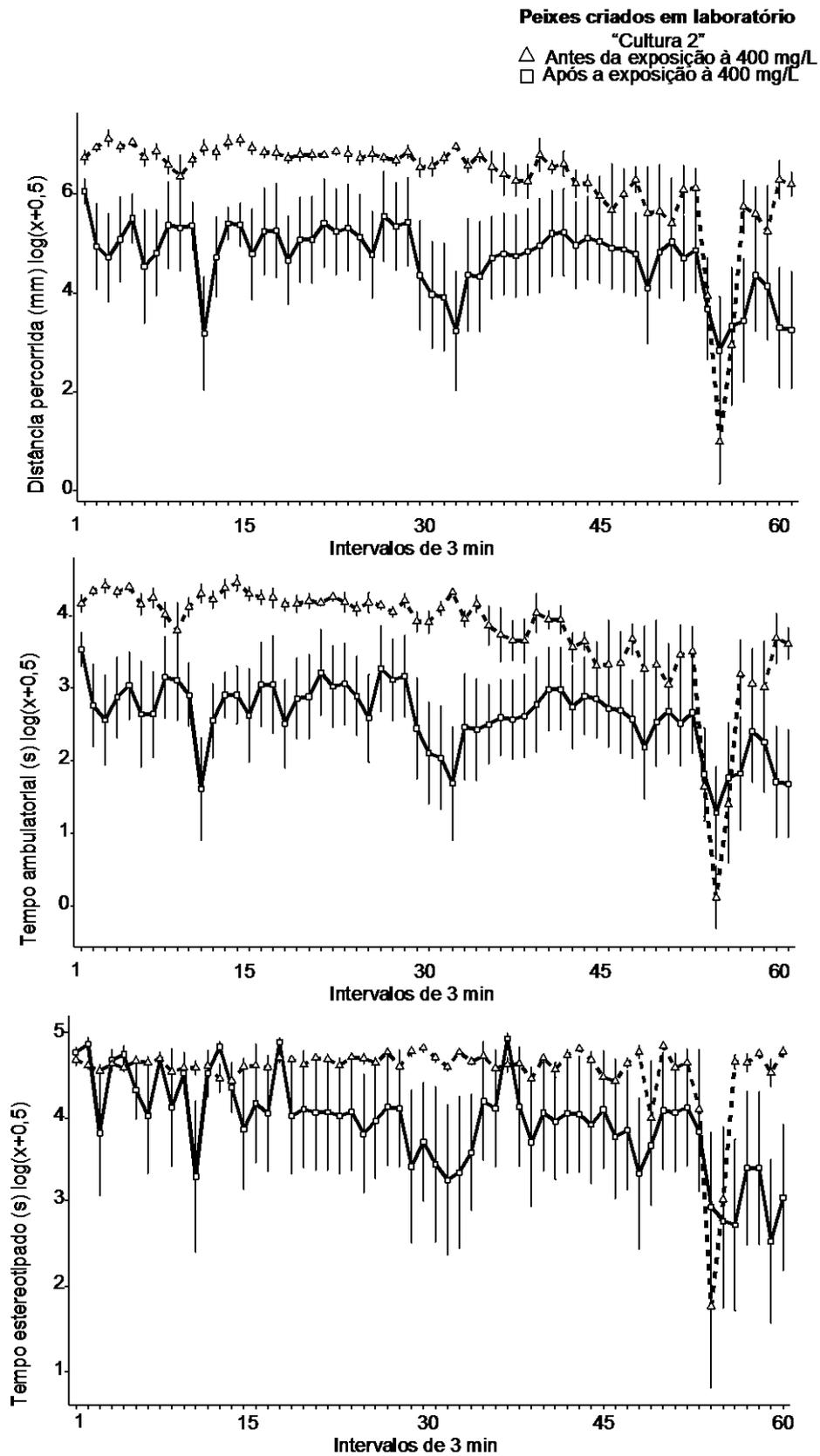


Figura 17: Registro dos parâmetros distância percorrida, tempo ambulatorial e tempo estereotipado dos peixes criados em laboratório antes e após a exposição à 400 mg L<sup>-1</sup> do extrato de cianobactéria da cultura 2

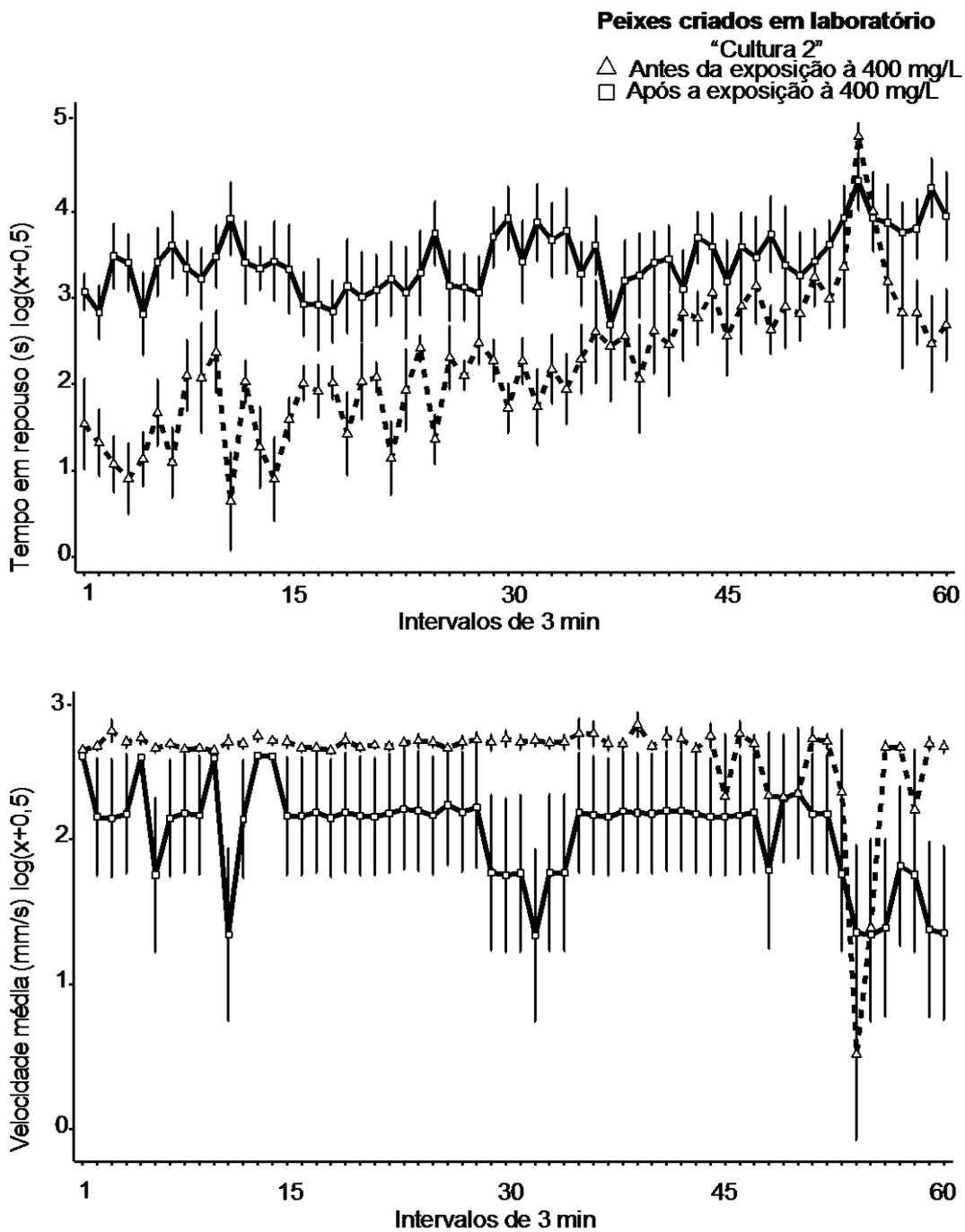


Figura 18: Registro dos parâmetros tempo em repouso e velocidade média dos peixes criados em laboratório antes e após a exposição à 400 mg L<sup>-1</sup> do extrato de cianobactéria da cultura 2

