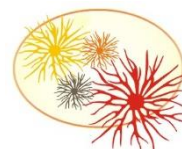




Universidade Federal do Rio Grande – FURG
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas



Efeito do extrato de *Microcystis aeruginosa* na regulação de proto-oncogenes e supressores de tumor em peixe-zebra

Viviane Barneche Fonseca

Dissertação a ser apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Rio Grande – FURG sob orientação do prof. Dr. Juliano Zanette.

Novembro, 2016

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus, pois Nele encontrei a força e a fé necessárias para o ingresso e a conclusão do mestrado.

Aos meus pais, os quais sempre acreditaram no meu potencial e foram e ainda são grandes incentivadores dos meus planos e sonhos. Obrigada por estarem sempre disponíveis e ao meu lado, apoiando e torcendo por cada etapa da minha vida acadêmica.

Ao meu irmão que, mesmo a quilômetros de distância, nunca deixou de se preocupar e de me apoiar, muitas vezes confiando mais em mim do que eu mesma.

Não poderia deixar de agradecer ao meu esposo, que também sempre me incentivou a não desistir dos meus objetivos, aceitou ficar longe para que eu pudesse estudar e desenvolvesse o projeto de dissertação. Obrigada por suportar minhas crises de nervosismo, ansiedade e angústia.

Obrigada à professora Vera Lucia Bobrowski, minha orientadora durante a graduação, a qual se tornou grande amiga e incentivadora, por todo o apoio e estímulo para seguir em frente. Sem palavras para agradecer as inúmeras oportunidades a mim dadas, tanto durante quanto após o término da graduação, tenho certeza que essa parceria jamais irá acabar.

Também gostaria de agradecer a todos os meus amigos e familiares por entenderem a vida de um pós-graduando, muitas vezes indisponível para encontros. Agradeço pela força e confiança sempre depositadas em mim. Em especial, Katiucia, Anita, Bruno, Shana, Danielli, Renato e grupo Romanos V.

Obrigada a todos os colegas da Sala 1 da Pós-Graduação pelas manhãs e tardes de conversas, comidinhas e chimarrão, aliviando o estresse do dia a dia e tornando o ambiente de trabalho mais agradável. Sendo assim, agradeço às amigadas formadas no FAC, em especial Juliana Fonseca, Amanda Fernandes, Silvana Manske, Juliano Barreto, Débora Luz e Yuri Zebral.

Agradeço aos técnicos, Loraine, Mateus e Josencler, pela ajuda e ensinamentos dispendidos ao longo dos experimentos e análises. Também agradeço à disponibilidade do professor José Monserrat em ensinar e acompanhar uma das análises.

Agradeço também aos colegas do grupo “Biomarcadores Ambientais”, Cíntia e Roger, por terem permitido que eu os acompanhasse em coletas e técnicas laboratoriais em suas retas finais de mestrado, enquanto eu nem havia ingressado no programa ainda. Muito obrigada, Maurício, doutorando do mesmo grupo, pela total ajuda dispendida ao longo desses dois anos de mestrado, tanto no laboratório quanto na parte estatística.

Obrigada a todos os docentes do programa pelas aulas excelentes que permitiram o enriquecimento do conhecimento em Fisiologia. Todos se tornaram grandes exemplos de profissionais e seres humanos para mim.

Fica aqui o agradecimento ao meu orientador, Juliano Zanette (Juca), que mesmo sem me conhecer direito, aceitou me orientar e sempre demonstrou confiança em meu trabalho e minhas ações. Obrigada por toda a ajuda, principalmente na análise dos resultados e escrita desta dissertação.

E por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão das bolsas de estudo.

SUMÁRIO

Resumo Geral	06
Introdução Geral	07
O problema ambiental das cianotoxinas: A produção de microcistinas	07
Ação hepatotóxica das microcistinas: A promoção tumoral e mecanismos de defesa celular	11
O modelo <i>Danio rerio</i>	19
Referências	23
Objetivo	32
Artigo “Effect of <i>Microcystis aeruginosa</i> extract on the regulation of proto-oncogenes and tumor suppressors in zebrafish”	33
Abstract	35
Introduction	36
Material and Methods	38
Results	41
Discussion	42
Conclusions	47
Acknowledgements	47
References	48
Considerações Finais	64
Perspectivas	65
Anexo	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ocorrência de florações de cianobactérias na Laguna dos Patos, Pelotas, RS Brasil	08
Figura 2: Estrutura da MC-LR	10
Figura 3: Diferença na estrutura química entre as variantes MC-LR e [D-Leu ¹] MC-LR	11
Figura 4: Ilustração esquemática do mecanismo de fosforilação e desfosforilação proteica na presença de cianotoxinas	12
Figura 5: Ação inibitória da MC-LR sob a proteína fosfatase PP2A e sua relação com a proliferação celular	15
Figura 6: Ilustração esquemática da via <i>p53</i> frente a diferentes estresses que podem ativá-la a partir de mediadores celulares	19
Figura 7: Peixe-zebra ou paulistinha (<i>Danio rerio</i>)	20

1. RESUMO GERAL

As cianobactérias do gênero *Microcystis* produzem uma diversidade de cianotoxinas que causam efeitos adversos em animais, sendo a microcistina-LR (MC-LR) uma hepatotoxina muito estudada. Existe uma relação entre a exposição à MC-LR e a promoção tumoral, através da alteração na transcrição de proto-oncogenes que levam a alterações no crescimento e proliferação celular. Peixes foram expostos a 25 e 250 ppm de extrato de *Microcystis aeruginosa*, contendo 3.5 e 54.6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ da variante [D-Leu¹] MC-LR, respectivamente, com a finalidade de avaliar a regulação transcricional dos proto-oncogenes *fosab*, *junba* e *myca* e de genes envolvidos na supressão tumoral, como *baxa*, *gadd45 α* e *p53*. De acordo com a análise da expressão gênica, tanto os proto-oncogenes, quanto os genes supressores de tumor sofreram uma repressão em sua expressão. Essa alteração transcricional foi tempo-dependente, uma vez que *p53* já apresentou repressão em 6h e seus genes alvo, *baxa* e *gadd45 α* foram reprimidos a partir de 24h. Em 96h, também se observou a supressão desses genes, porém no período mais longo (16 dias) não foi verificada esta alteração, pelo contrário, *p53* apresentou uma indução na menor dose testada. Já os proto-oncogenes, de uma forma geral, não tiveram alterações a nível de expressão relativa nos tempos mais curtos, mas em 96h todos os genes sofreram uma queda em seus transcritos dos grupos tratados em relação ao grupo controle. Esta supressão transcricional permaneceu após 16 dias de exposição, com exceção de *junba*. Dependendo do tempo e vias de exposição, assim como as doses utilizadas, os organismos fazem uso de diferentes mecanismos de defesa, porém nem sempre são suficientes para manter a homeostase celular, levando às células a economizar energia e apenas sobreviver ao estresse, inativando algumas funções, como por exemplo, a expressão gênica.

Palavras-chave: cianobactérias; expressão gênica; carcinogênese; microcistina.

2. INTRODUÇÃO GERAL

2.1 O problema ambiental das cianotoxinas: A produção de microcistinas

O desenvolvimento industrial, o crescimento dos centros urbanos e a expansão de áreas agriculturáveis levam ao aumento de nutrientes essenciais para o fitoplâncton, principalmente fósforo, nitrogênio, carbono e ferro. Este processo é denominado eutrofização e possui diversas consequências ao ecossistema aquático. Entre elas, o favorecimento ao aumento da biomassa de algas, cianobactérias e plantas (Calijuri et al., 2006), diminuição da diversidade de espécies em todos os níveis tróficos e aumento da turbidez e número de partículas em suspensão, diminuindo a qualidade da água (Codd, 2000).

As cianobactérias são organismos procariontes, pertencentes ao Reino Monera e com capacidade fotoautotrófica, encontradas em ecossistemas aquáticos continentais, estuarinos e marinhos, fazendo parte do fitoplâncton (Calijuri et al., 2006). A proliferação de cianobactérias não só é prejudicial à qualidade da água, como também preocupa pela capacidade de produzir toxinas, as quais aumentam os riscos à saúde de animais e seres humanos.

Ao longo das últimas décadas, a frequência e distribuição global de florações de cianobactérias produtoras de cianotoxinas em corpos d'água eutrofizados apresentaram um aumento significativo e tornaram-se uma preocupação mundial (Yan et al., 2012), tanto para organismos aquáticos, quanto seres humanos (Minillo et al., 2000; Ballot et al., 2005; Kotak e Zurawell, 2007; Amado, 2009), representando um importante grupo do ponto de vista da química toxicológica ambiental e ecotoxicologia (Bláha et al., 2009). A

contaminação dos corpos d'água por cianotoxinas traz sérias consequências econômicas, ecológicas e de saúde pública (Wiengand e Pflumacher, 2005; Amado, 2009).

Os ecossistemas de água doce são os ambientes mais propícios para o desenvolvimento de cianobactérias, pois a maioria das espécies apresenta melhor crescimento em águas neutroalcalinas com pH de 6 a 9, temperaturas entre 15°C e 30°C, com alta concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo (Calijuri et al., 2006).

Vários episódios com florações de cianobactérias já ocorreram no estuário da Laguna dos Patos (Figura 1), coincidente com ventos fracos ou ausentes, juntamente com temperatura da água acima de 20°C, pH em torno de 8, concentrações de nutrientes nitrogenados e de fósforo não-limitantes (Yunes et al., 1996; Matthiensen et al., 1999).



FIGURA 1: Ocorrência de florações de cianobactérias na Laguna dos Patos, Pelotas, RS – Brasil. Fonte: <http://www.onlinecomunicacoes.com.br/tapes/quais-as-razoes-para-as-aguas-da-lagoa-estarem-esverdeadas.html>

Cianobactérias podem produzir uma variedade de cianotoxinas com potencial tóxico (Cui et al., 2011), as quais podem ser classificadas tanto por

sua estrutura química, podendo ser alcaloides, peptídeos cíclicos ou lipopolissacarídeos (LPS), quanto pela sua ação farmacológica, atuando como neurotoxinas, hepatotoxinas ou dermatotoxinas (Calijuri et al., 2006).

Dentre as diversas cianotoxinas produzidas, as microcistinas (MC) representam um potente grupo de hepatotoxinas, com aproximadamente 90 isoformas identificadas (Liu et al., 2016). Muitas hepatotoxinas não tem nenhuma atração especial pelo tecido hepático, mas como o fígado concentra toxinas na tentativa de degradá-las, elas acabam atuando mais nesse órgão (Calijuri et al., 2006). Além disso, as MCs são incapazes de atravessar membranas celulares por difusão passiva, dependendo de transportadores polipeptídios de ânions orgânicos (Oatps) que são capazes de mediar sua absorção e muitos membros dessa família das Oatps são exclusivamente expressos no tecido hepático (Fischer et al., 2005; Niedermeyer et al., 2014).

Os aspectos ecológicos relacionados às microcistinas estão associados ao acúmulo na cadeia trófica, podendo chegar até os seres humanos. Também ocorrem mudanças na composição do fito e zooplâncton, pois em experimentos feitos em tanques de piscicultura, a população zooplanctônica reduziu-se após o aparecimento de florações de *Microcystis sp.*, possivelmente devido à função protetora desempenhada pelas cianotoxinas contra espécies que são seus predadores primários ou que estão competindo por recursos (Ribeiro et al., 1997; Calijuri et al., 2006).

As MC são heptapeptídios cíclicos produzidos como metabólitos secundários (Ding et al., 2000) por espécies de cianobactérias, como dos gêneros *Microcystis* (*M. aeruginosa*, *M. wesenbergii*, *M. viridis*), *Oscillatoria* (*O. agardhii*, *O. rubescens*, *O. tenuis*), *Anabaena*, *Haphalosiphon*, *Aphanocapsa*,

Cyanobium, *Arthrospira*, *Limnothrix*, *Phormidium*, *Hapalosiphon*, *Nostoc*, *Anabaenopsis* e *Synechocystis* (Zegura et al., 2011). Cada gênero pode compor dezenas ou centenas de espécies, tóxicas ou não, devido às substâncias químicas secretadas (Chorus e Bartram, 1999). As toxinas são sintetizadas durante a fase de crescimento das cianobactérias e grandes quantidades de MCs são liberadas para a água durante o colapso de uma floração, ou seja, após lise celular ou de crescimento ativo de populações de cianobactérias (Azevedo et al., 2002; Malbrouck e Kestemont, 2006).

A MC-LR é uma das variantes mais estudadas e comumente encontradas em água doce, sua porção Adda, presente em todas, é considerada a responsável pela atividade das MCs (Pinho et al., 2003; Campos e Vasconcelos, 2010) (Figura 2). As diferentes isoformas de MC são formadas principalmente devido às variações dos aminoácidos encontrados apenas nas posições 2 e 4, por exemplo, a MC-LR (Figura 2), MC-RR e MC-YR, com variadas combinações de leucina (L), arginina (R) ou tirosina (Y) (Kotak e Zurawell, 2007; Liu e Sun, 2015).

