UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

CAROLINE HOFF RISSETI

Moléculas bioativas e filogenia de isolados brasileiros de cianobactérias dos gêneros *Dolichospermum*, *Sphaerospermopsis, Cuspidothrix, Cylindrospermopsis* e *Microcystis*

Piracicaba
2012

CAROLINE HOFF RISSETI

Moléculas bioativas e filogenia de isolados brasileiros de cianobactérias dos gêneros *Dolichospermum*, *Sphaerospermopsis, Cuspidothrix, Cylindrospermopsis* e *Microcystis*

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore

Piracicaba

2012

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Risseti, Caroline Hoff
Moléculas bioativas e filogenia de isolados brasileiros de cianobactérias dos gêneros *Dolichospermum*, *Sphaerospermopsis*, *Cuspidothrix*, *Cylindrospermopsis* e *Microcystis* / Caroline Hoff Risseti; orientadora Marli de Fátima Fiore. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.
170 p.: il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Cromatografia líquida 2. ELISA 3. Espectrometria de massas 4. Genomas 5. Reação em cadeia por polimerase 6. Sequenciamento genético 7. Toxinas I. Título

CDU (575.111 : 579) 577.19

Dedico

Aos meus pais João e Nadir e ao meu irmão Giuliano. Sem vocês eu não teria chegado até aqui

Ofereço

Ao meu marido Caio pelo amor, compreensão, paciência, carinho e atenção

"*A mente que se abre a uma nova ideia*
nunca mais volta ao seu tamanho original".
(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por mais este sonho realizado.

À Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore pela orientação, confiança e amizade. Obrigada pela oportunidade concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo pela oportunidade e estrutura oferecida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Aos meus familiares, Vano, Lola, Lurdes, minha sobrinha Maria Fernanda, D. Leila, Sr. Fernando (in memorian), Simone e Jorge. Obrigada pelo apoio incondicional sempre.

A minha comadre e irmã do coração Lucélia pela amizade, acolhida em sua casa e apoio sempre.

Aos amigos Patricia e Danillo pela ajuda, parceria, mas principalmente pela amizade. ¨Pati vou sentir sua falta¨.

À Dra. Maria Estela Stenico pelas contribuições, sugestões e amizade.

Às amigas Ana Paula, Andresa, Elaine, Karina e aos amigos Diego e Marcelo. Obrigada pela ajuda na revisão da tese, pelas conversas, risadas, cafés e apoio.

Às amigas que agora estão longe e que deixaram saudade Adriana, Ana Cláudia, Beatriz, Bruna, Caroline, Isabela, Janaína, Lúcia, Luciana, Mariana, Marina, Natália, Paula e Tânia pela ajuda e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Ernani Pinto, ao Dr. Felipe A. Dörr e ao Dr. Ronaldo Leal Carneiro pelos ensinamentos e parcerias realizadas.

À Profa. Vera Regina Werner e ao amigo Dr. Ricardo Yukio Honda pelas linhagens cianobacterianas.

À Profa. Dra. Siu Mui Tsai pelo suporte oferecido.

À Bibliotecária Chefe Marília pela ajuda prestada e compreensão.

Aos funcionários do CENA em especial a Neuda e ao Fábio da Secretaria de Pós-Graduação, a Ana Cláudia, ao Chiquinho e ao Fábio do Lab. de Biologia Celular e Molecular.

Aos Professores e Colegas do Laboratório de Polimorfismo de DNA da UFPA.

Ao Prof. Dr. Luiz Coutinho e ao Dr. Gustavo Gasparin.

A todos os amigos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

HOFF-RISSETI, C. **Moléculas bioativas e filogenia de isolados brasileiros de cianobactérias dos gêneros *Dolichospermum*, *Sphaerospermopsis, Cuspidothrix, Cylindrospermopsis* e *Microcystis***. 2012. 170 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

O número crescente de descobertas de substâncias bioativas produzidas pelo metabolismo secundário de cianobactérias tem despertado o interesse de grupos de pesquisa no mundo todo com o objetivo comum de descrever e explorar estas moléculas e entender a sua biossíntese. No Brasil, as pesquisas sobre moléculas bioativas produzidas por linhagens de cianobactérias nativas são escassas. Neste trabalho, utilizando iniciadores específicos da PCR e sequenciamento, a presença de genes envolvidos na biossíntese da neurotoxina saxitoxina (STX) foi confirmada em representantes dos gêneros *Dolichospermum, Sphaerospermopsis*, *Cuspidothrix* e *Cylindrospermopsis*, enquanto que genes da citotoxina cilindrospermopsina (CYN) foram detectados somente em representantes de *Cylindrospermopsis*. Genes envolvidos com a produção dos inibidores enzimáticos, microviridina (MDN) e a cianobactina microciclamida (MCA) foram sequenciados em isolados do gênero *Microcystis*. Os genomas das linhagens de *Cylindrospermopsis raciborskii* CENA302 e CENA303 foram sequenciados usando a plataforma HiScan SQ (Ilumina) com biblioteca pareada 2 x 100 pb. O genoma da *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024 foi sequenciado utilizando a plataforma Ion Torrent (Life Technologies) com tamanhos de fragmentos de até 200 pb. As tentativas de montagem *ab initio* dos genomas foram realizadas e o agrupamento gênico da saxitoxina (28 kb) da linhagem *C. raciborskii* CENA302 foi identificado e caracterizado. As análises filogenéticas das sequências de aminoácidos envolvidos com a biossíntese das moléculas bioativas avaliadas demonstraram que os isolados brasileiros de cianobactérias formam clados com elevado valor de reamostragem com sequências homólogas de cianobactérias conhecidas como produtoras dessas moléculas. Neste estudo é relatada pela primeira vez a presença de genes *cyr* em linhagens da América do Sul de *C. raciborskii* e a presença simultânea de genes *cyr* e *sxt* em uma única linhagem de *C. raciborskii*. Além disso, este é o primeiro estudo que relata a presença de genes envolvidos na biossíntese de MDN e MCA nas espécies de cianobactérias *M. protocystis*, *M. panniformis* e *M. wesenbergii*. Análises por espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida (LC-MS) e imunoensaio enzimático (ELISA) foram utilizadas a fim de detectar e identificar variantes estruturais das moléculas bioativas das cianobactérias que tiveram os genes biossintéticos sequenciados. A análise de LC-MS mostrou a produção das variantes GTX2, GTX3, STX e dc-STX pela linhagem *C. raciborskii* CENA302, enquanto que a linhagem *C. raciborskii* CENA305 apresentou as variantes NEO, C1 e dcGTX3. As quatro novas variantes de MCY, [D-Val^1]MC-RR, [D-Leu/Ile^1]MC-RR, [D-Leu/Ile^1]MC-YR e [D-Phe^1]MC-LR, foram encontradas nas espécies *M. panniformis* SPC702 e *M. protocystis* SPC697. Este é o primeiro relato da produção de MCY por essas duas espécies de *Microcystis*. Dezesseis linhagens que ainda não possuíam as sequências do gene de RNAr 16S foram sequenciadas. O resultado da análise filogenética das sequências do gene de RNAr 16S foi coerente com as descrições morfológicas, sendo que todas as linhagens foram caracterizadas em nível de espécie. As informações geradas neste estudo contribuem para o aumento do conhecimento da diversidade metabólica dos isolados brasileiros de cianobactérias e trazem nova visão sobre a evolução dessas moléculas produzidas pelo metabolismo secundário.

Palavras-chave: PCR. Substâncias Bioativas. NGS. LC-MS. ELISA. Filogenia.

ABSTRACT

HOFF-RISSETI, C. **Bioactive molecules and phylogeny of Brazilian cyanobacterial isolates from genera *Dolichospermum*, *Sphaerospermopsis*, *Cuspidothrix*, *Cylindrospermopsis* and *Microcystis*.** 2012**.** 170 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

The growing numbers of discoveries of bioactive substances produced by cyanobacterial secondary metabolism has attracted the interest of research groups around the world with the common goal of describing and exploring these molecules and understanding their biosynthesis. In Brazil, researches on bioactive molecules produced by native cyanobacterial strains are scarce. In this work, using specific PCR primers and sequencing, the presence of genes involved in the biosynthesis of the neurotoxin saxitoxin (STX) was confirmed in representatives of the genera *Dolichospermum*, *Sphaerospermopsis*, *Cuspidothrix* and *Cylindrospermopsis*, while genes of the cytotoxin cylindrospermopsin (CYN) were detected only in representatives of *Cylindrospermopsis*. Genes involved in the production of protease inhibitors, microviridin (MDN) and the cianobactin microciclamide (MCA), were sequenced in isolates of the genus *Microcystis*. The genomes of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains CENA302 and CENA303 were sequenced using the high-throughput platform HiScan SQ (Illumina) as paired-ends 2 x 100 bp. The *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024 genome was sequenced using the high-throughput platform Ion Torrent (Life Technologies) with fragment sizes up to 200 bp. Attempts of *ab initio* genomes assembly were performed and the 28 kb saxitoxin gene cluster of *C. raciborskii* strains CENA302 was identified and characterized. Phylogenetic analyses of amino acid sequences involved in the biosynthesis of the bioactive molecules evaluated showed that the Brazilian cyanobacterial isolates formed clades with high bootstrap values with homologous sequences of known cyanobacterial producers of these molecules. In this study is reported for the first time the presence of *cyr* genes in South America strains of *C. raciborskii* and the simultaneous presence of *cyr* and *sxt* genes in a single *C. raciborskii* strain. Furthermore, this is the first study reporting the presence of genes involved in the biosynthesis of MDN and MCA in the cyanobacterial species *M. protocystis*, *M. panniformis* e *M. wesenbergii*. Analyses by mass spectrometry coupled to liquid chromatography (LC-MS) and enzyme immunoassay (ELISA) were used to detect and identify structural variants of bioactive molecules of the cyanobacteria that had the biosynthetic genes sequenced. Analysis of LC-MS showed the production of the variants GTX2, GTX3, STX and dc-STX by the *C. raciborskii* strain CENA302, whereas the strain *C. raciborskii* CENA305 presented the variants NEO, C1 and dcGTX3. The new four MCY variants [D-Val^1]MC-RR, [D-Leu/Ile^1]MC-RR, [D-Leu/Ile^1]MC-YR and [D-Phe^1]MC-LR were found in the species *M. panniformis* SPC702 and *M. protocystis* SPC697. This is the first report of the MCY production by these two species of *Microcystis*. Sixteen strains that still lacked the 16S rRNA gene sequences were sequenced. The result of the phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences was consistent with the morphological descriptions, and all strains were characterized to species level. The informations generated in this study contribute to the increase of knowledge on metabolic diversity of Brazilian cyanobacterial strains and bring new insight into the evolution of these molecules produced by secondary metabolism.

Keywords: PCR. Bioactive compounds. NGS. LC-MS. ELISA. Phylogeny.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática dos domínios enzimáticos em A) peptídeo sintetase não-ribossômica (NRPS); e B) policetídeo sintase (PKS) _____ 28

Figura 2 - Organização característica da biossíntese ribossomal de um agrupamento gênico 29

Figura 3 - Estrutura da cilindrospermopsina e suas variantes naturais _____ 30

Figura 4 - Organização estrutural do agrupamento gênico *cyr* em três cianobactérias _____ 34

Figura 5 - Via biossintética da cilindrospermopsina_____ 35

Figura 6 - Estrutura da saxitoxina e suas variantes naturais mais conhecidas _____ 38

Figura 7 - Organização estrutural do agrupamento gênico *sxt* em cinco cianobactérias ____ 41

Figura 8 - Via biossintética da saxitoxina _____ 43

Figura 9 - Estrutura química da anatoxina-a e seu homólogo homoanatoxina-a _____ 44

Figura 10 - Organização estrutural do agrupamento de genes putativos responsáveis pela biossíntese de anatoxina-a e homoanatoxina-a em *Oscillatoria* PCC 6506 e suas funções _____ 45

Figura 11 - Rota biossintética proposta para anatoxina-a e homoanatoxina-a é iniciada por uma prolina. KS - Cetosintase, AT - Aciltransferase, KR - Cetoredutase, DH - Dehidratase, ER - Enoil Redutase, ACP - Proteína Carreadora de Acila, Cy – Ciclase e CM – Metiltransferase _____ 45

Figura 12 - Estrutura química da anatoxina-a(s) _____ 46

Figura 13 - Via biossintética proposta para anatoxina-a(s). A biossíntese de anatoxina-a(s) envolve a perda de uma glicina da arginina _____ 48

Figura 14 - Estrutura da microcistina (MCY). Os aminoácidos (X e Z) e o grupo R1 (em cinza) são variáveis conforme tabela à direita. Os sete aminoácidos que formam a molécula de MCY (heptapeptídeos cíclicos) estão numerados de 1 a 7 _____ 49

Figura 15 - Domínios estruturais das multienzimas envolvidas na biossíntese de microcistina. KS: β-cetoacil sintase; AT: aciltransferase; ACP: proteína carreadora de acila; KR: cetoacil redutase; DH: dehidratase; CM: C-metiltransferase; OM: O-metiltransferase; NM: N-metiltransferase; AMT: aminotransferase; RC: racemase. Azul: PKS; Verde: PS; Cinza: Enzimas de acabamento e finalização, ¨tailoring enzymes¨ _____ 51

Figura 16 - Estrutura das microviridinas B e J. As pontes ω-éster e ω-amida estão destacadas em vermelho _____ 53

Figura 17 - Representação esquemática do agrupamento gênico da microviridina B em *M. aeruginosa* NIES-298 _____ 54

Figura 18 - Estrutura das microciclamidas 7806A e 7806B de *M. aeruginosa* PCC7806 determinado por análises de RMN e MS _____ 55

Figura 19 - Representação esquemática do agrupamento gênico da microciclamida em *M. aeruginosa* NIES-298 e PCC7806. Genes que apresentam similaridade com os genes envolvidos na biossíntese do composto patelamida em *P. didemni* estão

mostrados em cinza. A proteína precursora está realçada em preto. As ORFs, que não podem ser atribuídas à biossíntese de microciclamida, estão em cinza claro 56

Figura 20 - Árvore filogenética de sequências de aminoácidos Cyr. CyrA (A), CyrB (B) e CyrC (C). As linhagens utilizadas neste estudo estão em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% nas análises de ML/NJ estão apresentados em cada nó _____ 85

Figura 21 - Percentual de similaridade das sequências de aminoácidos Cyr de *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 com sequências de linhagens de cianobactérias produtoras de CYN _____ 86

Figura 22 - Análises por LC-UV-MS da cultura de *C. raciborskii* CYP-011K. Traço UV a 262 nm e cromatograma extraído do íon para CYN (*m/z* 418) e 7-deoxy-CYN (*m/z* 400) (A). Espectro do íon produzido e espectro de absorção UV estão apresentados para CYN (B e C) e 7-deoxy-CYN (D e E) _____ 88

Figura 23 - Árvore filogenética de sequências de aminoácidos Sxt. SxtA (A), SxtB (B) e SxtI (C). As linhagens analisadas neste estudo estão em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% nas análises de ML/NJ estão apresentados em cada nó _____ 91

Figura 24 - Percentual de similaridade das sequências de aminoácidos Sxt das linhagens estudadas com sequências homólogas de linhagens de cianobactérias produtoras de STX _____ 94

Figura 25 - Cromatogramas de HPLC-FD para STXs. Mistura de padrões (A), CENA302 (B), T3 (C) e CENA305 (em rosa) e mistura de padrões (D) _____ 96

Figura 26 - Cromatograma mostrando o pico de ANTX-A(S) produzida pela linhagem *S. torques-reginae* ITEP-024 no tempo de retenção de 11,8 min (A); Espectro ESI-MS/MS de ANTX-A(S) (B)_____ 101

Figura 27 - Variantes estruturais de MCY produzidas pelas linhagens *M. protocystis* SPC697 e *M. panniformis* SPC702. O círculo pontilhado destaca o aminoácido D-Ala na posição 1 da molécula de MCY que foi substituído pelos aminoácidos descritos na Tabela. X e Z representam L-aminoácidos variáveis _____ 103

Figura 28 - Espectros LC-MS/MS de MCY. A) Perfil cromatográfico das linhagens SPC697 e SPC702; B) Perfil cromatográfico da linhagem SPC697 (os números indicam os picos selecionados e fragmentados); C - F) Espectros MS^2 dos picos selecionados _____ 105

Figura 29 - Árvore filogenética de sequências de aminoácidos Mdn. MdnA (A), MdnB (B) e MdnC (C). As linhagens utilizadas neste estudo estão em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% nas análises de ML/NJ estão apresentados em cada nó _____ 108

Figura 30 - Percentual de similaridade das sequências de aminoácidos Mdn das linhagens estudadas com sequências de linhagens de cianobactérias produtoras de MDN 110

Figura 31 - Diversidade das sequências de aminoácidos do precursor MdnA em *Microcystis*. Negrito: linhagens estudadas. Cinza: sequência de aminoácidos comum para todas as linhagens; Vermelho: aminoácidos que apresentam a mesma posição dentro da sequência e; Amarelo: aminoácidos diferentes dentro da sequência _____ 111

Figura 32 - Árvore filogenética de sequências de aminoácidos Mca. McaA (A) e McaD (B) As linhagens utilizadas neste estudo estão em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% nas análises de ML/NJ estão apresentados em cada nó _____ 113

Figura 33 - Percentual de similaridade das sequências de aminoácidos Mca das linhagens estudadas com as sequências de linhagens produtoras ou potencialmente produtoras de MCA _____ 114

Figura 34 - Cobertura alcançada pela montagem do agrupamento gênico *sxt* das linhagens CENA302 (A) e CENA303 (B) utilizando como referência a linhagem *C. raciborskii* T3 _____ 116

Figura 35 - Agrupamento gênico *sxt* das linhagens brasileiras *C. raciborskii* CENA302 (montagem ab initio), *C. raciborskii* CENA303 (montagem por referência), *R. brookii* D9 e *C. raciborskii* T3 _____ 119

Figura 36 - Via biossintética de STX proposta por Mihali et al. (2009) para as linhagens *Anabaena circinalis* AWQC131C e *Aphanizomenon* sp. NH-5. Em vermelho, genes ausentes no genoma de CENA302 e CENA303. O gene *sxtN* cataliza a sulfatação (círculos azuis) do O-22 gerando as variantes GTX2 e GTX3, e do N-21 gerando as variantes C1 e C2. O gene *sxtX* cataliza a hidroxilação do N-1 da saxitoxina, gerando a variante neosaxitoxina. As setas pontilhadas indicam reações adicionais, mas não essenciais, e a caixa pontilhada indica reações presentes somente na linhagem *Aphanizomenon* sp. NH-5 _____ 120

Figura 37 - Variantes estruturais de STX. Em vermelho estão as toxinas produzidas pela linhagem *C. raciborskii* CENA302 _____ 121

Figura 38 - Árvore filogenética das sequências de nucleotídeos do agrupamento gênico *sxt*. A linhagem utilizada neste estudo está em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% nas análises de ML/NJ estão apresentados em cada nó _____ 123

Figura 39 - Identidade de algumas sequências do genoma de *S. torques-reginae* ITEP-024 com outras cianobactérias _____ 125

Figura 40 - Análise filogenética de sequências do gene de RNAr 16S. As sequências utilizadas neste estudo estão em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% na análise ML/NJ estão apresentados em cada nó _____ 127

Figura 41 - Fotomicrografias das linhagens de cianobactérias do gênero *Dolichospermum crassum.* A-C) CENA194; D-F) CENA195; G-I) CENA197_____ 128

Figura 42 - Fotomicrografias das linhagens de cianobactérias do gênero *Dolichospermum crassum.* A-C) CENA203; D-F) CENA204; G-I) CENA301 _____ 129

Figura 43 - Fotomicrografias das linhagens de cianobactérias do gênero *Dolichospermum crassum.* A-C) CENA200; D-F) CENA201. Linhagem do gênero *Dolichospermum planctonicum* CENA211, G-I _____ 130

Figura 44 – Fotomicrografias das linhagens de cianobactérias do gênero *Cylindrospermopsis raciborskii.* A) CENA302; B) CYP-011K; C) CENA303; D) CENA305; E) CENA306; F) Detalhes do tricoma das linhagens estudadas _____ 132

Figura 45 - Fotomicrografias das linhagens de cianobactérias do gênero *Sphaerospermopsis torques-reginae.* A-C) ITEP-024; D-F) ITEP-026 _____ 133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Substâncias naturais bioativas produzidas por cianobactérias _____ 26

Tabela 2 - Tamanho do agrupamento gênico da cilindrospermopsina para seis cianobactérias descritas _____ 32

Tabela 3 - Tamanho do agrupamento gênico da saxitoxina para seis cianobactérias descritas 40

Tabela 4 - Tamanho do agrupamento gênico da microcistina para cinco cianobactérias descritas _____ 50

Tabela 5 - Tamanho do agrupamento gênico da microviridina para quatro cianobactérias descritas _____ 54

Tabela 6 - Tamanho do agrupamento gênico da microciclamida para duas cianobactérias descritas _____ 56

Tabela 7 - Linhagens brasileiras de *Dolichospermum*, *Cuspidothrix*, *Sphaerospermopsis*, *Cylindrospermopsis* e *Microcystis* utilizadas neste estudo _____ 64

Tabela 8 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação fragmentos de genes de substâncias bioativas _____ 67

Tabela 9 - Reagentes utilizados nas reações de PCR para amplificação dos fragmentos gênicos de interesse _____ 68

Tabela 10 - Ciclagem das reações de amplificação por PCR dos fragmentos gênicos_____ 68

Tabela 11 - Resultados de amplificação e sequenciamento de fragmentos gênicos, e produção de substâncias bioativas. _____ 81

Tabela 12 - Sequências de aminoácidos MdnA de diferentes microviridinas _____ 1111

Tabela 13 - Informações sobre as leituras obtidas utilizando a plataforma HiScan SQ (Illumina) _____ 116

Tabela 14 - Descrição do agrupamento gênico *sxt* das linhagens CENA302 (montagem *ab initio*) e CENA303 (montagem por referência) sequenciadas neste estudo, e das linhagens brasileiras T3 e D9 _____ 118

Tabela 15 - Identidade e cobertura das sequências gênicas *sxt* da linhagem CENA302 em comparação com as linhagens T3 e D9 _____ 122

Tabela 16 - Informações sobre as leituras obtidas utilizando a plataforma Ion Torrent____ 124

Tabela 17 - Similaridade entre as sequências do gene de RNAr 16S obtidas e sequências disponíveis no GenBank (NCBI) com a ferramenta de alinhamento BLASTN 131

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 19
2. REVISÃO DE LITERATURA 22
2.1 OS GÊNEROS *DOLICHOSPERMUM*, *SPHAEROSPERMOPSIS*, *CUSPIDOTHRIX*, *CYLINDROSPERMOPSIS* E *MICROCYSTIS* 22
2.2 SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS PRODUZIDAS POR CIANOBACTÉRIAS 25
2.2.1 CILINDROSPERMOPSINAS 30
2.2.2 SAXITOXINAS 37
2.2.3 ANATOXINA-A, HOMOANATOXINA-A E ANATOXINA-A(S) 44
2.2.4 PEPTÍDEOS CÍCLICOS 48
2.2.4.1 Microcistina 48
2.2.4.2 Microviridinas 52
2.2.4.3 Microciclamida 55
2.3 SEQUENCIAMENTO DE GENOMAS DE CIANOBACTÉRIAS 57
2.3.1 PLATAFORMA HISCAN SQ (ILLUMINA) 58
2.3.2 PLATAFORMA ION TORRENT 59
3. OBJETIVOS 61
4. MATERIAL E MÉTODOS 62
4.1 LINHAGENS E LOCAIS DE AMOSTRAGEM 62
4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO 65
4.3 ANÁLISES MOLECULARES 65
4.3.1 EXTRAÇÃO DE DNA, AMPLIFICAÇÃO POR PCR E SEQUENCIAMENTO 65
4.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA 70
4.5 LC-MS 70
4.5.1 PREPARO DA AMOSTRA 70
4.5.2 ANÁLISES DE CYN 71
4.5.3 ANÁLISES DE STX 72
4.5.4 ANÁLISES DE ANTX-A(S) 73
4.5.5 ANÁLISE DOS PEPTÍDEOS – MCY, MDN E MCA 74
4.6 ELISA ("ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY") 75
4.7 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (*NEXT-GENERATION SEQUENCING, NGS*) 75
4.7.1 PREPARO DA AMOSTRA PARA O SEQUENCIAMENTO NA PLATAFORMA HISCAN SQ (ILLUMINA) 76
4.7.2 PREPARO DA AMOSTRA PARA O SEQUENCIAMENTO NA PLATAFORMA ION TORRENT 77

4.7.3 MONTAGEM E ANOTAÇÃO DOS AGRUPAMENTOS GÊNICOS *SXT* E *ANTX-A(S)* 78
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES 80
5.1 SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS 80
5.1.1 GENES *CYR* E PRODUÇÃO DE CYN 84
5.1.2 GENES *SXT* E PRODUÇÃO DE STX 89
5.1.3 GENES *ANA* E PRODUÇÃO DE ANTX-A, HANTX-A E ANTX-A(S) 99
5.1.4 ANÁLISE MOLECULAR E PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS CÍCLICOS 102
5.1.4.1 Genes *mcy* e produção de MCY 102
5.1.4.2 Genes *mdn* e produção de MDN 106
5.1.4.3 Genes *mca* 112
5.2 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO 115
5.2.1 CARACTERIZAÇÃO DO AGRUPAMENTO GÊNICO DA SAXITOXINA 115
5.2.2 SEQUENCIAMENTO COM A PLATAFORMA ION TORRENT 124
5.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE DE RNAR 16S 126
6. CONCLUSÕES 134
REFERÊNCIAS 136
ANEXOS 166
ANEXO A – Artigo publicado 167
ANEXO B – Artigo submetido 170

1. INTRODUÇÃO

Cianobactérias são encontradas em diversos ecossistemas e têm um importante papel nos ciclos biogeoquímicos, sendo amplamente reconhecidas como as progenitoras da fotossíntese oxigênica. Além disso, a maioria delas também é capaz de fixar o nitrogênio atmosférico (FIORE; HONDA, 2008), contribuindo de forma significativa na produção primária global (CHISHOLM et al., 1988; WATERBURY et al., 1979). Provavelmente, nenhum outro grupo pertencente ao domínio *Bacteria* tem tido maior impacto na biogeoquímica e trajetória evolutiva da Terra e, ainda assim, sua própria história evolutiva é pouco conhecida. Elas ocupam diversos nichos ecológicos e apresentam uma enorme diversidade quanto ao ambiente que habitam e quanto a sua fisiologia, morfologia e metabolismo (BECK et al., 2012). Em relação ao ambiente, as cianobactérias são encontradas em todos os tipos de ecossistemas (exceto naqueles com pH muito baixo), inclusive em ambientes extremos como areia e rochas desérticas, águas termais ("*hot springs*") e lagos do Ártico e da Antártica (DOR; DANIN, 1996; SKULBERG, 1995; CASTENHOLZ, 1973). Bilhões de anos de evolução fizeram com que as cianobactérias desenvolvessem estratégias fisiológicas necessárias para prosperar nesses ambientes extremos e com frequentes flutuações sazonais e ciclos naturais de cheia e seca (NEILAN et al., 2012). Algumas cianobactérias planctônicas apresentam vantagens adaptativas, como a capacidade de crescer em ambientes com alta turbidez, controle da flutuabilidade na coluna d'água (aerótopos) e alta capacidade para armazenamento de nutrientes (CHORUS; BARTRAM, 1999) que favorecem o seu crescimento em corpos-d'água enriquecidos artificialmente**,** principalmente com nitrogênio e fósforo, propiciando o aparecimento das florações.

Além de sua importância ecológica, as cianobactérias apresentam importância econômica na produção de alimentos com valores nutricionais elevados e na conversão de energia solar (ESTRADA et al., 2001; ANGERMAYR et al., 2009). Além disso, nas últimas décadas diversas substâncias naturais com atividade antiprotease, antifúngica e antiviral foram isoladas de cianobactérias (PATTERSON; LARSEN; MOORE, 1994). Por outro lado, algumas cianobactérias são conhecidas por produzirem cianotoxinas e quando presentes em corpos-d'água podem representar um risco para a saúde. Casos de intoxicações de seres humanos, animais domésticos e selvagens resultantes de florações de cianobactérias e suas toxinas já foram relatados por vários autores (BOURKE et al., 1983; CARMICHAEL, 1992; CARMICHAEL, 2001; CHORUS et al., 2000; DUY et al., 2000; EDWARDS et al., 1992;

GUGGER et al., 2005; NEGRI; JONES, 1995; SAKER et al., 1999b). As cianotoxinas são classificadas de acordo com seu mecanismo de ação como neurotoxinas, hepatotoxinas e dermatotoxinas (CHORUS, BARTRAN, 1999). Apesar das crescentes evidências de que as substâncias naturais bioquimicamente ativas produzidas pelas cianobactérias desempenham um papel importante na composição de uma comunidade através da comunicação inter e intra-espécie, várias questões como o seu papel biológico, o modo de ação e a regulação da sua produção ainda são pouco conhecidos (KAPLAN et al., 2012).

Dentre as cianobactérias, os gêneros *Anabaena*, *Cylindrospermopsis* e *Microcystis* representam aqueles cujas linhagens produzem a maior diversidade de classes de substâncias bioativas e por isso o interesse em estudar linhagens pertencentes a esses gêneros. No Brasil, florações com linhagens destes gêneros já foram descritas para alguns estados como Goiás, Minas Gerais, Ceará, Paraná, Rio Grande do Sul, São Paulo e Pernambuco (MOLICA, 2005; BARROS et al., 2004; SANT'ANNA; AZEVEDO, 2000). Esses gêneros de cianobactéria possuem várias características ecofisiológicas que potencializam a sua dominância em corpos-d'água eutrofizados, como a capacidade de regular sua flutuação, permitindo a exploração de diferentes estratos da coluna e, com isso, o melhor aproveitamento da disponibilidade de luz e nutrientes. No entanto, ainda não se sabe quais fatores são os principais responsáveis pela crescente ocorrência e/ou dominância dessas cianobactérias. Algumas das morfoespécies estudadas neste trabalho como, *Anabaena circinalis* (*Dolichospermum circinale*), *A. crassa* (*D. crassum*), *A. planctonica* (*D. planctonicum*), *A. oumiana* (reclassificada como *Sphaerospermosis torques-reginae*, WERNER et al., 2012), *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Microcystis* sp., *M. wesenbergii*, *M. panniformis*, *M. protocystis*, *M. novacekii* e *M. aeruginosa*, foram relatadas como produtoras de substâncias bioativas (SANT'ANNA et al., 2008; MOLICA et al., 2005; BECKER et al., 2004; MATTHIENSEN et al., 2000; WERNER et al., 2000; YUNES et al., 2000; LAGOS et al., 1999; AZEVEDO et al., 1994).

Neste estudo, representantes dos gêneros *Dolichospermum, Sphaerospermopsis*, *Cuspidothrix, Cylindrospermopsis* e *Microcystis* isolados de ambientes de água doce utilizados para abastecimento, recreação e geração de energia elétrica foram avaliados para a presença de genes envolvidos com a biossíntese de substâncias bioativas e a produção destas substâncias bioativas foi examinada. A caracterização filogenética de linhagens que ainda não possuíam as sequências do gene de RNAr 16S foi realizada para representates dos gêneros *Dolichospermum, Sphaerospermopsis*, *Cuspidothrix* e *Cylindrospermopsis.* O sequenciamento de nova geração (NGS) com as plataformas HiScan SQ (Illumina Inc, San Diego, CA, USA) e Ion Torrent (Applied Biosystems/Life Technology, Foster City, CA,

USA) foi utilizado na tentativa de identificar e caracterizar os agrupamentos gênicos envolvidos na biossíntese de saxitoxina e anatoxina-a(s).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Os gêneros *Dolichospermum*, *Sphaerospermopsis*, *Cuspidothrix*, *Cylindrospermopsis* e *Microcystis*

A sistemática das cianobactérias tem uma história consideravelmente conturbada. Esses organismos foram inicialmente identificados como pertencentes ao grupo das algas, sendo que desde a sua descoberta por Christian Gottfried Ehrenberg em 1838, o seu sistema de classificação seguiu o Código Internacional de Nomenclatura Botânica. Inúmeros sistemas de classificação foram então publicados (TURNER, 1997; WILMOTTE, 1994), mas na década de 1970, estudos ultra-estruturais, bioquímicos e moleculares revelaram a natureza bacteriana de suas células, justificando a inclusão desse grupo no domínio *Bacteria* (BONEN; DOOLITTLE, 1978; STANIER, 1977; STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977; STANIER et al., 1971). Ainda hoje, a sistemática das cianobactérias é alvo de intensas discussões entre os pesquisadores, e todo o sistema de classificação desse grupo de micro-organismos está em constante adaptação. Atualmente, o sistema de classificação recomendado é o elaborado por Hoffmann, Komárek e Kaštovský (2005), o qual divide as cianobactérias em seis ordens: Gloeobacterales, Synechococcales, Chroococcales, Oscillatoriales, Pseudanabaenales e Nostocales. Para facilitar o acesso a essas informações foi criado um banco de dados de sistemática cianobacteriana (http://www.cyanodb.cz), o qual fornece dados detalhados necessários para o reconhecimento de gênero e/ou espécies (KOMÁREK; HAUER, 2012).

Recentemente, com base na revisão das morfoespécies e baseado em sequências do gene de RNAr 16S, todas as espécies planctônicas do gênero *Anabaena*, ordem Nostocales, foram separadas em três diferentes gêneros: *Dolichospermum*, *Sphaerospermopsis* e *Cuspidothrix* (ZAPOMĚLOVÁ et al., 2010, 2009; WACKLIN et al., 2009; RAJANIEMI et al., 2005a). Esse rearranjo foi necessário uma vez que a taxonomia de *Anabaena*, a qual foi elaborada principalmente com base nas características morfológicas, não era consensual, apresentando problemas em níveis genéricos e infragenéricos (PAN et al., 2008; WILLAME et al., 2006; RAJANIEMI et al., 2005b; GUGGER; HOFFMANN, 2004; ITEMAN et al., 2002; RUDI et al., 1998; 1997), os caracteres morfológicos não refletiam relações evolutivas e sequências do gene de RNAr 16S existentes não suportavam muitas das morfoespécies descritas.

O gênero *Dolichospermum* (Ralfs *ex* Bornet & Flahault), ordem Nostocales, envolve os táxons cujas características morfológicas diacríticas incluem a presença de vesículas gasosas (aerótopos), distribuição metamérica dos heterócitos e estabilidade das células vegetativas, ou seja, sem diferenciação na parte terminal do tricoma, sendo considerada *Dolichospermum flos-aquae* (Lyngbye Brébisson *ex* Bornet et Flahault) como a espécie tipo desse gênero (WACKLIN et al., 2009). Dentre as espécies do gênero *Dolichospermum* estudadas neste trabalho estão: *D. circinalis*, *D. crassum* e *D. planctonicum*. Linhagens brasileiras do gênero *Dolichospermum* são conhecidas como produtoras de microcistina e anatoxina-a(s) (SANT'ANNA et al., 2008) e, em outros países, esse gênero é conhecido por produzir variantes estruturais de saxitoxina (TESTE et al., 2002; JONES; NEGRI et al., 1997; NEGRI; JONES; HINDMARSH, 1995).

Os táxons incluídos no gênero *Sphaerospermopsis*, ordem Nostocales, caracterizam-se principalmente pela forma e posição dos acinetos (esféricos, em um ou ambos os lados adjacentes ao heterócito) e pela presença de tricomas espiralados, sendo que a designação da espécie tipo foi baseada na espécie *Anabaena reniformis*, posteriormente renomeada como *Sphaerospermopsis reniforme* (Lemmermann) (ZAPOMĚLOVÁ et al., 2010; 2009). Neste trabalho foram estudadas duas espécies pertencentes a esse gênero: *Sphaerospermopsis torques-reginae* e *S. aphanizomenoides*. Linhagens de *S. torques-reginae* são conhecidas como produtoras de anatoxina-a(s) no Brasil (MOLICA et al., 2005).

Estudos indicaram que a divisão de várias cianobactérias dentro dos gêneros *Anabaena* e *Aphanizomenon*, ordem Nostocales, não era corroborada pelas análises filogenéticas e, assim, esses táxons foram colapsados e renomeados dentro do novo gênero denominado *Cuspidothrix* (RAJANIEMI et al., 2005b). Esses autores designaram a espécie tipo como sendo o tradicional táxon *Aphanizomenon issatschenkoii* (Usačev), (RAJANIEMI et al., 2005b), sendo que as características de representantes desse gênero incluem tricomas solitários, estreitos com estrutura subsimétrica; heterócitos intercalares, solitários, cilíndricos ou elípticos; acinetos intercalares, solitários ou raramente em pares, distantes ou próximos dos heterócitos; célula apical alongada, atenuada e acuminada. A espécie estudada neste trabalho foi *Cuspidothrix fallax*.

Os representantes do gênero *Cylindrospermopsis*, ordem Nostocales, possuem algumas características similares aos gêneros *Anabaena* e *Anabaenopsis*, mas diferenciam-se destes pelos tricomas flutuantes, solitários e subsimétricos e pelo desenvolvimento do heterócito somente nas células terminais (após a divisão assimétrica). Os acinetos desenvolvem-se subterminalmente e aerótopos ocorrem facultativamente nas células

(KOMÁREK; HAUER, 2012). A espécie tipo é *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska), (SEENAYYA; SUBBA RAJU, 1972) e a linhagem referência é a AWT205, que foi isolada da barragem Solomon, em Palm Island, Austrália (CASTENHOLZ, 2001). Até o momento, 10 morfoespécies (espécie conhecida apenas pela morfologia) foram descritas, sendo que a maioria delas foi encontrada em comunidades fitoplanctônicas de ambientes de água doce (KOMÁREK; HAUER, 2012). Linhagens de *C. raciborskii* foram originalmente descritas como espécies tropicais e subtropicais, no entanto, sua prevalência em regiões temperadas tem aumentado rapidamente nas últimas duas décadas (SINHA et al., 2012; HOLLAND et al., 2012; HAANDE et al., 2008; BURGER et al., 2007; WIEDNER et al., 2007; KOUZMINOV et al., 2007; HONG et al., 2006). Linhagens de *C. raciborskii* são potencialmente produtoras de toxina. No Brasil, linhagens desta espécie são conhecidas como produtoras de saxitoxinas e, em outros países, de cilindrospermopsinas (FASTNER et al., 2003; MOLICA et al., 2002; YUNES et al., 2003, 2000; LAGOS et al., 1999; HAWKINS et al., 1985). Cinco isolados da espécie *C. raciborskii* foram incluídos neste estudo.

As cianobactérias do gênero *Microcystis* (Kützing), ordem Chroococcales, estão entre os gêneros mais comumente relatados como presentes em florações, sendo *Microcystis aeruginosa* (Kützing) a espécie tipo. As cianobactérias do gênero *Microcystis* são formadas por células cocoides arranjadas irregularmente em um envelope mucilaginoso, com divisão celular em três planos perpendiculares e presença de aerótopos (KOMÁREK, 2003). O gênero *Microcystis* é composto por 25 espécies de cianobactérias planctônicas que são frequentemente encontradas em lagos de diversos países (KOMÁREK; HAUER, 2012). Seis diferentes espécies do gênero *Microcystis* foram estudadas neste trabalho, sendo elas: *M. aeruginosa*, *M. novacekii*, *M. protocystis*, *M. panniformis*, *M. wesenbergii* e *Microcystis* sp. No Brasil, as cianobactérias do gênero *Microcystis* são conhecidas pela síntese de microcistina (SANT'ANNA et al., 2008), além de outros inibidores enzimáticos como aeruginosina, cianopeptolina e microginina (SILVA-STENICO et al., 2011). A presença simultânea da toxina microcistina e inibidores de protease já foi detectada em espécies brasileiras de *Microcystis*, como o caso da produção de microcistina e aeruginosina (SILVA-STENICO et al., 2011) e microcistina e microginina (CARNEIRO et al., 2012). Em alguns países, além de produzirem os compostos citados acima, linhagens de *Microcystis* também produzem inibidores enzimáticos com potencial farmacológico, como microviridina e microciclamida (ISHIDA et al., 2000; ISHITSUKA et al., 1990; ZIEMERT et al., 2010, 2008a, 2008b).

2.2 Substâncias bioativas produzidas por cianobactérias

Alguns gêneros de cianobactérias são capazes de produzir substâncias de interesse biotecnológico e farmacológico, bem como cianotoxinas altamente prejudiciais à saúde humana e de animais. Cianobactérias tóxicas ocupam uma variedade enorme de nichos ecológicos, incluindo hábitats marinhos, de água doce e terrestre, em uma variedade de zonas climáticas. Ao longo das últimas três décadas, a frequência e distribuição global de substâncias tóxicas produzidas por cianobactérias aumentaram, ao mesmo tempo em que intoxicações humanas têm ocorrido regularmente. Em ambientes de água doce, os problemas com fitoplânctons produtores de toxina são quase que exclusivamente associados com cianobactérias (NEILAN et al., 2012). Algumas substâncias naturais bioativas já encontradas em cianobactérias estão apresentadas na Tabela 1.

Algumas cianotoxinas como cilindrospermopsina, saxitoxina, anatoxina-a, homoanatoxina-a e microcistina são formadas por um mecanismo enzimático conhecido como síntese não-ribossômica de peptídeos (CARMICHAEL, 1992) que utiliza uma grande variedade de substratos e é catalisada pelas enzimas peptídeo sintetase não-ribossômica (NRPS do inglês “non-ribosomal peptide synthetase”) e policetídeo sintase tipo I (PKS, do inglês “polyketide synthase”) e/ou híbridos de NRPS/PKS (WELKER; VON DÖHREN, 2006). Estas enzimas são multifuncionais e caracterizadas por apresentarem um arranjo modular dos genes que as codificam, e esses módulos, por sua vez, são subdivididos em domínios que contêm sequências altamente conservadas (KEHR; PICCHI; DITTMANN, 2011; MARAHIEL et al., 1997; VON DÖHREN et al., 1997). Estas enzimas funcionam como uma linha de montagem industrial na biossíntese de todas as cianotoxinas.

Tabela 1 - Substâncias naturais bioativas produzidas por cianobactérias

Atividade Biológica	Substância Bioativa	Cianobactéria Produtora	Referência
Hepatotoxicidade: inibidores das enzimas fosfatases 1A e 2A	Microcistina e nodularina	*M. aeruginosa*; *Microcystis*; *Planktothrix*; *Anabaena*; *Aphanocapsa*; *Oscillatoria*; *Synechococystis*; *Nodularia*	SANT'ANNA et al., 2008; ROUHIAINEN et al., 2004; CHRISTIANSEN et al., 2003; TILLETT et al., 2000; NISHIZAWA et al., 1999; DITTMANN et al., 1997
Neurotoxicidade: - bloqueio dos canais de sódio	Saxitoxina	*C. raciborskii*	KELLMANN; MIHALI; NEILAN, 2008b
- agonista dos receptores nicotínicos da acetilcolina	Anatoxina-a e homoanatoxina-a	*Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cilyndrospermum*, *Planktothrix*, *Raphidiopsis*, *Oscillatoria*, *Phormidium*	ARÁOZ; MOLGÓ; DE MARSAC, 2010; SANT'ANNA et al., 2008
- inibidor irreversível da acetilcolinesterase	Anatoxina-a(s)	*A. flos-aquae*, *A. lemmermannii, Anabaena, S. torques-reginae*	MOLICA et al., 2005; HENRIKSEN et al., 1997; MAHMOOD et al., 1987; 1998; CARMICHAEL; GORHAM, 1978
- ativador dos canais de sódio	Antillatoxina	*L. majuscula*	LI et al., 2001.
Citotoxicidade: - inibição da síntese proteica	Cilindrospermopsina	*C. raciborskii*, *U. natans*, *A. ovalisporum*, *R. curvata*, *A. flos-aquae*, *A. bergii*, *L. wollei*, *A. laponica* e *A. gracile*	MAZMOUZ et al., 2010
- candidatos a antibióticos	Nostociclopeptídeo, Cianobactinas, Microcolinas e mirabimidas	*Nostoc* ATCC 53789 *M. aeruginosa* *Lyngbya* e *Scytonema*	GOLAKOTI et al., 2001 SIVONEN et al., 2010 CARMELI et al., 1991a
- imunosupressores	Tantazoles e mirabazoles	*Scytonema mirabile*	CARMELI et al., 1990; 1991b
Dermatotoxina	Lyngbyatoxina	*L. majuscula*	EDWARDS; GERWICK, 2004
Toxicidade	Barbamida	*L. majuscula*	CHANG et al., 2002
Não determinada	Nostopeptolide	*Nostoc* sp. GSV224	LUESCH et al., 2003
Inibidor de trombina e tripsina	Aeruginosina	*M. aeruginosa*	MURAKAMI et al., 1995

continua

conclusão

Atividade Biológica	Substância Bioativa	Cianobactéria Produtora	Referência
Inibidor de aminopeptidase e enzima conversora de angiotensina	Microgininas	*M. aeruginosa*	ISHIDA et al., 2000
Inibidor de protease	Anabaenopeptinas	*P. rubescens*	SANO et al., 2001
Inibidor de serina protease: - tirosinase, tratamento de enfisema pulmonar	Microviridinas	*O. agardhii; M. viridi; M. aeruginosa*	ZIEMERT et al., 2008b; ROHRLACK et al., 2004; MURAKAMI et al., 1997; ISHITSUKA et al., 1990
- inibidor de quimiotripsina	Cianopeptolinas ou micropeptinas	*M. aeruginosa*	CZARNECKI et al., 2006; PLOUTNO; CARMELI, 2002; RESHEF, CARMELI, 2001; OKINO et al., 1993
Antifúngico	Laxaficinas	*Anabaena laxa*	FRANKMOLLE et al., 1992
Continuação			
Toxicidade, anti-cianobactérias	Nostociclamidas	*Nostoc* sp.31	TODOROVA, 1995
Inibidor enzimático, atividade antibacteriana e antimalárica	Microciclamida	*M. aeruginosa*	ZIEMERT et al., 2008a; ISHIDA et al., 2000
Agentes anticancerígenos - ação no citoesqueleto de células cancerígenas	Criptoficinas	*Nostoc* sp.	TAN et al., 2010; MAGARVEY et al., 2006; TRIMURTULU et al., 1994; GERWICK et al., 1994
	Dolastatinas	*Symploca hydnoides*	
	Curacina A	*L. majuscula*	
	Hectochlorina	*L. majuscula*	
	Apratoxinas	*Lyngbya* sp.	
	Lyngbyabellinas	*L. majuscula*	

Os módulos em NRPSs estão envolvidos nas etapas de elongamento do metabólito e cada módulo é responsável pela incorporação de um único aminoácido (KEHR; PICCHI; DITTMANN, 2011). Um módulo de uma NRPS é composto, no mínimo, por um domínio de adenilação (A), um domínio carreador de peptídeo (PCP) e um domínio de condensação (C) (KOGLIN; WALSH, 2009), Figura 1A. Essas enzimas não-ribossomais são capazes de reconhecer cerca de 300 substratos proteinogênicos e não proteinogênicos (GRÜNEWALD; MARAHIEL, 2006). Um módulo de PKS é formado pelos domínios de cetosintase (KS), aciltransferase (AT), cetoredutase (KR), dehidratase (DH), enoil redutase (ER) e proteína carreadora de acila (ACP) (STAUNTON; WEISSMAN, 2001), Figura 1B. Dentre as PKSs estão as do tipo I ou modulares, responsáveis por reações parciais que sintetizam a maioria dos produtos policetídicos não-aromáticos. A principal diferença entre NRPSs e PKSs reside no fato que PKSs condensam ácidos carboxílicos a uma cadeia crescente para a formação de um produto, enquanto que NRPSs adicionam aminoácidos (MOFFITT, NEILAN, 2004).

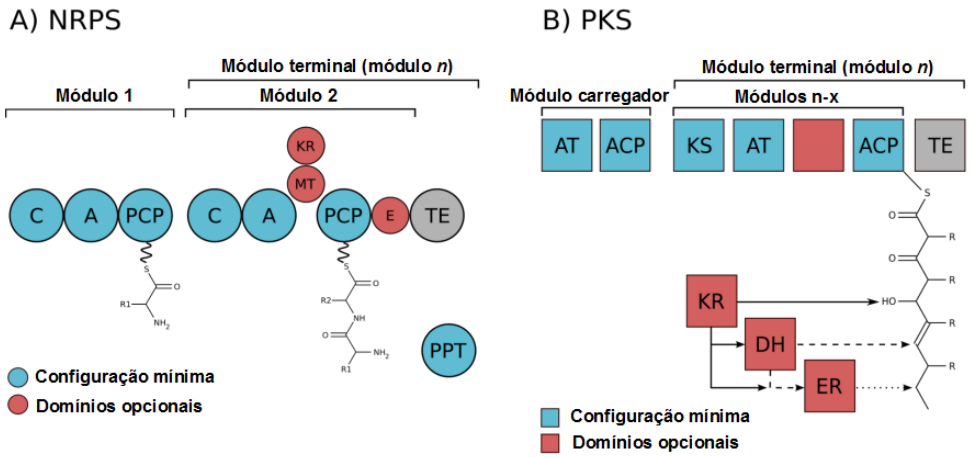


Figura 1 - Representação esquemática dos domínios enzimáticos em A) peptídeo sintetase não-ribossômica (NRPS); e B) policetídeo sintase (PKS) (adaptado de KEHR; PICCHI; DITTMANN, 2011)

Devido ao alto grau de conservação na estrutura primária das NRPSs e PKSs, evidenciado em nível de DNA, e com a informação prévia sobre o agrupamento dos genes biossintéticos de um peptídeo, é possível desenhar iniciadores capazes de amplificar regiões distintas dos demais genes. Isso foi possível com a descoberta dos agrupamentos gênicos de microcistinas **-** *mcy* (TILLETT et al., 2000), nodularinas – *nda* (MOFFITT; NEILAN, 2004), saxitoxinas – *sxt* (KELLMANN et al., 2008a), cilindrospermopsinas – *cyr* (MIHALI et al., 2008), anatoxina-a e homoanatoxina-a – *ana* (MÉJEAN et al., 2009).

Por outro lado, algumas substâncias bioativas produzidas por cianobactérias como, por exemplo, as microviridinas e as cianobactinas, são sintetizadas pela via ribossomal de peptídeos que está limitada aos 20 aminoácidos proteinogênicos conhecidos, diferentemente da síntese não-ribossômica. Este grupo de peptídeos ribossomais, no entanto, exibe uma grande diversidade estrutural e um considerável potencial bioativo. Os pré-peptídeos ribossomais são tipicamente compostos de um peptídeo guia e um peptídeo central associado a enzimas de modificação pós-traducional (PTMs) que catalisam diferentes tipos de macrociclizações do peptídeo central e modificações da cadeia lateral de aminoácidos. A maturação do peptídeo requer ainda a clivagem deste por proteases específicas (PP) combinados com o transporte através da membrana plasmática (OMAN; VAN DER DONK, 2010), Figura 2.

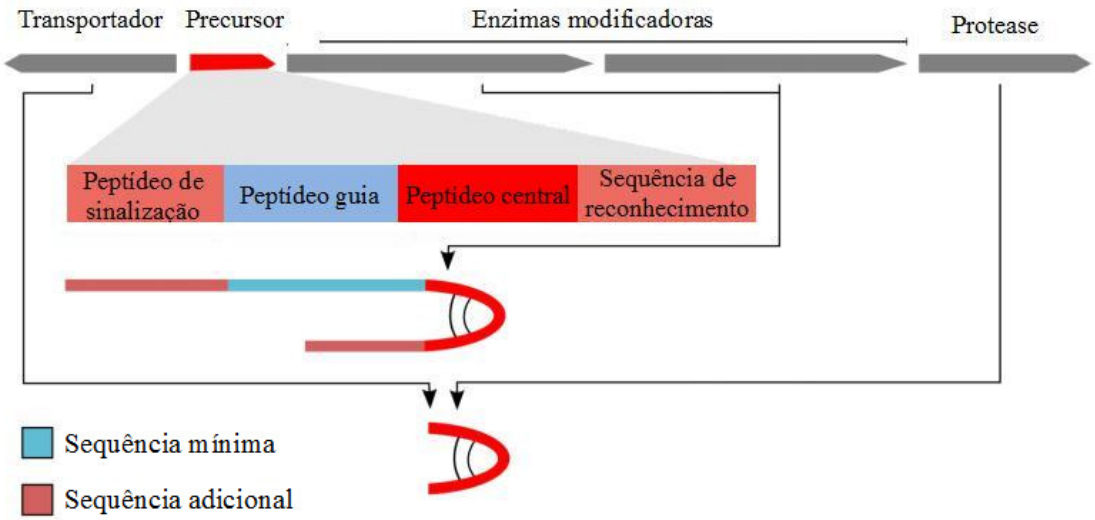


Figura 2 - Organização característica da biossíntese ribossomal de um agrupamento gênico (adaptado de KEHR; PICCHI; DITTMANN, 2011)

Nos últimos anos, os genes envolvidos na biossíntese de toxinas produzidas por cianobactérias foram identificados, sequenciados e caracterizados. Essas descobertas têm permitido determinar os fatores ambientais que regulam a produção dessas toxinas e, portanto, os fatores que afetam a qualidade da água (NEILAN et al., 2012). Assim, métodos rápidos e sensíveis para a detecção e monitoramento de cianobactérias e as substâncias bioativas que elas produzem, são de fundamental interesse para os órgãos públicos, principalmente aqueles responsáveis pela regulação da qualidade de água no país, uma vez que efeitos indesejáveis ou doenças fatais podem ser causados pela presença dessas substâncias na água. Por outro lado, há também o interesse em isolar substâncias de interesse biotecnológico e farmacológico.

2.2.1 Cilindrospermopsinas

A cilindrospermopsina (CYN - $C_{15}H_{21}N_5O_7S$) é um alcaloide composto por uma porção guanidino central funcional e uma hidroximetil uracila ligada a um esqueleto de carbono tricíclico, com massa molecular de 415 Da (OHTANI et al., 1992). Até o momento, apenas duas variantes estruturais naturais desta toxina, além da CYN, foram descritas: 7-Epi-CYN, produzida por *Aphanizomenon ovalisporum* e *Oscillatoria* sp. PCC6506 (BANKER et al., 2000; MAZMOUZ et al., 2010; 2011) e 7-Deoxi-CYN, produzida por *C. raciborskii*, *Raphidiopsis curvata* e *Lyngbya wollei* (LI et al., 2001a; 2001b; NORRIS et al., 1999; SEIFERT et al., 2007; JIANG et al., 2012). Estas variantes estruturais de cilindrospermopsina diferem no grupo ligado ao C-7, sendo 7-Epi-CYN considerada tão tóxica como a CYN, Figura 3. Cilindrospermopsina é uma citotoxina e o seu mecanismo de ação se dá por inibição da glutationa na síntese proteica e do citocromo P450, causando efeitos hepatotóxicos, nefrotóxicos e em geral citotóxicos, além de ter potencial carcinogênico (WIEGAND; PFLUGMACHER, 2005; FROSCIO et al., 2003; HUMPAGE et al., 2000; TERAO et al., 1994; RUNNEGAR et al., 1994; 1995; 2002).

Variante	R1	R2	Massa molecular
CYN (7-*R*)	OH	H	415,42
7-Epi-CYN (7-*S*)	H	OH	415,42
7-Deoxi-CYN	H	H	399,42

Figura 3 - Estrutura da cilindrospermopsina e suas variantes naturais (adaptado de MAZMOUZ et al., 2010)

Em inúmeros estudos realizados em muitos países, a espécie *C. raciborskii* é reportada como produtora de CYN (MIHALI et al., 2008; STUCKEN et al., 2010; BERNARD et al., 2003; CHONUDOMKUL et al., 2004; FASTNER et al., 2003; WOOD; STIRLING, 2003; LI et al., 2001b; SAKER et al., 1999a; 1999b; 2003; HAWKINS, et al., 1997). Entretanto, a primeira análise química de uma linhagem brasileira de *C. raciborskii* isolada da represa

Billings, São Paulo, indicou a produção de análogos da neurotoxina saxitoxina (STX) (LAGOS et al., 1999) e não CYN (KELLMANN; MILLS; NEILAN, 2006). Outras duas linhagens, ITEP-018 e CYRF-01, de *C. raciborskii* isoladas do reservatório Tabocas, Pernambuco (MOLICA et al., 2002), e do reservatório Funil, Resende, Rio de Janeiro (FERRÃO-FILHO et al., 2010), respectivamente, também apresentaram a produção de análogos de STX e não de CYN. Embora outros gêneros de cianobactérias tenham sido reportados como produtores de CYN, como mencionado anteriormente, não existem relatos de produção dessa toxina por linhagens brasileiras de. Os *C. raciborskii* únicos registros de CYN no Brasil referem-se ao encontrado no carbono e resina do sistema de tratamento de água de uma clínica de hemodiálise em Caruaru, Pernambuco (AZEVEDO et al., 2002) e também no fitoplâncton do reservatório Jucazinho, onde as linhagens *C. raciborskii* e *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* eram dominantes. Neste último trabalho, foram sequenciados os genes *cyrB* e *cyrC* da amostra do fitoplâncton e a presença da toxina foi analisada por imunoensaio enzimático (ELISA) (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2011). No entanto, em nenhum desses trabalhos os isolados foram analisados individualmente, e nenhum teste para confirmação e identificação química de CYN foi realizado. Sendo assim, trabalhos sobre linhagens brasileiras produtoras de CYN ainda são escassos. Nenhum caso da produção de CYN foi confirmado até o presente momento nos continentes europeu (FASTNER et al., 2003; SAKER et al., 2003; BRIAND et al., 2004) e africano (BERGER et al., 2006; HAANDE et al., 2008). Recentemente, Yilmaz e Phlips (2011) identificaram a presença de CYN produzida por uma linhagem de *Aphanizomenon ovalisporum* isolada dos Estados Unidos, sendo este o primeiro relato da produção dessa toxina no continente americano. Alguns autores sugerem que linhagens de *C. raciborskii* produtoras desta toxina são encontradas apenas nos continentes australiano (SAKER; EAGLESHAM, 1999; SAKER; NEILAN; GRIFFITHS, 1999; SAKER; THOMAS; NORTON, 1999) e asiático (LI et al., 2001b; CHONUDOMKUL et al., 2004).