A análise estatística comparativa de antes e após a exposição exibiu diferenças significativas em todos os parâmetros com exceção do estereotipado: distância percorrida (coeficiente estimado =  $0,99 \pm 0,32$ , Wald = 9,51,  $P=0,002$ ), tempo ambulatorial (coeficiente estimado =  $1,09 \pm 0,34$ , Wald = 10,40,  $P=0,001$ ), tempo estereotipado (coeficiente estimado =  $0,47 \pm 0,30$ , Wald = 2,43,  $P=0,12$ ), tempo em repouso (coeficiente estimado =  $-0,37 \pm 0,09$ , Wald = 16,20,  $P<0,001$ ) e velocidade média (coeficiente estimado =  $0,05 \pm 0,08$ , Wald = 0,38,  $P=0,03$ ).

No sétimo experimento realizado com *P. vivipara* coletados da lagoa e monitorados antes e após a exposição a  $400 \text{ mg L}^{-1}$  do extrato liofilizado da cultura 2, todos os parâmetros da atividade locomotora diminuíram com exceção do tempo em repouso. Os valores médios dos parâmetros antes da exposição foram: distância percorrida  $555,0 (\pm 265,0)$  mm, tempo ambulatorial  $42,70 (\pm 19,00)$  s, tempo estereotipado  $115,40 (\pm 21,30)$  s, tempo em repouso  $21,90 (\pm 25,10)$  s e velocidade média  $12,60 (\pm 1,77)$  mm/s. Os valores médios dos parâmetros após a exposição foram: distância percorrida  $480,00 (\pm 327,00)$  mm, tempo ambulatorial  $36,40 (\pm 24,20)$  s, tempo estereotipado  $93,70 (\pm 44,40)$  s, tempo em repouso  $49,90 (\pm 61,20)$  s e velocidade média  $11,20 (\pm 4,83)$  mm/s (Figuras 19 e 20).

A análise estatística comparativa entre estes antes e após a exposição exibiu diferenças significativas apenas no tempo ambulatorial: distância percorrida (coeficiente estimado =  $0,18 \pm 0,09$ , Wald = 3,75,  $P=0,05$ ), tempo ambulatorial (coeficiente estimado =  $0,21 \pm 0,10$ , Wald = 3,97,  $P=0,04$ ), tempo estereotipado (coeficiente estimado =  $0,13 \pm 0,07$ , Wald = 2,91,  $P=0,08$ ), tempo em repouso (coeficiente estimado =  $-0,66 \pm 0,34$ , Wald = 3,69,  $P=0,05$ ) e velocidade média (coeficiente estimado =  $-0,04 \pm 0,03$ , Wald = 1,43,  $P=0,23$ ).

Uma comparação geral entre todos os experimentos realizados indicou alterações na atividade locomotora dos peixes expostos ao extrato de cianobactérias com hiperatividades dos peixes expostos à cultura 1 e hipoatividade nos expostos à cultura 2 (Tabela 1).

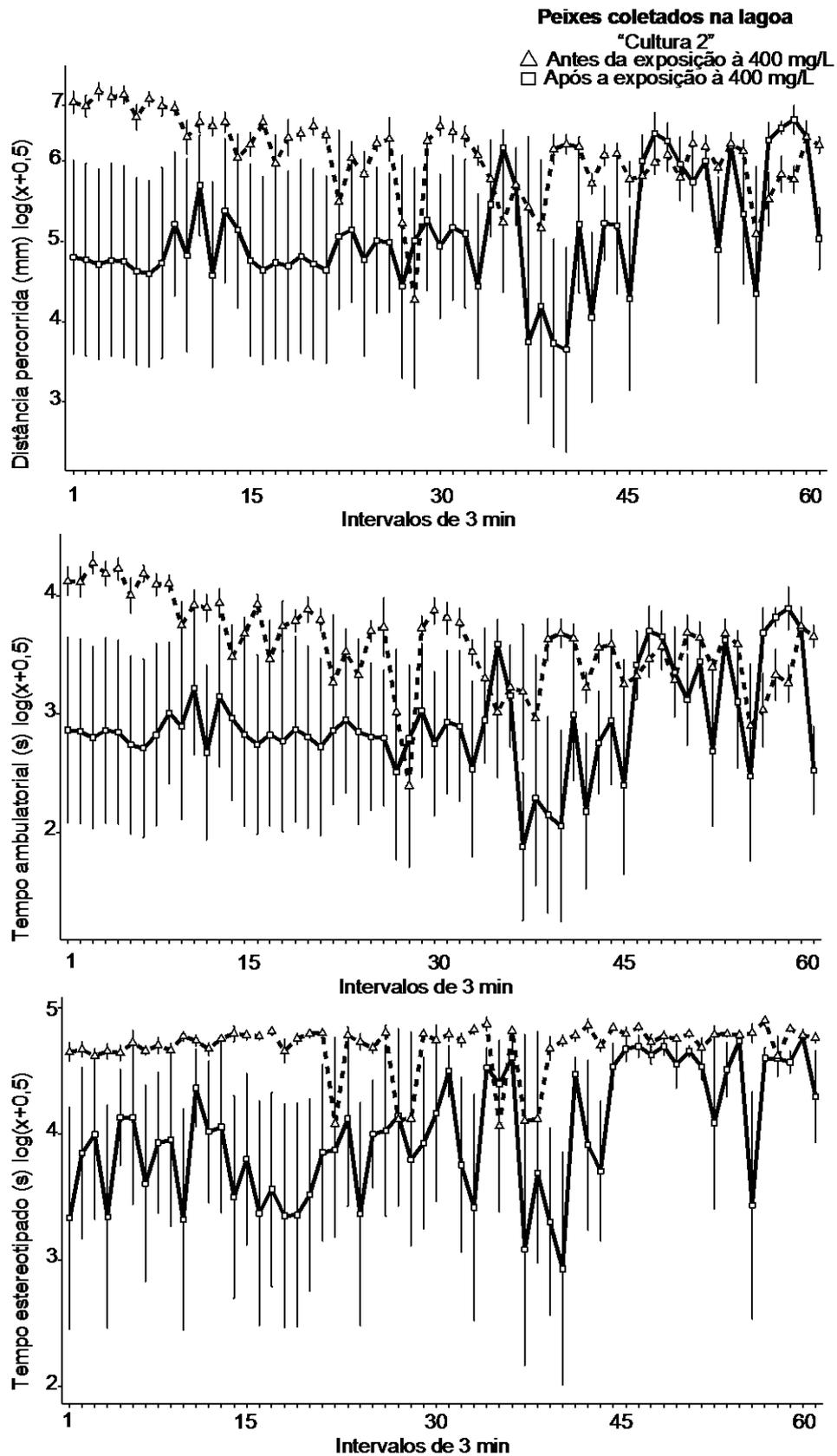


Figura 19: Registro dos parâmetros distância percorrida, tempo ambulatorial e tempo estereotipado dos peixes coletados da lagoa antes e após a exposição à 400 mg L<sup>-1</sup> do extrato de cianobactéria da cultura 2