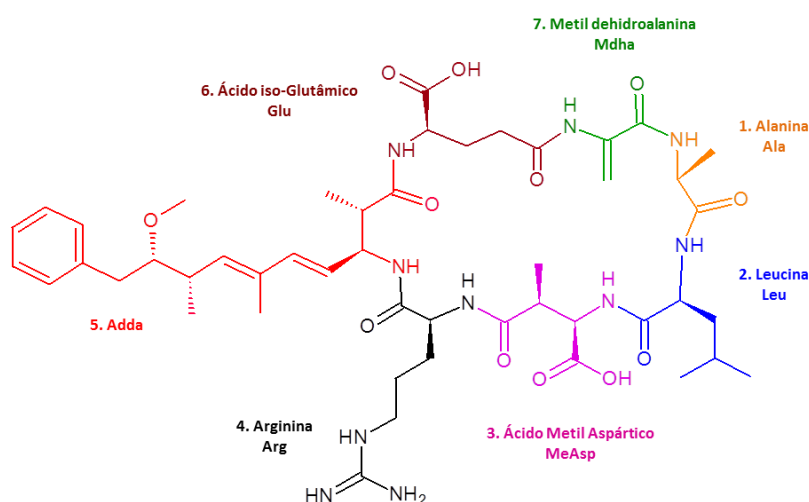


FIGURA 2: Estrutura da MC-LR. Isoforma caracterizada pelos aminoácidos leucina (L) e arginina (R) nas posições 2 e 4, respectivamente. (Adaptado de Antoniou et al., 2008)

Portanto, a nomenclatura das diferentes isoformas são referentes aos aminoácidos presentes nas posições 2 e 4, enquanto que na posição 1, o aminoácido alanina, é relativamente conservado (Sivonen e Jones, 1999; Ramos et al., 2015). No entanto, ainda podem ocorrer outras variantes de MC-LR, como a [D-Leu¹] MC-LR, que contém D-Leucina na posição 1, ao invés de alanina (Figura 3), mas sua toxicidade se dá pelo mesmo mecanismo de ação da MC-LR. Nos episódios de florações de cianobactérias ocorrentes na Laguna dos Patos, a toxina [D-Leu¹] MC-LR foi detectada em células isoladas de *M. aeruginosa* (Ramos et al., 2015).

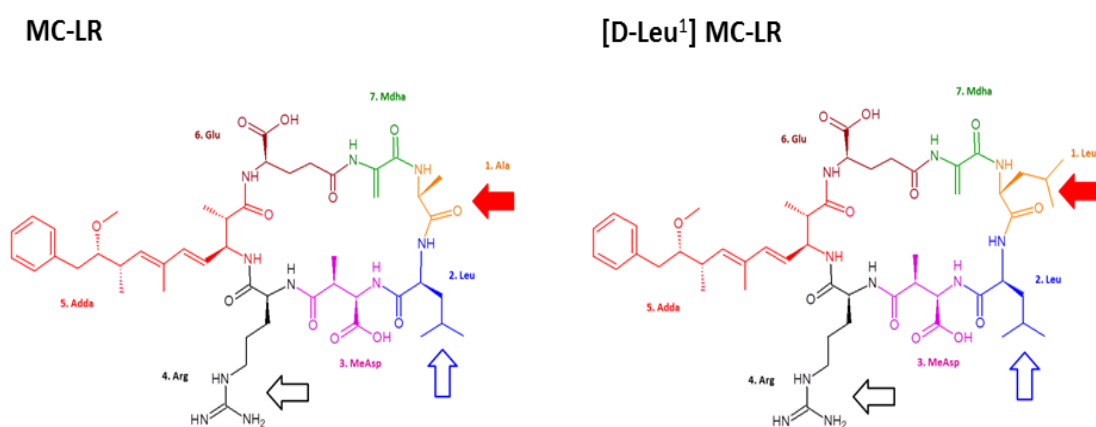


FIGURA 3: Diferença na estrutura química entre as variantes MC-LR e [D-Leu¹] MC-LR. Ocorre a troca do aminoácido alanina pelo aminoácido leucina na posição 1. (seta vermelha). (Adaptado de Ramos et al., 2015)

2.2 Ação hepatotóxica das microcistinas: A promoção tumoral e mecanismos de defesa celular

A inibição de proteínas fosfatases PP1 e PP2A é considerada um dos principais mecanismos de toxicidade a nível bioquímico das MCs (Zegura et al., 2004), com o consequente aumento da fosforilação proteica, geração de

estresse oxidativo e carcinogênese (Ding e Ong, 2003), assim como efeitos sobre a osmorregulação em peixes e outros organismos aquáticos (Yunes, 2009). Esta hiperfosforilação tem como efeito estrutural mais pronunciado a desorganização do citoesqueleto e perda de forma celular (Nishiwaki-Matsushima et al., 1992; Falconer e Yeung, 1992; Nishiwaki- Matsushima et al., 1994), tendo como consequência a desintegração da estrutura dos hepatócitos, associada à diminuição do volume intracelular e do contato intercelular, o choque hipovolêmico e até morte do indivíduo afetado (Carmichael, 1994).

A fosforilação reversível de proteínas é um importante mecanismo regulador das atividades intracelulares nas vias de transdução de sinal que controlam processos biológicos diversos (Figura 4), como o metabolismo intermediário e de substâncias de reserva, a dinâmica do citoesqueleto, a quimiotaxia, a diferenciação e o crescimento celular (Reinhart et al., 1991; Calijuri, 2006). Variações no estado de fosforilação proteico são resultados do balanço das atividades entre proteínas quinases e fosfatases, responsáveis pela fosforilação e desfosforilação, respectivamente (Cohen, 1992).

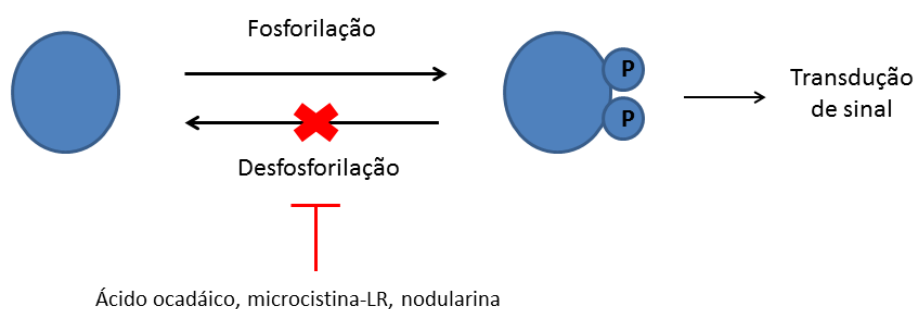


FIGURA 4: Ilustração esquemática do mecanismo de fosforilação e desfosforilação proteica na presença de cianotoxinas (Adaptado de Fujiki e Suganuma, 2011).

A exposição de células a sinais extracelulares pode requerer mudanças na expressão gênica para que sejam promovidas respostas fisiológicas apropriadas. Esses sinais ativam múltiplas vias de sinalização intracelular que estão integradas, por exemplo, a genes promotores e fatores alvos de transcrição (Whitmarsh, 2007). A fosforilação e desfosforilação de reguladores transcricionais mediados por proteínas quinases específicas e proteínas fosfatases é um mecanismo comum de controlar expressão gênica (Hill e Treisman, 1995; Whitmarsh e Davis, 2000; Whitmarsh, 2007). Sendo assim, as vias de sinalização do grupo MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos) são importantes mediadoras de respostas transcricionais a esses sinais, que incluem fatores de crescimento, hormônios, citocinas e estresses ambientais (Whitmarsh e Davis, 2000; Yang et al., 2003; Whitmarsh, 2007).

A MAPK é uma subfamília de proteínas quinases específicas de serina/treonina, conservada entre os eucariotos ao longo da evolução biológica, que respondem a estímulos extracelulares (mitógenos) e regulam várias atividades celulares, como expressão gênica, mitose, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose, a partir de uma cascata de sinais que levam a sua ativação por dupla fosforilação em seus resíduos de serina e treonina (Whitmarsh e Davis, 1996; Yang et al., 2003; Whitmarsh, 2007). Uma vez ativada, a MAPK move-se para o núcleo e ativa vários fatores de transcrição, os quais estimulam a transcrição de genes que atuam em parte do ciclo celular (Pierce, 2011).

A proliferação celular é regulada por sinais extracelulares conhecidos como fatores de crescimento, e esses fatores medeiam seu efeito proliferativo através da ligação ou ativação de receptores ligados a membranas. Esses

receptores transmitem sua informação para GTPases e então a quinases que fosforilam e ativam fatores de transcrição. Fatores de transcrição regulam a expressão de genes específicos que produzem a indução de respostas biológicas, como por exemplo, proliferação celular (Smart et al., 2008). Sendo assim, além dos efeitos agudos, existem algumas evidências que sugerem que a inibição das fosfatases PP1 e PP2A, decorrente de uma exposição crônica à microcistina, pode resultar numa proliferação celular descontrolada, potencializando o desenvolvimento de tumores *in vitro* (Nishiwaki-Matsushima et al., 1992; Ding et al., 1999).

O amplo alcance destas vias de regulação celular emergiu com a descoberta de candidatos a substratos da MAPK, como proteínas multi-alvo de transdução de sinal e numerosas proteínas reguladoras de transcrição, entre as quais estão incluídos os proto-oncogenes *fosab*, *junba* e *myca* (Avruch, 2007; Zegura et al., 2011). Os proto-oncogenes são seletivamente ativos apenas quando sinais de regulação apropriados permitem que sejam ativados, comumente por alguma interação alostérica (Griffiths, 1996). A fosforilação efetuada pelas MAPKs dá início à transcrição de genes necessários para o crescimento, diferenciação e proliferação celular (Figura 5) (Gehring, 2004; Zegura et al., 2008; Li et al., 2009; Wang et al., 2013, Li et al., 2014). Logo, em estudos sobre carcinogênese, a indução da expressão de proto-oncogenes tem sido relacionada com a promoção da atividade tumoral (De Felipe e Hunt, 1994; Hayashi et al., 2000; Li et al., 2009).

Alguns trabalhos já forneceram evidências de que a MC-LR induz a expressão de *fos*, *jun* e também *myc* em culturas primárias de hepatócitos de ratos e em peixes-zebra (Sueoka et al., 1997; Wei et al., 2008; Li et al., 2009).

A proteína c-Jun é um regulador positivo de proliferação e induz outros reguladores de progressão do ciclo celular (Szremska et al., 2003; Meixner et al., 2004, Wei et al., 2008) e c-Fos tem atividade oncogênica com frequente superexpressão em células tumorais (Verde et al., 2007). Segundo Fan et al. (2014), *c-myc* é um proto-oncogene que, ao ter sua expressão alterada, contribui para o desenvolvimento do tumor, estando frequentemente ativado em 20% de todos os cânceres humanos, mas também já foi encontrado ativo em tumores de outras espécies animais (Dang et al., 1999; Dang, 2012).

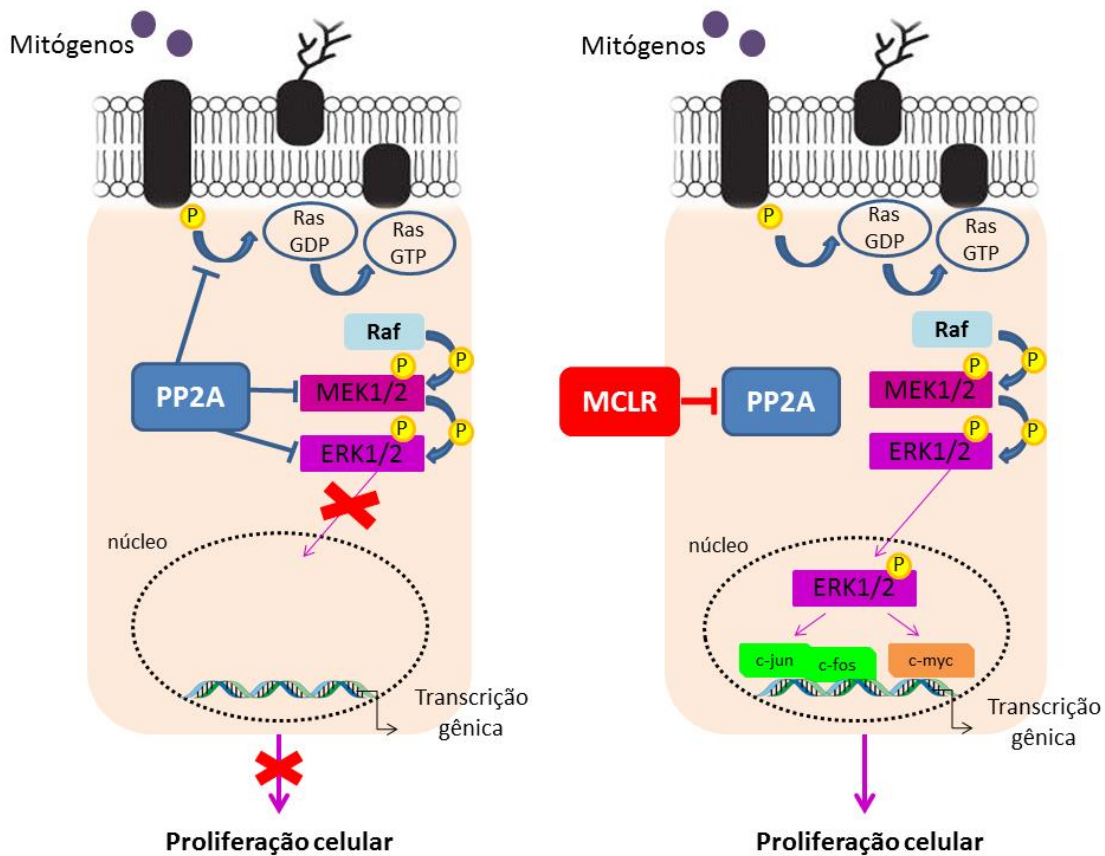


FIGURA 5: Ação inibitória da MC-LR sob a proteína fosfatase PP2A e sua relação com a proliferação celular. A inibição de PP2A leva à ativação de uma cascata de sinalizações da via MAPK, com ERK1/2 sendo translocado para o núcleo e ativando fatores de transcrição e genes relacionados com o processo de proliferação celular, como *c-jun*, *c-fos* e *c-myc*. Adaptado de Menezes et al. (2013)

Os genes que participam da formação de tumores estão envolvidos, principalmente, com o controle do ciclo celular, reparação do DNA danificado e apoptose em células normais, sendo os mais estudados os genes supressores de tumores e os oncogenes (Junqueira e Carneiro, 2005; Campbell e Farrell, 2007).