A produção de CYN já foi verificada em onze espécies de cianobactérias, sendo elas: *C. raciborskii* (HAWKINS et al., 1985), *Umezakia natans* (TERAO et al., 1994), *Aphanizomenon ovalisporum* (BANKER et al., 1997; SHAW et al., 1999), *Raphidiopsis curvata* (LI et al., 2001a), *Aphanizomenon flos-aquae* (PREUßEL et al., 2006), *Anabaena bergii* (SCHEMBRI et al., 2001; MIHALI et al., 2008), *Lyngya wollei* (SEIFERT et al., 2007), *Anabaena lapponica* (SPOOF et al., 2006), *Oscillatoria* sp. (MAZMOUZ et al., 2010), *Raphidiopsis mediterranea* (McGREGOR et al., 2011) e possivelmente de *Anabaena gracile*

(RÜCKER et al., 2007). Porém, o agrupamento gênico foi descrito somente para cinco cianobactérias, Tabela 2.

Tabela 2 - Tamanho do agrupamento gênico da cilindrospermopsina para cinco cianobactérias descritas

	***C. raciborskii* AWT205**	***C. raciborskii* CS-505**	***Oscillatoria* sp. PCC6506**	***Aphanizomenon* sp. 10E6**	***Raphidiopsis curvata* CHAB1150**
Tamanho do agrupamento	43 kb	41,6 kb	41,6 kb	42 kb	42,8 kb
Número de ORFs	15	16	15	11	11
			Genes (tamanho pb)		
cyrA	1176	1176	1194	1176	1176
cyrB	8754	8754	8871	8754	8754
cyrC	5005	5005	5016	5005	5005
cyrD	5631	5631	5619	5556	5631
cyrE	5667	5667	5679	5667	5667
cyrF	4074	4074	4104	4074	4074
cyrG	1437	1437	1434	1437	1437
cyrH	1431	1431	1419	1431	1431
cyrI	831	831	831	831	923
cyrJ	780	780	783	786	786
cyrK	1398	1398	1437	1440	1398
cyrL	750	750	-	-	-
cyrM	318	318	-	-	-
cyrN	600	600	525	-	-
cyrO	1548	1548	-	-	-
Referência	MIHALI, et al., 2008	STUCKEN, et al., 2010	MAZMOUZ, et al., 2010	STÜKEN; JAKOBSEN, 2010	JIANG et al., 2012

(-) não encontrado ou não descrito

A biossíntese de CYN envolve sete passos principais, sendo o primeiro passo catalisado pela enzima CyrA, uma L-arginina-glicina amidinotransferase responsável pela formação do guanidinoacetato, que é o substrato inicial para a enzima híbrida NRPS/PKS CyrB, a enzima seguinte da biossíntese da CYN. Outras enzimas PKSs (CyrC, CyrD, CyrE e CyrF) estão envolvidas em sucessivas adições de cinco unidades de acetato ao substrato inicial, responsáveis pela formação da estrutura carbônica da CYN. A biossíntese é completada pela formação do anel uracila (CyrG e CyrH) e reações complementares, como sulfotransferência (CyrJ) e hidroxilação (CyrI) (MUENCHHOFF et al., 2010; BURGOYNE et al., 2000).

Em 2002, três genes, *aoaA* (*cyrA*), *aoaB* (*cyrB*) e *aoaC* (*cyrC*), supostamente envolvidos na biossíntese de CYN, foram identificados em *Aphanizomenon ovalisporum*, isolada do Lago Kinneret, em Israel, os quais codificavam as enzimas amidinotransferase, NRPS/PKS híbrida e PKS, respectivamente (SHALEV-ALON et al., 2002). Em 2008, o

agrupamento gênico da biossíntese da cilindrospermopsina (denominado *cyr*) da cianobactéria australiana *C. raciborskii* AWT205 foi completamente sequenciado. Esse agrupamento possui 43 kb e contém 15 genes que codificam todas as funções necessárias para a biossíntese, regulação e exportação da toxina (MIHALI et al., 2008). No ano de 2010, três novos agrupamentos gênicos *cyr* foram descritos para as linhagens *C. raciborskii* CS-505 (STUCKEN et al., 2010), *Oscillatoria* sp. PCC6506 (MAZMOUZ et al., 2010) e *Aphanizomenon* sp. 10E6 (STÜKEN; JAKOBSEN, 2010). O agrupamento gênico que codifica para a cilindrospermopsina na linhagem *Raphidiopsis curvata* CHAB1150 foi recentemente descrito e mostrou alta similaridade (96% a 100%) com outras espécies do gênero Nostocales (JIANG et al., 2012).

O agrupamento *cyr* da linhagem australiana *C. raciborskii* CS-505 mostrou perfeita sintenia e alta conservação das sequências com a também linhagem australiana *C. raciborskii* AWT205 (STUCKEN et al., 2010). Entretanto, o agrupamento *cyr* da linhagem *Aphanizomenon* sp. 10E6, isolada do lago Melangsee, na Alemanha, quando comparado com os das linhagens AWT205 e CS-505 de *C. raciborskii*, mostrou extensos rearranjos na ordem dos genes, mas a conservação das sequências de nucleotídeos de todos os genes ortólogos foi maior que 95% (STÜKEN; JAKOBSEN, 2010). Além disso, os genes *cyrL*, *cyrM*, *cyrN* e *cyrO* não foram encontrados no genoma de *Aphanizomenon* sp. 10E6. Da mesma maneira, a linhagem *Oscillatoria* sp. PCC6506, de origem desconhecida, apresentou diferente sintenia, e embora as identidades entre os genes correspondentes tenham sido altas, o gene *cyrO* não foi encontrado (MAZMOUZ et al., 2010), Figura 4. Essa topologia variada dos três agrupamentos *cyr* sugere a ocorrência de eventos de transposição múltiplos ao longo da evolução da biossíntese de CYN nas cianobactérias. Uma inserção de 92 pb foi identificada no gene *cyrI* de *Raphidiopsis curvata* CHAB1150, causando um deslocamento no quadro de leitura e vários códons de parada. Como resultado, a sequência de aminoácidos CyrI nessa linhagem é truncada (JIANG et al., 2012). Assim, existe a necessidade de caracterizar os genes *cyr* para cada organismo (MIHALI et al., 2008).

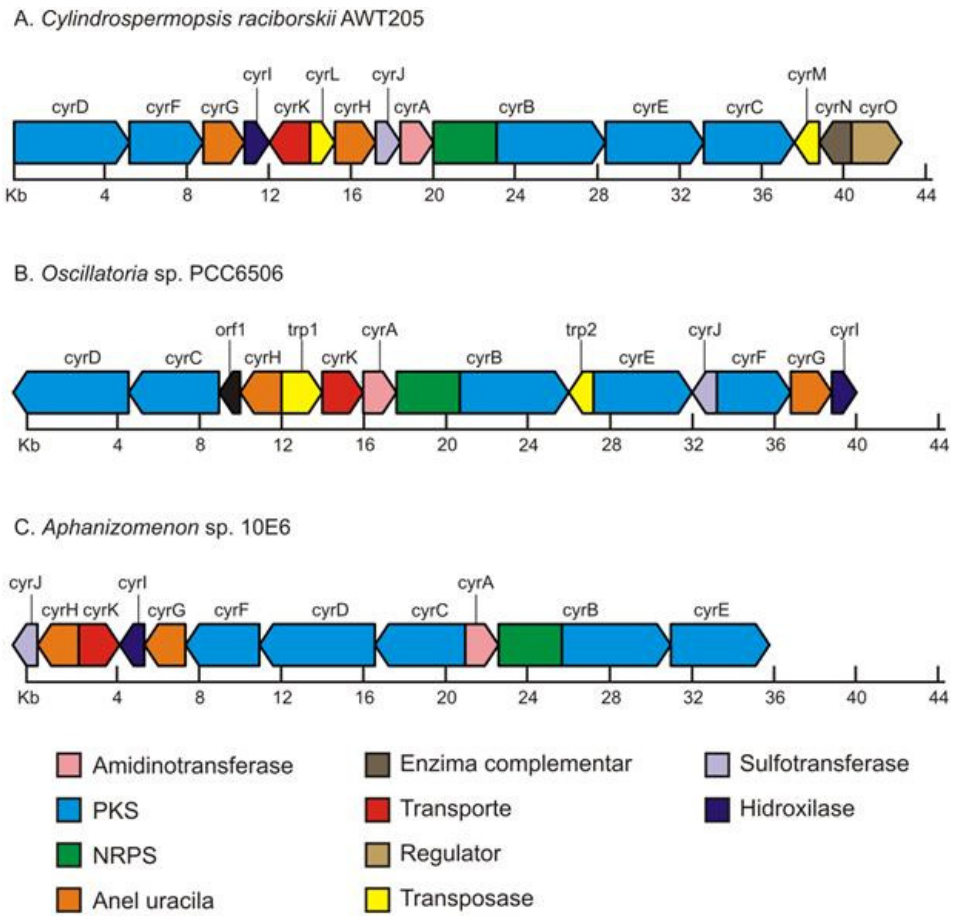


Figura 4 - Organização estrutural do agrupamento gênico *cyr* em três cianobactérias (adaptado de MAZMOUZ et al., 2010; MIHALI et al., 2008; STÜKEN; JAKOBSEN, 2010)

O primeiro passo na biossíntese de CYN envolve a síntese de guanidinoacetato pela transamidinação da glicina para a formação do esqueleto de carbono, Figura 5. Uma amidinotransferase codificada pelo gene *cyrA* transfere um grupo guanidino da arginina para a glicina, formando guanidinoacetato. Na segunda etapa, uma NRPS/PKS híbrida codificada pelo gene *cyrB* ativa o guanidinoacetato, que é então transferido, via PCP, para o domínio β-cetossintase (KS). O domínio aciltransferase (AT) da CyrB ativa o malonil-CoA e liga-o à proteína carreadora de acila (ACP). Em seguida, no domínio KS, ocorre uma reação de condensação entre o guanidinoacetato ativado e o malonil-CoA. O domínio da metiltransferase (MT), identificado em CyrB, realiza a metilação do C-13. A CyrB contém dois módulos de redução, cetorredutase (KR) e desidratase (DH). Essas duas reações combinadas reduzem o grupo ceto a uma hidroxila, seguido pela eliminação de H_2O, resultando em uma dupla ligação entre C-13 e C-14. Um ataque nucleofílico do grupo amidino no N-19, na recém-formada ligação dupla entre C-13 e C-14, ocorre via reação de

adição de Michael. A ciclização segue as regras de Baldwin para o fechamento do anel (BALDWIN et al., 1977), resultando na formação do primeiro anel da CYN. Essa reação pode ser espontânea e não exigir a catálise enzimática, pois é energeticamente favorável (MIHALI et al., 2008).

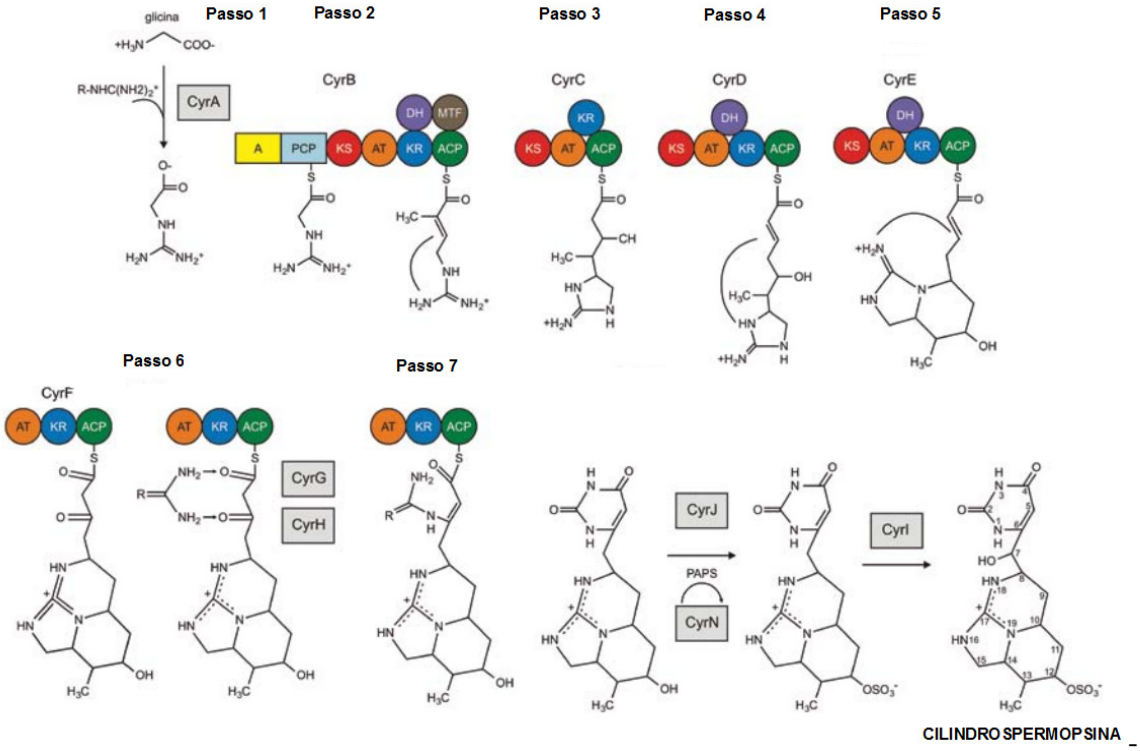


Figura 5 - Via biossintética da cilindrospermopsina (adaptado de PEARSON et al., 2010)

A terceira etapa da biossíntese da CYN envolve o gene *cyrC*, que codifica uma PKS que apresenta os domínios KS, AT, KR e ACP. A ação desses domínios resulta no alongamento da cadeia crescente por um acetato via ativação do malonil-CoA pelo domínio AT, sua transferência para o ACP e condensação no domínio KS com o produto da CyrB. A cadeia alongada é ligada ao ACP da CyrC, e o domínio KR reduz o grupo ceto a um grupo hidroxila no C-12. Em seguida à catálise da enzima CyrC, está a CyrD, uma enzima PKS. A ação desse módulo PKS no produto da CyrC (etapa 4) resulta na adição de um acetato e redução do grupo ceto no C-10 a uma hidroxila e desidratação de uma dupla ligação entre C-9 e C-10. Essa dupla ligação é o sítio de um ataque nucleofílico pelo grupo amidino do N-19 via outra reação de adição de Michael, que também segue as regras de Baldwin para o fechamento do anel, resultando na formação do segundo anel da CYN. O intermediário produzido por CyrD é o substrato para CyrE (etapa 5). A enzima PKS, CyrE, catalisa a adição

de um acetato e a formação de uma dupla ligação entre C-7 e C-8. Essa dupla ligação é atacada por N-18 via reação de adição de Michael, ocorrendo a terceira ciclização. O gene *cyrF* codifica o último módulo PKS, contendo apenas uma KS, AT e ACP. A enzima CyrF atua no produto da CyrE e alonga a cadeia pela adição de um acetato (etapa 6), deixando o C-4 e C-6 não reduzidos (MIHALI et al., 2008).

A etapa 7 envolve a formação do anel uracila, o qual é crucial para a toxicidade da CYN. Essa etapa consiste na ação de duas enzimas, CyrG e CyrH, que são mais semelhantes às enzimas da família amido-hidrolases/ureases/di-hidro-orotases, cujos membros catalisam a formação e clivagem de ligações N-C. Essas enzimas transferem um segundo grupo guanidino de uma molécula doadora, tal como a arginina ou ureia, para C-6 e C-4 da CYN, resultando na formação do anel uracila. A primeira reação consiste na formação de uma ligação covalente entre o N do doador guanidino e C-6 da CYN, seguida pela eliminação de H_2O, formando uma dupla ligação entre C-5 e C-6. A segunda reação catalisa a formação de uma ligação entre o segundo N do doador guanidino e C-4 da CYN, concomitantemente com a quebra da ligação tioéster entre a ACP da CyrF e CYN, causando a liberação da molécula do complexo enzimático. A terceira reação catalisa a clivagem do grupo guanidino de uma outra molécula doadora, que não ureia. A ação de CyrG e CyrH na formação do anel uracila em CYN descreve uma nova via de biossíntese de pirimidina (MIHALI et al., 2008).

A sulfatação da CYN no C-12 é provavelmente realizada pela ação de uma sulfotransferase. O gene *cyrJ* codifica uma proteína que é muito semelhante à 3'-fosfoadenosina-5'-fosfossulfato (PAPS) sulfotransferase-dependente. Enzimas similares foram recentemente relacionadas com a sulfatação de outras cianotoxinas (KELLMANN et al., 2008). O agrupamento gênico da CYN também codifica uma adenilsulfato quinase (ASK), ou seja, CyrN. As enzimas ASKs catalisam a formação de PAPS, que é o doador de sulfato para as sulfotransferases. A CyrJ sulfata a CYN no C-12 enquanto a CyrN cria o "pool" de PAPS requerido para essa reação. A reação final complementar é realizada pela enzima CyrI, a qual supostamente catalisa a hidroxilação do C-7, um resíduo que, juntamente com o anel de uracila, confere a toxicidade da CYN (MIHALI et al., 2008).

O agrupamento gênico da CYN contém ainda o gene *cyrK*, cujo produto se assemelha à enzima MATE (multidrogas e extrusão de substâncias tóxicas) da família de NorM. CyrK poderia, então, funcionar como uma transportadora de CYN, com base nessa similaridade e na sua localização central no agrupamento. Outro gene encontrado na extremidade 3' da CYN é o *cyrO*. Ele codifica uma proteína hipotética que apresenta similaridade com as proteínas repetitivas WD, as quais têm diversos papéis regulatórios e de transdução de sinais. CyrO

também pode ter um papel importante na regulação da transcrição e na ligação do DNA, e também tem similaridade com proteínas da família AAA, que frequentemente desempenham funções semelhantes às chaperonas e ajudam na montagem, operação ou desmontagem de complexos proteicos. Outras suposições sobre o papel da CyrO são prejudicadas devido à baixa similaridade de sequência com outras proteínas dos bancos de dados (PEARSON et al., 2010).

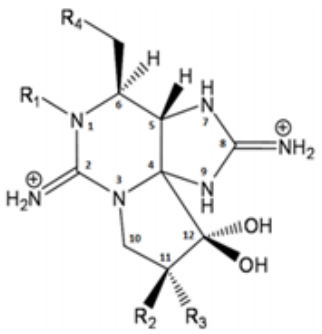
A toxina CYN foi identificada pela primeira vez em 1979, quando 148 indígenas da Ilha de Palm em Queensland, Austrália, foram hospitalizados com sintomas de hepatoenterite após a ingestão de água da represa Solomon, sendo este incidente associado com a presença de floração de *C. raciborskii* (HAWKINS et al., 1985). Neste incidente, 138 crianças e 10 adultos tiveram os sintomas de mal-estar, anorexia, vômito, dor de cabeça, dores no fígado, constipação seguida de diarréia sanguinolenta além de outros sintomas de desidratação (CHONG et al., 2002).

Ensaios avaliando a toxicidade de CYN já foram realizados em ratos através da injeção via intraperitoneal (i.p.) (OHTANI et al., 1992; HARADA et al., 1994; TERAO et al., 1994; FALCONER et al., 1999) e por via oral (FALCONER et al., 1999; SEAWRIGHT et al., 1999) da toxina, cuja DL_{50} após 24h (i.p.) foi de 2,1 $mg.kg^{-1}$. Com uma dose baixa de 0,2 $mg.kg^{-1}$ de CYN, os ratos foram a óbito após 5-6 dias da injeção (i.p.) (OHTANI et al., 1992), e a DL_{50} após 5 dias de injeção via oral foi de aproximadamente 6 $mg.kg^{-1}$ (SEAWRIGHT et al., 1999). Exames histopatológicos mostraram que o fígado foi o principal órgão atingido, mas os rins, timo e coração também foram afetados (HARADA et al., 1994; TERAO et al., 1994; FALCONER et al., 1999). Esses episódios de envenenamento humano atribuídos à cilindrospermopsina contribuíram para um aumento substancial nas pesquisas sobre cianobactérias e suas toxinas, resultando no acúmulo de informações sobre toxidez, estruturas das cianotoxinas e métodos analíticos para sua determinação. No entanto, estudos confirmando a produção de CYN ou relacionados à biossíntese desta toxina por linhagens brasileiras ainda não foram relatados.

2.2.2 Saxitoxinas

A saxitoxina (STX - $C_{10}H_{17}N_7O_4$) e seus derivados são alcaloides neurotóxicos também conhecidos como PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*) por seus efeitos terem sido primeiramente descritos em humanos envenenados após a ingestão de moluscos contaminados

(LLEWELLYN, 2006). Estruturalmente, as saxitoxinas, que compreendem cerca de 57 análogos (WIESE et al., 2010), são divididas em duas categorias: saxitoxina e neosaxitoxina. Em cada categoria, existem variações na estereoquímica dos grupamentos sulfato, carbamoil, hidroxila e benzoato, dos carbonos C-1, C-11 e C-17 (LLEWELLYN, 2006; NEGRI; JONES; HINDMARSH, 1995), no entanto, elas compartilham a estrutura tricíclica central (WIESE et al., 2010). Dentre as variantes mais comumente encontradas e relatadas na literatura, estão saxitoxina (STX), neosaxitoxina (neoSTX), goniautoxina 2 (GTX2), goniautoxina 3 (GTX3), goniautoxina 4 (GTX4), decarbamoil goniautoxina 2 (dcGTX2), decarbomoil goniautoxina 3 (dcGTX3), decarbamoil saxitoxina (dcSTX) e C-toxinas (C1 e C2) (ARÁOZ, MOLGÓ, DE MARSAC, 2010), Figura 6.



Esqueleto PST

TOXINA	R1	R2	R3	R4
STX	H	H	H	
NEO	OH	H	H	
GTXI	OH	H	OSO_3^-	H_2N-COO
GTXII	H	H	OSO_3^-	(Carbamoil -)
GTXIII	H	OSO_3^-	H	
GTXIV	OH	OSO_3^-	H	
B1	H	H	H	
B2	OH	H	H	
C1	H	H	OSO_3^-	^-O_3S-NH-COO
C2	H	OSO_3^-	H	(*N*-sulfo-carbamoil-)
C3	OH	H	OSO_3^-	
C4	OH	OSO_3^-	H	
dc-STX	H	H	H	
dc-NEO	OH	H	H	
dc-GTX I	OH	H	OSO_3^-	HO
dc-GTX II	H	H	OSO_3^-	(Decarbamoil -)
dc-GTX II	H	OSO_3^-	H	
dc-GTX II	OH	OSO_3^-	H	

Figura 6 - Estrutura da saxitoxina e suas variantes naturais mais conhecidas (adaptado de LLEWELLYN, 2006)

As saxitoxinas são produzidas pelas cianobactérias dos gêneros *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya*, *Raphidiopsis*, *Planktothrix*, *Scytonema*, e também por dinoflagelados marinhos (NEILAN et al., 2012; LLEWELLYN, 2006). Em 2008, Kellmann, Mihali e Neilan desenharam um conjunto de oligonucleotídeos degenerados (NOD-F/NOD-R) baseados nas regiões conservadas do gene codificador da enzima OCTase (*o*-carbamoiltransferase) que, juntamente com o DNA genômico de quatro cianobactérias produtoras de saxitoxina (*Anabaena circinalis* AWQC131C, *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5, *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 e *Lyngbya wollei*), foram usados em uma PCR. O

gene amplificado foi denominado *sxtI* e as quatro sequências completas foram usadas na construção de um conjunto de oligonucleotídeos não degenerado (Sxt1-F/R) que amplifica um fragmento do gene *sxtI* de aproximadamente 1669 pb. Uma PCR realizada com esses oligunocleotídeos e DNA genômico de 28 cianobactérias mostrou que somente as produtoras de saxitoxinas apresentaram amplificação, demonstrando a especificidade dos oligonucleotídeos. A sequência presumível completa do agrupamento gênico envolvido na biossíntese de saxitoxina foi obtida usando a técnica de "PCR walking" no genoma da cianobactéria *C. raciborskii* T3, tendo como ponto de partida o gene *sxtI*. Posteriormente, outras cinco linhagens de cianobactérias tiveram o agrupamento gênico *sxt* descrito, sendo elas, *L. wollei* (MIHALI; CARMICHAEL; NEILAN, 2011), *R. brookii* D9 (STUCKEN et al., 2010), *A. circinalis* AWQC131C (MIHALI; KELLMANN; NEILAN, 2009), *Aphanizomenon* sp. NH-5 (MIHALI; KELLMANN; NEILAN, 2009) e *A. circinalis* ACBUO2 (MOUSTAFA et al., 2009), Tabela 3. O agrupamento gênico *sxt* nestas linhagens variam no tamanho de 25,7 kb a 35,6 kb com até 33 genes que codificam enzimas biossintéticas, transportadores e proteínas de regulação, Figura 7. A localização dos genes dentro do agrupamento gênico é diferente para cada uma das linhagens sequenciadas, e a presença ou ausência de genes também determina a especificidade da toxina que será expressa por cada linhagem (NEILAN et al., 2012).

Tabela 3 - Tamanho do agrupamento gênico da saxitoxina para seis cianobactérias descritas

	***C. raciborskii* T3**	***R. brookii* D9**	***A. circinalis* AWQC131C**	***Aphanizomenon* sp. NH-5**	***A. circinalis* ACBUO2**	***L. wollei***
Tamanho do agrupamento	35 kb	25,7 kb	30,9 kb	29,05 kb	4,5Mb Incompleto	35,6 kb
ORFs	31	25	32	26	9	33
			Genes (tamanho pb)			
sxtA	3075	3738	3075	3075	3075	3732
sxtB	957	957	978	969	957	969
sxtC	354	354	285	285	354	285
sxtD	759	801	759	759	759	759
sxtE	387	387	477	363	387	363
sxtF	1416	1416	-	-	-	-
sxtG	1134	1134	1134	1134	-	1134
sxtH	1005	1005	1020	1020	-	1029
sxtI	1839	1839	1839	1839	-	1071
sxtJ	444	444	405	405	-	-
sxtK	165	-	165	165	-	-
sxtL	1299	1299	1281	1278	-	-
sxtM	1449	1449	1458	1458	-	#
sxtN	831	-	870	846	-	#
sxtO	603	603	570	-	-	-
sxtP	1227	1227	1449	1443	1227	1482
sxtQ	777	777	777	777	777	777
sxtR	777	777	804	777	777	777
sxtS	726	726	726	729	-	801
sxtT	1005	1005	1020	1020	-	1005
sxtU	750	745	750	750	-	750
sxtV	1653	-	Interrompido	1365	-	1680
sxtW	327	-	-	327	-	330
sxtX	774	-	-	756	-	774
sxtY	666	*	-	-	-	-
sxtZ	1353	*	-	-	-	-
Referência	Kellmann et al., 2008a	Stucken et al., 2010; Soto-Liebe et al., 2010	Mihali; Kellmann; Neilan, 2009	Mihali; Kellmann; Neilan, 2009	Moustafa et al., 2009	Mihali; Carmichael; Neilan, 2011

(-) não encontrado ou não descrito; (*) enzimas modificadas; (#) mais de um fragmento gênico.

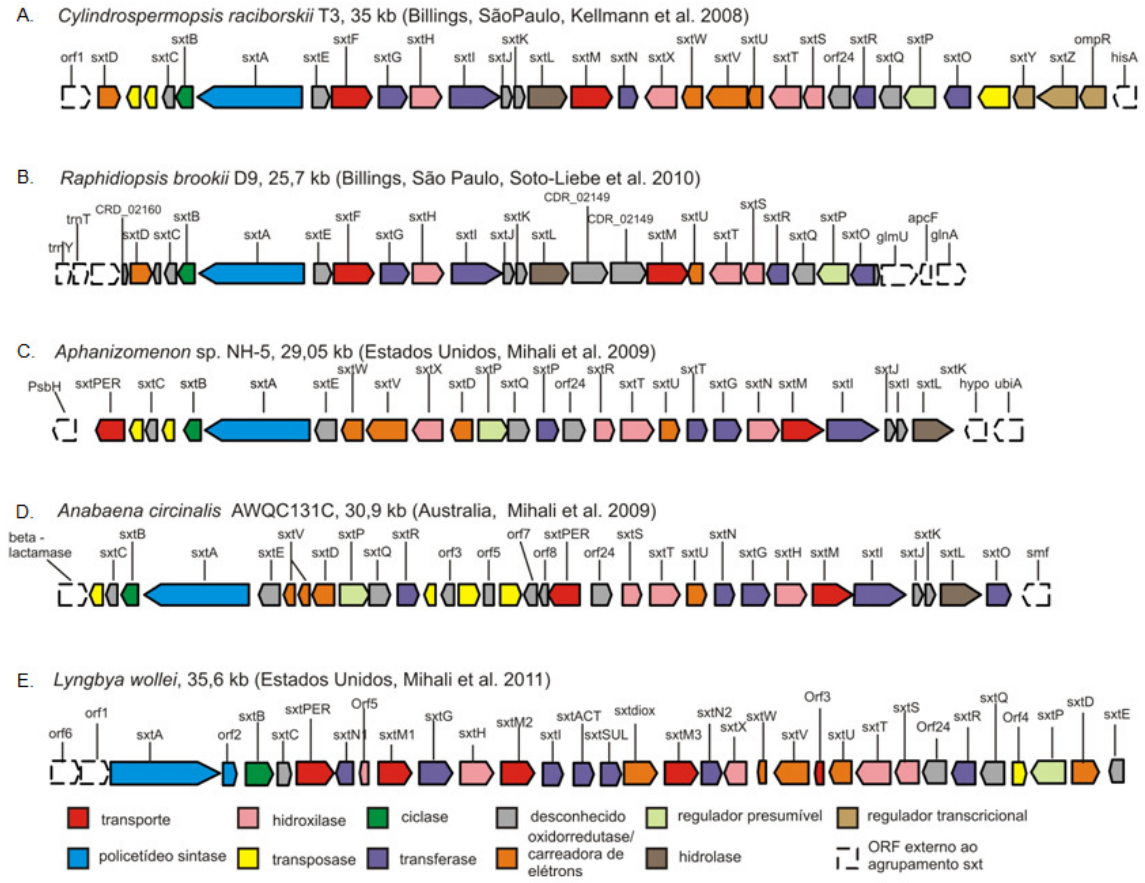


Figura 7 - Organização estrutural do agrupamento gênico *sxt* em cinco cianobactérias (KELLMANN et al., 2008a; SOTO-LIEBE et al., 2010; MIHALI; KELLMANN; NEILAN, 2009; MIHALI; CARMICHAEL; NEILAN, 2011)

Comparações entre o agrupamento gênico *sxt* de *C. raciborskii* T3 com o de outras cianobactérias podem fornecer informações sobre a função dos genes, e também refletem os diferentes perfis de produção de toxinas observados (SOTO-LIEBE et al., 2010). Por exemplo, o agrupamento gênico *sxt* de *C. raciborskii* T3 apresenta 35 kb e 31 quadros de leitura aberto (ORFs), enquanto que o pequeno agrupamento gênico *sxt* de *R. brookii* D9 tem 25,7 kb e codifica 25 ORFs. Somente 20 ORFs são partilhadas entre estes agrupamentos gênicos, e 19 delas apresentam 100% de similaridade. Além disso, quatro genes em *C. raciborskii* T3 (*sxtX*, *sxtN*, *sxtW* e *sxtV*) estão ausentes no agrupamento *sxt* de *R. brookii* D9 (SOTO-LIEBE et al., 2010, STUCKEN et al., 2010). O produto de *sxtX* na linhagem T3 está putativamente envolvido na síntese de neosaxitoxina (KELLMANN et al., 2008a), sendo assim, a ausência desse gene na linhagem D9 explicaria a não produção de neosaxitoxina por ela. Análises de LC-MS/MS mostraram que *R. brookii* D9 produz STX, dcSTX, GTX2/3 e

dcGTX2/3 (SOTO-LIEBE et al., 2010). Os genes *sxtV* e *sxtW* foram descritos como parte de um sistema de transporte de elétrons para o funcionamento de enzimas oxigenases, e o gene *sxtN* foi proposto como sendo o codificador de uma sulfotransferase envolvida na produção de análogos sulfatados das toxinas PSPs (KELLMANN et al., 2008a). Outra diferença observada com o sequenciamento do agrupamento *sxt* das linhagens T3 e D9, é que a primeira codifica três proteínas regulatórias (*sxtY*, *sxtZ* e *ompR*) localizadas na porção final do agrupamento gênico e que não estão presentes no agrupamento *sxt* da linhagem D9, mas estão localizadas em outra porção do genoma, conservando a mesma organização. O agrupamento gênico *sxt* da D9 está flanqueado na porção 3' terminal por ORFs com produtos de tradução semelhantes à proteína bifuncional GlmU, aloficocianina subunidade β (ApcF), e glutamina sintetase (GS). A expressão dos genes *apcF* e *glnA* é regulada pelo nitrogênio (JOHNSON et al., 1988; HERRERO et al., 2001), portanto, a produção de STX também pode ser regulada pela disponibilidade de nitrogênio na linhagem D9 (SOTO-LIEBE et al., 2010).

A via biossintética de STX proposta é baseada no modelo da incorporação de substrato com o envolvimento das enzimas aminotransferase classe II, amidinotransferase, metiltransferase dependente de SAM, hidroxilases e *o*-carbamoiltransferase (OCTase), responsável pela transferência de um grupo carbamoil para a cadeia lateral do precursor da saxitoxina, sendo, portanto, uma das enzimas chaves na biossíntese de saxitoxina. A OCTase também está envolvida na produção de fatores de nodulação e antibióticos (COQUE et al., 1995).

A biossíntese de STX é iniciada com SxtA, um novo tipo de PKS, que possui quatro domínios catalíticos (*sxtA1* – domínio metiltransferase, MTF; *sxtA2* – domínio GNAT envolvido no carregamento da proteína transportadora de acila, ACTF; *sxtA3* – um domínio de proteína carreadora de acila, ACP; e *sxtA4* – um domínio de condensação, AONS) (MURRAY; MIHALI; NEILAN, 2011; MIHALI; KELLMANN; NEILAN, 2009), Figura 8. Os três heterociclos da saxitoxina são formados por reações desconhecidas, e o intermediário resultante é metilado para formar a cadeia lateral, o qual é hidroxilado via epoxidação e, então, *o*-carbamoilado. Finalmente, os anéis de carbono (C-12) recebem dois grupos hidroxilas.

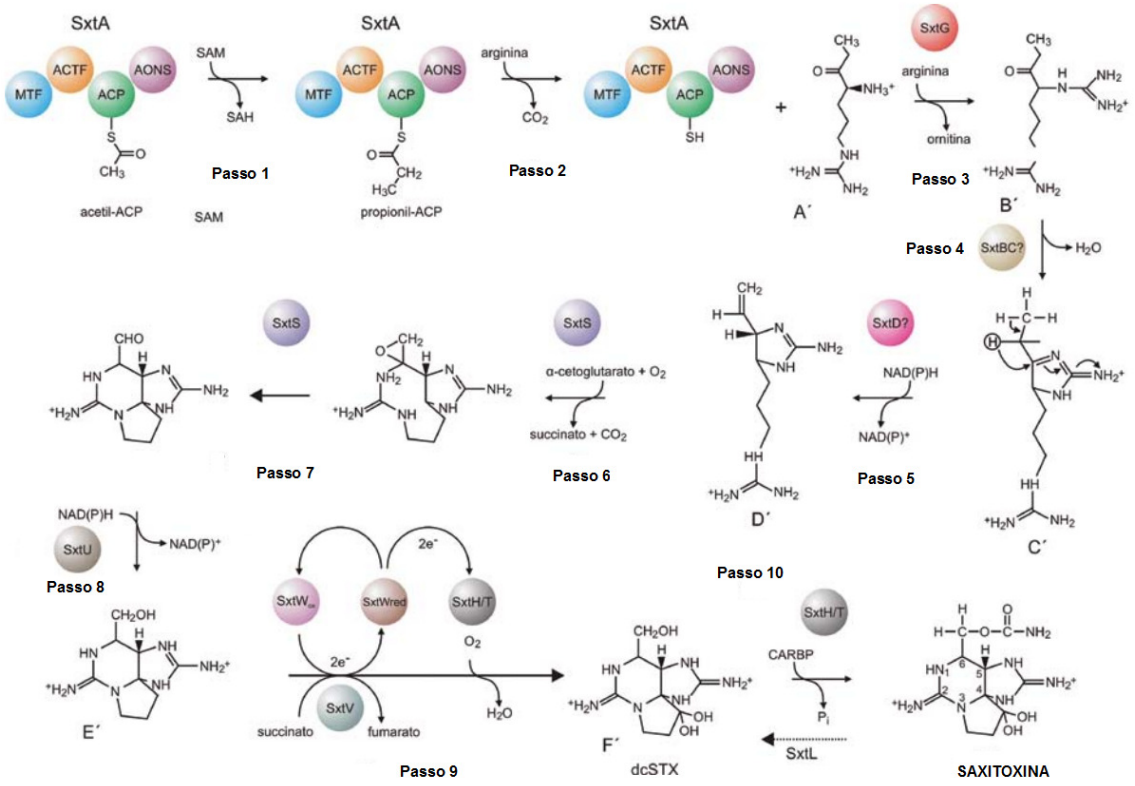


Figura 8 - Via biossintética da saxitoxina (adaptado de MIHALI; KELLMANN; NEILAN, 2009; PEARSON et al., 2010)

No Brasil, o primeiro relato da ocorrência de *C. raciborskii* data de 1969 em uma floração classificada inicialmente como sendo de *Anabaena flos-aquae* (PALMER, 1969; TUCCI; SANT'ANNA, 2003). Lagos et al. (1999) relataram pela primeira vez a ocorrência de PSP em uma densa floração de *C. raciborskii* ocorrida no estado de São Paulo. Desde então estudos têm observado *que C. raciborskii* é um componente importante entre as espécies formadoras de florações, sendo que, todas as linhagens toxigênicas isoladas até o presente no país são produtoras de saxitoxinas (HOFF-RISSETI et al., 2012; MOLICA et al., 2005; MOLICA et al., 2002; LAGOS, et al., 1999). Entre os sintomas mais comuns de envenenamento por saxitoxinas estão: parestesia e dormência progressiva da face e do pescoço; fraqueza e perda de coordenação motora; baixa progressiva da ventilação e, em altas doses, paralisia e morte (KAO, 1993). O mecanismo de ação das saxitoxinas se dá por ligação e bloqueio dos canais de sódio em células nervosas (FERRÃO-FILHO, 2009).

2.2.3 Anatoxina-a, Homoanatoxina-a e Anatoxina-a(s)

Anatoxina-a (ANTX - $C_{10}H_{15}NO$) e seu homólogo homoanatoxina-a (HANTX $C_{11}H_{18}NO$), Figura 9, são aminas secundárias bicíclicas de baixa massa molecular, sintetizadas por várias cianobactérias planctônicas e bentônicas (ARÁOZ; MOLGÓ; DE MARSAC, 2010). Anatoxina-a é sintetizada por vários membros do gênero *Anabaena* (HARADA et al., 1989), *Aphanizomenon* (SELWOOD et al., 2007), *Cylindrospermum* (SIVONEN et al., 1989), *Microcystis* (PARK et al., 1993), *Oscillatoria* (SIVONEN et al., 1989), *Planktothrix* (VIAGGIU et al., 2004) e *Raphidiopsis* (NAMIKOSHI et al., 2003). Homoanatoxina-a é sintetizada por algumas espécies do gênero *Oscillatoria* (SKULBERG et al., 1992), *Anabaena* (FUREY et al., 2003), *Raphidiopsis* (NAMIKOSHI et al., 2003) e *Phormidium* (WOOD et al., 2007). As duas toxinas são alcaloides com potente ação agonista dos receptores nicotínicos da acetilcolina provocando a morte rápida de animais por asfixia, e foram simultaneamente sintetizadas por *Raphidiopsis mediterranea* Skuja e *Oscillatoria* (SIVONEN et al., 1989; 1990; NAMIKOSHI, 2004). Essas neurotoxinas são sintetizadas exclusivamente por cianobactérias (MÉJEAN et al., 2009).

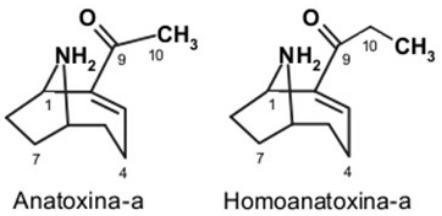
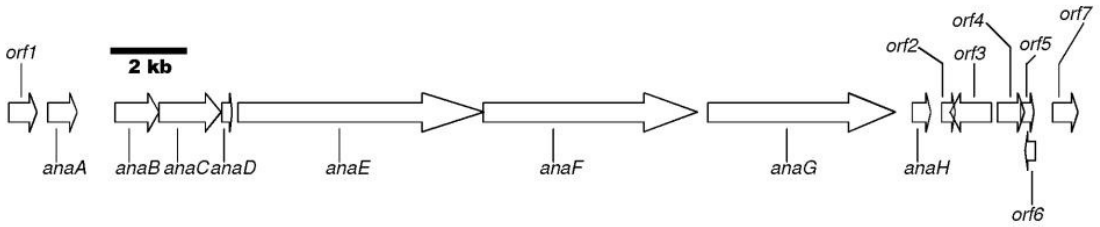


Figura 9 - Estrutura química da anatoxina-a e seu homólogo homoanatoxina-a (ARÁOZ; MOLGÓ; DE MARSAC, 2010)

O sequenciamento do genoma da cianobactéria *Oscillatoria* PCC 6506, produtora de anatoxina-a e homoanatoxina-a (CADEL-SIX et al., 2009) foi iniciado e identificou-se um fragmento de DNA de 29 kb contendo a sequência ks2 que codifica para uma enzima PKS. A sequência desse fragmento genômico foi analisada, sendo encontrados muitos genes, e sugeridas funções para as proteínas (Figura 10) após a determinação da rota biossintética de anatoxina-a e homoanatoxina-a, que neste caso teve como precursor uma prolina, Figura 11 (MÉJEAN et al., 2009). A sequência ks2 foi previamente identificada por Cadel-Six et al. (2009) e é específica para cianobactérias do gênero *Oscillatoria* produtoras de anatoxina-a e homoanatoxina-a.



Produto gênico	Função	Produto gênico	Função
Orf1	Ciclase	AnaE	PKS tipo I
AnaA	Tioesterase tipo II	AnaF	PKS tipo I
AnaB	Prolina desidrogenase	AnaG	PKS tipo I
AnaC	Proteína adeniladora de prolina	AnaH	Transposase
AnaD	Proteína transportadora de acila		

Figura 10 - Organização estrutural do agrupamento de genes putativos responsáveis pela biossíntese de anatoxina-a e homoanatoxina-a em *Oscillatoria* PCC 6506 e suas funções (MÉJEAN et al., 2009)

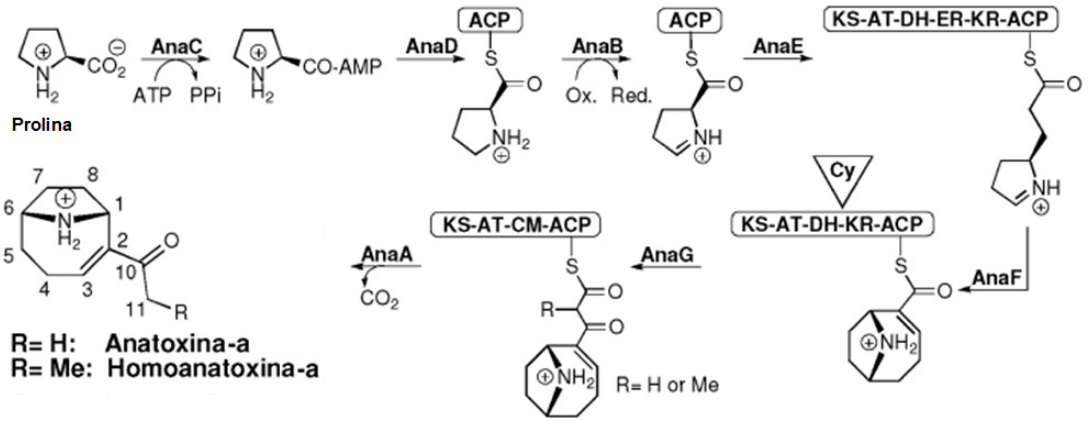


Figura 11 - Rota biossintética proposta para anatoxina-a e homoanatoxina-a é iniciada por uma prolina. KS - Cetosintase, AT - Aciltransferase, KR - Cetoredutase, DH - Dehidratase, ER - Enoil Redutase, ACP - Proteína Carreadora de Acila, Cy - Ciclase e CM - Metiltransferase (adaptado de MÉJEAN et al., 2009)

Hemscheidt et al. (1995) mostraram que anatoxina-a e homoanatoxina-a podem ser originadas a partir de acetato e glutamato. A fonte de carbono é a mesma para as duas cianotoxinas, com exceção do C-12. Estes resultados permitiram aos autores supor a existência de um precursor comum para ambas as toxinas que, após sua descarboxilação, pode originar: i) anatoxina-a, através da redução enzimática do precursor, ou ii) homoanatoxina-a, através de uma adição enzimática de um grupamento metila oriundo do composto doador SAM (S-adenosil-L-metionina). Mais tarde, foi identificada L-metionina como o precursor do grupo metila em C-12 para a biossíntese de homoanatoxina-a. Logo, homoanatoxina-a pode

ser derivada da metilação de anatoxina-a (NAMIKOSHI et al., 2004). No entanto, os passos detalhados da síntese dessas toxinas ainda não foram elucidados. A descarboxilação para gerar anatoxina-a pode ser espontânea ou ser catalisada por uma enzima para gerar homoanatoxina-a, fato ainda não confirmado (MÉJEAN et al., 2009).

As três primeiras etapas onde estão envolvidos AnaC, AnaD e AnaB, provavelmente são semelhantes às descritas para a biossíntese de pirrol, com adenilação da prolina, carregamento de uma ACP, e oxidação por uma flavoenzima, respectivamente. AnaE e AnaF podem ser responsáveis pela extensão e ciclização do tioéster, e AnaG pode estar relacionada com as reações de condensação e metilação do tioéster bicíclico (MÉJEAN et al., 2009).

Diferentemente das neurotoxinas saxitoxina, anatoxina-a e homoanatoxina-a que são alcaloides, a neurotoxina anatoxina-a(s) ($C_7H_{17}N_4O_4P$) é um organofosforado natural, Figura 12, sendo que o "s" do nome deriva da excessiva salivação viscosa observada em camundongos expostos a esta cianotoxina (AAS et al., 1996). Anatoxina-a(s) inibe irreversivelmente a acetilcolinesterase (MAHMOOD; CARMICHAEL, 1987), impedindo a hidrólise da acetilcolina, que induz uma excessiva estimulação colinérgica e abertura dos canais iônicos, provocando a exaustão do músculo. Um fato muito importante do ponto de vista clínico é que a inibição da acetilcolinesterase, produzida pela anatoxina-a(s), não pode ser revertida por oximas (CATTERALL, 1980; HYDE; CARMICHAEL, 1991). O agrupamento gênico *antx-a(s)* ainda não foi descrito.

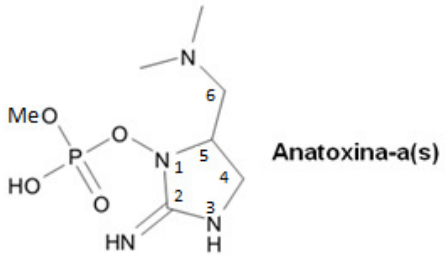


Figura 12 - Estrutura química da anatoxina-a(s) (adaptado de DÖRR et al., 2010)

Anatoxina-a(s) age como um inseticida organofosforado sintético, no entanto, é o único organofosforado inibidor irreversível de acetilcolinesterase de ocorrência natural conhecido (AAS et al., 1996). Cook et al. (1988) fizeram uma comparação da capacidade de inibição da acetilcolinesterase entre a anatoxina-a(s) e inseticidas sintéticos inibidores reversíveis (carbamatos) e irreversíveis (organofosforados). Os resultados obtidos sugerem uma capacidade inibitória da acetilcolinesterase da anatoxina-a(s) comparável com o

paraoxon, um inseticida organofosforado. Além disso, em experimentos com animais (administração via oral e intraperitoneal) foi verificado que essa toxina é incapaz de inibir a acetilcolinesterase cerebral, concluindo-se que ela não atravessa a barreira hematoencefálica. Por essa razão, sugere-se que essa toxina tenha uma baixa bioacumulação e baixa permanência em células adiposas e membranas celulares. Além disso, esse composto é muito mais solúvel em água que os organofosforados sintéticos.

Anatoxina-a(s) já foi relatada em alguns países como Canadá (CARMICHAEL; GORHAM, 1978) e Dinamarca (HENRIKSEN et al., 1997; ONODERA et al., 1997), onde houve a morte de animais relacionadas a intoxicação por essa cianotoxina (MAHMOOD et al., 1998; HENRIKSEN et al., 1997) e nos Estados Unidos (MAHMOOD et al., 1998) sendo produzida por linhagens de *Anabaena flos-aquae* e *A. lemmermannii*. Adicionalmente, a atividade de inibição da acetilcolinesterase foi encontrada em extratos de *Anabaena spirolides* linhagens ITEP-024, ITEP-025 e ITEP-026, posteriormente reclassificadas como *Sphaerospermopsis torques-reginae* (WERNER et al., 2012) isoladas de florações do reservatório Tapacurá, em Pernambuco, Brasil (MOLICA et al., 2005). Quando extratos de *A. flos-aquae* NRC 525-17 ou a toxina purificada foram administrados via i.p. em camundongos, houve morte dos animais precedida de salivação, olhos lacrimejantes, incontinência urinária e parada respiratória após 240 minutos da administração (LD_{50} via i.p em camundongos: 20 $mg.kg^{-1}$), (MAHMOOD; CARMICHAEL, 1986; ONODERA et al., 1997). Esta baixa incidência de casos e relatos pode ser explicada pela sua baixa estabilidade em meios alcalinos (MATSUNAGA et al., 1989) e pela falta de padrões analíticos comerciais disponíveis, fatores que dificultam o desenvolvimento de métodos específicos para determinação e identificação dessa cianotoxina. A detecção de anatoxina-a(s) em amostras ambientais é feita em bioensaios com animais e testes de inibição da acetilcolinesterase, métodos que apresentam sérios problemas, como a baixa sensibilidade e especificidade. Além disso, várias questões éticas estão envolvidas em testes com animais, levando à busca de métodos alternativos de análise (DÖRR et al., 2010).

Matsunaga et al. (1989) realizaram alguns experimentos com a linhagem *A. flos-aquae* NRC 525-17 usando dois compostos marcados para determinar a estrutura química da anatoxina-a(s). Análises de RMN mostraram que essa neurotoxina sofre pequenas autólises que geram uma mistura de um produto de degradação que é convertido em 4S-2-imino-4(dimetilaminometil)-imidazolidina por hidrogenação catalítica. Análises de RMN dos produtos de degradação confirmam a estereoquímica da anatoxina-a(s) e a posição do grupo metil fosfato no N-1 (MATSUNAGA et al., 1989; ONODERA et al., 1997). A

síntese total de anatoxina-a(s) ainda não foi descrita. Shimizu (1996) propôs uma rota biossintética para este organofosforado natural, sugerindo que a biossíntese de anatoxina-a(s) pode ser iniciada por um catabolismo não usual da arginina por um mecanismo de condensação conhecido por retro-Claisen que envolve a perda de uma glicina originada a partir de uma molécula de arginina (ARÁOZ; MOLGÓ; DE MARSAC, 2010), Figura 13.

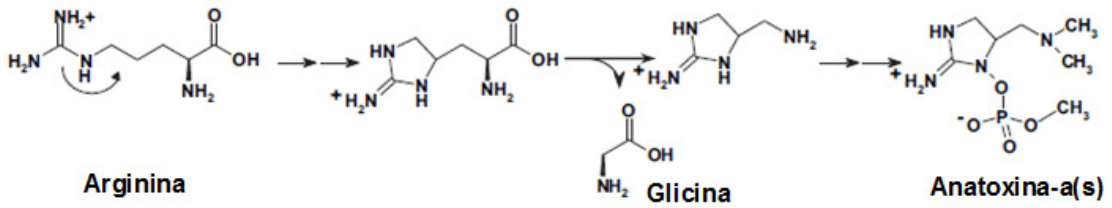
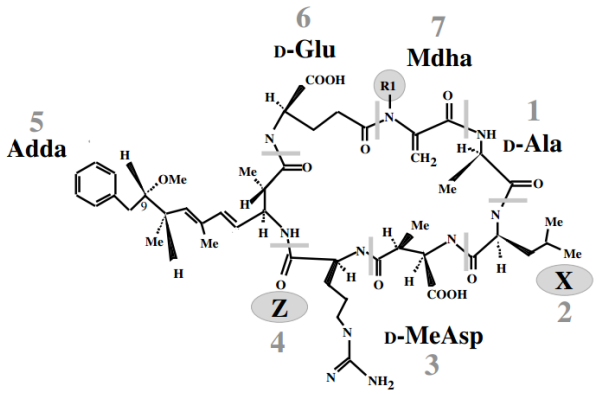


Figura 13 - Via biossintética proposta para anatoxina-a(s). A biossíntese de anatoxina-a(s) envolve a perda de uma glicina da arginina (modificado de ARÁOZ; MOLGÓ; DE MARSAC, 2010)

2.2.4 Peptídeos cíclicos

2.2.4.1 Microcistina

As microcistinas (MCY - $C_{49}H_{74}N_{10}O_{12}$ - variante LR) são peptídeos cíclicos formados por sete aminoácidos (heptapeptídeos cíclicos) de massas moleculares diferentes. Essas toxinas são caracterizadas de acordo com o arranjo dos aminoácidos na molécula, e já foram identificadas cerca de 90 isoformas estruturais de microcistinas que variam em nível de metilação, hidroxilação, sequência de peptídeos e toxicidade (WELKER; VON DÖHREN, 2006), sendo as mais conhecidas MC-LR, MC-RR, MC-YR e MC-LA, que possuem em comum a estrutura cíclica (D-Ala-L-X-D-MeAsp-L-Z-Adda-D-Glu-Mdha) no qual X e Z representam L-aminoácidos variáveis (SIVONEN; JONES, 1999; WELKER; VON DOHREN, 2006), Figura 14. D-MeAsp corresponde ao ácido D-eritro-β-metil-aspártico, MdhA à *N*-metildehidroalanina e Adda ao ácido dienóico (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6-decadienóico (BOTES et al., 1984). As microcistinas são predominantemente produzidas por linhagens dos gêneros *Microcystis*, *Planktothrix* e *Anabaena* isoladas de ambientes de água doce (WELKER; VON DÖHREN, 2006), mas também podem ser raramente encontradas em ambientes terrestres (KAPLAN et al., 2012).



