

EDUARDO DE JESÚS FRAGOZO VELÁSQUEZ

**CRESCIMENTO E HISTOPATOLOGIA HEPÁTICA DE TILÁPIAS DO NILO
ALIMENTADAS CONTINUAMENTE COM *Microcystis aeruginosa* LIOFILIZADA E
L-CARNITINA DIETÉTICA EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS**

**RECIFE,
2016**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

**CRESCIMENTO E HISTOPATOLOGIA HEPÁTICA DE TILÁPIAS DO NILO
ALIMENTADAS CONTINUAMENTE COM *Microcystis aeruginosa* LIOFILIZADA E L-
CARNITINA DIETÉTICA EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS**

Eduardo de Jesús Fragozo Velásquez

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Álvaro José de Almeida Bicudo
Orientador

Prof. Dr. Renato José Reis Molica
Co-orientador

Recife,
Julho/2016

Ficha catalográfica

V434c Velásquez, Eduardo de Jesús Fragozo
Crescimento e histopatologia hepática de tilápias do nilo
alimentadas continuamente com *Microcystis aeruginosa*
lioofilizada
e L-carnitina dietética em condições laboratoriais / Eduardo de
Jesús Fragozo Velásquez. – Recife, 2016.
66 f.

Orientador: Álvaro José de Almeida Bicudo.
Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e
Aquicultura) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento de Pesca e Aquicultura, Recife, 2016.
Inclui referências, anexo(s) e apêndice(s).

1. Aditivo alimentar 2. Cianobactérias 3. Cianotoxinas
4. Esteatose I. Bicudo, Álvaro José de Almeida, orientador
II. Título

CDD 639

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

CRESCIMENTO E HISTOPATOLOGIA HEPÁTICA DE TILÁPIAS DO NILO
ALIMENTADAS CONTINUAMENTE COM *Microcystis aeruginosa* LIOFILIZADA E L-
CARNITINA DIETÉTICA EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS

Eduardo de Jesús Fragozo Velásquez

Dissertação julgada adequada para obtenção do título de mestre em Recursos Pesqueiros e Aquicultura. Defendida e aprovada em 20/07/2016 pela seguinte Banca Examinadora.

Prof. Dr. Álvaro José de Almeida Bicudo
(Orientador)
Departamento de Zootecnia
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Alfredo Olivera Gálvez
Departamento de Pesca e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Fábio de Souza Mendonça
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedicatória

Ao meu amigo **Jesús Nigenda Jacinto** (*in memoriam*),
pelo carinho e amizade que ficará por muitos anos.

A minha família **Fragozo Velásquez**, pelo apoio
incondicional oferecido desde o México.

Ao meu filho **Johan**, inspiração total no Brasil para
concluir meus objetivos.

Agradecimentos

À embaixada do México no Brasil pela parceria com o grupo COIMBRA-Universidades Brasileiras através do programa PROPAT BRASIL-MÉXICO, ao Tecnológico Nacional do México pela bolsa de mestrado concedido.

A UFRPE pela oportunidade de cursar a pós-graduação.

Ao meu orientador, ÁLVARO JOSÉ DE ALMEIDA BICUDO, grande amigo, quem agradeço muito por ter me orientado sem prévio convite. É um orgulho rotundo para mim poder dizer “minha base profissional foi através de um dos melhores caras reconhecidos a nível mundial”.

Ao meu co-orientador, RENATO JOSÉ REIS MOLICA, grande amigo, graças por ter dado a paciência necessária durante minha residência em Garanhuns e me orientar. Apesar das complicações sempre mostrou interesse em mim, muito obrigado RENATO.

Aos meus amigos do laboratório de Patologia Animal da UAG/UFRPE, em especial à professora MARCIA BERSANE, pela orientação importante neste projeto. Agradeço também a dona MARA, pelo carinho e amizade oferecida.

Aos professores PAULO TRAVASSOS e ALFREDO GÁLVEZ que me acolheram e deram as boas-vindas no Brasil e ao Departamento de Pesca e Aquicultura da UFRPE.

Ao meu amigo ALFREDO BORIE, pelo recebimento total e moradia na sua casa nos primeiros dias no Brasil. Muito obrigado meu caro.

Ao meu grande amigo JORGE ARMANDO HERNANDEZ VALENCIA, incentivíssimo de começar uma nova etapa na minha vida como profissional.

Ao meu amigo DIJACI ARAÚJO FERREIRA, pelo grande apoio e orientação importante na língua portuguesa.

Aos meus camaradas e grandes amigos dos diferentes laboratórios onde estive convivendo e compartilhando conhecimentos.

Aos meus amigos do laboratório dos diferentes laboratórios do Departamento de Pesca e Aquicultura, principalmente ao laboratório do LEMAR. Aos meus amigos do CENLAG e do LAPPIS da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG), que compartilhei momentos inesquecíveis, a cada um deles, gratidão, MEUS CAROS, muito obrigado!

Resumo

No presente estudo foi avaliado o efeito da adição da L-carnitina (LC) sobre o desempenho e histologia do fígado de juvenis de tilápia do Nilo submetidos a repetidas doses de microcistina (MCs). Para isso, células liofilizadas de cianobactérias (CIAN) *Microcystis aeruginosa* NPJL4 foram incluídas (0,3%) em dietas sem L-carnitina (CIAN), com 1 g de L-carnitina kg⁻¹ (CIAN+LC-1), 2 g de L-carnitina kg⁻¹ (CIAN+LC-2) e sem CIAN e LC (CONT). Juvenis de tilápia do Nilo ($\pm 4,8$ g de peso inicial) foram distribuídos em aquários de 60L (20 peixes/aquário). As dietas foram fornecidas durante 28 dias em três refeições diárias a taxa de 5% da biomassa de modo a fornecer 1,2 µg de microcistinas g⁻¹ de peixe/dia. Nos dias 0, 3, 7, 14, 21 e 28 os fígados foram coletados para análises histológicas. A sobrevivência e o desempenho zootécnico não foram influenciados ($p > 0,05$) pelos tratamentos. As principais lesões hepáticas induzidas pela ingestão de MCs foi a perda da coesão celular e necrose de hepatócitos, megalocitose e a perda da coesão celular pancreática. Não foi possível verificar nenhum efeito protetor significativo da L-carnitina em tilápias do Nilo ingerindo MCs repetidamente. A espécie demonstrou alta resistência a ingestão contínua de microcistinas por 28 dias.

Palavras-chaves: aditivo alimentar, cianobactérias, cianotoxinas, esteatose.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of the addition of L-carnitine (LC) on the performance and histology of juvenile liver of Nile tilapia subjected to repeated doses of microcystins (MCs). To this end, lyophilized cells of cyanobacteria (CIAN) *Microcystis aeruginosa* strain NPJL-4 were included (3.3%) in diets without L-carnitine (CIAN), 1 g L-carnitine kg⁻¹ (CIAN+LC-1), 2 g of L-carnitine kg⁻¹ (CIAN+LC-2) and without CIAN and LC (CONT). Juvenile Nile tilapia ($\pm$ 4.8 g initial weight) were distributed in 60L tanks (20 fish / aquarium). The diets were fed for 28 days in three meals a rate of 5% of the biomass so as to provide 1.2 ug MC-LR, g⁻¹/fish/day. On days 0, 3, 7, 14, 21 and 28 samples of liver were collected for histological analysis. The survival and growth performance were not affected ($p>0.05$) by treatments. The foremost liver injury induced by MC intake was disorganization and necrosis of hepatocytes and pancreatic megalocytosis clutter. We could not find any significant protective effect of L-carnitine in Nile tilapia eating MCs repeatedly. The species showed high resistance to continuous intake of microcystins for 28 days.

Key words: food additive, cyanobacteria, cyanotoxins, steatosis.

Lista de figuras

	Página
Figura 1 – Taxa de sobrevivência de juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados com dietas contendo células liofilizadas de <i>M. aeruginosa</i> (CIAN); dietas com células liofilizadas de <i>M. aeruginosa</i> associadas a 1 g L-carnitina kg ⁻¹ (CIAN + LC-1) ou 2 g L-carnitina kg ⁻¹ (CIAN + LC-2) ou dietas sem <i>M. aeruginosa</i> e L-carnitina (CONT). As barras de erro correspondem ao desvio padrão da média	55
Figura 2 – Mortalidade acumulada de juvenis de tilápia-do-Nilo ao longo dos 28 dias de experimentação alimentados com dietas contendo células liofilizadas de <i>M. aeruginosa</i> (CIAN); dietas com células liofilizadas de <i>M. aeruginosa</i> associadas a 1 g L-carnitina kg ⁻¹ (CIAN + LC-1) ou 2 g L-carnitina kg ⁻¹ (CIAN + LC-2) ou dietas sem <i>M. aeruginosa</i> e L-carnitina (CONT). As barras de erro correspondem ao desvio padrão da média.....	56
Figura 3 – Cromatograma da <i>Microcystis aeruginosa</i> NPLJ-4, mostrando 6 análogos de microcistinas identificados pelos números 1-6.....	57
Figura 4– Histopatologia de fígados de tilápias do Nilo alimentadas com dietas sem <i>M. aeruginosa</i> liofilizada e L-carnitina (CONT) (A, B, C) e, com <i>M. aeruginosa</i> liofilizada (CIAN) (D) 14 dias de experimentação. HE (A,B) e por PAS (C,D). Bars-100 µm. A) Acino pancreático sem desorganização. B) Corte histológico sem congestão, hemorragia hepática e com esteatose moderado. C) Moderada esteatose (seta) e presença moderada de glicogênio (circulo). D) Grande quantidade de glicogênio (circulo) e esteatose acentuado (seta).....	58
Figura 5 – Histopatologia de fígados de tilápias do Nilo alimentados com dietas com <i>M. aeruginosa</i> liofilizado (CIAN) em 03 dias de experimentação. HE. Bars-100 µm, respectivamente. A) Leve vacuolização e desorganização de células do hepatopâncreas. B) Desorganização de hepatócitos. C) Hemorragia do parênquima hepático (setas) e congestão de sinusóides (circulo).....	59

Figura 6 – Histopatologia de fígados de tilápias do Nilo alimentados com dietas com *M. aeruginosa* liofilizado (CIAN) em 7 (A) e 14 dias de experimentação (B,C,D). HE. Bars-100 µm. A) Necrose de células do ácino pancreático e desorganização celular. B) Maior acentuação da lesão pancreática com desaparecimento de algumas células (setas). C) capsula hepática espessada com fibrina e infiltrado inflamatório mononuclear e restos de células necróticos, na fibrina e no interior de vasos. (circulo). D) Necrose individual de hepatócitos desorganizados (setas)..... 60

Figura 7 – Histopatologia de fígados de tilápias do Nilo alimentados com dietas com *M. aeruginosa* liofilizado (CIAN) em 21 (A) e 28 dias de experimentação (B). HE. Bars-100 µm. A) Megalocitose de hepatócitos (setas). B) Lesão evoluída do hepatopâncreas com desaparecimento quase total do ácino devido a necrose celular (setas)..... 61

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1 – Formulação e composição química das dietas experimentais	52
Tabela 2 – Índices zootécnicos de juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados com dietas contendo células liofilizadas de <i>M. aeruginosa</i> (CIAN); dietas com células liofilizadas de <i>M. aeruginosa</i> associadas a 1 g L-carnitina kg ⁻¹ (CIAN+LC-1) ou 2 g L-carnitina kg ⁻¹ (CIAN+ LC-2) ou dietas sem <i>M. aeruginosa</i> e L-carnitina (CONT). As barras de erro correspondem ao desvio padrão da média	53
Tabela 3 – Lesões histopatológicas de fígado de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas oralmente a 1,2 µg de microcistinas por grama de peixe durante 28 dias.....	54

Sumário

Página

Dedicatória

Agradecimento

Resumo

Abstract

Lista de figuras

Lista de tabelas

1- Introdução	13
2- Revisão de literatura	14
2.1 Impactos de florações de cianobactérias no cultivo de peixes.....	14
2.2 A L-carnitina na nutrição de peixes.....	18
3- Referências bibliográficas.....	19
4- Artigo científico.....	28
5- Anexos	62

1- Introdução

A produção animal vem experimentando avanços tecnológicos substanciais nas áreas de melhoramento genético, manejo, sanidade e nutrição. A piscicultura é uma atividade que vem se tornando cada vez mais importante como fonte de proteína para o consumo humano, sendo um dos setores produtivos que mais tem crescido em todo o mundo. A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie exótica presente em diversos corpos d'água naturais, além de ocupar a quarta colocação entre as espécies mais cultivadas no mundo. A sua produção mundial tem crescido em média 3% ao ano, equivalente a 1,5 milhões de toneladas (FAO, 2014). Este interesse deve-se a sua rusticidade, altas taxas de crescimento, aceitação de rações industrializadas, qualidade da carne, entre outros (BRASIL, 2013; FAO, 2014; JIWIYAM, 2013).

Em sistemas intensivos de produção, o fornecimento de nutrientes ocorre exclusivamente pelo fornecimento de alimento exógeno (rações). Isto eleva, do ponto de vista ambiental, o aporte de fósforo e nitrogênio, principais nutrientes relacionados a eutrofização dos ambientes aquáticos (CYRINO et al., 2010; FURUYA et al., 2005). Neste processo ocorre o rápido desenvolvimento de macrófitas, fitoplâncton e cianobactérias. Este último grupo são seres fotossintéticos e procariontes encontrados em uma ampla gama de habitats (TURKET et al., 2003; WOOD, 2016). Algumas espécies de cianobactérias têm a capacidade de produzir metabólitos secundários (cianotoxinas) tóxicos que podem, por exemplo, reduzir o desempenho ou levar a morte organismos aquáticos e animais domésticos que ingerirem a água em que estão presentes (FRANCIS, 1878; BERY et al., 1995; FALCONER et al., 1994; ZHANG et al., 2009; ZIMBA et al., 2001). Entre as cianotoxinas de importância para a aquicultura, as microcistinas estão entre as mais estudadas. São substâncias hepatotóxicas que inibem as proteínas fosfatases serina/treonina, aumentam o estresse oxidativo e causam lesões no coração, baço, brânquias e principalmente, no fígado de peixes (PINHO et al., 2003; PRIETO et al., 2009; ATENCIO et al., 2009; MOLINA et al., 2005; ERIKSSON et al., 1990; CARMICHAEL e BOYER 2016).

Devido aos prejuízos econômicos que florações de cianobactérias produtoras de microcistinas podem ocasionar em cultivos intensivos, pesquisadores têm avaliado o uso de aditivos nas rações para minimizar seus efeitos adversos nas espécies aquícolas

cultivadas (ATENCIO et al., 2009; PRIETO et al., 2009). Entre os aditivos alimentares avaliados, a L-carnitina (LC) tem se mostrado um promissor mitigador dos efeitos biológicos adversos causados pela exposição a cianobactérias. Por exemplo, Guzmán-Guillén et al. (2015) registraram redução nas lesões de fígado e rins de tilápias expostas a 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de células liofilizadas da cianobactéria *Aphanizomenon ovalisporum* quando os peixes ingeriram antecipadamente durante 21 dias 400 e 800 mg kg^{-1} de LC na ração. De fato, estudos prévios relataram a ação protetora deste aditivo em peixes submetidos a diferentes situações de estresse e a presença de xenobióticos no ambiente aquático (HARPAZ et al., 1999; SCHEREIBER et al., 1997; TREMBLAY e BRADLEY, 1992).

2- Revisão de literatura

2.1 Impactos de florações de cianobactérias no cultivo de peixes

A abundância de microrganismos unicelulares nos corpos d'água é devido ao enriquecimento com fósforo e nitrogênio, levando ao processo de eutrofização (VASCONCELOS, 2006). Entre os microrganismos planctônicos conhecidos, as cianobactérias constituem um dos grupos mais antigos, sendo que alguns autores sugerem que foram responsáveis pela formação do oxigênio atmosférico (STANIER e BAZINE, 1977; O'NEIL et al., 2012). Nos ambientes marinhos e continentais são encontradas de diferentes formas: unicelular, coloniais e filamentosas (CARMICHAEL e BOYER 2016; O'NEIL et al., 2012). São seres fotoautotóxicos, procariontes, estruturalmente e morfológicamente semelhantes às bactérias gram negativas, podendo ou não ter a bainha mucilaginosa. São extremamente resistentes, prevalecendo por tempos indeterminados, inclusive quando a temperatura, intensidade luminosa e a disponibilidade de nutrientes não são favoráveis (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2014; GUPTA et al., 2013; O'NEIL et al., 2012; STANIER e BAZINE, 1977; WOOD, 2016).

As florações de cianobactérias caracterizam-se pelo crescimento abundante de uma ou mais espécies, por um breve período ou mesmo durante todo o ano e caracteriza-se pela cor esverdeada da água (MOURA et al., 2011; PAPADIMITRIOU et al., 2012). Essas florações ocorrem em várias partes do mundo, inclusive ultrapassando o limite máximo aceitável de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ previamente estabelecido pela OMS, afetando

negativamente os animais aquáticos (CHORUS e BARTRAM, 1999; PARK et al., 2001).