De acordo com Junqueira e Carneiro (2005), alguns genes supressores de tumores codificam proteínas que mantêm as células em G-zero, ou seja, fora do ciclo mitótico, enquanto os oncogenes codificam proteínas modificadas que promovem a multiplicação desordenada das células, que se convertem em malignas, originando os tumores. Ainda segundo os autores, os oncogenes são denominados proto-oncogenes quando atuam nos momentos certos e de modo controlado, participando do controle da proliferação celular para constituir ou reconstituir tecidos normais do organismo.

Os proto-oncogenes são altamente conservados na evolução e sua expressão é fortemente regulada (Smart et al., 2008), visto que existe uma similaridade na sequência gênica dos proto-oncogenes entre os animais. Li et al. (2014) verificaram mais de 90% de similaridade para *fos* entre duas espécies de carpas e para *jun* foi verificada que a sequência de aminoácidos da carpa é idêntica cerca de 70% da sequência de mamíferos, aves e outros peixes teleósteos, indicando que este gene é comparativamente conservado na evolução dos vertebrados.

A alteração na expressão destes genes já vem sendo investigada, pois visa contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos de ação da MC-LR que provocam toxicidade/genotoxicidade e possuem potencial carcinogênico (Zegura et al., 2011).

Já os genes supressores de tumor frequentemente codificam proteínas que funcionam como reguladores negativos de proliferação celular ou reguladores positivos de morte celular (Smart et al., 2008). Os seres vivos tem a capacidade de desenvolver diversos mecanismos de defesa contra estressores celulares, sendo o *p53* um dos genes mais conhecidos e estudados pela sua indução em resposta ao estresse celular, considerado o maior sensor de estresse genotóxico via estresse oxidativo, funcionando como um transativador transcricional no reparo do DNA, apoptose e vias de supressão tumoral (Fu et al., 2005; Zegura et al., 2008).

Em células normais, os níveis proteicos de *p53* são baixos, no entanto, em resposta a danos no DNA, hipóxia ou estresse oncogênico, seus níveis rapidamente se acumulam (Smart et al., 2008). O gene *p53* é conservado em estrutura e função, tornando-o altamente similar entre mamíferos e peixes-zebra, além disso, é o gene supressor de tumor mais frequentemente mutado em casos de câncer (Storer e Zon, 2010).

Como descrito anteriormente, a partir da inibição de proteínas fosfatases PP1 e PP2A, numerosas proteínas celulares são hiperfosforiladas e a fosfoproteína nuclear *p53* é um substrato de PP2A (Wang et al., 2013). Por isso, uma exposição à MC-LR pode afetar o funcionamento normal de *p53* e seus genes alvo, responsáveis por regular processos de morte celular programada, de reparo de DNA e ciclo celular. Porém, além da ação inibitória de fosfatases, o estresse oxidativo também pode desempenhar um papel na patogênese de toxicidade da microcistina, através da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), injúria celular e peroxidação lipídica (Zegura et al., 2006).

Uma vez que as MCs podem ser genotóxicas, causando danos a nível de DNA, *p53* também é induzido e mecanismos de reparo são ativados (Figura 6) para superar os riscos de um DNA danificado que prejudicaria a integridade do genoma (Soares et al., 2012). Dentre os vários genes alvo do *p53*, tem-se o *gadd45a*, o qual também tem sua indução associado a vias acionadas por ocorrência de estresse oxidativo (Zegura et al. 2008). Segundo os mesmos autores, *gadd45a* atua no controle do ciclo celular e processos de reparo do DNA, removendo uma variedade de lesões do DNA ou interrompendo o ciclo celular, de forma que ocorra a prevenção da replicação do DNA danificado (Smart et al., 2008; Zegura et al., 2008; Soares et al., 2012).

Caso o dano do DNA seja muito severo, *p53* pode induzir apoptose através da regulação de genes que estimulam vias apoptóticas, tanto extrínsecas quanto intrínsecas (Smart et al., 2008). A proteína *p53* é um regulador de genes anti e pró-apoptótico, como *bcl-2* e *baxa*. Assim como *p53*, já foi relatado um aumento persistente dos níveis transcricional e proteico de *baxa* após exposição à MC-LR em fígados de ratos. Este gene é responsável pela morte celular através da liberação de citocromo c e subsequente aumento da expressão de proteases de morte celular, como caspases (Fu et al., 2005; Wang et al., 2013), enquanto *bcl-2*, supressor de apoptose, teve seus níveis de expressão reprimidos (Zegura et al., 2006).

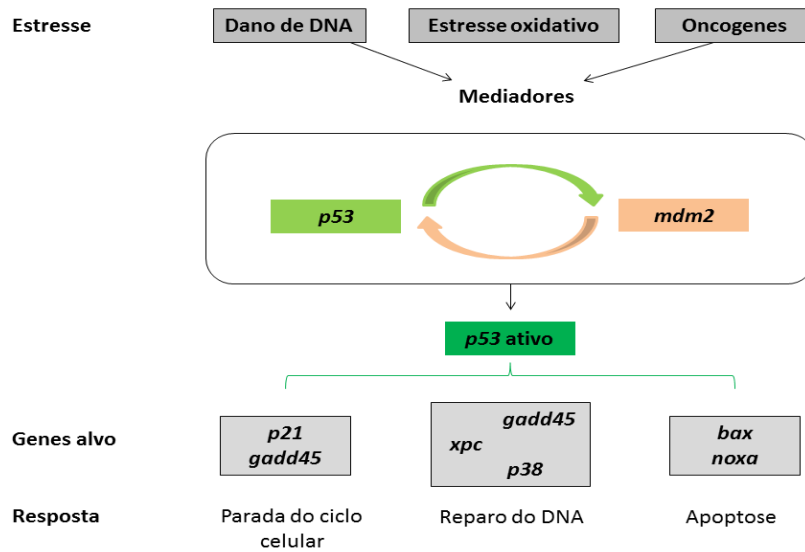


FIGURA 6: Ilustração esquemática da via p53 frente a diferentes estresses que podem ativá-la a partir de mediadores celulares. Uma vez induzido, p53 ativa genes que atuam em três grandes vias de resposta: Interrupção do ciclo celular e reparo do DNA com ação de *gadd45* e apoptose que pode ser ativada pelo *bax*, entre outros genes. O gene *p53* é regulado negativamente pelo *mdm2* e vice-versa (Adaptado de Soares et al., 2012).

2.3 O modelo *Danio rerio*

Membro da família Cyprinidae, essa espécie de água doce, originária do sul asiático, tornou-se um modelo experimental vertebrado importante na investigação científica. O peixe-zebra (Figura 7) é utilizado em pesquisas desde meados de 1930, porém, apenas no final da década de 60, com o biólogo George Streisinger da Universidade de Oregon nos Estados Unidos, é que o peixe recebeu destaque, quando o pesquisador identificou diversas vantagens do organismo em estudos genéticos e de desenvolvimento, em relação a modelos consolidados na época, como *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster* (Zhang et al., 2003; Gheno et al., 2016). A partir dessa descoberta, os estudos com peixe-zebra intensificaram-se e permitiram grandes avanços em diversas áreas da pesquisa biológica.



Figura 7 - Peixe-zebra ou paulistinha (*Danio rerio*).

Fonte: <http://peixesdeaquario.com.br/peixes-2/peixes-de-agua-doce/paulistinha-ou-danio-rerio/>

O peixe-zebra apresenta inúmeras vantagens, dentre elas, trata-se de um modelo pequeno de fácil manipulação e criação, além de que sua manutenção diária em laboratório apresenta baixo custo (Zhang et al., 2003; Scharl, 2014), se comparada à manutenção de roedores. Algumas características do peixe, tais como prole numerosa e desenvolvimento rápido (progride de ovos a estado larval em menos de três dias e torna-se adulto aos 3 meses de vida) são atributos que facilitam a manipulação e utilização da espécie na investigação de inúmeras patologias (Zhang et al., 2003; Silveira et al., 2012). Seus embriões são transparentes, o que permite a visualização em microscópio de estruturas morfológicas e órgãos internos, sem a necessidade de procedimento cirúrgico (Zhang et al., 2003).

Através do sequenciamento completo do genoma do *D. rerio*, pode-se indicar que aproximadamente entre 70-75% dos seus genes apresentam homologia aos genes humanos (Zhang et al., 2003; Zorzetto e Guimarães, 2013; Gheno et al., 2016), com alta conservação de sequências gênicas em estrutura e função entre os grupos de vertebrados. A similaridade entre os genes do peixe-zebra e dos humanos estimula cada vez mais a sua utilização como um organismo modelo alternativo ao uso de roedores ou como modelo

complementar no oferecimento de informações (Zorzetto e Guimarães, 2013; Gheno et al., 2016).

A produção científica brasileira utilizando o peixe-zebra, que inexistia há pouco mais de uma década, está crescendo de modo acelerado nos últimos anos, conforme relatado por Zorzetto e Guimarães (2013) e por um estudo minucioso de Gheno et al. (2016), os quais também verificaram que um número expressivo das publicações com *D. rerio* oriundas do país envolvem trabalhos de cunho toxicológico e biologia molecular. Diversos aspectos relativos ao funcionamento de um organismo são bastante conhecidos no peixe-zebra, principalmente informações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas para todos os estágios do desenvolvimento precoce, assim como em juvenis e adultos de ambos os sexos (Hill et al., 2005). Isto torna o peixe-zebra um modelo adequado e conveniente para investigações toxicológicas, quando o objetivo é identificar os efeitos adversos da exposição a toxinas ou outros poluentes ambientais e de órgãos alvo de substâncias químicas específicas (Zhang et al., 2003; Hill et al., 2005).

Para avaliar a toxicidade de determinado composto, é essencial identificar as suas relações de resposta à dose, elucidar os mecanismos de toxicidade e determinar a sua toxicodinâmica (Hill et al., 2005). De acordo com a problemática das microcistinas, para estudos de monitoramento e remediação dos ambientes aquáticos impactados por florações de cianobactérias é necessário, não apenas um conhecimento detalhado dos mecanismos bioquímicos de toxicidade do extrato bruto de cianobactérias tóxicas, mas também dos mecanismos bioquímicos de defesa utilizados pelos organismos frente à exposição a estes compostos.

Além dos aspectos favoráveis relativos à manutenção e ao manejo do peixe-zebra em laboratório, no meio ambiente os peixes podem ser veículos de toxinas (como as microcistinas) para animais de níveis elevados na cadeia alimentar (Lone et al., 2015), confirmando sua importância como um modelo de estudo.

Como os genes, receptores e processos moleculares são altamente conservados entre os filos animais de maior complexidade, estudos com peixe-zebra podem ser representativos quando existe a finalidade de comparar com humanos suas respostas frente a determinado estresse ou condição patológica, como por exemplo, carcinogênese. Estudos genéticos podem proporcionar maior conhecimento sobre a função dos genes em vertebrados e levar a uma melhor compreensão acerca de doenças humanas (Huang et al., 2012).

Portanto, a elucidação do genoma de peixe-zebra propiciou o ponto de partida do presente trabalho, por permitir a coleta das sequências nucleotídicas de proto-oncogenes e de genes envolvidos na supressão de tumores, presentes neste peixe.

REFERÊNCIAS

Amado, L. A. (2009). **Mudanças na competência antioxidante e de detoxificação após exposição do peixe *Cyprinus carpio* (Teleostei: Cyprinidae) a microcistinas e avaliação do ácido lipóico como agente quimioprotetor.** Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, 185p.

Antoniou, M. G.; Shoemaker, J. A.; de la Cruz, A. A.; Dionysiou, D. D. (2008). LC/MS/MS structure elucidation of reaction intermediates formed during the TiO₂ photocatalysis of microcystin-LR. **Toxicon**, 51(6), pp. 1103–1118.

Avruch, J. (2007). MAP kinase pathways: The first twenty years. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1773(8), pp. 1150-1160.

Azevedo, S. M. F. O.; Carmichael, W. W.; Jochimsen, E. M.; Rinehart, K. L.; Lau, S.; Shaw, G. R.; Eaglesham, G. K. (2002). Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicology**, 181, pp. 441-446.

Ballot, A.; Krienitz, L.; Kotut, K.; Wiegand, C.; Pflugmacher, S. (2005). Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in the alkaline crater lakes Sonachi and Simbi, Kenya. **Harmful Algae**, 4(1), pp. 139-150.

Bláha L.; Babica P.; Marsalek B. (2009). Toxins produced in cyanobacterial water blooms - toxicity and risks. **Interdisciplinary Toxicology**, 2(2), pp. 36–41.

Calijuri, M. C.; Alves, M. S. A.; Santos, A. C. A. (2006). **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais.** São Carlos: Rima, 118p.

Campbell, M. K.; Farrell, S. O. (2007). **Bioquímica: volume 2, Biologia Molecular.** São Paulo: Thomson Learning, 253p.

Campos, A.; Vasconcelos, V. (2010). Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. **International Journal of Molecular Sciences**, 11(1), pp. 268–287.

Carmichael, W. W. (1994). The toxins of cyanobacteria. **Scientific American**, 270(1), pp. 78-86.

Chorus, I.; Bartram, J. (1999). **Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E&FN Spon, 400p.

Codd, G. (2000). Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritization of eutrophication control. **Ecological Engineering**, 16(1), pp. 51–60.

Cohen, P. (1992). Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. **Trends in Biochemical Sciences**, 17(10), pp. 408–413.

Cui, Z.; Zhang, K.; Qu, X.; Liu, Q. (2011). Construction of differentially expressed genes library of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) exposed to microcystin-LR using ssh and expression profile of related genes. **Fish & Shellfish Immunology** 31(6), pp. 746-753.

Dang, C. V. (2012). MYC on the path to cancer. **Cell**, 149, pp. 22-35.

Dang, C. V.; Resar, L. M. S.; Emison, E.; Kim, S.; Li, Q.; Prescott, J. E.; Wonsey, D.; Zeller, K. (1999). Function of the c-myc oncogenic transcription factor. **Experimental Cell Research**, 253(1), pp. 63–77.