Microcistina	X	Z	R1
MCY-LR	L-Leu	L-Arg	CH_3
MCY-RR	L-Arg	L-Arg	CH_3
MCY-YR	L-Tyr	L-Arg	CH_3
[Dha^7]MCY-LR	L-Leu	L-Arg	H
[Dha^7]MCY-RR	L-Arg	L-Arg	H
[Dha^7]MCY-YR	L-Tyr	L-Arg	H

Figura 14 - Estrutura da microcistina (MCY). Os aminoácidos (X e Z) e o grupo R1 (em cinza) são variáveis conforme tabela à direita. Os sete aminoácidos que formam a molécula de MCY (heptapeptídeos cíclicos) estão numerados de 1 a 7 (adaptado de TANABE et al., 2009)

As microcistinas são hepatotoxinas produzidas por diferentes gêneros de cianobactérias e são as toxinas mais comumente encontradas em ambientes de água doce, sendo consideradas altamente prejudiciais à saúde pública e à qualidade da água (DITTMANN; WIEGAND, 2006). Linhagens tóxicas e não tóxicas normalmente ocorrem simultaneamente em florações naturais devido à distribuição de genes *mcy* que podem ser expressos esporadicamente em alguns gêneros (VIA-ORDORIKA et al., 2004). As microcistinas agem principalmente na inibição das enzimas eucarióticas fosfatases do tipo 1A e 2A, que removem os grupamentos fostato das proteínas e são conhecidas como promotoras de tumores (CARMICHAEL, 1992; CODD et al., 1999; KEHR; PICCHI; DITTMANN, 2011). O mecanismo de ação das hepatotoxinas é bastante semelhante para todas as classes, produzindo disfunções hepáticas agudas e crônicas, com hemorragia e morte do animal em poucas horas em doses agudas. Além de atuarem no fígado, as microcistinas podem alterar as funções de outros órgãos como rins, pulmão, timo e coração (CODD et al., 1999). As hepatotoxinas também podem causar efeitos a longo prazo em exposições crônicas, como a formação de tumores, tendo sido relatada a incidência de câncer em populações expostas cronicamente a microcistinas e cilindrospermopsina (UENO et al., 1996; FALCONER; HUMPAGE, 2006). Em fevereiro de 1996, na cidade de Caruaru, PE, 116 (89%) dos 131 pacientes do Instituto de Doenças Renais (IDR) foram contaminados com hepatotoxinas presentes na água utilizada para hemodiálise. A maioria dos pacientes apresentou perturbações visuais, náuseas, vômitos e fraqueza muscular. Posteriormente, 100 pacientes desenvolveram insuficiência hepática aguda. Em dezembro de 1996, 52 pacientes morreram, e

estudos mostraram a presença de microcistina e cilindropermopsina na água usada na hemodiálise (AZEVEDO et al., 2002).

O grupo de genes *mcy*, que são codificados pelas enzimas NRPSs e PKSs, já foi encontrado nos gêneros *Microcystis*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nodularia*, *Phormidium* e *Chroococcus* (FRISTACHI; SINCLAIR, 2008; NEILAN et al., 2008; SIVONEN; JONES, 1999), sendo que o agrupamento gênico já foi descrito para as espécies de cianobactérias *M. aeruginosa* (três linhagens diferentes), *Anabaena* sp. e *Planktothrix agardhii*, Tabela 4 (PEARSON; NEILAN, 2008). A comparação entre agrupamentos *mcy*, responsáveis pela produção de microcistinas nesses gêneros, mostrou que a maioria dos genes está em uma ordem diferente, nem todos eles estão presentes, a identidade entre eles foi baixa e o tamanho de alguns deles também é diferente, indicando a necessidade de caracterizá-los para cada organismo (ROUHIAINEN et al., 2004).

Tabela 4 - Tamanho do agrupamento gênico da microcistina para cinco cianobactérias descritas

	***M. aeruginosa* PCC7806**	***M. aeruginosa* NIES-843**	***M. aeruginosa* K-139**	***Anabaena* sp. 90**	***P. agardhii* CYA 126**
Tamanho do agrupamento	55 kb	55 kb	55 kb	55,4 kb	55,6 kb
ORFs	10	10	10	10	9
		Genes (tamanho pb)			
mcyA	8388	8364	8364	8364	8451
mcyB	6318	6381	6381	6399	6435
mcyC	3876	3876	3873	3852	3897
mcyD	11721	11706	11718	11607	11721
mcyE	10464	10464	10461	10446 ou 10386	10467
mcyF	756	756	753	756	-
mcyG	7896	7896	7896	7827 ou 7905	7923
mcyH	1617	1758	1761	1776	1755
mcyI	1014	1014	1014	1011	-
mcyJ	846	846	846	930	831
mcyT	-	-	-	-	791
Referência	TILLETT et al., 2000	KANEKO et al., 2007	NISHIZAWA et al., 2000	ROUHIAINEN et al., 2004	CHRISTIANSEN et al., 2003

(-) não encontrado ou não descrito

Na biossíntese de microcistina, o primeiro módulo da enzima NRPS está envolvido na ativação e incorporação do aminoácido *N*-terminal, e os demais módulos, na incorporação dos aminoácidos subsequentes. As reações mínimas de NRPS são adenilação, tioesterificação e condensação. As regiões envolvidas nessas reações parciais estão localizadas em três domínios: de adenilação (A), domínio codificador de uma proteína carreadora de peptídeos (PCP) e de condensação (C). Vários outros domínios já foram descritos, como o *N*-metiltransferase (NMT ou M), envolvido em reações de acilação e epimerização

(MARAHIEL et al., 1997). A biossíntese de microcistinas pelas PKSs ocorre pela ação de, no mínimo, três domínios por módulo: aciltransferase (AT), responsável pela ativação e incorporação da unidade extensora; proteína carreadora de acila (ACP) e β-cetosintase (KS), que captura o agrupamento acila do domínio ACP anterior. Em seguida, o produto é liberado do complexo PKS por meio do domínio de tioesterase (T) (DITTMANN; NEILAN; BÖRNER, 2001), Figura 15.

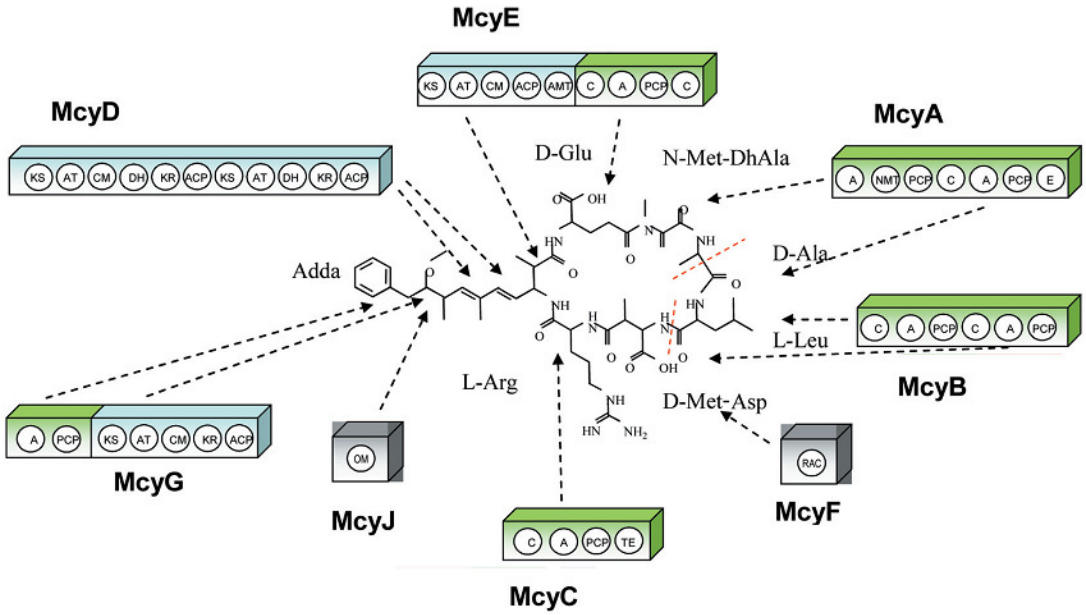


Figura 15 - Domínios estruturais das multienzimas envolvidas na biossíntese de microcistina. KS: β-cetoacil sintase; AT: aciltransferase; ACP: proteína carreadora de acila; KR: cetoacil redutase; DH: dehidratase; CM: C-metiltransferase; OM: O-metiltransferase; NM: N-metiltransferase; AMT: aminotransferase; RC: racemase. Azul: PKS; Verde: PS; Cinza: Enzimas de acabamento e finalização, ¨tailoring enzymes¨ (DITTMANN; WIEGAND, 2006)

Análises de bioinformática e de similaridade com enzimas análogas indicaram que a formação do Adda supostamente envolve enzimas codificadas por *mcyD-mcyG* e *mcyJ*. A enzima híbrida NRPS/PKS, McyG, constitui o primeiro passo na biossíntese do Adda. A hipótese inicial era de que o módulo NRPS da McyG ativava o fenilacetato, no entanto, posteriormente, a caracterização bioquímica do didomínio A-PCP (Adenilação – proteína carreadora de peptidila), localizado no N-terminal da McyG, revelou que fenilpropanoides variados são preferencialmente ativados e ligados na PCP (HICKS et al., 2006). Após a ativação, a unidade iniciadora fenilpropanoide é estendida por várias etapas de alongamento do malonil-CoA e, subsequentemente, modificada pela C-metilação, redução e desidratação,

todas as reações são catalisadas pelos módulos PKS das enzimas McyD, McyE e McyG. O domínio da aminotransferase do McyE, então, converte o policetídeo em um β-aminoácido na etapa final da biossíntese do Adda. O módulo NRPS da segunda enzima híbrida PKS/NRPS, McyE, supõe-se estar envolvido na ativação e condensação da D-Glu com o Adda.

2.2.4.2 Microviridinas

As microviridinas (MDN – $C_{84}H_{106}N_{16}O_{24}$ variante B) são uma das mais notáveis toxinas produzidas por cianobactérias e são sintetizadas pela via ribossomal. Elas são depsipeptídeos tricíclicos (peptídeos contendo ligações éster) produzidos pelos gêneros *Microcystis*, *Planktothrix* e *Nostoc* (ZIEMERT et al., 2010). Todas as microviridinas têm como característica paralela uma arquitetura do tipo gaiola e inibem especificamente vários tipos de proteases. A microviridina B (Figura 16A) tem elevado potencial terapêutico como um inibidor de elastase no tratamento de enfisema pulmonar (MURAKAMI et al., 1997; OKINO et al., 1995), enquanto que a microviridina J (Figura 16B) afeta os processos de motilidade de *Daphnia* através da inibição de proteases específicas, levando à morte do animal (ROHRLACK et al., 2004). Assim, estudos sobre a biossíntese de microviridina não somente podem ajudar no controle e prevenção do meio ambiente quanto à presenção de florações de cianobactérias, mas também podem abrir as portas para estudos de novas drogas terapêuticas (ZIEMERT et al., 2008b). A arquitetura do tricíclica das microviridinas resulta de pontes ω-éster e ω-amida. Nos últimos anos, estudos de amostras ambientais e linhagens de laboratório proporcionaram a descoberta de cerca de catorze variantes de MDN (ZIEMERT et al., 2010; GESNER-APTER; CARMELI, 2009; RESHEF; CARMELI, 2006; ROHRLACK et al., 2003; MURAKAMI et al., 1997; OKINO et al., 1995; ISHITSUKA et al., 1990). Ziermert et al. (2010) buscando encontrar linhagens de *Microcystis* presentes em florações e que apresentavam os genes envolvidos na biossíntese de MDN, observaram que existe uma ocorrência global desses genes e uma variedade natural não esperada. Eles detectaram quinze novas variantes do gene precursor *mdnA* que diferem em até 4 posições de aminoácidos das isoformas conhecidas do peptídeo.

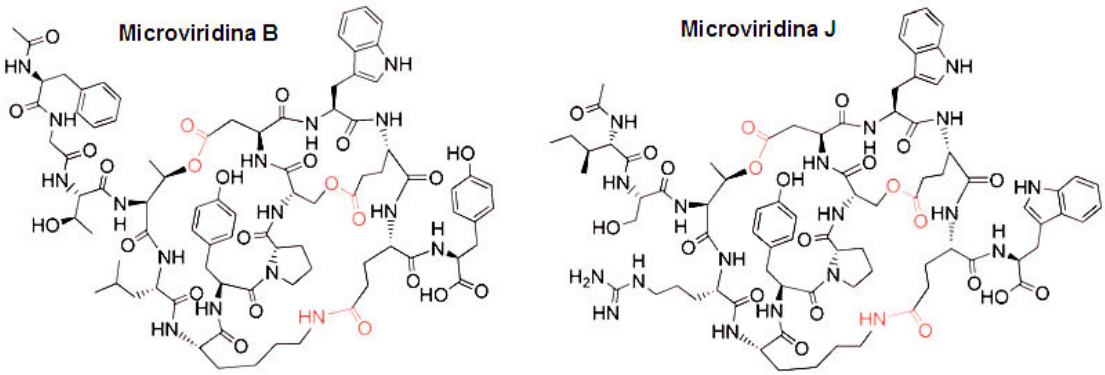


Figura 16 - Estrutura das microviridinas B e J. As pontes ω-éster e ω-amida estão destacadas em vermelho (adaptado de ZIEMERT et al., 2008b)

Depsipeptídeos são sintetizados, normalmente, pela linha de montagem das enzimas peptídeo sintetase não ribossomal (NRPS) (SCHWARZER et al., 2003; FISCHBACH; WALSH, 2006), assim como acontece com a via biossintética das cianopeptolinas (ROUHIAINEN et al., 2000). No entanto, na busca de genes NRPS em cianobactérias produtoras de MDN, não foi possível encontrar genes candidatos que pudessem estar envolvidos com a biossíntese de MDN. Pelo fato das microviridinas serem compostas, unicamente, por L-α-aminoácidos, foi proposto que a MDN seria sintetizada pela via ribossomal, assim como pode ser visto para patelamida (SCHMIDT et al., 2005; LONG et al., 2005) e outros peptídeos relacionados com cianobactérias (SUDEK et al., 2006; DONIA et al., 2008a).

Estudos têm demonstrado que o mecanismo de biossíntese de MDN é exclusivo dos gêneros *Microcystis* e *Planktothrix* (PHILMUS et al., 2008; ZIEMERT et al., 2008b). No agrupamento gênico responsável pela biossíntese da microviridina B em *M. aeruginosa* NIES-298, os 14 aminoácidos da sequência peptídica são codificados no C-terminal do peptídeo precursor putativo MdnA (ZIEMERT et al., 2008b). A macrociclização do peptídeo depende da atividade de duas enzimas do tipo “ATP-grasp ligases”, MdnB e MdnC, que são codificadas pelos genes seguintes. Outras enzimas são codificadas pelo agrupamento gênico MDN, sendo elas um transportador ABC (MdnE) e uma N-acetiltransferase (MdnD) da família das GNAT e (ZIEMERT et al., 2008b; VETTING et al., 2005), Figura 17. A atividade das enzimas MdnB e MdnC foi confirmada pela produção heteróloga em *E. coli* (ZIEMERT et al., 2008b).

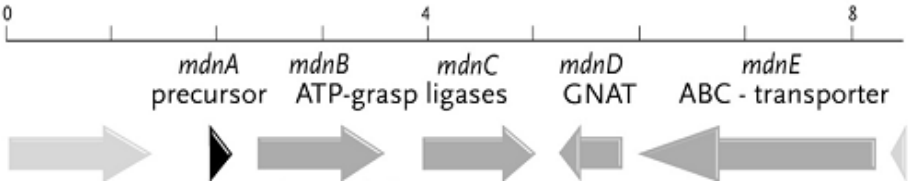


Figura 17 - Representação esquemática do agrupamento gênico da microviridina B em *M. aeruginosa* NIES-298 (ZIEMERT et al., 2010)

Até o presente momento, o agrupamento gênico MDN foi descrito para dois gêneros de cianobactérias, *Microcystis* e *Planktothrix*, sendo que três linhagens da espécie *M. aeruginosa* e uma linhagem da espécie *P. agardhii* já foram descritas, Tabela 5. Análises do agrupamento gênico que codifica para a microviridina J em *M. aeruginosa* MRC, revelaram somente a presença dos genes *mdnB*, *mdnC* e *mdnA*. A sequência do peptídeo MdnA na microviridina J é altamente similar com o peptídeo precursor em microviridina B, exceto pela região do C-terminal que difere em 13 aminoácidos. Além disso, o agrupamento gênico da microviridina J em *M. aeruginosa* MRC não apresenta os genes *mdnD* e *mdnE*. Estas duas enzimas são codificadas, provavelmente, em outra região do genoma (ZIEMERT et al., 2008b).

Tabela 5 - Tamanho do agrupamento gênico da microviridina para quatro cianobactérias descritas

	***Microcystis aeruginosa* NIES-298**	***Microcystis aeruginosa* NIES-843**	***Microcystis aeruginosa* MRC**	***Planktothrix agardhii* NIVA-CYA126/8**
Tamanho do agrupamento	9,9 kb	5,44 kb	6,7 kb	6,8 kb
ORFs	5	5	5	6
		Genes (tamanho em pb)		
mdnA	153	153	150	1794
mdnB	978	1012	981	540
mdnC	975	975	975	975
mdnD	534	534	-	993
mdnE	2064	2064	-	147
mdnF	-	-	-	153
Referência	Ziemert et al., 2008b	Kaneko et al., 2007	Ziemert et al., 2008b	Philmus et al., 2008

(–) não encontrado ou não descrito

2.2.4.3 Microciclamida

Microciclamida (MCA - $C_{24}H_{32}O_5N_6S$) é um hexapeptídeo cíclico que apresenta citotoxicidade moderada em células leucêmicas P388 de ratos (IC_{50} – 1,2 $\mu g.mL^{-1}$) (SIVONEN et al., 2010) e é formado pela via ribossomal através da atividade de uma série de enzimas de processamento muito semelhantes às enzimas envolvidas na biossíntese do composto patelamida em cianobactérias simbiontes de ascidians (ZIEMERT et al., 2008a). Microciclamida, uma substância pertencente à família das patelamidas, foi encontrada pela primeira vez em florações de *M. aeruginosa* NIES-298 (ISHIDA et al., 2000). As microciclamidas 7806A e B de *M. aeruginosa* PCC7806 (Figura 18) foram posteriormente renomeadas como aeruciclamidas, e sua estrutura foi revisada (PORTMANN et al. 2008a; 2008b). Microciclamida e aeruciclamida são sintetizadas pela via biossintética das cianobactinas (ZIEMERT et al., 2008a; PORTMANN et al., 2008a; 2008b).

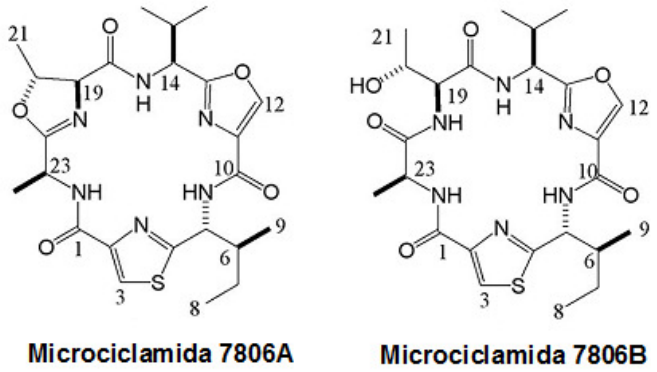


Figura 18 - Estrutura das microciclamidas 7806A e 7806B de *M. aeruginosa* PCC7806 determinado por análises de RMN e MS (ZIEMERT et al., 2008a)

Cianobactinas foi o nome coletivo proposto para peptídeos cíclicos que contêm aminoácidos heterociclizados ou aminoácidos derivados de isoprenoides (DONIA et al., 2008a; SCHMIDT; DONIA, 2009). Cianobactinas foram inicialmente definidas por conter oxazolinas, tiazolinas ou seus derivados oxidados, oxazóis e tiazóis. Essa definição foi ampliada para incluir peptídeos cíclicos, os quais contêm apenas aminoácidos proteinogênicos (LEIKOSKI et al., 2010). A cianobactina patelamida foi o primeiro peptídeo ribossomal de cianobactérias que teve sua via biossintética descrita (SCHMIDT et al., 2005).

O agrupamento gênico das cianobactinas têm aproximadamente 10 kb e contém entre 7 a 12 genes. A ordem dos genes não é conservada, no entanto, na maioria das vezes, os genes biossintéticos estão organizados como no agrupamento gênico *pat* da patelamida. Todos os agrupamentos gênicos das cianobactinas contêm duas proteases que operam juntas, um pequeno peptídeo precursor e proteínas envolvidas na maturação das cianobactinas (SCHMIDT et al., 2005; DONIA et al., 2006). As substâncias pertencentes ao grupo das cianobactinas possuem atividades antimalárica, antitumoral e reversão de várias drogas (SIVONEN et al., 2010).

O agrupamento gênico da microciclamida (13 kb) foi descrito para apenas duas linhagens de *M. aeruginosa* NIES-298 e PCC7806 e apresenta nove genes na mesma ordem dos genes da patelamida, com exceção de dois quadros abertos de leitura, os quais ainda não têm função definida conhecida (ZIERMERT et al., 2008b), Figura 19 e Tabela 6.

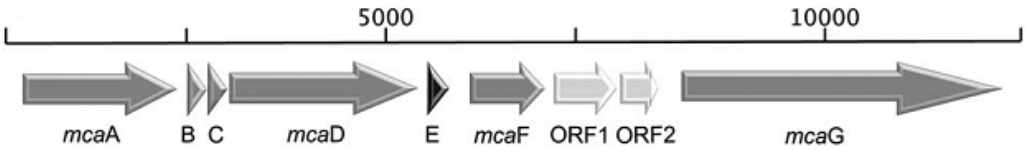


Figura 19 - Representação esquemática do agrupamento gênico da microciclamida em *M. aeruginosa* NIES-298 e PCC7806. Genes que apresentam similaridade com os genes envolvidos na biossíntese do composto patelamida em *P. didemni* estão mostrados em cinza. A proteína precursora está realçada em preto. As ORFs, que não podem ser atribuídas à biossíntese de microciclamida, estão em cinza claro (ZIEMERT et al., 2008a)

Tabela 6 - Tamanho do agrupamento gênico da microciclamida para duas cianobactérias descritas

	***Microcystis aeruginosa* NIES-298**	***Microcystis aeruginosa* PCC7806**
Tamanho do agrupamento	13,8 kb	12,6 kb
ORFs	9	9
	Genes (tamanho em pb)	
*mca*A	1974	1974
*mca*B	252	252
*mca*C	243	243
*mca*D	2331	2331
*mca*E	225	309
*mca*F	966	966
ORF1	804	804
ORF2	348	348
*mca*G	4056	3942
Referência	ZIEMERT et al., 2008a	ZIEMERT et al., 2008a

O produto gênico *mcaA* tem 68% de identidade com o PatA de *P. didemni* e codifica um multidomínio enzimático que compreende um domínio de protease na região do N-terminal. Nenhum motivo conservado foi detectado no C-terminal de McaA. A protease PatA foi predita como ser responsável pelo processamento do peptídeo precursor da patelamida em *P. didemni* (SCHMIDT et al., 2005). McaB e McaC são 72 e 53% idênticos a PatB e PatC, respectivamente. Ambas as proteínas não têm similaridade significativa com proteínas caracterizadas em bancos de dados e mostraram ser dispensáveis para a biossíntese de patelamida em *E. coli* (DONIA et al., 2006; 2008a). McaD tem 77% de identidade com a proteína PatD de *P. didemni*, que compreende dois domínios e parece estar envolvido na heterociclização de cisteína, treonina e/ou serina dos anéis tiazolina e oxazolina. O precursor putativo McaE difere parcialmente na sequência e no número de aminoácidos do seu correspondente ortólogo em *P. didemni*. Enquanto que o precursor em *P. didemni* codifica duas diferentes patelamidas, duas cópias do mesmo peptídeo são codificados em *M. aeruginosa* NIES-298. McaF apresenta 52% de identidade com PatF de *P. didemni*. Essa proteína parece estar envolvida na heterociclização e/ou prenilação das cianobactinas (SCHMIDT; DONIA, 2009). O homólogo de PatG, McaG, é uma proteína putativa que parece ser similar com McaA e está envolvida na oxidação de tiazolinas e oxazolinas em tiazóis e oxazóis (SCHMIDT et al., 2005).

2.3 Sequenciamento de genomas de cianobactérias

O primeiro genoma de cianobactéria foi sequenciado em 1996 por pesquisadores japoneses e a linhagem escolhida foi *Synechocystis* sp. PCC 6803, isolada de água doce (KANEKO et al., 1996). Até o momento, foram completados ou estão sendo finalizados os genomas de 75 linhagens de cianobactérias com representantes de 23 gêneros, a maioria destes pertencentes aos gêneros *Prochlorococcus* e *Synechococcus* isolados de ambientes marinhos, segundo o NCBI ("National Center for Biotechnology Information"). A diversidade de cianobactérias pode ser vista também a nível genômico, já que os genomas de cianobactérias variam consideravelmente quanto ao tamanho (~ 1,4 – 9,1 Mpb), conteúdo G+C (31 – 63%), número de genes que codificam proteínas (1.214 – 8.446) e proporção de nucleotídeos codificantes (52 – 94%) (LARSSON et al., 2011). As diferenças podem ser resultado da expansão ou redução do tamanho do genoma em função da adaptação

à luz ou condições nutricionais em seus nichos particulares. Por exemplo, o genoma de 1,66 Mpb da cianobactéria *Prochlorococcus marinus* CCMP1986 parece conter um conjunto mínimo de genes para sobreviver no oceano aberto de águas oligotróficas estáveis (DUFRESNE et al., 2005). Em contraste, o genoma de 7,21 Mpb da *Nostoc/Anabaena* sp. PCC 7120 é característico da adaptabilidade genética de cianobactérias filamentosas, que trafegam entre as condições de vida livre e simbiótica, onde elas fixam N_2, formam células morfologicamente distintas e crescem foto-autotroficamente, foto-heterotroficamente e quimio-heterotroficamente (KANEKO et al., 2001).

Em estudos de genomas, o fato de já existirem outros organismos do mesmo grupo sequenciados auxilia e facilita a análise do organismo alvo. A genômica comparativa permite que, a partir de uma sequência recém-descoberta, seja possível realizar busca em bancos de dados e fazer inferências sobre a função do novo gene a partir da similaridade com sequências gênicas conhecidas. Para determinar a função de um gene predito no genoma, ou seja, qual fenótipo ele especifica, podem ser utilizadas várias abordagens, como técnicas que provocam a perda de função por nocaute gênico ou inibição da tradução por RNA de interferência.

As tecnologias de Sequenciamento de Nova Geração (NGS – *Next-Generation Sequencing*) promovem o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida. Atualmente existem seis plataformas NGS disponíveis e conhecidas também como plataformas de segunda e terceira geração, são elas: 454 (http://www.454.com); Solexa, hoje conhecida como Illumina (http://www.illumina.com); SOLiD (http://www.appliedbiosystems.com); HeliScope (http://www.helicosbio.com); Ion Torrent (http://www.iontorrent.com) e PacBio (http://www.pacificbiosciences.com).

2.3.1 Plataforma HiScan SQ (Illumina)

O sequenciamento na plataforma HiScan SQ (Illumina), assim como o sequenciamento de Sanger, é realizado pela síntese de DNA, utilizando uma enzima DNA polimerase e nucleotídeos terminadores marcados com diferentes fluoróforos. A inovação desta plataforma se deve ao fato da clonagem ocorrer *in vitro* em uma superfície de clonagem, chamada "*flowcell*". Esse processo também é conhecido como PCR de fase sólida

(FEDURCO et al., 2006; TURCATTI et al., 2008). A *flowcel* é dividida em oito linhas que podem ser utilizadas para o sequenciamento de até oito bibliotecas (SHENDURE; JI, 2008).

Para o preparo da amostra e sequenciamento, dois adaptadores diferentes são ligados em ambas as extremidades do DNA fragmentado, com tamanho entre 300 – 400 pb. As moléculas de DNA fita simples são aderidas por afinidade a uma *flowcell*, onde estão também aderidos os oligonucleotídeos complementares aos adaptadores. Na etapa de anelamento da PCR, o adaptador da extremidade livre da molécula de DNA aderida ao suporte encontra seu oligonucleotídeo complementar, formando uma estrutura em ponte (SHENDURE; JI, 2008; FEDURCO et al., 2006; ADESSI et al., 2000). A reação de elongamento da fita molde é iniciada utilizando a extremidade 3' livre do oligonucleotídeo. Assim como em uma PCR normal, a etapa de desnaturação, onde a "ponte" é desfeita, ocorre mediante elevação de temperatura. A etapa de anelamento é repetida e, após uma série de ciclos, são obtidos grupos de moléculas idênticas ligadas ao suporte. Com a incorporação de nucleotídeos terminadores marcados e excitação a laser, é gerado um sinal, o qual é captado por um dispositivo de leitura e interpretado como um dos quatro possíveis nucleotídeos componentes da cadeia. O processo de incorporação de nucleotídeo marcado, excitação e leitura são repetidos para cada nucleotídeo componente da sequência. A leitura é feita de forma sequencial, o que permite a montagem da sequência completa de cada agrupamento (SHENDURE; JI, 2008).

2.3.2 Plataforma Ion Torrent

A plataforma Ion Torrent é o primeiro sequenciador NGS que não é baseado no princípio de emissão e detecção de luz. O sequenciamento ocorre em um *chip* contendo milhões de poços conectados a semicondutores capazes de detectar variações de potencial do meio reacional, em função da liberação de um íon de hidrogênio durante a incorporação de um nucleotídeo. Existem três diferentes *chips*, 314, 316 e 318, que diferem quanto a sua capacidade de gerar dados. O *chip* 314 gera cerca de 10 Mb, o 316 cerca de 100 Mb e o 318 cerca de 4-8 Mb, ou seja, milhões de sequências de aproximadamente 200 pb. A vantagem de utilizar este tipo de plataforma está no baixo custo e tempo de corrida (~ 2 h), (GLENN et al., 2011; ROTHBERG et al., 2011).

A plataforma Ion Torrent de uma forma geral utiliza os mesmos procedimentos de preparo da amostra e sequenciamento que a plataforma HiScan SQ (Illumina), porém, o

processo de identificação é muito mais simples e não utiliza nucleotídeos terminadores marcados e excitação a laser. O sequenciamento com a plataforma Ion Torrent utiliza um *chip* que contém uma malha com cerca de 1,2 milhão de poços e sensores que permitem o confinamento e a detecção de reações de sequenciamento independentes. O *chip* detecta prótons (H^+) quando nucleotídeos (dNTPs) são incorporados na cadeia de DNA em crescimento, devido a uma alteração no pH do poço. Isso induz uma alteração no potencial da superfície da camada metal-óxido, que é detectada por uma fonte subjacente que transforma o sinal químico em sinal digital (GLENN, 2011; ROTHBERG et al., 2011).

3. OBJETIVOS

O principal objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de produção de substâncias bioativas por linhagens brasileiras de cianobactérias. Estudos químicos juntamente com estudos a nível molecular podem contribuir para desvendar o papel fisiológico dessas substâncias e contribuir para uma gestão eficaz dos recursos hídricos. Sendo assim, os objetivos específicos deste estudo foram: I) Detectar genes envolvidos na biossíntese das substâncias bioativas, saxitoxina, cilindrospermopsina, anatoxina-a, homoanatoxina-a, microcistina, microviridina e microcilamida produzidas pelos gêneros *Dolichospermum, Sphaerospermopsis*, *Cuspidothrix*, *Cylindrospermopsis* e *Microcystis*; II) Analisar a produção e identificar as variantes estruturais das substâncias que tiveram seus genes sequenciados, por meio de análises por LC-MS e ELISA; III) Identificar e caracterizar o agrupamento gênico envolvido na biossíntese de saxitoxina das linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303, e anatoxina-a(s) da linhagem *S. torques-reginae* ITEP-024 através do sequenciamento de nova geração (*Next-Generation Sequencing*); IV) Realizar um estudo filogenético do gene de RNAr 16S das linhagens utilizadas nas análises moleculares e químicas de subtâncias bioativas.

Para tanto, foram utilizadas as seguintes abordagens:

* Extração do DNA, amplificação por PCR dos genes alvos, clonagem dos fragmentos amplificados e transformação para células competentes;
* Sequenciamento dos fragmentos amplificados;
* Construção de árvores filogenéticas;
* Detecção e identificação de substâncias bioativas por meio de LC-MS;
* Imunoensaio enzimático (ELISA);
* Sequenciamento de nova geração com as plataformas HiScan SQ e Ion Torrent.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens e locais de amostragem

Neste estudo foram utilizadas trinta e nove linhagens de quinze espécies diferentes, pertencentes aos gêneros *Dolichospermum, Sphaerospermopsis*, *Cuspidothrix, Cylindrospermopsis* e *Microcystis* isoladas de corpos-d'água de catorze ambientes em seis estados brasileiros, Tabela 7. As linhagens foram isoladas de florações presentes em corpos-d´água, na maioria das vezes eutrofizados, usados para o suprimento de água, recreação, pesca e geração de energia. Das trinta e nove linhagens, dezesseis que ainda não haviam sido caracterizadas filogeneticamente (destacadas em negrito na Tabela 7) tiveram o gene de RNAr 16S sequenciado neste estudo.

No estado de São Paulo, um dos ambientes analisados foi a praia dos Namorados, localizada no Reservatório Salto Grande (S22°42'15,3" O47°16'00,3"), Americana. A amostra de água foi coletada da superfície em 06/09/2007. Esse reservatório está inserido na bacia hidrográfica do rio Atibaia e foi construído entre 1940 e 1949 com o objetivo de gerar energia elétrica para a região, mas, com o passar dos anos, outras atividades foram incorporadas, tais como suprimento de água, irrigação de culturas e recreação. Processo crescente de deterioração da qualidade da água e florações típicas de *Microcystis* e *Anabaena* (*Dolichospermum*) são observados praticamente durante o ano todo devido à entrada de efluentes domésticos e industriais das cidades de Paulínia e Campinas, além da carga orgânica de pequenos rios e córregos que recebem esgotos sanitários sem tratamentos de outras cidades, e material proveniente da atividade agrícola (HONDA, 2009). Linhagens de *Dolichospermum crassum* isoladas deste ambiente foram analisadas e caracterizadas.

A amostra obtida do braço Riacho Grande (S23°46'33,9" O46°31'54,4") da Represa Billings, localizado no distrito de São Bernardo do Campo no estado de São Paulo, foi coletada na superfície d'água em 26/05/2008. Essa represa foi construída em 1927, e recebe os rios Grande, Pequeno, Bororé, Taquacetuba, entre outros. Essa represa de ambiente eutrófico possui utilização bem diversificada, desde abastecimento de água, controle de inundações, irrigação, recreação e geração de energia para o complexo industrial de Cubatão (CARVALHO, 2003; CETESB, 1996; 2003, SOUZA et al., 1998). O estado eutrofizado de suas águas contribui para a formação de florações de cianobactérias praticamente durante o

ano todo (HONDA, 2009). Linhagens dos gêneros *Dolichospermum crassum*, *Cuspidothrix fallax* e *Cylindrospermopsis raciborskii* foram isoladas deste ambiente.

O lago da Engenharia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" em Piracicaba, foi outro local amostrado no estado de São Paulo (S22°42'45,7" O47°37'52,4"). Este lago é um ambiente com finalidade ornamental e apresenta água com coloração esverdeada, típica de floração de cianobactérias. A amostragem foi realizada na região encharcada na margem do lago, e foi coletada em 13/10/2008 (HONDA, 2009). Todas as linhagens do gênero *Dolichospermum planctonicum* utilizadas neste estudo foram isoladas deste ambiente.

Um dos locais de amostragem do estado do Rio Grande do Sul foi o lago do Parque Theobaldo Dick (S29°27'54,47" O51°58'15,51") considerado o principal local de lazer e turismo da cidade de Lajeado e declarado como área de preservação permanente. A criação do lago foi realizada a fim de preservar a área central do Parque e tem como função servir de reservatório, protegendo os mananciais e vertedouros existentes no local (HEPP, 2009). Além da beleza cênica, no centro do lago foi mantida uma ilha que serve de refúgio para a fauna local, composta por espécies de aves e pequenos roedores (GEOAMBIENTAL, 2007). A linhagem *Cylindrospermopsis raciborskii* CENA303 foi coletada neste ambiente em 03/07/2009, e gentilmente cedida pela Professora Dra. Vera Regina Werner, do Museu de Ciências Naturais.

Um lago dentro do campus da Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, Porto Alegre, foi outro local de amostragem no estado do Rio Grande do Sul (S29°53'13" O51°09'29,9"). Este lago artificial apresentou florações persistentes de cianobactérias e um ambiente eutrofizado durante o período de Novembro/2009 a Novembro/2010 (comunicação pessoal). Essa amostra de água também foi coletada e gentilmente cedida pela Professora Dra. Vera Regina Werner, no dia 18/03/2010. A linhagem *Cylindrospermopsis raciborskii* CENA306 foi isolada deste local.

Linhagens de cianobactérias utilizadas neste estudo, também foram obtidas do Reservatório Tapacurá (S8°02' O35°09') criado em 1973 com o objetivo de abastecer a cidade de Recife, no estado de Pernambuco. Consequências do El Niño foram as principais causas dos altos níveis de eutrofização e modificações ecológicas do Reservatório Tapacurá (MOLICA et al., 2005). Amostras de água contendo as linhagens de *Sphaerospermopsis torques-reginae*, foram coletadas no dia 27/03/2005 e gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Sandra M. F. O. Azevedo, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, RJ.

Tabela 7 - Linhagens brasileiras de *Dolichospermum*, *Cuspidothrix*, *Sphaerospermopsis*, *Cylindrospermopsis* e *Microcystis* utilizadas. As linhagens que tiveram o gene de RNAr 16S sequenciado neste estudo estão destacadas em negrito

Ordem	Espécie	Linhagem	Origem
Nostocales	*Dolichospermum circinale*	CENA190	Represa Salto Grande, Americana, SP
		CENA191	Represa Salto Grande, Americana, SP
	Dolichospermum crassum	**CENA194**	Represa Salto Grande, Americana, SP
		CENA195	Represa Salto Grande, Americana, SP
		CENA196	Represa Salto Grande, Americana, SP
		CENA197	Represa Salto Grande, Americana, SP
		CENA198	Represa Salto Grande, Americana, SP
		CENA199	Represa Salto Grande, Americana, SP
		CENA200	Represa Salto Grande, Americana, SP
		CENA201	Represa Salto Grande, Americana, SP
		CENA202	Represa Salto Grande, Americana, SP
		CENA203	Represa Salto Grande, Americana, SP
		CENA204	Represa Salto Grande, Americana, SP
		CENA205	Represa Billings, Riacho Grande, SP
		CENA206	Represa Billings, Riacho Grande, SP
		CENA301	Represa Billings, Riacho Grande, SP
	Dolichospermum planctonicum	CENA209	Lago da ESALQ, Piracicaba, SP
		CENA210	Lago da ESALQ, Piracicaba, SP
		CENA211	Lago da ESALQ, Piracicaba, SP
	Cuspidothrix fallax	CENA208	Represa Billings, Riacho Grande, SP
	Sphaerospermopsis aphanizomenoides	CENA188	Lagoa do Povoado Nova Aurora, CE
	Sphaerospermopsis torques-reginae	**ITEP-024**[a]	Reservatório Tapacurá, PE
		ITEP-026[a]	Reservatório Tapacurá, PE
	Cylindrospermopsis raciborskii	**CENA302**	Represa Billings, Riacho Grande, SP
		CENA303	Parque Theobaldo Dick, Lajeado, RS
		CENA305	Represa Billings, Riacho Grande, SP
		CENA306	Campus da Ulbra, Porto Alegre, RS
		CYP-011K[b]	Lago Julius, Queensland, Australia
Chroococcales	*Microcystis aeruginosa*	NPJB-1[c]	Lago das Garças, São Paulo, SP
		NPCD-1[c]	Estação de Tratamento de Esgoto, Cidade de Deus, RJ
		SPC777[d]	Represa Billings, São Paulo, SP
		NPLJ-4[c]	Lagoa de Jacarepaguá, RJ
	Microcystis novacekii	SPC503[d]	Represa Billings, São Paulo, SP
	Microcystis protocystis	SPC697[d]	Reservatório Guarapiranga, São Paulo, SP
	Microcystis panniformis	SPC702[d]	Lago das Garças, São Paulo, SP
	Microcystis wesenbergii	SPC761[d]	Reservatório Taiaçupeba, SP
	Microcystis sp.	NPLS-1[c]	Lagoa Santa, MG
	Microcystis sp.	SPC804[d]	Lago Ibirá, SP
	Microcystis sp.	SPC822[d]	Represa Billings, São Paulo, SP

Linhagens pertencentes: [a] Instituto de Tecnologia de Pernambuco; [b] Australian Water Quality Center; [c] Coleção de Culturas de Algas do Instituto de Botânica; [d] Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/UFRJ.

No Estado do Ceará, amostras de água foram coletadas em 07/11/2008 da lagoa do Povoado Nova Aurora em Canindé (S4°22' O39°19'), localizada dentro da vegetação de caatinga. A época amostrada corresponde ao período de seca da região (HONDA, 2009). A

linhagem estudada e isolada deste ambiente foi *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* CENA188.

As linhagens de *Microcystis* foram analisadas quanto à presença dos peptídeos microcistina, microviridina e microciclamida. Estas linhagens fazem parte do banco de culturas do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias e foram isoladas de diferentes ambientes dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, Tabela 7.

4.2 Condições de cultivo

Os isolados foram cultivados na sala de culturas de cianobactérias do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias do CENA/USP em frascos de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura ASM-1 (GORHAM et al., 1964) sob condições específicas de fotoperíodo de 14/10 (claro/escuro), iluminação fluorescente ($40^{\pm}5$ µmol fótons $m^{-2}.s^{-1}$) e temperatura de $25^{\pm}1$ °C.

4.3 Análises moleculares

4.3.1 Extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento

Para a extração do DNA genômico, 4,5 mL de células foram coletadas na fase final do crescimento exponencial, e concentradas por centrifugação (13.000 × *g*, 5 min). O DNA genômico total foi extraído do pélete seguindo o métodos descritos por Fiore et al. (2000) e Lin et al. (2010), este último com algumas modificações conforme descrito a seguir. As células concentradas foram ressuspendidas em 500 µL de tampão de lise (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 9,0). Posteriormente, adicionou-se lisozima (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) na concentração final de 1 $mg.mL^{-1}$ e a amostra foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Após a incubação, adicionou-se proteinase K (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) na concentração final de 0,4 $mg.mL^{-1}$ e SDS (AppliChem, Darmstadt, Alemanha) na concentração final 0,4%. Os tubos foram incubados a 55 °C por 1h. Em

seguida, adicionou-se 600 µL de uma solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). A amostra foi cuidadosamente homogeneizada por 5 minutos e então centrifugada (12.000 × *g*, 5 min). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se um volume de 600 µL de uma solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A amostra foi novamente homogeneizada por 5 minutos e centrifugada (12.000 × *g*, 5 min). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se RNAse na concentração final de 100 $\mu g.mL^{-1}$. Os tubos foram então incubados a 37 °C por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 µL de acetato de sódio 3 M a pH 4,8 e 600 µL de isopropanol. As amostras foram homogeneizadas e colocadas no freezer a - 80 °C por 30 minutos e, posteriormente, centrifugadas (12.000 × *g*, 10 min, 4 °C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70% e centrifugado (12.000 × *g*, 5 min, a 4 °C). As amostras foram colocadas em bloco aquecedor a 37 °C até a secagem do precipitado. O DNA foi ressuspendido em 50 µL de água ultrapura esterilizada. A qualidade dos DNAs extraídos foi verificada acrescentando-se tampão de carregamento (sacarose 40%, azul de bromofenol 0,25% e água ultrapura - Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EUA) com SYBR® Green I 0,1% (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), e a integridade dos mesmos foi verificada em gel de agarose 1%, após corrida eletroforética em tampão 0,5 X TBE (1 X TBE: Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). A documentação do gel foi feita com fotodocumentador "Gel Logic 212 Imaging System" (Molecular Imaging System Carestream Health, Inc., Rochester, NY, EUA). Como padrão de tamanho de DNA foi utilizado o marcador *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

Fragmentos de genes envolvidos na biossíntese de substâncias bioativas foram amplificados utilizando os oligonucleotídeos descritos na Tabela 8. Para a amplificação do gene de RNAr 16S foram utilizados os oligonucleotídeos 27F1 e 1494Rc (NEILAN et al., 1997) que amplificam um fragmento de aproximadamente 1400 pb. Os reagentes utilizados nas reações de PCR estão descritos na Tabela 9, e a ciclagem térmica adotada seguiu as condições descritas pelos autores e otimizadas quando necessário, Tabela 10. As reações de amplificação por PCR foram processadas em um termociclador Techne TC-412 (Bibby Scientific Limited, Stone, Staffordshire, England). A integridade dos fragmentos gênicos foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%, de acordo com o protocolo descrito anteriormente, e o tamanho e quantificação dos *amplicons* resultantes foram feitas por comparação com o padrão de tamanho e massa molecular *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen/Life Technologies). As referências utilizadas para amplificação de fragmentos gênicos foram: *cyrA, B* e *C* (KELLMANN; MILLS; NEILAN, 2006), *cyrJ* (MIHALI et al.,

2008; MAZMOUZ et al., 2010); *anaC, E, F* e *G* (MÉJEAN et al., 2009); *mcyE, D* e *G* (FEWER et al., 2007; RANTALA et al., 2004); *sxtA, sxtB* e *sxtI* (HOFF-RISSETI et al., 2012); *mdnA*, *mdnB* e *mdnC* (ZIEMERT et al., 2010); genes de microciclamida *mcaA* (ZIEMERT et al., 2008a), *mcaD* e *mcaF* (este trabalho).

Tabela 8 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação de fragmentos de genes de substâncias bioativas

Substância	Oligonucleotídeo	Gene (pb)	Sequência (5'- 3')	Produto Gênico
Microcistina	mcyD-F/R	*mcyD* (818)	GAT CCGATTGAATTAGAAAG GTATTCCCCAAGATTGCC	PKS
	mcyE-F2/R4	*mcyE* (810)	GAAATTTGTGTAGAAGGTGC AATTCTAAAGCCCAAAGACG	NRPS
	mcyG-F/R	*mcyG* (385)	GAAATTGGTGCGGGAACTGGAG TTTGAGCAACAATGATACTTTGCTG	PKS
Cilindrospermopsina	cynsulf-F cylnam-R	*cyrJ* (780)	ACTTCTCTCCTTTCCCTATC GAGTGAAAATGCGTAGAACTTG	Sulfotransferase
	cyrJ-F/R	*cyrJ* (563)	TTCTCTCCTTTCCCTATCTCTTTATC TGCTACGGTGCTGTACCAAGGGGC	Sulfotransferase
	CYLAT-F/R	*cyrA* (1100)	ATTGTAAATAGCTGGAATGAGTGG TTAGGGAAGTAATCTTCACAG	Amidinotransferase
	CPS-F/R	*cyrB* (478)	AGTATATGTTGCGGGACTCG CCCGCCAAGACAGAGGGTAG	NRPS
	A205PK-F/R	cyrC (514)	AATGACAGAGACTTGTGCGGGG TTATCGGTATTGGTGGTAGCAACT	PKS
Anatoxina-a e Homoanatoxina-a	F/R-ALM	*anaC* (421)	CTGGGGGCACAATTATTTTACTCTCACCTG ACGCAAAGCTCACCCACCTCACCTCTAACT	Adenilação da prolina
	F/R-KSD	*anaE* (401)	AGGAGAGGGTTGTGGCGTTGTTAT GGGGGATCTGGTTATGCTGAAGT	PKS
	1170[C] 1171[C]	*anaF* (412)	CGCAAATCGATGCTCACTTA CCACTGGCTCCATCTTGATT	PKS
	F/R-KSB RKSB	*anaG* (468)	AAGGTTGCGGCATAGTCGTTCTCA TCTGTTCGCTTGCCACTTTTATTG	PKS
Saxitoxina	OCTF/R	*sxtI* (900)	TGCCGTTTTGTGCTTAGATG TATCGTGAGTCCTTCCGTCC	O-carbamoyl transferase
	sxtA4-F/R	*sxtA4* (200)	GGACTCGGCTTGTTGCTTC CCAGACAGCACGCTTCATAA	AONS
	sxtB-F/R	*sxtB* (400)	TTTGTAGGRCAGGCACTT ATCATCGGTATCATCGGTAG	Citidina deaminase
Microciclamida	mcaA-F/R	*mcaA* (810)	TTYGGNACYGAAGCNCGNGG AGAAGACCAAGAACGAACTTGGCC	Proteína subtilisina
	mcaD-F/R	*mcaD* (430)	TCATCGGCTACGGGGCAACC GTCTGCTCTGGAGTAAACGC	Heterociclização
	mcaF-F/R	*mcaF* (415)	GGCTACAGTGATGTTGAGTTA GGCTACAGTGATGTTGAGTTA	Proteína hipotética
Microviridina	mdnA-F/R	*mdnA* (150)	TCACTCGAAATTACCAGAGGAA CGGTGTAATCAAGAAAAGTGCT	Peptídeo precursor
	mdnB-F/R	*mdnB* (298)	TTGGCTGGTTTTTGGGATAG CGATCGCATTGGAAATAGGT	ATP-grasp ligase
	mdnC-F/R	*mdnC* (309)	GAAGGTTTGCAATTTTGTCCA CGCCAACGGGATTAATTTCT	ATP-grasp ligase

(F/R) forward/reverse

Tabela 9 **-** Reagentes utilizados nas reações de PCR para amplificação dos fragmentos gênicos de interesse

Reagentes	**Concentração**
Tampão PCR 10 ×	1 ×
$MgCl_2$	3mM
Oligonucleotídeo F (*forward)*	5 pmol ou 10 pmol
Oligonucleotídeo R (*reverse)*	5 pmol ou 10 pmol
dNTPs	0,2 mM
DNA molde	10 ng
Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen)	1,5 U
H_2O Ultra-pura	*
	Volume final = 25 µL

*quantidade suficiente para completar o volume final da reação para 25 µL

Tabela 10 - Ciclagem das reações de amplificação por PCR dos fragmentos gênicos

Substância Bioativa – Genes	**Ciclo**	**T °C**	**Tempo**	**Substância Bioativa – Genes**	**Ciclo**	**T °C**	**Tempo**
	1X	94	3m		1X	94	4m
Cilindrospermopsina – *cyrA*, *cyrB* e *CyrC*	30X	94 57 72	10s 20s 1m	Anatoxina e homoanatoxina – *anaC*, *anaE*, *CyrF* e *anaG*	30X	94 50 72	20s 20s 1m
	1X	72	7m		1X	72	7m
Substância Bioativa – Genes	**Ciclo**	**T °C**	**Tempo**	**Substância Bioativa – Genes**	**Ciclo**	**T °C**	**Tempo**
	1X	95	3m		1X	95	3m
Microcistina – *mcyE*, *mcyD* e *mcyG*	30X	94 56 72	30s 30s 1m	Microviridina – *mdnA*, *mdnB* e *mdnC*	30X	95 60 72	20s 1m 2m
	1X	72	7m		1X	72	7m
Substância Bioativa – Genes	**Ciclo**	**T °C**	**Tempo**	**Produto gênico – Gene**	**Ciclo**	**T °C**	**Tempo**
	1X	94	4m		1X	94	3m
Microciclamida – *mcaA*, *mcaD* e *mcaF*	30X	94 55 72	20s 1m 1m	RNAr 16S – *rrn*	30X	94 57 72	10s 20s 1m
	1X	72	7m		1X	72	7m
Substância Bioativa - Gene	**Ciclo**	**T °C**	**Tempo**	**Substância Bioativa - Gene**	**Ciclo**	**T °C**	**Tempo**
	1X	94	5m		1X	94	3m
Saxitoxina - *sxtA*	35X	94 58 72	30s 30s 30s	Saxitoxina - *sxtB*	35X	94 63 72	30s 30s 1m
	1X	72	7m		1X	72	7m
	1X	94	5m				
Saxitoxina - *sxtI*	35X	94 61 72	30s 1m 90s				
	1X	72	7m				

Após a amplificação dos fragmentos gênicos, foi realizada a clonagem dos produtos da PCR em vetor pGEM-T, *kit* "pGEM®-T Easy Vector Systems" (Promega, Madison, WI, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O vetor contendo o inserto foi transformado em 50 µL de células competentes de *Escherichia coli* DH5α por choque térmico (SAMBROOK et al., 1989). A presença dos insertos nas células transformantes foi confirmada através de PCR de colônia, utilizando oligonucleotídeos específicos do vetor, M13-F e M13-R, nas seguintes condições: 94 ºC/5m, 30 ciclos 95 ºC/20s, 50 ºC/15s e 60 ºC/1m. Para checar a presença de fragmentos do gene de RNAr 16S nas células transformantes, foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos CYA359F, CYA781Ra e CYA781Rb (NÜBEL et al., 1997), específicos para sequência de genes RNAr de cianobactérias.

A extração dos plasmídeos recombinantes foi feita pelo método de hidrólise alcalina descrita por Birnboim e Dolly (1979). A integridade do plasmídeos extraídos foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%, como descrito anteriormente. O DNA extraído foi quantificado pela comparação com o marcador de massa molecular *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen/Life Technologies).

Reações de reamplificação com o *kit* DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, England) foram realizadas com 200 ηg do DNA plasmidial contendo o inserto, e 5 ρmol dos oligonucleotídeos M13-F e M13-R. Para o gene que codifica para o RNAr 16S, oligonucleotídeos internos foram utilizados, sendo eles 357F/R, 704F/R e 1114F/R (modificado de Lane, 1991). Reações de reamplificação foram realizadas nas seguintes condições: 25 ciclos de 95 ^{o}C/20s, 52 ^{o}C/15s e 60 ^{o}C/1min. Após a amplificação dos fragmentos, realizou-se a precipitação seguindo as recomendações descritas pelo *kit* DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare). Para o sequenciamento, seguindo o método de Sanger e colaboradores (1977), as reações precipitadas foram ressuspendidas com 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems/Life Technology) e inseridas em sequenciador capilar ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Life Technology). Os dados gerados pelo sequenciador foram processados pelo programa ABI PRISM® DNA Sequencing Analysis Software versão 3.7 (Applied Biosystems/Life Technology).

4.4 Análise filogenética

A qualidade das sequências geradas foram analisadas pelo pacote de programas Phred/Phrap/Consed (EWING et al., 1998; EWING; GREEN, 1998; GORDON et al., 1998), em sistema operacional GNU/Linux. Regiões contendo bases com índice de qualidade Phred menor que 20 foram novamente sequenciadas. A sequência consenso obtida foi comparada com as sequências de outros gêneros de cianobactérias depositadas no GenBank do NCBI ("National Center for Biotechnology Information" - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), utilizando a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). As árvores foram construídas com os algoritmos Maximum-Likelihood (ML) e Neighbor-Joining (NJ) implementados pelo pacote de programas MEGA versão 5.0 (TAMURA et al., 2011), usando os parâmetros Tamura-Nei e Kimura-2, respectivamente, como modelo de substituição nucleotídica. Repetições de 1.000 reamostragens foram utilizadas para acessar a confiabilidade dos nós. Para a construção das árvores de aminoácidos, as sequências gênicas foram analisadas com a ferramenta BLASTX (GenBank) que compara uma sequência de nucleotídeos contra um banco de dados de proteínas fornecendo todos os quadros de leitura possíveis. Após a identificação do quadro de leitura correto, a sequência de nucleotídeos foi traduzida em aminoácidos com a ferramenta *translate* do ExPASy Proteomic Server (Swiss Institute of Bioinformatics). As sequências de aminoácidos foram então utilizadas para a construção das árvores filogenéticas com os algoritmos Maximum-Likelihood (ML) e Neighbor-Joining (NJ).

4.5 LC-MS

4.5.1 Preparo da amostra

Células presentes em 50 mL de meio de cultura, após vinte dias de crescimento, foram concentradas em filtros de fibra de vidro (Millipore, Milford, MA, USA). Os filtros foram congelados e as células extraídas do filtro com 2 mL de uma solução de ácido acético 0,05 M. O rompimento das células foi realizado por vórtex e sonicação em banho de água por 15 min. Esse procedimento foi repetido duas vezes. Após a centrifugação (10.000 × *g*, 10 min,

4 °C), o sobrenadante foi recuperado e filtrado em membrana de 0,45 µm, PVDF (Millipore), e colocado em tubos apropriados para as análises químicas. Para acessar as substâncias presentes também no meio extracelular, células de 500 mL de meio de cultura foram congeladas e liofilizadas. Posteriormente, o liofilizado foi ressuspendido com ácido acético 0,05 M e as amostras centrifugadas (10.000 × *g*, 10 min, 4 °C), e colocadas em tubos apropriados para as análises por LC-MS descritas abaixo.

Para as análises de anatoxina-a(s), o preparo da amostra foi realizado seguindo as recomendações de Henriksen et al. (1997) e Dörr et al. (2010). As células liofilizadas (50 mg) foram ressuspendidas em 5 mL de etanol/ácido acético 0,1 M (20:80 v/v) e as células rompidas por sonicação. Posteriormente, a amostra foi centrifugada (5.000 × *g*, 15 min, 4 °C). Para separar os pigmentos da amostra, o extrato foi eluído em cartucho C_{18} (Sep-Pack, Waters, MA, USA) pré-condicionado com metanol e etanol/ácido acético 0,1 M (20:80 v/v). Os eluatos foram coletados e secados em *Speed Vac* (Thermo Scientific, MA, USA) e, em seguida, ressuspendidos em metanol e filtrados em tubos apropriados para as análises de LC-MS.