Algumas cepas ou/e espécies de cianobactérias tem a capacidade produzir metabólitos secundários altamente tóxicos, denominados cianotoxinas relacionados com a mortalidade de peixes (AZEVEDO et al., 2002; HAWKINS et al., 1985; ZIMBA et al., 2001). Dos 150 gêneros conhecidos de cianobactérias, aproximadamente 40 são capazes de produzir compostos que acarretam estes problemas (VAN APELDOORN et al., 2007). A função desses metabólitos secundários ainda não está bem definida (MOLICA e AZEVEDO, 2009), e de forma geral, podem ser classificadas de acordo com o grau de toxicidade, em hepatotoxinas, neurotoxinas e dermatotoxinas. As neurotoxinas apresentam um elevado grau de toxicidade, e são produzidos principalmente pelos generos *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon* e *Lyngbia* (CHORUS e BARTRAM, 1999). As neurotoxinas são classificadas em três grupos: anatoxina-a e anatoxina-a (s) que inibem a ação de acetilcolinesterase bloqueando a degradação de acetilcolina e as saxitoxinas, que inibem o sistema nervoso por bloqueio dos canais de sódio e cálcio. Este último grupo foi primeiramente isolado em dinoflagelados marinhos relacionados com a intoxicação dos organismos aquáticos. (SIVONEN e JONES, 1999).

As hepatotoxinas são peptídeos cíclicos compostos por cinco (nodularinas) e sete (microcistinas) aminoácidos. As microcistinas são amplamente distribuídas nos ambientes naturais, produzidas pelos gêneros de cianobactérias *Microcystis* sp., *Anabaena* sp., *Nodularia* sp., *Oscillatoria* sp., *Nostoc* sp., *Cylindrospermopsis* sp., *Planktotrix* sp., *Radiocystis* sp., *Arthrospira* sp., e as nodularinas produzido por um único gênero *Nodularia* sp. (CARMICHAEL, 1992; MOLICA e AZEVEDO, 2009). As dermatotoxinas são toxinas irritantes de contato produzindo dermatites e são produzidos pelos gêneros: *Lyngbya* sp., *Nodularia* sp., *Anabaena* sp., *Aphanizomenon* sp., *Oscillatoria* sp., *Schizothrix* sp, (CARMICHAEL, 1992).

Também existem compostos produzidos pelas cianobactérias, como a geosmina (GEO) e 2- metilisoborneol (MIB), que embora não causem mortalidade, são responsáveis pela ocorrência de *off-flavor* em espécie economicamente importantes (SCHRADER et al., 2005; JOHNSEN et al., 1987; RASHASH et al., 1995).

Entre as cianotoxinas conhecidas, as microcistinas (MCs) são as mais estudadas e vêm sendo observadas em maiores quantidades em ambientes naturais (PAPADIMITRIOU et al., 2012; MITSOURA et al., 2013), sistemas de produção aquícola (TURKET et al., 2003; VASCONCELOS et al., 2013) como também em reservatórios de abastecimento público de água (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2014). No Brasil, a contaminação por microcistinas obteve grande repercussão a meados da década de 1990, após a morte de 70 pessoas no centro de hemodiálise na cidade de Caruaru (PE) (AZEVEDO et al., 2002).

A nomenclatura das microcistinas foi proposta por CARMACHEL et al. (1988), composto por sete aminoácidos dentro sua estrutura. Na posição 1 por D-alanina, dois L-aminoácidos variáveis na posição 2 e 4, um ácido D-eritro-B-metil-aspartico (D-MeAsp) na posição 3, um ácido dienóico (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2, 6, 8-trimetil-10-fenideca-4,6 (ADDA) na posição 5, ácido glutâmico (D-Glu) na posição 6 e três aminoácidos incomuns e uma N-metil-deidroalanina (Mdha) na posição 7. Portanto, nas posições 2 e 4 são encontrados os L-aminoácidos responsáveis pela nomenclatura das diferentes variantes de microcistinas, destacando-se a microcistina-LR, constituídos por aminoácidos leucina (L) e arginina (R) a microcistina-RR (arginina: arginina) e microcistina YR (tirosina: arginina) (CARMICHAEL et al., 1988) sendo a microcistina-LR a mais tóxica (PRIETO et al., 2006). Aproximadamente 130 variantes de microcistinas já foram descritas (CARMICHAEL e BOYER, 2016; PUDDICK et al., 2015).

Ao longo das últimas décadas tem aumentado os estudos referentes aos efeitos das microcistinas em condições experimentais (TENCALLA et al., 1994; SAHIN et al., 1996; FISCHER et al., 2000). Assim, diferentes vias ou métodos de exposição das microcistinas como intraperitoneal, imersão e via oral (alimentação) têm sido avaliados em mamíferos, crustáceos e peixes (RÅBERGH et al., 1991; PINHO et al., 2005; ELLEMAN et al., 1978). Juvenis de carpa prussiana *Carassius auratus gibelio*, submetido a doses repetidas de microcistinas (1,02-10,76 µg MC-LR kg⁻¹ peso corporal) por via oral apresentaram redução de 20% no ganho de peso e elevada mortalidade (ZHAO et al., 2006a). Li et al. (2004) registraram redução de 80% no ganho de peso de carpas comuns ao ingerirem 50 µg MC-LR kg⁻¹. Efeito similar foi observado por Bury et al. (1995) em trutas marrons *Salmo trutta* após ingestão de microcistinas. Em contraste, tilápias ao ingerirem doses repetidas de microcistinas (1,2-5,6 µg MC-LR g⁻¹)

apresentaram taxa de crescimento específico em média 15,8% superior aos peixes do tratamento controle (sem microcistina), demonstrando a elevada resistência desta espécie a este tipo de cianotoxina (ZHAO et al., 2006b).

Além de redução no desempenho zootécnico, vários estudos têm registrado lesões teciduais no baço, intestino, brânquias, e principalmente, no fígado como resultado da ingestão de microcistinas (BOTHÁ et al., 2004; FERREIRA et al., 2010; MOLINA et al., 2005; SHI et al., 2015; TENCALLA et al., 1994; XIE et al., 2004). As lesões hepáticas observadas, após a exposição as microcistinas, são relativas a alterações no citoesqueleto do hepatócito, acompanhada de congestão de sinusóides e hemorragia intra-hepática, sendo alguns casos observados necroses e apoptoses de hepatócitos (FERREIRA et al. 2010; FISCHER et al., 2000; MOLINA et al., 2005). Infiltrado inflamatório no fígado geralmente é observado quando a exposição as microcistinas é contínua e por tempo prolongado (ELLEMAN et al., 1978; ACUÑA et al., 2012).

Estas lesões podem estar relacionadas aos mecanismos de ação das microcistinas, que causam tumores hepáticos e inibem as proteínas serina/treonina fosfatases (ERIKSSON et al., 1990; MAYNES et al., 2006). Estas enzimas desempenham um importante papel intracelular na regulação do crescimento, uma vez que estão relacionadas ao balanço entre a fosforilação e a desfosforilação de vários eventos biológicos (FUJIKI e SUGANUMA, 2009). No entanto, internamente uma vez que são ingeridas e absorvidas no trato gastrointestinal, as microcistinas são transportadas para o fígado (FISCHER et al., 2005). Quando então são absorvidas nos hepatócitos, promovem a perda da coesão celular, originada pela hiperfosforilação. Esta perda da arquitetura hepática, acompanhada de hemorragia, pode resultar em morte dos animais (RUNNEGAR e FALCONER, 1986; ZIMBA et al., 2001; FERREIRA et al., 2010).

A cepa NPLJ-4 de *Microcystis aeruginosa*, isolada na década de 90, é uma espécie produtora de microcistinas. Embora existam poucos estudos desenvolvidos com esta cepa, alguns autores têm registrado elevado acúmulo de microcistinas no fígado e músculos de tilápias, inclusive, excedendo a concentração máxima permitida de toxina para consumo humano (SOARES et al., 2004). Embora ainda não exista nenhum estudo de toxicidade confirmando o aumento do estresse oxidativo provocado pela NPLJ-4,

Ferreira et al. (2010) demonstraram lesões histopatológicas crônicas nos fígados e trato intestinal de carpas comuns *Cyprinus carpio* expostos a esta cepa. Portanto, é perceptível que a intensidade dos efeitos da ingestão de microcistinas pode estar relacionado também a características intrínsecas de cada espécie.

2.2 O papel protetor da L-carnitina em peixes

A L-carnitina (LC) é uma amina quaternária, descoberta na década de 50, e desde então vem sendo estudada como suplemento alimentar com múltiplos propósitos em humanos e animais. É encontrada em duas formas químicas: L-carnitina e D-carnitina, sendo apenas a primeira forma considerada biologicamente ativa (SANTULLI e D'AMELIO, 1986). É sintetizada endogenamente no fígado, rins e cérebro, tendo a lisina e metionina como aminoácidos precursores (VAZ e WANDERS, 2002; MA et al., 2008). Nas células eucarióticas atua no transporte de ácidos graxos de cadeia longa para a mitocôndria a fim de gerar energia metabólica, através da beta oxidação, propondo um efeito economizador de energia, armazenada principalmente em tecidos esqueléticos (REBOUCHE, 2004; NOGUEIRA et al., 2010; PEKALA et al., 2011). Por isso, em peixes, os estudos têm focado principalmente nos seus possíveis efeitos como promotor de crescimento (FOCKEN et al., 1999; SCHREIBER et al., 1997; JAYAPRAKAS et al., 1996; DIAZ et al., 2001; HARPAZ, 2005).

Embora a maioria dos estudos foquem nos efeitos da L-carnitina no desempenho zootécnico dos animais, esta também tem demonstrado possuir ação antioxidante (ZAMMIT et al., 2009) e contra a ação de xenobióticos (HARPAZ, 2005). Por isso, estudos focando o papel protetor da L-carnitina têm aumentado nos últimos anos (GÓMEZ-AMORES et al., 2007). Tremblay e Bradley (1992) demonstraram o efeito protetor de L-carnitina em juvenis de salmão-real *Oncorhynchus tshawytscha* após aplicação intraperitoneal de 10,75 mmol kg⁻¹ de acetato de amônio, pois somente 33% dos que receberam previamente LC intraperitoneal (10-16 mmol / kg de peso do corpo) apresentaram sinais de toxicidade por amônia, contra 98% do grupo controle. Recentemente, a aplicação de dois níveis de carnitina (400 e 880 mg kg⁻¹) não permitiu a peroxidação lipídica, mantendo estáveis as enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) após a exposição cilindrospermopsina (CYN), citotoxina produzida por *Aphanizomenon ovalisporum* (GUZMAN-GUILLEN et al., 2013). Por outro lado, a

ingestão por 60 dias de 110, 120, 160, 240, 390 e 1100 mg L-carnitina kg⁻¹ não resultou em nenhum efeito sobre a produção das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione (GLU) na dourada negra *Sparus macrocephalus* (Ma et al., 2008). Uma hipótese para a ação deste composto sobre vários xenobióticos é a sua interação com a cardiolipina, o que irá melhorar a permeabilidade da membrana e as funções de proteção das mitocôndrias (ARRIGONI-MARTELLI e CASO, 2001).

Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito protetor da L-carnitina em alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas continuamente com *Microcystis aeruginosa* liofilizada.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ACUÑA, S.; DENG, D.F.; LEHMAN, P.; THE, S. Sublethal dietary effects of *Microcystis* on Sacramento splittail, *Pogonichthys macrolepidotus*. **Aquatic Toxicology**, v. 110, n. 111, p. 1–8, 2012.
- ARRIGONI-MARTELLI, E.; CASO, V. Carnitine protects mitochondria and removes toxic acyls from xenobiotics. **Drugs under experimental and clinical research**, v. 27, n. 1, p. 27-49, 2001.
- ATENCIO, L.; MORENO, I.; JOS, A.; PRIETO, A.I.; MOYANO, R.; BLANCO, A.; CAMEÁN, A.M. Effects of dietary selenium on the oxidative stress and pathological changes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a microcystin-producing cyanobacterial water bloom. **Toxicon**, v. 53, p. 269–282, 2009.
- AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W.; JOCHIMSEN, E.M.; RINEHART, K.L.; LAU, S.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicology**, v. 181, n. 182, p. 441-446, 2002.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; PICCIN-SANTOS, V.; MOURA, A.R.; NÍSIA ARAGÃO-TAVARES, N.K.C.; CORDEIRO-ARAÚJO, M.K. Cyanobacteria, microcystins and cylindrospermopsin in public drinking supply reservoirs of Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 1, p. 297-309, 2014.
- BOTHA, N.; VAN DE VENTER, M.; DOWNING, T.G.; SHEPHARD, E.G.; GEHRINGER, M.M. The effect of intraperitoneally administered microcystin-LR on the gastrointestinal tract of Balb/c mice. **Toxicon**, v. 43, p. 251–254, 2004.
- BRASIL. Ministério da Pesca e a Aquicultura (MPA). Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2011. Brasília: DEMOC, CGMIP, 2013. 60 p.
- BURY, N.R.; EDDY F.B.; CODD G.A. The effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR, and ammonia on growth rate and ionic regulation of brown trout. **Journal of Fish Biology**, v. 46, p. 1042–1054, 1995.
- CARMICHAEL, W.W.; BEASLEY, V.R.; BUNNER, D.L.; ELOFF, J.N.; FALCONER, I.R.; GORHAM, P.R.; HARADA, K.-I.; KRISHNAMURTHY, T.; JUAN, Y.M.; MOORE, R.E.; RINEHART, K.L.; RUNNEGAR, M.T.C.; SKULBERG, O.M.; WATANABE, M.F. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). **Toxicon**, v. 26, n. 11, p. 971-973, 1988.

- CARMICHAEL, W.W. cyanobacteria secondary metabolites – The Cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 72: 445-59. 1992.
- CARMICHAEL, W.W.; BOYER, G.L. Review, Health impacts from cyanobacteria harmful algae blooms: Implications for the North American Great Lakes. **Harmful Algae**, v. 54, p. 194–212, 2016.
- CHORUS, I.; BARTRAM, J. Toxic Cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. London; New York: E and Fn Spon, 1999. 416 p.
- CYRINO, J.E.P.; BICUDO, A.J.A.; SADO, R.Y. BORGHESI, R.; DAIRIKI, J.K. A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 68-87, 2010.
- DIAZ, J.; ARZEL, J.; CORRAZE, G.; KAUSHIK, J. Effects of dietary L-carnitine supplementation on growth and lipid metabolism in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture Research**, v. 32, p. 206-215, 2001.
- ELLEMAN, T.C.; FALCONER, I.R.; JACKSON, A.R.B.; RUNNEGAR, M.T. Isolation, characterization and pathology of the toxin from a *Microcystis aeruginosa* (= *Anacystis cyanea*) bloom. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 31, p. 209-218, 1978.
- ERIKSSON, J.E.; TOIVOLA, D.; MERILUOTO, J.A.O.; KARAKI, H.; HAN, Y.; HARTSHORNE, D. Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins effects inhibition of protein phosphatases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 173, p. 1347-1353, 1990.
- FALCONER, I.R.; BURCH, M.D.; STEFFENSEN, D.A.; CHOICE, M.; COVERDALE, O.R. Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. **Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal**, v. 9, p. 131-139, 1994.
- FERREIRA, M.F.N.; OLIVEIRA, V.M.; OLIVEIRA, R.; CUNHA, P.V.; GRISOLIA, C.K.; JÚNIOR, O.R.P. Histopathological effects of [D-Leu¹] Microcystin-LR variants on liver, skeletal muscle and intestinal tract of *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844). **Toxicon**, v. 55, p. 1255–1262, 2010.
- FISCHER, W.J.; HITZFELD, B.C.; TENCALLA, F.; ERIKSSON, J.E.; MIKHAILOV A.; DIETRICH, D.R. Microcystin- LR toxicodynamics induced pathology and

immunohistochemical localization in livers of bluegreen algae exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicological Sciences**, v. 54, p. 365–373, 2000.

FISCHER, W.J.; ALTHEIMER, S.; CATTORI, V.; MEIER, P.J.; DIETRICH, D.R.; HAGENBUCH, B. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, p. 257– 263, 2005.

Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. 2014. State of World Fisheries and Aquaculture 2014. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome, Italy.

FOCKEN, U.; BECKER, K.; LAWRENCE, P. A note on the effects of L-carnitine on the energy metabolism of individually reared carp, *Cyprinus carpio* L. **Aquaculture Nutrition**, v. 3, p. 261–264, 1999.

FRANCIS, G. Poisonous Australian Lake. **Nature**, v. 18, p. 11–12, 1878.

FUJIKI, H.; SUGANUMA, M. Carcinogenic aspects of protein phosphatase 1 and 2A inhibitors. **Progress in Molecular and Subcellular Biology**, v.46, p. 221–254, 2009.

FURUYA, W.M.; BOTARO, D.; GOMES DE MACEDO, R.M.; DOS SANTOS, V.G.; SILVA, L.C.R.; SILVA, T.C.; FURUYA, V.R.B.; SALES, P.J.P. Aplicação do conceito de proteína ideal para redução dos níveis de proteína em dietas para Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 3, n. 5, 1433-1441, 2005.

GÓMEZ-AMORES, L.; MATE, A.; MIGUEL-CARRASCO, J.L.; JIMÉNEZ L.; JOS, Á.; CAMÉAN, A.M.; SANTA-MARIA, CONSUELO.; VÁZQUEZ, C.M. L-carnitine attenuates oxidative stress in hypertensive rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 533-540, 2007.

GUZMAN-GUILLEN, R.; PRIETO, A.L.; VAZQUEZ, C.M.; VASCONCELOS, V.; CAMEÁN, A.M. The protective role of l-carnitine against cylindrospermopsin-induced oxidative stress in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquatic Toxicology**, v.132-133 p.141– 150, 2013.

GUZMÁN-GUILLÉN, R.; ORTEGA, A.I.P.; MOYANO, R.; BLANCO, A.; VASCONCELOS, V.; CAMÉAN, A.M. Dietary L-Carnitine prevents histopathological changes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to cylindrospermopsin. **Environmental Toxicology**, v. 00, p. 000–000, 2015.