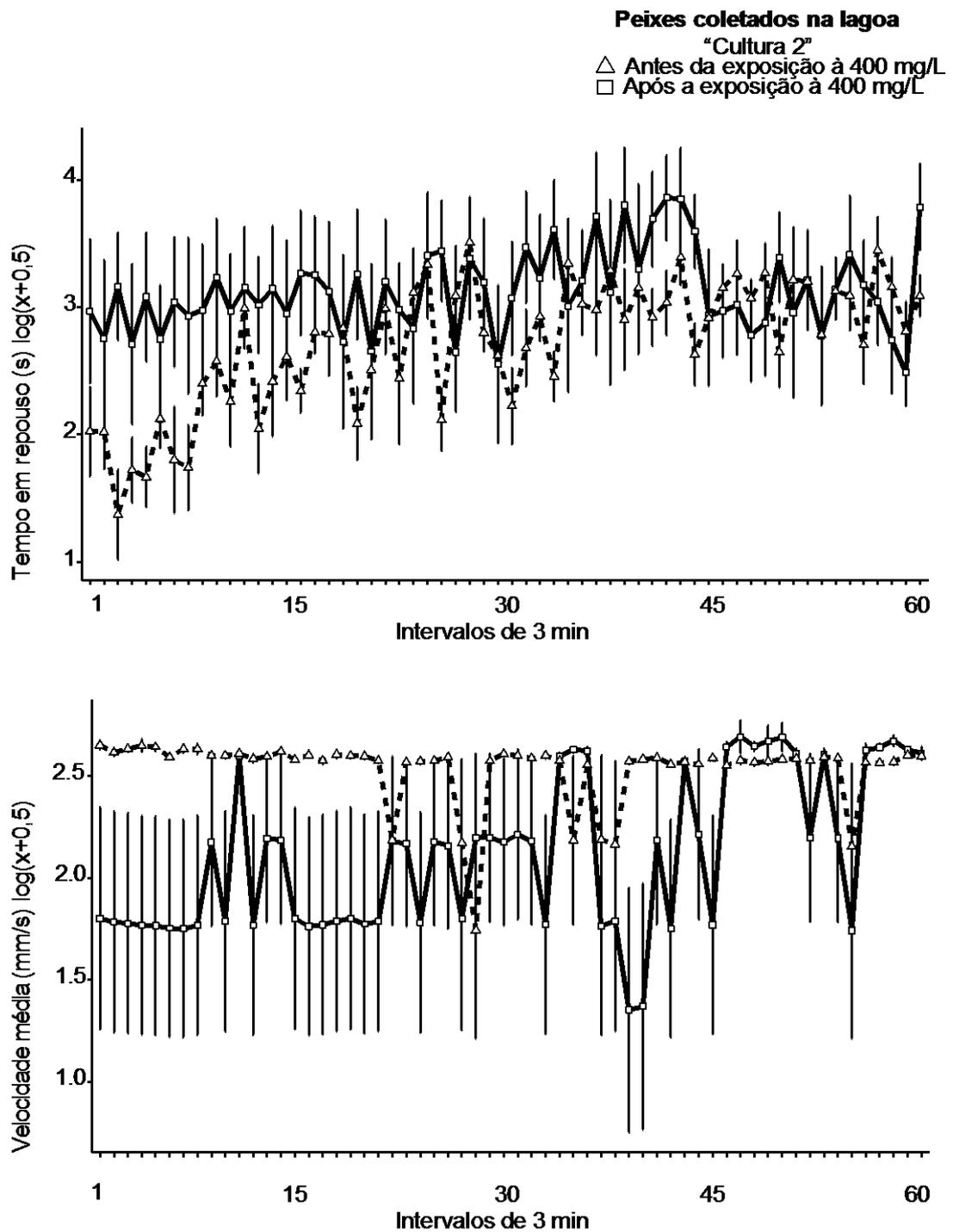


Figura 20: Registro dos parâmetros tempo em repouso e velocidade média dos peixes coletados da lagoa antes e após a exposição à 400 mg L<sup>-1</sup> do extrato de cianobactéria da cultura 2

Tabela 1: Resumo dos experimentos com a indicação do valor de significancia ( $p>0,05$ ) entre os dois momentos de monitoramento e a indicação se os parâmetros de locomoção permaneceram iguais (=), aumentaram (+) ou diminuíram (-) em resposta ao estímulo (R).

Experimentos	DP	R	TA	R	TE	R	TR	R	VM	R
1. Peixes criados em laboratório (não expostos)	0,10	=	0,05	=	0,44	=	0,17	=	0,36	=
2. Peixes da lagoa (não expostos)	0,47	=	0,54	=	0,25	=	0,34	=	0,43	=
3. Peixes criados em laboratório (Cultura 1 - 40mg/L)	0,02	+	0,02	+	<0,001	-	<0,001	-	0,03	+
4. Peixes criados em laboratório (Cultura1 - 400mg/L)	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	-	0,15	=	<0,001	-
5. Peixes da lagoa (Cultura 1 - 400mg/L)	0,03	+	0,05	=	<0,001	+	0,02	-	0,002	+
6. Peixes criados em laboratório (Cultura 2 - 400mg/L)	0,002	-	<0,001	-	0,12	=	0,001	-	0,03	-
7. Peixe da lagoa (Cultura 2 - 400mg/L)	0,05	=	0,04	-	0,08	=	0,05	=	0,23	=

\*DP= distância percorrida; TA= tempo ambulatorial; TE= tempo estereotipado; TR= tempo em repouso; VM= velocidade média

## 5.2. Motilidade de metacercárias de *Pygidopsis macrostomum*

O comprimento total dos peixes utilizados nestes experimentos variou de 3,5–5,5 (4,4) cm, e o peso 0,4–1,7 (1,1) g. Os valores médios dos parâmetros físico-químicos controlados da água do aquário sem o extrato da cianobactéria foram: oxigênio 7,3 ( $\pm 0,2$ ) mg L<sup>-1</sup>, condutividade 83,7 ( $\pm 1,6$ )  $\mu$ S/cm e pH 6,1 ( $\pm 0,4$ ). Os valores médios dos parâmetros físico-químicos da água com extrato de cianobactéria foram: oxigênio 7,4 ( $\pm 0,2$ ) mg L<sup>-1</sup>, condutividade 165 ( $\pm 28,2$ )  $\mu$ S/cm e pH 6,6 ( $\pm 0,3$ ), a temperatura se manteve constante em torno de 24 °C.

As 36 metacercárias de *P. macrostomum* retiradas das vísceras dos cinco peixes examinados do grupo controle da fase 1 e as 51 dos cinco peixes da fase 2 estavam vivas (100%).

Na primeira fase, todos os dez peixes foram examinados imediatamente após a exposição. No grupo exposto à concentração de 40 mg L<sup>-1</sup> (Fase 1) 35 metacercárias foram encontradas mas apenas nove estavam com motilidade inalterada (35%) (Qui-quadrado  $X^2= 10.04$ ,  $P= 0.001$ ). No grupo exposto à 400 mg L<sup>-1</sup> (Fase 1) das 38 metacercárias encontradas, apenas dez (36%) estavam ativas (Qui-quadrado  $X^2= 10.36$ ,  $P= 0.002$ ) (Tabela 2, Figura 21).