4.5.2 Análises de CYN

Análises cromatográficas de CYN foram realizadas em um cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence (Kyoto, Japan), equipado com um detector de arranjo de fotodiodos (SPD-M20A), acoplado a um espectrômetro de massas do tipo íon trap (Esquire HCT, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Separações foram realizadas em coluna Synergy Hydro (150 × 2.0 mm, 4 µm; Phenomenex, CA, USA), sendo a fase móvel A: água; e B: água/acetonitrila (10:90 v/v), ambas contendo 5 mM de formiato de amônio e 0,01% de ácido fórmico. Foi realizado um gradiente linear de 1 a 30% da fase móvel B em 15 min, 30 a 90% de B em 5 min, 90% de B por 2 min, 90 a 1% de B em 1 min e 1% de B por 12 min (tempo total de corrida: 35 min). O espectro de absorção foi obtido na faixa de 200-600 nm. O detector de eluentes foi dividido em 1:4 antes de entrar no espectrômetro de massas através de uma fonte de electrospray, operando em modo positivo a 4 KV. As análises foram realizadas usando o nitrogênio como gás de nebulização (35 psi) e secagem (5 $mL.min^{-1}$, 300°C) e o hélio como gás tampão (4×10^{-6} mbar). Uma avaliação inicial das corridas foi feita na faixa de *m/z* 50 – 800. Adicionalmente, um experimento de monitoramento de reação múltipla (MRM) foi

realizado, e as seguintes transições (*m/z* do íon precursor > íon fragmentado) foram selecionadas: CYN (*m/z* 416 > 336, *m/z* 416 > 274 e *m/z* 416 > 194); e 7-*deoxy*-CYN (*m/z* 416 > 320, *m/z* 416 > 274 e *m/z* 416 > 194). Considerando que não há padrão para 7-*epi*-CYN disponível, a banda cromatográfica única em 6,7 min para *m/z* 416 foi considerada como sendo de CYN. Análises quantitativas foram baseadas na curva de calibração construída pelas diluições em série do marcador comercialmente disponível de CYN (Abraxis, Warminster, PA, USA).

4.5.3 Análises de STX

Os análogos STX foram investigados por metodologias analíticas complementares: métodos de oxidação pós-coluna com detecção de fluorescência (HPLC-FD) de acordo com Diener et al. (2006; 2007) e um método baseado em cromatografia líquida de interação hidrofílica acoplada a espectrometria de massas (HILIC-MS), seguindo as recomendações de Soto-Liebe et al. (2010).

No método de oxidação pós-coluna os compostos foram separados em um cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence (Kyoto, Japan) equipado com um forno de reação pós-coluna e um detector de fluorescência (RF-10Axl). As separações foram obtidas com uma coluna de fase reversa Luna C_{18} (250 × 4,6 mm, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) nas seguintes condições cromatográficas, fase móvel A: 10 mM de formiato de amônio e 10 mM de ácido fórmico em água; e B: acetonitrila/água (80:20 v/v) e uma concentração final de 8 mM de formiato de amônio. A vazão de 0,7 $mL.min^{-1}$ com o seguinte gradiente linear: 82% de B em 24 min, 70% de B em 11 min, 65% de B em 15 min, retornando para 70% de B em 5 min e 82% de B em 15 min (tempo total de corrida: 70 min). O eluato da coluna foi constantemente oxidado com 10 mM de ácido periódico, 550 mM de hidróxido de amônio em água, em um fluxo de 0,3 $mL.min^{-1}$, dentro do forno de reação à temperatura de 50°C. Em seguida, o eluato foi acidificado com 0,75 M de ácido nítrico aquoso em um fluxo de 0,3 $mL.min^{-1}$. As toxinas foram identificadas pelo detector de fluorescência nos comprimentos de onda 330 nm (excitação) e 395 nm (emissão).

Para as análises com HILIC-MS um cromatógrafo Shimadzu Prominence (Kyoto, Japan) foi acoplado a um espectrômetro de massas do tipo íon trap (Esquire HCT, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) com detector de arranjo de fotodiodos (PDA-M20A) e

equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI) operando em modo positivo a 5 KV. O argônio foi usado como gás de colisão. O fase móvel A consistiu de 5 mM de formiato de amônio e 2 mM de ácido fórmico em acetonitrila/água (80:20 v/v), e a fase móvel B de 10 mM de formiato de amônio e 10 mM de ácido fórmico em água. A separação cromatográfica foi realizada por uma coluna ZIC-HILIC (250 × 4,6 mm, SeQuant, Haltern, Germany). Inicialmente, equilibrou-se a coluna com 80% de A por 20 min. O gradiente linear de eluição foi realizado com 65% de A até 5 min, 60% de A até 10 min, 55% de A até 20 min, em seguida, realizou-se uma eluição isocrática com 55% de A até 24 min, retornando para 80% de A até 25 min (tempo total de corrida: 45 min). Vazão de fluxo de 0,7 $mL.min^{-1}$. O monitoramento por MRM foi realizado em dois períodos, e as seguintes transições (*m/z* do íon precursor > íon fragmentado) foram selecionadas, período 1: GTX1/4 (*m/z* 412 > 332), C3/4 (*m/z* 412 > 314), GTX2/3, C1/2 e B2 (*m/z* 396 > 316 e *m/z* 396 > 298), B1 = GTX5 (*m/z* 380 > 300 e *m/z* 380 > 282), dcGTX2/3 (*m/z* 353 > 273), dcGTX1/4 (*m/z* 369 > 289); período 2: STX (*m/z* 300 > 282 e *m/z* 300 > 204), NEO (*m/z* 316 > 298 e *m/z* 316 > 196), dcSTX (*m/z* 257 > 196 e *m/z* 257 > 156) e dcNEO (*m/z* 273 > 255).

Em todas as análises o nitrogênio foi usado como gás de nebulização (35 psi) e secagem (5 $mL.min^{-1}$, 300°C), e o hélio como gás tampão (4×10^{-6} mbar). Análises quantitativas foram baseadas na curva de calibração construída por diluições em série dos padrões comerciais das variantes de STX (National Research Council/Institute for Marine Biosciences, Halifax, NS, Canadá).

4.5.4 Análises de ANTX-A(S)

As análises de ANTX-A(S) foram realizadas seguindo os procedimentos descritos por Dörr et al. (2010). Experimentos de MRM foram realizados em um espectrômetro de massas do tipo íon trap (Esquire HCT, Bruker Daltonics, MA, USA), equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI), e acoplado a um cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence (Kyoto, Japan). Nitrogênio foi usado como gás de nebulização (15 psi) e secagem (5 $L.min^{-1}$, 350°C) e o hélio como gás tampão (4×10^{-6} mbar). As análises foram realizadas no modo positivo, e as seguintes transições (*m/z* do íon precursor > íon fragmentado) foram selecionadas: *m/z* 253 > 159, *m/z* 253 > 98, *m/z* 253 > 96 e *m/z* 253 > 58. Tempos de permanência de 100 ms foram usados para cada transição. A voltagem do capilar foi de 3,5

KV. A cromatografia líquida com interação hidrofílica zwitteriônica (ZIC-HILIC) foi realizada em uma coluna (150 mm × 2,0 mm 5 µm, SeQuant, Umeå, Sweden). A vazão de fluxo foi de 0,1 $mL.min^{-1}$. Separações cromatográficas foram alcançadas com um gradiente de eluição de 0,7 $mL.min^{-1}$ sendo o A: água/acetonitrila (20:80 v/v) contendo 5 mM de formiato de amônio e 2 mM de ácido fórmico; e o B: água contendo 10 mM de formiato de amônio e 10 mM de ácido fórmico. Um gradiente linear foi realizado com 20 a 35% de B até 5 min, um segundo gradiente de 40% de B até 10 min, um terceiro gradiente de 65% de B até 11 min e uma eluição isocrática até 14 min com 65% de B. Em seguida, o programa retornou as condições iniciais até 15 min e a coluna foi equilibrada por mais 15 min (tempo total de corrida: 30 min).

4.5.5 Análise dos peptídeos – MCY, MDN e MCA

Análises exploratórias de LC-MS foram realizadas com o objetivo de avaliar todos os peptídeos presentes no meio de cultura. As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence (Kyoto, Japan) equipado com um detector de arranjo de fotodiodos (PDA-M20A) e acoplado a um espectrômetro de massas do tipo Íon Trap (Esquire HCT, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Separações foram alcançadas em uma coluna Synergi-Fusion RP (150 × 2,00 mm, Phenomenex, CA, USA) com um gradiente de eluição de, A: água; e B: água/acetonitrila (10:90 v/v), ambos eluentes contendo 2 mM de formiato de amônio e 0,01% de ácido fórmico. Um gradiente linear foi realizado com 15 a 70% da solução B em 45 min, 90% de B por 2 min, 90 a 15% de B em 1 min (tempo total de corrida: 48 min). A vazão de fluxo foi de 0,2 $mL.min^{-1}$. O espectro de absorção para MCY foi obtido na faixa de 235-240 nm e para os demais peptídeos na faixa de 280-290 nm. O detector de efluentes foi dividido em 1:4 antes de entrar no espectrômetro de massas através de uma fonte de electrospray (ESI), operando em modo positivo a 4 KV, sendo o argônio o gás de colisão. As análises foram realizadas usando o nitrogênio como gás de nebulização (30 psi) e secagem (5 $mL.min^{-1}$, 300°C) e o hélio como gás tampão (4×10^{-6} mbar). Os espectros foram obtidos usando o modo de Ultrascan no intervalo de *m/z* 400 - 2200 e a fragmentação (MS^2) foi em modo automático com amplitude de fragmentação de 0,60 V. Para as análises de microcistina os seguintes íons $[M+H]^+$ foram selecionados: MC-RR (*m/z* 1038); MC-LR (*m/z* 995); MC-YR (*m/z* 1045); MC-LW (*m/z* 1023); MC-LA (*m/z* 910); MC-LL

(*m/z* 952); MC-LF (*m/z* 986) (DIEHNELT et al., 2006; DIEHNELT; PETERMAN; BUDDE, 2005). Para as análises de MDN os íons $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$ na faixa de *m/z* 1450 à *m/z* 1700, foram selecionados (WEIZ, 2012). As análises da produção de MCA por LC-MS foram realizadas monitorando-se os íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ na faixa de *m/z* 517 a 637 (RAVEH et al., 2010; ZIEMERT et al., 2008b; FUJII et al., 2002; ISHIDA et al., 2000).

4.6 ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay")

A detecção da produção de saxitoxina (STX) e cilindrospermopsina (CYN) por ensaio imunológico ELISA (Saxitoxin e Cylindrospermopsin ELISA Kit, Abraxis LLC, Warminster, PA, EUA) foi avaliada em linhagens que tiveram genes *sxt* e *cyr* amplificados. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

O ensaio imunoenzimático para verificar a presença de STX foi realizado com 15 linhagens de três gêneros distintos. Os extratos foram obtidos da seguinte maneira: 2 ml de cultura foram centrifugados (15.000 × *g,* 10 min) e somente as células coletadas. Em seguida, foram adicionados às células 500 µL de água ultrapura (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EUA). As células foram rompidas usando um sonicador UP50H (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Alemanha) por 3 minutos com 80% de amplitude. A solução foi centrifugada (10.000 × *g*, 5 min) e o sobrenadante coletado e utilizado no ensaio imunoenzimático, seguindo as recomendações do fabricante.

O imunoensaio para avaliar a presença de CYN foi realizado com 5 linhagens de *C. raciborskii*. A obtenção dos extratos foi realizada da seguinte maneira: células presentes em 2 ml de cultura foram rompidas usando um sonicador UP50H (Hielscher Ultrasonics GmbH) por 3 minutos com 80% de amplitude. A solução foi centrifugada (10.000 × *g*, 5 min), e o sobrenadante coletado e utilizado na análise da toxina seguindo o protocolo do *kit*.

4.7 Sequenciamento de nova geração (*Next-Generation Sequencing, NGS*)

A plataforma HiScan SQ (Illumina Inc., San Diego, CA, Estados Unidos) foi utilizada para o sequenciamento genômico das linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303, e a

plataforma Ion Torrent (Applied Biosystems/Life Technology, Foster City, CA, USA), para o sequenciamento do genoma da linhagem *S. torques-reginae* ITEP-024.

4.7.1 Preparo da amostra para o sequenciamento na plataforma HiScan SQ (Illumina)

Para o sequenciamento genômico das linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303, foram feitas extrações de DNA partindo de 50 mL de cultura. O método de extração utilizado foi o descrito por Lin et al. (2010) com algumas modificações. O DNA genômico foi concentrado com o *kit* Microcon® Ultracel YM-100 (Millipore, Bedford, MA, EUA) até uma concentração de aproximadamente 20 µg (0,2 $\mu g.\mu L^{-1}$). Este DNA foi submetido à sonicação em um Ultrasonic Homogenizer CPX600 (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) para obtenção de fragmentos de aproximadamente 300 a 400 pb. Diferentes tempos e potências de sonicação foram testados e os fragmentos gerados a cada sonicação foram visualizados por eletroforese em de gel de agarose 1,5% (85 V por 30 minutos), acrescidos de tampão de carregamento (sacarose 40% e azul de bromofenol 0,25%) contendo SYBR Green (Molecular probes, Eugene, OR, EUA) em tampão TBE 0,5× (1× TBE: 45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA pH 8,0). Como padrão de massa molecular utilizou-se o *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen). A condição que proporcionou a formação de fragmentos com o tamanho esperado foi após 14 minutos de sonicação a uma potência de 100%. As bandas correspondentes aos fragmentos de 300 a 400 pb foram excisadas do gel e purificadas com o *kit* GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), seguindo as instruções do fabricante. Após a purificação, a amostra foi quantificada em fluorômetro Qubit™ utilizando o *kit* Quant-iT™ dsDNA BR Assay (Invitrogen, Carlsbad, USA). Para confirmar o tamanho das bandas obtidas, 1 µL deste DNA foi utilizado em eletroforese em gel de agarose 1,5%. Diluiu-se o DNA para a concentração final de 20 $ng.\mu L^{-1}$ em um volume de 50 µL, correspondendo a 1 µg de DNA, o qual foi utilizado para a construção da biblioteca genômica conforme recomendações do fabricante.

As etapas para construção da biblioteca genômica foram realizadas seguindo as recomendações do *kit* TruSeq® DNA Sample Preparation v2 (Illumina Inc.). Os principais passos envolveram: I) Reparo das pontas coesivas; II) Adenilação da extremidade 3'; III) Ligação dos adaptadores; IV) Purificação; V) Enriquecimento dos fragmentos de DNA e; VI) Validação da biblioteca. Após a validação da biblioteca foi realizada a clusterização com o *kit*

TruSeq Cluster v3 em equipamento cBot, e o sequenciamento das amostras em um sequenciador Illumina HiScan SQ (Illumina Inc.) pertencente ao Laboratório de Biotecnologia Animal, ESALQ-USP, Piracicaba, SP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luiz Coutinho.

4.7.2 Preparo da amostra para o sequenciamento na plataforma Ion Torrent

Para o sequenciamento do genoma da linhagem *S. torques-reginae* ITEP-024, 25 mL da cultura foram centrifugados em tubos de 2 mL (12.000 × *g*, 3 min). A extração foi feita seguindo o protocolo descrito por Lin et al., (2010), com algumas modificações. Para remover o excesso de RNA, 70 µL da amostra foram incubados a 37 °C por 1 h e 30 min com 7,5 µL de RNAse (10 $mg.mL^{-1}$). Em seguida, o DNA genômico foi precipitado com etanol 70% e ressuspendido em 1 mL de água ultrapura. A quantificação do DNA foi feita com o fluorômetro Qubit™ utilizando o *kit* Quant-iT™ dsDNA BR Assay (Invitrogen, Carlsbad, USA) e 1 µL deste DNA foi utilizado em eletroforese em gel de agarose 1,5% para confirmar a integridade do mesmo. Posteriormente, 16 µL da amostra, correspondentes a 5 µg de DNA, foram transferidos para um microtubo Costar® de 0,65 mL (Covaris Inc., Woburn, MA, EUA) e ressuspendidos em 50 µL de tampão Low TE, pH 8 (Life Technologies). A fragmentação do DNA foi feita por sonicação em equipamento Covaris® S2 (Covaris Inc.), sendo realizados cinco ciclos de 90 segundos de sonicação (totalizando 6 minutos), gerando fragmentos de DNA entre 100 e 250 bp. Novamente, a quantificação do DNA foi feita com o fluorômetro Qubit™ (Invitrogen, Carlsbad, USA) e 1 µL deste DNA foi utilizado em eletroforese em gel de agarose 1,5% para confirmar o tamanho das bandas obtidas.

Este DNA foi então utilizado para a construção da biblioteca genômica, seguindo a metodologia descrita no manual do *kit* Ion Fragment Library (Life Technologies). Os principais passos envolveram etapas preliminares de preparo da amostra, sendo eles: I) Reparo das pontas coesivas; II) Purificação; III) Ligação dos adaptadores; IV) *Nick Translation* e Amplificação da biblioteca e; V) Enriquecimento. Para a PCR em emulsão e o enriquecimento da amostra utilizou-se o manual do *kit* Ion Xpress™ Template v2.0 (Life Technologies). Já para o sequenciamento, utilizando a plataforma Ion Torrent, seguiu-se as instruções do manual Ion Sequencing Kit User Guide v 2.0 (Life Technologies).

O sequenciamento do genoma da linhagem *S. torques-reginae* ITEP-024 foi realizado em um sequenciador Ion Torrent com um Chip 316 (Life Technologies), pertencente ao

Laboratório de Polimorfismo de DNA da UFPA, Belém, PA, sob a supervisão do Prof. Dr. Artur Luiz da Costa da Silva.

4.7.3 Montagem e anotação dos agrupamentos gênicos *sxt* e *antx-a(s)*

Para a montagem do agrupamento gênico *sxt* das leituras obtidas na plataforma HiScan SQ (Illumina) foi utilizado o programa *CLC Genomics Workbench* (CLCBio, Aarhus, Dinamarca) que permite uma montagem rápida e eficiente de sequências que apresentam alta qualidade. Inicialmente, foi realizada uma montagem por referência (*reference assembly*) utilizando o agrupamento gênico *sxt* da linhagem *C. raciborskii* T3 (KELLMANN et al., 2008a), isolada da Represa Billings, São Paulo, de forma a gerar uma sequência consenso para o agrupamento gênico *sxt* das linhagens deste estudo. Paralelamente, uma montagem *ab initio* também foi realizada com o programa *CLC Genomics Workbench*. O *contig* contendo o agrupamento *sxt* foi submetido ao programa Glimmer (http://www.cbcb.umd.edu/software/glimmer/) para detecção de ORFs. Este software é utilizado para genomas microbianos, especialmente de bactérias, arqueias e vírus, utilizando modelos de Markov (IMMs) para identificar possíveis regiões codificantes, distinguindo-as de regiões não-codificantes (SALZBERG et al., 1998). Em seguida, após a geração de um arquivo em formato .gb contendo as ORFs detectadas e a sequência em formato .fasta (http://cpt.tamu.edu/cgi-bin/phage_genomics/glimmer2genbank.php), a anotação manual do agrupamento gênico *sxt* e seus flanqueadores foi realizada pelo programa Artemis (RUTHERFORD et al., 2000) pela comparação com sequências do banco de dados de nucleotídeos e proteínas do NCBI.

Para o agrupamento gênico da *antx-a(s)*, que ainda não foi descrito, foi realizada uma montagem *ab initio* das sequências obtidas na plataforma Ion Torrent com os programas Velvet (ZERBINO; BIRNEY, 2008) e Edena (HERNANDEZ et al., 2008). Estas montagens foram realizadas no Lab. de Polimorfismo de DNA, da UFPA, PA, sob a coordenação do Prof. Dr. Artur Luiz da Costa da Silva. No programa Velvet foram testados diferentes valores dos parâmetros *k*-mer, valor mínimo de cobertura (coverage cutoff - cov_cut) e cobertura esperada (expected coverage - exp_cov). O conjunto de parâmetros que gerou *contigs* mais longos e em menor quantidade foi adotado para a montagem do genoma. No programa Edena, variações de tamanho mínimo de sobreposição entre as leituras (MinOverlap) foram testadas e

utilizadas para a construção do grafo de sobreposição, e quantidade mínima de sobreposições (OverlapCutoff), cujo parâmetro está diretamente ligado ao valor de cobertura obtido no sequenciamento. No entanto, não se obteve uma cobertura satisfatória e não foi possível montar o agrupamento gênico *antx-a(s)* da linhagem *S. torques-reginae* ITEP-024.

Análises com a ferramenta Blast2GO (http://www.blast2go.org/) foram realizadas para análises funcionais das sequências geradas (CONESA et al., 2005). Essa ferramenta utiliza um sistema de ontologias, o Gene Ontology (http://www.geneontology.org/), que tem como objetivo padronizar a representação dos genes e seus produtos para todos os sistemas biológicos, sendo subdividido em três categorias I) processo biológico (atividade biológica); II) função molecular (atividade bioquímica do gene ou produto) e, III) componente celular (local na célula onde o gene ou produto é ativo). O Blast2GO permite ainda realizar buscas por sequências similares em bancos de dados (CONESA et al., 2005).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Substâncias bioativas

Os resultados obtidos com a amplificação por PCR de fragmentos gênicos *cyr* (cilindrospermopsina), *sxt* (saxitoxina), *ana* (anatoxina-a, homoanatoxina-a), *mcy* (microcistina), *mdn* (microviridina) e *mca* (microciclamida), sequenciamento dos produtos de PCR e análises da produção das substâncias bioativas por Elisa e LC-MS estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11 **-** Resultados de amplificação e sequenciamento de fragmentos gênicos, e produção de substâncias bioativas

Espécie de cianobactéria	**Linhagem**	**Amplificação dos Genes**				**Sequenciamento dos Genes**				**Elisa**	**LC-MS**
		cyrA	***cyrB***	***cyrC***	***cyrJ***	***cyrA***	***cyrB***	***cyrC***	***cyrJ***		
D. planctonicum	CENA209	-	-	-	-						
S. torques-reginae	ITEP-024	-	-	-	-						
C. raciborskii	CENA302	+	+	+	-	+	+	+		-	-
	CENA303	+	+	+	-	+	+	+		-	-
	CENA305	-	+	-	-					-	
	CENA306	+	+	+	-					-	
	T3	-	+	-	-					-	-
	CYP-011K	+	+	+	+					+	+
		sxtA	***sxtB***	***sxtI***		***sxtA***	***sxtB***	***sxtI***		**Elisa**	**LC-MS**
D. circinalis	CENA190	+	+			+				-	-
	CENA191	+	-	+				+		-	-
D. crassum	CENA194			+				+			
	CENA195	+	+			+				-	
	CENA196			+							
	CENA198			+				+			
	CENA199			+							
	CENA202			+				+			
	CENA204			+				+			
	CENA205		+	+						-	-
	CENA206			+				+			
	CENA301			+						-	-
D. planctonicum	CENA209		+	+				+		-	-
	CENA210		+	+				+		-	-
	CENA211			+				+			
C. fallax	CENA208	+	+			+				-	
S. aphanizomenoides	CENA188	+	+							-	-

continua

continuação

S. torques-reginae	ITEP-026			+				+			
	ITEP-024	+	-	+		+		+		-	-
C. raciborskii	CENA302	+	+	+		+	+	+		+	+
	CENA303	+	+	+		+	+	+		-	-
	CENA305	+	+	+						+	+
	CENA306	+	+	+						-	
	CYP-011K	-	-	-							
		anaC	***anaE***	***anaF***	***anaG***	***anaC***	***anaE***	***anaF***	***anaG***	**LC-MS**	
D. circinale	CENA190	-	-								
	CENA191	-	-								
D. crassum	CENA194	-	-								
	CENA198	-	-								
	CENA202	+	+	-	-						
	CENA204	-	-								
	CENA205	+	+							-	
	CENA301	+	+	+	-					-	
S. torques-reginae	ITEP-024	+	-	+	-					*	
		mcyD	***mcyE***	***mcyG***		***mcyD***	***mcyE***	***mcyG***		**LC-MS**	
D. circinalis	CENA190	-	-	-							
D. crassum	CENA196	+	+	-							
	CENA199		+								
	CENA205	-	+	-						-	
	CENA301	+	+	-						-	
D. planctonicum	CENA209	-	+	-							
	CENA210	+	+	-						-	
C. fallax	CENA208	+	+	-						-	
S. aphanizomenoides	CENA188	+	+	-						-	
S. torques-reginae	ITEP-024	-	-	-							

continua

conclusão

C. raciborskii	CENA302	-	-	-				
M. protocystis	SPC697							+
M. panniformis	SPC702							+
M. wesenbergii	SPC701							-
		mdnA	***mdnB***	***mdnC***	***mdnA***	***mdnB***	***mdnC***	**LC-MS**
M. aeruginosa	NPJB-1	+	+	+	+	+	+	
	NPCD-1	+	+	+	+		+	-
	SPC777	+	+	+	+	+	+	-
	NPLJ-4	+	+	+	+	+		
M. novacekii	SPC503	-	-	-				
M. protocystis	SPC697	+	+	+	+	+	+	-
M. panniformis	SPC702	+	+	+		+	+	-
M. wesenbergii	SPC761	-	+	+		+		-
Microcystis sp.	NPLS-1	-	-	-				
	SPC804	-	-	-				
	SPC822	-	+	+		+	+	
		mcaA	***mcaD***	***mcaF***	***mcaA***	***mcaD***	***mcaF***	**LC-MS**
M. aeruginosa	NPJB-1	+	+	+			+	
M. aeruginosa	NPCD-1	+	+	+	+	+	+	-
	SPC777	+	+	+	+		+	-
	NPLJ-4	+	+	+	+	+	+	-
M. novacekii	SPC503	-	-	-			-	
M. protocystis	SPC697	-	-	-			-	
M. panniformis	SPC702	+	+	-			+	-
M. wesenbergii	SPC761	-	-	-			-	
Microcystis sp.	NPLS-1	-	-	-			-	
	SPC804	+	+	-			+	
	SPC822			-				

(+) resultado positivo; (-) resultado negativo; (em branco) não analisado; (*) resultado positivo de produção de anatoxina-a(s).

5.1.1 Genes *cyr* e produção de CYN

Linhagens cianobacterianas pertencentes a três gêneros distintos foram avaliadas para a presença de fragmentos dos genes *cyrA*, *cyrB*, *cyrC* e *cyrJ* e produção de CYN, Tabela 11. A linhagem *C. raciborskii* CYP-011K, cedida pelo Prof. Peter Baker do Australian Water Quality Center – AWQC foi usada como controle positivo. Fragmentos de tamanho esperado para os genes *cyr* foram obtidos por PCR com o DNA da linhagem CYP-011K, utilizando os oligonucleotídeos descritos na Tabela 6, e a produção da toxina foi confirmada por LC/MS e ensaio imunoenzimático.

Três linhagens de *C. raciborskii* CENA302, CENA303 e CENA306 tiveram fragmentos dos genes *cyrA*, *cyrB* e *cyrC* amplificados, enquanto que as linhagens *C. raciborskii* CENA305 e T3 tiveram somente o fragmento do gene *cyrB* amplificado. Os produtos da PCR das linhagens CENA302 (isolada do estado de São Paulo) e CENA303 (isolada do Estado do Rio Grande do Sul) foram clonados, sequenciados e a identidade dos genes *cyr* confirmada. Os seguintes produtos gênicos foram obtidos com seus respectivos números de acesso entre parêntesis: CENA302, *cyrA* – 1106 pb (JX175239); *cyrB* – 470 pb (JX175241) e; *cyrC* – 515 pb (JX175243); CENA303, *cyrA* – 1107 pb (JX175238); *cyrB* – 470 pb (JX175240) e; *cyrC* – 515 pb (JX175242).

Vários esforços foram realizados para amplificação do gene *cyrJ*, como por exemplo, um teste de gradiente de temperatura de anelamento que variou de 55,8 a 59,6 °C e também um "*Touch Down*", no entanto, nenhum resultado positivo foi obtido. O gene *cyrJ* foi amplificado e apresentou um fragmento de tamanho esperado no genoma da linhagem australiana CYP-011K. A não detecção do gene *cyrJ* em todas as linhagens brasileiras analisadas pode ter ocorrido devido a baixa especificidade dos oligonucleotídeos usados ou com a ausência desse gene nos genomas dessas cianobactérias. A segunda hipótese parece mais viável, já que o produto de PCR foi obtido para a linhagem australiana CYP-011K produtora de CYN. A ausência desse gene no agrupamento gênico da cilindrospermopsina tem sido associada à linhagens de cianobactérias não produtoras de CYN (MIHALI et al., 2008; MAZMOUZ et al., 2010; BALLOT et al., 2011). No entanto, em um estudo realizado em dois lagos da Polônia Ocidental, o gene *cyrJ* foi identificado em 22 amostras de água, mas somente em 16 amostras a produção de CYN foi confirmada (MANKIEWICZ-BOCZEK et al., 2012). Portanto, uma investigação mais detalhada do agrupamento gênico da CYN nas

linhagens brasileiras não produtoras de CYN se faz necessário, visto que fragmentos dos genes *cyrA*, *cyrB* e *cyrC* foram identificados.

A análise filogenética agrupou as sequências de aminoácidos CyrA, CyrB e CyrC das linhagens brasileiras de *C. raciborskii* com sequências de aminoácidos homólogas de cianobactérias produtoras de CYN, indicando a função das proteínas, Figura 20. As linhagens brasileiras ficaram agrupadas em clados formados por linhagens isoladas de outros países pertencentes ao gênero *Cylindrospermopsis* ou a outros gêneros da ordem Nostocales. A linhagem *Oscillatoria* sp. PCC 6506 pertencente à ordem Oscillatoriales ficou em um clado separado das demais linhagens.

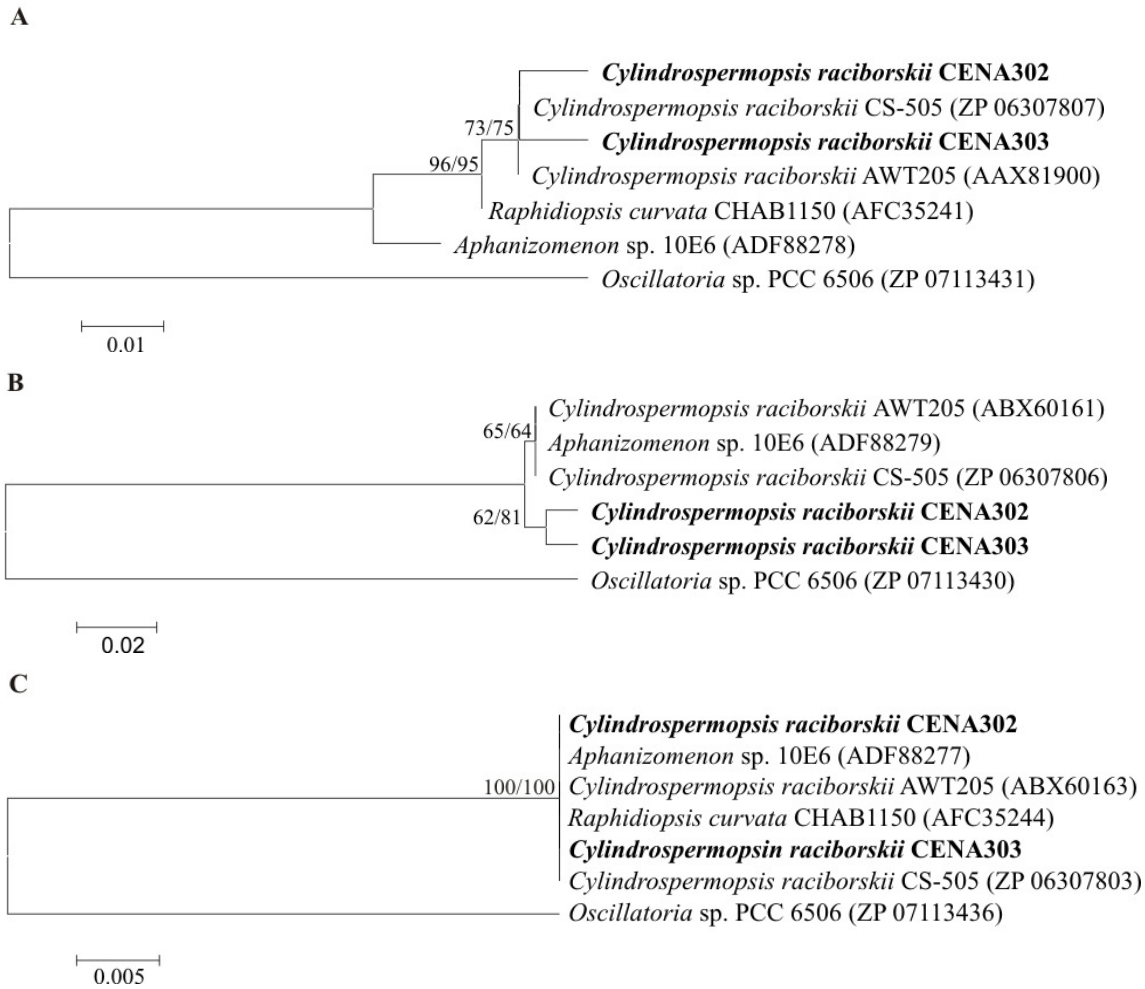


Figura 20 - Árvore filogenética de sequências de aminoácidos. CyrA (A), CyrB (B) e CyrC (C). As linhagens utilizadas neste estudo estão em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% nas análises de ML/NJ estão apresentados em cada nó

Análises com a ferramenta BLASTP (NCBI) mostram que as sequências de aminoácidos Cyr das linhagens brasileiras analisadas apresentam elevada identidade com sequências de linhagens produtoras de CYN como *C. raciborskii* AWT205, *C. raciborskii* CS-505 e *Aphanizomenon* sp. 10E6. Por outro lado, a identidade das sequências Cyr das linhagens brasileiras foi menor com *Oscillatoria* sp. PCC6506, principalmente em relação ao CyrB, Figura 21.

A

Linhagem	Origem	CyrA (aa)	1	2	3	4	5	6
1. *C. raciborskii* AWT205	Austrália	334	-					
2. *C. raciborskii* CS-505	Austrália	391	99,7	-				
3. *Aphanizomenon* sp. 10E6	Alemanha	391	97,6	98,2	-			
4. *Raphidiopsis curvata* CHAB1150	China	391	98,8	99,2	97,9	-		
5. *Oscillatoria* sp. PCC6506	França	398	87,1	86,2	86,4	85,9	-	
6. *C. raciborskii* CENA302	Brasil/SP	368	99,2	99,2	97,3	98,4	86,1	-
7. *C. raciborskii* CENA303	Brasil/RS	369	99,2	99,2	97,3	98,8	86,2	98,0

B

Linhagem	Origem	CyrB (aa)	1	2	3	4	5	6
1. *C. raciborskii* AWT205	Austrália	2917	-					
2. *C. raciborskii* CS-505	Austrália	2917	100	-				
3. *Aphanizomenon* sp. 10E6	Alemanha	2917	99,4	99,4	-			
4. *Raphidiopsis curvata* CHAB1150	China	2917	99,3	99,3	99,4	-		
5. *Oscillatoria* sp. PCC6506	França	2957	79,4	79,4	79,5	79,5	-	
6. *C. raciborskii* CENA302	Brasil/SP	156	98,7	98,7	98,7	98,7	62,2	-
7. *C. raciborskii* CENA303	Brasil/RS	156	98,1	98,1	98,1	98,1	62,2	98,1

C

Linhagem	Origem	CyrC (aa)	1	2	3	4	5	6
1. *C. raciborskii* AWT205	Austrália	1667	-					
2. *C. raciborskii* CS-505	Austrália	1667	99,9	-				
3. *Aphanizomenon* sp. 10E6	Alemanha	1667	99,2	99,0	-			
4. *Raphidiopsis curvata* CHAB1150	China	1667	99,2	99,0	99,4	-		
5. *Oscillatoria* sp. PCC6506	França	1672	86,3	86,3	86,4	86,5	-	
6. *C. raciborskii* CENA302	Brasil/SP	171	100	100	100	100	93,6	-
7. *C. raciborskii* CENA303	Brasil/RS	171	100	100	100	100	93,6	100

Figura 21 - Percentual de similaridade das sequências de aminoácidos Cyr de *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 com sequências de linhagens de cianobactérias produtoras de CYN. (A) CyrA; (B) CyrB; (C) CyrC

A enzima CyrA é uma L-arginina:glicina amidinotransferase responsável pela formação do anel guanidinoacetato, o primeiro passo na biossíntese da toxina. Essa enzima só foi encontrada, até o momento, envolvida na biossíntese de CYN (MIHALI et al., 2008; MUENCHHOFF et al., 2010). Sendo assim, o gene *cyrA* representa um marcador ideal para a detecção e seleção de linhagens potencialmente produtoras de CYN. CyrB (híbrido NRPS-PKS) e CyrC (PKS) são as enzimas subsequentes na via biossintética proposta, e ambas incorporam unidades de acetato ao guanidinoacetato (MIHALI et al., 2008). Kellmann, Mills e Neilan (2006) demonstraram que os genes *cyrA*, *cyrB* e *cyrC* estavam presentes somente em linhagens produtoras de CYN, com exceção da linhagem húngara *C. raciborskii* Hung1, não produtora de CYN. Eles observaram que esta linhagem apresenta uma sequência do gene *cyrB* homóloga às linhagens produtoras de CYN, mas não apresenta os genes *cyrA* e *cyrC*. Sendo assim, os dados do presente estudo confrontam os apresentados por Kellmann, Mills e Neilan (2006), pois fragmentos dos genes *cyrA*, *cyrB* e *cyrC* foram encontrados em linhagens produtoras e não produtoras de CYN.

As linhagens *D. planctonicum* CENA209 e *S. torques-reginae* ITEP-024 apresentaram resultados negativos de amplificação dos genes *cyr* avaliados. Não há relatos na literatura de linhagens pertencentes a esses gêneros como sendo produtoras de CYN.

Diferentes metodologias foram utilizadas a fim de detectar as variantes CYN e/ou 7-*deoxy*-CYN nas linhagens Brasileiras, no entanto, nenhuma molécula foi identificada. Como esperado, ambas moléculas foram detectadas na linhagem australiana *C. raciborskii* CYP-011K nas frações intra e extracelulares (Figura 22). A concentração total de CYN (*m/z* 418) e 7-*deoxy*-CYN (*m/z* 400) foi 0,11 e 0,209 $\mu g.mL^{-1}$, respectivamente. A ausência do gene *cyrJ*, sugerida pela não amplificação utilizando oligonucleotídeos específicos, pode ser um dos motivos pelo qual não foram encontrados possíveis variantes de CYN nas linhagens brasileiras. O produto codificado por esse gene é responsável pela sulfatação do C-12 da CYN. O ensaio imunoenzimático ELISA confirmou a não produção de cilindrospermopsinas pelas linhagens brasileiras e a produção da toxina pela linhagem australiana CYP-011K.

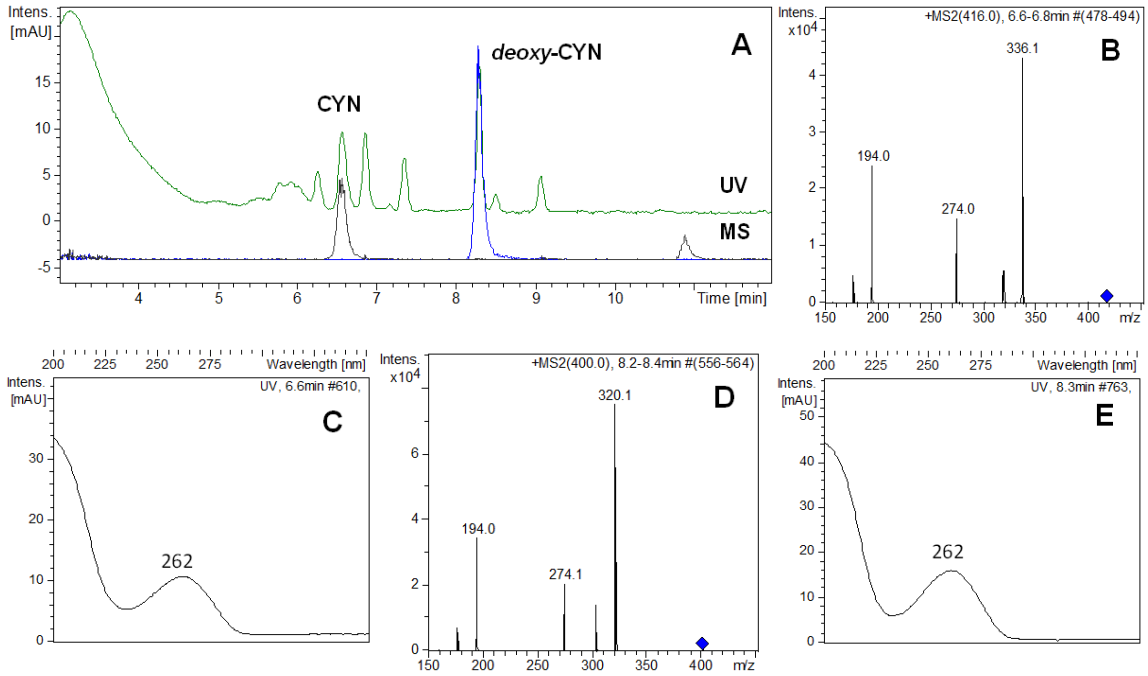


Figura 22 - Análises por LC-UV-MS da cultura de *C. raciborskii* CYP-011K. Traço UV a 262 nm e cromatograma extraído do íon para CYN (*m/z* 418) e 7-*deoxy*-CYN (*m/z* 400) (A). Espectro do íon produzido e espectro de absorção UV estão apresentados para CYN (B e C) e 7-*deoxy*-CYN (D e E)

Alguns padrões em relação à toxigenicidade das linhagens de *C. raciborskii* podem ser observados e são separados em cada continente. Por exemplo, é possível agrupar as linhagens australianas e asiáticas como produtoras de CYN, linhagens européias como produtoras de compostos ainda não identificados que apresentam efeitos hepatotóxicos e neurotóxicos em bioensaios e linhagens americanas como produtoras de STX (HAANDE et al., 2008; GUGGER et al., 2005; NEILAN et al., 2003; MOLICA et al., 2002). Embora a existência de CYN em florações de corpos-d'água brasileiros com dominância de *C. raciborskii* seja conhecida há muitos anos, linhagens brasileiras dessa espécie produtoras de CYN nunca foram isoladas. Neste estudo, apesar da identificação de fragmentos de genes *cyr* em linhagens brasileiras de *C. raciborskii*, nenhuma produção foi detectada por extensos experimentos de LC/MS e Elisa.

Deleções e inserções no agrupamento gênico da cilindrospermopsina podem ser uma das causas da perda da capacidade de produção da toxina (RASMUSSEN et al., 2008). Além disso, genes PKS e NRPS, responsáveis pela biossíntese de pequenas moléculas como a cilindrospermopsina, podem permanecer silenciados ou serem pouco expressos em condições de laboratório (WINTER et al., 2011). Um exemplo disso são as bactérias anaeróbicas do gênero *Clostridium* que, apesar do fato de vários estudos indicarem que elas contêm genes

que codificam para a biossíntese de metabólitos secundários, nenhum destes metabólitos foi reportado em condições de laboratório (LINCKE et al., 2010). Os pesquisadores adicionaram um extrato aquoso do solo na cultura de *C. cellulolyticum*, expondo o organismo ao seu habitat natural o qual alterou seu perfil metabólico e permitiu a identificação do antibiótico politioamidaclostioamida.

As linhagens de *C. raciborskii* estudadas neste trabalho estão em cultivo há mais de três anos e suas condições ambientais podem não ser favoráveis para a expressão de cilindrospermopsina. Sendo assim, alternativas para tentar acessar esses metabólitos seriam, por exemplo, análises *in silico* ou ensaios de microcosmos, que consistem basicamente em reproduzir condições ambientais em laboratório.

5.1.2 Genes *sxt* e produção de STX

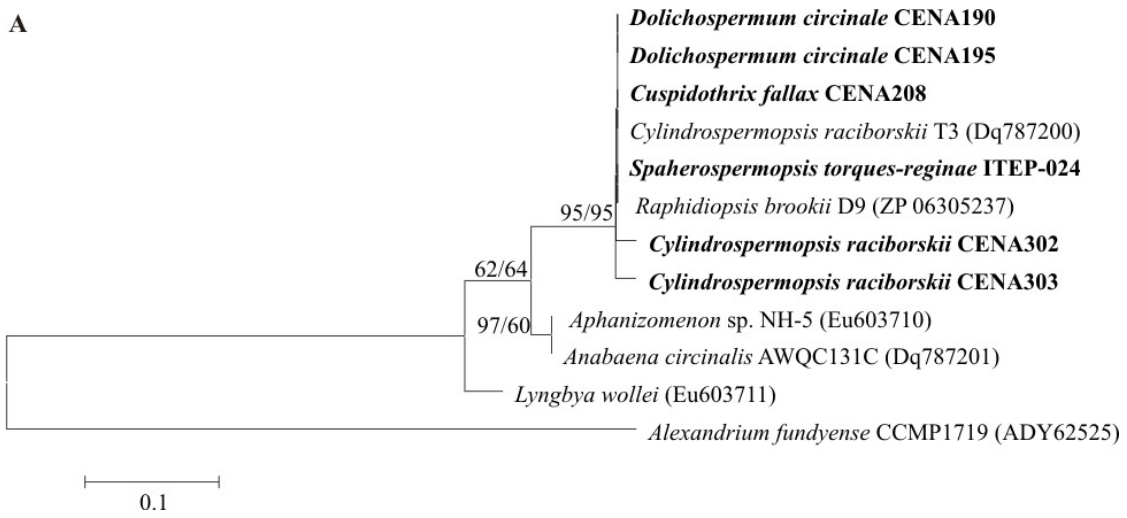
Neste estudo, vinte e quatro linhagens pertencentes a sete espécies foram avaliadas para a presença dos genes *sxtA*, *sxtB* e *sxtI*. Um fragmento do gene *sxtA* foi amplificado em nove isolados e o produto de PCR de seis destes foi clonado, sequenciado e a árvore filogenética construída. Amplificações de fragmentos do gene *sxtB* foram obtidas com o DNA de onze linhagens sendo que duas destas tiveram o produto de PCR clonado e sequenciado. Já o fragmento do gene *sxtI* foi amplificado em dezenove linhagens e destas, treze linhagens tiveram o produto de PCR clonado e sequenciado, Tabela 11.

Fragmentos dos genes *sxtA*, *sxtB* e *sxtI* foram amplificados nos genomas das linhagens CENA302, CENA303 e CENA305 que também apresentaram fragmentos de genes envolvidos na biossíntese de cilindrospermopsina. O tamanho dos fragmentos gênicos obtidos e seus respectivos números de acesso foram: CENA302, *sxtA* – 201 pb (JX175236); *sxtB* – 336 pb (JX175234) e; *sxtI* – 904 pb (JX175232); CENA303, *sxtA* – 200 pb (JX175237); *sxtB* – 270 pb (JX175235) e; *sxtI* – 589 pb (JX175233). Os genes *sxt* não foram detectados na linhagem australiana *C. raciborskii* CYP-011K produtora de CYN.

Nos genomas das linhagens *D. circinalis* CENA190, *D. crassum* CENA195, *C. fallax* CENA208 e *S. aphanizomenoides* CENA188 foram encontrados os genes *sxtA* e *sxtB*. Nas linhagens *D. circinalis* CENA191 e *S. torques-regiane* ITEP-024 (produtora de anatoxina-a(s)) amplificou-se por PCR fragmentos dos genes *sxtA* e *sxtI*, enquanto que na *C. raciborskii* CENA306 somente fragmentos dos genes *sxtB* e *sxtI*. Nos DNAs genômicos das demais

linhagens foram amplificados por PCR apenas fragmentos de um dos genes *sxt* testados, como pode ser visto na Tabela 11.

Análises filogenéticas utilizando os métodos de Máxima Verossimilhança (¨Maximum likelihood¨ – ML) e Neighboor Joining – NJ agruparam as sequências de aminoácidos SxtA, SxtB e SxtI das linhagens estudadas com sequências Sxt homólogas de linhagens brasileiras de *C. raciborskii* T3 e *R. brookii* D9, produtoras de STX, com elevado valor de reamostragem 95% (SxtA), 100% (SxtB) e 98% (SxtI), Figura 23. Além disso, as linhagens brasileiras ficaram agrupadas em clados separados das demais linhagens da mesma espécie ou da mesma ordem que foram isoladas de outros países, como é o caso da linhagem australiana *A. circinalis* AWQC131C (*Dolichospermum circinale*) que formou um clado separado das linhagens brasileiras *D. circinale* CENA190 e CENA195. A linhagem *A. circinalis* AWQC131C ficou agrupada com a linhagem norte americana *Aphanizomenon* sp. NH-5 nas árvores filogenéticas das sequências de aminoácidos SxtA, SxtB e SxtI, com valor de reamostragem acima de 80%.



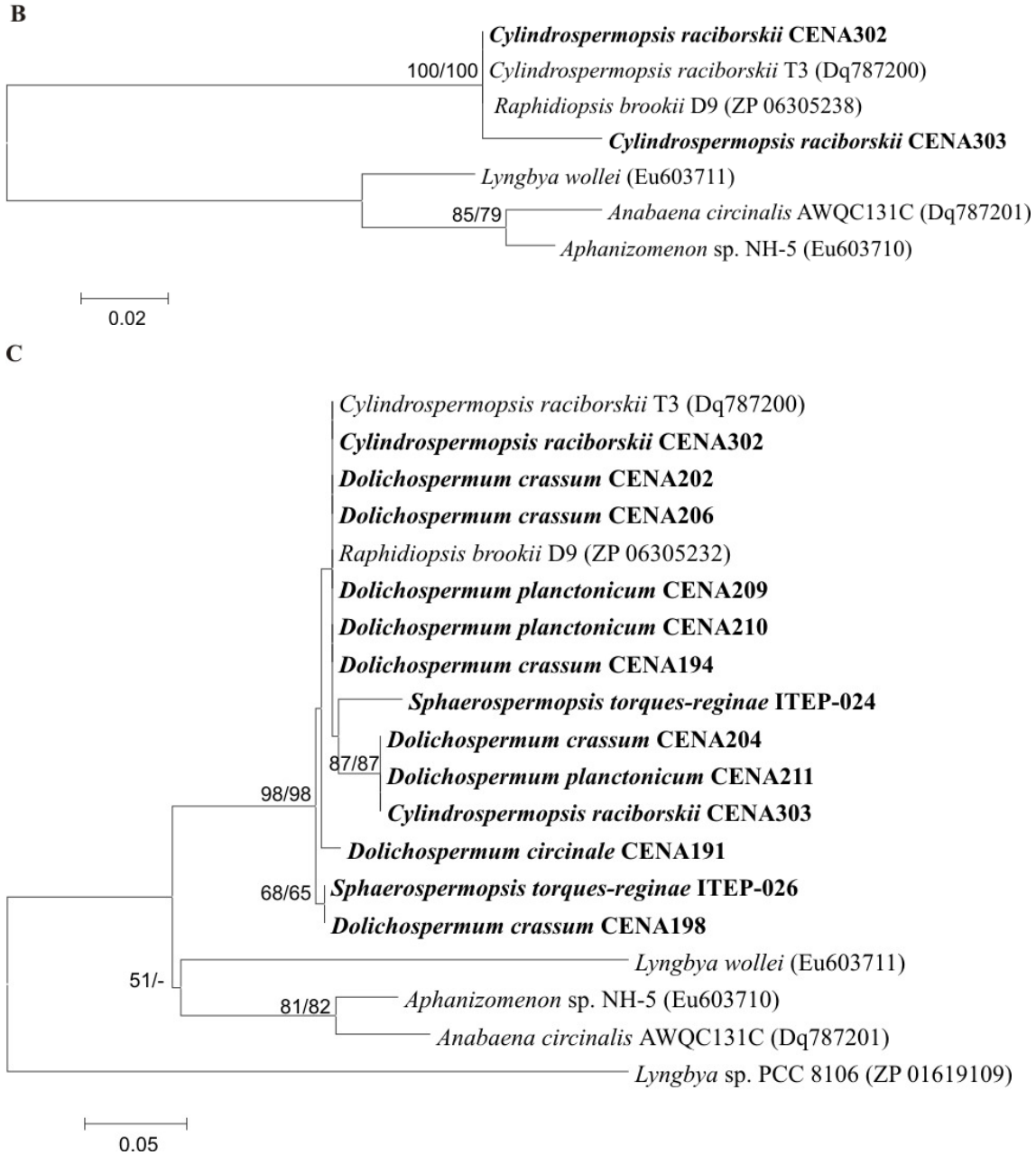


Figura 23 - Árvore filogenética de sequências de aminoácidos Sxt. SxtA (A), SxtB (B) e SxtI (C). As linhagens analisadas neste estudo estão em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% nas análises de ML/NJ estão apresentados em cada nó

Recentemente, Stüken et al. (2011) sequenciaram o RNAm de duas linhagens de dinoflagelados produtores de saxitoxina, *Alexandrium fundyense* CCMP1719 e *Alexandrium minutum* CCMP113, e descobriram que essas linhagens apresentam genes requeridos para a biossíntese de saxitoxina. Esses autores focaram principalmente no gene *sxtA*, o único gene que inicia a biossíntese de STX, e observaram que os transcritos desse gene em

dinoflagelados têm a mesma estrutura de domínios que o gene *sxtA* presente em cianobactérias. Na árvore filogenética da sequência SxtA (Figura 23A), a linhagem *Alexandrium fundyense* CCMP1719 ficou em um clado separado, mostrando que apesar do potencial para produção da toxina, esse dinoflagelado apresenta uma sequência de aminoácidos SxtA distinta.

A análise filogenética SxtA, SxtB e SxtI de *Lynbya wollei* mostra que essa linhagem forma um clado separado e com baixo valor de reamostragem em relação às demais linhagens produtoras de STX. Kellmann, Mihali e Neilan (2008) analisaram e compararam o gene *sxtI* de *Lynbya wollei* com a linhagem *C. raciborskii* T3. Esses autores observaram que a linhagem *L. wollei* apresenta a inserção de um gene aciltransferase (*sxtACT*) em uma posição que pode ter causado o truncamento ou a inativação do gene carbamoiltransferase (*sxtI*), resultando em um agrupamento gênico *sxt* que não é capaz de produzir derivados carbamoilados de STX.

Análises com a ferramenta BLASTP mostram que existem algumas cianobactérias como *Lyngbya* sp. PCC 8106, *Synechocystis* sp. PCC 6803 e *Cyanothece* sp. CCY0110 além da proteobactéria *Mariprofundus ferrooxydans* PV-1, que apresentam uma sequência SxtI capaz de codificar uma proteína de nodulação. Esta sequência não está relacionada com a biossíntese de STX e, como pode ser visto na árvore filogenética, a sequência SxtI de *Lyngbya* sp. PCC 8106 ficou distantemente relacionada, filogeneticamente, formando um clado isolado das demais linhagens produtoras de STX.

Neste trabalho, a ferramente BLASTP foi usada para comparar o percentual de similaridade das sequências de aminoácidos SxtA, SxtB e SxtI das linhagens que tiveram fragmentos gênicos *sxt* sequenciados com sequências homólogas de linhagens produtoras de STX depositadas no GenBank, Figura 24. A identidade das sequências SxtA, SxtB e SxtI foi alta, variando de 90,9 a 100% para a sequência SxtA, 77,2 a 99,1% para SxtB e 82,3 a 100% para SxtI. Uma exceção foi a linhagem *L. wollei*, que apresenta algumas modificações em seu agrupamento gênico *sxt* como descrito anteriormente. A sequência SxtA das linhagens *D. circinale* CENA190, *D. crassum* CENA195, *C. fallax* CENA208 e *S. torques-reginae* ITEP-024 foram 100% idênticas. Anteriormente, táxons pertencentes a esses quatro gêneros eram classificados dentro do gênero *Anabaena.* As linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA303 diferem na sequência SxtA em apenas dois aminoácidos.