GUPTA, V.; RATHA, S.; SOOD, A.; CHAUDHARY, V.; PRASANNA, R. New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae)-Prospects and challenges. **Algal Research**, v. 2, p. 79-97, 2013.

- HARPAZ, S.; BECKER, K.; BLUM, R. The effect of dietary L-carnitine supplementation on cold tolerance and growth of the ornamental cichlid fish *Pelvicachromis pulcher*-preliminary results. **Thermal Biology**, v. 24, p. 57-62, 1999.
- HARPAZ, S. L-carnitine and its attributed functions in fish culture and nutrition - a review. **Aquaculture**, v. 249, p. 3-21, 2005.
- HAWKINS, P.R.; RUNNEGAR, M.T.C.; JACKSON, A.R.B.; FALCONER, I.R. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya and Subba Raju isolated from a domestic supply reservoir. **Applied and Environment Microbiology**, v. 50, p. 1292–1295, 1985.
- JAYAPRAKAS, V.; SAMBHU, C.; KUMAR, S.S. Effect of L-carnitine in the diet on growth and reproductive performance of male *Oreochromis mossambicus* (Peters). **Fishing Technology**, v. 33, p. 84-90, 1996.
- JIWYAM, W. Density-dependent growth and production of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings relative to phytoplankton and periphyton biomass. **Our Nature**, v. 11, n. 2, p. 105-115, 2013.
- JOHNSEN, P.B.; KUAN, J.-C.W. Simplified method to quantify geosmin and 2-methylisoborneol concentrations in water and microbiological cultures. **Journal of Chromatography**, v. 409, p. 337–342, 1987.
- LI, X-Y.; CHUNG, I-K.; KIM, J.I.; LEE, J-A. Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to Microcystis under laboratory conditions. **Toxicon**, v. 44, p. 821–827, 2004.
- MA, J.J.; XU, Z.R. Q.; SHAO, J.J.; XU, Z.; HUNG, S.S.O.; HU, W.L.; ZHOU, L.Y. Effect of dietary supplemental L-Carnitine on growth performance, body composition and antioxidant status in juvenile black sea bream, *Sparus macrocephalus*. **Aquaculture Nutrition**, v. 14, p. 464–471, 2008.
- MAYNES, J.T.; LUU, H.A.; CHERNEY, M.; ANDERSEN, R.J.; WILLIAMS, D.; HOLMES, C.F.B.; JAMES, M.N.G. Crystal structures of protein phosphatase-1 bound to motuporin and Dihydromicrocystin-LA: Elucidation of the mechanism of enzyme inhibition by cyanobacterial toxins. **Journal of Molecular Biology**, v. 356, p. 111–120, 2006.
- MOLICA, R.; AZEVEDO, S. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 2, p. 229-246, 2009.

MOLINA, R.; MORENO, I. PICHARDO, S.; JOS, A.; MOYANO, R.; MONTERDE J.G.; CAMEÁN A. Acid and alkaline phosphatase activities and pathological changes induced in Tilapia fish (*Oreochromis* sp.) exposed subchronically to microcystins from toxic cyanobacterial blooms under laboratory conditions. **Toxicon**, v. 46, p.725–735, 2005.

MOURA, A.N.; DANTAS, E.W.; OLIVEIRA, H.S.B.; BITTENCOURT-OLIVEIRA M.C. Vertical and temporal dynamics of cyanobacteria in the Carpina potable water reservoir in Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.71, p. 451-459, 2011.

MITSOURA, A.; KAGALOU, I.; PAPAIOANNOU, N.; BERILLIS, P.; MENTE, E.; PAPADIMITRIOU, T. The presence of microcystins in fish *Cyprinus carpio* tissues: a histopathological study. **International Aquatic Research**, v. 5, n. 8, p. 1-16, 2013.

NOGUEIRA, N.; CORDEIRO, N.; CANADA, P.; CRUZ E SILVA, P.; OZORIO, R.O.A. Separate and combined effects of cyclic fasting and L-carnitine supplementation in red porgy (*Pagrus pagrus*, L. 1758). **Aquaculture Research**, v. 41, p. e795-e806, 2010.

O'NEIL, J.M.; DAVIS, T.W.; BURFORD M.A.; GOBLER C.J. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. **Harmful Algae** v. 14, p. 313–334, 2012.

PAPADIMITRIOU, T.; KAGALOU, I.; STALIKAS, C.; PILIDIS, G.; LEONARDOS, I.D. Assessment of microcystin distribution and biomagnification in tissues of aquatic food web compartments from a shallow lake and evaluation of potential risks to public health. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 1155–1166, 2012.

PARK, H.; NAMIKOSHI, M.; BRITTAIN, S.M.; CARMICHAEL, W.W.; MURPHY, T. [D-Leu¹] microcystin-LR, a new microcystin isolated from waterbloom in a Canadian prairie lake. **Toxicon**, v. 39, p. 855-862, 2001.

PEKALA, J.; PATKOWSKA-SOKOŁA, B.; BODKOWSKI, R.; JAMROZ, D.; NOWAKOWSKI, P.; LOCHYŃSKI, S.; LIBROWSKI, T. L-Carnitine - metabolic functions and meaning in humans life. **Current Drug Metabolism**, v. 12, p. 667-678, 2011.

PRIETO, A.I.; JOS, A.; PICHARDO, S.; MORENO, I.; CAMEAN, A.M. Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.). **Aquatic Toxicology**, v.77 p. 314–321, 2006.

PRIETO, A.I.; JOS, A.; PICHARDO, S.; MORENO, I.; SOTOMAYOR, M.A.; MOYANO, R.; BLANCO, A.; CAMEÁN, A.M. Time-Dependent Protective Efficacy

of Trolox (Vitamin E Analog) Against Microcystin-Induced Toxicity in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environmental Toxicology**, 54: 563–579, 2009.

PINHO, G.L.L.; DE ROSA, C.M.; YUNES, J.S.; LUQUET, C.M.; BIANCHINI, A.; MONSERRAT, J.M. Toxic effects of microcystins in the hepatopâncreas of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 135, p. 459–468, 2003.

PINHO, G.L.L.; ROSA, C.M.; MACIEL, F.E.; BIANCHINI, A.; YUNES, J.S.; PROENÇA, L.A.O.; MONSERRAT, J.M. Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, p. 353-360, 2005.

PUDDICK, J.; PRINSEP, M.R.; WOOD, S.A.; CARY, S.C.; HAMILTON, D.P.; HOLLAND, P.T. Further Characterization of Glycine-Containing Microcystins from the McMurdo Dry Valleys of Antarctica. **Toxins**, v. 7, p. 493-515, 2015.

RÅBERGH, C.M.I.; BYLUND, G.; ERIKSSON, J.E. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (bluegreen alga) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquatic Toxicology**, v. 20, p. 131–146, 1991.

RASHASH, D.M.C.; DIETRICH, A.M.; HOEHN, R.C.; PARKER, B.C. The influence of growth conditions on odor-compound production by two chrysophytes and two cyanobacteria. **Water Science & Technology**, v. 31, p. 165–172 1995.

REBOUCHE, C.J. Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-Carnitine and Acetyl-L-carnitine metabolism. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1033, p. 30–41, 2004.

RUNNEGAR, M.T.C.; FALCONER, I.R. Effect of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. **Toxicon**, v. 24, n, 2, p. 109- 115, 1986.

SAHIN, A.; TENCALLA, F.; DIETRICH, D.; NAEGELI, H. Biliary excretion of biochemically active cyanobacteria (blue-green algae) hepatotoxins in fish. **Toxicology**, v. 106, p. 123–130, 1996.

SANTULLI, A.; D'AMELIO, V. Effects of supplemental dietary carnitine on growth and lipid metabolism of hatchery-reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Aquaculture**, v. 59, p. 177–186, 1986.

SCHREIBER, S.; BECKER, K.; BRESLER, V.; FISHELSON, L. Dietary L-carnitine protects the gills and skin of guppies (*Poecilia reticulata*) against anionic xenobiotics.

Comparative Biochemistry and Physiology, v.117, n.1, p.99-102, 1997.

SCHRADER, K.K.; RUBIO, S.A.; PIEDRAHITA, R.H.; RIMANDO, A.M. Geosmin and 2- methylisoborneol cause off-flavors in cultured largemouth bass and white sturgeon reared in recirculating-water systems. **North American Journal of Aquaculture**, v. 67 n. 3, p. 177–180, 2005.

SHI, Y.; JIANG, J.; SHAN, Z.; BU, Y.; DENG, Z.; CHENG, Y. Oxidative stress and histopathological alterations in liver of *Cyprinus carpio* L. induced by intraperitoneal injection of microcystin-LR. **Ecotoxicology**, v. 24, p. 511–519, 2015.

SOARES, R.M.; MAGALHÃES, V.F.; AZEVEDO, S.M.F.O. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 70, p. 1–10, 2004.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial Toxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. Toxic Cyanobacteria in Water. London: E & FN Spon, 1999. Cap. 3, p.41-111.

STANIER, R.Y.; COHEN-BAZIRE, G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 31, p. 225-74, 1977.

TENCALLA, F.G.; DIETRICH, D. R.; SCHLATTER, C. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, v. 30, n. 3, p. 215–224, 1994.

TREMBLAY, G.C.; BRADLEY, T.M. L-carnitine protects fish against acute ammonia toxicity. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 101C, n. 2, p. 349-351, 1992.

TURKER, H.; EVERSOLE, A.G.; BRUNE, D.E. Filtration of green algae and cyanobacteria by Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in the Partitioned Aquaculture System. **Aquaculture**, n.215, p.93–101, 2003.

VASCONCELOS, V. Eutrophication, toxic cyanobacteria and cyanotoxins: when ecosystems cry for help. **Limnetica**, v. 25. n 1-2, p. 425-432, 2006.

VASCONCELOS, J.F.; BARBOSA, J.E.L.; LIRA, W.; AZEVEDO, S.M.F.O. Microcystin bioaccumulation can cause potential mutagenic effects in farm fish. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 39, p. 185–192, 2013.

VAN APELDOORN, M.E. et al. Toxins of cyanobacteria. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, p. 7-60, 2007.

VAZ, F.M.; WANDERS, R.J.A. Carnitine biosynthesis in mammals. **Biochemical Journal**, v. 361, p.417-429, 2002.

WOOD, R. Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure — A review of the literature. **Environment International**, v. 91, p. 276–282, 2016.

- XIE, L.; XIE, P.; OZAWA, K. Dynamics of microcystins-LR and -RR in the hytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment. **Environmental Pollution**, v. 127, n. 3, p. 431-9, 2004.
- ZAMMIT, V.A.; RAMSAY, R.R.; BONOMINI, M.; ARDUINI, A. Carnitine, mitochondrial function and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 1353–1362, 2009.
- ZHAO, M.; XIE, S.; ZHU, X.; YANG, Y.; GAN, L.; SONG, L. Effect of inclusion of blue-green algae meal on growth and accumulation of microcystins in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 22, p. 72–78, 2006a.
- ZHAO, M.; XIE, S.Q.; ZHU, X.M.; YANG, Y.X.; GAN, N.Q.; SONG, L.R. Effect of dietary cyanobacteria on growth and accumulation of microcystins in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 261, p. 960–966, 2006b.
- ZHANG, X.; XIE, P.; LI, D.; TANG, R.; LEI, H.; ZHAO Y. Time-dependent oxidative stress responses of crucian carp (*Carassius auratus*) to intraperitoneal injection of extracted microcystins. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, p. 574–578, 2009.
- ZIMBA, P.V.; KHOO, L.; GAUNT, P.S.; BRITTAIN, S.; CARMICHAEL, W.W. Confirmation of catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), mortality from *Microcystis* toxins. **Journal of Fish Diseases**, v. 24, p. 41-47, 2001.

4- Artigo científico

Alimentação contínua de alevinos de tilápia do Nilo com *Microcystis aeruginosa* associada a suplementação de L-carnitina: desempenho e histopatologia hepática

Artigo científico a ser encaminhado a Revista **Anais da
Academia Brasileira de Ciências.**

Todas as normas de redação e citação, deste capítulo, atendem as estabelecidas pela referida revista (em anexo).

Alimentação contínua de alevinos de tilápia do Nilo com *Microcystis aeruginosa* associada a suplementação de L-carnitina: desempenho e histopatologia hepática

FRAGOZO VELASQUEZ EDUARDO DE JESÚS ^{ab}, RENATO JOSÉ REIS MOLICA ^b, MÁRCIA BERSANE ARAÚJO DE MEDEIROS TORRES ^b, ÁLVARO JOSÉ DE ALMEIDA BICUDO ^{ab}.

^a Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, Departamento de Pesca e Aquicultura (DEPaq), Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900. Recife, PE, Brasil.

^b Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE / Unidade Acadêmica de Garanhuns –Av. Bom Pastor, s/n, Boa Vista, 55292-270, Garanhuns, PE, Brasil.

RESUMO

No presente estudo foi avaliado o efeito da adição da L-carnitina (LC) sobre o desempenho e histologia do fígado de juvenis de tilápia do Nilo submetidos a repetidas doses de microcistina (MCs). Para isso, células liofilizadas de cianobactéria (CIAN) *Microcystis aeruginosa* cepa NPJL4 foram incluídas (3,3%) em dietas sem L-carnitina (CIAN), com 1 g de L-carnitina kg⁻¹ (CIAN+LC-1), 2 g de L-carnitina kg⁻¹ (CIAN+LC-2) e sem CIAN e LC (CONT). Juvenis de tilápia do Nilo ($\pm 4,8$ g de peso inicial) foram distribuídos em aquários de 60L (20 peixes/aquário). As dietas foram fornecidas durante 28 dias em três refeições diárias a taxa de 5% da biomassa de modo a fornecer 1,2 µg MC g⁻¹/peixe/dia. Nos dias 0, 3, 7, 14, 21 e 28 amostras de fígados foram coletadas para análises histológicas. A sobrevivência e o desempenho zootécnico não foram influenciados ($p > 0,05$) pelos tratamentos. As principais lesões hepáticas induzidas pela ingestão de MCs foi a perda da coesão celular e necrose de hepatócitos, megalocitose e a perda da coesão celular pancreática. Não foi possível verificar nenhum efeito protetor significativo da L-carnitina em tilápias do Nilo ingerindo MCs repetidamente. A espécie demonstrou alta resistência a ingestão contínua de microcistinas por 28 dias.

Palavras chaves: aditivo alimentar, cianobactérias, cianotoxinas, esteatose

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a aquicultura mundial cresceu a taxas de 8,8% anuais, sendo a tilápia-do-Nilo uma das principais espécies produzidas globalmente (FAO 2014). A intensificação dos sistemas de produção responde por parte significativa deste crescimento. Entretanto, em sistemas intensivos, ocorre a elevação significativa do aporte de nutrientes exógenos (especialmente N e P) na água devido as altas taxas de alimentação utilizadas (Cyrino et al. 2010). Neste panorama, a eutrofização do ambiente de cultivo é uma possibilidade, incluindo o surgimento de superpopulações de cianobactérias (Borges et al. 2010, Vasconcelos et al. 2013).

Além de serem autotróficas, algumas espécies de cianobactérias produzem metabólitos secundários tóxicos (cianotoxinas), que podem ter diferentes estruturas e atividades tóxicas, acarretando em efeitos biológicos distintos (Van Apeldoorn et al. 2007). Entre as diferentes cianotoxinas existentes, a MCs é a mais frequente em águas continentais, sendo a microcistina-LR a mais comum e uma das isoformas mais tóxicas (Ferrão-Filho 2009). Entre os efeitos mais comumente relatados em peixes submetidos a presença de MCs estão o aumento do estresse oxidativo (Prieto et al. 2009) e lesões histopatológicas no tecido de diferentes órgãos (Botha et al. 2004, Atencio et al. 2009) podendo ocasionar mortalidades massivas dos peixes cultivados (Sevrin-Reyssac e Pletikosic 1990, Zimba et al. 2001).

Assim, nos últimos anos diversos estudos têm buscado avaliar substâncias antioxidantes como possíveis protetores dos efeitos adversos da MCs em peixes (Atencio et al. 2009, Prieto et al. 2009). Estes estudos têm focado na administração prévia destas substâncias aos peixes antes de submetê-los a presença da MCs. A L-carnitina (LC) é uma amina quaternária, que ocorre na forma de isômeros D- e L-, sendo apenas esta última biologicamente ativa. É sintetizada a partir dos aminoácidos lisina e metionina, sendo importante no metabolismo lipídico (Ma et al. 2008). Apresenta um importante papel na detoxificação celular, uma vez que remove o acetil-CoA proveniente da mitocôndria, cujo excesso pode ter efeito tóxico (Schreiber et al. 1997). Estudos prévios demonstraram que a LC pode proteger a membrana celular dos danos provocados pelo estresse oxidativo em peixes e na presença de xenobióticos (Gülçin et al. 2006, Ma et al. 2008).

De fato, a ação protetora da administração prévia da LC em peixes desafiados com uma única dose de MCs já foi demonstrada (Guzmán-Guillén et al. 2015). Porém, a superpopulação de cianobactérias em condições naturais ou de cultivo resultará em aporte de MCs aos peixes por vários dias, principalmente pela ingestão de células, principalmente com relação às espécies filtradoras, como a tilápia-do-Nilo (Ferrão-Filho 2009). Além disso, a previsibilidade de florações de cianobactérias em situação de cultivo ou naturais não é tarefa fácil (Sevrin-Reyssac e Pletikoscic 1990), dificultando o uso estratégico da LC como prevenção à presença de MCs.

Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito protetor da adição da LC sobre o desempenho e histologia do fígado de juvenis de tilápia do Nilo submetidos a repetidas doses de microcistinas.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo de *Microcystis aeruginosa* e determinação de microcistina

No presente estudo foi utilizada a cepa NPJL-4 de *M. aeruginosa* proveniente do banco de culturas do Laboratório de Biotecnologia da Unidade Acadêmica de Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Para obtenção da biomassa de *M. aeruginosa* incluída nas rações foram realizados uma série de cultivos tipo “batch” em Erlenmeyers de 2 L (1,5 L úteis) em meio ASM-1 (Gorham et al. 1964), pH 8,0, temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, intensidade luminosa de 2000-4000 lux (Biospherical Instruments QSL-100) obtida a partir de lâmpadas fluorescentes, sob fotoperíodo de 12h controlado por temporizador. No 10º dia de cultivo, era formada uma amostra composta proveniente das diferentes unidades de cultivo (Erlenmeyers), a qual foi centrifugada 5.000 rpm por 10 minutos e o pélete armazenado em congelador a -20°C para posterior liofilização. Antes do processo de centrifugação, uma alíquota da amostra composta foi retirada e fixada com solução de lugol para a quantificação celular (células/ml) em câmara de Fuchs-Rosenthal. A concentração final de células foi uma média de $7,4 \times 10^6$ células/mL.

A determinação da concentração de MCs foi realizada a partir do material liofilizado. Para extração das microcistinas, a biomassa liofilizada foi homogeneizada por uma hora com solução de metanol 75% (Fastner et al. 1998) para extração da MCs, centrifugada por 5000 rpm a 15 minutos e o sobrenadante coletado. Este procedimento

foi repetido por duas vezes, diminuindo-se o tempo de extração para 30 minutos. Ao final, os sobrenadantes foram transferidos e evaporados sob fluxo de ar quente, ressuspensado em metanol 20% (20:80, metanol grau HPLC: água ultrapura, v/v), centrifugado (15000 rpm a 15 min) e o sobrenadante submetido à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) utilizando um cromatógrafo modelo Proeminance (Shimadzu®) composto por uma bomba (LC-20AT), degaseificador (DGU-20A5), forno (CTO-20A), detector UV-Vis com arranjo de diodo (SPD-M20A), amostrador automático (SIL-20AHT), sistema controlador para conexão dos módulos com computador (CBM-20A) e software LC Solution para a aquisição e processamento dos dados (Shimadzu, Proeminance).

A análise cromatográfica foi realizada usando o método gradiente, tendo como fases móveis a solução A (água ultrapura + ácido trifluoracético 0,05%) e solução B (acetonitrila + ácido trifluoracético 0,05%), durante 54 minutos (Lawton et al., 1994). O volume de amostra injetado foi de 50 µL, fluxo de 1 mL/min, coluna C18 Lichrospher 100 RP-8e (125 mm x 4.0 mm, 5 µm), comprimento de onda de 238 para monitorar a corrida e um espectro de absorção entre 200 e 300 nm para confirmação dos picos de microcistinas. A identificação e quantificação das microcistinas foi feita mediante uma curva padrão (Sigma – microcistina-LR) e os dados expressos em MC-LR_{eq} (equivalentes de microcistina-LR), uma vez que a cepa produz pelo menos cinco análogos de microcistinas. A concentração de cianotoxinas nas células liofilizadas da cepa NPLJ-4 de *M. aeruginosa* foi de 7.245 µg MC-LR_{eq} g⁻¹.

Dietas experimentais

Foram formuladas quatro dietas práticas isoproteicas (34% PB) e isocalóricas (3400 kcal ED/kg) de modo a atender as exigências nutricionais da espécie (NRC, 2011). Os tratamentos consistiram em: dieta sem carnitina + *M. aeruginosa* liofilizada (CIAN); dieta com *M. aeruginosa* liofilizada + 1g kg⁻¹ de L-carnitina (CIAN+LC-1) e dieta com *M. aeruginosa* liofilizada + 2g kg⁻¹ de L-carnitina (CIAN+LC-2); dieta controle sem carnitina e células liofilizadas de *M. aeruginosa* (CONT). A L-carnitina na dieta foi suplementada na forma de Cloridrato de DL-carnitina (Sigma Aldrich®), que possui 50% de L-carnitina ativa. Foi adicionado um aglutinante a dieta (carboximetilcelulose) para minimizar a lixiviação da carnitina. As células liofilizadas

de cianobactérias foram adicionadas a ração em substituição ao farelo de soja (Dong et al. 2009); a carnitina foi incluída em substituição a celulose microfina (Tabela 1).

Para a fabricação das dietas experimentais os ingredientes foram previamente homogeneizados, exceto a carnitina. Esta foi diluída em água destilada a 40°C para facilitar a homogeneização na mistura. A ração foi peletizada em um moinho de rosca sem fim (Modelo MA-361, Marconi®, Piracicaba, SP) em grânulos de 0,5 mm de diâmetro, seca em estufa de ventilação forçada (35°C; $\pm$ 24h), armazenadas sob refrigeração até o momento de fornecer aos peixes.

Animais e condições experimentais

Os alevinos de tilápia-do-Nilo utilizados foram provenientes da Estação de Piscicultura de Itiúba da Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba (CODEVASF) em Porto Real do Colégio - AL. Os peixes foram aclimatados as condições laboratoriais por sete dias, sendo alimentados diariamente (9:00h e 15:00h) com ração comercial (45% PB). Após, realizou-se a adaptação dos peixes as dietas experimentais alimentando-os por uma semana com a dieta CONT.

Para o início do experimento, 240 alevinos ($4,8 \pm 0,1$ g) foram aleatoriamente distribuídos em aquários de 60 L úteis (20 peixes/aquário), constituindo um delineamento inteiramente casualizado ($n=3$). Os peixes foram alimentados durante 28 dias com as dietas experimentais em três refeições diárias (9:00, 13:00 e 17:00h), na proporção de 5% da biomassa estocada. Esta taxa de alimentação foi calculada para fornecer diariamente 1,2 µg de microcistina por grama de peixe. Esta concentração foi a mesma utilizada no estudo realizado por Molina et al. (2005) com a mesma espécie-alvo. Diariamente, antes de cada refeição, todos os aquários eram vistoriados, os peixes mortos eram pesados individualmente e a quantidade de ração a ser fornecida ajustada para manter o fornecimento de microcistina constante ao longo de todo o experimento.

Todos os aquários foram individualmente dotados de aquecedores para controle da temperatura da água, filtro biológico de espuma acoplado a um sistema de aeração contínua. Diariamente, uma hora após a última refeição, todos os aquários foram sifonados para a retirada das fezes e renovação de 25% do volume total da água. O fotoperíodo utilizado foi 12h luz:12h escuro. A temperatura ($30,0 \pm 1,9$ °C) e o oxigênio dissolvido ($5,2 \pm 0,8$ mg L⁻¹) na água foram monitorados diariamente com auxílio de oxímetro modelo YSI-55. O pH ($7,3 \pm 0,7$), a alcalinidade total ($22,5 \pm 17,5$ mg

$\text{CaCO}_3\text{L}^{-1}$), a dureza total ($95,0 \pm 25,0 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$), nitrito ($1,31 \pm 0,33 \text{ mg L}^{-1}$) e nitrogênio amoniacal total ($0,62 \pm 0,61 \text{ mg L}^{-1}$) foram monitorados semanalmente com auxílio de reações colorimétricas (ALFAKIT®).

Variáveis de desempenho analisadas

As variáveis abaixo utilizadas para avaliar o desempenho zootécnico dos juvenis de tilápia-do-Nilo foram calculadas de acordo com o NRC (2011):

Ganho de peso relativo (GPR; %) = $[(\text{PMF} - \text{PMI}) \div \text{PMI}] \times 100$

Taxa de crescimento específico (TCE; % peso vivo dia^{-1}) = $[(\ln \text{PMF} - \ln \text{PMI}) \div \text{n}^\circ \text{ dias}] \times 100$;

Taxa de sobrevivência (%) = $100 \times (\text{n}^\circ \text{ final de peixes} \div \text{n}^\circ \text{ inicial de peixes})$.

Em função das mortes de peixes e a amostragem ao longo do período experimental, a taxa de eficiência alimentar (TEA) foi corrigida somando-se ao ganho de peso o peso individual dos peixes mortos e amostrados em todo o período experimental, seguindo a metodologia descrita por Rostagno e Sakomura (2007).

$$\text{TEA} = [\text{ganho de peso do grupo} + \text{peso animais mortos} + \text{peso animais amostrados (g)}] \div \text{consumo total de alimento do grupo}_{(g)}$$
.

Coleta de amostras para análise histológica

No início do período experimental, após jejum de 24h, seis peixes provenientes da população inicial foram amostrados, eutanasiados por overdose de anestésico (benzocaína 500 mg L^{-1}) e necropsiados para retirada do fígado para análise histológica. Após a coleta, os fígados eram imediatamente fixados em formalina tamponada a 10%, desidratados, incluídos em parafina e corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) e pelo método Ácido Periódico de Schiff (PAS), para detecção de glicogênio.

Nos 3º, 7º, 14º e 21º dias de experimentação dois peixes de cada aquário (totalizando seis por tratamento) foram amostrados, eutanasiados e processados seguindo o protocolo anteriormente descrito. Após o 21º dia, foi registrado 100% de mortalidade em um aquário do tratamento CONT e outro do tratamento CIAN. Assim, no 28º dia experimental foram coletados três peixes nos dois aquários restantes nestes

tratamentos (para totalizar seis peixes por tratamento), mantendo-se o protocolo amostral de dois peixes por aquário para os outros tratamentos.

Procedimentos estatísticos

Duas unidades experimentais apresentaram 100% de mortalidade após o 21º dia de experimentação, uma do tratamento CONT e outra do tratamento CIAN, sendo então consideradas como parcelas perdidas nos cálculos das variáveis de desempenho (exceto para a taxa de sobrevivência) e na análise estatística. Os resultados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para análise de normalidade e o teste de Bartlett para avaliar a igualdade das variâncias. Após os dados foram submetidos a ANOVA e quando detectada diferença significativa entre tratamentos, submetidos ao teste de Tukey. O nível de significância utilizado em todo o estudo foi 5%. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software SIGMAPLOT 12 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

Resultados

Caracterização da microcistinas

Foram identificados seis análogos de microcistina-LR (identificados pelos numero 1-6) produzidos pela cepa NPJL-4 de *M. aeruginosa* (Figura 1). Dentre estes, o análogo 4 (D-Leu¹) foi o principal análogo produzido, representando 86,81% do total de microcistinas detectado (dados não apresentados).

Desempenho zootécnico

Não se observou nenhum comportamento de rejeição às dietas fornecidas durante todo o período experimental. A taxa de sobrevivência dos juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados com a dieta CONT foi similar ($P>0,05$) a observada para os animais que receberam células de *M. aeruginosa* (CIAN), independente da associação ou não com a L-carnitina dietética (Figura 2). Entretanto, mesmo sem diferença estatística significativa entre os tratamentos, a taxa de sobrevivência dos peixes alimentados com as dietas CIAN+LC-1 (75%) e CIAN+LC-2 (70%) foi em média 27,8% superior ao dos alimentados apenas com *M. aeruginosa* (56,7%) (Figura 3).

A presença de células liofilizadas de *M. aeruginosa*, associada ou não a L-carnitina dietética, não influenciou ($p>0,05$) o peso médio final, ganho de peso, taxa de crescimento específico e a taxa de eficiência alimentar dos alevinos de tilápia-do-Nilo (Tabela 2).

Análise histopatológica do fígado

Os fígados dos peixes alimentados com a dieta CONT apresentaram hepatopâncreas bem estruturado (Fig. 4A) e sem congestão (Fig. 4B), esteatose moderada e presença de moderada quantidade glicogênio (Fig. 4C), não sendo observado nenhum outro achado histopatológico relevante. Todos os peixes apresentaram um quadro degenerativo do tecido hepático, que ao longo de todo o período experimental, foi observado uma diminuição.

No 3º dia experimental, os fígados dos peixes alimentados com a dieta CIAN apresentaram esteatose moderada a acentuada, pouca quantidade de glicogênio, com leve vacuolização e perda da adesão do hepatopâncreas (Fig. 5A). Observou-se desorganização de hepatócitos (Fig. 5B) e congestão de sinusóides com dilatação de vasos e focos isolados de hemorragia (Fig. 5C). Observou-se uma menor desorganização das células pancreáticas e quantidade moderada de glicogênio nos peixes do tratamento CIAN+LC-1 se comparado ao do tratamento CIAN, sendo as demais lesões semelhantes entre os dois tratamentos. Os fígados dos peixes alimentados com a dieta CIAN+LC-1 apresentaram quantidade acentuada de glicogênio, com leve desorganização do hepatopâncreas em relação aos peixes alimentados com células liofilizadas de *M. aeruginosa* apenas.

No 7º dia de exposição, registrou-se diminuição da esteatose e aumento do glicogênio hepático nos peixes alimentados com *M. aeruginosa* sem associação com L-carnitina. Manteve-se a vacuolização e desorganização do hepatopâncreas, porém houve necrose das células pancreáticas (Fig. 6A) associadas a células inflamatórias mononucleares (linfócitos e macrófagos). Também foi observada uma acentuação da congestão de sinusóides e desorganização dos hepatócitos. Nos peixes alimentados com CIAN+LC-1 foi observada quantidade moderada dos níveis de glicogênio, associada a uma diminuição da lesão pancreática e uma sutil diminuição da congestão do sinusóides. Diminuição do glicogênio e necrose individual de hepatócitos foi registrada nos fígados dos peixes alimentados com CIAN+LC-2. Os demais achados histopatológicos nos grupos alimentados com *M. aeruginosa*, associada ou não a LC, foram semelhantes, independente da concentração de LC avaliada.

No 14º dia de exposição, os fígados dos peixes alimentados apenas CIAN apresentaram um quadro acentuado de esteatose e grande quantidade de glicogênio hepático (Fig. 4D). Observou-se também evolução da lesão do hepatopâncreas, com necrose e desaparecimento de algumas células deste tecido (Fig. 6B) e aumento do infiltrado inflamatório, ao redor do tecido pancreático e na cápsula com fibrina e material basofílico (Fig. 6C). Houve necrose individual de hepatócitos (Fig. 6D), localizados preferencialmente próximos ao hepatopâncreas e a cápsula. A congestão dos sinusóides apresentou-se mais acentuada, com agravamento das áreas de hemorragia e leve aumento do tamanho dos hepatócitos. Os peixes alimentados com a dieta CIAN+LC-1 apresentaram níveis de esteatose e glicogênio hepático moderado. Resultado parecido foi registrado para CIAN+LC-2, com esteatose leve e glicogênio moderado. Os demais achados foram similares nos grupos CIAN e CIAN+LC, independente da concentração de LC utilizada.

Aos 21 dias de experimentação os peixes submetidos a dieta CIAN apresentaram diminuição da esteatose hepática e no glicogênio hepático. As lesões no hepatopâncreas permaneceram similares as observadas no período anterior (14 dias), porém observou-se o aumento da desorganização dos hepatócitos, da congestão e hemorragia, inflamação e megalocitose (Fig. 7A) nos hepatócitos. Os fígados dos peixes submetidos a alimentação com CIAN+LC-1 apresentaram lesões semelhantes às do grupo CIAN; em contrapartida os tratados com CIAN+LC-2 apresentaram leve aumento de esteatose e de níveis de glicogênio. As demais lesões foram semelhantes às observadas para o grupo CIAN.

Ao final do experimento (28 dias), os fígados dos peixes alimentados com a dieta CIAN apresentaram esteatose leve, com mesmo nível de glicogênio hepático observado no período anterior. Houve uma acentuação na lesão do hepatopâncreas, com desaparecimento de tecido em alguns pontos (Fig. 7B). Observou-se também a presença de infiltrado inflamatório que se estende do hepatopâncreas para a cápsula do fígado, com focos de material basofílico e fibrina. Registrou-se adicionalmente a necrose aleatória dos hepatócitos próximos a cápsula e ao hepatopâncreas, e megalocitose. No tratamento CIAN+LC-1, registrou-se níveis acentuados de glicogênio hepático. A necrose do hepatopâncreas foi menor comparada ao grupo CIAN, embora também tenha sido registrado o desaparecimento de tecido do hepatopâncreas em alguns focos. As demais lesões apresentaram-se similares ao grupo CIAN. Os fígados expostos a

CIAN+LC-2 apresentaram diminuição da esteatose e glicogênio. Observou-se que a gravidade da lesão do hepatopâncreas e a resposta inflamatória foram levemente menor em relação ao grupo CIAN. Os demais achados foram similares ao grupo CIAN.

Discussão

No presente estudo, foi registrada uma alta resistência da tilápia do Nilo à exposição oral diária a 1,2 μg de microcistinas por grama de peixe durante 28 dias. De fato, estudos prévios têm demonstrado elevada capacidade de sobrevivência da tilápia exposta às microcistinas. Tilápias híbridas expostas a 1,3 e 6,8 $\mu\text{g g}^{-1}\text{MC-LR/dia}$, durante 60 dias apresentaram 100% de sobrevivência (Dong et al. 2009). Além disso, a resistência desta espécie é muito superior à de vertebrados superiores. Tilápias submetidas a 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de MC-LA por via intraperitoneal apresentaram apenas efeitos subletais (Moreira 2012). Embora a variante MC-LA é pouco usado e descrito na literatura científica, o autor confirmou a inatividade das fosfatases PP2A num intervalo de 96 horas após exposição, sugerindo estes efeitos devem-se que a microcistina permaneceu circulando no organismo através do torrente sanguíneo durante nesse intervalo, o que possivelmente gerou um sinal, aumentando a transcrição do núcleo e, conseqüentemente, elevou o numero de copias de mRNA, inibindo as próximas copias de PP2A. Apesar dessas problemáticas produzidas a nível celular, o mesmo autor conclui que a resistência mostrada nesta espécie seja a presença de outras fosfatases, assim mantendo equilibrada a ausência de atividade PP2A por tanto tempo.