Na segunda fase, os peixes após a exposição ficaram 48h em água limpa do aquário para em seguida serem examinados. No grupo exposto à 40 mg L<sup>-1</sup> do extrato foram encontradas 53 metacercárias e todas (100%) estavam ativas (Qui-quadrado  $X^2= 0.00$ , p-valor= 1). No grupo exposto à 400 mg L<sup>-1</sup>, 42 metacercárias foram coletadas e 38 (90%) estavam se movendo (Qui-quadrado  $X^2= 0.11$ , p-valor= 0.77) (Tabela 2, Figura 21).

Os experimentos de motilidade de metacercárias foram realizados com uma mesma cultura de cianobactérias (cultura 3) e foram observados: 1) motilidade normal no grupo controle; 2) paralisia na maioria dos parasitos analisados imediatamente após a exposição às cianobactérias e 3) motilidade na maioria dos parasitos que passaram 48h em água limpa após a exposição ao extrato de cianobactéria.



Figura 21: Fotomicrografia da metacercária de *Pygidiopsis macrostomum*

Tabela 2: Número total de metacercárias de *Pygidiopsis macrostomum* móveis e imóveis nas fases 1 e 2 do experimento.

Grupos	Fase 1 Necropsias realizadas imediatamente após a exposição			Fase 2 Necropsias realizadas após os peixes serem mantidos por 48 h em água limpa		
	Móveis	Imóveis	N total	Móveis	Imóveis	N total
Controle	36	0	36	51	0	51
40 mg L <sup>-1</sup>	9	26	35	53	0	53
400 mg L <sup>-1</sup>	10	28	38	38	4	42

N= número de metacercárias

### 5.3 Quantificação de saxitoxina das soluções e dos tecidos dos peixes

Os valores quantificados de saxitoxina presente nas amostras das soluções utilizadas nos testes comportamentais e no teste de motilidade de metacercárias de *P. macrostomum*, as diluições realizadas para dosagem e o valor de saxitoxina presente nas culturas estão representados na Tabela 3.

Os valores médios e os desvios padrões da quantificação de saxitoxina presente nas réplicas das amostras de peixes, as diluições realizadas nas dosagens, o peso das amostras e o valor de saxitoxina presente nas vísceras e brânquias dos peixes das fases 1 e 2 e do grupo controle utilizados no teste de motilidade de metacercárias de *P. macrostomum* estão representados na Tabela 4.

Tabela 3: Análise quantitativa da saxitoxina presente nas soluções das culturas 1,2 e 3.

<b>Amostra</b>	<b>Saxitoxina nas Amostras (ppb) (ng/mL)</b>	<b>Diluição</b>	<b>Saxitoxina nas Culturas* (µg L<sup>-1</sup>)</b>
Cultura 1 - 40 mg L <sup>-1</sup>	0,200	100	20,00
Cultura 1 - 400 mg L <sup>-1</sup>	0,073	100	7,30
Cultura 2 - 400 mg L <sup>-1</sup>	0,086	100	8,60
Cultura 3 - 40 mg L <sup>-1</sup>	0,026	100	2,60
Cultura 3 - 400 mg L <sup>-1</sup>	0,026	100	2,60

\*Os valores de saxitoxina nas culturas foi obtido a partir multiplicação do valor de saxitoxina nas amostras pela diluição utilizada.

Tabela 4: Análise quantitativa da saxitoxina presente nas vísceras e brânquias dos peixes provenientes da lagoa utilizados no teste de motilidade de metacercárias de *Pygidiopsis macrostomum*.

Fase do experimento	Tecidos	Saxitoxina inicial	Diluição	Peso (g)	Saxitoxina final
		nos Tecidos (ppb) (ng/mL)			nos tecidos*
Controle	Vísceras	0,131±0,003	1	0,085±0,02	1,60±0,43
Controle	Brânquias	0,072±0,001	1	0,085±0,02	0,87±0,20
1	Vísceras - 40 mg L <sup>-1</sup>	0,101±0,01	1	0,08±0,02	1,37±0,61
1	Brânquias - 40 mg L <sup>-1</sup>	0,037±0,005	1	0,051±0,006	0,72±0,02
1	Vísceras - 400 mg L <sup>-1</sup>	0,025±0,02	100	0,065±0,007	37,74±0,84
1	Brânquias - 400 mg L <sup>-1</sup>	0,098±0,03	1	0,0435±0,001	2,23±0,82
2	Vísceras - 40 mg L <sup>-1</sup>	0,129±0,004	1	0,058±0,007	2,24±0,36
2	Brânquias - 40 mg L <sup>-1</sup>	0,047±0	1	0,0325±0,002	1,45±0,09
2	Vísceras - 400 mg L <sup>-1</sup>	0,236±0,02	1	0,045±0,006	5,20±0,23
2	Brânquias - 400 mg L <sup>-1</sup>	0,064±0,002	1	0,041±0,002	1,53±0,13

\*O valor final de saxitoxina nos tecidos foi obtido a partir da fórmula: (saxitoxina inicial nos tecidos x diluição) / peso.

## 6. DISCUSSÃO

As alterações comportamentais em animais podem ser caracterizadas pela tentativa de se adaptar ao meio após alguma perturbação ou podem ser geradas com o objetivo de reduzir a probabilidade de morte ou o custo metabólico do organismo (Olla et al. 1980, Begout Anras e Largardère, 2004).

O comportamento natatório, por exemplo, é considerado um índice válido e consistente para avaliação de toxicidade subletal, pois os testes podem ser feitos com estresse mínimo para os peixes, possibilitando a repetição de medidas dos mesmos indivíduos ao longo de todo o experimento (Little e Finger, 1990). As mudanças na atividade natatória causadas pela exposição a contaminantes podem dificultar a habilidade do peixe de se alimentar, evitar predação e reproduzir (Little e Finger, 1990, Santos e Santos, 2013).

Os efeitos tóxicos das cianotoxinas em peixes podem ser avaliados através de métodos mais ou menos invasivos. Dentre os métodos considerados mais invasivos estão as injeções intraperitoneais e as aplicações orais que já foram utilizadas em prévios estudos toxicológicos (Phillips et al. 1985, Tencalla et al. 1994, Cazenave et al. 2008 e Bakke et al. 2010). Em contraste, o uso de parâmetros comportamentais é menos invasivo para avaliar a sensibilidade dos peixes a essas toxinas e possibilita detectar baixos níveis de cianotoxinas capazes de gerar perturbações (Siegmund e Biermann, 1993). Baganz et al. (1998) por exemplo, verificaram que baixas concentrações de microcistina ( $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ ) são capazes de alterar o comportamento do peixe *Danio rerio* (Hamilton, 1822), reduzindo a sua locomoção. No entanto, este peixe é de origem asiática sendo apenas encontrado em aquários e laboratórios experimentais.

*Poecilia vivipara* por sua vez, é um peixe endêmico da região Neotropical e totalmente adaptado a condições ambientais extremas, inclusive a áreas poluídas, mas que tem sido pouco usado como modelo experimental. Nesse primeiro estudo ecotoxicológico com cianobactérias utilizando tanto peixes coletados na Lagoa Rodrigo de Freitas (ambiente natural) quanto peixes nascidos e criados em laboratório, foi possível observar que o extrato da

cianobactéria alterou significativamente a atividade natatória dos peixes de ambos os ambientes.