A

Linhagem	Origem	SxtA (aa)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. *C. raciborskii* T3	Brasil/SP	426	-									
2. *R. brookii* D9	Brasil/SP	1245	99,9	-								
3. *A. circinalis* AWQC131C	Austrália	413	94,4	89,9	-							
4. *Aphanizomenon* sp. NH-5	EUA	1234	94,4	90,0	99,5	-						
5. *L. wollei*	EUA	1243	88,5	88,4	90,5	90,6	-					
6. *D. circinale* CENA190	Brasil/SP	66	100	100	92,4	92,4	89,4	-				
7. *D. crassum* CENA195	Brasil/SP	66	100	100	92,4	92,4	89,4	100	-			
8. *C. fallax* CENA208	Brasil/SP	66	100	100	92,4	92,4	89,4	100	100	-		
9. *S. torques-reginae* ITEP-024	Brasil/PE	66	100	100	92,4	92,4	89,4	100	100	100	-	
10.*C. raciborskii* CENA302	Brasil/SP	67	98,5	98,5	90,9	90,9	87,9	98,5	98,5	98,5	98,5	-
11.*C. raciborskii* CENA303	Brasil/RS	66	100	100	90,9	90,9	87,9	98,5	98,5	98,5	98,5	97,0

B

Linhagem	Origem	SxtB (aa)	1	2	3	4	5	6
1. *C. raciborskii* T3	Brasil/SP	318	-					
2. *R. brookii* D9	Brasil/SP	318	100	-				
3. *A. circinalis* AWQC131C	Austrália	325	86,0	86,0	-			
4. *Aphanizomenon* sp. NH-5	EUA	322	86,8	86,8	96,6	-		
5. *L. wollei*	EUA	322	88,4	88,4	89,8	91,9	-	
6. *C. raciborskii* CENA302	Brasil/SP	112	99,1	99,1	85,7	83,6	85,3	-
7. *C. raciborskii* CENA303	Brasil/RS	90	96,6	96,6	80,0	77,2	79,5	97,7

C

Linhagem	Origem	SxtI (aa)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1. *C. raciborskii* T3	Brasil/SP	612	-																
2. *R. brookii* D9	Brasil/SP	612	100	-															
3. *A. circinalis* AWQC131C	Austrália	612	90,5	90,5	-														
4. *Aphanizomenon* sp. NH-5	EUA	612	91,5	91,5	97,4	-													
5. *L. wollei*	EUA	356	81,0	81,0	77,4	79,2	-												
6. *D. circinale* CENA191	Brasil/SP	189	98,4	98,4	86,8	87,3	53,5	-											
7. *D. crassum* CENA194	Brasil/SP	189	98,9	98,9	86,8	87,3	53,5	98,4	-										
8. *D. crassum* CENA198	Brasil/SP	189	98,9	98,9	87,3	87,8	50,4	97,3	97,8	-									
9. *D. crassum* CENA202	Brasil/SP	189	99,5	99,5	87,3	87,8	50,4	98,9	99,5	98,4	-								
10. *D. crassum* CENA204	Brasil/SP	189	98,4	98,4	86,2	86,8	52,0	96,8	97,3	97,3	97,8	-							
11. *D. crassum* CENA206	Brasil/SP	189	99,5	98,4	86,2	86,8	52,0	97,9	98,4	97,3	98,9	96,8	-						
12. *D. planctonicum* CENA209	Brasil/SP	219	96,0	96,0	84,7	87,3	50,4	97,3	97,8	97,8	98,4	97,3	97,3	-					
13. *D. planctonicum* CENA210	Brasil/SP	220	93,3	93,3	82,3	82,8	53,5	97,3	97,8	96,8	98,4	96,3	97,3	97,6	-				
14. *D. planctonicum* CENA211	Brasil/SP	189	98,4	98,4	86,2	86,8	52,0	96,8	97,3	97,3	97,8	98,9	96,8	97,3	96,3	-			
15. *S. torques-reginae* ITEP-024	Brasil/PE	214	96,9	96,9	85,3	85,8	51,2	96,8	97,3	96,3	97,8	95,8	96,8	95,3	96,6	95,8	-		
16. *S. torques-reginae* ITEP-026	Brasil/PE	217	93,8	93,8	83,3	83,7	50,4	96,8	97,3	99,5	97,8	96,8	96,8	94,9	95,0	96,8	93,5	-	
17. *C. raciborskii* CENA302	Brasil/SP	222	99,0	99,0	87,3	86,8	53,5	98,9	99,5	98,4	100	97,8	98,9	95,4	98,5	97,8	97,1	95,8	-
18. *C. raciborskii* CENA303	Brasil/RS	222	98,0	98,0	86,3	87,8	48,8	96,8	97,3	98,4	97,8	98,9	96,8	97,2	96,6	98,9	94,4	95,4	98,1

Figura 24 - Percentual de similaridade das sequências de aminoácidos Sxt das linhagens estudadas com sequências homólogas de linhagens de cianobactérias produtoras de STX. (A) SxtA; (B) SxtB; (C) SxtI

A linhagem australiana *A. circinalis* AWQC131C (*D. circinale*), produtora de STX, apresentou uma identidade menor com as sequências de aminoácidos SxtA, SxtB e SxtI das linhagens brasileiras de *D. circninale* estudadas, ficando mais proximamente relacionada com a linhagem norte americana *Aphanizomenon* sp. NH-5. Esses resultados demonstram que o agrupamento gênico *sxt* precisa ser analisado e sequenciado para cada linhagem, pois linhagens do mesmo gênero e até mesma espécie podem ter diferenças significativas na composição dos seus genes. Além disso, há uma identidade maior na sequência de aminoácidos entre as linhagens brasileiras em relação às linhagens isoladas de outros países.

Moustafa et al. (2009) realizaram uma busca de vinte e seis genes *sxt* no genoma de duas linhagens de *Anabaena circinalis* sendo a linhagem ACBU02 tóxica e a linhagem ACFR02 não tóxica. Os autores concluíram que a montagem do agrupamento gênico *sxt* envolve múltiplos eventos de HGT (horizontal gene transfer) que tiveram origem em diferentes fontes. Dos vinte e seis genes *sxt* analisados, eles observaram que nove genes foram transferidos horizontalmente a partir de fontes não cianobacterianas, dentre eles está o gene *sxtB* proveniente de proteobactéria. Estes nove genes estão presentes somente em cianobactérias produtoras de STX. Treze genes são provenientes de cianobactérias e são considerados monofiléticos entre os táxons produtores de STX, dentre eles estão o gene *sxtI*. O gene chave (*sxtA*), presente em cianobactérias produtoras de STX, é uma quimera originária de duas transferências horizontais independentes seguidas de fusão. Os outros quatro genes (*sxtO*, *sxtW*, *sxtY* e *sxtZ*) são partilhados entre linhagens produtoras e não produtoras. Portanto, a filogenia e o percentual de identidade dos fragmentos gênicos *sxtA*, *sxtB* e *sxtI* com sequências homólogas de linhagens produtoras de STX, indicam o potencial de produção da toxina pelas linhagens estudadas neste trabalho.

Análises da produção de STX, utilizando duas metodologias distintas (HPLC-FD e ELISA), confirmaram a produção da toxina pelas linhagens *C. raciborskii* CENA302 e CENA305 ambas isoladas da represa Billings, São Bernardo do Campo. As duas linhagens apresentaram os genes *sxtA*, *sxtB* e *sxtI* em seus genomas. O método cromatográfico de oxidação pós-coluna com detecção de fluorescência permitiu a identificação de três variantes carbamato toxinas (GTX2, GTX3 e STX) e uma decarbamato toxina (dc-STX) produzidas pela linhagem *C. raciborskii* CENA302, enquanto que a linhagem *C. raciborskii* CENA305 produz uma variante carbamato (NEO), uma *N*-sulfocarbamato toxina (C1) e uma decarbamato toxina (dcGTX3). A linhagem *C. raciborskii* T3 usada como controle positivo neste estudo produz as variantes NEO, STX e dcSTX, Figura 25. Estes resultados foram confirmados por análises de HILIC-MS.

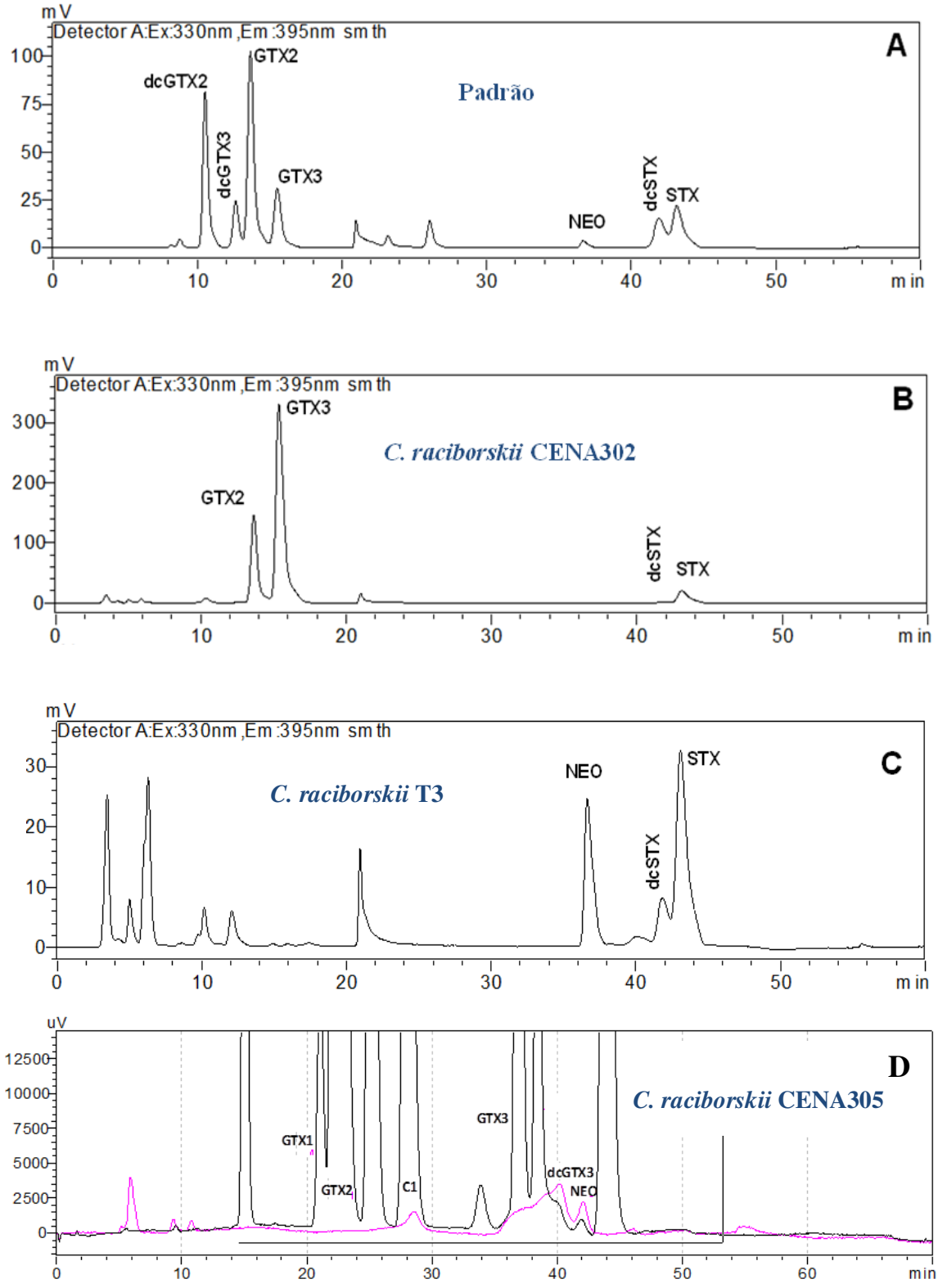


Figura 25 - Cromatogramas de HPLC-FD para STXs. Mistura de padrões (A), CENA302 (B), T3 (C) e CENA305 (em rosa) e mistura de padrões (D)

A presença de sequências dos genes *sxt* nas linhagens estudadas, bem como a detecção de variantes STX por análises cromatográficas nas linhagens CENA302 e CENA305 corroboram as informações prévias de que linhagens brasileiras *C. raciborskii* são produtoras destas neurotoxinas (LAGOS et al., 1999; MOLICA et al., 2002; FERRÃO-FILHO et al., 2007). Um perfil similar de produção de toxina, exceto pela pequena quantidade de dcSTX encontrada nas análises realizadas neste estudo, foi reportada por Lagos et al. (1999) para as linhagens *C. raciborskii* T2 e T3. Um dado interessante é que tanto as linhagens CENA302, CENA305, quanto T2 e T3 foram isoladas do reservatório Billings no estado de São Paulo (clima tropical), em diferentes localizações, as linhagens CENA302 e CENA305 foram isoladas do braço Riacho Grande e as linhagens T2 e T3 do braço Taquacetuba. No que diz respeito ao perfil de STXs produzidas pela linhagem *C. raciborskii* T3, nossos resultados podem ser comparados com todos obtidos por Soto-Liebe et al. (2010). Como apontado por esses autores, dados da literatura do perfil de toxinas produzidas pela T3 têm gerado muita confusão, pois diferentes grupos de pesquisa identificaram diferentes variantes de STX. Em nosso estudo, a produção de NEO, STX e dcSTX foi confirmada por três técnicas analíticas complementares. Baixas taxas de dcNEO foram detectadas somente por HILIC-MS, uma vez que a co-eluição dificulta a sua identificação nos métodos de HPLC-FD, estes resultados estão apresentados no artigo gerado: Simultaneous detection of cylindrospermopsin and saxitoxin synthetase genes in *Cylindrospermopsis raciborskii* strains from Brazilian freshwater (HOFF-RISSETI et al., 2012, Anexo B).

A produção de STX por linhagens cianobacterianas brasileiras foi identificada até o presente momento apenas para linhagens de *C. raciborskii* (FERRÃO-FILHO et al., 2007; POMATI et al., 2004; CASTRO et al., 2004; MOLICA et al., 2002; LAGOS et al., 1999). Linhagens de *Dolichospermum* produtoras de STX e seus análogos foram verificados somente na Austrália em *D. circinale* (SOTO-LIEBE et al., 2010; TESTE et al., 2002; JONES; NEGRI, 1997; NEGRI; JONES; HINDMARSH, 1995). Apesar da produção de STX não ter sido detectada nas linhagens de *Dolichospermum*, *Sphaerospermopsis* e *Cuspidothrix* estudadas, a detecção e a filogenia dos genes *sxt* sugerem que elas são potencialmente produtoras de PSPs. Paralelamente, foram realizadas análises da produção de STX por LC-MS, com as linhagens de *M. aeruginosa* NPCD-1, *M. protocystis* SPC697, *M. panniformis* SPC702 e *M. wesenbergii* SPC761, no entanto, nenhuma destas linhagens mostrou a produção de STX.

Como foi dito anteriormente, no Brasil, os trabalhos disponíveis mostram que todas as linhagens toxigênicas de *C. raciborskii* isoladas são produtoras de saxitoxinas (MOLICA et

al., 2005; MOLICA et al., 2002; LAGOS, et al., 1999). Neste estudo, foi demonstrado que as linhagens *C. raciborskii* CENA303 e CENA306 apresentam os genes *sxt*, entretanto a produção da toxina não foi observada. Pode-se associar a não produção da toxina à deleções e inserções no agrupamento gênico *sxt*. As linhagens CENA303 e CENA306 estão há mais de três anos em condições de cultivo e as condições de laboratório ou as condições ambientais de onde as linhagens foram isoladas podem ter estimulado a composição da comunidade presente nas florações, ou ter um impacto direto sobre a expressão dos genes, ou ainda ter um efeito discriminante sobre os genótipos tóxicos e não tóxicos de cianobactérias dentro de uma floração (NEILAN et al., 2012).

Considerando os fatores ambientais, Gomes, Marinho e Azevedo (2007) analisaram cinquenta e três ecossistemas aquáticos brasileiros e observaram que há uma dominância de *C. raciborskii* em grande parte dos ecossistemas analisados, concluindo que determinados fatores ambientais como, alcalinidade, pH, temperatura, baixa intensidade luminosa e altos valores de condutividade, favoreciam a dominância da espécie no país. Estudos mostram que além de aumentar a dominância de *C. raciborskii*, esses fatores podem também influenciar na produção e concentração de STX produzida. Neste sentido, Kellmann e Neilan (2007) avaliaram o efeito da intensidade luminosa sobre a síntese de STX *¨in vitro¨* e observaram que a taxa de biossíntese de STX foi 12 vezes maior na condição de 10 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}, durante uma hora de exposição. Quando a reação foi mantida na ausência de luz, a biossíntese reduziu até 1,6 vezes após cinco horas. Os autores acreditam que alguns estágios da síntese de STX podem ser regulados por enzimas fotossensíveis, como a foto-frutoquinase e a sucrose-fosfato sintase. Estes autores também observaram que o uso de 1 mM de magnésio elevou em 11% a síntese de STX. Pomati et al. (2004) analisaram o efeito do cátion Na^+ (NaCl 10 mM) sobre a produção de STX por *C. raciborskii* T3 após exposição por seis dias. Os autores observaram que o aumento da concentração de STX era dependente do sal. Um estudo similar foi realizado por Carneiro (2009) que avaliou a produção de STX pela linhagem *C. raciborskii* T3 observando que a produção é favorecida pela intensidade luminosa de 100 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}, com o aumento da condutividade e salinidade da água e com a presença de cátions Ca^{2+}, Mg^{2+} e Na^{2+}. Portanto, estes dados mostram que a intensidade luminosa e a disponibilidade de cátions, características usualmente observadas em ambientes aquáticos brasileiros onde há florações, (COSTA et al., 2009; CHELLAPPA; BORBA; ROCHA, 2008; CHELLAPPA; COSTA, 2003; BOUVY et al., 2000) podem influenciar no aumento da síntese de STX.

Sabendo que as linhagens CENA303 e CENA306 foram isoladas de florações de um lago artificial do parque Theobaldo Dick, Lajeado, RS e um lago da Ulbra, Porto Alegre, RS, respectivamente, e apresentam alguns fragmentos de genes *sxt*, podemos considerar que o tempo de cultivo em laboratório pode, ao longo do tempo, causar deleções ou mutações no agrupamento gênico *sxt* já que apenas três genes foram analisados. Além disso, seria necessário avaliar e comparar as condições ambientais entre a represa Billings, de onde as linhagens tóxicas CENA302, CENA305, T3 e T2 foram isoladas, e os ambientes em que as linhagens não tóxicas CENA303 e CENA306 foram isoladas. Portanto, estudos mais detalhados do agrupamento gênico *sxt*, das florações e das condições ambientais se fazem necessários.

5.1.3 Genes *ana* e produção de ANTX-A, HANTX-A e ANTX-A(S)

Anatoxina-a e homoanatoxina-a são toxinas sintetizadas por algumas cianobactérias de água doce do gênero *Anabaena* (HARADA et al., 1989; FUREY et al., 2003) entre outros, Tabela 1. Neste estudo, diferentes linhagens do gênero *Dolichospermum* e uma linhagem do gênero *Sphaerospermopsis*, anteriormente inclusos no gênero *Anabaena*, foram analisadas quanto à presença de genes envolvidos na biossíntese de anatoxina-a e homoanatoxina-a, Tabela 11.

Resultados positivos de amplificação foram obtidos somente para linhagens da espécie *Dolichospermum crassum* CENA202, CENA205 e CENA301 e *S. torques-reginae* ITEP-024 conhecida como produtora de anatoxina-a(s). Um fragmento do gene *anaC*, responsável pela adenilação da prolina foi amplificado nas linhagens CENA202, CENA205, CENA301 e ITEP-024. Já um fragmento do gene *anaE*, que codifica uma PKS, foi amplificado nas linhagens CENA202, CENA205 e CENA301, e um fragmento do gene *anaF*, provavelmente envolvido na extensão e ciclização do tioéster (MÉJEAN et al., 2009), foi amplificado nas linhagens CENA301 e ITEP-024. Em todas as reações foram amplificados fragmentos de tamanho esperado, entretanto observou-se a ocorrência de bandas inespecíficas. Testes envolvendo gradientes de temperatura e mudanças nas concentrações dos reagentes foram realizados com o objetivo de obter bandas únicas, porém resultados satisfatórios não foram alcançados. O fragmento do gene *anaG*, relacionado com as reações de condensação e

metilação do tioéster bicíclico (MÉJEAN et al., 2009) não foi amplificado em nenhuma das linhagens analisadas, Tabela 11.

Os resultados das análises por LC-MS das linhagens CENA205, CENA301 e ITEP-024 demostraram que elas não são produtoras de ANTX-A e HANTX-A. Esses dados já eram esperados e corroboram os resultados negativos de amplificação por PCR do gene *anaG*.

Os genes envolvidos na biossíntese de anatoxin-a(s) não puderam ser acessados por PCR, pois o agrupamento gênico dessa toxina ainda não foi descrito e, portanto, não há sequências gênicas disponíveis para o desenho de oligonucleotídeos. Análises de LC-MS foram realizadas para confirmar a produção de ANTX-A(S) pela linhagem *S. torques-reginae* ITEP-024, Figura 26. A linhagem *S. torques-reginae* ITEP-024 foi isolada do reservatório Tapacurá, PE, juntamente com duas outras linhagens da mesma espécie ITEP-025 e ITEP-026. Essas três linhagens são as únicas linhagens brasileiras conhecidas como produtoras de ANTX-A(S) (MOLICA et al., 2005). Este número reduzido de estudos envolvendo essa molécula se deve ao fato de ANTX-A(S) ser pouco estável (MATSUNAGA et al., 1989), pela falta de padrões analíticos comerciais disponíveis (DÖRR et al., 2010), e por seu agrupamento gênico não ter sido descrito, fatores que dificultam o desenvolvimento de métodos específicos para determinação e identificação dessa cianotoxina.

O pico correspondente a ANTX-A(S) com tempo de retenção de 11,8 min utilizando a coluna cromatográfica ZIC-HILIC é mostrado na Figura 26A. Uma vez identificado o íon *m/z* 253, que corresponde à molécula de ANTX-A(S) protonada $[M+H]^+$, foram avaliados os íons representativos do espectro MS^2 correspondente às transições *m/z* 253 >159, *m/z* 253 >141, *m/z* 253 >98 e *m/z* 253 >58, Figura 26B. Estudos anteriores haviam mencionado somente o íon *m/z* 159 como produto de degradação de ANTX-A(S) após a perda do grupamento fosfato (MATSUNAGA et al., 1989). Devido à natureza intensa, estável e característica do íon *m/z* 58, a transição (253>58) pode ser considerada como uma transição de quantificação. As outras transições presentes no espectro da ANTX-A(S) são menos intensas, mas ainda características, sendo considerados os íons presentes nessas transições como bons íons de qualificação. Apesar das transições serem originadas de produtos de íons estáveis dos espectros de MS^2 de ANTX-A(S), a intensidade relativa destes fragmentos pode variar de acordo com as definições utilizadas no espectrômetro de massas. Sendo assim, em experimentos de identificação da ANTX-A(S) por LC-MS/MS é fortemente recomendado o monitoramente de quatro transições (DÖRR et al., 2010).

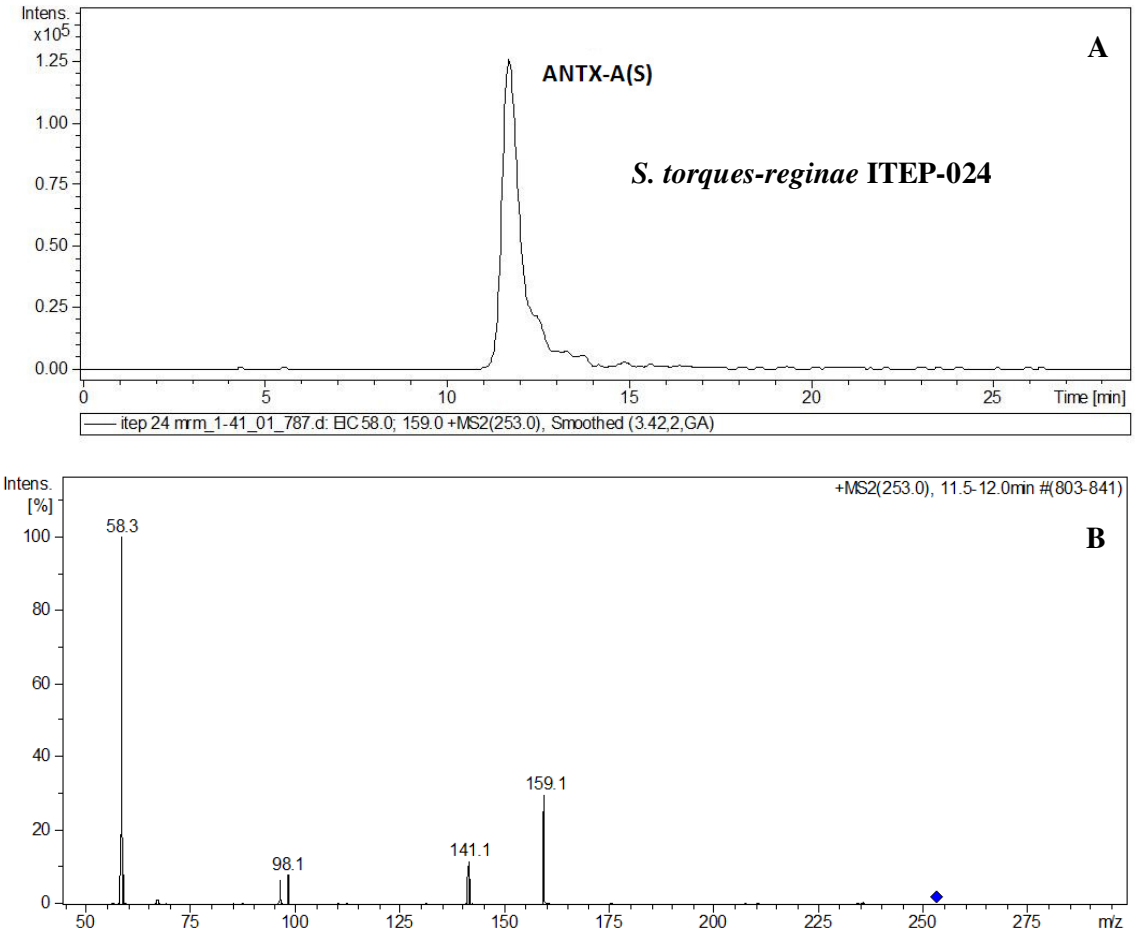


Figura 26 - Cromatograma mostrando o pico de ANTX-A(S) produzida pela linhagem *S. torques-reginae* ITEP-024 no tempo de retenção de 11,8 min (A); Espectro ESI-MS/MS de ANTX-A(S) (B)

Os resultados apresentados neste estudo corroboram os dados mostrados na literatura que dentre o grupo das anatoxinas, somente anatoxina-a(s) foi encontrada em isolados cianobacterianos brasileiros de *S. torques-reginae*, sendo descritas para os estados de Pernambuco e Rio Grande do Sul (MOLICA et al., 2005; BECKER et al., 2010). Há relatos de linhagens brasileiras das espécies *A. circinalis* (*Dolichospermum circinale*) e *A. crassa* (*Dolichospermum crassum*) como produtoras de ANTX-A(S) e *A. verrucosa* como produtora de ANTX-A, no entanto, esses dados não estão publicados e foram citados por Sant'Anna et al. (2008).

5.1.4 Análise molecular e produção de peptídeos cíclicos

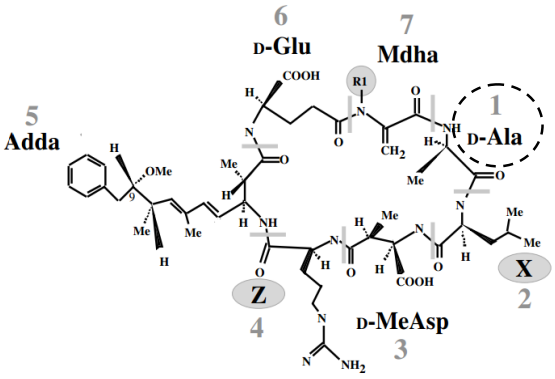
5.1.4.1 Genes *mcy* e produção de MCY

A hepatotoxina microcistina é comumente produzida por cianobactérias de água doce dos gêneros *Microcystis*, *Planktothrix* e *Anabaena* (WELKER; VON DÖHREN, 2006). Na busca de genes *mcy* em linhagens cianobacterianas potencialmente produtoras de MCY, isolados de diferentes espécies foram selecionados. Resultados positivos de amplificação por PCR de um fragmento do gene *mcyD* foram obtidos para as linhagens *D. crassum* CENA196 e CENA301, *D. planctonicum* CENA210, *C. fallax* CENA208 e *S. aphanizomenoides* CENA188. Para o gene *mcyE*, resultados positivos foram encontrados para as linhagens *D. crassum* CENA196, CENA199, CENA205 e CENA301, *D. planctonicum* CENA209 e CENA210, *C. fallax* CENA208 e *S. aphanizomenoides* CENA188. Ambos os genes *mcyD* e *mcyE* codificam para o β-aminoácido Adda envolvido com a toxicidade da microcistina (DITTMANN; BORNER, 2005). Nenhum produto gênico foi amplificado quando os oligonucleotídeos que codificam para um fragmento do gene *mcyG* foram utilizados. Este trabalho é o primeiro relato da amplificação de fragmentos de genes *mcy* por representantes das espécies *Anabaena crassa* (*D. crassum*), *Anabaena planctônica* (*D. planctonicum*), *Cuspidothrix fallax* e *S. aphanizomenoides*. Genes *mcyB*, *C*, *D* e *E* já foram encontrados em algumas espécies do gênero *Anabaena*, sendo elas *Anabaena* sp. (SIVONEN et al., 1992, ROUHIANEN et al., 2004) e *Anabaena flos-aquae* (*D. flos-aquae*) (HARADA et al., 1990), o gene *mcyG* não foi encontrado nestas linhagens. A presença de fragmentos de genes *mcy*, nos isolados de *Microcystis* estudados neste trabalho foram previamente analisados por Rigonato et al. (2012)[1].

Os extratos das linhagens *D. crassum* CENA205 e CENA301, *D. planctonicum* CENA210, *Cuspidothrix fallax* CENA208 e *S. aphanizomenoides* CENA188 que amplificaram fragmentos de genes *mcy* foram analisados por LC-MS, mas não apresentaram a produção de MCY. Análises químicas por LC-MS das culturas liofilizadas de *M. wesenbergii* SPC761 isolada do Reservatório Taiaçupeba, SP, *M. protocystis* SPC697, isolada do Reservatório Guarapiranga, São Paulo, SP e *M. panniformis* SPC702, isolada do Lago das

[1] RIGONATO, J. Lab. Biologia Celular e Molecular – CENA/USP. Dados não publicados, 2012.

Garças, São Paulo, SP, foram realizadas. Quatro novas variantes estruturais de MCY foram encontradas nas linhagens *M. protocystis* SPC697 e *M. panniformis* SPC702 e pela primeira vez descritas em linhagens destas espécies. As variantes encontradas apresentam substituições no aminoácido da posição 1 da molécula de MCY (Figura 27). Diehnelt et al. (2006) observaram que o aminoácido D-Ala encontrado na posição 1 da molécula de microcistina é extremamente conservado e está presente em 66 das 67 variantes de MCY reportadas. A linhagem *M. wesenbergii* SPC761 não apresentou a produção de MCY.

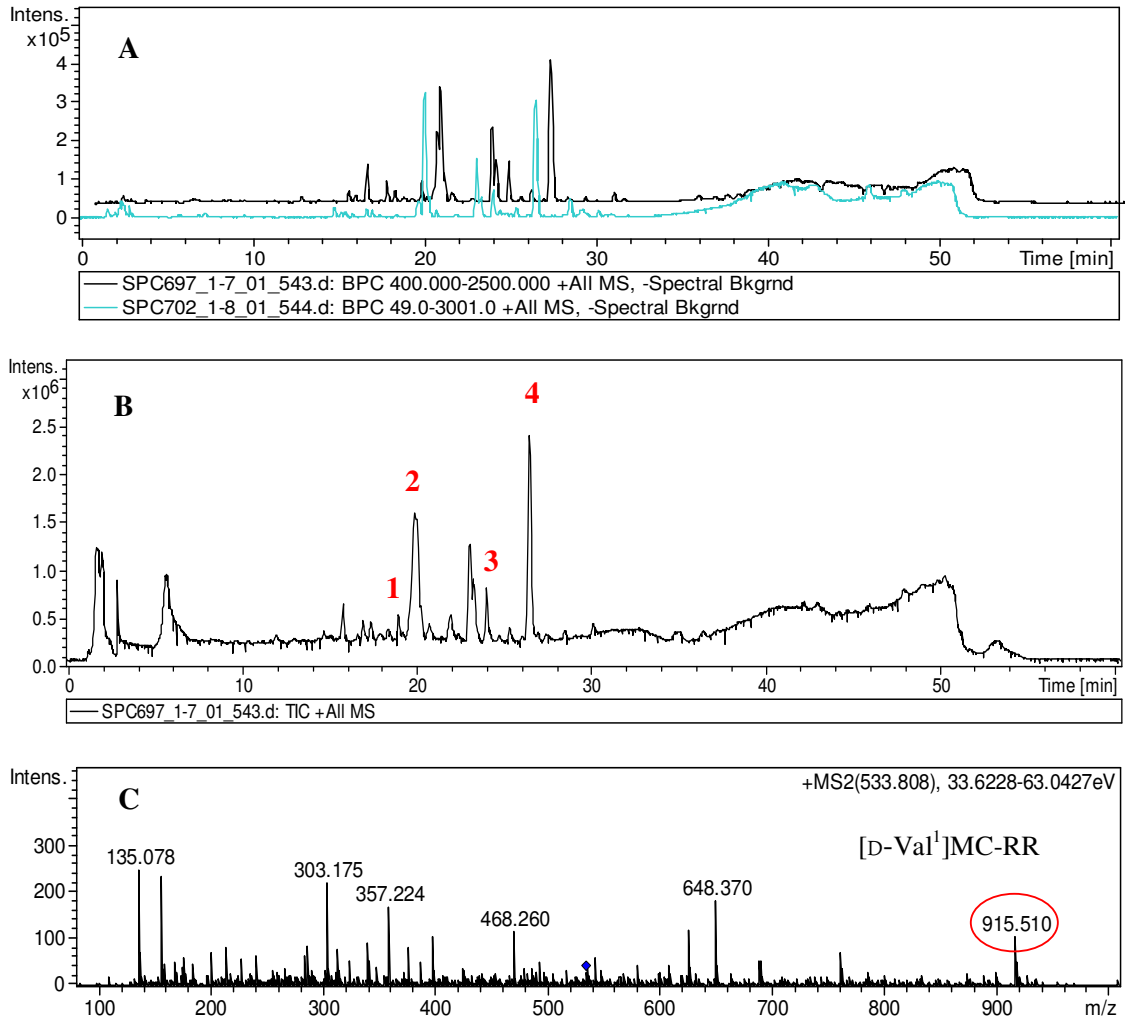


Microcistina	X	Z	Posição 1
[D-Val[1]]MC-RR	L-Arg	L-Arg	D-Val
[D-Leu/Ile[1]]MC-RR	L-Arg	L-Arg	D-Leu/Ile
[D-Leu/Ile[1]]MC-YR	L-Tyr	L-Arg	D-Leu/Ile
[D-Phe[1]]MC-LR	L-Leu	L-Arg	D-Phe

Figura 27 - Variantes estruturais de MCY produzidas pelas linhagens *M. protocystis* SPC697 e *M. panniformis* SPC702. O círculo pontilhado destaca o aminoácido D-Ala na posição 1 da molécula de MCY que foi substituído pelos aminoácidos descritos na Tabela. X e Z representam L-aminoácidos variáveis

O perfil cromatográfico de produção de MCY das linhagens *M. protocystis* SPC697 e *M. panniformis* SPC702 foi idêntico, Figura 28A. Diferentes picos, com tempos de retenção de 19,5 min (1), 20 min (2), 24 min (3) e 26,6 min (4) foram isolados, Figura 28B. Os espectros de MS^2 mostram as variantes de MCY produzidas, [D-Val[1]]MC-RR (*m/z* 915,5), [D-Leu/Ile[1]]MC-RR (*m/z* 929,5), [D-Leu/Ile[1]]MC-YR (*m/z* 1087,5) e [D-Phe[1]]MC-LR (*m/z* 1071). A fragmentação do íon precursor da MC-RR (*m/z* 1038) gera o íon *m/z* 887,5 que, com a substituição de D-Ala por D-Val (28 Da), forma o íon *m/z* 915,5, Figura 28C, assim como a substituição por um D-Leu/Ile (42 Da) forma o íon *m/z* 929,5, Figura 28D. Já o íon precursor da variante MC-YR tem *m/z* 1045, com a substituição de D-Ala por D-Leu/Ile (42 Da), forma o íon *m/z* 1087,5 mostrado na Figura 28E. O íon precursor da variante MC-LR tem *m/z* 995,7, com a substituição de D-Ala por D-Pro (27 Da), forma o íon *m/z* 1071, Figura 28F. Em todos os espectros MS^2 é possível identificar ainda o íon *m/z* 135 que

corresponde ao aminoácido Adda (ácido 3-amino-9-metoxin-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6-decadienóico) que confere toxicidade à molécula de MCY (NAMIKOSHI et al., 1992). Até o momento, apenas duas variantes de MCY, que apresentam o mesmo tipo de substituição no aminoácido D-Ala foram descritas, sendo elas [D-Leu^1]MC-LR isolada de *M. aeruginosa* (PARK et al., 2001) e [D-Ser^1-ADMAdda^5]MC-LR isolada de *Nostoc* sp. (OKSANEM et al., 2004). Ambas as variantes apresentaram toxicidade em bioensaios. A produção de microcistina por ensaio imunoenzimático ELISA pela linhagem *M. protocystis* SPC697 foi confirmada previamente em nosso laboratório (SILVA-STENICO et al., 2011). Análises de RMN são necessárias para elucidar a estrutura das variantes de MCY encontradas, porém, estes dados mostram que as linhagens de *Microcystis* representam um risco potencial à qualidade da água e à saúde humana, pois foram isoladas de um reservatório de abastecimento e um lago utilizado para recreação.



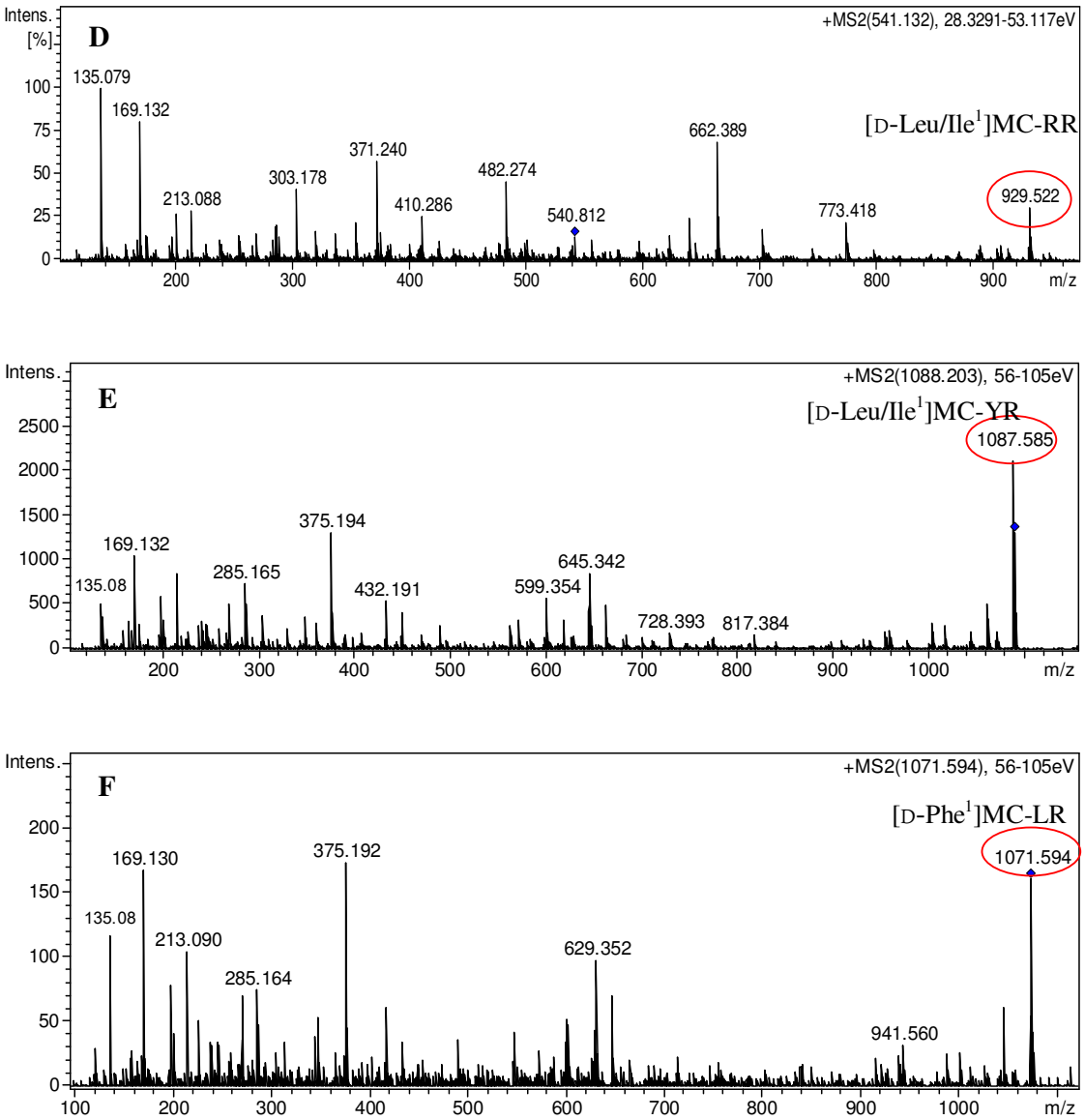


Figura 28 - Espectros LC-MS/MS de MCY. A) Perfil cromatográfico das linhagens SPC697 (em preto) e SPC702 (em verde); B) Perfil cromatográfico da linhagem SPC697 (os números indicam os picos selecionados e fragmentados); C - F) Espectros MS^2 dos picos selecionados

As análises de LC-MS/MS identificaram algumas linhagens do gênero *Microcystis* como produtoras de MCY, e apesar da amplificação de fragmentos gênicos *mcy* nas linhagens dos gêneros *Dolichospermum*, *Cuspidothrix* e *Sphaerospermopsis*, a produção da toxina não foi detectada. Linhagens de *D. flos-aquae*, *D. circinalis* e *Anabaena* sp. já foram relatadas como produtoras de MCY em vários países como Canadá, Dinamarca, Egito, Finlândia,

França e Noruega (VEZIE et al., 1998; YANNI; CARMICHAEL, 1997; HENRIKSEN et al., 1997; HARADA et al., 1991; SIVONEN et al., 1992; KRISHNAMURTHY et al., 1989).

Alguns autores sugerem que a elevada produção de MCYs em cianobactérias está correlacionada com concentrações elevadas de nitrogênio e fósforo (SIVONEN, 1990; VEZIE et al., 2002) e com baixas concentrações de ferro (LUKAC; AEGERTER, 1993; SEVILLA et al., 2008; ALEXOVA et al., 2011a) na água. A descrição do agrupamento gênico *mcy* por Tillett e colaboradores (2000) permitiu examinar a regulação de microcistinas a nível molecular pela primeira vez, demonstrando que a transcrição dos genes *mcy* em *M. aeruginosa* ocorre via um promotor central bi-direcional entre *mcyA* e *mcyD*, que contém proteínas de ligação ao DNA conhecidas como Fur (proteína reguladora de absorção de ferro) e NtcA (proteína reguladora de nitrogênio global). Estas descobertas sugerem que tanto o ferro quanto o nitrogênio desempenham papel no controle da produção de microcistina (GINN et al., 2010), pois há evidências de que esses fatores influenciam florações de cianobactérias ao nível de comunidade, através de mudanças nos índices de genótipos que diferem quanto à sua aptidão para a produção de microcistina (NEILAN et al., 2012). Estudos proteômicos de linhagens de *Microcystis* também mostram um grande número de proteínas que são diferencialmente expressas, em linhagens tóxicas e não tóxicas em determinadas condições ambientais, sugerindo que a produção de microcistina tem um papel de proteína moduladora dentro da célula produtora (ZILLIGES et al., 2011; ALEXOVA et al., 2011b). Sendo assim, são crescentes as evidências de que as substâncias bioativas produzidas pelas cianobactérias desempenham um papel importante na composição de uma comunidade através da comunicação inter e intra-espécies (KAPLAN et al., 2012).

Deste modo, apesar da produção de MCY não ter sido identificada nos isolados brasileiros dos gêneros *Dolichospermum*, *Cuspidothrix Sphaerospermopsis*, o fato de fragmentos gênicos envolvidos na biossíntese da toxina serem amplificados, pode ajudar a entender o papel e a importância dos metabólitos secundários produzidos por estes organismos no contexto de comunidade.

5.1.4.2 Genes *mdn* e produção de MDN

Microviridinas (MDN) são depsipeptídeos tricíclicos produzidos pelos gêneros *Microcystis*, *Planktothrix* e *Nostoc* (ZIEMERT et al., 2010). Neste trabalho as linhagens do

gênero *Microcystis* foram usadas na identificação de genes *mdn* e produção de MDN. Fragmentos dos genes *mdnA*, *mdnB* e *mdnC* foram amplificados nas linhagens de *M. aeruginosa* NPJB-1, NPCD-1, SPC777 e NPLJ-4, *M. protocystis* SPC697 e *M. panniformis* SPC702. As linhagens *M. wesenbergii* SPC761 e *Microcystis* sp. SPC822 amplificaram fragmentos dos genes *mdnB* e *mndC*. Nas linhagens *M. novacekii* SPC503, *Microcystis* sp. NPLS-1 e SPC804 os genes *mdn* não foram amplificados, Tabela 11.

A árvore filogenética das sequências de aminoácidos MdnA, Figura 29, mostra que as linhagens de *M. aeruginosa* estudadas formaram um clado com valor de reamostragem de 97%, com linhagens da mesma espécie que foram isoladas de outros países e conhecidas como produtoras de MDN, com exceção da linhagem australiana da espécie *M. aeruginosa* MRC que formou um clado separado com 63% de valor de reamostragem. Além disso, as linhagens brasileiras formaram um clado interno com valor de reamostragem de 69%. Já a linhagem *M. protocystis* SPC697 formou um clado separado das demais linhagens. As sequências de aminoácidos MdnB de *M. aeruginosa* formaram um clado interno (71% de valor de reamostragem), com exceção da linhagem *M. aeruginosa* NPJB-1 que ficou mais próxima do grupo formado por linhagens de outras espécies. As sequências MdnC de todas as linhagens de *M. aeruginosa* ficaram agrupadas em um único clado com valor de reamostragem de 83%, juntamente com *Microcystis* sp. SPC822. As linhagens *M. protocystis* SPC697 e *M. panniformis* formaram um clado separado. As sequências MdnA, MdnB e MdnC de *P. agardhii* NIVA-CYA126/8 ficaram em clados separados e distantemente relacionados das sequências de *Microcystis*.

Os resultados apresentados nas árvores filogenéticas podem ser explicados pelo tamanho e composição dos nucleotídeos dos genes *mdn* que, variam consideravelmente de espécie para espécie. Por exemplo, o gene *mdnA* de *P. agardhii* NIVA-CYA126/8 apresenta cerca de 1794 pb, sendo muito maior que o gene homólogo das linhagens *M. aeruginosa* NIES-298, NIES-843 e MRC que, apresentam cerca de 150 pb. Por outro lado, o gene *mdnB* de *P. agardhii* NIVA-CYA126/8 é menor (540 pb) que o gene *mdnB* das linhagens de *Microcystis* que, variam de 1012 a 978 pb. Já o gene *mdnC* de todas as linhagens apresentam o mesmo número de pares de bases (975 pb), no entanto, a sequência de nucleotídeos é muito diferente (PHILMUS et al., 2008; ZIEMERT et al., 2008b; KANEKO et al., 2007) gerando sequências de aminoácidos diferentes.

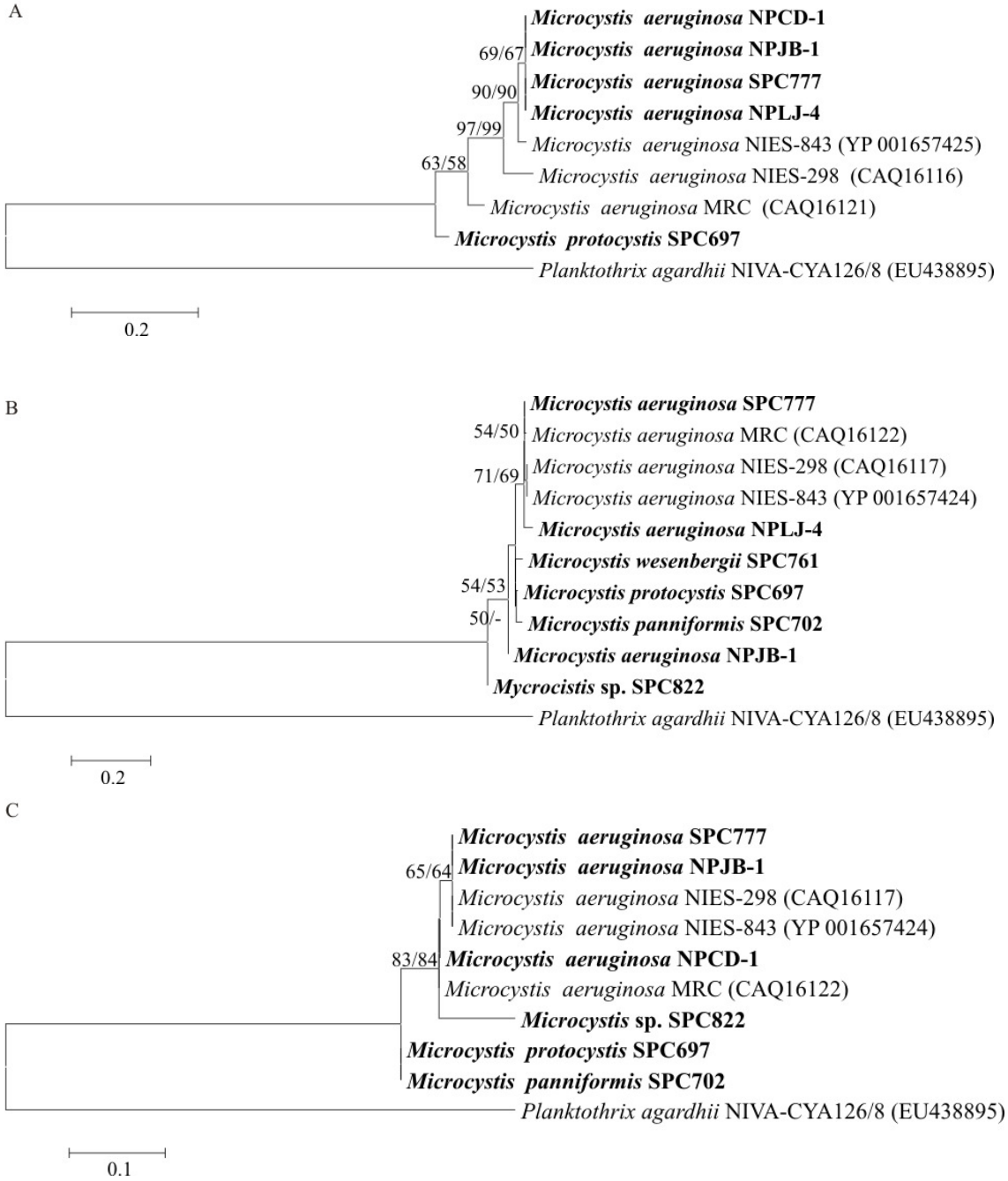


Figura 29 - Árvore filogenética de sequências de aminoácidos Mdn. MdnA (A), MdnB (B) e MdnC (C). As linhagens utilizadas neste estudo estão em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% nas análises de ML/NJ estão apresentados em cada nó

A identidade das sequências Mdn das linhagens estudadas foi analisada com a ferramenta BLASTP, Figura 30, e mostram que as diferentes espécies do gênero *Microcystis* apresentaram alta identidade nas sequências MdnA, MdnB e MdnC, sendo mais elevada entre

linhagens da mesma espécie, mesmo quando as linhagens foram isoladas de países diferentes. Portanto, podemos supor que as sequências Mdn são mais conservadas entre linhagens da mesma espécie ocorrendo então uma tansferência vertical dos genes *mdn*. Os baixos valores de identidade das sequências Mdn da linhagem *P. agardhii* NIVA-CYA126/8 com as demais linhagens se devem à baixa cobertura das análises de BLASTP.

A

Linhagem	Origem	MdnA (aa)	1	2	3	4	5	6	7	8
1. *M. aeruginosa* NIES-298	Japão	50	-							
2. *M. aeruginosa* NIES-843	Japão	50	92,0	-						
3. *M. aeruginosa* MRC	Austrália	49	84,0	82,0	-					
4. *Planktothrix agardhii* NIVA-CYA126/8	Finlândia	597	44,4	40,0	44,4	-				
5. *M. aeruginosa* NPCD-1	Brasil, RJ	50	90,0	96,0	82,0	40,0	-			
6. *M. aeruginosa* NPJB-1	Brasil, SP	50	90,0	96,0	82,0	40,0	100	-		
7. *M. aeruginosa* SPC777	Brasil, SP	50	90,0	96,0	82,0	40,0	100	100	-	
8. *M. aeruginosa* NPLJ-4	Brasil, RJ	50	90,0	96,0	82,0	40,0	100	100	100	-
9. *M. protocystis* SPC697	Brasil,SP	49	82,0	80,0	89,8	44,4	82,0	82,0	82,0	82,0

B

Linhagem	Origem	MdnB (aa)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. *M. aeruginosa* NIES-298	Japão	324	-									
2. *M. aeruginosa* NIES-843	Japão	337	99,0	-								
3. *M. aeruginosa* MRC	Austrália	326	97,8	97,5	-							
4. *Planktothrix agardhii* NIVA-CYA126/8	Finlândia	179	68,5	28,5	32,0	-						
5. *M. aeruginosa* NPJB-1	Brasil, SP	214	96,2	96,2	95,8	28,5	-					
6. *M. aeruginosa* SPC777	Brasil, SP	214	97,6	97,6	98,1	50,0	95,3	-				
7. *M. aeruginosa* NPLJ-4	Brasil, RJ	214	97,2	97,2	96,7	30,0	96,2	95,8	-			
8. *M. protocystis* SPC697	Brasil, SP	214	96,7	96,7	97,2	28,5	96,7	96,2	97,6	-		
9. *M. panniformis* SPC702	Brasil, SP	214	95,8	95,8	96,2	100	96,7	95,3	96,2	98,6	-	
10.*Mycrocistis* sp. SPC822	Brasil, SP	214	95,8	95,8	96,2	28,5	98,6	95,8	95,8	97,2	97,2	-
11.*M. wesenbergii* SPC761	Brasil, SP	214	96,2	96,2	96,7	44,4	96,2	95,8	96,2	97,6	96,7	96,7

C

Linhagem	Origem	MdnC (aa)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. *M. aeruginosa* NIES-298	Japão	324	-								
2. *M. aeruginosa* NIES-843	Japão	324	98,7	-							
3. *M. aeruginosa* MRC	Austrália	324	98,4	98,4	-						
4. *Planktothrix agardhii* NIVA-CYA126/8	Finlândia	324	78,2	79,5	36,0	-					
5. *M. aeruginosa* NPJB-1	Brasil, SP	102	100	100	98,9	38,5	-				
6. *M. aeruginosa* SPC777	Brasil, SP	102	100	100	98,9	38,5	100	-			
7. *M. aeruginosa* NPCD-1	Brasil, RJ	102	98,9	98,9	100	39,6	99,0	99,0	-		
8. *M. protocystis* SPC697	Brasil, SP	103	97,1	97,1	98,0	41,7	96,8	96,8	98,0	-	
9. *M. panniformis* SPC702	Brasil, SP	103	97,1	97,1	98,0	41,7	96,8	96,8	98,0	100	-
10.*Mycrocistis* sp. SPC822	Brasil, SP	103	94,8	94,8	95,8	38,9	94,4	94,4	95,5	93,7	93,7

Figura 30 - Percentual de similaridade das sequências de aminoácidos Mdn das linhagens estudadas com sequências de linhagens produtoras de MDN. (A) MdnA; (B) MdnB; (C) MdnC

Ziemert et al. (2010) realizaram uma busca de linhagens de *Microcystis* que apresentavam os genes envolvidos na biossíntese de MDN e detectaram 15 novas variantes do gene precursor *mdnA* que diferem em até 4 posições de aminoácidos das isoformas conhecidas do peptídeo. Para verificar se existem essas diferentes isoformas do peptídeo precursor nas sequências MdnA obtidas neste estudo, foi realizada uma análise comparativa das mesmas com as descritas na literatura, Figura 31. De uma forma geral os 17 aminoácidos da porção C-terminal da sequência MdaA apresentam diferenças que podem variar dentro da mesma espécie ou entre espécies diferentes e que conferem as diferentes isoformas encontradas do peptídeo precursor (ZIEMERT et al., 2010). A linhagem holandesa *M. aeruginosa* MRC e a linhagem brasileira *M. protocystis* SPC697 apresentaram sequências de aminoácidos com o maior número de variações, 8 e 9 respectivamente, e ainda um aminoácido a menos na sua sequência MdnA. A posição 6, dentro da região de aminoácidos variáveis da sequência MdaA, foi a que apresentou a maior diversidade de aminoácidos (glicina, treonina, serina e valina), seguida da posição 17 com três aminoácidos diferentes (tirosina, triptofano e fenilalanina). Podemos observar ainda que as linhagens brasileiras de *M. aeruginosa* apresentam, entre elas, a mesma sequência de aminoácidos e uma semelhança maior com a linhagem japonesa *M. aeruginosa* NIES-843. A sequência de aminoácidos da linhagem *M. protocystis* SPC697 é mais próxima da linhagem australiana *M. aeruginosa* MRC. Esses resultados confirmam as análises filogenéticas e com a ferramenta Blasp das sequências MdnA, concluindo que as diferenças de filogenia e identidade apresentadas se devem a porção C-terminal variável da sequência de aminoácidos.