Não só a sobrevivência é importante, mas quando se trata da produção em cativeiro, as variáveis de desempenho zootécnico são importantes para avaliar a viabilidade econômica da produção. São poucos os estudos que avaliaram o impacto da ingestão de cianobactérias/cianotoxinas no desempenho produtivo de tilápias. Zhao et al. (2006b) em concentrações sub-crônicas de microcistinas (1,2-5,46 $\mu\text{g g}^{-1}$) afirmaram aumento de crescimento na tilápia, quando o TCE incrementou 15,8% nos tratamentos desafiados com microcistinas. No presente estudo, apesar de que a taxa de crescimento não foram significativas em tilápias, mas, houve um incremento 20% no TCA relativamente melhor nos tratamentos com CIAN e CIAN+LC-2.

Embora a elevada resistência da tilápia do Nilo a ingestão de elevadas concentrações de MCs pareça estar bem estabelecida, esta mesma característica não foi observada quando a espécie foi exposta a outras cianobactérias. De Bock (2014)

registrou elevada mortalidade e diminuição no desempenho zootécnico em juvenis de tilápia cultivados na presença de *Cylindrospermopsis raciborskii*, cianobactéria produtora de saxitoxinas (neurotoxina). A autora em seu estudo concluiu que o efeito das saxitoxinas é dose-dependente em relação ao peso do peixe. Assim, devido a elevada taxa de crescimento dos peixes na fase inicial, a relação entre a concentração de saxitoxinas e o peso diminuiu rapidamente, registrando-se uma diminuição da mortalidade dos peixes a partir de 8,6 g de peso vivo. No presente estudo, a relação biomassa-microcistina manteve-se constante ($1,2 \mu\text{g g}^{-1}$) ao longo de todo o período experimental. Assim, é possível supor que os efeitos sobre o desempenho e sobrevivência dos peixes nestas condições, além da óbvia diferença de ação entre as toxinas, também não tenha se expresso devido ao período experimental (28 dias).

A via de administração das cianotoxinas também influencia os efeitos observados. Muitos estudos que registraram efeitos negativos de MCs na sobrevivência de peixes usaram a aplicação intraperitoneal (Fournie e Courtney 2002, Zhang et al. 2009). Entretanto, os efeitos tóxicos utilizando a via intraperitoneal são registrados em concentrações de cianotoxinas aproximadamente dez vezes menores do que quando se utiliza a administração oral (Carbis et al., 1996). No presente estudo, a ingestão de MC-LR manteve-se constante em $1,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso vivo. Na carpa comum, a dose letal para a espécie via intraperitoneal foi determinada em $0,55 \mu\text{g MC-LR purificada g}^{-1}$ de peso vivo (Råbergh et al. 1991). Deste modo, é plausível supor que a observação de mortalidades expressivas de tilápias ingerindo MCs em condições laboratoriais somente serão observadas sob elevadas concentrações da toxina em relação ao peso vivo do animal. Entretanto, tais concentrações não são observadas em ambiente natural (Magalhães et al. 2001, Mohamed et al. 2003).

Não só a sobrevivência, mas quando se trata da produção em cativeiro, as variáveis de desempenho zootécnico também são importantes para avaliar a viabilidade econômica da produção. É escassa a literatura disponível que correlaciona a influência da ingestão de cianotoxinas/cianobactérias no desempenho produtivo de tilápias e outras espécies de peixes. Zhao et al. (2006b) registraram aumento significativo do ganho de peso de tilápias alimentadas com dietas contendo *M. aeruginosa* ($1,2-5,46 \mu\text{g}$ de MC-LR g^{-1} de ração), porém não existiu diferença significativa na conversão alimentar e sobrevivência dos peixes. Por outro lado, o bagre amarelo *Pelteobagrus fulvidraco* apresentou redução de 19 e 33% do crescimento após 30 dias de alimentação com dietas

contendo, respectivamente, baixa (32,3 mg g⁻¹) e alta (71,96 mg g⁻¹) concentrações de MCs (Dong et al. 2012). Redução do crescimento em função da ingestão de microcistinas também foi registrado em juvenis de carpa prussiana (Zhao et al. 2006a), truta marrom *Salmo trutta* (Bury et al. 1995) e carpa comum *Cyprinus carpio* (Li et al. 2004). Essas variações de resultados podem ser explicadas a dois fatores fundamentais: (i) a quantidade de toxina ingerida por cada peixe durante o ensaio e (ii) a sensibilidade da espécie a esses efeitos.

Alterações histopatológicas em diferentes órgãos foram observadas decorrentes da intoxicação por MCs em peixes (Ferreira et al. 2010, Gutierrez-Praena et al. 2014, Shi et al. 2015). Entretanto, a degeneração hepática observada neste estudo foi diferente aos relatados em estudos anteriores com tilápias (Guzmán-Guillén et al. 2015, Prieto et al. 2009) que registraram progressão no quadro de esteatose hepática. No presente estudo, observou-se um quadro de diminuição do quadro de esteatose ao longo do ensaio em relação ao quadro observado na população inicial, o que sugere não tenha sido uma lesão decorrente da exposição a microcistinas. Esteatose hepática em peixes tem sido relatada como consequência da exposição a contaminantes ambientais (Teh et al. 1997), infecções parasitárias (Videira et al. 2014) e desbalanceamento nutricional das dietas, em especial quanto a concentração e fontes energéticas (Ferri et al. 2011). Assim, o quadro de esteatose observado na população inicial e no grupo controle pode ser consequência de um inadequado manejo alimentar-nutricional da piscicultura onde os peixes foram adquiridos. De fato, esta hipótese é bem plausível, uma vez que Montanhini Neto e Ostrensky (2014) relatam que as rações de tilápias no Brasil sub ou superestimam diversos nutrientes exigidos pela espécie.

A perda da adesão celular do hepatócito observada neste estudo, foram inicialmente descritos a partir de hepatócitos isolados em mamíferos (Falconer e Yeung 1992, Runnegar et al. 1981, Ding et al. 2000) e carpas *C. carpio* (Li et al. 2001), órgão considerado extremamente sensível à toxicidade das microcistinas. Após a ingestão e digestão das cianobactérias no trato gastrointestinal dos peixes, as microcistinas são ativamente transportadas para o fígado pelo polipeptídeo de transporte (OATP) sendo captadas pelos hepatócitos (Fisher et al. 2005). Runnegar e Falconer (1986) demonstraram a deformidade da estrutura do citoesqueleto de cerca de 50 % quando tratados com 30 nM de microcistinas e incubados durante 30 minutos. Em função disso, Falconer e Yeung (1992) sugeriram que a deformação e perda do citoesqueleto do

hepatócito, devem-se à hiperfosforilação de proteínas reguladoras, que atuam no processo de transdução do sinal que mantem a organização do citoesqueleto. Além destes, a estrutura do citoesqueleto é formada por três componentes tais como microfilamentos, microtubulos e os microfilamentos de actina, porém vários autores têm demonstrado perturbações ou modificações nesses componentes (Chen et al. 2012, Hooser et al. 1991, Taviola et al. 1997).

A partir da desorganização dos hepatócitos, haverá perda e congestão dos sinusóides, acompanhado de hemorragia, como observado em estudos prévios com carpa comum (Ferreira et al. 2010) e bagre do canal (Zimba et al. 2001) e com tilápia do Nilo no presente estudo. Assim, mortalidades em bagre do canal (Zimba et al. 2001) e a redução do crescimento em carpa comum (Li et al. 2004) foram creditadas ao mal funcionamento do fígado promovido por esta perda da coesão celular. No presente estudo, estes distúrbios circulatórios foram observados com maior intensidade a partir do 14º dia experimental, embora não se possa fazer correlação direta com as mortalidades registradas, pois não se registrou diferença ($p > 0,05$) em relação ao controle, o que reforça a elevada resistência da tilápia do Nilo à exposição as microcistinas.

O dano à estrutura do hepatócito pode induzir à necrose hepática (Falconer e Yeung, 1992), como observado em trutas arco-íris *Oncorhynchus mykiss* após 72 horas da aplicação de 5,700 $\mu\text{g MC-LR kg}^{-1}$ (Fisher et al. 2000). As MCs inibem as enzimas serina/treonina fosfatases que atuam em vários eventos biológicos a nível celular na organização do citoesqueleto e no metabolismo do glicogênio (Barford et al. 1998). No presente estudo, observou-se diminuição no teor de glicogênio hepático nos peixes alimentados com a dieta CIAN, mantendo-se o mesmo nível até o final do experimento; mesma redução no glicogênio hepático foi observada nos peixes do tratamento CIAN+LC-2 ao final do experimento. Reduções no teor de glicogênio hepático também foram registrados no hepatopâncreas do caranguejo estuarino *Chasmagnathus granulatus* em função da exposição a microcistinas (Pinho et al. 2005). Os autores sugeriram que a redução do glicogênio hepático é consequência da inibição das proteínas serina/treonina fosfatases.

Ao final do experimento, a vacuolização e desorganização total do hepatopâncreas das tilápias ficaram bem evidentes. Molina et al. (2005) registraram

vacuolização e aparecimento de células necróticas no hepatopâncreas de tilápias após 21 dias de exposição a 1,2 $\mu\text{g MC-LR g}^{-1}$ /peixe/dia. O mesmo tipo de lesão foi observado em *C. granulatus* (Pinho et al. 2003) e na carpa comum (Carbis et al. 1996) após 7 dias de exposição a MC-LR, respectivamente, a 17,6 ng MC-LR mL por imersão e 0,25 $\mu\text{g MC-LR g}^{-1}$ via oral. Carbis et al. (1996) sugeriram que a modificação ou alteração do hepatopâncreas deve-se à eliminação hepática pré-sistêmica, um sistema que atua e controla os níveis de toxinas no fígado que passam através da veia porta (Estreller 2008). Geralmente quando é obstruído por distúrbios circulatórios como observados neste estudo, gera um desequilíbrio ao sistema pré-sistêmico. Molina et al. (2005) descreveram em função ao distúrbio produzido no parênquima hepático, como um desequilíbrio na síntese de substâncias do próprio tecido, que pode estar extremamente relacionado com a obstrução do sistema hepático pré-sistêmico.

Ao final dos 28 dias de experimentação, foi possível observar nos peixes alimentados com CIAN, associados ou não a LC, a ocorrência de um infiltrado inflamatório, que se estendia do hepatopâncreas para a cápsula do fígado. Esta observação corrobora registros similares com mamíferos (Elleman et al. 1978) e com o ciprinídeo “splittail” *Pogonichthys macrolepidotus* (Acuña et al. 2012), que possivelmente, é resultado de uma lesão hepática degenerativa a partir de uma exposição prolongada a microcistinas (Agius e Roberts 2003, Abdel-Moneim et al. 2012).

A megalocitose, no entanto, sugere-se seja produzido a partir de doses sub-letais ou um efeito cumulativo de doses repetidas de substâncias tóxicas (Taper e Bannasch 1979, Prakash et al. 1999) além disso, sabe-se também que surge a partir da inibição da síntese de DNA, o que induz a síntese repetida das proteínas associadas à inibição da mitose, relacionado ao efeito causado por agentes tóxicos (Mukhopadhyay et al. 2006; Taper e Bannasch 1979). Essa mudança patológica, no entanto, pode ser também interpretada como uma alteração reversível, mediante a interação dos efeitos degenerativos e regenerativos ocorrido no parênquima hepático (Taper e Bannasch 1979). A ocorrência de megalocitose foi observada também na carpa comum (Carbis et al. 1996) após sete dias recebendo doses contínuas de microcistinas (250 $\mu\text{g MC-LR g}^{-1}$).

A maior parte dos estudos com L-carnitina em peixes têm focado seus efeitos sobre o desempenho zootécnico das espécies (Diaz et al. 2001, Ma et al. 2008).

Entretanto, os estudos com este foco falharam até o presente momento em determinar uma dose efetiva de suplementação, mesmo em trabalhos. Por exemplo, no caso das tilápias híbridas, a suplementação de 150 mg kg⁻¹ proporcionou aumento significativo sobre o ganho dos peixes, entretanto o mesmo não foi observado quando a concentração de L-carnitina foi elevada para 300 mg kg⁻¹ (Becker et al. 1999). Juvenis de tilápia mossambica quando suplementados com 150, 300, 500, 700 e 900 mg kg⁻¹ de L-carnitina, somente apresentarem incremento significativo no ganho de peso na maior dosagem testada (Jayaprakas et al. 1996). De fato, nos estudos sobre L-carnitina em peixes tem sido utilizado até 3000 mg kg⁻¹ (Dias et al. 2001), de modo que a relação custo benefício foi questionada em concentrações tão elevadas, em função do alto custo deste suplemento (Harpaz 2005). Portanto, não existe um nível base que determine o melhor desempenho de crescimento em peixes, e consequência também há carência de informações quanto as doses efetivas mínimas para atuar como proteção contra xenobióticos e outros compostos tóxicos.

Discreta proteção hepática foi observada nos tratamentos com suplementação de LC, sendo em alguns aspectos semelhantes aos observados nos peixes do tratamento CIAN. Em contraste, estudos prévios com a vitamina E (Prieto et al. 2009), Selênio (Atencio et al. 2009) confirmaram efeitos contra a degeneração hepática, quando estes antioxidantes foram previamente fornecidos ao desafio com microcistinas. Recentemente, Guzmán-Guillén et al (2015) registraram efeito hepatoprotetor quando, ao final de 21 dias de suplementação de LC dietética (400 e 800 mg kg⁻¹), juvenis de tilápias ingeriram única dose de 400 µg kg⁻¹ de cilindrospermopsina (CYN), neurotoxina produzida pela cianobactéria *Aphanizomenon ovalisporum*. É importante ressaltar que o estudo prévio com resultados efetivos da LC como agente protetor contra cianotoxina difere do presente estudo significativamente quanto ao tempo de ingestão, o tipo de espécies de cianobactérias e as concentrações de cianotoxinas previamente usadas, pois entre a CYN e MCs tem diferentes mecanismos de ação a nível celular, a CYN inibe a síntese proteica e a MCs ocasionam distúrbios no parênquima hepático (Terão et al. 1999, Runnegar e Falconer 1986), isto seja a possível causa dessas diferenças nos presentes resultados. A exposição contínua a cianobactérias é o que, em geral, ocorre na natureza perante qualquer tipo de organismo (Smith e Haney 2006, Bittencourt-Oliveira et al. 2014). Entretanto, é difícil prever a ocorrência destas florações, bem como seu tempo de duração, principalmente em sistemas de cultivo

(Turket et al. 2003), por isso a importância de encontrar novas alternativas para tais situações.

Além destas diferenças, a concentração de MCs produzido pela *M. aeruginosa* NPJL4 foi extremamente elevada ($7.280 \mu\text{g g}^{-1}$), superior aos valores registrados por Molina et al. (2005), Acuña et al. (2012) e Zhang et al. (1991) em ambientes naturais. Molina et al. (2005) descreveram lesões hepáticas relativamente modestas em tilápias, embora a quantidade de MCs ingerida por grama de peixe ($1,2 \mu\text{g MC-LR g}^{-1}$) tenha sido a base para execução do presente estudo, onde se observou lesões mais prematuras e mais acentuadas que os descritos por aqueles autores. Entretanto, é comum observar essas diferenças e alguns autores têm associado a um único fator seja, entre as variantes de MCs existem cepas ou/e espécies que mostram ser mais letais, mesmo sendo classificadas dentro do mesmo padrão de microcistinas (Dong et al. 2012). Prieto et al (2006) compararam os efeitos de toxicidade em tilápias quando foram desafiados num mesmo intervalo de sete dias e uma doses de $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ com MC-LR e MC-RR, sendo, portanto, mais letal a MC-LR quando os níveis dos antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOB) significativamente foram mais elevadas a concentrações. Não obstante, nos resultados prévios de Acuña et al. (2012) a quantidade de toxina descrita nesse estudo foi relativamente elevada, mas em comparação ao usado neste estudo, foram aproximadamente 90 % menos, quando comparados à quantidade de microcistinas/grama gerado de matéria seca.

Possivelmente, a discrepância nos resultados quanto a efetividade da LC como agente protetor no presente estudo deve-se dois fatores fundamentais: (i) a elevada concentração de microcistinas inserida na ração e (ii) as concentrações de LC previamente estabelecidas. É possível que este segundo fator seja o mais significativo, visto que, por momentos foi descrito uma leve diminuição nas lesões hepáticas da tilápia. Assim, sugere-se que níveis mais elevados de suplementação de LC possam ser mais efetivos na proteção contra os efeitos tóxicos decorrentes de florações de cianobactérias. Portanto, sugerimos para futuras pesquisas aprofundar um pouco mais nesta questão, uma vez que especulações indicam que cada vez vai aumentar a eutrofização dos ambientes naturais, consequentemente, haverá um aumento de florações de cianobactérias.