De Felipe, C.; Hunt, S. P. (1994). The differential control of c-jun expression in regenerating sensory neurons and their associated glial cells. **The Journal of Neuroscience**, 14(5), pp. 2911-2923.

Ding, W. X.; Ong, C. N. (2003). Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. **FEMS Microbiology Letters**, 220(1), pp. 1-7.

Ding, W. X.; Shen, H. M.; Ong, C. N. (2000). Microcystic cyanobacteria extract induces cytoskeletal disruption and intracellular glutathione alteration in hepatocytes. **Environmental Health Perspectives**, 108(7), pp. 605-609.

Ding, W. X.; Shen, H. M.; Zhu, H. G.; Lee, B. L.; Ong, C. N. (1999). Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 442(2), pp. 69–77.

Falconer, I. R.; Yeung, D. S. K. (1992). Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by microcystis toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins. **Chemico-Biological Interactions**, 81(1-2), pp. 181–196.

Fan, H.; Cai, Y.; Xie, P.; Xiao, W.; Chen, J.; Ji, W.; Zhao, S. (2014). Microcystin-LR stabilizes c-myc protein by inhibiting protein phosphatase 2A in HEK293 cells. **Toxicology**, 319, pp. 69-74.

Fischer, W. J.; Altheimer, S.; Cattori, V.; Meier, P. J.; Dietrich, D. R.; Hagenbuch, B. (2005). Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 203, pp. 257–263.

Fu, W.; Chen, J.; Wang, X.; Xu, L. (2005). Altered expression of *p53*, *bcl-2* and *bax* induced by microcystin-LR *in vivo* and *in vitro*. **Toxicol**, 46(2), pp. 171-177.

Fujiki, H.; Suganuma, M. (2011). Tumor promoters: microcystin-LR, nodularin and TNF- α and human cancer development. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, 11(1), pp. 4–18.

Gehringer, M. M. (2004). Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. **FEBS Letters**, 557(1-3), pp. 1–8.

Gheno, E. M.; Rosemberg, D. B.; Souza, D. O.; Calabró, L. (2016). Zebrafish in brazilian science: Scientific production, impact and collaboration. **Zebrafish**, 13(3), pp. 1–9.

Griffiths, A. J. F.; Miller, J. H.; Suzuki, D. T.; Lewontin, R. C.; Gerlbart, W. M. (1996). **Introdução à Genética**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 856p.

Hayashi, M.; Ueyama, T.; Nemoto, K.; Tamaki, T.; Senba, E. (2000). Sequential mRNA expression for immediate early genes, cytokines, and neurotrophins in spinal cord injury. **Journal of Neurotrauma**, 17(3), pp. 203–218.

Hill, A. J.; Teraoka, H.; Heideman, W.; Peterson, R. E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicological Sciences**, 86(1), pp. 6–19.

Hill, C. S.; Treisman, R. (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: Mechanisms and specificity. **Cell**, 80(2), pp. 199-211.

Huang, P.; Zhu, Z.; Lin, S.; Zhang, B. (2012). Reverse genetic approaches in zebrafish. **Journal of Genetics and Genomics**, 39(9), pp. 421–433.

Junqueira, L. C.; Carneiro, J. (2005). **Biologia Celular e Molecular**. 8ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 332p.

Kotak, B. G.; Zurawell, R. W. (2007). Cyanobacterial toxins in Canadian freshwaters: A review. **Lake and Reservoir Management**, 23(2), pp. 109-122.

Li, H.; Xie, P.; Li, G.; Hao, L.; Xiong, Q. (2009). *In vivo* study on the effects of microcystin extracts on the expression profiles of proto-oncogenes (*c-fos*, *c-jun*

and *c-myc*) in liver, kidney and testis of male Wistar rats injected i.v. with toxins. **Toxicol**, 53(1), pp. 169-175.

Li, Y.; Ma, J.; Fang, Q.; Li, X. (2014). *c-fos* and *c-jun* expression in the liver of silver carp and the effect of microcystins. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, 28 (4), pp. 157-166.

Liu, J.; Sun, Y. (2015). The role of PP2A-associated proteins and signal pathways in microcystin-LR toxicity. **Toxicology Letters**, 236(1), pp. 1–7.

Liu, J.; Wang, H.; Wang, B.; Chen, T.; Wang, X.; Huang, P.; Xu, L.; Guo, Z. (2016). Microcystin-LR promotes proliferation by activating Akt/S6K1 pathway and disordering apoptosis and cell cycle associated proteins phosphorylation in HL7702 cells. **Toxicology Letters**, 240(1), pp. 214–225.

Lone, Y.; Koiri, R. K.; Bhide, M. (2015). An overview of the toxic effect of potential human carcinogen Microcystin-LR on testis. **Toxicology Reports**, 2, pp. 289–296.

Malbrouck, C.; Kestemont, P. (2006). Effects of microcystins on fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 25(1), pp. 77-86.

Matthiensen, A.; Yunes, J. S.; Codd, G. A. (1999). Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no estuário da Lagoa dos Patos, RS. **Revista Brasileira de Biologia**, 59(3), pp. 361–376.

Meixner, A.; Karreth, F.; Kenner, L.; Wagner, E.F. (2004). Jun D regulates lymphocyte proliferation and T helper cell cytokine expression. **The EMBO Journal**, 23(6), pp. 1325–1335.

Menezes, C.; Valério, E.; Dias, E. (2013). The kidney vero-E6 cell line: A suitable model to study the toxicity of microcystins. In: Gowder, S. editor. **New Insights Into Toxicity And Drug**. Rijeka, Croatia: InTech, pp. 29-48.

Minillo, A.; Ferreira, A. H.; Yunes, J. S. (2000). Detecção de microcistinas em florações de *Microcystis aeruginosa* no estuário da Lagoa dos Patos, RS, entre 1997 e 1998. **Atlântica**, 22, pp. 81-93.

Niedermeyer, T. H. J.; Daily, A.; Swiatecka-Hagenbruch, M.; Moscow, J. A. (2014). Selectivity and potency of microcystin congeners against OATP1B1 and OATP1B3 expressing cancer cells. **PLOS ONE**, 9(3), pp. 1–7.

Nishiwaki-Matsushima, R.; Ohta, T.; Nishiwaki, S.; Suganuma, M.; Kohyama, K.; Ishikawa, T.; Carmichael, W. W.; Fujiki, H. R. (1992). Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, 118(6), pp. 420-424.

Nishiwaki-Matsushima, R.; Ohta, T.; Sueoka, E.; Suganuma, M.; Harada, K.I.; Watanabe, M.F.; Fujiki, H. (1994). Two significant aspects of microcystin-LR: specific binding and liver specificity. **Cancer Letters**, 83(2), pp. 283-289.

Pierce, B. A. (2011). **Genética: um enfoque conceitual**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 774p.

Pinho, G. L. L.; Moura da Rosa, C.; Yunes, J. S.; Luquet, C. M.; Bianchini, A.; Monserrat, J. M. (2003). Toxic effects of microcystins in the hepatopancreas of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). **Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology & Pharmacology**, 135(4), pp. 459–68.

Ramos, D. F.; Matthiensen, A.; Colvara, W.; Votto, A. P. S. de; Trindade, G. S.; Silva, P. E. A.; Yunes, J. S. (2015). Antimycobacterial and cytotoxicity activity of microcystins. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, 21(9), pp. 1–7.

Reinhart, H.; Martin, L.; Brautigam, L. (1991). Modulation of calcium-activated potassium channels from rat brain by protein kinase A and phosphatase 2A. **The Journal of Neuroscience**, 11(6), pp. 1627–1635.

Ribeiro, M. A. G.; Kubo, E.; Mainardes-Pinto, C. S. R. (1997). Efeito do adubo orgânico e da dosagem do fertilizante química no aumento do fitoplâncton e do zooplâncton. **Boletim do Instituto da Pesca**, 24, pp. 57-64.

Schartl, M. (2014). Beyond the zebrafish: diverse fish species for modeling human disease. **Disease Models & Mechanisms**, 7(2), pp. 181–192.

Silveira, T. R. da; Schneider, A. C.; Hammes, T. O. (2012). Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, 64(2), pp. 4–5.

Sivonen, K.; Jones, G. (1999) Cyanobacterial toxins. In: Chorus L, Bartram J, editors. **Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: World Health Organization and E&FN Spon, pp. 41–111.

Smart, R. C.; Ewing, S. J.; Loomis, K. D. (2008) Carcinogenesis. In: Smart, R. C. and Hodgson, E. (Org) **Molecular and Biochemical Toxicology**. 4ed, New Jersey: John Wiley & Sons, Hoboken, 932p., pp. 535-586.

Soares, J.; Castro, L. F. C.; Reis-Henriques, M. A.; Monteiro, N. M.; Santos, M. M. (2012). Zebrafish (*Danio rerio*) life-cycle exposure to chronic low doses of ethinylestradiol modulates *p53* gene transcription within the gonads, but not NER pathways. **Ecotoxicology**, 21(5), pp. 1513–1522.

Storer, N. Y.; Zon, L. I. (2010). Zebrafish models of p53 functions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2(8), pp. 1-12.

Sueoka, E.; Sueoka, N.; Okabe, S.; Kozu, T.; Komori, A.; Ohta, T.; Suganuma, M.; Kim, S. J.; Lim, I. K.; Fujiki, H. (1997). Expression of the tumor necrosis factor a gene and early response genes by nodularin, a liver tumor promoter, in primary cultured rat hepatocytes. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, 123(8), pp. 413-419.

Szremska, A. P.; Kenner, L.; Weisz, E.; Ott, R. G.; Passequé, E.; Artwohl, M.; Freissmuth, M.; Stoxreiter, R.; Theussl, H. C.; Parzer, S. B.; Moriggl, R.; Wagner, E. F.; Sexl, V. (2003). Jun B inhibits proliferation and transformation in B-lymphoid cells. **Blood**, 102, pp. 4159–4165.

Verde, P.; Casalino, L.; Talotta, F.; Yaniv, M.; Weitzman, J. B. (2007). Deciphering AP-1 function in tumorigenesis. **Cell Cycle**, 6(21), pp. 2632-2639.

Wang, X.; Chen, Y.; Zuo, X.; Ding, N.; Zeng, H.; Zou, X; Han, X. (2013). Microcystin (-LR) induced testicular cell apoptosis via up-regulating apoptosis-related genes *in vivo*. **Food and Chemical Toxicology**, 60, pp. 309-317.

Wei, L.; Sun, B.; Song, L.; Nie, P. (2008). Gene expression profiles in liver of zebrafish treated with microcystin-LR. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 26(1), pp. 6–12.

Whitmarsh, A. J. (2007). Regulation of gene transcription by mitogen-activated protein kinase signaling pathways. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1773(8), pp. 1285-1298.

Whitmarsh, A. J.; Davis, R. J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. **Journal of Molecular Medicine**, 74(10), pp. 589-607.

Whitmarsh, A. J.; Davis, R. J. (2000). Regulation of transcription factor function by phosphorylation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 57(8), pp. 1172-1183.

Wiegand, C.; Pflugmacher, S. (2005). Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 203(3), pp. 201–18.

Yan, W.; Zhou, Y.; Yang, J.; Li, S.; Hua, D.; Wang, J.; Chen, J.; Li, G. (2012). Water-borne exposure to microcystin-LR alters thyroid hormone levels and

gene transcription in the hypothalamic–pituitary–thyroid axis in zebrafish larvae. **Chemosphere**, 87, pp. 1301–1307.

Yang, S. H.; Sharrocks, A. D.; Whitmarsh, A. J. (2003). Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. **Gene**, 320, pp. 3-21.

Yunes, J. S. (2009). Florações de *Microcystis* da Lagoa dos Patos e no seu estuário: vinte anos de estudos. **Oecologia Brasiliensis**, 13(2), pp. 313-318.

Yunes, J. S.; Salomon, P. S.; Matthiensen, A.; Beattie, K. A.; Raggett, S. L.; Codd, G. A. (1996). Toxic blooms of cyanobacteria in the Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil. **Journal of Aquatic Ecosystem Health**, 5(4), pp. 223-229.

Zegura, B.; Lah, T. T.; Filipic, M. (2004). The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. **Toxicology**, 200(1), pp. 59-68.

Zegura, B.; Lah, T. T.; Filipic, M. (2006). Alteration of intracellular GSH levels and its role in microcystin-LR-induced DNA damage in human hepatoma HepG2 cells. **Mutation Research**, 611(1-2), pp. 25-33.

Zegura, B.; Straser, A.; Filipic, M. (2011). Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. **Mutation Research**, 727 (1-2), pp. 16-41.

Zegura, B.; Zajc, I.; Lah, T. T.; Filipic, M. (2008). Patterns of microcystin-LR induced alteration of the expression of genes involved in response to DNA damage and apoptosis. **Toxicon**, 51(4), pp. 615-623.

Zhang, C.; Willett, C.; Fremgen, T. (2003). Zebrafish: an animal model for toxicological studies. **Current Protocols in Toxicology**, pp. 1–18.

Zorzetto, R.; Guimarães, M. (2013). Um peixe modelo. **Pesquisa Fapesp**, 209, pp. 16–21.

3. OBJETIVO

Avaliar a resposta transcricional dos proto-oncogenes *fosab*, *junba* e *myca* e dos genes envolvidos na supressão tumoral *baxa*, *gadd45* e *p53* em fígados de peixe-zebra após exposição a um extrato de *M. aeruginosa* produtor de [D-Leu¹] MC-LR, contendo as concentrações de 3.5 e 54.6 µg.L⁻¹, nos tempos de 6, 24, 96 e 384 horas.