Linhagem/ n° de pb	Sequência MdnA																	
M. aeruginosa NIES-843/50	MAYPNDQQGKALPFFARFLSVSKEESSIKSPSP	E	P	T	Y	G	G	T	F	K	Y	P	S	D	W	E	D	Y
M. aeruginosa NIES-298/50	MAYPNDQQGKALPFFARFLSVSKEESSIKSPSP	E	P	T	F	G	T	T	L	K	Y	P	S	D	W	E	E	Y
M. aeruginosa MRC/49	MAYPNDQQGKALPFFARFLSVSKEESSIKSPSP	D	H	E	I	S	T	R	K	Y	P	S	D	W	E	E	W	
***M. aeruginosa* SPC777/50**	MAYPNDQQGKALPFFARFLSVSKEESSIKSPSP	E	P	T	Y	G	V	T	F	K	Y	P	S	D	W	E	D	F
***M. aeruginosa* NPCD-1/50**	MAYPNDQQGKALPFFARFLSVSKEESSIKSPSP	E	P	T	Y	G	V	T	F	K	Y	P	S	D	W	E	D	F
***M. aeruginosa* NPJB-1/50**	MAYPNDQQGKALPFFARFLSVSKEESSIKSPSP	E	P	T	Y	G	V	T	F	K	Y	P	S	D	W	E	D	F
***M. aeruginosa* NPLJ-4/50**	MAYPNDQQGKALPFFARFLSVSKEESSIKSPSP	E	P	T	Y	G	V	T	F	K	Y	P	S	D	W	E	D	F
***M. protocystis* SPC697/49**	MAYPNDQQGKALPFFARFLSVSKEESSIKSPSP	E	H	E	T	S	T	R	K	F	P	S	D	W	E	E	F	

Figura 31 - Diversidade das sequências de aminoácidos do precursor MdnA em *Microcystis*. Negrito: linhagens estudadas. Cinza: sequência de aminoácidos comum para todas as linhagens; Vermelho: aminoácidos que apresentam a mesma posição dentro da sequência e; Amarelo: aminoácidos diferentes dentro da sequência.

As diferenças na sequência de aminoácidos MdnA influenciam nas variantes de microviridina produzidas. Estas, por sua vez, apresentam diferentes capacidades inibitórias das enzimas tripsina, quimiotripsina e elastase (ZIEMERT et al., 2010; ROHRLACK et al., 2003; MURAKAMI et al., 1997; OKINO et al., 1995; ISHITSUKA et al., 1990). Se for considerada a sequência de aminoácidos MdnA TFKYPSDWEDY da linhagem *M. aeruginosa* NIES-843 (Figura 31), onde os aminoácidos sublinhados F (X1), W (X2), D (X3) e Y (X4) podem ser substituídos, diferentes isoformas de microviridina podem ser produzidas, Tabela 12. Fazendo as substituições de acordo com as sequências MdnA obtidas neste estudo, conclui-se que todas as linhagens brasileiras têm o potencial de produzir isoformas de MDN ainda não descritas na literatura.

Tabela 12 - Sequências de aminoácidos MdnA de diferentes microviridinas

Linhagem	Sequência de aminoácidos											Variante MDN	Referência
	T	X1	K	Y	P	S	D	X2	E	X3	X4		
NIES-843		F						W		D	Y	L	Zimert et al, 20120
NIES-298		L						W		E	Y	A,B,G,H	Ishitsuka et al., 1990; Okino et al., 1995; Murakami et al., 1997
MRC		R						W		E	W	J	Rohrlack et al., 2003
SPC777		F						W		D	F	nd	Este estudo
NPCD-1		F						W		D	F	nd	Este estudo
NPJB-1		F						W		D	F	nd	Este estudo
NPLJ-4		F						W		D	F	nd	Este estudo
SPC697		R		F				W		E	F	nd	Este estudo

nd – isoforma MDN não determinada

Análises preliminares da produção de MDN por LC-MS foram realizadas com os extratos de *M. aeruginosa* NPCD-1 e SPC777, *M. protocystis* SCP697, *M. panniformis* SPC702 e *M. wesenbergii* SPC761, mas nenhum resultado positivo foi obtido. Nestas linhagens foi possível amplificar por PCR fragmentos dos três genes *mdnA*, *mdnB* e *mdnC*, com exceção da linhagem *M. wesenbergii* SPC761 que mostrou amplificação dos genes *mdnB* e *mdnC* mas não do gene *mdnA*. Análises adicionais por LC-MS são necessárias, além de análises por RMN com o objetivo de elucidar a estrutura das novas variantes MDN propostas. Estudos visando a expressão, o isolamento e bioensaios com as variantes MDN seriam de grande interesse biotecnológico, pois estas substâncias bioativas apresentam um alto potencial terapêutico, agindo como um inibidor de elastase no tratamento de enfisema pulmonar (MURAKAMI et al., 1997; OKINO et al., 1995).

5.1.4.3 Genes *mca*

Microciclamida é um hexapeptídeo cíclico que apresenta citotoxicidade moderada em células leucêmicas P388 de ratos, e o agrupamento gênico *mca* foi descrito apenas para linhagens da espécie *M. aeruginosa* (ZIEMERT et al., 2008a). Neste estudo, as linhagens do gênero *Microcystis* foram avaliadas para a presença de fragmentos dos genes *mca*. Resultados positivos de amplificação de fragmentos dos genes *mcaA*, *mcaD* e *mcaF* foram obtidos com o DNA das linhagens *M. aeruginosa* NPJB-1, NPCD-1, SPC777 e NPLJ-4. As linhagens *M. panniformis* SPC702 e *Microcystis* sp. SPC804 amplificaram fragmentos dos genes *mcaA* e *mcaD*. No entanto, fragmentos dos genes *mdn* não foram encontrados nos genomas das linhagens *M. novacekii* SPC503, *M. protocystis* SPC697, *M. wesenbergii* SPC761 e *Microcystis* sp. NPLS-1, Tabela 11.

Produtos de PCR foram clonados, sequenciados e as sequências de aminoácidos geradas foram usadas para construção das árvores filogenéticas, Figura 32. As sequências McaA das linhagens brasileiras *M. aeruginosa* NPLJ-4 e NPCD-1 ficaram agrupadas em um clado com 100% de valor de reamostragem. Essas linhagens foram isoladas de ambientes distintos da cidade do Rio de Janeiro, RJ, sendo NPLJ-4 isolada da Lagoa de Jacarepaguá e NPCD-1 da estação de tratamento de esgoto do bairro Cidade de Deus. Já a linhagem *M. aeruginosa* SPC777, isolada da represa Billings, São Paulo, SP, ficou agrupada com a linhagem holandesa da mesma espécie, PCC7806, com valor de reamostragem de 66%. A linhagem

japonesa *M. aeruginosa* NIES-298 formou um clado isolado das demais linhagens. Já as sequências McaD das linhagens *M. aeruginosa* NIES-298 e PCC7806 ficaram agrupadas em um mesmo clado com 100% de valor de reamostragem, indicando a elevada semelhança entre essas duas sequências. As sequências McaD das linhagens brasileiras *M. aeruginosa* NPLJ-4 e NPCD-1 seguiram o mesmo perfil que a sequência McaA, pois ficaram agrupadas em um mesmo clado, isoladas das demais linhagens. Não foi possível obter a sequência McaD de *M. aeruginosa* SPC777 apesar das tentativas realizadas.

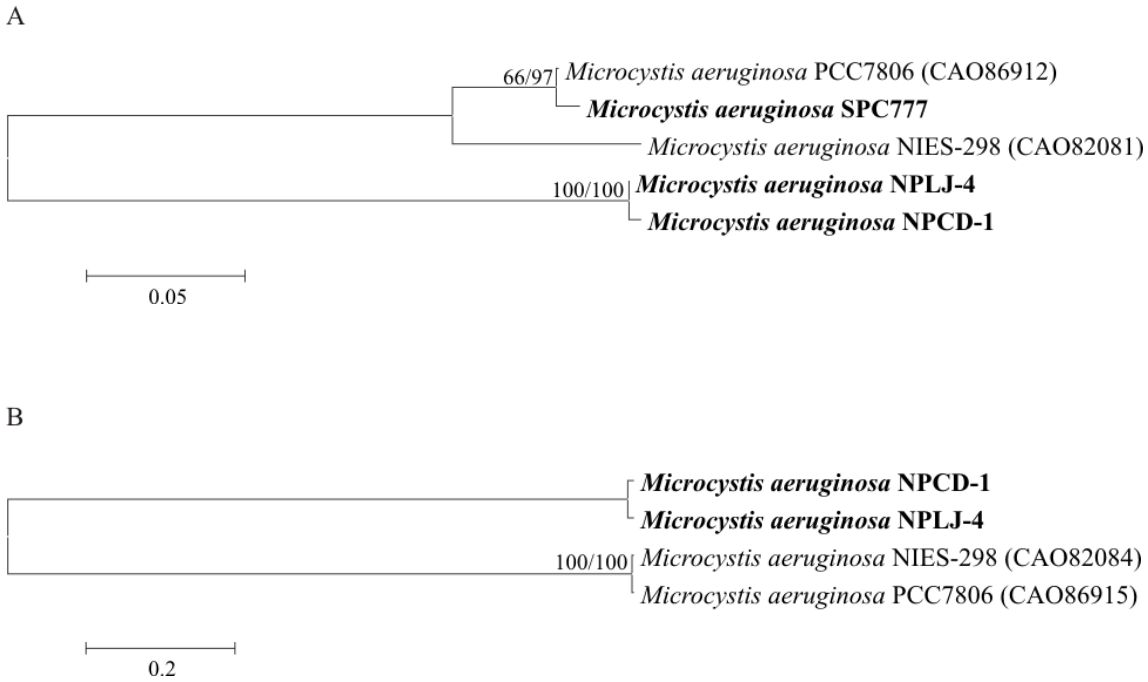


Figura 32 - Árvore filogenética de sequências de aminoácidos Mca. McaA (A) e McaD (B) As linhagens utilizadas neste estudo estão em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% nas análises de ML/NJ estão apresentados em cada nó

A ferramenta BLASTP foi usada para verificar o percentual de similaridade entre as sequências de aminoácidos McaA e McaD das linhagens brasileiras de *M. aeruginosa* com aquelas já descritas na literatura, Figura 33. As sequências McaA das linhagens japonesa NIES-298 e holandesa PCC7806, apresentaram uma maior identidade com SPC777 em relação às linhagens NPCD-1 e NPLJ-4. O percentual de similaridade McaA entre as linhagens brasileiras NPCD-1 e NPLJ-4 foi elevado e menor quando comparadas com a linhagem SPC777. Sendo assim, é notável que a sequência McaA da linhagem brasileira SPC777 é mais próxima, evolutivamente, das linhagens japonesa e holandesa. Já o percentual

de similaridade das sequências McaD das linhagens NIES-298 e PCC7806 com as linhagens NPCD-1 e NPLJ-4 foi baixa, isso pode ser explicado pela baixa cobertura. É possível que uma região pouco conservada da sequência McaD tenha sido acessada com os oligonucleotídeos desenhados neste trabalho. O percentual de similaridade da sequência McaD entre as linhagens NPCD-1 e NPLJ-4 foi elevado, demostrando que a região da sequência McaD acessada, parece ser conservada entre essas linhagens brasileiras de *M. aeruginosa*.

A

Linhagem	Origem	McaA (aa)	1	2	3	4
1. *M. aeruginosa* NIES-298	Japan	658	-			
2. *Microcystis aeruginosa* PCC7806	Holanda	658	94,0	-		
3. M. aeruginosa NPCD-1	Brasil, RJ	268	67,1	68,3	-	
4. *M. aeruginosa* SPC777	Brasil, SP	268	90,5	99,2	69,1	-
5. *M. aeruginosa* NPLJ-4	Brasil, RJ	275	62,7	64,0	99,2	69,1

B

Linhagem	Origem	McaD (aa)	1	2	3
1. *M. aeruginosa* NIES-298	Japan	777	-		
2. *Microcystis aeruginosa* PCC7806	Holanda	777	98,3	-	
3. M. aeruginosa NPCD-1	Brasil, RJ	173	60,0	60,0	-
4. *M. aeruginosa* NPLJ-4	Brasil, RJ	173	60,0	60,0	98,2

Figura 33 - Percentual de similaridade das sequências de aminoácidos Mca das linhagens estudadas com as sequências de linhagens produtoras ou potencialmente produtoras de MCA

Apesar de *M. aeruginosa* NIES-298 ser a única linhagem do gênero *Microcystis* que mostrou a produção de microciclamida, o potencial genético de produção desta família de peptídeos cíclicos pode ser muito mais abrangente do que o esperado. Para testar esta hipótese, Ziemert et al. (2008a) fizeram uma busca de genes similares no genoma da linhagem *M. aeruginosa* PCC7806. Análises de BLASTP revelaram um agrupamento gênico que codifica proteínas com mais de 90% de identidade com nove proteínas codificadas em NIES-298, um exemplo disso pode ser visto na Figura 33, sugerindo a capacidade da linhagem PCC7806 em produzir um peptídeo do grupo das microciclamidas. Com esses dados em mãos, pode-se sugerir que a linhagem brasileira *M. aeruginosa* SPC777 também é potencialmente produtora do peptídeo, pois apresentou 90,5% de identidade com a sequência McaA de NIES-298. No entanto, outros genes *mca* devem ser analisados no genoma da linhagem SPC777 para confirmar a identidade das proteínas codificadas.

Assim como ocorre com o peptídeo precursor da microviridina, MdnA, que apresenta diferenças na sequência de aminoácidos, o peptídeo precursor McaE da microciclamida nas linhagens NIES-298 e PCC7806, apresenta uma sequência diferente de peptídeos codificados, porém, com as mesmas sequências de sinalização. Enquanto que o precursor em NIES-298 contêm duas regiões codificadoras de MCA, a proteína corresponde na linhagem PCC7806 contêm quatro (ZIEMERT et al., 2008a). Oligonucleotídeos que codificam para o peptídeo precursor McaE não foram analisados neste estudo.

Análises da produção de MCA por LC-MS dos extratos das linhagens *M. aeruginosa* NPCD-1, SPC777 e NPLJ-4 foram realizadas, mas a produção da substância não foi verificada.

5.2 Sequenciamento de nova geração

5.2.1 Caracterização do agrupamento gênico da saxitoxina

Os resultados do sequenciamento do genoma das linhagens CENA302 e CENA303, com a plataforma HiScan SQ (Illumina), foram obtidos em Julho de 2012. Informações sobre o número de sequências geradas e a cobertura alcançada estão descritas na Tabela 13. A cobertura genômica foi calculada considerando o número de bases sequenciadas, 3,88 Mb, do genoma da linhagem *C. raciborskii* CS-505 (STUCKEN et al., 2010). A cobertura do agrupamento gênico *sxt* das linhagens CENA302 e CENA303, utilizando o programa de montagem *CLC Genomics Workbench* e a linhagem *C. raciborskii* T3 como referência, é mostrada na Figura 34. Sequências consenso contendo regiões de lacuna (*gaps*) foram geradas. Pode-se observar que a cobertura das sequências obtidas, pela montagem por referência, foi maior para a linhagem CENA302 que para a linhagem CENA303.

O sequenciamento do agrupamento gênico *sxt* já foi descrito em seis linhagens cianobacterianas pertencentes a diferentes espécies, sendo elas *Cylindrospermopsis raciborskii* linhagem T3 (KELLMANN et al., 2008), *Raphidiopsis brookii* linhagem D9 (STUCKEN et al., 2010), *Anabaena variabilis* linhagens AWQC131C e ACBUO2 (MIHALI; KELLMANN; NEILAN, 2009; MOUSTAFA et al., 2009), *Aphanizomenon* sp. linhagem NH-5 (MIHALI; KELLMANN; NEILAN, 2009) e *Lyngbya wollei* (MIHALI; CARMICHAEL; NEILAN, 2011), ver Tabela 3, item 2.2.2. As linhagens T3 e D9 são

brasileiras e foram isoladas do braço Taquacetuba da Represa Billings no estado de São Paulo.

Tabela 13 - Informações sobre as leituras obtidas utilizando a plataforma HiScan SQ (Illumina).

Dados Brutos	***C. raciborskii* CENA302**	***C. raciborskii* CENA303**
Número de pb gerados	5.346.498.600	7.143.897.000
Número de pb de cada sequência	100	100
Cobertura	1.377,9 x	1.841,2 x
Montagem	*ab initio*	Referência
Programas utilizados	CLCBio	CLCBio
Maior contig (pb)	348.465	635.621
Menor contig (pb)	78	100

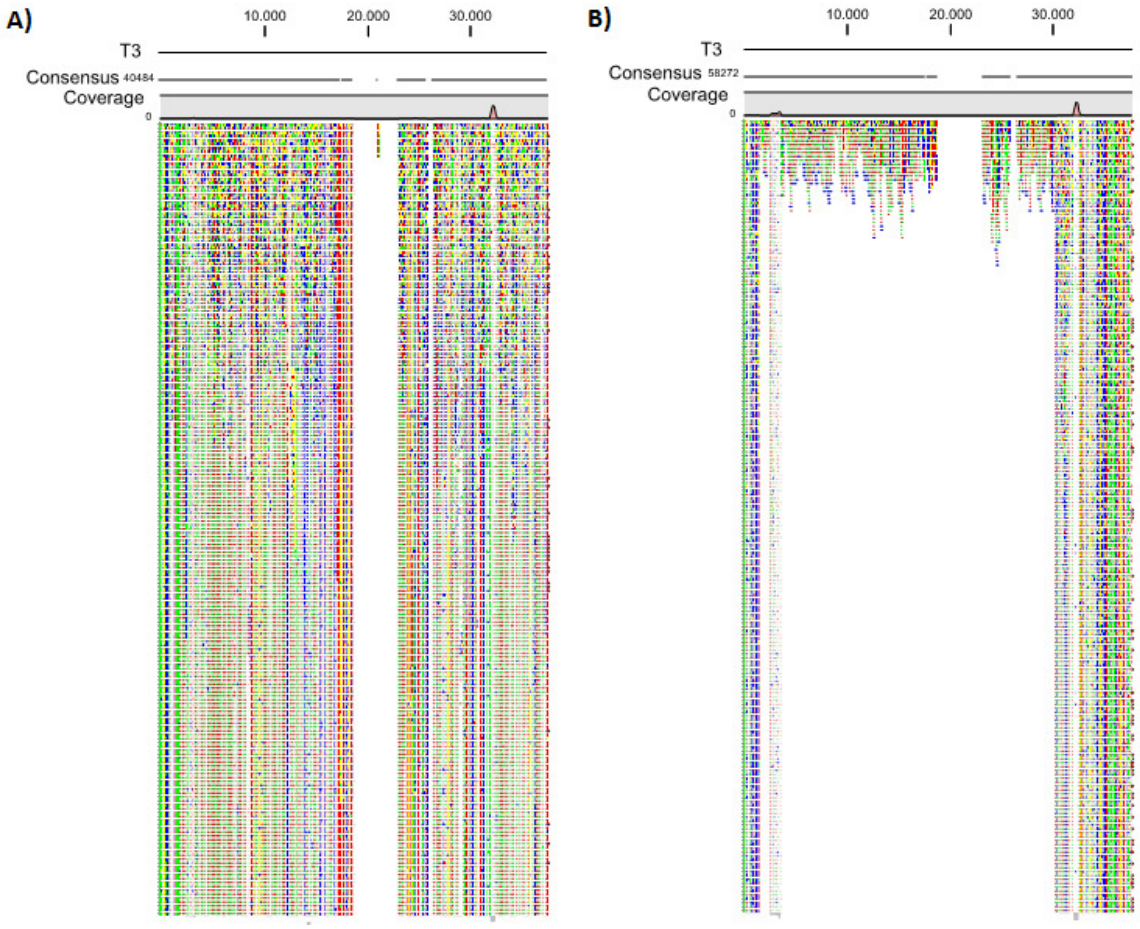


Figura 34 - Cobertura alcançada pela montagem do agrupamento gênico *sxt* das linhagens CENA302 (A) e CENA303 (B) utilizando como referência a linhagem *C. raciborskii* T3

Na montagem *ab initio*, *contigs* de diferentes tamanhos foram gerados, variando de 78 a 348.465 pb na linhagem CENA302, e de 100 a 635.621 pb na linhagem CENA303, Tabela 13. A identidade dos *contigs* gerados foi analisada com a ferramenta BLASTN do NCBI, e um *contig* com 85.875 pb no genoma da linhagem CENA302 apresentou 99% (89% de cobertura) e 100% de identidade (95% de cobertura) com o agrupamento gênico *sxt* das linhagens T3 e D9, respectivamente. A identificação das ORFs deste *contig* foi realizada utilizando o programa Glimmer, e a anotação manual e identidade das mesmas confirmada pelo programa Artemis. Já para a linhagem CENA303, não foi possível identificar o agrupamento gênico *sxt* completo usando a montagem *ab initio*, pois as sequências *sxt* ficaram distribuídas em vários *contigs* diferentes, uma vez que o programa de montagem utilizado não foi capaz de reconhecer e montar uma sequência consenso contendo o agrupamento gênico *sxt* completo. Os resultados da montagem *ab initio* do genoma da linhagem CENA303 ainda são preliminares, e melhorias na capacidade de processametno computacional do servidor estão sendo realizadas. Sendo assim, outros programas de montagem como o Velvet e o Edena serão utilizados. Portanto, os resultados apresentados neste estudo referentes ao agrupamento *sxt* da linhagem CENA303 foram obtidos com a montagem por referência.

Na Tabela 14, estão descritas algumas informações sobre o tamanho do agrupamento gênico *sxt* e o tamanho de cada gene *sxt* encontrado nas linhagens brasileiras *C. raciborskii* CENA302 (montagem *ab initio*), *C. raciborskii* CENA303 (montagem por referência), *C. raciborskii* T3 e *R. brookii* D9. Quando comparamos o agrupamento de genes da linhagem CENA302 com a linhagem T3, podemos observar que ela não apresenta os genes *sxtN* (uma sulfotransferase), *sxtV* (uma enzima succinato desidrogenase), *sxtW* (uma ferredoxina), *sxtX* (uma cefalosporina hidroxilase), responsável por hidroxilar o N-1 da saxitoxina, gerando a variante tóxica neosaxitoxina (NEO), e os genes *sxtY* e *sxtZ* (duas proteínas envolvidas na transdução de sinal) (KELLMANN et al., 2008a). Já quando comparamos o agrupamento *sxt* da linhagem CENA303, que teve como molde a linhagem T3, observamos que os genes *sxtN*, *sxtX*, *sxtW* e *sxtV* também estão ausentes. Baseados no agrupamento *sxt* da linhagem T3, os genes ausentes na linhagem CENA303 estariam localizados no *gap* de 4.458 pb localizado entre *sxtM* e *sxtU*, Figura 35. Outros quatro *gaps* principais foram encontrados: entre os genes *sxtD* e *sxtC*, com 1.271 pb; entre *sxtS* e *sxtR*, com 710 pb; entre *sxtP* e *sxtO*, com 819 pb; e entre *orf6* e *sxtY*, com 725 pb. Não podemos afirmar se os genes ausentes na linhagem CENA303 foram substituídos por outros genes, ou se foram perdidos ao longo do tempo. Uma montagem *ab initio* seguindo outros princípios de montagem deve ser realizada.

Tabela 14 - Descrição do agrupamento gênico *sxt* das linhagens CENA302 (montagem *ab initio*) e CENA303 (montagem por referência) sequenciadas neste estudo, e das linhagens brasileiras T3 e D9

	***C. raciborskii* T3**	***R. brooki* D9**	***C. raciborskii* CENA302**	***C. raciborskii* CENA303**	**Provável Função**
Tamanho do agrupamento	35 kb	25,7 kb	28,3 kb	26,3 kb	
	Genes (tamanho em pb)				
ORFs	31	25	26	27	
sxtA	3075	3738	3735	3735	Metilação (*sxtA1*), carregamento de ACP (*sxtA2*), ACP (*sxtA3*), Condensação de Claisen (*sxtA4*)
sxtB	957	957	954	954	Ciclização
sxtC	354	354	351	351	Regulatória
sxtD	759	801	756	756	Dessaturação
sxtE	387	387	384	384	Desconhecida
sxtF	1416	1416	1413	1413	Exportar as PSPs
sxtG	1134	1134	1131	1131	Amidinotransferência
sxtH	1005	1005	1002	1002	Hidroxilação do C-12
sxtI	1839	1839	1836	1836	Carbamoilação
sxtJ	444	444	441	441	Regulatória
sxtK	165	-	162	162	Regulatória
sxtL	1299	1272	1257	1257	Descarbamoilação
sxtM	1449	1278	1377	1425	Exportar as PSPs
sxtN	831	-	-	-	Sulfotransferase
sxtO	603	480	600	600	Biossíntese de PAPS
sxtP	1227	1128	414	414	Ligação de PSPs
sxtQ	777	777	774	774	Desconhecida
sxtR	777	777	774	774	Desconhecida
sxtS	726	726	723	723	Formação do anel
sxtT	1005	1005	1002	1002	Hidroxilação do C-12
sxtU	750	747	744	744	Redução do C-1
sxtV	1653	-	-	-	Dioxigenase redutase
sxtW	327	-	-	-	Carregamento de elétrons
sxtX	774	-	-	-	Hidroxilação do N-1
sxtY	666	-	-	663	Transdução de sinal
sxtZ	1353	-	-	1353	Transdução de sinal
sxtSUL	-	909	909	*	Sulfotransferência
sxtDIOX	-	1005	1005	*	Redução do C-12
orf1	1320	-	1317	1317	Desconhecida
CRD_02162	-	102	-	*	Proteína hipotética
CRD_02160	-	156	153	*	Proteína hipotética
CRD_02139	-	162	159	*	Proteína hipotética
glmU	-	1230	1371	*	Proteína bifuncional
orf6	-	-	-	1275	Desconhecida
orf7	-	-	-	750	Desconhecida
orf8	-	-	-	771	Desconhecida
orf9	-	-	-	378	Desconhecida

(*) genes ausentes na linhagem T3 utilizada como molde para montagem por referência da linhagem CENA303.

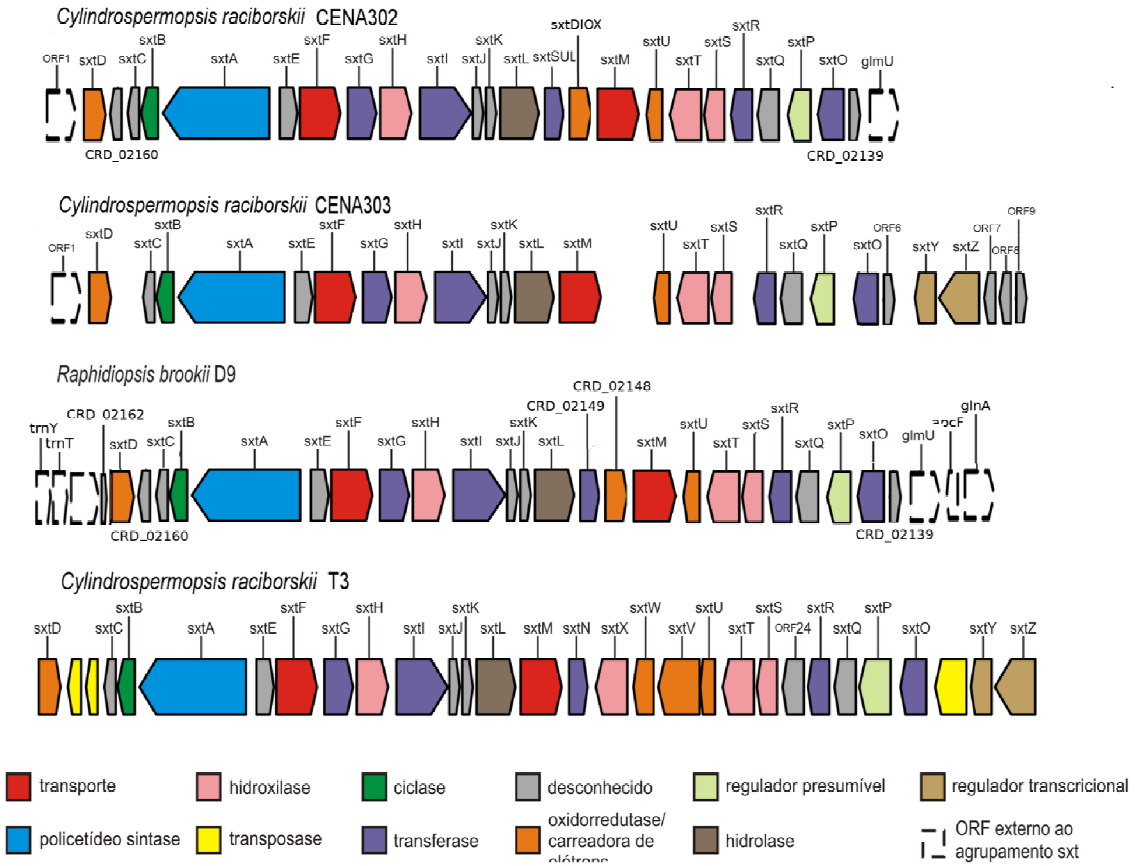


Figura 35 - Agrupamento gênico *sxt* das linhagens brasileiras *C. raciborskii* CENA302 (montagem *ab initio*), *C. raciborskii* CENA303 (montagem por referência), *R. brookii* D9 e *C. raciborskii* T3 (KELLMANN et al., 2008a; STUCKEN et al., 2010; SOTO-LIEBE et al., 2010)

Mihali, Kellmann e Neilan (2009) descreveram a via de biossíntese de STX em duas linhagens, *Anabaena circinalis* AWQC131C e *Aphanizomenon* sp. NH-5. Neste trabalho, os autores mostraram que a proteína codificada pelo gene *sxtN* estaria supostamente envolvida em duas reações de sulfatação: do O-22 da STX, resultando na formação das variantes GTX2 e GTX3; e do N-21 da STX, resultando nas PSPs conhecidas como C1 e C2. Já os genes *sxtV* e *sxtW* estariam envolvidos em um sistema de transporte de elétrons para o funcionamento de enzimas oxigenases, Figura 36. No entanto, na linhagem *A. circinalis* AWQC131C o gene *sxtV* apresenta um códon de parada interrompendo a ORF, enquanto que na linhagem *Aphanizomenon* sp. NH-5, somente um fragmento do gene foi encontrado. O gene *sxtW* foi encontrado na linhagem *Aphanizomenon* sp. NH-5, mas está ausente na linhagem *A. circinalis* AWQC131C, assim como o gene *sxtX*, envolvido na biossíntese de NEO. Dessa forma, parece haver um mecanismo alternativo capaz de realizar a função dos genes ausentes, ou eles podem

não desempenhar um papel essencial na produção de STX, o que explicaria também o fato desses genes estarem ausentes no genoma das linhagens CENA302 e CENA303. As análises por LC-MS (item 5.1.2) mostraram que a linhagem CENA302 não produz a variante NEO, sintetizada pelo produto do gene *sxtX*, ausente nesta linhagem. No entanto, ela produz as variantes sulfatadas GTX2/3 (Figura 37) e, de acordo com a via proposta por Mihali, Kellmann e Neilan (2009), a biossíntese das variantes sulfatadas é realizada pelo produto do gene *sxtN*, que também está ausente. A linhagem CENA303 não apresentou a produção de PSPs. Portanto, os resultados obtidos com a anotação do agrupamento gênico *sxt* e as análises químicas da linhagem CENA302, mostram uma divergência com os dados propostos por Mihali, Kellmann e Neilan (2009) quanto à função do produto gênico de *sxtN*.

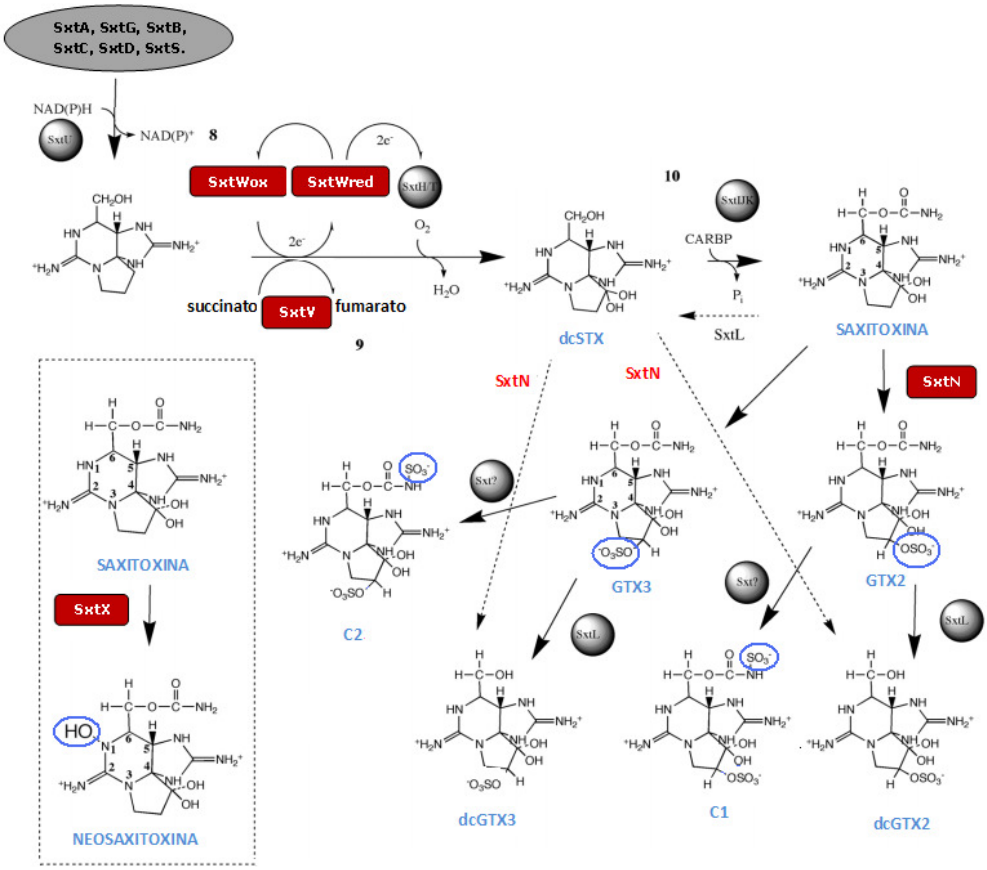
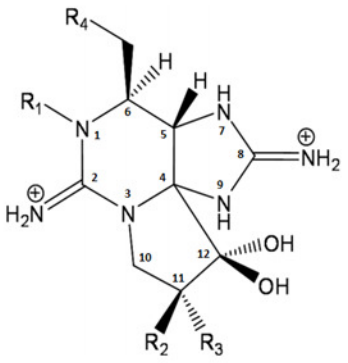


Figura 36 - Via biossintética de STX proposta por Mihali, Kellmann e Neilan (2009) para as linhagens *Anabaena circinalis* AWQC131C e *Aphanizomenon* sp. NH-5. Em vermelho, genes ausentes no genoma de CENA302 e CENA303. O gene *sxtN* cataliza a sulfatação (círculos azuis) do O-22 gerando as variantes GTX2 e GTX3, e do N-21 gerando as variantes C1 e C2. O gene *sxtX* cataliza a hidroxilação do N-1 da saxitoxina, gerando a variante neossaxitoxina. As setas pontilhadas indicam reações adicionais, mas não essenciais, e a caixa pontilhada indica reações presentes somente na linhagem *Aphanizomenon* sp. NH-5 (adaptado e modificado de MIHALI; KELLMANN; NEILAN, 2009)



Toxina	R1	R2	R3	R4	Fator de Toxicidade
STX	H	H	H		1
NEO	OH	H	H		0,92
GTX I	OH	H	OSO_3^-	H_2N-COO	0,99
GTX II	H	H	OSO_3^-	**(Carbamoil -)**	0,36
GTX III	H	OSO_3^-	H		0,64
GTX IV	OH	OSO_3^-	H		0,73
B1	H	H	H		0,06
B2	OH	H	H		-
C3	OH	H	OSO_3^-	^-O_3S-NH-COO	0,01
C1	H	H	OSO_3^-	**(*N*- sulfo -**	< 0,01
C2	H	OSO_3^-	H	**carbamoil -)**	0,10
C4	OH	OSO_3^-	H		0,06
dc-STX	H	H	H		0,51
dc-NEO	OH	H	H		-
dc-GTX I	OH	H	OSO_3^-	HO	-
dc-GTX II	H	H	OSO_3^-	**(Decarbamoil -)**	0,65
dc-GTX III	H	OSO_3^-	H		0,75
dc-GTX IV	OH	OSO_3^-	H		-

Figura 37 - Variantes estruturais de STX. Em vermelho estão as toxinas produzidas pela linhagem *C. raciborskii* CENA302

Um trabalho semelhante foi desenvolvido por Soto-Liebe e colaboradores (2010), que discutiram a função dos produtos gênicos sintetizados pelos genes *sxt* na linhagem *C. raciborskii* T3 e comparam com outras cianobactérias, sendo uma delas a linhagem *R. brookii* D9. A linhagem T3 apresenta quatro genes que estão ausentes na linhagem D9 (*sxtN*, *sxtV*, *sxtW* e *sxtX*), assim como nas linhagens CENA302 e CENA303. Análises químicas mostram que a linhagem D9 também produz as variantes sulfatadas GTX2/3 e dcGTX2/3 e não produz a variante NEO. Após uma busca por genes que poderiam exercer a função dos genes *sxtN*, *sxtV*, *sxtW* e *sxtX* na linhagem D9, eles observaram que essa linhagem apresenta duas ORFs (CRD_02149 e CRD_02148) ausentes no agrupamento *sxt* da linhagem T3. Análises de bioinformática mostraram que o produto gênico de CRD_02149 apresentou 89% de identidade com a sequência de aminoácidos SxtSUL de *L. wollei*, uma sulfotransferase, enquanto que o produto gênico de CRD_02148 mostrou 85% de identidade com a sequência de aminoácidos SxtDIOX de *L. wollei*, uma hidroxilase (MIHALI; CARMICHAEL; NEILAN, 2011). Provavelmente, os produtos SxtSUL e SxtDIOX estão envolvidos na modificação do C-11 da STX para formar os derivados sulfatados GTX2/3 (SOTO-LIEBE et al., 2010). Por uma questão de entendimento, as ORFs CRD_02149 e CRD_02148 presentes na linhagem D9 serão, a partir de agora, descritas como SxtSUL e SxtDIOX, respectivamente. Sabendo disso, foi realizada uma busca por sequências dentro do agrupamento *sxt* da linhagem CENA302 que tivessem identidade com as sequências SxtSUL e SxtDIOX das

linhagens *R. brookii* D9 e *Lyngbya wollei*. Observamos que a linhagem CENA302 apresenta duas sequências com elevado valor de identidade, 100 e 99% (100% de cobertura) com as sequências SxtSUL e SxtDIOX da linhagem *R. brookii* D9, respectivamente. A identidade das sequências *sxt* da linhagem CENA302 em comparação com as linhagens T3 e D9 está apresentada na Tabela 15. A cobertura das sequências *sxt* da linhagem CENA302 foi maior quando elas foram comparadas com a linhagem T3, no entanto, os genes *sxt* tiveram valores de identidade maior com a linhagem D9.

Tabela 15 - Identidade e cobertura das sequências gênicas *sxt* da linhagem CENA302 em comparação com as linhagens T3 e D9

Genes	***C. raciborskii* T3**		***R. brooki* D9**	
(tamanho pb)	**Identidade (%)**	**Cobertura (%)**	**Identidade (%)**	**Cobertura (%)**
sxtA	99,9	100	99,9	99
sxtB	100	100	100	99
sxtC	100	100	100	99
sxtD	99,6	100	100	94
sxtE	100	100	99,7	99
sxtF	99,9	100	99,8	99
sxtG	100	100	100	99
sxtH	100	100	100	99
sxtI	99,8	100	99,7	99
sxtJ	99,8	100	99,7	99
sxtK	100	100	-	-
sxtL	99,8	100	99,8	95
sxtM	90,3	99	99,8	99
sxtO	99,5	100	99,4	78
sxtP	99,6	100	99,3	99
sxtQ	99,7	100	100	99
sxtR	99,7	100	99,7	99
sxtS	99,7	100	100	99
sxtT	99,9	100	100	99
sxtU	100	100	99,8	99
sxtSUL	-	-	100	99
sxtDIOX	-	-	99,9	99
CRD_02160	-	-	100	98
orf1	98,4	100	-	-
CRD_02139	-	-	100	98
glmU	-	-	99,4	99

A análise filogenética do agrupamento gênico *sxt* mostra que as linhagens brasileiras ficaram em um clado juntamente com a linhagem norte americana *L. wollei*. A árvore mostra ainda que a linhagem CENA302 ficou agrupada em um clado interno com a linhagem D9 com 100% de valor de reamostragem, Figura 38.

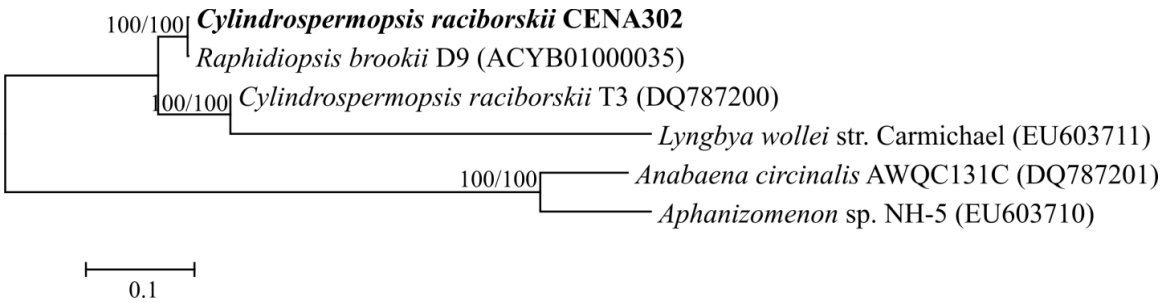


Figura 38 - Árvore filogenética das sequências de nucleotídeos do agrupamento gênico *sxt*. A linhagem utilizada neste estudo está em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% nas análises de ML/NJ estão apresentados em cada nó

Portanto, os resultados da anotação do agrupamento gênico *sxt* da linhagem *C. raciborskii* CENA302 mostram que este agrupamento gênico está mais proximamente relacionado ao agrupamento homólogo de *Raphidiopsis brookii* D9. Além disso, nossas análises corroboram os dados propostos por Soto-Liebe et al. (2010), que mostram que a linhagem *R. brookii* D9, a qual também não possui o gene *sxtN*, é capaz de realizar a conversão de STX para GTX2/3 pela ação específica de uma O-sulfotransferase sintetizada por *sxtSUL* (CRD_02149), explicando o fato da linhagem CENA302 também ser capaz de produzir as variantes sulfatadas. Com estes dados podemos propor ainda que a linhagem CENA303 não apresentou a produção de variantes sulfatadas e NEO por não apresentar em seu genoma os genes *sxtN*, *sxtSUL*, *sxtDIOX* e *sxtX*, tendo em vista que a montagem do agrupamento gênico *sxt* da linhagem CENA303 foi obtida utilizando como molde a linhagem T3, que não apresenta sequências *sxtSUL* e *sxtDIOX*. No entanto, a linhagem CENA303 apresentou sequências de genes envolvidos em passos anteriores da produção das variantes sulfatadas e NEO, que podem estar envolvidos na biossíntese da variante STX. Logo, a ausência de produção de toxina pela linhagem CENA303 precisa ser investigada. Uma busca por sequências dos genes *sxtSUL* e *sxtDIOX* foi realizada mas somente fragmentos gênicos foram encontrados. Além das tentativas de montagem por referência, usando como molde a linhagem T3, realizados duas outras montagens com as sequências do agrupamento *sxt* da linhagem *C. raciborskii* CENA302 (montagem *ab initio*) e de *Lygnbya wollei*, no entanto, muitos *gaps* foram gerados e a cobertura do agrupamento gênico foi menor do que quando usamos como molde a T3.

Os resultados do sequenciamento do genoma das linhagens CENA302 e CENA303 confirmam a filogenia dos fragmentos gênicos *sxt* obtidos pelo sequenciamento tradicional baseado no método de Sanger e colaboradores (1977).

5.2.2 Sequenciamento com a plataforma Ion Torrent

Neste estudo, o genoma da linhagem *S. torques-reginae* ITEP-024 foi sequenciado com a plataforma Ion Torrent com o objetivo de descrever, pela primeira vez, o agrupamento gênico *antx-a(s)*. O resultado do sequenciamento não foi satisfatório considerando que, após a filtração dos dados, uma cobertura de aproximadamente 5,42 vezes foi alcançada, Tabela 16. O sequenciamento do genoma gerou 86.405 *contigs* que variaram de tamanho de 3.209 a 100 pb. Tentativas de montagem *ab initio* foram realizadas com os programas Velvet e Edena, mas não foi possível gerar uma sequência consenso com cobertura considerável. Até o momento, nenhum representante do gênero *Sphaerospermopsis* teve seu genoma sequenciado. O tamanho dos genomas das linhagens dos gêneros *Anabaena* (*Nostoc*) sp. PCC7120 e *Anabaena variabilis* ATCC29413, proximamente relacionadas com o gênero *Sphaerospermopsis*, é em torno de 7 Mb. Acreditamos que o tamanho do genoma da linhagem *S. torques-reginae* ITEP-024 seja o motivo da baixa cobertura verificada.

Tabela 16 - Informações sobre as leituras obtidas utilizando a plataforma Ion Torrent

***S. torques-reginae* ITEP-024**		**Cobertura**
Número de pb gerados (dados brutos)	141.156.687	20,165 x
Número de pb gerados (dados filtrados)	37.929.248	5,418 x
Montagem (*ab initio*)		
Programas utilizados	Velvet e Edena	
Maior contig (pb)	3.209	
Menor contig (pb)	100	

Uma busca de sequências PS, PKS e de outras enzimas que poderiam estar envolvidas na biossíntese de ANTX-A(S) foi realizada utilizando o relatório de função molecular gerado pela ferramenta Blast2GO. Esta análise revelou a presença de 305 sequências com função enzimática interessante. Essas sequências foram analisadas com a ferramenta BLASTN do NCBI, e somente 99 sequências tiveram identidade com regiões do genoma de diferentes gêneros de cianobactéria, Figura 39. Das 99 sequências, 62 delas tiveram valores elevados de identidade e cobertura com o genoma completo de *Nostoc azollae* 0708. Entre as 37 sequências restantes, 7 delas tiveram identidade com *Anabaena variabilis* ATCC19413, 6 com *Nostoc punctiforme* PCC73102 e 4 com *Anabaena* sp. 90. As demais sequências tiveram identidade com outras linhagens também pertencentes à ordem Nostocales. Além disso, o relatório de funções identificou a presença de 6 sequências que podem estar envolvidas com a

biossíntese de microcistina, enumeradas a seguir: Seq3960, Seq8930, Seq12331 e Seq14855 (*microcystin synthetase*); Seq12481 (*microcystin synthetase n-methyltranserase domain*); e Seq5520 (*microcystin synthetase-associated thioesterase*). No entanto, as sequências geradas foram muito curtas e tiveram uma baixa cobertura, não sendo possível gerar uma sequência consenso para o agrupamento gênico *mcy*. Tentativas de amplificar os genes *mcy* foram realizadas com o DNA da linhagem *S. torques-reginae* ITEP-024, mas nenhum resultado positivo foi encontrado, como mostrado anteriormente, Tabela 11.

O genoma da linhagem *S. torques-reginae* ITEP-024 está sendo sequenciado novamente, utilizando a plataforma SOLiD V5 (Applied Biosystems/Life Technologies) do Laboratório de Polimorfismo de DNA, Universidade Federal do Pará, em Belém, PA. Na plataforma SOLiD, os fragmentos de DNA gerados são ligados a um adaptador que se liga especificamente a uma microesfera na PCR em emulsão. A reação de sequenciamento é catalisada por uma DNA ligase e ocorre por hibridização de sondas fluorescentes com o alvo, (MCKERNAN et al., 2006).

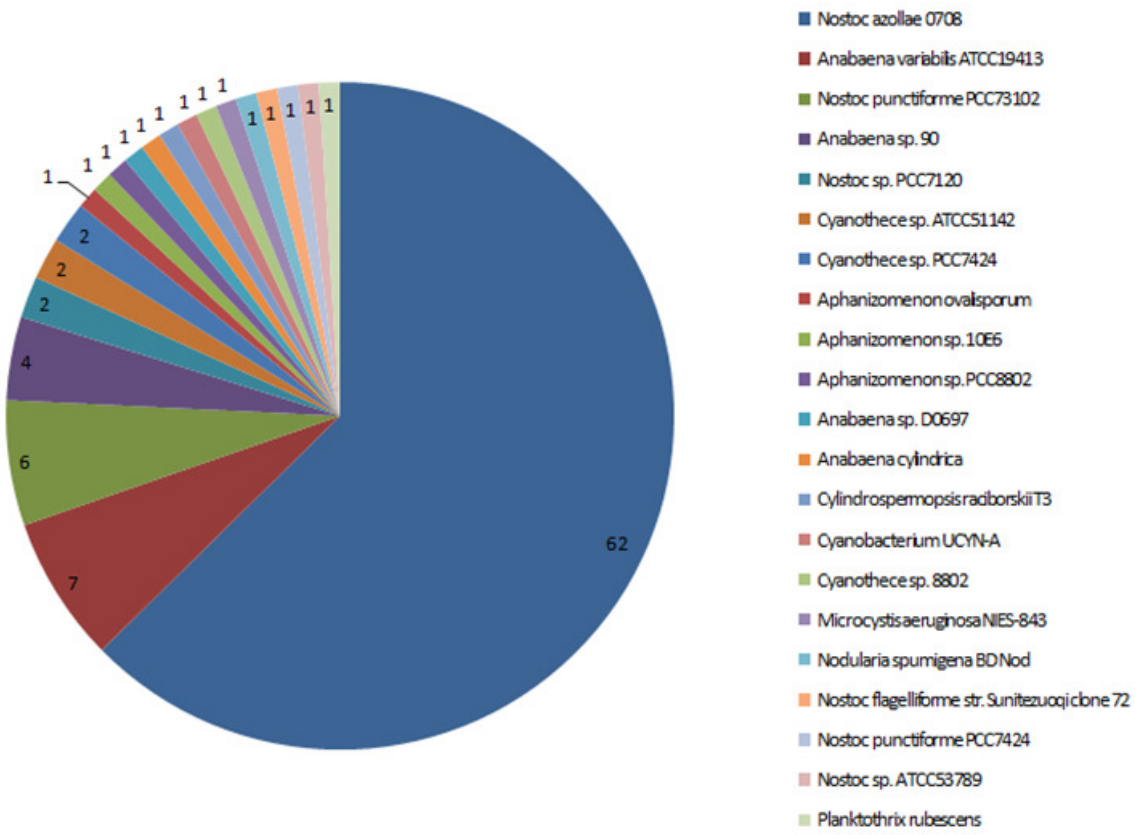


Figura 39 - Identidade de algumas sequências do genoma de *S. torques-reginae* ITEP-024 com outras cianobactérias

5.3 Análise Filogenética do gene de RNAr 16S

Neste estudo, o gene de RNAr 16S foi sequenciado em dezesseis linhagens pertencentes a três gêneros distintos, sendo elas I) *Dolichospermum crassum* linhagens CENA194, CENA195, CENA197, CENA200, CENA201, CENA203, CENA204 e CENA301; *Dolichospermum planctonicum* CENA211; II) *Sphaerospermopsis torques-reginae* linhagens ITEP-024 e ITEP-026 e; III) *Cylindrospermopsis raciborskii* linhagens CENA302, CENA303, CENA305, CENA306 e CYP-011K. As demais linhagens utilizadas neste estudo já apresentam o gene de RNAr 16S.

A filogenia do gene de RNAr 16S utilizando os métodos de Maximum Likelihood – ML e Neighbor Joining – NJ, agrupou as linhagens dos diferentes gêneros em clados com elevado valor de reamostragem, Figura 40. O clado formado pelas linhagens do gênero *Dolichospermum* apresentou 95% de valor de reamostragem, as linhagens do gênero *Cuspidothrix* formaram um clado com 96% de valor de reamostragem, as linhagens do gênero *Sphaerospermopsis* também ficaram separadas em um clado com 91% de valor de reamostragem, e as linhagens do gênero *Cylindrospermopsis* com o elevado valor de reamostragem de 99%.

As linhagens brasileiras da espécie *Dolichospermum crassum* (*A. crassa*) formaram um clado interno com 84% de valor de reamostragem. Já as linhagens brasileiras da espécie *Dolichospermum planctonicum* ficaram agrupadas em um clado com valor de reamostragem de 52%. O gênero *Dolichospermum* (Ralfs *ex* Bornet & Flahault) envolve os táxons cujas características morfológicas diacríticas incluem a presença de vesículas gasosas (aerótopos), distribuição metamérica dos heterócitos e estabilidade das células vegetativas, ou seja, sem diferenciação na parte terminal do tricoma (WACKLIN et al., 2009), Figuras 41, 42 e 43. As análises com a ferramenta BLASTN do NCBI mostraram que as linhagens *D. crassum* apresentam 99% de identidade (99% e 100% de cobertura) com a linhagem brasileira de *D. crassum* CENA206 depositadas no GenBank, Tabela 17. As análises de *D. planctonicum* CENA211 (*A. planctonica*) mostraram que esta linhagem apresenta 99,7 e 99,9% de identidade, 99% de cobertura, com as linhagens *D. planctonicum* CENA209 e CENA210, respectivamente.

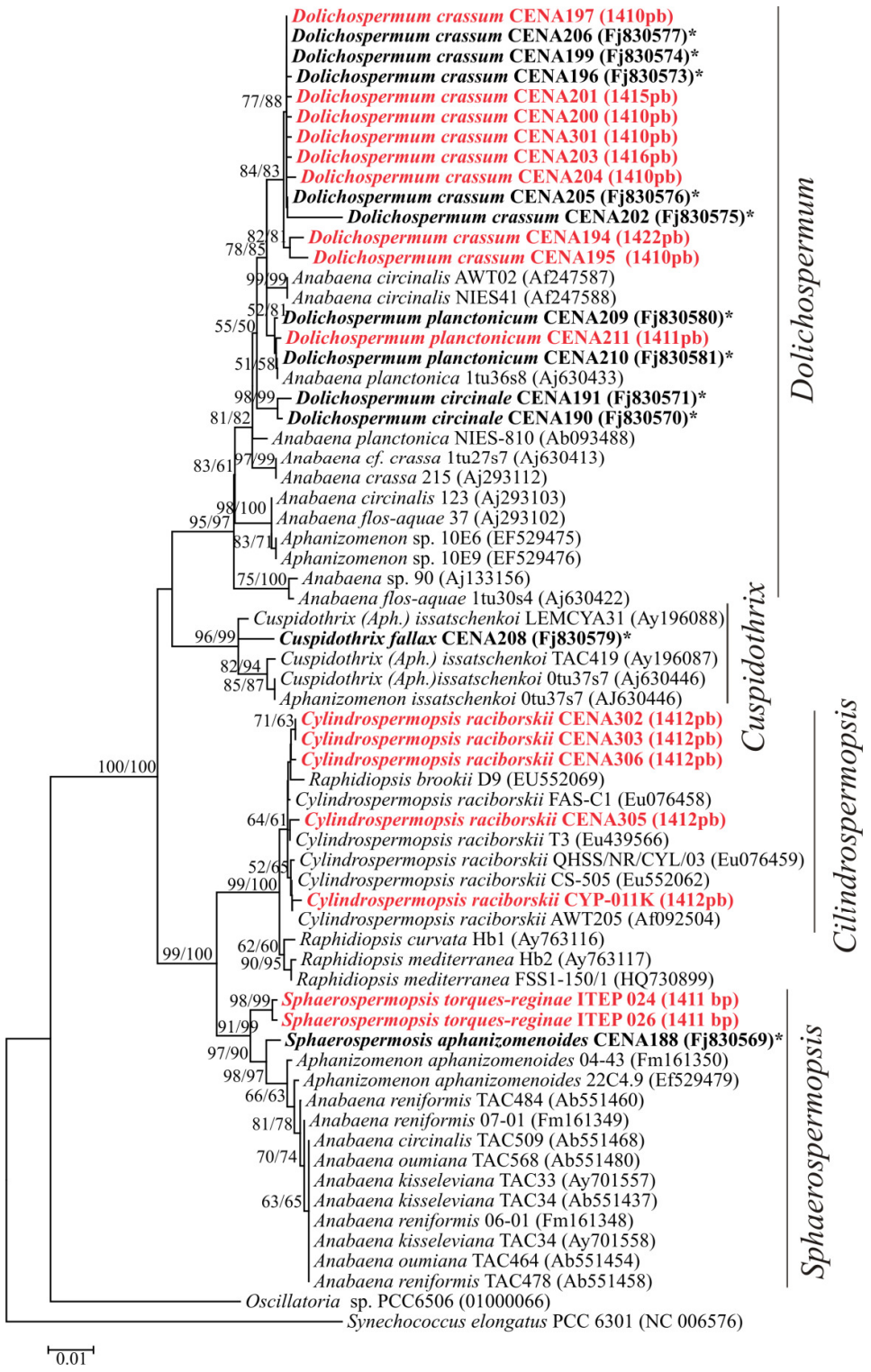


Figura 40 - Análise filogenética de sequências do gene de RNAr 16S (~1410 pb). As sequências de linhagens da ordem Nostocales utilizadas neste trabalho estão em negrito e as sequências geradas neste estudo estão em vermelho. Valores de reamostragem acima de 50% na análise ML/NJ estão apresentados em cada nó. (*) sequenciadas pelo Dr. Ricardo Yukio Honda.