Referencias bibliográficas

- ABDEL-MONEIM AM. AL-KAHTANI MA AND ELMENSHAWY OM. 2012. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. *Chemosphere* 88: 1028–1035.
- ACUÑA S. DENG DF. LEHMAN P AND THE S. 2012. Sublethal dietary effects of *Microcystis* on Sacramento splittail, *Pogonichthys macrolepidotus*. *Aquat Toxicol* 110 (111): 1– 8.
- AGIUS C AND ROBERTS RJ. 2003. Review Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J Fish Dis* 26: 499–509.
- ATENCIO L. MORENO I. JOS A. PRIETO AI. MOYANO R. BLANCO A AND CAMEÁN AM. 2009. Effects of dietary selenium on the oxidative stress and pathological changes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a microcystin-producing cyanobacterial water bloom. *Toxicon* 53:269–282.
- BARFORD D. DAS AK AND EGLOFF M-P. 1998. The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struc* 27:133–64.
- BECKER K. SCHREIBER S. ANGONI C AND BLUM R. 1999. Growth performance and feed utilization response of *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* hybrids to L-carnitine measured over a full fattening cycle under commercial conditions. *Aquaculture* 174: 313-322.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA MC. PICCIN-SANTOS V. MOURA AN. ARAGÃO-TAVARES NKC AND CORDEIRO-ARAÚJO MKC. 2014. Cyanobacteria, microcystins and cylindrospermopsin in public drinking supply reservoirs of Brazil. *An Aca Bras Cien* 86 (1): 297-309.
- BORGES PAF. TRAIN S. DIAS JD AND BONECKER CC. 2010. Effects of fish farming on plankton structure in a Brazilian tropical reservoir. *Hydrobiologia*. 649: 279-291.
- BOTHA N. VAN DE VENTER M. DOWNING TG. SHEPHARD EG AND GEHRINGER MM. 2004. The effect of intraperitoneally administered microcystin-LR on the gastrointestinal tract of Balb/c mice. *Toxicon* 43: 251–254.
- BURY NR. EDDY FB AND CODD GA. 1995. The effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR, and ammonia on growth rate and ionic regulation of brown trout. *J Fish Bio* 46: 1042–1054.

- CARBIS CR. RAWLIN GT. MITCHELL GF. ANDERSON JW AND MCCAULEY I. 1996. The histopathology of carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to microcystins by gavage, immersion, and intraperitoneal administration. J Fish Dis 9:199–207.
- CYRINO JEP. BICUDO AJA. SADO RY. BORGHESI R AND DAIRIKI JK. 2010. A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. Rev Brasil Zootec 39: 68-87.
- DE BOCK MFS. 2014. Efeitos da exposição de tilápias (*Oreochromis niloticus*) a saxitoxinas produzidas por *Cylindrospermopsis raciborskii* (CYANOBACTERIA). Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ecologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. 68 p.
- DIAZ J. ARZEL J. CORRAZE G AND KAUSHIK J. 2001. Effects of dietary L-carnitine supplementation on growth and lipid metabolism in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture Res 32: 206-215.
- DING W-X. SHEN H-M AND ONG C-N. 2000. Microcystic cyanobacteria extract induces cytoskeletal disruption and intracellular glutathione alteration in hepatocytes. Environ Health Perspect 108:605-609.
- DONG G. XIE S. ZHU X. HAN D. YANG Y. SONG L. GAN L AND CHEN W. 2012. Responses of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco* Richardson) exposed to dietary cyanobacteria and subsequent recovery. Toxicon 60: 1298-1306.
- DONG GF. ZHU XM. HAN D. YANG YX. SONG LR AND XIE SQ. 2009. Effects of dietary cyanobacteria of two different sources on growth and recovery of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*). Toxicon 54: 208-216.
- ESTELLER A. 2008. Physiology of bile secretion. World J Gastroenterol 7; 14 (37) : 5641-5649.
- ELLEMAN TC. FALCONER IR. JACKSON ARB AND RUNNEGAR MT. 1978. Isolation, characterization and pathology of the toxin from a *Microcystis aeruginosa* (= *Anacystis cyanea*) bloom. Aust J Biol Sci 31: 209-218.
- FASTNER J. FLIEGER I AND NEUMANN U. 1998. Optimised extraction of microcystins from field samples- a comparison of different solvents and procedures. Water Res 10: 3177-3181.
- FALCONER IR AND YEUNG DS. 1992. Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by *Microcystis* toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins. Chem Biol Interactions 81: 181–196.
- FERREIRA MFN. OLIVEIRA VM. OLIVEIRA R. CUNHA PV. GRISOLIA CK AND JÚNIOR ORP. 2010. Histopathological effects of [D-Leu¹] Microcystin-LR variants on

liver, skeletal muscle and intestinal tract of *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844). *Toxicon* 55: 1255–1262.

FERRÃO-FILHO AS. 2009. Bioacumulação de cianotoxinas e seus efeitos em organismos aquáticos. *Oecol Bras* 13 (2): 272-312.

FERRI J, POPOVIĆ NT, COZ-RAKOVAC R, BEER-LJUBIĆ B, STRUNJAK-PEROVIĆ I, ŠKELJO F, JADAN M, PETRIĆ M, BARIŠIĆ J, ŠIMPRAGA M AND STANIĆ R. 2011. The effect of artificial feed on blood biochemistry profile and liver histology of wild saddled bream, *Oblada melanura* (Sparidae). *Marine Environm Res* 71: 218-224.

FISCHER WJ. HITZFELD BC. TENCALLA F. ERIKSSON JE. MIKHAILOV A AND DIETRICH DR. 2000. Microcystin- LR toxicodynamics induced pathology and immunohistochemical localization in livers of bluegreen algae exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol Sci* 54:365–373.

FISCHER WJ. ALTHEIMER S. CATTORI V. MEIER PJ. DIETRICH DR AND HAGENBUCH B. 2005. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol Appl Pharma* 203: 257– 263.

Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. 2014. State of World Fisheries and Aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome, Italy.

FOURNIE JW AND COURTNEY LA. 2002. Histopathological evidence of regeneration following hepatotoxic effects of the cyanotoxin microcystin-LR in the hardhead catfish and gulf killifish. *J Aquat Anim Health* 14, 273–280.

FURUYA WM. PEZZATO LE. BARROS MM. BOSCOLO WR. CYRINO JEP. FURUYA VRB AND FEIDEN A. 2010. Tabelas Brasileiras para a Nutrição de Tilápias. Toledo: GFM.

GORHAM PR. MCLACHLAN J. HAMMER UT AND KIM WK. 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae*. *Bréb Ver Int Verein Theor Angew Limnol* 15:796–804.

GÜLÇİN I. 2006. Antioxidant and antiradical activities of l-carnitine. *Life Sci* 78: 803–811.

GUZMÁN-GUILLÉN R. ORTEGA AIP. MOYANO R. ALFONSO BLANCO A. VASCONCELOS V AND CAMÉAN AM. 2015. Dietary L-Carnitine prevents histopathological changes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to cylindrospermopsin. *Environ Toxicol* 00: 000–000.

HARPAZ S. BECKER K AND BLUM R. 1999. The effect of dietary L-carnitine supplementation on cold tolerance and growth of ornamental cichlid fish (*Pelvicachromis pulcher*)—preliminary results. *J Ther Biol* 24: 57–62.

HARPAZ S. 2005. L-carnitine and its attributed functions in fish culture and nutrition - a review. *Aquaculture* 249: 3-21.

HOOSER SB. BEASLEY VR. WAITE LL. KUHLENSCHMIDT MS. CARMICHAEL WW AND ASCHEK WMH. 1991. Actin filament alterations in rat hepatocytes induced in vivo and in vitro by microcystin-LR, a hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Vet Pathol* 28: 259-266.

JAYAPRAKAS V. SAMBHU C AND SUNIL KUMAR S. 1996. Effect of dietary L-carnitine on growth and reproductive performance of male *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Fish Technol* 33: 84-90.

LAWTON L. EDWARDS C AND CODD GA. 1994. Extraction and high performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst* 119: 1525–1530.

LI X-Y, LIU Y-D AND SONG L-R. 2001. Cytological alterations in isolated hepatocytes from common Carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to microcystin-LR. *Environ Toxicol* 16: 517–522.

LI XY. CHUNG IK. KIM JI AND LEE J. 2004. Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicon* 44: 821–827.

MA JJ. XU ZR.Q. SHAO JJ. XU Z. HUNG SSO. HU WL AND ZHOU LY. 2008. Effect of dietary supplemental L-Carnitine on growth performance, body composition and antioxidant status in juvenile black sea bream, *Sparus macrocephalus*. *Aquaculture Nutrition* 14: 464–471.

MAGALHÃES VF. SOARES MR AND AZEVEDO SMFO. 2001. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon* 39:1077-1085.

MITSOURA A. KAGALOU I. PAPAIOANNOU N. BERILLIS P. MENTE E AND PAPADIMITRIOU T. 2013. The presence of microcystins in fish *Cyprinus carpio* tissues: a histopathological study. *Intern Aquat Res* 5 (8): 1-16.

MOHAMED ZA. CARMICHAEL WW AND HUSSEIN AA. 2003. Estimation of microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom. *Environm Toxicol* 18:137–141.

MOLINA R. MORENO I. PICHARDO S. JOS A. MOYANO R. MONTERDE JG AND CAMEÁN A. 2005. Acid and alkaline phosphatase activities and pathological changes induced in Tilapia fish (*Oreochromis* sp.) exposed subchronically to microcystins from toxic cyanobacterial blooms under laboratory conditions. *Toxicon* 46: 725–735.

MOREIRA DA. 2012. Mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade da microcistina-LA em tilápia (*Oreochromis niloticus*). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 53p.

MONTANHINI NETO R AND OSTRENSKY A. 2014. Evaluation of commercial feeds intended for the Brazilian production of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): nutritional and environmental implications. *Aquaculture Nutrition* 21 (3): 311-320.

MUKHOPADHYAY S, SHAHA M, PATEL K, SEHGAL PB. 2006. Monocrotaline pyrrole-induced megalocytosis of lung and breast epithelial cells: Disruption of plasma membrane and Golgi dynamics and an enhanced unfolded protein response. *Toxicol Appl Pharma* 211: 209 – 220.

National Research Council - NRC. 2011. Nutrients Requirements of Fish and Shrimp. Washington: National Academy Press, 376 p.

PAPADIMITRIOU T. KAGALOU I. BACOPOULOS V AND LEONARDOS ID. 2010. Accumulation of microcystins in water and fish tissues: An estimation of risks associated with microcystins in most of the Greek lakes. *Environ Toxicol* 25: 418–427.

PINHO GLL, DE ROSA CM, YUNES JS, LUQUET CM, BIANCHINI A, MONSERRAT JM, 2003. Toxic effects of microcystins in the hepatopâncreas of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comp Biochem Physiol* 135, 459–468.

PINHO GLL, ROSA CM, MACIEL FE, BIANCHINI A, YUNES JS, PROENÇA LAO AND MONSERRAT JM. 2005. Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. *Ecotoxic Environ Safety* 61: 353-360.

PRAKASH AS. PEREIRA TN. REILLY PEB AND SEAWRIGHT AA. 1999. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mutat Res* 443:53–67.

PRIETO AI. JOS A. PICHARDO P. MORENO I. SOTOMAYOR MA. MOYANO R. BLANCO A AND CAMEÁN AM. 2009. Time-dependent protective efficacy of Trolox (Vitamin E Analog) against microcystin-induced toxicity in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ Toxicol* 54: 563–579.

RÅBERGH CMI. BYLUND G AND J. E. ERIKSSON. 1991. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (bluegreen alga)

Microcystis aeruginosa, on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquat Toxicol* 20: 131–146.

RUNNEGAR MTC AND FALCONER IR. 1986. Effect of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. *Toxicon* 24 (2): 109- 115.

RUNNEGAR MT, FALCONER IR AND SILVER J. 1981. Deformation of isolated rat hepatocytes by a peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Naunyn-Schm Arch Pharmacol* 317:258–272.

SAKOMURA NK AND ROSTAGNO HS. 2007. Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos. Jaboticabal: Funep, 283p.

SCHREIBER S. BECKER K. BRESLER V AND FISHELSON L. 1997. Dietary L-carnitine protects the gills and skin of guppies (*Poecilia reticulata*) against anionic xenobiotics. *Comp Biochem Physiol* 117 (1): 99-102.

SCHLECHTRIEM C. BRESLER V. FISHELSON L. ROSENFELD M AND BECKER K. 2004. Protective effects of dietary L-carnitine on tilapia hybrids (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) reared under intensive pond-culture conditions. *Aquaculture Nutrition* 10: 55-63.

SEVRIN-REYSSAC J AND PLETIKOSIC M. 1990. Cyanobacteria in fish ponds. *Aquaculture*, Amsterdam 88: 1-20.

SOARES RM. MAGALHÃES VF AND AZEVEDO SMFO. 2004. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquat Toxicol* 70: 1–10.

SMITH JL AND HANEY JF. 2006. Food web transfer, accumulation, and depuration of microcystins, a cyanobacterial toxin, in pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*). *Toxicon* 48: 580–589.

TAPER HS AND BANNASCH P. 1978. Histochemical differences between So-Called megalocytosis and neoplastic preneoplastic Liver lesions Induced by N-Nitrosomorpholine. *Europ J Cancer* 15: 189 196.

TEH SJ, ADAMS SM AND HINTON DE. 1997. Histopathological biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquat Toxicol* 37: 51-70.

TENCALLA FG. DIETRICH DR AND SCHLATTER C. 1994. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 30 (3): 215–224.

TOIVOLA DM. GOLDMAN RD. GARROD DR AND ERIKSSON JE. 1997. Protein phosphatases maintain the organization and structural interactions of hepatic keratin intermediate filaments. *J Cell Sci* 110: 23–33.

TREMBLAY GC AND BRADLEY TM. 1992. L-carnitine protects fish against acute ammonia toxicity. *Comp Biochem Physiol* 101: 349-351.

TURKER H. EVERSOLE AG AND BRUNE DE. 2003. Filtration of green algae and cyanobacteria by Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in the Partitioned Aquaculture System. *Aquaculture* 215: 93–101.

VAN APELDOORN ME. VAN EGMOND HP. SPEIJERS GJA AND BAKKER GJI. 2007. Toxins of cyanobacteria. *Mol Nut Food Res* 51:7-60.

VASCONCELOS JF. BARBOSA JEL. LIRA W AND AZEVEDO SMFO. 2013. Microcystin bioaccumulation can cause potential mutagenic effects in farm fish. *Egyp J Aquat Res* 39: 185–192.

VIDEIRA M. VELASCO M. MATOS P. DE SÃO CLEMENTE SC. SANCHES O. SANTOS P AND MATOS E. 2014. Hepatic steatosis associated with microsporidiosis in teleost fishes from Marajó Island, Brazil. *An Aca Bras Cien* 86 3: 1347-1350.

XIE L. XIE P AND OZAWA K. 2004. Dynamics of microcystins-LR and -RR in the hytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment. *Environ Pollut* 127 (3): 431-9.

ZHAO M. XIE S. ZHU X. YANG Y. GAN L AND SONG L. 2006a. Effect of inclusion of blue-green algae meal on growth and accumulation of microcystins in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *J Appl Ichthyol* 22: 72–78.

ZHAO M. XIE SQ. ZHU XM. YANG YX. GAN NQ AND SONG LR. 2006b. Effect of dietary cyanobacteria on growth and accumulation of microcystins in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 261: 960–966.

ZHANG QX. CARMICHAEL WW. YU MJ AND LI SH. 1991. Cyclic peptide hepatotoxins from fresh-water cyanobacterial (bluegreen- algae) water blooms collected in central China. *Environ Toxicol Chem* 10: 313–321.

ZHANG X. XIE P. LI D. TANG R. LEI H AND ZHAO Y. 2009. Time-dependent oxidative stress responses of crucian carp (*Carassius auratus*) to intraperitoneal injection of extracted microcystins. *Bull Environ Contam Toxicol* 82:574–578.

ZIMBA PV. KHOO L. GAUNT PS. BRITTAIN S AND CARMICHAEL WW. 2001. Confirmation of catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), mortality from *Microcystis* toxins. *J Fish Dis* 24: 41-47.

Tabela 1 - Formulação e composição química das dietas experimentais.

Ingredientes (g kg ⁻¹)	Dietas experimentais			
	CONT	CIAN	CIAN+LC-1	CIAN+LC-2
Farelo de soja	677,4	674,1	674,1	674,1
Farinha de peixe	30,0	30,0	30,0	30,0
Milho	151,0	151,0	151,0	151,0
Óleo de soja	75,0	75,0	75,0	75,0
<i>M. aeruginosa</i> liofilizada	0,0	3,3	3,3	3,3
Premix vitaminas e minerais ¹	10,0	10,0	10,0	10,0
Carboximetilcelulose	30,0	30,0	30,0	30,0
Celulose microfina	10,0	10,0	8,0	6,0
Carnitina ²	0,0	0,0	2,0	4,0
Fosfato bicalcico	8,4	8,4	8,4	8,4
Sal comum	5,0	5,0	5,0	5,0
DL-Metionina	3,0	3,0	3,0	3,0
B H T	0,2	0,2	0,2	0,2
<i>Composição química</i>				
Matéria seca (g kg ⁻¹)	90,82	93,20	92,20	92,53
Matéria mineral (g kg ⁻¹)	7,31	7,16	7,26	7,43
Fibra bruta (g kg ⁻¹)	4,85	4,85	4,85	4,85
Proteína bruta (g kg ⁻¹)	34,08	36,27	35,79	34,96
Extrato etéreo (g kg ⁻¹)				
Energia digestível (MJ kg ⁻¹) ³	3400	3400	3400	3400

¹Níveis de garantia (kg-1 produto): vit. A, 1.000.000 UI; vit. D3, 312.500 UI; vit. E, 18.750 UI; vit. K3, 1.250 mg; vit. B, 2.500 mg; vit. B2, 2.500 mg; vit. B6, 1.875 mg; vit. B12, 4 mg; Vitamina C, 31.250 mg; Ác. Nicotínico, 12.500 mg; Pantotenato de cálcio, 6.250 mg; Biotina, 125 mg; Ác. Fólico, 750 mg; Colina, 50.000 mg; Inositol, 12.500 mg; Sulfato de ferro, 6.250 mg; Sulfato de cobre, 625 mg; Sulfato de zinco, 6.250 mg; Sulfato de manganês, 1875 mg; Selenito de sódio, 13 mg; Iodato de cálcio, 63 mg; Sulfato de cobalto, 13 mg.