4. ARTIGO:

Effect of *Microcystis aeruginosa* extract on the regulation of proto-oncogenes
and tumor suppressors in zebrafish

Artigo a ser submetido à revista **Ecotoxicology and Environmental Safety**

1 **Effect of *Microcystis aeruginosa* extract on the regulation of proto-oncogenes and**
2 **tumor suppressors in zebrafish**

3
4 Viviane Barneche Fonseca^a; Mauricio da Silva Sopezki^a; José Maria Monserrat^b; João
5 Sarkis Yunes^c; Juliano Zanette^a
6

7 ^aLaboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas (ICB),
8 Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS 96203-900, Brazil.

9 ^bLaboratório de Determinações, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade
10 Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS 96203-900, Brazil.

11 ^cLaboratório de Cianobactérias e Ficotoxinas, Instituto de Oceanografia (IO),
12 Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS 96203-900, Brazil.
13

14 **Number of Tables: 1**

15 **Number of Figures: 2**

16 **Supplementary Material: 1**
17

18 *Correspondence to:

19 Juliano Zanette

20 Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

21 Instituto de Ciências Biológicas (ICB)

22 Av. Itália, Km 8, Campus Carreiros, 96203-900

23 Rio Grande, RS, Brasil

24 Phone: +55 53 32935193

25 Email: juliano.zanette@pq.cnpq.br or julianozanette@furg.br

26 **Abstract**

27 Cyanobacterial blooms of *Microcystis aeruginosa* produces toxins that represent risk to
28 the environment. The microcystin-LR (MC-LR) is a widely studied hepatotoxin with
29 potential to cause tumor promotion and the variant [D-Leu¹] MC-LR was detected in
30 blooms at Patos Lagoon Estuary (Brazil). The present study evaluated the transcription
31 of the proto-oncogenes *fosab*, *junba* and *myca* and the tumor suppressor genes *baxa*,
32 *gadd45a* and *p53* in response to extract of *M. aeruginosa* exposure. The proto-
33 oncogenes and tumor suppressors respond differently at time-dependent manner to
34 transcriptional changes. There was repression of all proto-oncogenes for 25 and 250
35 ppm (with 3.5 and 54.6 µg.L⁻¹ of [D-Leu¹] MC-LR respectively) of cyanobacterial
36 extract tested at times 96 and 384 hours, except only *junba* in the longest time. The
37 tumor suppressor genes were repressed in shorter times of 24 and 96 hours, and *p53* was
38 repressed already at 6 hours, but induced at 384 hours. Depending on the time and
39 routes of exposure, as well as the used doses, the organisms make use of different
40 defense mechanisms, but they are not always enough to maintain cellular homeostasis,
41 causing the cells to conserve energy and only survive the stress, inactivating some
42 functions, such as gene expression.

43

44 **Keywords:** cyanobacteria; gene expression; carcinogenesis; microcystin

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55 **1. Introduction**

56 Over the past decades, the frequency and global distribution of cyanobacteria
57 blooms in water bodies presented a significant increase and became a worldwide
58 preoccupation (Yan et al., 2012). This concern is mainly due to the fact that several
59 species of cyanobacteria could produce a variety of cyanotoxins with toxic potential
60 (Cui et al., 2011).

61 Microcystins (MCs) are commonly found in the aquatic environment and are
62 produced by species of several genera of cyanobacteria, such *Microcystis* (Amado and
63 Monserrat, 2010). The microcystin-LR (MC-LR) is a very common hepatotoxin and its
64 toxicity to diverse biologic systems has been investigated (Abdel-Rahman et al., 1993;
65 Qiao et al., 2013). Studies have demonstrated the appearance of hepatic lesions, as
66 occurrence of cellular apoptosis, in fish exposed to MC-LR at laboratory (Tencalla et
67 al., 1994; Williams et al., 1995; Fischer and Dietrich, 2000; Mezhoud et al., 2008).

68 The main known toxicity mechanism for MC-LR is the inhibition of the PP1 and
69 PP2A phosphatase proteins, leading to hyperphosphorylation of cytoskeleton proteins
70 (Mezhoud et al., 2008; Dias et al., 2010), increasing the oxygen reactive species (ROS)
71 production and oxidative damage to DNA (Ding et al., 2000; Yan et al., 2012). The
72 tumor promoter activity caused by MCs has been attributed to PP2A inhibition, by
73 regulating mitogen activated protein kinases (MAPKs) (Gehring, 2004; Wang et al.,
74 2013).

75 The MAPKs once activated, regulate the expression of proto-oncogenes. For
76 example, *fosab* and *junba* are well-known targets of the MAPKs pathway (Delaney et
77 al., 2008; Zegura et al., 2011) and initiate transcription of genes involved in growth,
78 differentiation and cellular proliferation (Gehring, 2004; Zegura et al., 2008; Li et al.,
79 2009; Wang et al., 2013). The over transcriptional induction of proto-oncogenes has

80 been linked with the promotion of tumor activity in different organs as kidney, testis,
81 brain and liver of rats (De Felipe and Hunt, 1994; Hayashi et al., 2000; Li et al., 2009;
82 Wang et al., 2013).

83 Some studies have provided evidences that MC-LR induces the expression of
84 *jun*, *fos* and also *myc* in primary cultures hepatocytes of rats and zebrafish (Sueoka et
85 al., 1997; Wei et al., 2008; Li et al., 2009). The protein c-Jun is a positive regulator of
86 proliferation and induces other regulators of cell cycle progression (Szremska et al.,
87 2003; Meixner et al., 2004; Wei et al., 2008) and c-fos has oncogenic activity with
88 frequent overexpression in tumor cells (Verde et al., 2007). According with Fan et al.
89 (2014), the altered expression of *myc* proto-oncogene contributes to tumor development.
90 This gene is activated in 20% of all the human cancers and has been found to be active
91 in tumors of other animal species (Dang et al., 1999; Dang, 2012).

92 On the other hand, living beings have the ability to develop a variety of defense
93 mechanisms against cellular stressors and the tumor suppressor genes are one of the
94 responsible for act preventing severe damages for cell. These genes often encode
95 proteins that function as negative regulators of cell proliferation (Smart et al., 2008) and
96 it is necessary to keep the cell integrity and the cellular content. The *p53* gene is the
97 most often mutated in cancers (Storer and Zon, 2010) and is conserved in structure and
98 function, being highly similar in mammals and zebrafish. Once activated, *p53* can
99 induce the expression of genes related to arrest of cell cycle, apoptosis and DNA repair
100 (Fu et al., 2005; Zegura et al., 2008).

101 Among the various p53 target genes, *gadd45a* is one of the genes that operate in
102 cell cycle control and DNA repair processes. The *gadd45a* removes a variety of DNA
103 lesions or interrupt the cell cycle, preventing the replication of damaged DNA (Zegura
104 et al., 2008; Smart et al., 2008; Svircev et al., 2010). If the DNA damage is too severe,

105 *p53* can induce apoptosis through the regulation of genes that stimulate apoptotic
106 pathways (Smart et al., 2008), such as *baxa* (Wang et al., 2013). Exposure to MC-LR
107 caused a persistent increase of its transcriptional and protein levels in hepatocytes and
108 testicular cells and it is responsible for cell death with c cytochrome release and
109 expression of caspases. (Fu et al., 2005; Wang et al, 2013).

110 Thus, the alteration in the expression of these genes is going studied, because
111 may contribute for a better knowledge of the MC-LR action mechanism which cause
112 toxicity/genotoxicity and carcinogenic potential (Zegura et al., 2011). This work
113 evaluated the transcriptional response of the proto-oncogenes *fosab*, *junba* and *myca*
114 and tumor supressor genes *baxa*, *gadd45a* and *p53* in zebrafish (*Danio rerio*) after
115 exposure to *Microcystis aeruginosa* extract with concentrations of 0, 3.5 and 54.6 µg.L⁻¹
116 [D-Leu¹] MC-LR at 6, 24, 96 and 384 hours.

117

118 **2. Material and Methods**

119 **2.1 *Microcystis aeruginosa* extract**

120 The cyanobacteria extract used was obtained from cultures of the *Microcystis*
121 *aeruginosa* originally isolated from water collected in Patos Lagoon Estuary, Rio
122 Grande, RS, Brazil. *M. aeruginosa* cells of RST 9501 strain producing cyanotoxin were
123 cultivated at Laboratory of Cyanobacteria e Phycotoxins, Oceanographic Institute of
124 Federal University of Rio Grande (IO-FURG) and the characterization of microcystin
125 produced by this strain was previously achieved by Matthiensen et al. (2000). The most
126 abundant MC variant in that strain was a [D-Leu¹] MC-LR, which presents a similar
127 potency to phosphatase inhibition comparing to the common [D-Ala¹] MC-LR (MC-
128 LR) (Matthiensen et al. 2000).

129 *M. aeruginosa* was cultured in 5 L of BG-11 medium, kept in FANEM 347
130 growth chambers at 20 °C ± 2 °C in 12 h:12 h light and dark cycles. The culture was
131 100 x concentrated by centrifugation (6000 rpm) to yield an aqueous pellet of *M.*
132 *aeruginosa* extract with 50 mL. The extract was frozen and thawed three times and
133 stored at – 20 °C until used in the exposure experiments.

134

135 **2.2 Laboratory animal care and experimental design**

136 Adult zebrafish (*Danio rerio*) were obtained commercially, transported to the
137 wet lab of the Institute of Biological Sciences (ICB) of the Federal University of Rio
138 Grande (FURG) and maintained in tanks with dechlorinated and aerated tap water, at
139 28°C ± 2°C, pH 7.0 ± 1 and photoperiod of 12 hours light and 12 hours dark. Fish were
140 acclimated for two weeks before of the experiments and fed with commercial
141 Tetracolor™ Tropical Granules (Tetra) twice daily.

142 Working solutions with 2 L of 25 and 250 parts per million (ppm) of *M.*
143 *aeruginosa* extract were made by dilution in dechlorinated water and shaken for 30
144 minutes to obtain nominal working solutions containing 5 and 50 µg.L⁻¹ [D-Leu¹] MC-
145 LR, respectively. Dechlorinated water was used in the control groups. Ten fish were
146 used for each one of the experimental groups (0, 25 and 250 ppm of *M. aeruginosa*
147 extract) in which 200 mL fractions of working solutions was distributed in beakers. One
148 zebrafish was immediately added in each beaker and maintained with constant aeration,
149 28 °C, and photoperiod 12 h light:12 h dark at 6, 24, 96 and 384 h in the Toxicology
150 Laboratory. The water of all beakers was renewed every 24 h.

151 After the end of each exposure time, the fish were anaesthetized with 100 mg.L⁻¹
152 of MS-222 tricaine immersed in the water at 10 minutes and euthanized by section of
153 the spinal cord. The livers were dissected and stored in 500 µL of Trizol and at -80 °C

154 for the next procedures. All the procedures used were approved by the Ethic Committee
155 of Animal Use of FURG (CEUA N° P029/2015, 23116.002456/2015-05 protocol).

156

157 **2.3 Dosage of MC-LR in the water**

158 Individual water samples with 10 mL were collected from the three experimental
159 groups after the 6 h exposure and stored at -20 °C. The microcystin concentration in the
160 water was analyzed in duplicate using a specific immunoassay QuantiPlate™ Kit for
161 Microcystins (EnviroLogix, Portland, ME, USA) according to the manufacturer manual
162 in a microplate spectrophotometer at 405 nm (Biotek Lx 800) in the Determinations
163 Laboratory.

164

165 **2.4 Gene expression evaluation by qRT-PCR**

166 The 120 liver samples of *D. rerio* were homogenized in TRizol reagent
167 (Invitrogen) and the total RNA extraction was conducted according to the manufacturer
168 manual. The RNA quality and amount were evaluated using espectrofotometer
169 (Nanodrop ND1000; NanoDrop Technologies). The quality of some of the RNA
170 samples was evaluated in agarose gel electrophoresis 1%. The total RNA was reversely
171 transcribed to cDNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied
172 Biosystems). The gene sequences were obtained in GenBank and the primers (Table 1)
173 were designed in Primer3 Plus and tested using the software FastPCR.

174 The gene expression analysis was evaluated in duplicate, using the GoTaq qPCR
175 Master Mix Kit (Promega), a real-time PCR System 7300 (Applied Biosystems) and the
176 program: 95°C to 2 min and 40 cycles of 95°C to 15 s and 60°C to 30 s. The $E^{-\Delta Ct}$ method
177 was used to calculate the transcriptional relative level in the experimental groups
178 Schmittgen and Livak (2008). The internal control Ct used was the average of the Cts of

179 the three housekeeping genes: *18s rRNA* (18S ribosomal RNA), *b2m* (β -2-
180 microglobulin) and *g6pdh* (glucose 6-phosphate dehydrogenase). The use of average of
181 three or more reference genes of distinct functional classes has been recommended
182 (Vandesompele et al., 2002; Swijssen et al., 2012). The possible effect of changes in
183 housekeeping genes caused by microcystin (e.g. Sopezki et al., 2017, submitted
184 manuscript) in the responses of target genes using $E^{-\Delta ct}$ was avoided, by using the Ct
185 internal control only to adjust intrinsic variability inside groups, but not between
186 experimental groups.

187

188 **2.6 Statistic analysis**

189 The variables were tested for normality and homoscedasticity and transformed to
190 logarithmic. Significant differences in transcript levels in the experimental groups were
191 carried using one-way variance (ANOVA) followed by Tukey *post hoc* test, considering
192 significant at $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using Statistica 10
193 software and data are presented as mean \pm standard error using GraphPad Prism 5.0
194 software.

195

196 **3. Results**

197 The microcystin concentration measured in the water of the experiment was
198 0.06, 3.5 and 54.6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ in the control and exposed groups to 25 and 250 ppm of *M.*
199 *aeruginosa* extract, respectively.

200 With regard to mortality, in the longer experiment (384 h) three fish died, one in
201 the control group and two in the higher dose group. These deaths may be associated not
202 only with the prolonged exposure to the extract but also with the stress generated by the
203 chronic experiment. The routine procedures may cause significant stress to laboratory

204 animals, regardless of the care and skill with which they are performed (Balcombe et
205 al., 2004).