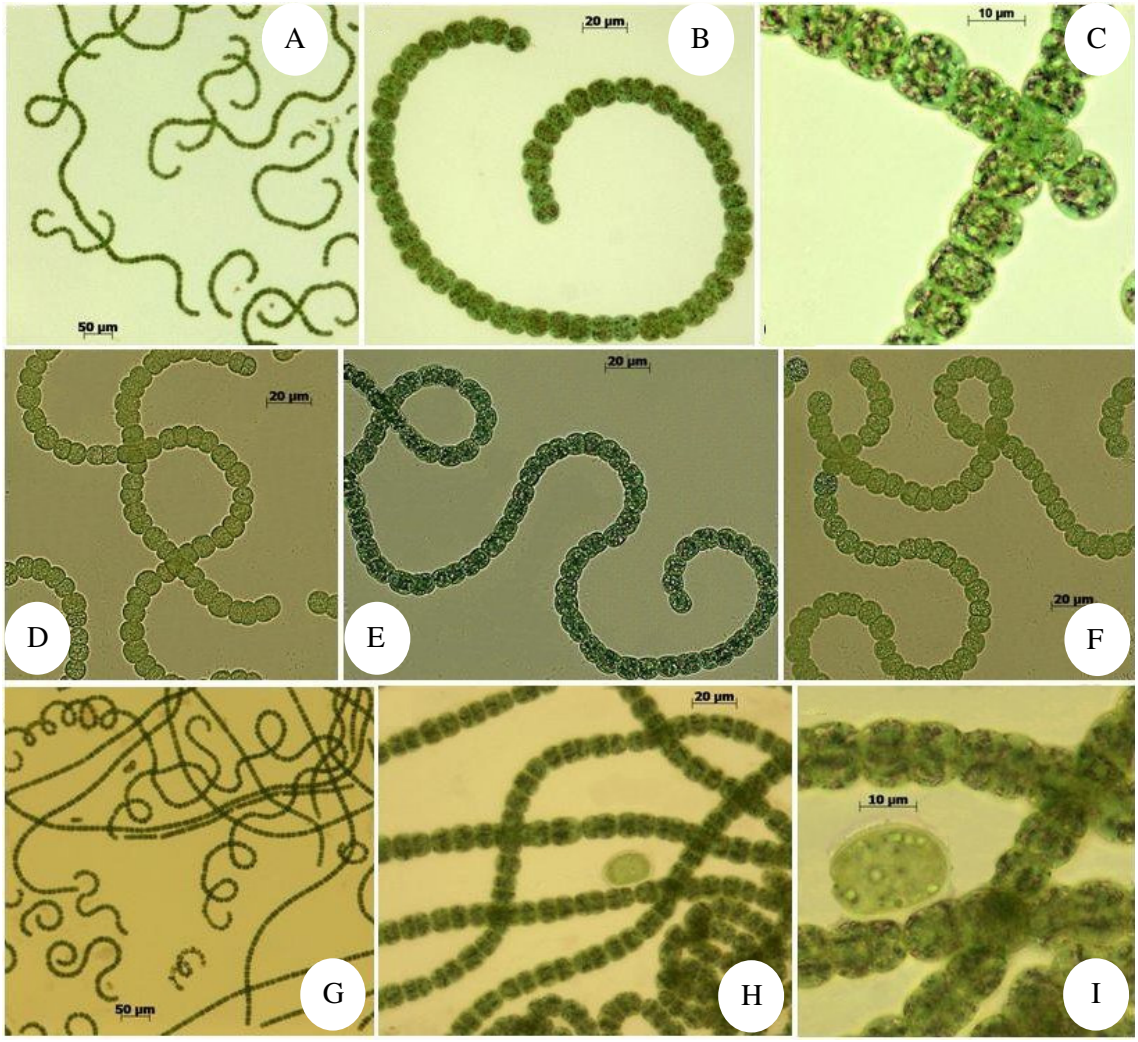


Figura 41 - Fotomicrografias das linhagens de cianobactérias do gênero *Dolichospermum crassum.* A-C) CENA194; D-F) CENA195; G-I) CENA197

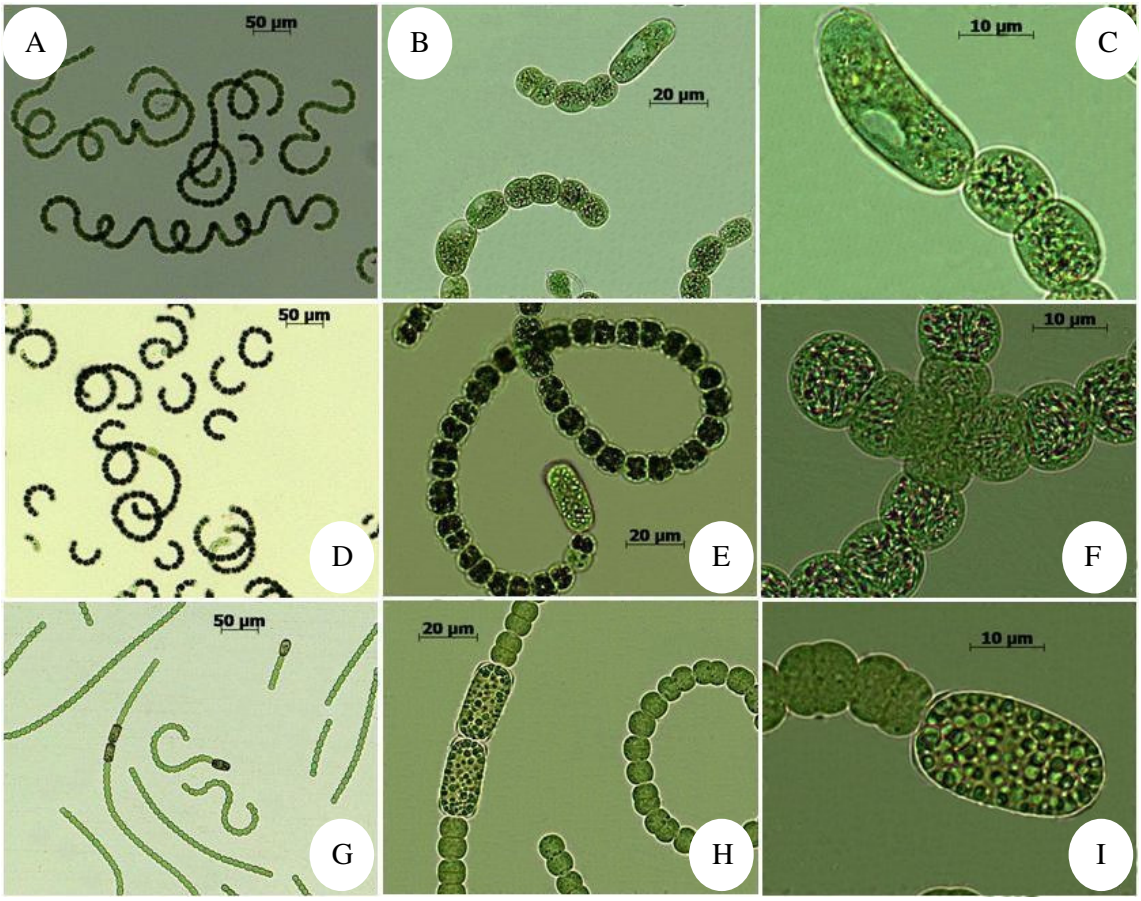


Figura 42 - Fotomicrografias das linhagens de cianobactérias do gênero *Dolichospermum crassum.* A-C) CENA203; D-F) CENA204; G-I) CENA301

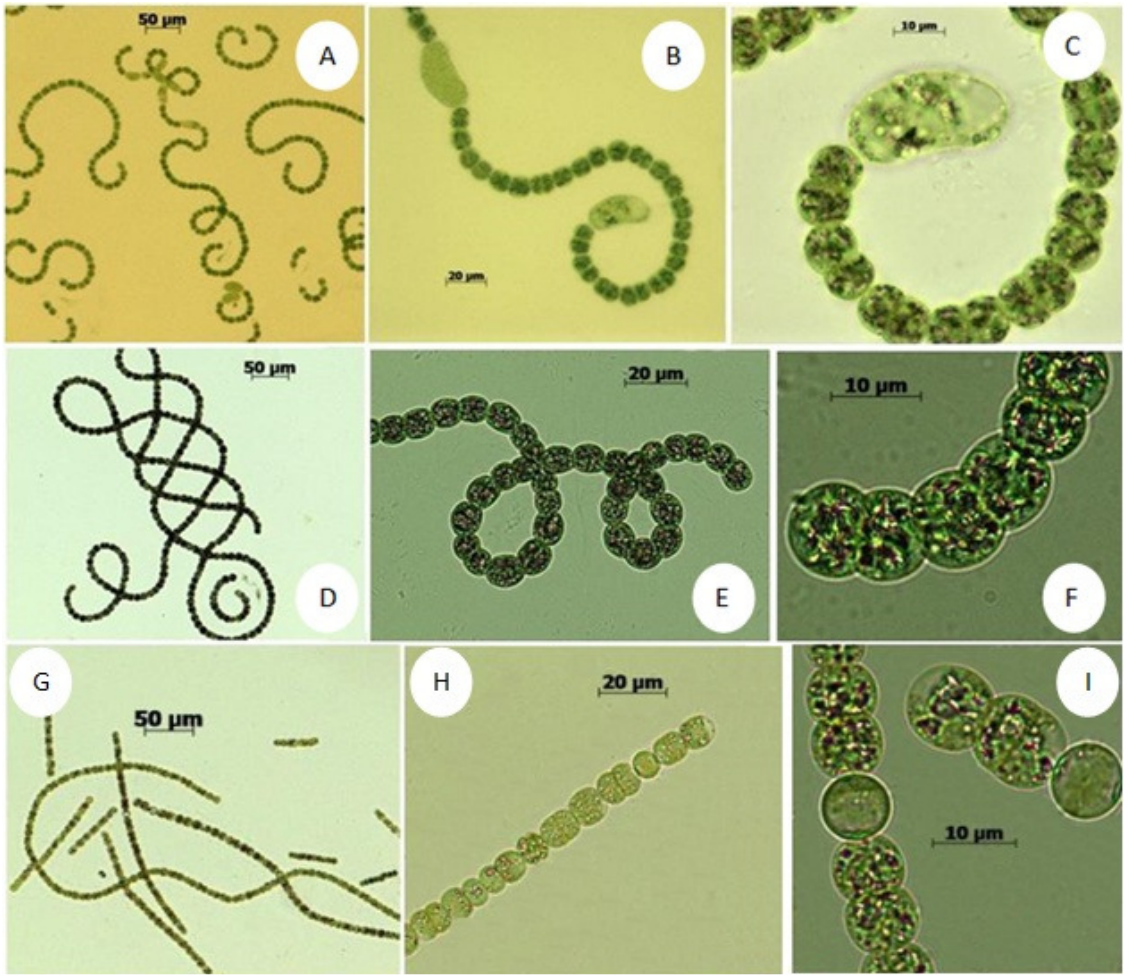


Figura 43 - Fotomicrografias das linhagens de cianobactérias do gênero *Dolichospermum crassum.* A-C) CENA200; D-F) CENA201. Linhagem do gênero *Dolichospermum planctonicum* CENA211, G-I

Tabela 17 - Identidade entre as sequências do gene de RNAr 16S obtidas e sequências disponíveis no GenBank (NCBI) com a ferramenta de alinhamento BLASTN

Linhagem	Tamanho do fragmento (pb)	Sequência mais próxima (Número de acesso)	Identidade (%)	Cobertura (%)
CENA194	1422	*Dolichospermum crassum* CENA206 (FJ830577)	99,6	99
CENA195	1410	*Dolichospermum crassum* CENA206 (FJ830577)	99,5	100
CENA197	1410	*Dolichospermum crassum* CENA206 (FJ830577)	99,9	100
CENA200	1410	*Dolichospermum crassum* CENA206 (FJ830577)	99,9	100
CENA201	1415	*Dolichospermum crassum* CENA206 (FJ830577)	99,7	99
CENA203	1416	*Dolichospermum crassum* CENA206 (FJ830577)	99,8	99
CENA204	1410	*Dolichospermum crassum* CENA206 (FJ830577)	99,8	100
CENA301	1410	*Dolichospermum crassum* CENA206 (FJ830577)	99,9	100
CENA211	1411	*Dolichospermum planctonicum* CENA210 (FJ830581)	99,9	99
CENA302	1412	*Cylindrospermopsis raciborskii* PMC98.14 (AJ582102)	99,3	100
CENA303	1412	*Cylindrospermopsis raciborskii* PMC98.14 (AJ582102)	99,3	100
CENA305	1412	*Cylindrospermopsis raciborskii* 1LT32S01 (FM177492)	99,5	100
CENA306	1412	*Cylindrospermopsis raciborskii* 1LT32S01 (FM177492)	99,5	100
CYP-011K	1412	*Cylindrospermopsis raciborskii* QHSS/NR/CYL/03 (EU076459)	99,8	100
ITEP-024	1411	*Sphaerospermopsis aphanizomenoides* CENA188 (FJ830569)	98,6	100
ITEP-026	1411	*Anabaena aphanizomenoides* CENA188 (FJ830569)	98,6	100

As linhagens do gênero *C. raciborskii* ficaram agrupadas em um clado com as demais linhagens da mesma espécie juntamente com linhagens do gênero *Raphidiopsis*, com 99% de valor de reamostragem, corroborando as características morfológicas visualizadas desse gênero que são tricomas flutuantes, solitários e subsimétricos e desenvolvimento do heterócito somente nas células terminais (após a divisão assimétrica). Os acinetos desenvolvem subterminalmente e aerótopos ocorrem facultativamente nas células (KOMÁREK; HAUER, 2012), Figura 44. Análises com a ferramenta BLASTN, mostraram identidade de 99 e 100% de cobertura, com as demais linhagens de *C. raciborskii* depositadas no GenBank.

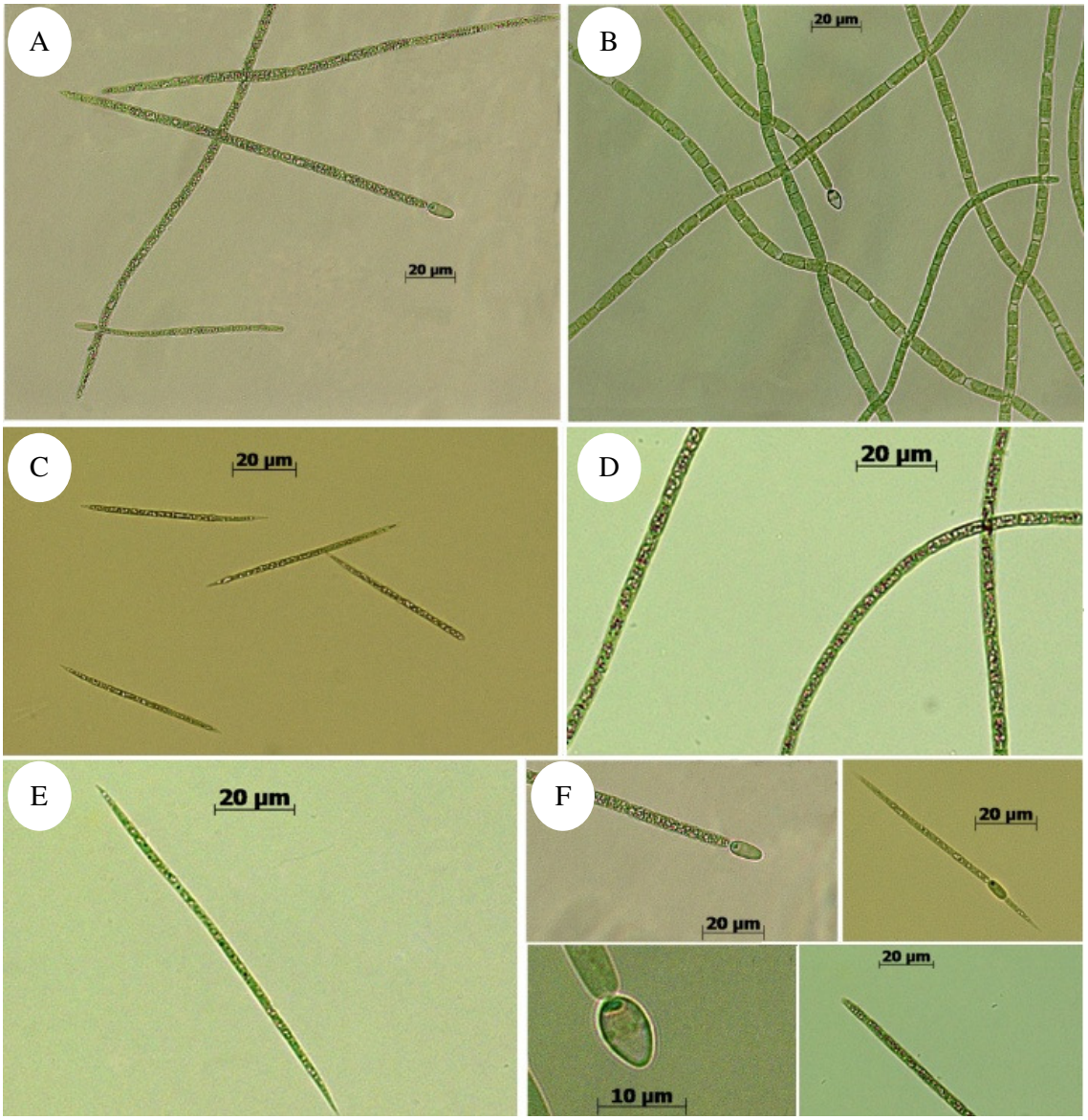


Figura 44 – Fotomicrografias das linhagens de cianobactérias do gênero *Cylindrospermopsis raciborskii*. A) CENA302; B) CYP-011K; C) CENA303; D) CENA305; E) CENA306; F) Detalhes do tricoma das linhagens estudadas

Estudos morfológicos inicialmente realizados para as duas linhagens analisadas, ITEP-024 e ITEP-026, identificaram-nas como sendo *Anabaena spiroides* (MOLICA et al., 2005). Posteriormente, após novas análises morfológicas essas duas linhagens foram renomeadas de *Anabaena oumiana* (WERNER; LAUGHINGHOUSE, 2009). Porém, após o estudo filogenético baseado nas sequências do gene de RNAr 16S realizado neste trabalho, observou-se que essas linhagens pertencem ao gênero *Sphaerospermopsis* sendo identificadas como *S. torques-reginae* ITEP-024 e *S. torques-reginae* ITEP-026 (WERNER et al., 2012, Anexo A). Estas duas linhagens ficaram filogeneticamente separadas em um clado interno com elevado

valor de reamostragem (98%) e estão inclusas em um clado maior formado somente por cianobactérias do gênero *Sphaerospermopsis*. Este clado contém um grupo de cianobactérias planctônicas originalmente classificadas no gênero *Anabaena*, mas recentemente incluídas no recém-descrito gênero *Sphaerospermopsis* de acordo com características genéticas e morfológicas (ZAPOMĚLOVÁ et al., 2009; 2010). As duas linhagens de *Sphaerospermopsis* estudadas apresentaram alta semelhança com a linhagem brasileira *Anabaena aphanizomenoides* CENA188 (98% de identidade, 100% de cobertura). Os táxons inclusos no gênero *Sphaerospermopsis* caracterizam-se principalmente pela morfologia e posição dos acinetos (esféricos, em um ou ambos os lados adjacentes ao heterócito) e pela presença de tricomas espiralados (ZAPOMĚLOVÁ et al., 2009; 2010), Figura 45.

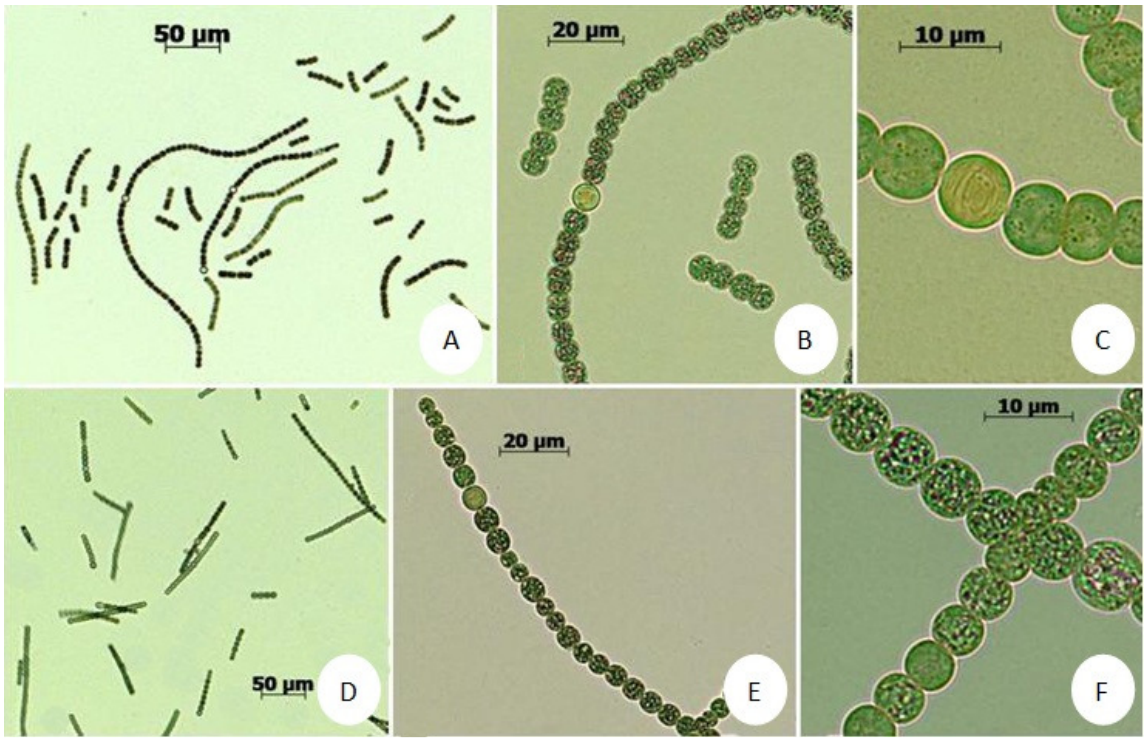


Figura 45 - Fotomicrografias das linhagens de cianobactérias do gênero *Sphaerospermopsis torques-reginae.* A-C) ITEP-024; D-F) ITEP-026

Atualmente, a taxonomia polifásica é utilizada como uma ferramenta de classificação filogenética, sendo a caracterização fenotípica e genotípica recomendada para a descrição de novas bactérias (TINDALL et al., 2010). Portanto, neste estudo foi possível identificar as morfoespécies *D. crassum*, *D. plancoticum*, *S. torques-reginae* e *C. raciborskii* dos isolados brasileiros que ainda não haviam sido caracterizados filogeneticamente.

6. CONCLUSÕES

Neste estudo, genes envolvidos com a biossíntese da saxitoxina foram encontrados nas linhagens brasileiras dos gêneros *Dolichospermum, Sphaerospermopsis*, *Cuspidothrix* e *Cylindrospermopsis*. Com exceção da *Cylindrospermopsis*, este é o primeiro relato de genes de STX em linhagens brasileiras de *Dolichospermum, Sphaerospermopsis* e *Cuspidothrix*. Apesar da identificação de genes *sxt* nesses quatro gêneros, as análises químicas mostraram a produção de STX somente em duas linhagens de *Cylindrospermopsis* (CENA302 e CENA305). Os agrupamentos gênicos da STX da *C. raciborskii* CENA 302 (produtora de STX) e da *C. raciborskii* CENA 303 (não produtora de STX) foram identificados e caracterizados, após o sequenciamento genômico. A organização estrutural desses dois agrupamentos *sxt* é semelhante, no entanto, existem diferenças quanto à presença de alguns genes e nas suas sequências, o que pode explicar a ausência de produção de STX pela linhagem CENA303.

Pela primeira vez a presença simultânea de fragmentos gênicos *sxt* e *cyr* foi descrita em linhagens de *C. raciborskii*, sendo também este o primeiro relato da distribuição de genes *cyr* em linhagens de *C. raciborskii* isoladas do continente americano. A produção de CYN, entretanto, não foi constatada em nenhuma *C. raciborskii* avaliada. Esse fato pode ser um indicativo de que o organismo ancestral possuía esses dois agrupamentos gênicos e, ao longo do processo evolutivo, possivelmente fatores ambientais influenciaram a deleção ou inativação de genes envolvidos na biossíntese de STX ou CYN em linhagens de *C. raciborskii*. Assim, nas populações de *C. raciborskii* do continente americano genes que controlam a produção de CYN foram perdidos ou silenciados, enquanto que em outros continentes essas alterações ocorreram com os genes de STX.

Nos isolados brasileiros de *Microcystis* foram encontradas quatro novas isoformas da hepatotoxina microcistina em duas espécies (*M. panniformis* SPC702 e *M. protocystis* SPC697) ainda não relatadas como produtoras. Entretanto, o grau de toxicidade dessas novas variantes ainda necessita ser determinado. Além disso, genes envolvidos na biossíntese de duas substâncias que agem como inibidores enzimáticos, microviridina e microciclamida, foram detectados e sequenciados em algumas das linhagens de *Microcystis*.

Os resultados deste estudo trazem informações inéditas importantes sobre a distribuição de genes de cianotoxinas em linhagens brasileiras planctônicas de cianobactérias formadoras de florações em corpos-d'água. Alguns desses genes podem ter sofrido

modificações e/ou rearranjamentos que levaram à interrupção da produção das cianotoxinas. Nesse caso, a utilização de métodos moleculares para identificação de florações tóxicas em águas de reservatórios de abastecimento público pode fornecer resultados falsos positivos, o que é indesejável. Estudos visando conhecer o papel dessas substâncias bioativas nas células cianobacterianas são de fundamental importância e trarão novas perspectivas com referências aos fatores que influenciam a produção ou não dessas moléculas.

REFERÊNCIAS

AAS, P.; ERIKSEN, S.; KOLDERUP, J.; LUNDY, P.; HAUGEN, J.E.; SKULBERG, O.M.; FONNUM, F. Enhancement of acetylcholine release by homoanatoxin-a from *Oscillatoria formosa*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 2, n. 2-3, p. 223-232, 1996.

ADESSI, C.; MATTON, G.; AYALA, G.; TURCATTI, G.; MERMOD, J.J.; MAYER, P.; KAWASHIMA, E. Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms. **Nucleic Acids Research**, London, v. 28, n. 20, p. 1-20, 2000.

ALEXOVA, R.; FUJII, M.; BIRCH, D.; CHENG, J.; WAITE, T.D.; FERRARI, B.C.; NEILAN, B.A. Iron uptake and toxin synthesis in the bloom-forming *Microcystis aeruginosa* under iron limitation. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 1064–1077, 2011a.

ALEXOVA, R.; HAYNES, P.A.; FERRARI, B.C.; NEILAN, B.A. Comparative protein expression in different strains of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 10, n. 9, 2011b. doi: 10.1074/mcp.M110.003749.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410, 1990.

ANGERMAYR, S.A.; HELLINGWERF, K.J.; LINDBLAD, P.; MATTOS, M.J.T. Energy biotechnology with cyanobacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 20, n. 3, p. 257–263, 2009.

ARÁOZ, R.; MOLGÓ, J.; DE MARSAC, N.T. Neurotoxic cyanobacterial toxins. **Toxicon**, Oxford, v. 56, n. 5, p. 813–828, 2010.

AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W.; JOCHIMSEN, E.M.; RINEHART, K.L.; LAU, S.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human intoxication by microcystin during renal dialysis treatment in Caruaru. **Toxicology**, Amsterdam, v. 181-182, p. 441-446, 2002.

AZEVEDO, S.M.F.O.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W.; NAMIKASHI, M. First report of microcystin from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginiosa*. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 6, p. 261–265, 1994.

BALDWIN, J.E.; THOMAS, R.C.; KRUSE, L.I.; SILBERMAN, L. Rules for ring closure: ring formation by conjugate addition of oxygen nucleophiles. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, DC, v. 42, n. 24, p. 3846-3852, 1977.

BALLOT, A.; RAMM, J.; RUNDBERGET, T.; KAPLAN-LEVY, R.N.; HADAS, O.; SUKENIK, A.; WIEDNER, C. Occurrence of non-cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon ovalisporum* and *Anabaena bergii* in Lake Kinneret (Israel). **Journal of Plankton Research**, Oxford, v. 33, n. 11, p. 1736-1746, 2011.

BANKER, R.; TELTSCH, B.; SUKENIK, A.; CARMELI, S. 7-Epicylindrospermopsin, a toxic minor metabolite of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* from Lake Kinneret, Israel. **Journal of Natual Products**, Washington, DC, v. 63, n. 3, p. 387–389, 2000.

BANKER, R.; CARMELI, S.; HADAS, O.; TELTSCH, B.; PORAT, R.; SUKENIK, A. Identification of cylindrospermopsin *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. **Journal of Phycology**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 613-616, 1997.

BARROS, L.P.C.; MONSERRAT, J.M.; YUNES, J.S. Determination of optimized protocols for the extraction of anticholinesterasic compounds in environmental samples containing cyanobacteria species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 23, n. 4, p. 883-889, 2004.

BECK, C.; KNOOP, H.; AXMANN, I.; STEUER, R. The diversity of cyanobacterial metabolism: genome analysis of multiple phototrophic microorganisms. **BMC Genomics**, London, v. 13, n. 56, p. 1-17, 2012.

BECKER, V.; IHARA, P.; YUNES, J.S.; HUSZAR, V.L.M. Occurrence of anatoxin-a(s) during a bloom of *Anabaena crassa* in a water-supply reservoir in southern Brazil. **Journal of Applied Phycology,** Dordrecht, v. 22, p. 235-241, 2010.

BECKER, V.; CARDOSO, L.C.; MARQUES, D.M. Development of *Anabaena* BORY ex BORNET et FLAHAULT (Cyanobacteria) blooms in a shallow, subtropical lake in Southern Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, São Carlos, v. 16, n. 4, p. 306–317, 2004.

BERGER, C.; BA, N.; GUGGER, M.; BOUVY, M.; RUSCONI, F.; COUTÉ, A.; TROUSSELLIER, M.; BERNARD, C. Seasonal dynamics and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* in lake Guiers (Senegal, West Africa). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 57, n. 3, p. 355–366, 2006.

BERNARD, C.; HARVEY, M.; BRIAND, J.F.; BIRE, R.; KRYS, S.; FONTAINE, J.J. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: Evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. **Environmental Toxicology**, New York, v. 18, n. 3, p. 176-186, 2003.

BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v.7, n. 6, p. 1513-1518, 1979.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; PICCIN-SANTOS, V.; KUJBIDA, P.; MOURA, A.N. Cylindrospermopsin in water supply reservoirs in Brazil determined by immunochemical and molecular methods. **Journal of Water Resource and Protection**, Herndon, v. 3, p. 349-355, 2011.

BONEN, L.; DOOLITTLE, W.F. Ribosomal RNA homologies and the evolution of the filamentous blue-green bacteria. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 10, n. 4, p. 283-291, 1978.

BOTES, D.P.; TUINMAN, A.A.; WESSELS, P.L.; VILJOEN, C.C.; KRUGER, H.; WILLIAMS, D.H.; SANTIKARN, S.; SMITH, R.J.; HAMMOND, S.J. The structure of cyanoginosin-LA, a cyclic heptapeptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, London, p. 2311-2318, 1984.

BOURKE, A.T.C.; HAWES, R.B.; NEILSON, A.; STALLMAN, N.D. An outbreak of hepato-enteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. **Toxicon**, Oxford, v. 21, n. 3, p. 45–48, 1983.

BOUVY, M.; FALCÃO, D.; MARINHO, M.; PAGANO, M.; MOURA, A. Occurence of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. **Aquatic Microbial Ecology**, Oldendorf, v. 23, p. 13-27, 2000.

BRIAND, J.F.; LEBOULANGER, C.; HUMBERT, J.F.; BERNARD, C.; DUFOUR, P. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? **Journal of Phycology**, Oxford, v. 40, p. 231–238, 2004.

BURGER, D.F.; HAMILTON, D.P.; HALL, J.A.; RYAN, E.F. Phytoplankton nutrient limitation in a polymictic eutrophic lake: community versus species specific responses. **Fundamental and Applied Limnology**, Stuttgart, v. 169, n. 1, p. 57-68, 2007.

BURGOYNE, D.L.; HEMSCHEIDT, T.K.; MOORE, R.E.; RUNNEGAR, M.T.C. Biosynthesis of cylindrospermopsin. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, DC, v. 65, n. 1, p. 152–156, 2000.

CADEL-SIX, S.; ITEMAN, I.; PEYRAUD-THOMAS, C.; MANN, S.; PLOUX, O.; MÉJEAN, A. Identification of a polyketide synthase coding sequence specific for anatoxin-a-producing *Oscillatoria* cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 75, n. 14, p. 4909-4912, 2009.

CARMELI, S.; MOORE, R.E.; PATTERSON, G.M.L. Tantazoles: unusual cytotoxic alkaloids from the blue-green alga *Scytonema mirabile*. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, DC, v. 112, n. 22, p. 8195–8197, 1990.

CARMELI, S.; MOORE, R.E.; PATTERSON, G.M.L. Mirabimides AD, new N-acylpyrrolinones from the blue-green alga *Scytonema mirabile*. **Tetrahedron**, Amsterdam, v. 47, n. 23, p. 2087–2096, 1991a.

CARMELI, S.; MOORE, R.E.; PATTERSON, G.M.L. Mirabazoles, minor tantazole-related cytotoxins from the terrestrial bluegreen alga *Scytonema mirabile*. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 32, n. 23, p. 2593–2596, 1991b.

CARMICHAEL, W.W.; AZEVEDO, S.M.F.O.; AN, J.S.; MOLICA, R.J.R.; JOCHIMSEN, E.M.; LAU, S.; RINEHART, K.L.; SHAW, G.R.; EAGELSHAM, G.K. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental Health Perspect**, Washington, DC, v. 109, n. 7, p. 663-668, 2001.

CARMICHAEL, W.W. Cyanobacteria secondary metabolites: the cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 72, n. 6, p. 445-459, 1992.

CARMICHAEL, W.W.; GORHAM, P.R. Anatoxins from clones of *Anabaena flos-aquae* isolated from lakes of Western Canada. **Mitteilungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie**, Heidelberg, v. 21, p. 285-295, 1978.

CARNEIRO, R.L. **Ecofisiologia de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria): influências da intensidade e qualidade da luz e da dureza da água sobre o crescimento e a produção de saxitoxinas**. 2009. 133 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biofísica) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

CARNEIRO, R.L.; DÖRR, F.A.; DÖRR, F.; BORTOLI, S.; DELHERBE, N.; VÁSQUEZ, M.; PINTO, E. Co-occurrence of microcystin and microginin congeners in Brazilian strains of *Microcystis* sp. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, p. 1-11, 2012. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01439.x.

CARVALHO, M.C. **Comunidade fitoplanctônica como instrumento de biomonitoramento de Reservatórios no Estado de São Paulo**. 2003. 167 p. Tese (Doutorado em Saúde Ambiental) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

CASTENHOLZ, R.W. Ecology of blue-green algae in hot springs. In: CARR, N.G.; WHITTON, B.A. (Ed.). **The biology of blue-green algae**. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1973. p. 379-414.

CASTENHOLZ, R.W. Phylum Bx. Cyanobacteria. Oxygenic Photosynthetic Bacteria. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** 2. ed. New York: Springer Verlag, 2001. p. 473–599.

CASTRO, D.; VERA, D.; LAGOS, N.; GARCIA, C.; VASQUEZ, M. The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. **Toxicon,** Oxford, v. 44, n. 5, p. 483–489, 2004.

CATTERALL, W.A. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium-channels in excitable-membranes. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 20, p. 15-43, 1980.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Considerações sobre aspectos limnológicos do Reservatório Jundiaí**: Série Relatórios. São Paulo: CETESB, 1996.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo**: Série Relatórios. São Paulo: CETESB, 2003.

CHANG, Z.; FLATT, P.; GERWICK, W.H.; NGUYEN, V.A.; WILLIS, C.L.; SHERMAN, D.H. The barbamide biosynthetic gene cluster: a novel marine cyanobacterial system of mixed polyketide synthase (PKS)-non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) origin involving an unusual trichloroleucyl starter unit. **Gene**, Amsterdam, v. 296, n. 1-2, p. 235–247, 2002.

CHELLAPA, N.T.; COSTA, M.A.M. Dominant and co-existing species of cyanobacteria from a eutrophicated reservoir of Rio Grande do Norte State, Brazil. **Acta Oecologia**, Paris, v. 24, n. 1, p. S3-S10, 2003.

CHELLAPPA, N.T.; BORBA, J.M.; ROCHA, O. Phytoplankton community and physical-chemical characteristics of water in the public reservoir of Cruzeta, RN, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, v. 68, n. 3, p. 477-494, 2008.

CHISHOLM, S.W.; OLSON, R.J.; ZETTLER, E.R.; GOERICKE, R.; WATERBURY, J.B.; WELSCHMEYER, N.A. A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. **Nature**, London, v. 334, p. 340-343, 1988.

CHONG, M.W.K.; WONG, B.S.F.; LAM, P.K.S.; SHAW, G.R.; SEAWRIGHT, A.A. Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophyrotomin in primary rat hepatocytes. **Toxicon**, Oxford, v. 40, n. 2, p. 205–211, 2002.

CHONUDOMKUL, D.; YONGMANITCHAI, W.; THEERAGOOL, G.; KAWACHI, M.; KASAI, F.; KAYA, K.; WATANABE, M.M. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 48, n. 3, p. 345–355, 2004.

CHORUS, I.; FALCONER, I.R.; SALAS, H.J.; BARTRAM, J. Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, Washington, DC, v. 3, n. 4, p. 323–347, 2000.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water, a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon, WHO, 1999. 416 p.

CHRISTIANSEN, G.; FASTNER, J.; ERHARD, M.; BÖRNER, T.; DITTMANN, E. Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 185, n. 2, p. 564-572, 2003.

CODD, G.A.; BELL, S.G.; KAYA, K.; WARD, C.J.; BEATTIE, K.A.; METCALF, J.S. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. **European Journal of Phycology**, Cambridge, v. 34, n. 4, p. 405-415, 1999.

CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J.M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, n. 18, p. 3674-3676, 2005.

COOK, W.O.; BEASLEY, V.R.; DAHLEM, A.M.; DELLINGER, J.A.; HARLIN, K.S.; CARMICHAEL, W.W. Comparison of effects of anatoxin-a(s) and paraoxon, physostigmine and pyridostigmine on mouse brain cholinesterase activity. **Toxicon**, Oxford, v. 26, n. 8, p. 750–753, 1988.

COSTA, I.A.S.; CUNHA, S.R.S.; PÁNOSSO, R.; ARAÚJO, M.F.F.; MELO, J.L.S.; ESKINAZI-SANT'ANNA, E.M. Dinâmica de cianobactérias em reservatórios eutróficos do semi-árido do Rio Grande do Norte. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, p. 382-401, 2009.

COQUE, J.J.; PEREZ-LLARENA, F.J.; ENGUITA, F.J.; FUENTE, J.L.; MARTIN, J.F.; LIRAS, P. Characterization of the cmcH genes of *Nocardia lactamdurans* and *Streptomyces clavuligerus* encoding a functional 3'-hydroxymethylcephem O- carbamoyltransferase for cephamycin biosynthesis. **Gene**, Amstedam, v. 162, n. 1, p. 21–7, 1995.

CZARNECKI, O.; LIPPERT, I.; HENNING, M.; WELKER, M. Identification of peptide metabolites of *Microcystis* (Cyanobacteria) that inhibit trypsin-like activity in plankonic herbivorous *Daphnia* (Cladocera). **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 77–87, 2006.

DIEHNELT, C.W.; PETERMAN, S.M.; BUDDE, W.L. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry and accurate *m/z* measurements of cyclic peptide cyanobacteria toxins. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 24, n. 7, p. 622-634, 2005.

DIEHNELT, C.W.; DUGAN, N.R.; PETERMAN, S.M.; BUDDE, W.L. Identification of microcystin toxins from a strain of *Microcystis aeruginosa* by liquid chromatography introduction into a hybrid linear ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 78, n. 2, p. 501-512, 2006.

DIENER, M.; ERLER, K.; CHRISTIAN, B.; LUCKAS, B. Application of a new zwitterionic hydrophillic interaction chromatography column for determination of paralytic shellfish poisoning toxins. **Journal of Separation Science**, New York, v. 30, n. 12, p. 1821-1826, 2007.

DIENER, M.; ERLER, K.; HILLER, S.; CHRISTIAN, B.; LUCKAS, B. Determination of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins in dietary supplements by application of a new HPLC/FD method. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 224, n. 2, p. 147-151, 2006.

DITTMANN, E.; WIEGAND, C. Cyanobacterial toxins – occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 50, n. 1, p. 7–17, 2006.

DITTMANN, E.; BÖRNER, T. Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 203, n. 3, p. 192–200, 2005.

DITTMANN, E.; NEILAN, B.A.; BÖRNER, T. Molecular biology of peptide and polyketide biosynthesis in cyanobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 57, n. 4, p. 467–473, 2001.

DITTMANN, E.; NEILAN, B.A.; ERHARD, M.; VON DÖHREN, H.; BÖRNER, T. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC7806. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 779–787, 1997.

DONIA, M.S.; HATHAWAY, B.J.; SUDEK, S.; HAYGOOD, M.G.; ROSOVITZ, M.J.; RAVEL, J.; SCHMIDT, E.W. Natural combinatorial peptide libraries in cyanobacterial symbionts of marine ascidians. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 2, n. 12, p. 729–735, 2006.

DONIA, M.S.; RAVEL, J.; SCHMIDT, E.W. A global assembly line for cyanobactins. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 4, p. 341–343, 2008.

DOR, I.; DANIN, A. Cyanobacterial desert crusts in the Dead Sea Valley. **Archives für Hydrobiologie**, Sttutgart, v. 83, p. 197-206, 1996.

DÖRR, F.A.; RODRÍGUEZ, V.; MOLICA, R.; HENRIKSEN, P.; KROCK, B.; PINTO, E. Methods for detection of anatoxin-a(s) by liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Toxicon**, Oxford, v. 55, n. 1, p. 92–99, 2010.

DUFRESNE, A.; GARCZAREK, L.; PARTENSKY, F. Accelerated evolution associated with genome reduction in a free-living prokaryote. **Genome Biology**, London, v. 6, n. 2, p. 1-10, 2005.

DUY, T.N.; LAM, P.K.S.; SHAW, G.R.; CONNELL, D.W. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 163, p. 113–186, 2000.

EDWARDS, D.J.; GERWICK, W.H. Lyngbyatoxin biosynthesis: sequence of biosynthetic gene cluster and identification of a novel aromatic prenyltransferase. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, DC, v. 126, n. 37, p. 11432–11433, 2004.

EDWARDS, C.; BEATTIE, K.; SCRIMGEOUR, C.; CODD, G. Identification of anatoxin-a in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. **Toxicon**, Oxford, v. 30, n. 10, p. 1165–1167, 1992.

ESTRADA, J.E.P.; BESCÓS, P.B.E; FRESNO, A.M.V. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **Il Farmaco**, Pavia, v. 56, n. 5-7, p. 497-500, 2001.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL. M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 175-185, 1998.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. II. Error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 186-194, 1998.

FALCONER, I.R.; HUMPAGE, A.R. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: cylindrospermopsins. **Environmental Toxicology,** New York, v. 21, p. 299-304, 2006.

FALCONER, I.R.; BARTRAM, J.; CHORUS, I.; KUIPER-GOODMAN, T.; UTKILEN, H.; BURCH, M.; CODD, G.A. Safe levels and safe practices. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic Cyanobacteria in water**. London: E & FN Spon, 1999. p. 155–178.

FASTNER, J.; HEINZE, R.; HUMPAGE, A.R.; MISCHKE, U.; EAGLESHAM, G.K.; CHORUS, I. Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. **Toxicon**, Oxford, v. 42, p. 313–321, 2003.

FEDURCO, M.; ROMIEU, A.; WILLIAMS, S.; LAWRENCE, I. & TURCATTI, G. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. **Nucleic Acids Research**, London, v. 34, e22, 2006.

FERRÃO-FILHO, A. da S.; SOARES, M. C. S.; MAGALHÃES, V. F. DE, AZEVEDO, S. M. F. O. A rapid bioassay for detecting saxitoxins using a Daphnia acute toxicity test. **Environmental Pollution**, New York, v. 158, p. 2084-2093, 2010.

FERRÃO-FILHO, A. da S. Bioacumulação de cianotoxinas e seus efeitos em organismos aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 13, p. 272-312, 2009.

FERRÃO-FILHO, A.S.; CUNHA, R.; MAGALHÃES, V.F.; SOARES, M.C.S.; BAPTISTA, D.F**.** Evaluation of sub-lethal toxicity of cyanobacteria on the swimming activity of aquatic organisms by image analysis. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Rio Grande, v. 2, n. 2, p. 93-100, 2007.

FEWER, D.P.; ROUHIAINEN, L.; JOKELA, J.; WAHLSTEN, M.; LAAKSO, K.; WANG, H.; SIVONEN, K. Recurrent adenylation domain replacement in the microcystin synthetase gene cluster. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 7, p. 183, 2007.

FIORE, M.F.; HONDA, R.Y. Fixação do N_2 por cianobactérias. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R.S. (Ed.). **Micro-organismos e agrobiodiversidade**: o novo desafio para a agricultura. Guaíba: Agrolivros, 2008. p. 69-95.

FIORE, M.F.; MOON, D.H.; TSAI, S.M.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 39, n. 2, p. 159–169, 2000.

FISCHBACH, M.A.; WALSH, C.T. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. **Chemical Reviews**, Easton, v. 37, n. 44, p. 3468–3496, 2006.

FRANKMOLLE, W.P.; KNUBEL, G.; MOORE, R.E.; PATTERSON, G.M. Anti-fungal cyclic peptides from the terrestrial blue-green algae *Anabaena laxa*. Isolation and properties. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 45, n. 9, p. 1458–1466, 1992.

FRISTACHI, A.; SINCLAIR, J.L. Occurrence of cyanobacterial harmful algal blooms workgroup report. In: HUDNELL, K.H. (Ed.). **Cyanobacterial Harmful Algal Blooms:** state of the science and research needs. New York: Springer, 2008. p. 45–103.

FROSCIO, S.M.; HUMPAGE, A.R.; BURCHAM, P.C.; FALCONER, I.R. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v. 18, n. 4, p. 243–251, 2003.

FUJII, K.; YAHASHI, Y.; NAKANO, T.; IMANISHI, S.; BALDIA, S.F.; HARADA, K. Simultaneous detection and determination of the absolute configuration of thiazole-containing amino acids in a peptide. **Tetrahedron**, Amsterdam, v. 58, n. 34, p. 6873–6879, 2002.

FUREY, A.; CROWLEY, J.; SHUILLEABHAIN, A.N.; SKULBERG, O.M.; JAMES, K.J. The first identification of the rare cyanobacterial toxin, homoanatoxin-a, in Ireland. **Toxicon**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 297–303, 2003.

GEOAMBIENTAL. **Diagnóstico Ambiental Parque Professor Theobaldo Dick Município de Lajeado**. Lajeado, 2007. 55 p.

GERWICK, W.H.; PROTEAU, P.J.; NAGLE, D.G.; HAMEL, E.; BLOKHIN, A.; SLATE, D.L. Structure of curacin A, a novel antimiotic, antiproliferative, and brine shrimp toxic natural product from the marine cyanobaterium *Lyngbya majuscula*. **Journal of Organic Chemistry**, Washington,DC, v. 59, n. 6, p. 1243-1245, 1994.

GESNER-APTER, S.; CARMELI, S. Protease inhibitors from a water bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Natural Products**, Gorakhpur, v. 72, n.8, p. 1429–1436, 2009.

GINN, H.P.; PEARSON, L.A.; NEILAN, B.A. NtcA from *Microcystis aeruginosa* PCC7806 is autoregulatory and binds to the microcystin promoter. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 76, n. 13, p. 4362–4368, 2010.

GLENN, T.C. Field guide to next-generation DNA sequencers. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 11, n. 5, p. 759–769, 2011.

GOLAKOTI, T.; YOSHIDA, W.Y.; CHAGANTY, S.; MOORE, R.E. Isolation and structure determination of Nostocyclopeptides A1 and A2 from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc* sp. ATCC53789. **Journal of Natural Products**, Gorakhpur, v. 64, n. 1, p. 54–59, 2001.

GOMES, A.M.A.; MARINHO, M.M.; AZEVEDO, S.M.F.O. The success of *Cylindrospermopsis* at brazilian aquatic systems. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON TOXIC CYANOBACTERIA, 2007, Rio de Janeiro, 2007. p. 10.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. *Consed*: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998.

GORHAM, P.R.; MCLACHLAN, J. R.; HAMMER, V.T.; KIM, W.K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) Breb. Verhandlungen der Internationalen Vereiningung fuer Theoretische und Angewandte. **Limnologie**, Tolouse, v. 15, p. 796-804, 1964.

GRÜNEWALD, J.; MARAHIEL, M.A. Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 70, n. 1, p. 121–146, 2006.

GUGGER, M.; LENOIR, S.; BERGER, C.; LEDREUX, A.; DRUART, J.C.; HUMBERT, J.F.; GUETTE, C.; BERNARD, C. First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin–a associated with dog neurotoxicosis. **Toxicon**, Oxford, v. 45, n. 7, p. 919–928, 2005.

GUGGER, M.F.; HOFFMANN, L. Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 349-357, 2004.

HAANDE, S.; ROHRLACK, T.; BALLOT, A.; RØBERG, K.; SKULBERG, R.; BECK, M.; WIEDNER, C. Genetic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 7, n. 5, p. 692–701, 2008.

HARADA, K.I.; OHTANI, I.; IWAMOTO, K.; SUZUKI, M.; WATANABE, M.F.; WATANABE, M.; TERAO, K. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. **Toxicon**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 73–84, 1994.

HARADA, K.-I.; OGAWA, K.; KIMURA, Y.; MURATA, H.; SUZUKI, M.; THORN, P.M.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W. Microcystins from *Anabaena flos-aquae* NRC 525–17. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, DC, v. 4, n. 5, p. 535–540, 1991.

HARADA, K.-I.; MATSUURA, K.; SUZUKI, M.; WATANABE, M.F.; OISHI, S.; DAHLEM, A.M.; BEASLEY, V.R.; CARMICHAEL, W.W. Isolation and characterization of the minor components associated with microcystins LR and RR in the cyanobacterium (blue-green algae). **Toxicon**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 55-64, 1990.

HARADA, K.-I.; KIMURA, Y.; OGAWA, K.; SUZUKI, M.; DAHLEM, A.M.; BEASLEY, V.R.; CARMICHAEL, W.W. A new procedure for the analysis and puri-fication of naturally occurring anatoxin-a from the blue-green alga *Anabaena flos-aquae*. **Toxicon**, Oxford, v. 27, n. 12, p. 1289–1296, 1989.

HAWKINS, P.R.; CHANDRASENA, N.R.; JONES, G.J.; HUMPAGE, A.R.; FALCONER, I.R. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. **Toxicon**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 341-346, 1997.

HAWKINS, P.R.; RUNNEGAR, M.T.C.; JACKSON, A.R.B.; FALCONER, I.R. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 50, n. 5, p. 1292-1295, 1985.

HEMSCHEIDT, T.; RAPALA J.; SIVONEN, K.; SKULBERG, O.M. Biosynthesis of anatoxin in *Anabaena flos-aquae* and homoanatoxin-a in *Oscillatoria formosa*. **Journal of Chemical Society, Chemical Communication**, London, v. 13, p. 1361–1362, 1995.

HENRIKSEN, P.; CARMICHAEL, W.W.; NA, J.; MOESTRUP, O. Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria/blue-green algae from Danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds. **Toxicon**, Oxford, v. 35, n. 6, p. 901-913, 1997.

HEPP, K. **Composição, variação temporal e espacial de cianobactérias, com ênfase na espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju no lago do parque Professor Theobaldo Dick, Lajeado, Rio Grande do Sul, Brasil**. 2009. 64 p. Dissertação (Mestrado) - Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, 2009.

HERNANDEZ, D.; FRANÇOIS, P.; FARINELLI, L.; ØSTERÅS, M.; SCHRENZEL, J. De novo bacterial genome sequencing: millions of very short reads assembled on a desktop computer. **Genome Research**, Woodbury, v. 18, n. 5, p. 802–809, 2008.

HERRERO, A.; MURO-PASTOR, A.M.; FLORES, E. Nitrogen control in cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 183, n. 2, p. 411–425, 2001.

HICKS, L.M.; MOFFITT, M.C.; BEER, L.L.; MOORE, B.S.; KELLEHER, N.L. Structural characterization of *in vitro* and *in vivo* intermediates on the loading module of microcystin synthetase. **ACS Chemical Biology**, Washington, DC, v. 1, n. 2, p. 93–102, 2006.

HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; KASTOVSKY, J. System of cyanoprokaryotes (Cyanobacteria): state in 2004. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 117, p. 95-115, 2005.

HOFF-RISSETI, C.; DÖRR, F.A.; SCHAKER, P.D.C.; PINTO, E.; WERNER, V.R.; FIORE, M.F. Simultaneous detection of cylindrospermopsin and saxitoxin synthetase genes in Brazilian isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii*. In: 14th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PHOTOTROPHIC PROKARYOTES, 2012, Porto, Portugal. 2012. p. 155.

HOLLAND, D.P.; PANTORNO, A.; ORR, P.T.; STOJKOVIC, S.; BEARDALL, J. The impacts of a high CO2 environment on a bicarbonate user: the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Water Research**, New York, v. 46, n. 5, p. 1430–1437, 2012.

HONDA, R.Y. **Caracterização morfológica e molecular de cianobactérias do gênero *Anabaena* isoladas de corpos-d'água brasileiros**. 2009. 154 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

HONG, Y.; STEINMAN, A.; BIDDANDA, B.; REDISKE, R.; FAHNENSTIEL, G. Occurrence of the toxin-producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Mona and Muskegon Lakes, Michigan. **Journal of Great Lakes Research**, Toronto, v. 32, n. 3, p. 645–652, 2006.

HUMPAGE, A.R.; FENECH, M.; THOMAS, P.; FALCONER, I.R. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 472, n. 1-2, p. 155–161, 2000.

HYDE, E.G.; CARMICHAEL, W.W. Anatoxin-a(s), a naturally occurring organophosphate, is an irreversible active site-directed inhibitor of acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7). **Journal of Biochemical Toxicology**, Hoboken, v. 6, n. 3, p. 195-201, 1991.

ISHIDA, K.; NAKAGAWA, H.; MURAKAMI, M. Microcyclamide, a cytotoxic cyclic hexapeptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Natural Products**, Gorakhpur, v. 63, n. 9, p. 1315 – 1317, 2000.

ISHITSUKA, M.O.; KUSUMI, T.; KAKISAWA, H.; KAYA, K.; WATANABE, M.M. Microviridin: a novel tricyclic depsipeptide from the toxic cyanobacterium *Microcystis viridis*. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, DC, v. 112, n. 22, p. 8180–8182, 1990.

ITEMAN, I.; RIPPKA, R.; MARSAC, N.T.; HERDMAN, M. rDNA analyses of planktonic heterocystous cyanobacteria, including members of the genera *Anabaenopsis* and *Cyanospira*. **Microbiology**, Reading, v. 148, p. 481–496, 2002.

JIANG, Y.; XIAO, P.; YU, G.; SANO, T.; PAN, Q.; LI, R. Molecular basis and phylogenetic implications of deoxycylindrospermopsin biosynthesis in the cyanobacterium *Raphidiopsis curvata*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 78, n. 7, p. 2256-2263, 2012.

JOHNSON, T.R.; HAYNES 2ND, J.I.; WEALAND, J.L.; YARBROUGH, L.R.; HIRSCHBERG, R. Structure and regulation of genes encoding phycocyanin and allophycocyanin from *Anabaena variabilis* ATCC29413. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 170, n. 4, p. 1858–1865, 1988.