A análise dos parâmetros físico-químicos mostrou que o extrato liofilizado da cianobactéria elevou o pH da água utilizada nos experimentos. Estudos realizados por Magalhães et al. (2012) analisando a influência de diferentes valores de pH na atividade locomotora do peixe *Danio rerio*, indicaram que a locomoção do peixe não é alterada em valores inferiores a 9.5. Como as variações observadas nesse trabalho não excederam este valor, o pH não foi considerado responsável pelas alterações ocorridas na atividade locomotora dos peixes após exposição ao extrato de *C. raciborskii*.

A avaliação de como determinadas substâncias ou parasitos podem influenciar na atividade locomotora dos organismos aquáticos vem sendo realizada em nosso laboratório através do sistema de biomonitoramento por análise de imagem (VIDEOMEX-V®). Em moluscos, o comportamento de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) infectadas com *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 foi avaliado por Alberto-Silva et al. (2015) e o comportamento de *Melanoides tuberculatus* (Müller, 1774) infectados com o trematódeo *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) foi avaliado por Santos et al. (2013).

Em microscrustáceos, Ferrão-Filho et al. (2007) avaliaram a atividade locomotora de *Daphnia pulex* Leydig, 1860 expostos à *Cylindrospermopsis raciborskii*. Em peixes, o comportamento de *D. rerio* foi avaliado após a exposição ao cloreto de sódio (NaCl) (Magalhães et al. 2007) e à *C. raciborskii* (Ferrão-Filho et al. 2007). *Poecilia vivipara* foram utilizados para a avaliação de alterações comportamentais causadas pelos trematódeos *Acanthocollaritrema umbilicatum* (Santos et al. 2011) e *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* (Santos e Santos, 2013).

Ao avaliarmos a concentração ideal de *C. raciborskii* para conduzir os experimentos, foram testadas as concentrações de 40 e 400 mg L<sup>-1</sup> e como não houve mortalidade na maior concentração, optamos por utilizá-la nos experimentos subsequentes. No entanto, utilizamos a concentração de 40 mg L<sup>-1</sup> para realizar um experimento piloto conduzido com peixes criados em laboratório expostos a cultura 1.

No experimento conduzido com peixes criados em laboratório expostos à 400 mg L<sup>-1</sup> da cultura 1 houve um aumento significativo da distância percorrida e do tempo ambulatorial, no entanto ocorreu uma redução da velocidade média. O aumento do tempo ambulatorial é proporcionalmente maior em relação a distância percorrida, fazendo com que a velocidade média, que é inversamente proporcional ao tempo ambulatorial, diminua.

Ao avaliarmos a atividade locomotora tanto de *P. vivipara* criados em laboratório quanto dos peixes coletados na lagoa, observamos padrões de resposta opostos só quando expostos a culturas diferentes de *C. raciborskii*. Em todos os experimentos conduzidos com a cultura 1, nas duas concentrações testadas, ocorreu uma hiperatividade tanto nos peixes parasitados coletados na lagoa como nos livres de infecção criados em laboratório. Quando repetimos o experimento utilizando a cultura 2 obtivemos uma resposta contrária, uma hipoatividade dos peixes. No entanto, a quantificação de saxitoxina nas soluções de 400 mg L<sup>-1</sup> utilizadas nos testes apresentou valores próximos entre as culturas 1 e 2, o que indica que essa toxina não está relacionada com as alterações comportamentais observadas. Essas culturas diferentes da mesma cepa de *C. raciboorkii*, causaram efeitos antagônicos na atividade locomotora de *P. vivipara*, possivelmente devido à ação de outros metabólitos secundários não avaliados neste trabalho.

Os peixes coletados na lagoa tiveram contato prévio com diversas substâncias e microrganismos no ambiente natural e os peixes de laboratório foram mantidos em condições controladas. Mesmo sendo de ambientes diferentes, a resposta comportamental frente à exposição ao extrato da cianobactéria foi semelhante, com aumento da atividade locomotora quando expostos à cultura 1. Na cultura 2 houve redução da atividade locomotora nos dois grupos, mas apenas nos peixes da lagoa as alterações não foram significativas. É assim possível que haja maior resistência nos peixes da lagoa.

O efeito da saxitoxina em organismos aquáticos é referido como paralisante por cessar os impulsos elétricos através do bloqueio do canal de sódio nas células nervosas (Evans, 1965). Em peixes, o efeito de paralisia causado pela saxitoxina de diferentes cianobactérias já foi reportado em diversas espécies, *D. rerio* (Lefebvre et al. 2004), *Clupea harengus pallasii*

Valenciennes, 1847 (Lefebvre et al. 2005), *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Bakke et al. 2010), *Fundulus heteroclitus* (Linnaeus, 1766) (Salierno et al. 2006) e *Salmo salar* Cuvier et Valenciennes, 1848. (White, 1984, Mortensen, 1985, Bakke e Hosberg, 2007). Ferrão-Filho et al. (2007) expuseram *D. rerio* à células vivas de *C. raciborskii* cultivadas em laboratório e também à água bruta trazida do reservatório do Funil de onde a cepa foi isolada. Os autores relataram um aumento da atividade locomotora do peixe após a exposição, de modo semelhante ao que foi agora observado em *P. vivipara* expostos ao extrato da cultura 1. Em ambos os casos não foi observada paralisia dos peixes.

Além de alterações comportamentais em peixes e microcrustáceos, a saxitoxina pode ter efeitos na sobrevivência e crescimento desses organismos. Também podem causar algumas anomalias em larvas de peixes como edemas, curvatura do corpo e deformações da face (Lefebvre et al. 2004). Em nossos experimentos, não realizamos testes para determinar a letalidade média do extrato de *C. raciborskii* em *P. vivipara*, devido não ter ocorrido mortes de peixes em nenhum dos grupos de testados em nenhuma das concentrações utilizadas por 48 horas. Zagatto et al. (2012) relataram não ter observado efeitos na sobrevivência do peixe *D. rerio* adulto durante 96 horas de exposição às células vivas de *C. raciborskii*, porém observou letalidade nas larvas do mesmo peixe após 7 dias de exposição.

A Lagoa Rodrigo de Freitas atua como berçário para diversas espécies de peixes sendo fonte de abrigo, reprodução e alimentação. A presença de aves piscívoras e moluscos garantem a manutenção do ciclo de vida de diversas espécies de trematódeos (Simões et al. 2008). No entanto, apresenta problemas de saneamento, registrando mortandades periódicas de peixes. O aporte de nutrientes contribui para a ocorrência de frequentes florações de microalgas, principalmente cianobactérias, criptofíceas e dinoflagelados (Domingos et al. 2012). É interessante notar que nos eventos de mortandades de peixes na lagoa, os barrigudinhos *P. vivipara* apresentam grande resistência e apresentam uma alta carga parasitária ao longo de todo o ano (Simões et al 2009).

Dentre as espécies que parasitam *P. vivipara*, as metacercárias de *P. macrostomum* são as maiores, o que facilita a sua localização nos órgãos do mesentério do peixe e a observação de sua motilidade. Os dados obtidos no experimento de motilidade desses parasitos sugerem que a saxitoxina possa ter exercido nas metacercárias um efeito de paralisia temporária similar ao observado por Ferrão-Filho et al. (2007) em duas espécies de *Daphnia* (microcrustáceos) expostas a baixas concentrações de *C. rasciborskii* ( $5 \times 10^3$  células mL<sup>-1</sup>). Assim como observado por estes autores, este efeito mostrou-se reversível. A paralisia temporária foi observada nos parasitos dos peixes expostos ao extrato de cianobactérias nas duas concentrações. Nos peixes que após a exposição retornaram à água limpa por 48h antes de serem examinados, as metacercárias estavam ativas, confirmando que houve uma paralisia temporária.