206 All genes that were evaluated in liver of fish, including the proto-oncogenes
207 *fosab*, *junba* and *myca* and the tumor suppressors *baxa*, *gadd45a* and *p53* were
208 repressed after exposure to *M. aeruginosa* extract. This transcriptional repression was
209 time-dependent (Figure 1 and 2). The tumor suppressor genes *baxa* and *p53* were the
210 only genes that were repressed in the early time of 6 h. At 6 h, *p53* was suppressed at
211 both *M. aeruginosa* treatments, while *baxa* was altered only in the lowest concentration
212 when compared to control. Although the tumor suppressor *gadd45a* was not altered by
213 *M. aeruginosa* extract in the early exposure time of 6 h, it was repressed at 24 h and 96
214 h, similarly to *baxa* and *p53*. These alterations for the tumor suppressor genes were not
215 observed at the longer time exposure of 384 h (Figure 1).

216 Interestingly, in shorter exposure times (6 and 24 h), there was any or little effect
217 on the gene expression of the proto oncogenes *fosab*, *junba* and *myca*, since there was
218 only a group where the repression of *myca* was observed (25 ppm of extract at 24 h). At
219 longer exposure times (96 and 384 h) there was repression of all the proto-oncogenes to
220 the two tested dilutions of cyanobacteria extract, with exception only of *junba* at 384 h
221 (Figure 2).

222

223 **4. Discussion**

224 **4.1 Transcriptional Repression**

225 In the present study, both tumor suppressor genes and proto-oncogenes were
226 suppressed at transcriptional level. The transcriptional repression can occur in a local or
227 global manner by numerous cellular processes. For Arnosti (2004), there are processes
228 that degrade, sequester, covalent modify or remove transcriptional factors from the

229 nucleus, eliminating a positive signal and causing the repression of the specific genes.
230 In case of global gene regulation, can occur modification of the general transcription
231 machinery, such as RNA polymerase and changes in baseline factors used at most
232 promoters (Arnosti, 2004). Much harmful/toxic effects can occur after exposure to
233 microcystins that affect the integrity and cellular structures of the liver (Falconer and
234 Yeung, 1992). These structural damages, for example, can affect the general
235 transcriptional machinery or alter the gene expression of the specific genes, as tumor
236 suppressor genes or proto-oncogenes.

237 It is important to note that the effects caused by the crude *M. aeruginosa* extract
238 could be distinct to the effects caused by the purified toxin. Previous studies that
239 exposed a variety of biologic models (e.g.: human cells and mice) to pure microcystin
240 observed an induction of the proto-oncogenes studied in this work (Wei et al., 2008;
241 Zegura et al., 2008), instead of repression. In macrophages, exposure to
242 lipopolysaccharides (LPS), led to activation of NF- κ B transcription factor, which is
243 related to gene expression that underlies immune responses (Glezer et al., 2000; Sharif
244 et al., 2007). The transcriptional changes include induction or suppression of specific
245 genes that regulate inflammation, cell proliferation, cell migration and survival (Sharif
246 et al., 2007). Therefore, other components present in the crude extract, as the LPS, can
247 influence in the relative responses to toxicity (Amado and Monserrat, 2010; Best et al.,
248 2002), but the biochemical and molecular mechanisms involved in the toxicity is not
249 well known (Amado and Monserrat, 2010).

250 The different routes of exposure can influence the biological responses of
251 organisms to xenobiotics. According to Gaudin et al. (2008), the sensibility of
252 intraperitoneal rout compared to oral suggests a difference in the toxin biodisponibility,
253 showing a fast and high uptake by liver, while an oral administration results in a slower

254 rate of uptake. Studies that found proto-oncogenes induction, used intraperitoneal
255 injections of MC-LR (Wei et al., 2008; Li et al., 2009; Li et al., 2014), favoring a
256 contact more direct with the target organ and decreasing the possibility of action of
257 intermediate ways, that could affect its uptake and toxic action, as well as its
258 biotransformation.

259 In this work, the chosen route was the waterborne exposure, where the *M.*
260 *aeruginosa* extract was diluted in water. Comparing to intraperitoneal injection, this
261 route has a smaller and a slower uptake, and it can regulate differently the transcription
262 of specific genes. Studies have failed to show activity related to the initiation or tumor
263 promotion of MC-LR or *Microcystis sp.* extracts, when applied orally (Abramsson and
264 Zetterberg, 2010). Nevertheless, this does not mean that an oral or immersion exposure is
265 not able to promote toxicity and even carcinogenesis, because depending of the research
266 animal model, doses more elevated and chronic administration could be necessary.

267 The repression of gene expression observed in this work was time-dependent.
268 Tumor suppressor genes were altered in shorter times, while the proto-oncogenes at
269 longer times, possibly those two classes evolved in the carcinogenesis are regulated by
270 different ways that act at different times, depending of the cellular state. Repression can
271 be limited to the time when negative regulatory factors are found at a specific gene, or
272 the transcriptional machinery is blocked for the life of an organism (Arnosti, 2004). It
273 can happen in cases of pollutant exposure where the animals need to fight for survival
274 through different strategies, and the drop in his metabolism could be one of those
275 strategies.

276 It is possible that the transcriptional suppression is a strategy used to save
277 energy, while the animals are spending in emergency situations, as a defense against
278 toxic agents. With respect to defense, the animals have a number of different

279 mechanisms. The fish have a highly efficient detoxification system, the glutathione S-
280 transferases (GSTs) plays an important role in the detoxification of microcystin because
281 transform and eliminate quickly the MC of the organism, reducing its toxicity (Fu and
282 Xie, 2006; Schmidt et al., 2014). Fish species exposed to MC via immersion had an
283 increase of their antioxidant and detoxification enzymes in function of time and the
284 increase of ROS (Cazenave et al., 2006; Jinlin et al., 2011; Pavagadhi et al., 2012). It
285 has already been shown that the conjugation of MC with the glutathione, responsible to
286 start its biotransformation, decreases the binding capacity to, e.g., phosphatase proteins,
287 reducing the toxicity of MCs (Kondo et al., 1992; Abramsson and Zetterberg, 2010).
288 Depending of the cellular state, the autophagy avoids the death, suppressing the
289 apoptosis or easing the cellular stress, mostly in lower doses and in shorter exposure
290 times to MCs. Chen and Xie (2016) found that in Vero-E6 cells this process was fired in
291 a tentative of eliminate the toxin and/or the damages induced by the same, leading to
292 survival of the cells.

293 As well as the exposure mode, the data analysis can also influence and is crucial
294 to a reliable interpretation of the obtained results. The reference genes are expressed in a
295 wide range of tissues and cell types and show any or only minimal changes in the
296 expression levels between the individual samples and experimental conditions
297 (Rebouças et al., 2013). When using the $E^{-\Delta Ct}$ method, it must make sure that the chosen
298 housekeeping genes have not undergone any treatment effect which the animals were
299 submitted. Several studies have shown that the expression of reference genes at
300 messenger RNA level may vary in some experimental conditions, despite having a high
301 and relatively constant expression and make these genes inappropriate in certain cases
302 (Thellin et al., 1999; Rebouças et al., 2013). In this work, the housekeeping genes were
303 repressed in the time of 384 h (Supplementary Material), including *18s rRNA*,

304 frequently used as reference gene (Zegura et al., 2008; Wei et al., 2012) and, if it used
305 their raw data, without eliminate this repressor effect, the target genes would
306 overexpression in this time, when in fact some were downregulated when compared to
307 control.

308

309 **4.2 Transcriptional Induction**

310 The tumor suppressor gene *p53* was repressed in the shorter times (6, 24 and 96
311 h), but at the longest time (384 h) occurred an induction in the smaller concentration of
312 3.5 µg.L⁻¹ [D-Leu1] MC-LR.

313 The microcystins could be also toxic through of the generation of oxidative
314 stress. A situation of moderate oxidative stress can repress the expression of some
315 genes, between then, *p53* (Morel and Barouki, 1999). Therefore, since in normal cells
316 under physiological conditions this gene is already expressed at low levels, it is possible
317 that a median oxidative stress be able to suppress its expression and consequently, genes
318 that act in conjunction with its activation, such as *baxa* and *gadd45α*. Previously, was
319 discussed the possibility of the cells using other defense mechanisms against
320 xenobiotics, for example, the detoxification system with GSTs or activation of
321 antioxidants enzymes. These mechanisms can mitigate the toxic effects of oxidative
322 stress, not sure that is enough.

323 After 384 h of exposure, *p53* was overexpressed while the proto-oncogenes
324 *fosab* and *myca* were suppressed and the tumor suppressor genes *baxa* and *gadd45α*
325 reestablished their transcriptional levels, mainly in the intermediary dose. The *p53* gene
326 is considered the greatest genotoxic stress sensor, functioning as a transcriptional
327 transactivator in DNA repair, apoptosis and tumor suppression pathways (Fu et al.,
328 2005; Zegura et al., 2008). *p53* plays also important roles in the control of cell cycle

329 progression and cellular senescence in response to various cellular stressors (Storer and
330 Zon, 2010), for this, is possible that in the longer times, moderate exposures to MC led
331 to activation of specific genes, as *p53* and consequently, their target genes, in the
332 hepatocytes to prevent irreversible damage to the genetic material. Recent studies in
333 zebrafish have highlighted a varied ways in which *p53* can be regulated, including
334 phosphatases proteins and MAPK signaling pathway (Wu, 2004; Storer and Zon, 2010;
335 Wang et al., 2013), both related to the toxicity of microcystin.

336 In general, a variety of signaling pathways can affect the organisms and their
337 genes by MC. Many studies have revealed the potentially harmful effects of them, but
338 more extensive researches are needed to explore the toxicological mechanisms at the
339 molecular level (Rastogi et al., 2014). It is required mainly for not knowing the possible
340 toxicity pathways of *M. aeruginosa* extracts that containing other components in
341 addition to MC.

342

343 **5. Conclusion**

344 This study shows that exposure to *M. aeruginosa* extract containing [D-Leu¹]
345 MC-LR caused a suppression of gene expression in time-dependent manner in all genes
346 analyzed in the liver of zebrafish, but also led to the overexpression of *p53* at 384 h in
347 the moderate concentration.

348

349 **Acknowledgments**

350 Viviane Barneche Fonseca is a master's degree student of the Physiology Sciences Post-
351 Graduate Program at Federal University of Rio Grande, Brasil and had the support and
352 financial assistance through post-graduate scholarship funded by CAPES. This work

353 was supported by funds from the Brazilian agency CNPq, approved by Juliano Zanette
354 (480708/2013-4).

355

356 **References**

357 Abdel-Rahman, S., El-Ayouty, Y., Kamael, H., 1993. Characterization of heptapeptide
358 toxins extracted from *Microcystis aeruginosa* (Egyptian isolate). Int J Pept Protein
359 Res 41, 1–7.

360

361 Abramsson-Zetterberg, L., Sundh, U.B., Mattsson, R., 2010. Cyanobacterial extracts
362 and microcystin-LR are inactive in the micronucleus assay *in vivo* and *in vitro*.
363 Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 699, 5–10.

364 doi:10.1016/j.mrgentox.2010.04.001

365

366 Amado, L.L., Monserrat, J.M., 2010. Oxidative stress generation by microcystins in
367 aquatic animals: Why and how. Environ. Int. 36, 226–235.

368 doi:10.1016/j.envint.2009.10.010

369

370 Arnosti, D.N., 2004. Multiple mechanisms of transcriptional repression in eukaryotes.
371 HEP 166, 33–67.

372

373 Balcombe, J.P., Barnard, N.D., Sandusky, C., 2004. Laboratory routines cause animal
374 stress. Contemp. Top. Lab. Anim. Sci. 43, 42–51.

375

376 Best, J.H., Pflugmacher, S., Wiegand, C., Eddy, F.B., Metcalf, J.S., 2002. Effects of
377 enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR,

378 on glutathione S -transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.*
379 60, 223–231.
380
381 Cazenave, J., Bistoni, M.D.L.A., Pesce, S.F., Wunderlin, D.A., 2006. Differential
382 detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus*
383 experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquat. Toxicol.* 76, 1–12.
384
385 Chen, L., Xie, P., 2016. Mechanisms of microcystin-induced cytotoxicity and apoptosis.
386 *Mini Rev. Med. Chem.* 16. doi:10.2174/1389557516666160219130407
387
388 Cui, Z., Zhang, K., Qu, X., Liu, Q., 2011. Construction of differentially expressed genes
389 library of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) exposed to microcystin-LR using ssh
390 and expression profile of related genes. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 746–753.
391 doi:10.1016/j.fsi.2011.07.009
392
393 Dang, C. V., 2012. MYC on the path to cancer. *Cell* 149, 22–35.
394 doi:10.1016/j.cell.2012.03.003
395
396 Dang, C. V, Resar, L.M., Emison, E., Kim, S., Li, Q., Prescott, J.E., Wonsey, D., Zeller,
397 K., 1999. Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Exp. Cell Res.*
398 253, 63–77. doi:10.1006/excr.1999.4686
399
400 Delaney, J., Chiarello, R., Villar, D., Kandalam, U., Castejon, A.M., Clark, M. A.,
401 2008. Regulation of *c-fos* , *c-jun* and *c-myc* gene expression by angiotensin II in

402 primary cultured rat astrocytes: Role of ERK1/2 MAP kinases. *Neurochem. Res.*
403 33, 545–550. doi:10.1007/s11064-007-9474-y
404

405 De Felipe, C., Hunt, S.P., 1994. The differential control of *c-jun* expression in
406 regenerating sensory neurons and their associated glial cells. *J. Neurosci.* 14,
407 2911–2923.
408