JONES, G.J.; NEGRI, A.P. Persistence and degradation of cyanobacterial paralytic shellfish poisons (PSPs) in freshwaters. **Water Research**, New York, v. 31, n. 3, p. 525–533, 1997.

KANEKO, T.; N. NAKAJIMA, S. OKAMOTO, I. SUZUKI, Y. TANABE, M. TAMAOKI, Y. NAKAMURA, F. KASAI, A. WATANABE, K. KAWASHIMA, Y. KISHIDA, A. ONO, Y. SHIMIZU, C. TAKAHASHI, C. MINAMI, T. FUJISHIRO, M. KOHARA, M. KATOH, N. NAKAZAKI, S. NAKAYAMA, M. YAMADA, S. TABATA, AND M. M. WATANABE. Complete genomic structure of the bloom-forming toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-843. **DNA Research**, Tokyo, v. 14, n. 6, p. 247–256, 2007.

KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; WOLK, C.P.; KURITZ, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IRIGUCHI, M.; ISHIKAWA, A.; KAWASHIMA, K.; KIMURA, T.; KISHIDA, Y.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; MATSUNO, A.; MURAKI, A.; NAKAZAKI, N.; SHIMPO, S.; SUGIMOTO, M.; TAKAZAWA, M.; YAMADA, M.; YASUDA, M. AND TABATA, S. Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. **DNA Research**, Tokyo, v. 8, n. 5, p. 205–213, 2001.

KANEKO, T.; SATO, S.; KOTANI, H.; TANAKA, A.; ASAMIZU, E.; NAKAMURA, Y.; MIYAJIMA, N.; HIROSAWA, M.; SUGIURA, M.; SASAMOTO, S.; KIMURA, T.; HOSOUCHI, T.; MATSUNO, A.; MURAKI, A.; NAKAZAKI, N.; NARUO, K.; OKUMURA, S.; SHIMPO, S.; TAKEUCHI, C.; WADA, T.; WATANABE, A.; YAMADA, M.; YASUDA, M.; TABATA, S. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determi-nation of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. **DNA Research**, Tokyo, v. 3, n. 3, p. 109–136, 1996.

KAO, C.Y. Paralytic shellfish poisoning. In: FALCONER, I.R. (Ed.). **Algal toxins in seafood and drinkingwater**. New York: Academic Press, 1993. p. 75-86.

KAPLAN, A.; HAREL, M.; KAPLAN-LEVY, R.N.; HADAS, O.; SUKENIK, A.; DITTMANN, E. The languages spoken in the water body (or the biologicalrole of cyanobacterial toxins). **Frontiers in Microbiology**, Bethesda, v. 3, p. 138, 2012.

KEHR, J-C.; PICCHI, D.G.; DITTMANN, E. Natural product biosyntheses in cyanobacteria: A treasure trove of unique enzymes. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, Frankfurt, v. 7, p. 1622-1635, 2011.

KELLMANN, R.; NEILAN, B.A. Biochemical characterization of paralytic shellfish toxin biosynthesis *in vitro*. **Journal of Phycology**, Oxford, v. 43, n. 3, p. 497-508, 2007.

KELLMANN, R.; MILLS, T.; NEILAN, B.A. Functional modeling and phylogenetic distribution of putative cylindrospermopsin biosynthesis Enzymes. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 62, n. 3, p. 267–280, 2006.

KELLMANN, R.; MIHALI, T.K.; NEILAN, B.A. Identification of a saxitoxin biosynthesis gene with a history of frequent horizontal gene transfers. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 67, n. 5, p. 526-538, 2008.

KELLMANN, R.; MIHALI, T.K.; JEON, Y.J.; PICKFORD, R.; POMATI, F.; NEILAN, B.A. Biosythetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 74, n. 3, p. 4044–4053, 2008.

KOGLIN, A.; WALSH, C. T. Structural insights into nonribosomal peptide enzymatic assembly lines. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 26, n. 6, p. 987–1000, 2009.

KOMÁREK, J.; HAUER, T. **CyanoDB.cz - On-line database of cyanobacterial genera**. České Budějovice: University of South Bohemia & Inst. of Botany AS CR, 2012. Disponível em: http://www.cyanodb.cz. Acesso: 15 ago. 2012.

KOMÁREK, J. Coccoid and colonial cyanobacteria. In: WEHR, J.D.; SHEATH, R.G. (Ed.). **Freshwater algae of North America**: ecology and classification. New York: Academic Press, 2003. p. 59-116.

KOUZMINOV, A.; RUCK, J.; WOOD, S.A. New Zealand risk management approach for toxic cyanobacteria in drinking water. **Australian and New Zealand Journal of Public Health**, Melbourne, v. 31, n. 3, p. 275-281, 2007.

KRISHNAMURTHY, T.; SZAFRANIEC, L.; HUNT, D. F.; SHABANOWITZ, J.; YATES, J. R.; III, HAUER, C. R.; CARMICHAEL, W. W.; SKULBERG, O.; CODD, G. A.; MISSLER, S. Structural characterization of toxic cyclic peptides from blue-green algae by tandem mass spectrometry. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, DC, v. 86, n. 3, p. 770–774, 1989.

LAGOS, N.; ONODERA, H.; ZAGATTO, P.A.; ANDRINOLO, D.; AZEVEDO, S.M.F.Q.; OSHIMA, Y. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the fresh water cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon**, Oxford, v. 37, n. 10, p. 1359–1373, 1999.

LANE, D.J. 16S/23 rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLWON, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematic**. Chichister: John Wiley & Sons, 1991. p. 115-175.

LARSSON, J.; NYLANDER, J.A.A.; BERGMAN, B. Genome fluctuations in cyanobacteria reflect evolutionary, developmental and adaptive traits. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 11, p. 187, 2011. doi:10.1186/1471-2148-11-187.

LEIKOSKI, N.; FEWER, D.P.; JOKELA, J.; WAHLSTEN, M.; ROUHIAINEN, L.; SIVONEN, K. Highly diverse cyanobactins in strains of the genus *Anabaena*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 76, n. 3, p. 701–709, 2010.

LI, W.I.; BERMA, F.W.; OKINO, T.; YOKOKAWA, F.; SHIOIRI, T.; GERWICK, W.H.; MURRAY, T.F. Antillatoxin is a marine cyanobacterial toxin that potently activates voltage-gated sodium channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, DC, v. 98, n. 13, p. 7599-7604, 2001.

LI, R.; CARMICHAEL, W.W.; BRITTAIN, S.; EAGLESHAM, G.; SHAW, G.; LIU, Y.; WATANABE, M. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). **Journal of Phycology**, Oxford, v. 37, p. 1121–1126, 2001a.

LI, R.; CARMICHAEL, W.W.; BRITTAIN, S.; EAGLESHAM, G.K.; SHAW, G.R.; MAHAKHANT, A.; NOPARATNARAPORN, N.; YONGMANITCHAI, W.; KAYA, K.; WATANABE, M.M. Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). **Toxicon**, Oxford, v. 39, n. 7, p. 973–980, 2001b.

LIN, S.; WU, Z.; YU, G.; ZHU, M.; YU, B.; LI, R. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Planktothrix* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) strains from China. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 9, n. 1, p. 87-97, 2010.

LINCKE, T.; BEHNKEN, S.; ISHIDA, K.; ROTH, M.; HERTWECK, C. Closthioamide: an unprecedented polythioamide antibiotic from the strictly anaerobic bacterium *Clostridium cellulolyticum*. **Angewandte Chemie (International Edition In English),** Weinheim, v. 49, n. 11, p. 2011-2013, 2010.

LLEWELLYN, L.E. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 23, n. 2, p. 200-222, 2006.

LONG, P.F.; DUNLAP, W.C.; BATTERSHILL, C.N.; JASPARS, M. Shotgun cloning and heterologous expression of the patellamide gene cluster as a strategy to achieving sustained metabolite production. **ChemBioChem**, Weinheim, v. 6, n. 10, p. 1760–1765, 2005.

LUESCH, H.; HOFFMANN, D.; HEVEL, J.M.; BECKER, J.E.; GOLAKOTI, T.; MOORE, R.E. Biosynthesis of 4-methylproline in cyanobacteria: cloning of *nose* and *nosf* genes and biochemical characterization of the encoded dehydrogenase and reductase activities. **The Journal of Organic Chemistry**, Washington, DC, v. 68, n. 1, p. 83–91, 2003.

LUKAC, M.; AEGERTER, R. Influence of trace-metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon**, Oxford, v. 31, n. 9, p. 293–305, 1993.

MAGARVEY, N.A.; BECK, Z.Q.; GOLAKOTI, T.; DING, Y.; HUBER, U.; HEMSCHEIDT, T.K.; ABELSON, D.; MOORE, R.E.; SHERMAN, D.H. Biosynthetic characterization and chemoenzymatic assembly of the cryptophycins. Potent anticancer agents from *Nostoc* cyanobionts. **ACS Chemichal Biology**, Washington, DC, v. 1, n. 12, p. 766-779, 2006.

MAHMOOD, N.A.; CARMICHAEL, W.W.; PFAHLER, D. Anticholinesterase poisoning in dogs from cyanobacterial (blue green algae) bloom dominated by *Anabaena flos-aquae*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 49, n. 4, p. 500–503, 1998.

MAHMOOD, N.A.; CARMICHAEL, W.W.; Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525–17. **Toxicon**, Oxford, v. 25, n. 11, p. 1221-1227, 1987.

MAHMOOD, N.A.; CARMICHAEL, W.W. The pharmacology of anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. **Toxicon**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 425–434, 1986.

MANKIEWICZ-BOCZEK, J.; KOKOCIŃSKI, M.; GAGALA, I.; PAWEŁCZYK, J.; JURCZAK, T.; DZIADEK, J.; Preliminary molecular identification of cylindrospermopsin-producing *cyanobacteria* in two Polish lakes (Central Europe). **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 326, n. 2, p. 173-179, 2012.

MARAHIEL, M.A.; STACHELHAUS, T.; MOOTZ, H.D. Modular peptide synthetases in nonribosomal peptide synthesis. **Chemical Reviews**, Easton, v. 97, n. 7, p. 2651-2673, 1997.

MATSUNAGA, S.; MOORE, R.E.; NIEMCZURA, W.P.; CARMICHAEL, W.W. Anatoxin-a(s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, DC, v. 111, n. 20, p. 8021–8023, 1989.

MATTHIENSEN, A.; BEATTIE, K.A.; YUNES, J.S.; KAYA, K.; CODD, G.A. [D-Leu1]-Microcystin-LR, from the cyanobacterium *Microcystis* RST 9501 and from a *Microcystis* bloom in the Patos Lagoon estuary Brazil. **Phytochemistry**, Oxford, v. 55, n. 5, p. 383–387, 2000.

MAZMOUZ, R.; CHAPUIS-HUGON, F.; PICHON, V.; MÉJEAN, A.; PLOUX, O. The last step of the biosynthesis of the cyanotoxins cylindrospermopsin and 7-epi-cylindrospermopsin is catalysed by CyrI, a 2-oxoglutarate-dependent iron oxygenase. **ChemBioChem**, Weinheim, v. 12, p. 858 – 862, 2011.

MAZMOUZ, R.; CHAPUIS-HUGON, F.; MANN, S.; PICHON, V.; MÉJEAN, A.; PLOUX, O. Biosynthesis of cylindrospermopsin and 7-epicylindrospermopsin in *Oscillatoria* sp. strain PCC 6506: identification of the *cyr* gene cluster and toxin analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 76, p. 4943–4949, 2010.

MCGREGOR, G.B.; SENDALL, B.C.; HUNT, L.T.; EAGLESHAM, G.K. Report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from *Raphidiopsis mediterranea* Skuja (Cyanobacteria/Nostocales). **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 10, p. 402–410, 2011.

MCKERNAN, K.; BLANCHARD, A.; KOTLER, L.; COSTA, G**. Reagents, methods, and libraries for bead-based sequencing**. Beverly, MA: Agencourt Bioscience Corp., 2006.

MÉJEAN, A.; MANN, S.; MALDINEY, T.; VASSILIADIS, G.; LEQUIN, O.; PLOUX, O. Evidence that biosynthesis of the neurotoxic alkaloids anatoxin-a and homoanatoxin-a in the cyanobacterium *Oscillatoria* PCC 6506 occurs on a modular polyketide synthase initiated by L-proline. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, DC, v. 131, n. 22, p. 7512-7513, 2009.

MIHALI, T.K.; CARMICHAEL, W.W.; NEILAN, B.A. A putative gene cluster from a *Lyngbya wollei* bloom that encodes paralytic shellfish toxin biosynthesis. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 2, e. 14657, 2011.

MIHALI, T.K.; KELLMANN, R.; NEILAN, B.A. Characterisation of the paralytic shellfish toxin biosynthesis gene clusters in *Anabaena circinalis* AWQC131C and *Aphanizomenon* sp. NH-5. **BMC Biochemistry**, London, v. 10, n. 8, p. 1-13, 2009.

MIHALI, T.K.; KELLMANN, R.; MUENCHHOFF, J.; BARROW, K.D.; NEILAN, B.A. Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 74, n. 3, p. 716–722, 2008.

MOFFITT, M.C.; NEILAN, B.A. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, n. 11, p. 6353-6362, 2004.

MOLICA, R.; ONODERA, H.; GARCIA, C.; RIVAS, M.; ANDRINOLO, D.; NASCIMENTO, S.; MEGURO, H.; OSHIMA, Y.; AZEVEDO, S.; LAGOS, N. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. **Phycologia**, Odense, v. 41, n. 6, p. 606–611, 2002.

MOLICA, R.J.R.; OLIVEIRA, E.J.A.; CARVALHO, P.V.V.C.; COSTA, A.N.S.F.; CUNHA, M.C.C.; MELO, G.L.; AZEVEDO, S.M.F.O. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 4, n. 4, p. 743–753, 2005.

MOFFITT, M.C.; NEILAN, B.A. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, n. 11, p. 6353-6362, 2004.

MOUSTAFA, A.; LORAM, J.E.; HACKETT, J.D.; ANDERSON, D.M.; PLUMLEY, F.G.; BHATTACHARYA, D. Origin of saxitoxin biosynthetic genes in cyanobacteria. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 4, n. 6, e. 5758, 2009.

MUENCHHOFF, J.; SIDDIQUI K,S.; POLJAK, A.; RAFTERY, M.J.; BARROW, K.D.; NEILAN, B.A. A novel prokaryotic L-arginine:glycine amidinotransferase is involved in cylindrospermopsin biosynthesis. **FEBS Journal**, Oxford, v. 277, n. 18, p. 3844–3860, 2010.

MURAKAMI, M.; SUN, Q.; ISHIDA, K.; MATSUDA, H.; OKINO, T.; YAMAGUCHI, K. Microviridins, elastase inhibitors from the cyanobacterium *Nostoc minutum* (NIES-26). **Phytochemistry**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 1197–1202, 1997.

MURAKAMI, M.; ISHIDA, K.; OKINO, T.; OKITA, Y.; MATSUDA, H.; YAMAGUCHI, K. Aeruginosins 98-A and B, trypsin inhibitors from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (NIES-98). **Tetrahedron Letters,** Oxford, v. 36, n. 16, p. 2785–2788, 1995.

MURRAY, S.A.; MIHALI, T.K.; NEILAN, B.A. Extraordinary conservation, gene loss and positive select ion in the evolution of an ancient neurotoxin. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 3, p. 1173–1182, 2011.

NAMIKOSHI, M.; MURAKAMI, T.; FUJIWARA, T.; NAGAI, H.; NIKI, T.; HARIGAYA, E.; WATANABE, M.F.; ODA, T. YAMADA, J.; TSUJIMURA, S. Biosynthesis and transformation of homoanatoxin-a in the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja and structures of three new homologues. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, DC, v. 17, n. 12, p. 1692–1696, 2004.

NAMIKOSHI, M.; MURAKAMI, T.; WATANABE, M.F.; ODA, T.; YAMADA, J.; TSUJIMURA, S.; NAGAI, H.; OISHI, S. Simultaneous production of homoanatoxin-a, anatoxin-a, and a new non-toxic 4-hydrox-yhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. **Toxicon**, Oxford, v. 42, n. 5, p. 533–538, 2003.

NAMIKOSHI, M.; RINEHART, K.L.; SAKAI, R.; STOTTS, R.R.; DAHLEM, A.M.; BEASLEY, V.R.; CARMICHAEL, W.W.; EVANS, W.R. Identification of 12 hepatotoxins from a Homer Lake bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, and *Microcystis wesenbergii*: nine new microcystins. **Journal of Organic Chemistry**, Washington,DC, v. 57, n. 3, p. 866-872, 1992.

NEGRI, A.P.; JONES, G.J. Bioaccumulation of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins from the cyanobacterium *Anabaena circinalis* by the freshwater mussel *Alathyria condola*. **Toxicon**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 667–678, 1995.

NEGRI, A.P.; JONES, G.J.; HINDMARSH, M. Sheep mortality associated with paralytic shellfish poisoning toxins from the cyanobacterium *Anabaena circinalis.* **Toxicon**, Oxford, v. 33, n. 10, p. 1321–1329, 1995.

NEILAN, B.A.; PEARSON, L.A.; MUENCHHOFF, J.; MOFFITT, M.C.; DITTMANN, E. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. **Environmental Microbiology**, Oxford, 2012. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02729.x.

NEILAN, B.A.; PEARSON, L.A.; MOFFITT, M.C.; MIHALI, K.T.; KAEBERNICK, M.; KELLMANN, R.; POMATI, F. Chapter 17: The genetics and genomics of cyanobacterial toxicity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 619, p. 417-452, 2008.

NEILAN, B.A.; SAKER, M.L.; FASTNER, J.; TÖRÖKNÉ, A.; BURNS, B.P. Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 133-140, 2003.

NEILAN, B.A.; JACOBS, D.; DEL DOT, T.; BLACKALL, L.L.; HAWKINS, P.R.; COX, P.T.; GOODMAN, A.E. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 47, n. 3, p. 693-697, 1997.

NISHIZAWA, T.; UEDA, A.; ASAYASMA, M.; FUJII, K.; HARADA, K.-I.; OCHI, K.; SHIRAI, M. Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 127, n. 5, 779-789, 2000.

NISHIZAWA, T.; ASAYAMA, M.; FUJII, K.; HARADA, K.; SHIRAI, M. Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* sp. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 126, n. 3, p. 520-529, 1999.

NORRIS, R.L.; EAGLESHAM, G.K.; PIERENS, G.; SHAW, G.R.; SMITH, M.J.; CHISWELL, R.K.; SEAWRIGHT, A.A.; MOORE, M.R. Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Environmental Toxicology**, New York, v. 14, n. 1, p. 163–165, 1999.

NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; MUYZER, G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, n. 6, p. 3327-3332, 1997.

OKINO, T.; MATSUDA, H.; MURAKAMI, M.; YAMAGUCHI, K. New microviridins, elastase inhibitors from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Tetrahedron**, Amsterdam, v. 51, n. 39, p. 10679-10686, 1995.

OKINO, T.; MURAKAMI, M.; HARAGUCHI, R.; MUNEKATA, H.; MATSUDA, H. Micropeptins A and B, plasmin and trypsin inhibitors from the blue green alga *Microcystis aeruginosa*. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 34, n. 3, p. 8131–8134, 1993.

OKSANEN, I.; JOKELA, J.; FEWER, D.P.; WAHLSTEN, M.; RIKKINEN, J.; SIVONEN, K. Discovery of rare and highly toxic microcystins from lichenassociated cyanobacterium *Nostoc* sp. strain IO-102-I. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, n. 10, p. 5756–5763, 2004.

OMAN, T.J.; VAN DER DONK, W.A. Follow the leader: the use of leader peptides to guide natural product biosynthesis. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 6, p. 9–18, 2010.

OHTANI, I.; MOORE, R.E.; RUNNEGAR, M.T.C. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, DC, v. 114, n. 20, p. 7942–7944, 1992.

ONODERA, H.; OSHIMA, Y.; HENRIKSEN, P.; YASUMOTO, T. Confirmation of anatoxin-a(s), in the cyanobacterium *Anabaena lemmermannii*, as the cause of bird kills in Danish lakes. **Toxicon**, Oxford, v. 35, n. 11, p. 1645–1648, 1997.

PALMER, C.M. **Report on the algae in relation to water quality of Paranoa Lake, Brasília: Relatório de Consultoria**. Brasília, DF: Pan American Health Organization/WHO, 1969.

PAN, X.; CHANG, F.; KANG, L.; LI, G.; LI, D.; LIU, Y.; SHEN, Y.; WEI, Z. Morphological characteristics and phylogenetic relationship of *Anabaena* species from Lakes Dianchi and Erhai, China. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 614, n. 1, p. 353-362, 2008.

PARK, H.; NAMIKOSHI, M.; BRITTAINC, S.M.; CARMICHAEL, W.W.; MURPHY, T. [D-Leu^{1}] microcystin-LR, a new microcystin isolated from waterbloom in a Canadian prairie lake. **Toxicon**, Oxford, v. 39, n. 6, p. 855-862, 2001.

PARK, H.D.; WATANABE, M.F.; HARDA, K.; NAGAI, H.; SUZUKI, M.; WATANABE, M.; HAYASHI, H. Hepatotoxin (microcystin) and neurotoxin (anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters. **Natural Toxins**, New York, v. 1, n. 6, p. 353–360, 1993.

PATTERSON, G.M.L.; LARSEN, L.K.; MOORE, R.E. Bioactive natural products from blue-green algae. **Journal Applied Phycology**, Amsterdam, v. 6, p. 151–157, 1994.

PEARSON, L.; MIHALI, T.; MOFITT, M.; KELLMANN, R.; NEILAN, B.; On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. **Marine Drugs**, Basel, v. 8, n. 5, p. 1650–1680, 2010.

PEARSON, L.A.; NEILAN, B.A. The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 19, n. 3, p. 281–288, 2008.

PHILMUS, B.; CHRISTIANSEN, G.; YOSHIDA, W.Y.; HEMSCHEIDT, T.K. Post-translational modification in microviridin biosynthesis. **ChemBioChem**, Weinheim, v. 9, n. 18, p. 3066–3073, 2008.

PLOUTNO, A.; CARMELI, S. Modified peptides from a water bloom of the cyanobacterium *Nostoc* sp. **Tetrahedron**, Amsterdam, v. 58, n. 50, p. 9949–9957, 2002.

POMATI, F.; MOFFITT, M.C.; CAVALIERE, R.; NEILAN, B.A. Evidence for differences in the metabolism of saxitoxin and C1/C2 toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1674, n. 1, p. 60-67, 2004.

PORTMANN, C.; BLOM, J.F.; GADEMANN, K.; JÜTTNER, F. Aerucyclamides A and B: isolation and synthesis of toxic ribosomal heterocyclic peptides from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. **Journal of Natural Products**, Gorakhpur, v. 71, n. 7, p. 1193–1196, 2008a.

PORTMANN, C.; BLOM, J.F.; KAISER, M.; BRUN, R.; JÜTTNE, F.; GADEMANN, K. Isolation of aerucyclamides C and D and structure revision of microcyclamide 7806A: heterocyclic ribosomal peptides from *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 and their antiparasite evaluation. **Journal of Natural Products**, Gorakhpur, v. 71, n. 11, p. 1891–1896, 2008b.

PREUβEL, K.; STÜKEN, A.; WIEDNER, C.; CHORUS, I.; FASTNER, J. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. **Toxicon**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 156–162, 2006.

RAJANIEMI, P.; HROUZEK, P.; KAŠTOVSKÁ, K.; WILLAME, R.; RANTALA, A.; HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; SIVONEN, K. Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, n. 1, p. 11-26, 2005a.

RAJANIEMI, P.; KOMÁREK, J.; WILLAME, R.; Hrouzek, P.; Kaštovská, K.; Hoffmann, L.; Sivonen, K. Taxonomic consequences from the combined molecular and phenotype evaluation of selected *Anabaena* and *Aphanizomenon* strains. **Algological Studies**, Sttutgart, v. 117, n. 6, p. 371-391, 2005b.

RANTALA, A.; FEWER, D. P.; HISBERGUES, M.; ROUHIAINEN, L.; VAITOMAA, J.; BÖRNER, T.; SIVONEN, K. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, DC, v. 101, n. 2, p. 568-573, 2004.

RASMUSSEN, J.P.; GLIGIO, S.; MONIS, P.T.; CAMPBELL, R.J.; SAINT, C.P. Development and field testing of a real-time PCR assay for cylindrospermopsin-producing cyanobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, London, v. 104, n. 5, p. 1503-1515, 2008.

RAVEH, A.; MOSHE, S.; EVRON, Z.; FLESCHER, E.; CARMELI, S. Novel thiazole and oxazole containing cyclic hexapeptides from a waterbloom of the cyanobacterium *Microcystis* sp. **Tetrahedron**, Amstedam, v. 66, n. 14, p. 2705–2712, 2010.

RESHEF, V.; CARMELI, S. New microviridins from a water bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Tetrahedron**, Amsterdam, v. 62, n. 31, p. 7361–7369, 2006.

RESHEF, V.; CARMELI, S. Protease inhibitors from a water bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Tetrahedron**, Amsterdam, v. 57, n. 14, p. 2885–2894, 2001.

ROHRLACK, T.; CHRISTOFFERSEN, K.; HANSEN, P.E.; ZHANG, W.; CZARNECKI, O.; HENNING, M.; FASTNER, J.; ERHARD, M.; NEILAN, B.A.; KAEBERNICK, M. Isolation, characterization, and quantitative analysis of microviridin J, a new *Microcystis* metabolite toxic to *Daphnia*. **Journal of Chemical Ecology**, Amsterdam, v. 29, n. 8, p. 1757–1770, 2003.

ROHRLACK, T.; CHRISTOFFERSEN, K.; KAEBERNICK, M.; NEILAN, B.A. Cyanobacterial protease inhibitor microviridin J causes a lethal molting disruption in *Daphnia pulicaria*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, n. 8, p. 5047–5050, 2004.

ROTHBERG, J.M.; HINZ, W.; REARICK, T.M.; SCHULTZ, J.; MILESKI, W.; DAVEY, M.; LEAMON, J.H.; JOHNSON, K.; MILGREW, M.J.; EDWARDS, M.; HOON, J.; SIMONS, J.F.; MARRAN, D.; MYERS, J.W.; DAVIDSON, J.F.; BRANTING, A.; NOBILE, J.R.; PUC, B.P.; LIGHT, D.; CLARK, T.A.; HUBER, M.; BRANCIFORTE, J.T.; STONER, I.B.; CAWLEY, S.E.; LYONS, M.; FU, Y.; HOMER, N.; SEDOVA, M.; MIAO, X.; REED, B.; SABINA, J.; FEIERSTEIN, E.; SCHORN, M.; ALANJARY, M.; DIMALANTA, E.; DRESSMAN, D.; KASINSKAS, R.; SOKOLSKY, T.; FIDANZA, J.A.; NAMSARAEV, E.; MCKERNAN, K.J.; WILLIAMS, A.; ROTH, G.T.; BUSTILLO, J. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. **Nature**, London, v. 475, p. 348-352, 2011.

ROUHIAINEN, L.; VAKKILAINEN, T.; SIEMER, B.L.; BUIKEMA, W.; HASELKORN, R.; SIVONEN, K. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (Microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, n. 2, p. 686-692, 2004.

ROUHIAINEN, L.; PAULIN, L.; SUOMALAINEN, S.; HYYTIAINEN, H.; BUIKEMA, W.; HASELKORN, R.; SIVONEN, K. Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in Anabaena strain 90. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 156–167, 2000.

RÜCKER, J.; STÜKEN, A.; NIXDORF, B.; FASTNER, J.; CHORUS, I.; WIEDNER, C. Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin (CYN) in 2 *Aphanizomenon* dominated lakes of North East Germany. **Toxicon**, Oxford, v. 50, n. 6, p. 800–809, 2007.

RUDI, K.; SKULBERG, O.M.; JAKOBSEN, K.S. Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 180, n. 13, p. 3453-3461, 1998.

RUDI, K.; SKULBERG, O.M.; LARSEN, F.; JAKOBSEN, K.S. Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6, V7, and V8. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, n. 7, p. 2593-2599, 1997.

RUNNEGAR, M.T.; KONG, S.M.; ZHONG, Y.Z.; LU, S.C. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. **Biochemical Pharmacology**, London, v. 49, p. 219–225, 1995.

RUNNEGAR, M.T.; KONG, S.M.; ZHONG, Y.Z.; GE, J.L.; LU, S.C. The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 201, p. 235–241, 1994.

RUNNEGAR, M.T.; XIE, C.; SNIDER, B.B.; WALLACE, G.A.; WEINREB, S.M.; KUHLENKAMP, J. In vitro hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related synthetic analogues. **Toxicological Sciences**, San Diego, v. 67, n. 1, p. 81–87, 2002.

RUTHERFORD, K.; PARKHILL, J.; CROOK, J.; HORSNELL, T.; RICE, P.; RAJANDREAM, M-A.; BARRELL, B. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, Oxford, v. 16, n. 10, p. 944–945, 2000.

SAKER, M.L.; EAGLESHAM, G.K. The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the Redclaw crayfish. Cherax quandricarinatus. **Toxicon**, Oxford, v. 37, n. 7, p. 1065-1077, 1999.

SAKER, M.L.; NEILAN, B.A.; GRIFFITHS, D.J. Two morphological forms of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolated from Solomon Dam, Palm Island, Queensland. **Journal of Phycology,** Oxford, v. 35, n. 3, p. 599–606, 1999.

SAKER, M.L.; THOMAS, A.D.; NORTON, J.H. Cattle mortality attributed to the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in an outback region of north Queensland. **Environmental Toxicology**, New York, v. 14, n. 1, p. 179–182, 1999.

SAKER, M.L.; NOGUEIRA, I.C.G.; VASCONCELOS, V.M.; NEILAN, B.A.; EAGLESHAM, G.K.; PEREIRA, P. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. **Ecotoxicology and Environmental Safety,** New York, v. 55, n. 2, p. 243–250, 2003.

SALZBERG, S.L.; DELCHER, A.L.; KASIF, S.; QHITE, O. Microbial gene identification using interpolated Markov models. **Nucleic Acids Research**, London, v. 26, n. 2, p. 544-548, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academic Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

SANO, T.; USUI, T.; UEDA, K.; OSADA, L.; KAYA, K. Isolation of new protein phosphatase inhibitors from two cyanobacteria species, *Planktothrix* sp. **Journal of Natural Products**, Gorakhpur, v. 64, n. 8, p. 1052–1055, 2001.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; WERNER, V.R.; DOGO, C.R.; RIOS, F.R.; CARVALHO, L.R. Review of toxic species of cyanobacteria in Brazil. **Algological Studies**, Sttutgart, v. 126, p. 251-265, 2008.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P. Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil. **Nova Hedwigia**, Weinheim, v. 71, p. 359-385, 2000.

SCHEMBRI, M.A.; NEILAN, B.A.; SAINT, C.P. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Environmental Toxicology**, New York, v. 16, n. 5, p. 413–421, 2001.

SCHMIDT, E.W.; DONIA, M,S. Cyanobactin ribosomally synthesized peptides — a case of deep metagenome mining. **Methods in Enzymology**, New York, v. 458, p. 575–596, 2009.

SCHMIDT, E.W.; NELSON, J.T.; RASKO, D.A.; SUDEK, S.; EISEN, J.A.; HAYGOOD, M.G.; RAVEL, J. Patellamide A and C biosynthesis by a microcin-like pathway in Prochloron didemni , the cyanobacterial symbiont of Lissoclinum patella. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 102, n. 20, p. 7315– 7320, 2005.

SCHWARZER, D.; FINKING, R.; MARAHIEL, M.A. Nonribosomal peptides: from genes to products. **Natural Products Reports**, Cambridge, v. 20, p. 275–287, 2003.

SEIFERT, M.; MCGREGOR, G.; EAGLESHAM, G.; WICKRAMASINGHE, W.; SHAW, G. First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 6, n. 1, p. 73–80, 2007.

SEAWRIGHT, A.A.; NOLAN, C.C.; SHAW, G.R.; CHRISWELL, R.K.; NORRIS, R.L.; MOORE, M.R.; SMITH, M. The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska). **Environmental Toxicology**, New York, v. 14, n. 1, p. 135-142, 1999.

SEVILLA, E.; MARTIN-LUNA, B.; VELA, L.; BES, M.T.; FILLAT, M.F.; PELEATO, M.L. Iron availability affects *mcyD* expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 10, n. 10, p. 2476–2483, 2008.

SEENAYYA, G.; SUBBA RAJU, N. On the ecology and systematic position of the alga known as *Anabaenopsis raciborskii* (Wolosz.) Elenk. and a critical evaluation of the forms described under the genus *Anabaenopsis*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TAXONOMY AND BIOLOGY OF BLUE-GREEN ALGAE, 1., 1972, Madras, India. **Papers…** Madras, India: University of Madras, 1972. p. 52–57.

SELWOOD, A.I.; HOLLAND, P.T.; WOOD, S.A.; SMITH, K.F.; MCNABB, P.S. Production of anatoxin-a and a novel biosynthetic precursor by the cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoi*. **Environmental Science and Technology**, Washington, DC, v. 41, n. 2, p. 506–510, 2007.

SHALEV-ALON, G.; SUKENIK, A.; LIVNAH, O.; SCHWARZ, R.; KAPLAN, A. A novel gene encoding amidinotransferase in the cylindrospermopsin producing cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 209, n. 1, p. 87-91, 2002.

SHAW, G.R.; SUKENIK, A.; LIVNE, A.; CHISWELL, R.K.; SMITH, M.J.; SEAWRIGHT, A.A.; NORRIS, R.L.; EAGLESHAM, G.K.; MOORE, M.R. Blooms of the hepatotoxic cyanobacterium, *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) in newly constructed lakes, Queensland, Australia. **Environmental Toxicology**, New York, v. 14, p. 167–177, 1999.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 10, p. 1135-1145, 2008.

SHIMIZU, Y. Microalgal metabolites: a new perspective. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 50, p. 43–465, 1996.

SILVA-STENICO, M.E.; SILVA, C.S.P.; LORENZI, A.S.; SHISHIDO, T.K.; ETCHEGARAY, A.; LIRA, S.P.; MORAES, L.A.B.; FIORE, M.F. Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. **Microbiological Research**, Jena, v. 166, n. 3, p. 161-175, 2011.

SINHA, R.; PEARSON, L.A.; DAVIS, T.W.; BURFORD, M.A.; ORR, P.T.; NEILAN, B.A. Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones - Is climate change responsible? **Water Research**, New York, v. 46, n. 5, p. 1408–1419, 2012.

SIVONEN, K.; LEIKOSKI, N.; FEWER, D.P.; JOKELA, J. Cyanobactins — ribosomal cyclic peptides produced by cyanobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 86, n. 5, p. 1213–1225, 2010.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxin. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacterial in water**: A guide to their public health consequences, monitoring, and management. London: Spoon, 1999. p. 41-111.

SIVONEN, K.; NAMIKOSHI, M.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W.; SUN, F.; ROUHIAINEN, L.; LUUKKAINEN, R.; RINEHART, K.L. Isolation and characterization of a variety of microcystins from seven strains of the cyanobacterial genus *Anabaena*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 58, n. 8, p. 2495-2500, 1992.

SIVONEN, K.; CARMICHAEL, W.W.; NAMIKOSHI, M.; RINEHART, K.L.; DAHLEM, A.M.; NIEMELA, S.I. Isolation and characterization of hepatotoxic microcystin homologs from the filamentous freshwater cyanobacterium Nostoc sp. strain 152. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington,DC, v. 56, n. 9, p. 2650–2657, 1990.

SIVONEN, K.; HIMBERG, K.; LUUKKAINEN, R.; NIEMELÄ, S.I.; POON, G.K.; CODD, G.A. Preliminary characterization of neurotoxic cyanobacteria blooms and strains from Finland. **Toxicity Assessment**, New York, v. 4, n. 3, p. 339–352, 1989.

SKULBERG, O.M. Biophotolysis, hydrogen production and algal culture technology. In: YÜRUM, Y. (Ed). **Hydrogen energy system**. Production and utilization of hydrogen and future aspects. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 95-110.

SKULBERG, O.M.; CARMICHAEL, W.W.; ANDERSEN, R.A.; MATSUNAGA, S.; MOORE, R.E.; SKULBERG, R. Investigations of a neurotoxic oscillatorialean strain (Cyanophyceae) and its toxin. Isolation and characterization of homoanatoxin-a. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 11, n. 3, p. 321–329, 1992.

SOTO-LIEBE, K.; MURILLO, A.A.; KROCK, B.; STUCKEN, K.; FUENTES-VALDÉS, J.J.; TREFAULT, N.; CEMBELLA, A.; VÁSQUEZ, M. Reassessment of the toxin profile of *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 and function of putative sulfotransferases in synthesis of sulfated and sulfonated PSP toxins. **Toxicon**, Oxford, v. 56, n. 8, p. 1350–1361, 2010.

SOUZA, R.C.R.; CARVALHO, M.C.; TRUZZI, A.C. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanophyceae) dominance and contribution to the knowledge of Rio Pequeno Arm, Billings reservoir, Brazil. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v. 13, p. 73-81, 1998.

SPOOF, L.; BERG, K.A.; RAPALA, J.; LAHTI, K.; LEPISTÖ, L.; METCALF, J.S.; CODD, G.A.; MERILUOTO, J. First observation of cylindrospermopsinin *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland). **Environmental Toxicology**, New York, v. 21, n. 6, p. 552–560, 2006.

STANIER, R.Y. The position of cyanobacterial in the world of phototrophs. **Carlsberg Research Communications**, Copenhagen, v. 42, p. 77-98, 1977.

STANIER, R.Y.; COHEN-BAZIRE, G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. **Annual Reviews on Microbiology**, Palo Altov. 31, p. 225-274, 1977.

STANIER, R.Y.; KUNISAWA, R.; MANDEL, M.; COHEN-BAZIRE, G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v. 35, n. 2, p. 171-205, 1971.

STAUNTON, J.; WEISSMAN, K.J. Polyketide biosynthesis: a millennium review. **Natural Products Reports**, Cambridge, v. 18, p. 380–416, 2001.

SUDEK, S.; HAYGOOD, M.G.; YOUSSEF, D.T.; SCHMIDT, E.W. Structure of trichamide, a cyclic peptide from the bloom-forming cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum*, predicted from the genome sequence. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 72, n. 6, p. 4382–4387, 2006.

STUCKEN, K.; JOHN, U.; CEMBELLA, A.; MURILLO, A.A.; SOTO-LIEBE, K.; FUENTES-VALDÉS, J.J.; FRIEDEL, M.; PLOMINSKY, A.M.; VÁSQUEZ, M.; GLÖCKNER, G. The smallest known genomes of multicellular and toxic cyanobacteria: comparison, minimal gene sets for linked traits and the evolutionary implications. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 5, n. 2, e. 9235, 2010.

STÜKEN, A; ORR, R.J.S.; KELLMANN, R.; MURRAY, S.A.; NEILAN, B.A.; JAKOBSEN, K.S. Discovery of nuclear-encoded genes for the neurotoxin saxitoxin in dinoflagellates. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 5, e. 20096, 2011.

STÜKEN, A.; JAKOBSEN, K.S. The cylindrospermopsin gene cluster of *Aphanizomenon* sp. strain 10E6: organization and recombination. **Microbiology**, Reading, v. 156, n. 8, p. 2438–2451, 2010.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, p. 2731–2739, 2011.

TAN, L.T. Filamentous tropical marine cyanobacteria: a rich source of natural products for anticancer drug discovery. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 22, n. 5, p. 659-676, 2010.

TANABE, Y.; SANO, T.; KASAI, F.; WATANABE, M.M. Recombination, cryptic clades and neutral molecular divergence of the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 9, p. 1-14, 2009.

TERAO, K.; OHMORI, S.; IGARASHI, K.; OHTANI, I.; WATANABE, M.F.; HARADA, K.I.; ITO, E.; WATANABE, M. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from the blue-green alga *Umezakia natans*. **Toxicon**, Oxford, v. 32, n. 7, p. 833–844, 1994.

TESTE, V.; BRIAND, J. F.; NICHOLSON, B.C.; PUISEUX-DAO, S. Comparison of changes in toxicity during growth of *Anabaena circinale* (Cyanobacteria) determined by mouse neuroblastoma bioassay and HPLC. **Journal Applied Phycology**, Amsterdam, v. 14, n. 5, p. 399–407, 2002.

TILLETT, D.; DITTMANN, E.; ERHARD, M.; VON DÖHREN, H.; BÖRNER, T.; NEILAN, B.A. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. **Chemical Biology**, Cambridge, v. 7, n. 10, p. 753-764, 2000.

TODOROVA, A.K.; JÜTTNER, F.; LINDEN, A.; PLÜSS, T.; VON PHILIPSBORN, W. Nostocyclamide: a new macrocyclic, thiazolecontaining allelochemical from *Nostoc* sp. 31 (Cyanobacteria). **Journal of Organic Chemistry**, Washington, DC, v. 60, n. 24, p. 7891–7895, 1995.

TRIMURTULU, G.; OHTANI, I.; PATTERSON, G.M.L.; MOORE, R.E.; CORBETT, T.H.; VALERIOTE, F.A.; DEMCHIK, L. Total structures of cryptophycins, potent antitumor depsipeptides from the blue-green alga *Nostoc* sp. strain GSV 224. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, DC, v. 116, n. 11, p. 4729-4737, 1994.

TUCCI, A.; SANT'ANNA, C.L. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 97-112, 2003.

TURCATTI, G.; ROMIEU, A.; FEDURCO, M.; TAIRI, A-P. A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. **Nucleic Acids Research**, London, v. 36, n. 4, p. e25, 2008.

TURNER, S. Molecular systematics of oxygenic photosynthetic bacteria. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 11, p. 13-52, 1997.

UENO, Y.; NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; HASEGAWA, A.; WATANABE, M.F.; PARK, H.; CHEN, G.; CHEN, G.-C.; YU, S.-Z. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. **Carcinogenesis**, London, v 17, n. 6, p.1317-1321, 1996.

VETTING, M.W.; DE CARVALHO, L.P.S.; YU, M.; HEDGE, S.S.; MAGNET, S.; RODERICK, S.L.; BLANCHARD, J.S. Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 433, n. 1, p. 212–226, 2005.

VEZIE, C.; RAPALA, J.; VAITOMAA, J.; SEITSONEN, J.; SIVONEN, K. Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. **Microbial Ecology,** Oldendorf, v. 43, n. 4, p. 443–454, 2002.

VEZIE, C.; BRIENT L.; SIVONEN, K.; BERTRU, G.; LEFEUVRE, J.C.; SALONEN, M.S.A. Variation of microcystin content of cyanobacterial blooms and isolated strains in lake Grand – Lieu(France). **Microbial Ecology**, Oldendorf, v 35, n. 2, p. 126–153, 1998.

VIAGGIU, E.; MELCHIORRE, S.; VOLPI, F.; DI CORCIA, A.; MANCINI, R.; GARIBALDI, L.; CRICHIGNO, G.; BRUNO, M. Anatoxin-a toxin in the cyanobacte-rium *Planktothrix rubescens* from a fishing pond in northern Italy. **Environmental Toxicology**, New York, v. 19, n. 3, p. 191–197, 2004.

VIA-ORDORIKA, L.; FASTNER, J.; KURMAYER, R.; HISBERGUES, M.; DITTMANN, E.; KOMAREK, J.; ERHARD, M.; CHORUS, I. Distribution of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* sp. in European freshwater bodies: detection of microcystins and microcystin genes in individual colonies**. Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, n. 5, p. 592–602, 2004.

VON DÖHREN, H.; KELLER, U.; VATER, J.; ZOCHER, R. Multifunctional peptide synthetases. **Chemical Reviews**, Easton, v. 29, n. 7, p. 2675-2706, 1997.

WACKLIN, P.; HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J. Nomenclatural validation of the genetically revised cyanobacterial genus *Dolichospermum* (Ralfs ex Bornet et Flahault) comb. nova. **Fottea**, Praha, v. 9, n. 1, p. 59–64, 2009.

WATERBURY, J.B.; WATSON, S.W.; GUILLARD, R.R.L.; BRAND, L.E. Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic, cyanobacterium. **Nature**, London, v. 277, p. 293-294, 1979.

WEIZ, A.R. **Characterization and manipulation of the biosynthetic pathway of cyanobacterial tricyclic microviridins in *E. coli***. 2012. 158 f. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade de Humboldt, Berlim, Alemanha, 2012.

WELKER, M.; VON DÖHREN, H. Cyanobacterial peptides – nature's own combinatorial biosynthesis. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 30, n. 4, p. 530-563, 2006.

WERNER. V.R.; LAUGHINGHOUSE IV, H.D.; SANT'ANNA, C.L.; FIORE, M.F.; HOFF, C.; SANTOS, K.R.S.; NEUHAUS, E.B.; MOLICA, R.J.R.; HONDA, R.Y.; ECHENIQUE, R.O. Morphological and molecular studies of ***Sphaerospermopsis torques-reginae*** (Cyanobacteria, Nostocales) from South American water blooms. **Phycologia**, Oldense, v. 51, n. 2, p. 228-238, 2012.

WERNER, V.R.; LAUGHINGHOUSE IV, D.H. Bloom forming and other planktonic *Anabaena* (Cyanobacteria) morphospecies with twisted trichomes from Rio Grande do Sul State, Brazil. **Nova Hedwigia**, Weinheim, v. 89, n.1-2, p. 17-47, 2009.

WERNER, V.R.; TORGAN, L.C.; YUNES, J.S.; CUNHA, M.T. **Ocorrência de floração de cianofícea (cianobactéria) tóxica na represa de Itaúba, Rio Grande do Sul, Brasil**. In: Seminário internacional represa do Lobo-Broa: 30 anos de pesquisa em limnologia, gerenciamento e participação da comunidade e bases científicas para o gerenciamento da eutrofização. São Carlos, SP, 2000.

WIEDNER, C.; RUCKER, J.; BRÜGGEMANN, R.; NIXDORF, B. Climate change affects timing and size of populations of an invasive cyanobacterium in temperate regions. **Oecologia**, Paris, v. 152, n. 3, p. 473- 484, 2007.

WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. **Toxicology and Applied Pharmacology,** San Diego, v. 203, n. 3, p. 201–218, 2005.

WIESE, M.; D'AGOSTINO, P.M.; MIHALI, T.K.; MOFFITT, M.C.; NEILAN, B.A. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. **Marine Drugs**, Basel, v. 8, n. 7, p. 2185–2211, 2010.

WILLAME, R.; BOUTTE, C.; GRUBISIC, S.; WILMOTTE, A.; KOMÁREK, J.; HOFFMANN, L. Morphological and molecular characterization of planktonic cyanobacteria from Belgium and Luxembourg. **Journal of Phycology**, Oxford, v. 42, n. 6, p. 1312-1332, 2006.

WILMOTTE, A. Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In: BRYANT, D.A. (Ed.). **The molecular biology of cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. v.1, p. 1-25.

WINTER, J.M.; BEHNKEN, S.; HERTWECK, C. Genomics-inspired discovery of natural products. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 15, n. 1, p. 22-31, 2011.

WOOD, S.A.; RASMUSSEN, J.P.; HOLLAND, P.T.; CAMPBELL, R.; CROWE, A.L.M. First report of the cyanotoxin anatoxin-a from *Aphanizomenon issatschenkoi* (Cyanobacteria). **Journal of Phycology**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 356–365, 2007.

WOOD, S.A.; STIRLING, D.J. First identification of the cylindrospermopsin-producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in New Zealand. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, Wellington, v. 37, n. 4, p. 821-828, 2003.

YANNI, Y.G.; CARMICHAEL, W.W. Screening of cyanobacteria isolated from soil, rice fields and water resources of the Nile Delta for production of cyanotoxins. In:

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMFUL ALGAE, 8., 1997, Vigo, Spain. v. 216, p. 25-29.

YILMAZ, M.; PHLIPS, E.J. Diversity of and selection acting on cylindrospermopsin *cyrB* gene adenylation domain Sequences in Florida. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 77, n. 7, p. 2502-2507, 2011.

YUNES, J.S.; CUNHA, N.T.; CONTE, S.M.; RABELLO, I.M.; GIORDANI, A.T.; BEND-ATTI, M.M.; MAIZONAVE, C.M.; GRANADA, G.L.; HEIN, R.P. Programa ÁguaAN: agilização do gerenciamento e utilização de águas com algas nocivas. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 27., 2000, Porto Alegre.

YUNES, J.S.; PROENÇA, L.A.O.; MONSERRAT, J.M. Cyanobacterial Neurotoxins from Southern Brazil. **Comments on Toxicology**, Philadelphia, v. 9, n.2, p. 103-115, 2003.

ZAPOMELOVÁ, E.; JEZBEROVÁ, J.; HROUZEK, P.; HISEM, D.; REHÁKOVÁ, K.; KOMÁRKOVÁ, J. Polyphasic characterization of three strains of *Anabaena reniformis* and *Aphanizomenon aphanizomenoides* (Cyanobacteria) and their reclassification to *Sphaerospermum* gen. nov. (incl. *Anabaena kisseleviana*). **Journal of Phycology**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 1363-1373, 2009.

ZAPOMELOVÁ, E.; JEZBEROVÁ, J.; HROUZEK, P.; HISEM, D.; REHÁKOVÁ, K.; KOMÁRKOVÁ, J. Nomenclatural Note: Polyphasic characterization of three strains of *Anabaena reniformis* and *Aphanizomenon aphanizomenoides* (Cyanobacteria) and their reclassification to *Sphaerospermum* gen. nov. (incl. *Anabaena kisseleviana*). **Journal of Phycology**, Oxford, v. 45, n. 2, p. 415, 2010.

ZERBINO, D.R.; BIRNEY, E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**, Woodbury, v. 18, n. 5, p. 821–829, 2008.

ZIEMERT, N.; ISHIDA, K.; WEIZ, A.; HERTWECK, C.; DITTMANN, E. Exploiting the Natural Diversity of Microviridin Gene Clusters for Discovery of Novel Tricyclic Depsipeptides. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington,DC, v. 76, n. 11, p. 3568–3574, 2010.

ZIEMERT, N.; ISHIDA, K.; QUILLARDET, P.; BOUCHIER, C.; HERTWECK, C.; TANDEAU DE MARSAC, N.; DITTMANN, E. Microcyclamide biosynthesis in two strains of *Microcystis aeruginosa*: from structure to genes and vice versa. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 74, n. 6, p. 1791–1797, 2008a.

ZIEMERT, N.; ISHIDA, K.; LIAIMER, A.; HERTWECK, C.; DITTMANN, E. Ribosomal synthesis of tricyclic depsipeptides in bloom-forming cyanobacteria. **Angewandte Chemie (International edition in English)**, Weinheim, v. 47, n. 40, p. 7756–7759, 2008b.

ZILLIGES, Y.; KEHR, J.C.; MEISSNER, S.; ISHIDA, K.; MIKKAT, S.; HAGEMANN, M.; APLAN, A.; BORNER, T.; DITTMANN, E. The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins andi increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions. **PLoS ONE,** San Francisco, v. 6, n. 3, p. 1-11, 2011.

ANEXOS

ANEXO A – Artigo Publicado

Artigo publicado: Phycologia (2012) Volume 51 (2), 228–238

Morphological and molecular studies of *Sphaerospermopsis torques-reginae* (Cyanobacteria, Nostocales) from South American water blooms

VERA REGINA WERNER[2]*, HAYWOOD DAIL LAUGHINGHOUSE IV [2, 3], MARLI FÁTIMA FIORE[4], CÉLIA LEITE SANT'ANNA[5], **CAROLINE HOFF[4]**, KLEBER RENAN DE SOUZA SANTOS[5], EMANUEL BRUNO NEUHAUS[1], RENATO JOSÉ REIS MOLICA[6], RICARDO YUKIO HONDA[4] AND RICARDO OMAR ECHENIQUE[7]

[1] Natural Sciences Museum, Zoobotanical Foundation of Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS), Brazil; [2]Department of Botany, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, DC 20560, USA; [3]MEES Program, College of Computer, Mathematics and Natural Sciences, University of Maryland, College Park, MD 20742, USA; [4]Center for Nuclear Energy in Agriculture, University of São Paulo, Piracicaba (SP), Brazil; [5]Institute of Botany, Section of Phycology. São Paulo (SP), Brazil; [6]Federal Rural Universtity of Pernambuco, Garanhuns (PE), Brazil; [7]Phycology Scientific Department, College of Natural Sciences and Museum (UNLP) and Scientific Research Commission of Buenos Aires Province, La Plata, Argentina

Running title: *Sphaerospermopsis torques-reginae* (Cyanobacteria) in South America.

ABSTRACT

Sphaerospermopsis torques-reginae (Komárek) Werner, Laughinghouse IV, Fiore & Sant'Anna comb. nov. was originally described as *Anabaena torques-reginae* Komárek from planktonic populations of Cuban eutrophic environments, characterized by twisted trichomes with spherical akinetes adjacent to the heterocytes. Recently, using molecular analyses, all planktonic *Anabaena* Bory ex Bornet et Flahault morphospecies were transferred into the genus *Dolichospermum* (Ralfs ex Bornet & Flahault) Wacklin et al., including *D. torques-*

reginae (Komárek) Wacklin *et al*. However, by a polyphasic characterization of strains of *Anabaena reniformis* Lemmermann and *Aphanizomenon aphanizomenoides* (Forti) Horecká & Komárek (=*Anabaena aphanizomenoides* Forti), these planktonic species were reclassified into *Sphaerospermopsis* Zapomělová *et al*. Our study's main objective was to characterize morphologically and molecularly cyanobacterial populations identified as *D. torques-reginae*, observed in different aquatic ecosystems in South America. The 16S rRNA gene of two *D. torques-reginae* strains (ITEP-024 and ITEP-026) was sequenced and phylogenetically analyzed for the first time. The morphological and phylogenetic analyses demonstrated the affiliation of the studied populations with the genus *Sphaerospermopsis* and, consequently, were denominated as *S. torques-reginae*. Furthermore, geographic distribution, ecology, and toxicity of the species are discussed. It was observed in different aquatic environments, natural and artificial, tropical and subtropical in Brazil, temperate in Argentina, and tropical in Colombia, suggesting a wide distribution in South America. It normally occurred in dense freshwater blooms, although it was also found in water with low salinity. *Sphaerospermopsis torques-reginae* toxic blooms have been reported in tropical water bodies in northeastern Brazil.

KEYWORDS: 16S rRNA gene, *Anabaena torques-reginae,* Cyanobacteria, *Dolichospermum*, ecology, geographic distribution, morphology, phylogeny, toxicity.

ANEXO B – Artigo Submetido

Revista: PLoS ONE

Simultaneous detection of cylindrospermopsin and saxitoxin synthetase genes in *Cylindrospermopsis raciborskii* strains from Brazilian freshwater

CAROLINE HOFF-RISSETI[a], FELIPE AUGUSTO DÖRR[b], PATRICIA DAYANE CARVALHO SCHAKER[a], ERNANI PINTO[b], VERA REGINA WERNER[c], MARLI FÁTIMA FIORE[a]*

[a]University of São Paulo, Center for Nuclear Energy in Agriculture, Molecular Ecology of Cyanobacteria Laboratory, 13400-970, Piracicaba-SP, Brazil; [b]University of São Paulo, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Department of Clinical and Toxicological Analyses, 05508-900, São Paulo-SP, Brazil; [c]Natural Sciences Museum, Zoobotanical Foundation of Rio Grande do Sul, 90690-000, Porto Alegre-RS, Brazil.

ABSTRACT

The *Cylindrospermopsis raciborskii* population from Brazilian freshwater is known to produces saxitoxin derivatives (STX), while cylindrospermopsin (CYN), which is commonly detected in isolates from other countries, has thus far not been detected in Brazilian strains. However, during investigation for the presence of CYN synthetase (*cyr*) genes in the genomes of five laboratory-cultured Brazilian cyanobacterial strains, the *cyrA*, *cyrB* and *cyrC* genes were successfully PCR amplified from three strains (CENA302, CENA303 and CENA306). These nucleotide sequences were translated into amino acids, and the predicted protein functions and domains confirmed their identity as CYN synthetase genes. Phylogenetic analysis grouped these amino acids sequences together with their homologues found in two known CYN synthetase clusters (*C. raciborskii* strain AWT205 and CS-505) with high bootstrap support. In addition, *sxt* genes involved in STX production were also obtained. Extensive LC-MS analyses were unable to detect CYN in the cultured strains, whereas the production of STX, GTX2 (gonyautoxin), GTX3 and dcSTX (decarbamoylsaxitoxin) was confirmed in CENA302. To our knowledge, this is the first study reporting the presence of *cyr* genes in Brazilian strains of *C. raciborskii* and the simultaneous presence of *sxt* and *cyr* genes

in a single *C. raciborskii* strain, which point out the potential of production of both cyanotoxins during a *C. raciborskii* bloom in aquatic ecosystems.

Keywords: cyanotoxins, PKS, NRPS, 16S rRNA gene, LC-MS