²DL-carnitina (50% D-carnitina; 50% L-carnitina) – Sigma Aldrich® (C9 500)

³Calculada a partir das exigências nutricionais da Tilapia NRC, (2011) e coeficiente de digestibilidade aparente da energia e proteína (Furuya et al., 2010).

Tab. 2 – Índices zootécnicos de juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados com dietas contendo células liofilizadas de *M. aeruginosa* (CIAN); dietas com células liofilizadas de *M. aeruginosa* associadas a 1 g L-carnitina kg⁻¹ (CIAN + LC-1) ou 2 g L-carnitina kg⁻¹ (CIAN + LC-2) ou dietas sem *M. aeruginosa* e L-carnitina (CONT). As barras de erro correspondem ao desvio padrão da média.

Variáveis	Dietas experimentais				Valor de P
	CIAN	CIAN+LC-1	CIAN+LC-2	CONT	
Peso médio inicial (g peixe ⁻¹)	4,8±0,1	4,8±0,1	4,8±0,1	4,8±0,1	0,958
Peso médio final (g peixe ⁻¹)	14,5±1,8	12,6±1,0	14,2±2,7	11,3±0,6	0,314
Ganho de peso relativo (%)	198,9±32,9	161,6±17,9	194,8±51,7	135,2±18,9	0,281
Taxa de crescimento específico (%peso vivo dia ⁻¹)	3,9±0,4	3,4±0,2	3,8±0,6	3,1±0,3	0,255
Taxa de eficiência alimentar	2,1±0,3	1,5±0,1	1,8±0,7	1,5±0,2	0,463

Tabela 3. Lesões histopatológicas de fígado de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas oralmente a 1,2 µg de microcistinas por grama de peixe durante 28 dias.

Lesões	Tratamento	Dias de exposição				
		3	7	14	21	28
Esteatose	CIAN	+++	+++	+++	++	+
	CIAN+LC-1	+++	+++	++	++	+
	CIAN+LC-2	+++	+++	+++	+	+
	CONT	+++	+++	+++	+	+
Glicogênio	CIAN	+++	+++	+++	++	+
	CIAN+LC-1	+++	+++	+++	+++	+++
	CIAN+LC-2	+++	+++	+++	++	+
	CONT	+++	+++	+++	+++	+++
Vacuolização de células pancreáticas	CIAN	+	+	++	-	-
	CIAN+LC-1	+	-	+	-	-
	CIAN+LC-2	+	+	+	-	-
	CONT	-	-	-	-	-
Congestão de sinusóides	CIAN	++	++	+++	+++	+++
	CIAN+LC-1	+	++	++	+++	+++
	CIAN+LC-2	++	++	+++	+++	+++
	CONT	-	-	-	-	-
Volume de hepatócitos	CIAN	-	-	-	+	++
	CIAN+LC-1	-	-	-	-	+
	CIAN+LC-2	-	-	-	-	+
	CONT	-	-	-	-	-
Desorganização das células pancreáticas	CIAN	-	-	+	++	+++
	CIAN+LC-1	-	-	-	+	++
	CIAN+LC-2	-	-	+	++	+++
	CONT	-	-	-	-	-
Células inflamatórias	CIAN	-	-	-	+	+++
	CIAN+LC-1	-	-	+	++	++
	CIAN+LC-2	-	-	-	++	+++
	CONT	-	-	-	-	-

NOTA. (-) não achado; (+) Pouco; (++) Moderado; (+++) Acentuado.

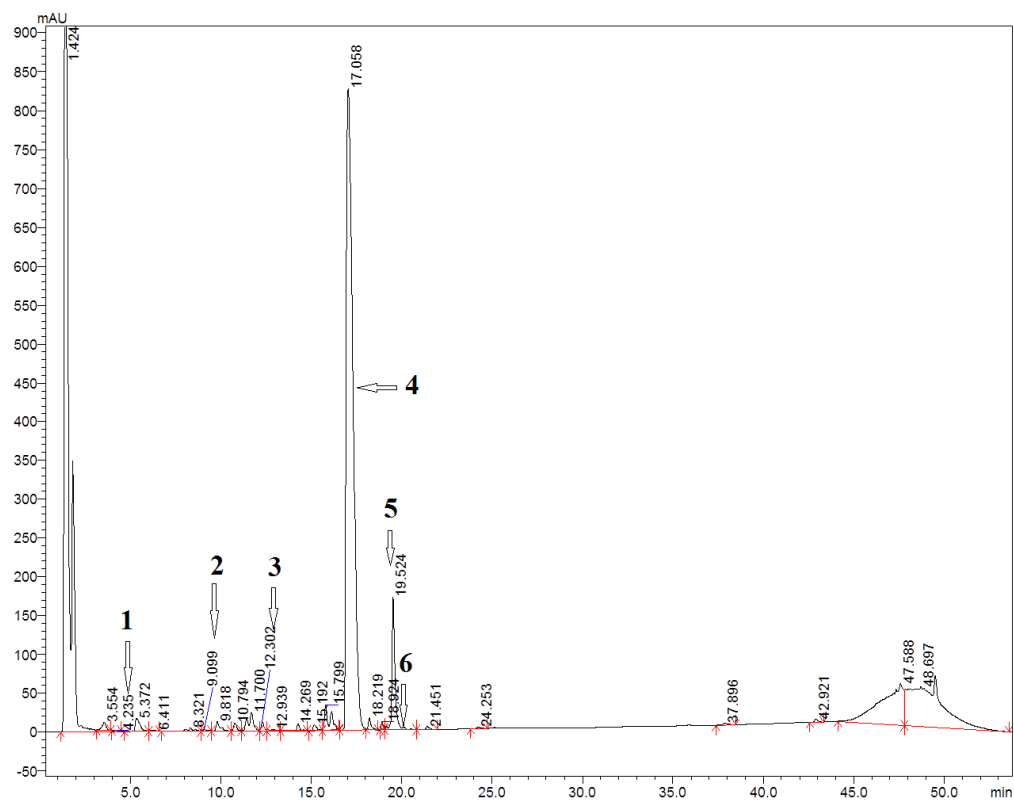


Fig. 1. Cromatograma da *Microcystis aeruginosa* NPLJ-4, mostrando 6 análogos de microcistinas, identificados pelos números 1-6.

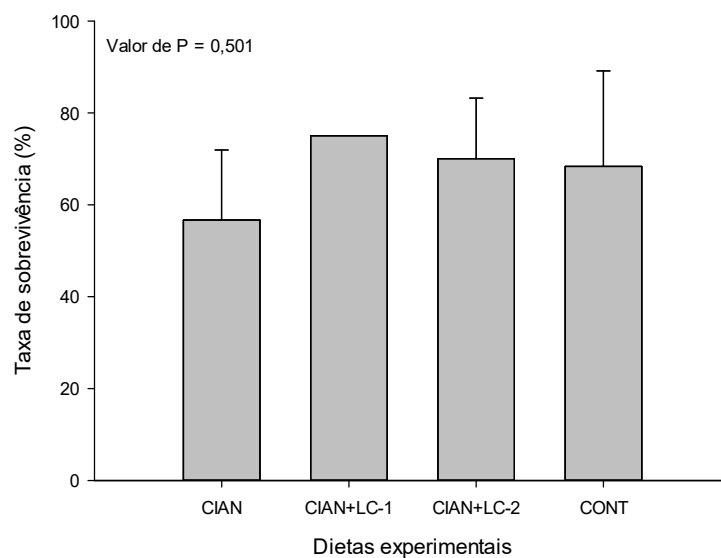


Fig. 2 – Taxa de sobrevivência de juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados com dietas contendo células liofilizadas de *M. aeruginosa* (CIAN); dietas com células liofilizadas de *M. aeruginosa* associadas a 1 g L-carnitina kg^{-1} (CIAN+LC-1) ou 2 g L-carnitina kg^{-1} (CIAN+LC-2) ou dietas sem *M. aeruginosa* e L-carnitina (CONT). As barras de erro correspondem ao desvio padrão da média.

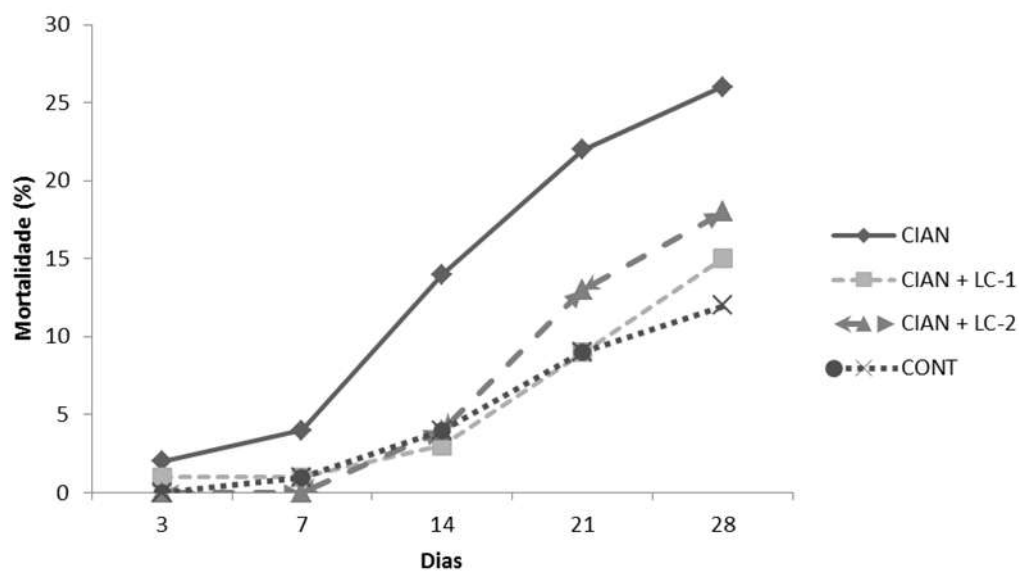


Fig. 3 – Mortalidade acumulada de juvenis de tilápia-do-Nilo ao longo dos 28 dias de experimentação alimentados com dietas contendo células liofilizadas de *M. aeruginosa* (CIAN); dietas com células liofilizadas de *M. aeruginosa* associadas a 1 g L-carnitina kg⁻¹ (CIAN + LC-1) ou 2 g L-carnitina kg⁻¹ (CIAN + LC-2) ou dietas sem *M. aeruginosa* e L-carnitina (CONT). As barras de erro correspondem ao desvio padrão da média.

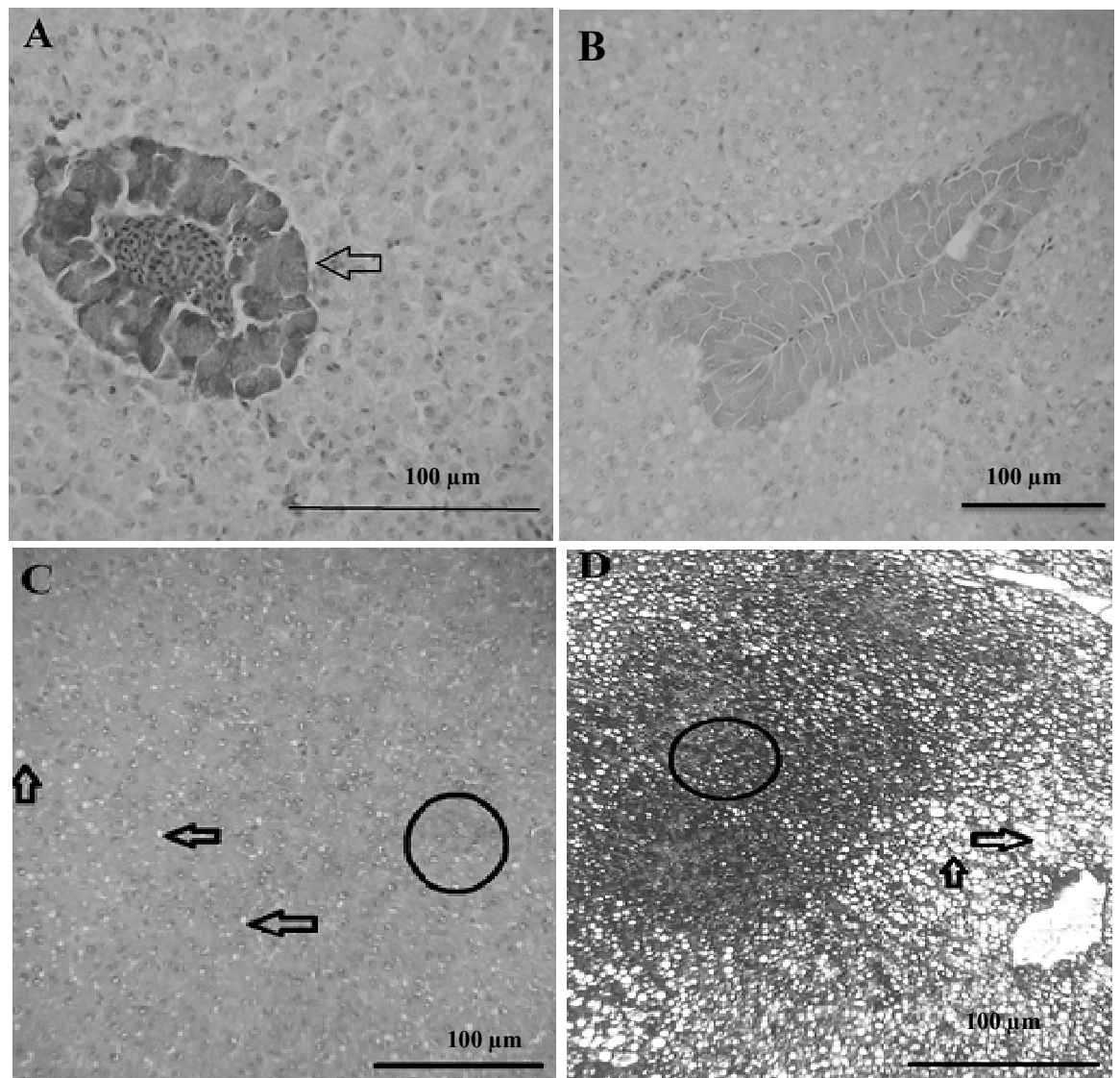


Fig. 4. Histopatologia de fígados de tilápias do Nilo alimentadas com dietas sem *M. aeruginosa* liofilizada e L-carnitina (CONT) (A, B, C) e, com *M. aeruginosa* liofilizada (CIAN) (D) 14 dias de experimentação. HE (A,B) e por PAS (C,D). Bars-100 µm. A) Acino pancreático sem desorganização. B) Corte histológico sem congestão, hemorragia hepática e com esteatose moderado. C) Moderada esteatose (seta) e presença moderada de glicogênio (circulo). D) Grande quantidade de glicogênio (circulo) e esteatose acentuado (seta).

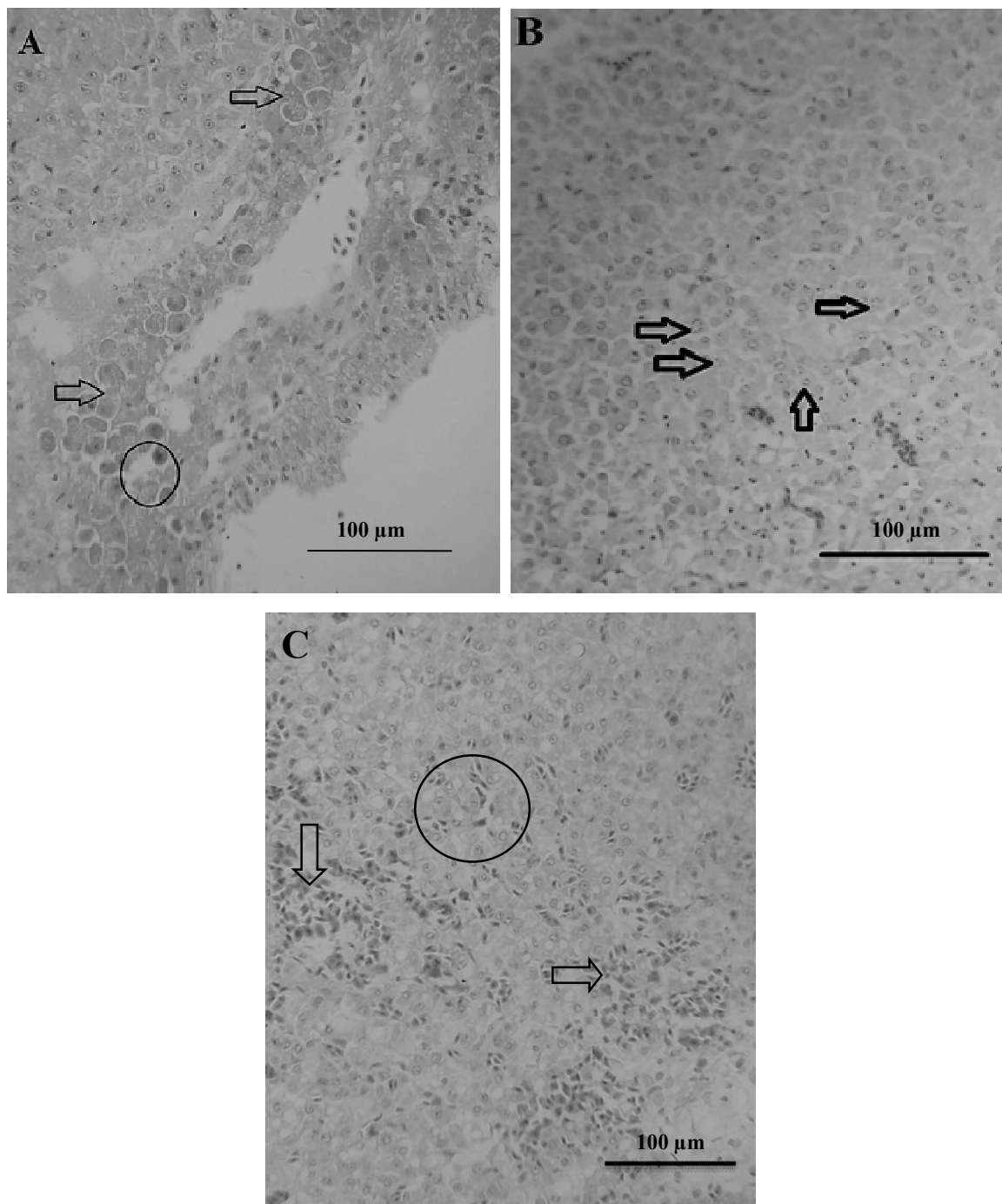


Fig 5. Histopatologia de fígados de tilápias do Nilo alimentados com dietas com *M. aeruginosa* liofilizado (CIAN) em 03 dias de experimentação. HE. Bars-100 µm, respectivamente. A) Leve vacuolização e desorganização de células do hepatopâncreas. B) Desorganização de hepatócitos (setas). C) Hemorragia do parênquima hepático (setas) e congestão de sinusóides (circulo).