409 Dias, E., Matos, P., Pereira, P., Batoréu, M.C.C., Silva, M.J., Jordan, P., 2010.
410 Microcystin-LR activates the ERK1/2 kinases and stimulates the proliferation of
411 the monkey kidney-derived cell line Vero-E6. *Toxicol. Vitro.* 24, 1689–1695.
412 doi:10.1016/j.tiv.2010.05.018
413

414 Ding, W.X., Shen, H.M., Ong, C.N., 2000. Microcystic cyanobacteria extract induces
415 cytoskeletal disruption and intracellular glutathione alteration in hepatocytes.
416 *Environ. Health Persp.*, 108, 605-609.
417

418 Falconer, I. R., Yeung, D. S. K., 1992. Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by
419 microcystis toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins.
420 *Chem. Biol. Interact.* 81, 181–196.
421

422 Fan, H., Cai, Y., Xie, P., Xiao, W., Chen, J., Ji, W., Zhao, S., 2014. Microcystin-LR
423 stabilizes c-myc protein by inhibiting protein phosphatase 2A in HEK293 cells.
424 *Toxicology* 319, 69–74. doi:10.1016/j.tox.2014.02.015

425 Fischer, W.J., Dietrich, D.R., 2000. Pathological and biochemical characterization of
426 microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*).
427 Toxicol. Appl. Pharmacol. 164, 73–81. doi:10.1006/taap.1999.8861
428

429 Fu, J., Xie, P., 2006. The acute effects of microcystin LR on the transcription of nine
430 glutathione S -transferase genes in common carp *Cyprinus carpio* L .. Aquat.
431 Toxicol. 80, 261–266.
432

433 Fu, W., Chen, J., Wang, X., Xu, L., 2005. Altered expression of *p53*, *bcl-2* and *bax*
434 induced by microcystin-LR *in vivo* and *in vitro*. Toxicol. 46, 171–177.
435 doi:10.1016/j.toxicol.2005.03.021
436

437 Gaudin, J., Huet, S., Jarry, G., Fessard, V., 2008. *In vivo* DNA damage induced by the
438 cyanotoxin microcystin-LR: Comparison of intra-peritoneal and oral
439 administrations by use of the comet assay. Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ.
440 Mutagen. 652, 65–71. doi:10.1016/j.mrgentox.2007.10.024
441

442 Gehringer, M.M., 2004. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: A
443 dualistic response. FEBS Lett. 557, 1–8. doi:10.1016/S0014-5793(03)01447-9
444

445 Glezer, I., Marcourakis, T., Christina, M., Avellar, W., Gorenstein, C., Scavone, C.,
446 2000. O fator de transcrição NF- k B nos mecanismos moleculares de ação de
447 psicofármacos. Rev. Bras. Psiquiatr. 22, 26–30.
448

449 Hayashi, M., Ueyama, T., Nemoto, K., Tamaki, T., Senba, E., 2000. Sequential mRNA
450 expression for immediate early genes, cytokines, and neurotrophins in spinal cord
451 injury. *J. Neurotrauma* 17, 203–218.

452

453 Jinlin, J., Xueyuan, G., Rui, S., Qian, Z., Jinju, G., Xiaorong, W., Liuyan, Y., 2011.
454 Time-dependent oxidative stress and histopathological changes in *Cyprinus carpio*
455 L. exposed to microcystin-LR. *Ecotoxicology* 20, 1000-1009.

456

457 Kondo, F., Ikai, Y., Oka, H., Okumura, M., Ishikawa, N., Harada, K., Matsuura, K.,
458 Murata, H., Suzuki, M., 1992. Formation, characterization, and toxicity of the
459 glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. *Chem.*
460 *Res. Toxicol.* 5, 591–596.

461

462 Li, H., Xie, P., Li, G., Hao, L., Xiong, Q., 2009. *In vivo* study on the effects of
463 microcystin extracts on the expression profiles of proto-oncogenes (*c-fos*, *c-jun* and
464 *c-myc*) in liver, kidney and testis of male Wistar rats injected i.v. with toxins.
465 *Toxicol* 53, 169–175. doi:10.1016/j.toxicol.2008.10.027

466

467 Li, Y., Ma, J., Fang, Q., Li, X., 2014. *c-fos* and *c-jun* Expression in the Liver of Silver
468 Carp and the Effect of Microcystins. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 28, 157–166.
469 doi:10.1002/jbt

470

471 Matthiensen, A., Beattie, K.A., Yunes, J.S., Kaya, K., Codd, G.A., 2000. [D-
472 Leu1]Microcystin-LR, from the cyanobacterium *Microcystis* RST 9501 and from a

473 Microcystis bloom in the Patos Lagoon estuary, Brazil. *Phytochemistry* 55, 383–
474 387. doi:10.1016/S0031-9422(00)00335-6
475
476 Meixner, A., Karreth, F., Kenner, L., Wagner, E.F., 2004. JunD regulates lymphocyte
477 proliferation and T helper cell cytokine expression. *Embo J* 23, 1325–35.
478 doi:10.1038/sj.emboj.7600133
479
480 Mezhoud, K., Bauchet, A.L., Château-Joubert, S., Praseuth, D., Marie, A., François,
481 J.C., Fontaine, J.J., Jaeg, J.P., Cravedi, J.P., Puiseux-Dao, S., Edery, M., 2008.
482 Proteomic and phosphoproteomic analysis of cellular responses in medaka fish
483 (*Oryzias latipes*) following oral gavage with microcystin-LR. *Toxicol* 51, 1431–
484 1439. doi:10.1016/j.toxicol.2008.03.017
485
486 Morel, Y., Barouki, R., 1999. Repression of gene expression by oxidative stress.
487 *Biochem. J.* 342, 481–496. doi:10.1042/0264-6021:3420481
488
489 Pavagadhi, S., Gong, Z., Hande, M.P., Dionysiou, D.D., de la Cruz, A.A.,
490 Balasubramanian, R., 2012. Biochemical response of diverse organs in adult *Danio*
491 *rerio* (zebrafish) exposed to sub-lethal concentrations of microcystin-LR and
492 microcystin-RR: A balneation study. *Aquat. Toxicol.* 109, 1–10.
493 doi:10.1016/j.aquatox.2011.11.009
494
495 Qiao, Q., Liu, W., Wu, K., Song, T., Hu, J., Huang, X., Wen, J., Chen, L., Zhang, X.,
496 2013. Female zebrafish (*Danio rerio*) are more vulnerable than males to

497 microcystin-LR exposure, without exhibiting estrogenic effects. *Aquat. Toxicol.*
498 142-143, 272–282. doi:10.1016/j.aquatox.2013.07.002
499
500 Rastogi, R.P., Sinha, R.P., Incharoensakdi, A., 2014. The cyanotoxin-microcystins:
501 current overview. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 13, 215–249.
502 doi:10.1007/s11157-014-9334-6
503
504 Rebouças, E.D.L., Jackson, J., Passos, M.J., Renato, J., Passos, D.S., Hurk, R. Van Den,
505 Roberto, J., Silva, V., 2013. Real Time PCR and Importance of Housekeepings
506 Genes for Normalization and Quantification of mRNA Expression in Different
507 Tissues. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 56, 143–154.
508
509 Schmidt, J. R., Wilhelm, S. W., Boyer, G. L., 2014. The fate of microcystins in the
510 environment and challenges for monitoring. *Toxins* 6, 3354–3387.
511
512 Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative
513 CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108. doi:10.1038/nprot.2008.73
514
515 Sharif, O., Bolshakov, V.N., Raines, S., Newham, P., Perkins, N.D., 2007.
516 Transcriptional profiling of the LPS induced NF- κ B response in macrophages 17,
517 1–17. doi:10.1186/1471-2172-8-1
518
519 Smart, R.C., Ewing, S.J., Loomis, K.D., 2008. Carcinogenesis. In: Smart, R. C. and
520 Hodgson, E. (Org) *Molecular and Biochemical Toxicology*. 4^a ed, New Jersey:
521 John Wiley & Sons, Hoboken, 932p., 535-586.

522 Svircev, Z., Baltić, V., Gantar, M., Juković, M., Stojanović, D., Baltić, M., 2010.
523 Molecular aspects of microcystin-induced hepatotoxicity and
524 hepatocarcinogenesis. *J. Environ. Sci. Health. C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol.*
525 *Rev.* 28, 39–59. doi:10.1080/10590500903585382
526
527 Storer, N.Y., Zon, L.I., 2010. Zebrafish models of p53 functions. *Cold Spring Harb.*
528 *Perspect. Biol.* 2, 1–12. doi:10.1101/cshperspect.a001123
529
530 Sueoka, E., Sueoka, N., Okabe, S., Kozu, T., Komori, A., Ohta, T., Suganuma, M.,
531 Kim, S.J., Lim, I.K., Fujiki, H., 1997. Expression of the tumor necrosis factor
532 alpha gene and early response genes by nodularin, a liver tumor promoter, in
533 primary cultured rat hepatocytes. *J Cancer Res Clin Oncol* 123, 413–419.
534 doi:10.1007/BF01372544
535
536 Swijsen, A., Nelissen, K., Janssen, D., Rigo, J., Hoogland, G., 2012. Validation of
537 reference genes for quantitative real-time PCR studies in the dentate gyrus after
538 experimental febrile seizures. *BMC Res. Notes* 5, 1-8.
539
540 Szremska, A.P., Kenner, L., Weisz, E., Ott, R.G., Passegué, E., Artwohl, M.,
541 Freissmuth, M., Stoxreiter, R., Theussl, H.C., Parzer, S.B., Moriggl, R., Wagner,
542 E.F., Sexl, V., 2003. JunB inhibits proliferation and transformation in B-lymphoid
543 cells. *Blood* 102, 4159–4165. doi:10.1182/blood-2003-03-0915
544

545 Tencalla, F., Dietrich, D., Schlatter, C., 1994. Toxicity of *Microcystis aeruginosa*
546 peptide toxins to yearling rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.*
547 30, 215–224.

548

549 Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., Borman, B. De, Coumans, B., 1999. Housekeeping
550 genes as internal standards: use and limits. *J Biotech.* 75, 291–295.

551

552 Vandesompele, J., Preter, K. De, Poppe, B., Roy, N. Van, Paepe, A. De, 2002. Accurate
553 normalization of real-time quantitative RT -PCR data by geometric averaging of
554 multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, 1–12.

555

556 Verde, P., Casalino, L., Talotta, F., Yaniv, M., Weitzman, J.B., 2007. Deciphering AP-1
557 function in tumorigenesis: Fra-ternizing on target promoters. *Cell Cycle* 6, 2633–
558 2639. doi:10.4161/cc.6.21.4850

559

560 Wang, X., Chen, Y., Zuo, X., Ding, N., Zeng, H., Zou, X., Han, X., 2013. Microcystin
561 (-LR) induced testicular cell apoptosis via up-regulating apoptosis-related genes in
562 vivo. *Food Chem. Toxicol.* 60, 309–317. doi:10.1016/j.fct.2013.07.039

563

564 Wei, L., Hoole, D., Sun, B., 2012. Identification of apoptosis-related genes and
565 transcription variations in response to microcystin-LR in zebrafish liver. *Toxicol.*
566 *Ind. Health* 30, 777–84. doi:10.1177/0748233712462443

567

568 Wei, L., Sun, B., Song, L., Nie, P., 2008. Gene expression profiles in liver of zebrafish
569 treated with microcystin-LR. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 26, 6–12.
570 doi:10.1016/j.etap.2007.12.007
571

572 Williams, D.E., Kent, M.L., Andersen, R.J., Klix, H., Holmes, C.F., 1995. Tissue
573 distribution and clearance of tritium-labeled dihydromicrocystin-LR epimers
574 administered to Atlantic salmon via intraperitoneal injection. *Toxicol.* 33, 125–13.
575

576 Wu, G.S., 2004. The functional interactions between the p53 and MAPK signaling
577 pathways. *Cancer Biol. Ther.* 3,156–161.
578

579 Yan, W., Zhou, Y., Yang, J., Li, S., Hu, D., Wang, J., Chen, J., Li, G., 2012.
580 Chemosphere waterborne exposure to microcystin-LR alters thyroid hormone
581 levels and gene transcription in the hypothalamic – pituitary – thyroid axis in
582 zebrafish larvae. *Chemosphere* 87, 1301–1307.
583 doi:10.1016/j.chemosphere.2012.01.041
584

585 Zegura, B., Straser, A., Filipic, M., 2011. Genotoxicity and potential carcinogenicity of
586 cyanobacterial toxins - a review. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 727, 16–41.
587 doi:10.1016/j.mrrev.2011.01.002
588

589 Zegura, B., Zajc, I., Lah, T.T., Filipic, M., 2008. Patterns of microcystin-LR induced
590 alteration of the expression of genes involved in response to DNA damage and
591 apoptosis. *Toxicol.* 51, 615–623. doi:10.1016/j.toxicol.2007.11.009

TABLES

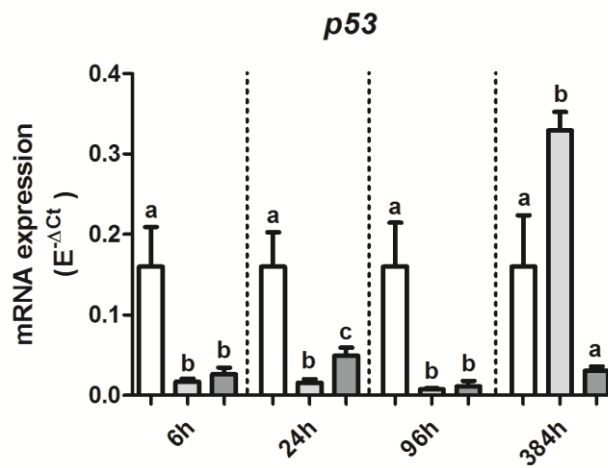
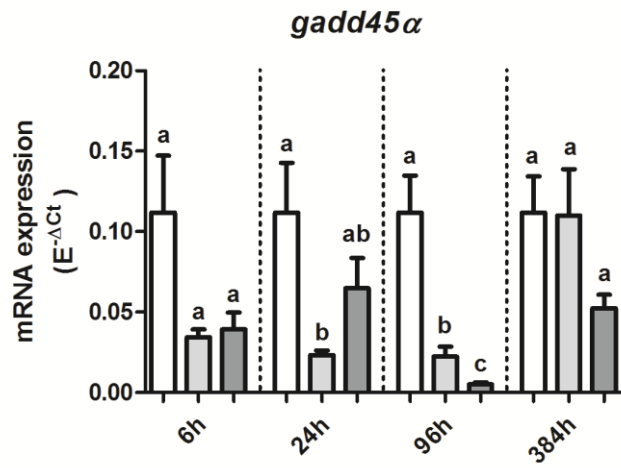
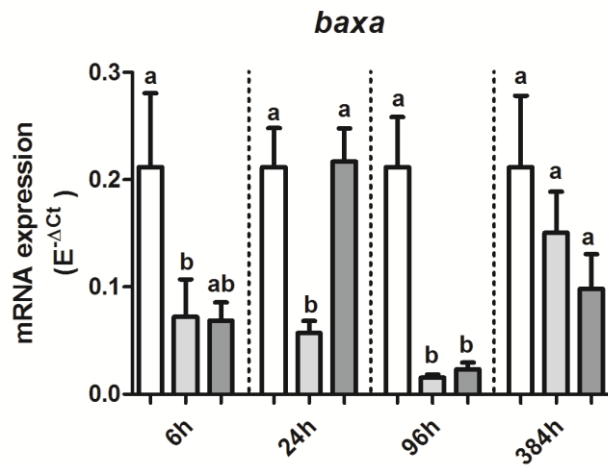
Table 1: Primers of the selected genes for quantitative real-time PCR.