Este é o primeiro relato de efeito de cianobactérias produtoras de saxitoxinas em metacercárias de peixes. Esta evidência sugere que as toxinas de cianobactérias podem exercer um efeito modulador da relação parasito-hospedeiro no ambiente natural. Segundo Poulin (2010) os parasitos podem alterar o comportamento dos hospedeiros de modo a aumentar as chances de completar seus ciclos de vida que ocorrem através da teia trófica. Neste trabalho foi possível mostrar que de modo semelhante, os efeitos causados por toxinas produzidas por *C. rasciborskii* podem alterar o comportamento dos peixes e a motilidade das metacercárias influenciando no ciclo destes parasitos.

A quantificação de saxitoxinas nas soluções das culturas 1, 2 e 3 em diferentes concentrações confirmou sua ocorrência, mas com variações. A técnica de dosagem por ELISA pode apresentar reações cruzadas o que deve ter ocorrido com a concentração mais baixa ( $40 \text{ mg L}^{-1}$ ) na qual foram encontrados altos valores de saxitoxina.

Nas dosagens das vísceras e brânquias dos peixes utilizados no teste de motilidade de *P. macrostomum* as saxitoxinas estavam presentes em todos os peixes analisados nas duas fases do experimento, incluindo o controle. Em todos eles a quantidade nas vísceras foi superior à encontrada nas brânquias, possivelmente devido a ingestão do extrato de cianobactérias. As vísceras dos

peixes analisados imediatamente após a exposição a 400 mg L<sup>-1</sup> do extrato apresentaram valores de toxina maiores do que nos peixes expostos a 40 mg L<sup>-1</sup>.

Ao compararmos a quantificação de toxinas nas vísceras e brânquias dos peixes expostos à 40 mg L<sup>-1</sup> do extrato entre as fases do experimento, foi possível observar valores médios superiores nos peixes mantidos por 48 h em água limpa. No entanto, nas vísceras e brânquias dos peixes expostos à 400 mg L<sup>-1</sup> do extrato ocorre o oposto, os valores médios de saxitoxina são maiores nos peixes necropsiados imediatamente após a exposição.

Pflugmacher et al. 1998 relatam que em vários organismos aquáticos que vão desde plantas (*Ceratophyllum demersum*), invertebrados (*Dreissena polymorpha*, *Daphnia magna*) até ovas de peixe e peixes (*Danio rerio*), as microcistinas podem se conjugar enzimaticamente via glutathione S-transferase. A formação desse conjugado faz parte da etapa inicial do processo de desintoxicação das cianotoxinas pelos organismos. De acordo com Metcalf et al. (2000, 2002) os produtos de biotransformação de microcistina (conjugados) também podem ser detectados por ELISA. Esta reatividade cruzada com a toxina conjugada resultaria na superestimação da concentração de microcistina presente na amostra.

Nesse estudo foram quantificados valores elevados de saxitoxina nas vísceras e brânquias mesmo nos peixes mantidos por 48h em água limpa. É possível que haja relação com o processo de desintoxicação da saxitoxina, tendo em vista que dois dias não foram suficientes para a depuração total da toxina. É também possível que possa estar ocorrendo uma conjugação como relatado para microcistina, mas novos estudos são necessários para estabelecer esta relação. Comparativamente, Nasseem (1996) referiu que em ratos, até 48 horas após a aplicação de saxitoxinol (substância sintética análoga a saxitoxina) o nível da substância se manteve alto nos músculos, fígado, coração e pulmões.

A análise por ELISA encontrou saxitoxina nas brânquias e vísceras dos peixes do grupo controle. Como os peixes utilizados nesse experimento foram coletados na lagoa, poderiam ter tido contato prévio com essa toxina em seu ambiente natural. No entanto, eles foram mantidos em aquários com água

limpa por pelo menos 20 dias antes de serem utilizados nos experimentos, tempo suficiente para depuração da toxina que, segundo Costa et al. (2011), tem duração de 15 a 16 dias. Similarmente a este estudo, Ferrão-Filho et al. (2014) reportam ter encontrado reações positivas para microcistina no grupo controle, em experimentos com cladóceros, embora em menor escala do que nos grupos expostos. Provavelmente, esses resultados podem ser atribuídos a ocorrência de reações cruzadas na quantificação por ELISA.

Os resultados obtidos demonstram que o extrato bruto de *C. rasciborskii* causa alterações na atividade locomotora de *P. vivipara* e paralisia temporária nas metacercárias de *P. macrostomum*. Estas alterações podem acarretar consequências biológicas e ecológicas para os peixes em seus ambientes naturais e influenciar no ciclo de vida de seus parasitos.

## 7. CONCLUSÕES

1- O extrato liofilizado de *C. raciborskii* é capaz de alterar a atividade locomotora de *P. vivipara* criados em laboratório e coletados da Lagoa Rodrigo de Freitas.

2- Culturas diferentes da mesma cepa de *C. raciborskii* podem alterar de forma antagônica a atividade locomotora de *P. vivipara*, sugerindo não ser a saxitoxina a substância responsável por essas alterações.

3- A saxitoxina foi encontrada nas vísceras e brânquias de *P. vivipara* analisados imediatamente após à exposição ao extrato e nos peixes mantidos por 48 horas em água limpa.

4- As metacercárias de *P. macrostomum* sofreram paralisia temporária, recuperando a motilidade após 48 horas, sugerindo ação causada pela saxitoxina.

## 8. REFERÊNCIAS

- Alberto-Silva AC, Santos EGN, Santos CP, Mello-Silva CC. Changes in the locomotory and reproductive behavior of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol* 2015; 153: 68–74.
- Apeldoorn ME, Egmond HP, Speijers GJA, Bakker GJI. Toxins of cyanobacteria. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51: 7-60.
- Azevedo FA, Chasin AAM. *As bases toxicológicas da Ecotoxicologia*. São Paulo, São Carlos: Editora Rima 2003.
- Bakke MJ, Hosberg TE. Effects of algal-produced neurotoxins on metabolic activity in telencephalon, optic tectum and cerebellum of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat Toxicol* 2007; 85, 96-103.
- Bakke MJ, Hustoft HK, Hosberg TE. Subclinical effects of saxitoxin and domoic acid on aggressive behavior and monoaminergic turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 2010; 99, 1-9.
- Baganz D, Staaks G, Steinberg C. Impact of the cyanobacteria toxin, microcystin-LR on behavior of zebrafish, *Danio rerio*. *Wat Res* 1998; 3: 948-952.
- Begout Anras ML, Lagardère JP. Measuring cultured fish swimming behavior: first results on rainbow trout using acoustic telemetry in tanks. *Aquaculture* 2004; 240, 175-186.
- Bieczynski F, Bianchi VA, Luquet CM. Accumulation and biochemical effects of microcystin-LR on *Patagonian pejerrey* (*Odontesthes hatcheri*) fed with the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. *Fish Physiol Biochem* 2013; 39: 1309-1321.
- Bonilla S, Aubriot L, Soares MCS, González-Piana M, Fabre A, Huszar VL, Lüring M, Antoniades D, Padisák J. What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*. *FEMS Microbiol Ecol* 2012; 79: 594–607.
- Bouvy M, Falcão D, Marinho M, Pagano M, Moura A. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. *Aquat Microbiol Ecology* 2000; 23:13-27.
- Briand JF, Leboulanger C, Humbert JF. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: Selection, wide physiological tolerance, or global warming? *J Phycol* 2004; 40: 231–238.