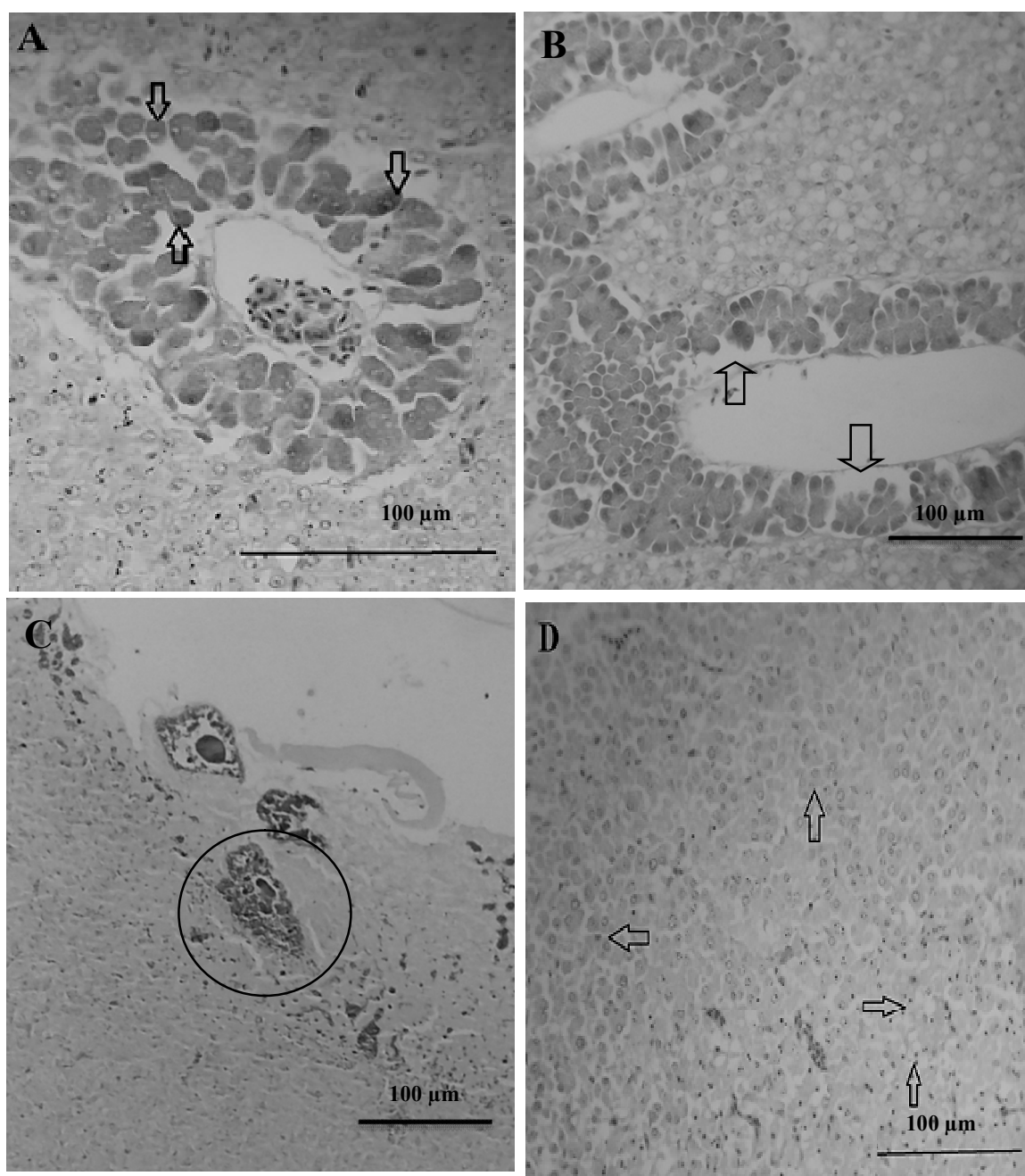


Fig. 6. Histopatologia de fígados de tilápias do Nilo alimentados com dietas com *M. aeruginosa* liofilizado (CIAN) em 7 (A) e 14 dias de experimentação (B,C,D). HE. Bars-100 µm. A) Necrose de células do ácino pancreático e desorganização celular. B) Maior acentuação da lesão pancreática com desaparecimento de algumas células (setas). C) capsula hepática espessada com fibrina e infiltrado inflamatório mononuclear e restos de células necróticas, na fibrina e no interior de vasos. (circulo). D) Necrose individual de hepatócitos desorganizados (setas).

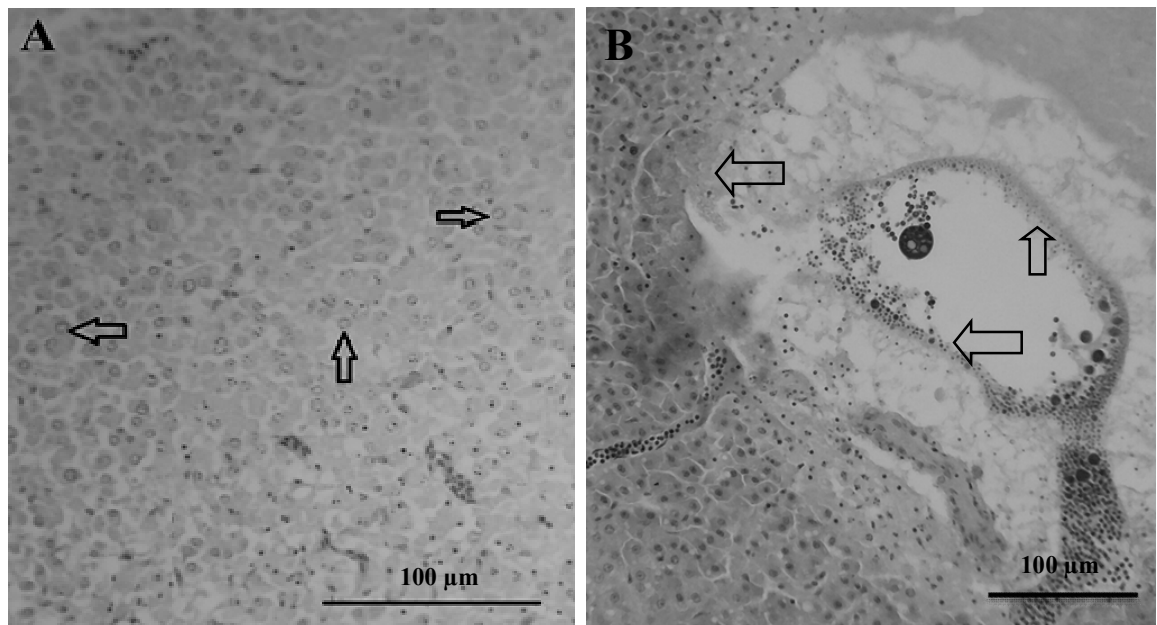


Fig. 7. Histopatologia de fígados de tilápias do Nilo alimentados com dietas com *M. aeruginosa* liofilizado (CIAN) em 21 (A) e 28 dias de experimentação (B). HE. Bars-100 µm. A) Megalocitose de hepatócitos (setas). B) Lesão evoluída do hepatopâncreas com desaparecimento quase total do ácino devido a necrose celular (setas).

Anexos

Instruções aos Autores

A revista ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS encoraja fortemente as submissões online. Uma vez o artigo preparado de acordo com as instruções abaixo, visite o site de submissão online (<http://aabc.abc.org.br/>).

As instruções devem ser lidas cuidadosamente e seguidas integralmente. Desta forma, a avaliação e publicação de seu artigo poderão ser feitas com mais eficiência e rapidez. Os editores reservam-se o direito de devolver artigos que não estejam de acordo com estas instruções. Os artigos devem ser escritos em inglês claro e conciso.

Objetivo e Política Editorial

Todos os artigos submetidos devem conter pesquisa original e ainda não publicada ou submetida para publicação. O primeiro critério para aceitação é a qualidade científica. O uso excessivo de abreviaturas ou jargões deve ser evitado, e os artigos devem ser compreensíveis para uma audiência tão vasta quanto possível. Atenção especial deve ser dada ao Abstract, Introdução e Discussão, que devem nitidamente chamar a atenção para a novidade e importância dos dados relatados. A não observância desta recomendação poderá resultar em demora na publicação ou na recusa do artigo.

Os textos podem ser publicados como uma revisão, um artigo ou como uma breve comunicação. A revista é trimestral, sendo publicada nos meses de março, junho, setembro e dezembro.

Tipos de Artigos

Revisões: Revisões são publicadas somente a convite. Entretanto, uma revisão pode ser submetida na forma de breve carta ao Editor a qualquer tempo. A carta deve informar os tópicos e autores da revisão proposta e declarar a razão do interesse particular do assunto para a área.

Artigos: Sempre que possível, os artigos devem ser subdivididos nas seguintes partes:

1. Página de rosto;
2. Abstract (escrito em página separada, 200 palavras ou menos, sem abreviações);
3. Introdução;
4. Materiais e Métodos;
5. Resultados;
6. Discussão;
7. Agradecimentos quando necessário;
8. Resumo e palavras-chave (em português - os autores estrangeiros receberão assistência);
9. Referências.

Artigos de algumas áreas,

como Ciências Matemáticas, devem observar seu formato usual. Em certos casos pode ser aconselhável omitir a parte (4) e reunir as partes (5) e (6). Onde se aplicar, a parte de Materiais e Métodos deve indicar o Comitê de Ética que avaliou os procedimentos para estudos em humanos ou as normas seguidas para a manutenção e os tratamentos experimentais em animais.

Breves Comunicações: Breves comunicações devem ser enviadas em espaço duplo. Depois da aprovação não serão permitidas alterações no artigo, a fim de que somente correções de erros tipográficos sejam feitas nas provas.

Os autores devem enviar seus artigos somente em versão eletrônica.

Preparo dos Artigos

Os artigos devem ser preparados em espaço duplo. Depois de aceitos nenhuma modificação será realizada, para que nas provas haja somente correção de erros tipográficos.

Tamanho dos artigos: Embora os artigos possam ter o tamanho necessário para a apresentação concisa e discussão dos dados, artigos sucintos e cuidadosamente preparados têm preferência tanto em termos de impacto quando na sua facilidade de leitura.

Tabelas e ilustrações: Somente ilustrações de alta qualidade serão aceitas. Todas as ilustrações serão consideradas como figuras, inclusive desenhos, gráficos, mapas, fotografias e tabelas com mais de 12 colunas ou mais de 24 linhas (máximo de figuras gratuitas: cinco figuras). A localização provável das figuras no artigo deve ser indicada.

Figuras digitalizadas: As figuras devem ser enviadas de acordo com as seguintes especificações: 1. Desenhos e ilustrações devem ser em formato .PS/.EPS ou .CDR (Postscript ou Corel Draw) e nunca inseridas no texto; 2. Imagens ou figuras em meio tom devem ser no formato .TIF e nunca inseridas no texto; 3. Cada figura deve ser enviada em arquivo separado; 4. Em princípio, as figuras devem ser submetidas no tamanho em que devem aparecer na revista, i.e., largura de 8 cm (uma coluna) ou 12,6 cm (duas colunas) e com altura máxima para cada figura menor ou igual a 22 cm. As legendas das figuras devem ser enviadas em espaço duplo e em folha separada. Cada dimensão linear das menores letras e símbolos não deve ser menor que 2 mm depois da redução. Somente figuras em preto e branco serão aceitas. 5. Artigos de Matemática,

Física ou Química podem ser digitados em Tex, AMS-Tex ou Latex; 6. Artigos sem fórmulas matemáticas podem ser enviados em .RTF ou em WORD para Windows.

Página de rosto: A página de rosto deve conter os seguintes itens: 1. Título do artigo (o título deve ser curto, específico e informativo); 2. Nome (s) completo (s) do (s) autor (es); 3. Endereço profissional de cada autor; 4. Palavras-chave (4 a 6 palavras, em ordem alfabética); 5. Título abreviado (até 50 letras); 6. Seção da Academia na qual se enquadra o artigo; 7. Indicação do nome, endereço, números de fax, telefone e endereço eletrônico do autor a quem deve ser endereçada toda correspondência e prova do artigo.

Agradecimentos: Devem ser inseridos no final do texto. Agradecimentos pessoais devem preceder os agradecimentos a instituições ou agências. Notas de rodapé devem ser evitadas; quando necessário, devem ser numeradas. Agradecimentos a auxílios ou bolsas, assim como agradecimentos à colaboração de colegas, bem como menção à origem de um artigo (e.g. teses) devem ser indicados nesta seção.

Abreviaturas: As abreviaturas devem ser definidas em sua primeira ocorrência no texto, exceto no caso de abreviaturas padrão e oficial. Unidades e seus símbolos devem estar de acordo com os aprovados pela ABNT ou pelo Bureau International des Poids et Mesures (SI).

Referências: Os autores são responsáveis pela exatidão das referências. Artigos publicados e aceitos para publicação (no prelo) podem ser incluídos. Comunicações pessoais devem ser autorizadas por escrito pelas pessoas envolvidas. Referências a teses, abstracts de reuniões, simpósios (não publicados em revistas indexadas) e artigos em preparo ou submetidos mas ainda não aceitos, podem ser citados no texto como (Smith et al. unpublished data) e não devem ser incluídos na lista de referências.

As referências devem ser citadas no texto como, por exemplo, (Smith 2004), (Smith and Wesson 2005) ou, para três ou mais autores, (Smith et al. 2006). Dois ou mais artigos do mesmo autor no mesmo ano devem ser distinguidos por letras, e.g. (Smith 2004a), (Smith 2004b) etc. Artigos com três ou mais autores com o mesmo primeiro autor e ano de publicação também devem ser distinguidos por letras.

As referências devem ser listadas em ordem alfabética do primeiro autor sempre na ordem do sobrenome XY no qual X e Y são as iniciais. Se houver mais de 10 autores, use o primeiro seguido de et al. As referências devem ter o nome do artigo. Os nomes das revistas devem ser abreviados. Para as abreviações corretas, consultar a listagem de base de dados na qual a revista é indexada ou consulte a World List of Scientific

Periodicals. A abreviatura para os Anais da Academia Brasileira de Ciências é An Acad Bras Cienc. Os seguintes exemplos são considerados como guia geral para as referências.

Artigos

Albe-Fessard D, Condes-Lara M, Sanderson P and Levante A . 1984a. Tentative explanation of the special role played by the áreas of paleospinothalamic projection in patients with deafferentation pain syndromes. *Adv Pain Res Ther* 6: 167-182.

Albe-Fessard D, Sanderson P, Condes-Lara M, Delandsheer E, Giuffrida R and Cesaro P. 1984b. Utilisation de la depression envahissante de Leão pour l'étude de relations entre structures centrales. *An Acad Bras Cienc* 56: 371-383.

Knowles RG and Moncada S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298: 249-258.

Pinto ID and Sanguinetti YT. 1984. Mesozoic Ostracode Genus *Theriosynoecum* Branson, 1936 and validity of related Genera. *An Acad Bras Cienc* 56: 207-215.

Livros e capítulos de livro

Davies M. 1947. An outline of the development of Science, *Athinker's Library*, n. 120. London: Watts, 214 p.

Prehn RT . 1964. Role of immunity in biology of cancer. In: *National Cancer Conference* , 5., Philadelphia Proceedings, Philadelphia: J.B. Lippincott, p. 97-104.

Uytenbogaardt W and Burke EAJ . 1971. Tables for microscopic identification of minerals, 2 nd ed., Amsterdam: Elsevier, 430 p.

Woody RW . 1974. Studies of theoretical circular dichroism of Polipeptides: contributions of B-turns. In: Blouts ER et al . (Eds), *Peptides, polypeptides and proteins*, New York: J Wiley & Sons, New York, USA, p. 338-350.

Outras publicações

International Kimberlite Conference , 5, 1991. Araxá, Brazil. Proceedings ... Rio de Janeiro: CPRM, 1994., 495 p.

Siatycki J . 1985. Dynamics of Classical Fields. University of Calgary, Department of Mathematics and Statistics, 19985, 55 p. Preprint n. 600.