		Forward Primer (5-3')	Reverse Primer (5-3')
Target	<i>fosab</i>	TCATGCCCCGGACTTGCAGTG	AGGATTGAGCTGCGCCGTTG
	<i>junba</i>	GCGGACGGATTCGTCAAAGC	CGCCACCGAACAACTCGACA
	<i>myca</i>	ATCCGTCAACGCGGCATGA	TCGCACACTTGCCTGCTTC
	<i>p53</i>	ACTATCCCGGCGATCATGGA	CGTCCACCACCATTTGAACG
	<i>baxa</i>	TTCATCAGAGTGGCCCGTGA	TGACAAGGCGACAGGCAAAG
	<i>gadd45a</i>	ATCAACATCCTGCGCGTGAA	TGGAACCGTGACCAGAATGC
Housekeeping	<i>18s rRNA</i>	AGGGACAAGTGGCGTTCAGC	GCAGGGTAGGCACACGTTGA
	<i>b2m</i>	GCCTTCACCCAGAGAAAGG	GCGGTTGGGATTTACATGTTG
	<i>g6pdh</i>	GTGGAGTCTACTGGTGTCTTC	GTGCAGGAGGCATTGCTTACA

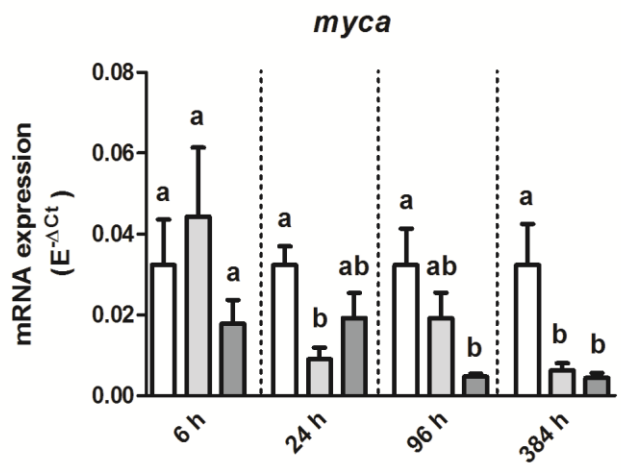
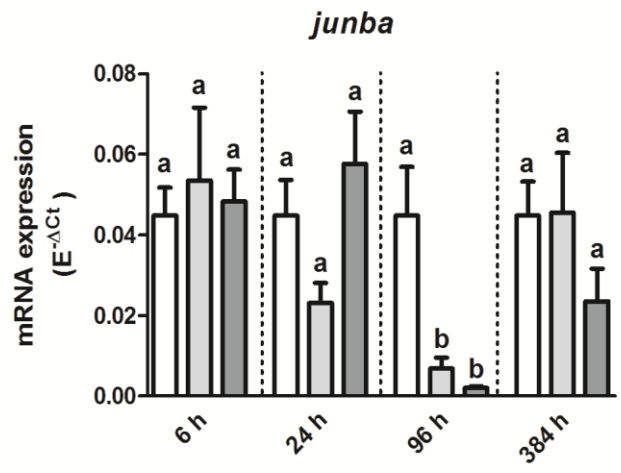
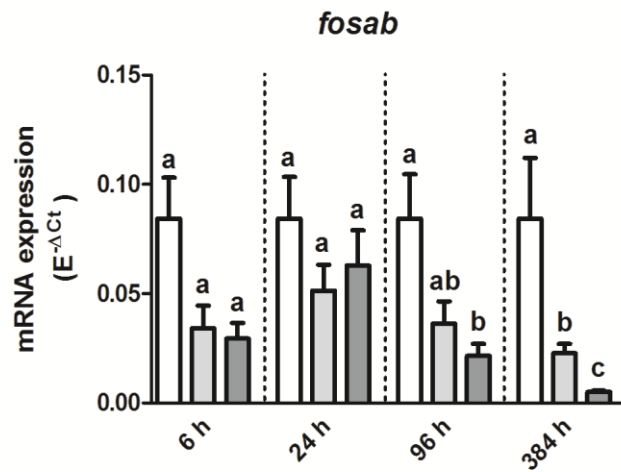
FIGURE CAPTIONS

Fig. 1. Changes of tumor suppressor genes transcript after *M. aeruginosa* extracts exposure compared with the controls. All expression values were transformed to logarithmic and normalized to the value of *18s rRNA*, *b2m* and *g6pdh* genes. Significance is indicated as $p < 0.05$.

Fig. 2. Changes of proto-oncogene transcript after *M. aeruginosa* extracts exposure compared with the controls. All expression values were transformed to logarithmic and normalized to the value of *18s rRNA*, *b2m* and *g6pdh* genes. Significance is indicated as $p < 0.05$.



- 0 ppm of *M. aeruginosa* extract
- 25 ppm of *M. aeruginosa* extract
- 250 ppm of *M. aeruginosa* extract



0 ppm of *M. aeruginosa* extract
 25 ppm of *M. aeruginosa* extract
 250 ppm of *M. aeruginosa* extract

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table: Relative gene expression values of the housekeeping genes for the E^{ct} calculation (* represents statistical significance of $p < 0.05$).

		<i>18s rRNA</i>	<i>b2m</i>	<i>g6pdh</i>	<i>Média</i>
6h	C0	2,66E-02 ± 2,30E-02	1,72E-05 ± 1,63E-05	1,38E-06 ± 1,15E-06	8,86E-03 ± 7,67E-03
	C50	1,69E-02 ± 1,88E-02	7,57E-06 ± 9,96E-06	5,20E-07 ± 4,94E-07	5,64E-03 ± 6,29E-03
	C500	1,50E-02 ± 1,38E-02	7,24E-06 ± 3,94E-06	4,42E-07 ± 5,61E-07	5,00E-03 ± 4,60E-03
24h	C0	6,14E-02 ± 2,36E-02	7,24E-05 ± 6,54E-05	1,73E-06 ± 1,54E-06	2,05E-02 ± 7,89E-03
	C50	2,89E-02 ± 3,43E-02	2,70E-05 ± 3,96E-05	6,54E-07 ± 7,36E-07	9,65E-03 ± 1,14E-02
	C500	4,27E-02 ± 3,09E-02	1,13E-04 ± 1,24E-04	9,76E-07 ± 1,02E-06	1,43E-02 ± 1,04E-02
96h	C0	1,24E-03 ± 2,07E-03	1,70E-06 ± 1,16E-06	5,20E-07 ± 5,98E-07	4,14E-04 ± 6,92E-04
	C50	6,82E-04 ± 1,18E-03	1,80E-06 ± 2,20E-06	1,34E-07 ± 1,58E-07	2,28E-04 ± 3,93E-04
	C500	5,00E-04 ± 7,11E-04	1,08E-06 ± 1,04E-06	1,08E-07 ± 1,28E-07	1,67E-04 ± 2,37E-04
384h	C0	1,24E-05 ± 2,41E-05	2,01E-07 ± 1,74E-07	4,51E-08 ± 2,57E-08	4,20E-06 ± 8,09E-06
	C50	3,65E-06 ± 5,71E-06	1,01E-07 ± 1,08E-07	1,65E-08 ± 1,08E-08 *	1,25E-06 ± 1,94E-06
	C500	2,38E-07 ± 3,13E-07 *	1,22E-08 ± 7,71E-09 *	1,04E-08 ± 7,67E-09 *	8,70E-08 ± 1,10E-07 *

HIGHLIGHTS

- Exposure to *M. aeruginosa* extract caused a time-dependent transcriptional response.
- The tumor suppressor genes *baxa*, *gadd45a* and *p53* were repressed in shorter times (6 and 24 hours) and the proto-oncogenes *fosab*, *junba* and *myca* were repressed in longer times (96 and 384 hours).
- *p53* was the only induced gene after 16 days of exposure in the intermediary concentration tested.
- The housekeeping genes *18s rRNA*, *b2m* and *g6pdh* were repressed at 384 hours.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- MC-LR do extrato de *M. aeruginosa* não provocou, em nenhum dos tempos de exposição e concentrações testadas, indução na expressão dos proto-oncogenes *fosab*, *junba* e *myca*, os quais são relacionados com a carcinogênese. Portanto, mais estudos necessitam ser realizados para compreender os mecanismos envolvidos com a promoção tumoral através da contaminação por extratos de cianobactérias produtores de toxinas.

- Os genes relacionados à supressão tumoral (*baxa*, *gadd45a* e *p53*) foram suprimidos nos tempos de 24 e 96 h. O gene *p53* sofreu repressão já em 6h e sua inibição provavelmente ocorreu a partir do estresse oxidativo gerado pelas exposições. No entanto, após 16 dias, *p53* apresentou uma indução na sua expressão gênica na concentração $3.5 \mu\text{g.L}^{-1}$ [D-Leu¹] MC-LR.

- Os três proto-oncogenes foram reprimidos nos tempos mais longos (96 e 384h) para as duas doses testadas, com exceção de *junba* que restabeleceu seus níveis transcricionais em 16 dias.

- Dependendo do tempo e vias de exposição, assim como as doses utilizadas, as células fazem uso de diferentes mecanismos defensivos, visando à manutenção de todas suas funções vitais, porém muitas vezes esses mecanismos não são suficientes para manter a homeostase celular, então as células passam a economizar energia e apenas sobrevivem ao estresse, deixando ativas apenas funções extremamente importantes.

6. PERSPECTIVAS

Com relação a este trabalho, surgiram muitas possibilidades pertinentes para a sua continuação e que contribuiriam para um melhor entendimento sobre os resultados obtidos. Diversos testes podem e provavelmente serão aplicados de forma a contribuir com o presente estudo:

- Histopatologia do fígado para avaliação de danos hepáticos;
- Expressão gênica de isoformas de Oatps para verificar se está ocorrendo a importação da microcistina pelo órgão-alvo;
- Expressão gênica ou *Western blotting* para proteínas fosfatases PP1 e PP2A, além das proteínas da via MAPK, como MEK e ERK para verificar se a alteração na transcrição gênica dos genes estudados está relacionada com os efeitos da microcistina nessas proteínas, já documentados;
- Análises relacionadas ao estresse oxidativo, visto que o mesmo pode afetar diversas vias e, conseqüentemente, causar danos ao tecido hepático e alterações na expressão de genes.
- Expressão gênica de GSTs, para corroborar a hipótese de que o organismo está economizando sua energia para transcrição de uma série de outros genes, o que leva à supressão. Ao mesmo tempo, as células estariam gastando energia para expressão de enzimas do sistema de detoxificação, a fim de biotransformar e eliminar a microcistina.

7. ANEXO

Aprovação do projeto de dissertação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais na Universidade Federal do Rio Grande.

COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL

Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Pesquisa e Pós-Graduação - PROPESP
ceua@furg.br http://www.propesp.furg.br

CEUA



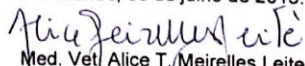
GERTIFICADO Nº P029/2015

Certificamos que o projeto intitulado "**Efeito da microcistina-LR do extrato de *Microcystis aeruginosa* na regulação de proto-oncogenes da via MAPK em *Danio rerio***", protocolo nº 23116.002456/2015-05, sob a responsabilidade de Juliano Zanette - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE (CEUA-FURG), em reunião de 24 de junho de 2015 (Ata 009/2015).

A CEUA lembra aos pesquisadores que qualquer alteração no protocolo experimental ou na equipe deve ser encaminhada à comissão para avaliação e aprovação. Um relatório final deve ser enviado à CEUA no término da vigência do seu projeto.

CEUA Nº	Pq008/2015
VIGÊNCIA DO PROJETO	30/06/16
ESPÉCIE/ LINHAGEM	<i>Danio rerio</i>
NÚMERO DE ANIMAIS	160
PESO/ IDADE	1-2 g; adulto
SEXO	macho
ORIGEM	Redfish - Rua Tenente Ary Tarragô, 891 - Petrópolis, Porto Alegre - RS, 91225-000 Telefone:(51) 3338-6226
ENVIO DO RELATÓRIO FINAL	Julho de 2016

Rio Grande, 08 de julho de 2015.


Med. Vet. Alice T. Meirelles Leite
Coordenadora da CEUA-FURG