Bridges CM. Tadpole swimming performance and activity affected by acute exposure to sublethal levels of carbaryl. *Environ. Toxicol Chem* 1997; 16 (9): 1935-1939.

Bruno M. Cyanotoxin health hazard and risk assessment in freshwater lakes. In Ferrão-Filho, AS, ed, *Cyanobacteria: Ecology, Toxicology and Management*. Nova Science Publishers, New York, USA, 2013; 153-177.

Butterwick C, Heaney SI, Talling JF. Diversity in the influence of temperature on the growth rates of freshwater algae, and its ecological relevance. *Freshw Biol* 2005; 50: 91–300

Carmichael WW. The toxins of cyanobacteria. *Scientific American* 1994; 270: 64-72.

Carmichael WW, Azevedo SMFO, An JS, Molica, RJR, Jochimsen, EM, Lau S, Rinehart KL, Shaw GR, Eaglesham GK. Human fatalities from cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ Health Perspect* 2001; 109 (7): 663-668.

Cazenave J, Nores ML, Miceli M, Díaz MP, Wunderlin DA, Bistoni MA. Changes in the swimming activity and the glutathione S-transferase activity of *Jenymsia multidentata* fed with microcystin-RR. *Wat Res* 2008; 42: 1299-1307.

Charoy CP, Janssen CR, Persoone G, Clément P. The swimming behaviour of *Brachionus calyciflorus* (rotifer) under toxic stress. I. the use of automated trajectometry for determining sublethal effects of chemicals. *Aquat Toxicol* 1995; 32:271-82.

Chonudomkul D, Yongmanitchai W, Theeragool G, Kawachi M, Kasai F, Kaya K, Watanabe MM. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. *FEMS Microbiol Ecol* 2004; 48: 345–355.

Chorus I, Bartram J (eds.). *Toxic Cyanobacteria in water. A guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & FNSpon, London 1999; 416p.

Costa IAS, Azevedo SMFO, Senna PA, Bernardo RR, Costa SM, CHELLAPPA NT. The occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semi-arid reservoir. *Brazilian Journal of Biology* 2006; 66(1): 211-219.

Costa PR, Lage S, Barata M, Ferreira PP. Uptake, transformation, and elimination kinetics of paralytic shellfish toxins in white seabream (*Diplodus sargus*). *Mar Biol* 2011; 158: 2805–2811.

Costa CR, Olivi P, Botta CMR, Espindola ELG. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, São Paulo 2008; (31)7: 1820-1830.

Codd GA. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritization of eutrophication control. *Ecological Engineering* 2000; 16: 51-62.

Dahms HU, Hagiwara A, Lee JS. Ecotoxicology, ecophysiology, and mechanistic studies with rotifers. *Aquatic Toxicol* 2010; 101: 1-12.

Domingos P, Gômara GA, Sampaio GF, Soares MF, Soares FFL. Eventos de mortandade de peixes associados a florações fitoplanctônicas na Lagoa Rodrigo de Freitas: programa de 10 anos de monitoramento. *Oecologia Australis* 2012; 16(3): 441-466.

Duy TN, Lam PKS, Shaw GR, Connell DW. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (Blue-Green Algal) toxins in water. *Rev Environ Contam Toxicol* 2000, 163: 113–186.

Etheridge SM. Paralytic shellfish poisoning: Seafood safety and human health perspectives. *Toxicon* 2010; 56: 108–122.

Evans M H. Cause of death in experimental paralytic shellfish poisoning (PSP). *Br J Exp Path* 1965; 46: 245-253.

Ferrão-Filho AS, Kozlowsky-Suzuki B. Cyanotoxins: bioaccumulation and effects on aquatic animals. *Marine Drugs* 2011; 9, 2729–2772.

Ferrão-Filho AS, Cunha R, Magalhães VF, Soares MCS, Baptista DF. Evaluation of sub-lethal toxicity of cyanobacteria on the swimming activity of aquatic organisms by image analysis. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* 2007; 2: 93-100.

Ferrão-Filho AS, Costa SM, Ribeiro MGL, Azevedo SMFO. Effects of a saxitoxin-producer strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) on the swimming movements of cladocerans. *Environ Toxicol* 2008; 23: 161-168.

Ferrão-Filho AS, Herrera NA, Echeverri LF. Microcystin accumulation in cladocerans: First evidence of MC uptake from aqueous extracts of a natural bloom sample. *Toxicon* 2014; 87: 26-31.

Ferreira RS, Monserrat JM, Ferreira JLR, Kalb AC, Stegeman J, Bainy ACD, Zanette J. Biomarkers of organic contamination in the South American fish *Poecilia vivipara* and *Jenysia multidentata*. *J Toxicol Environ Health* 2012; 75: 1023-1034.

Froese R, Pauly D editores. FishBase, version 02/2015. Acesso em 3 de abril de 2016. Disponível em: <http://www.fishbase.org>.

Gomes AMA, Manzi MM, Azevedo SMFO. Which factors are related to the success of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Brazilian aquatic systems? In Ferrão-Filho, AS, ed, *Cyanobacteria: Ecology, Toxicology and Management*. Nova Science Publishers, New York, USA 2013; 73-94.

Henry MG, Atchison GJ. Behavioral changes in social groups of bluegills exposed to copper. *Trans. Am. Fish. Soc.* 1986; 115: 590-595.

Hodgson E. *A Textbook of Modern Toxicology*, John Wiley & Sons: New Jersey 2004.

Hudnell HK (ed). Cyanobacterial harmful algal blooms: state of science and research needs. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2008; (619): 950p.

Huszar VLM, Silva LHS, Marinho M, Domingos P, Sant'anna CL. Cyanoprokaryote assemblages in eight productive tropical Brazilian waters. *Hydrobiologia* 2000; 424: 67–77.

Ibelings BW, Chorus I. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: A review. *Environ Pollut* 2007; 150: 177-192.

Johnk KD, Huisman J, Sharples J, Sommeijer B, Visser PM, Stroom JM. Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. *Glob Change Biol* 2008; 14:495–512.

Koblitz JL, Andreatta JV, Marca AG. Distribuição dos metais pesados nos sedimentos recentes da Laguna Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, Brasil. In: Andreatta JV, ed. *Lagoa Rodrigo de Freitas: síntese histórica e ecológica*. Rio de Janeiro: Universidade Santa Úrsula 2001; 290-296.

Landsberg JH. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. In: Stickney RR (Ed.), *Rev Fish Sci* 2002; 1: 2.

Lima JS. *O Biomonitoramento como ferramenta complementar na avaliação de impactos ambientais - Discutindo Conceitos*. Belo Horizonte Techoje 2000.

Little EE, Brewer SK. Neurobehavioral toxicity in fish. In *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts New Perspectives: Toxicology and the Environment*. Vol. 2. Systems. Schlenk, D. and W. H. Benson (eds). Taylor and Francis, London and New York. 2001; 139-174.

Little EE, Finger SE. Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environ Toxicol Chem* 1990; 9:13-19.

Little EE, Fairchild JF, DeLonay AJ. Behavioral methods for assessing the impacts of contaminants on early life stage fishes. In *American Fisheries Society Symposium 14 Water Quality and the Early Life Stages of Fishes*. L. Fuiman (ed). American Fisheries Society, Bethesda. 1993.

Lefebvre KA, Trainer VL, Scholz NL. Morphological abnormalities and sensorimotor deficits in larval fish exposed to dissolved saxitoxin. *Aquat Toxicol* 2004; 66:159-170.

Lefebvre KA, Elder NE, Hershberger PK, Trainer VL, Stehr CM, Scholz NL. Dissolved saxitoxin causes transient inhibition of sensorimotor function in larval Pacific herring (*Clupea harengus pallasii*). Mar Biol 2005; 147: 1393-1402.

Machado AAS, Hoff MLM, Klein DR, Cardozo JG, Giacomini MM, Pinho GLL, Bianchini A. Biomarkers of waterborne copper exposure in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to salt water. Aquat Toxicol 2013; 138-139: 60-69.

Magalhães VF, Marinho MM, Domingos P, Oliveira ACP, Costa SM, Azevedo LO, Azevedo SMFO. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brazil, RJ). Toxicon 2003; 42: 289-295.

Magalhães DP, Cunha RA, Buss DF, Santos J A A, Baptista DF. Behavioral response of the zebrafish *Danio rerio* to sublethal stress by sodium hypochlorite—evaluation of a method of toxicological assay by real-time biomonitoring in the laboratory. Ecotoxicology 2007; 16: 417–422.

Marcucella H, Abramson CI. Behavioral toxicology and teleost fish. In: Mostofsky DJ, editor. The Behavior of fish and other Aquatic Animals. London, UK: Academic Press 1978; 33-77.

Mendonça JP, Andreatta JV. Aspectos reprodutivos de *Poecilia vivipara* (Bloch & Schneider) (Poeciliidae) da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, Brasil. Rev Bras Zool 2001; 18 (4): 1041-1047.

Metcalf JS, Beattie KA, Pflugmacher S, Codd GA. Immuno-cross-reactivity and toxicity assessment of conjugation products of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. FEMS Microbiol Lett 2000; 189: 155-158.

Metcalf JS, Beattie KA, Ressler J, Gerbersdorf S, Pflugmacher S, Codd GA. Cross-reactivity and performance assessment of four microcystin immunoassays with detoxification products of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. J Water Supply Res Technol 2002; 51(3): 145-151.

Mortensen AM. Massive fish mortalities in the Faroe Islands caused by *Gonyaulax excavata* red tide. In: Anderson DM, White AW, Baden DG (Eds.), Toxic Dinoflagellates. Elsevier Science Publishers B.V., New York 1985; 165-170.

Nassem SM. Toxicokinetics of [3H] saxitoxin in peripheral and central nervous system of rats. Toxicol Appl Pharmacol 1996; 141: 49–58.

Olla BL, Pearson WH, Studholme AL. Applicability of behavioural measures in environmental stress assessment. Rapp. P-V. Reun Cons Int Explor Mer 1980; 179: 162-173.

Padisák J. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynnska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Archiv für Hydrobiol* 1997; 107: 563-593.

Paerl HW, Huisman J. Blooms like it hot. *Science* 2008; 320: 57–58.

Pflugmachera S, Wieganda C, Oberemma A, Beattie KA, Krausec E, Codd GA, Steinberg CEW. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *BBA-Gen Subjects* 1998; 1425 (3): 527-533.

Phillips MJ, Roberts RJ, Stewart JA, Codd GA. The toxicity of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J Fish Dis* 1985; 8:339-344.

Poulin R. Manipulation of host behavior: An Update and frequently asked questions. In H. Brockmann, editor: *Advances in the study of behavior*, Burlington: Academic Press 2010; 41: 151-186.

Ryan EF, Hamilton DP, Barnes G. Recent occurrence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Waikato lakes of New Zealand. *New Zealand J Mar Fresh Res* 2003, 37: 829-836.

Sant'Anna CL, Tucci A, Azevedo MTP, Melcher SS, Werner VR, Malone CFS, Rossini EF, Jacinavicius FR, Hentschke GS, Osti JAS, Santos KRS, Gama-Júnior WA, Rosal C, Adame G. Atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras. Publicação eletrônica, Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Ficologia, 2012.

Santos EGN, Cunha RA, Santos CP. Behavioral responses of *Poecilia vivipara* (Osteichthyes: Cyprinodontiformes) to experimental infections of *Acanthocollariotrema Umbilicatum* (Digenea: Cryptogonimidae). *Exp Parasitol* 2011; 127: 522-526.

Santos EGN, Santos CP. Parasite-induced and parasite development-dependent alteration of the swimming behavior of fish hosts. *Acta Tropica* 2013; 127: 56-62.

Scott GR, Sloman KA. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat Toxicol* 2004; 68: 369–392.

Sigee DC. *Freshwater microbiology: biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the freshwater environment*. England: John Wiley & Sons Ltda, 2005.

Siegmund R, Biermann K. Quantitative chronobiological behavior of fish as an indicator for environmental alterations: methods and first results. In *Trends in Ichthyologie – an International Perspective* (Edited by Schröder JH, Bauer J e Scharl M) 1993; 381-396.

Simões SBE, Barbosa HS, Santos CP. The life history of *Pygidiopsis macrostomum* Travassos, 1928 (Digenea: Heterophyidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104: 106-111.

Simões SBE, Neves RFC, Santos CP. Life history of *Acanthocollariotrema umbilicatum* Travassos, Freitas and Bührnheim, 1965 (Digenea: Cryptogonimidae). Parasitol Res 2008;103: 523-528.

Simões SBE, Scholz T, Barbosa HS, Santos CP. Taxonomic status, redescription, and surface ultrastructure of *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* n. comb. (Digenea: Heterophyidae). J Parasitol 2006; 92:501-508.

Soares RM, Magalhães VF, Azevedo SMFO. Accumulation and depuration of microcystins in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. Aquat Toxicol 2004; 70, 1-10.

Teixeira MGLC, Costa MCN, Carvalho VLP, Pereira MS, Hage E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. Bulletin of PAHO 1993; 27(3): 244-253.

Tencalla F, Dietrich D, Schlatter C. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat Toxicol 1994; 30: 215-224.

Terao K, Ohmori S, Igarashi K, Ohtani I, Watanabe MG, Harada KI, Ito E, Watanabe M. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green algae *Umezakia natans*. Toxicol 1994; 32: 833-843.

Truhaut R. Ecotoxicology: Objectives, Principles and Perspectives. Ecotoxicol Environ Safety 1977; 1: 151-173.

Tundisi JG. Água no século XXI: enfrentando a escassez. RIMA, Instituto Internacional de Ecologia, São Carlos. 2003; 247p.

Vidal L, Kruk C. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34°53'S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. Pan-American J Aquat Sci 2008; 3: 142-151.

Wiedner C, Nixdorf B, Hinze R, Wirsing B, Neumann U, Weckesser J. Regulation of cyanobacteria and microcystin dynamics in polymictic shallow lakes. Archiv für Hydrobiol 2002; 155: 383-400.

Wickham H. Ggplot2: Elegant graphics for data analysis. Springer- Verlag New York 2009.

White AW. Paralytic shellfish toxins and finfish. ACS Symp. Ser. 1984; 262: 171-180.

Zagatto PA, Aragão MA. Implantação de métodos para avaliação de algas tóxicas. São Paulo. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Relatório Técnico 1992; 23p.

Zagatto PA, Bertoletti E. Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações. 1. ed. São Carlos: RiMa 2006; 478 p.

Zagatto PA, Buratini SA, Aragão M, Ferrão-Filho AS. Neurotoxicity of two *Cylindrospermopsis raciborskii* strains to mice, *Daphnia* and fish. Environ Toxicol Chem 2012; 31: 857–862.