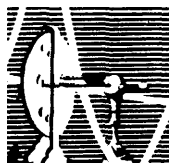


RAQUEL MORAES SOARES

“ASPECTOS DA BIODISTRIBUIÇÃO E EFEITOS
DE MICROCISTINAS (HEPATOTOXINAS DE
CIANOBACTÉRIAS) EM MAMÍFEROS”

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU
DE DOUTOR EM CIÊNCIAS



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2 0 0 5

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

ASPECTOS DA BIODISTRIBUIÇÃO E EFEITOS DE
MICROCISTINAS (HEPATOTOXINAS DE
CIANOBACTÉRIAS) EM MAMÍFEROS

Raquel Moraes Soares

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo

Rio de Janeiro
Janeiro de 2005

ASPECTOS DA BIODISTRIBUIÇÃO E EFEITOS DE MICROCISTINAS (HEPATOTOXINAS DE CIANOBACTÉRIAS) EM MAMÍFEROS

Raquel Moraes Soares

Orientadora: Prof^a Dr^a Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada por:

Presidente, Prof^a Sandra M.F.O. Azevedo

Prof. Paulo Hilário Nascimento Saldiva

Prof. Marcelo Marcos Morales

Prof. Olaf Malm

Rio de Janeiro
Janeiro de 2005

Soares, Raquel Moraes.

Aspectos da biodistribuição e efeitos de microcistinas (hepatotoxinas de cianobactérias) em mamíferos/ Raquel Moraes Soares. Rio de Janeiro: UFRJ/ IBCCF, 2005.

xi, 117f.: il; 30cm

Orientadora: Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo

Tese (doutorado) – UFRJ/ Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2005.

Referências Bibliográficas: f. 99-111.

1. Microcistinas. 2. Fígado. 3. Proteínas Fosfátases. 4. Glutathiona. 5. Pulmão. 6. Inflamação. 7. Soro. I. Azevedo, Sandra Maria Feliciano de Oliveira e. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Dedicatória

À minha mãe, Libânia, pelo imenso amor e apoio que me deu em todos os momentos.

Agradecimentos

À Profa. Sandra M.F.O. Azevedo pela orientação, ensinamentos, amizade, apoio, socorro, incentivo e enorme carinho que me dedicou durante estes quase 12 anos de convivência. Minha gratidão e carinho são eternos!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado concedida e pelo financiamento de grande parte deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa do Programa de Doutorado com Estágio no Exterior (PDEE) concedida.

Ao Prof. José Roberto Meyer Fernandes pela orientação, colaboração e apoio na realização de parte deste trabalho.

À Profa. Patrícia Rocco pela amizade, orientação, colaboração e apoio em vários momentos deste doutorado.

Ao Prof. Walter Zin e equipe pelo apoio e colaboração na realização de parte deste trabalho.

Ao Prof. Wayne Carmichael por me receber tão atenciosamente em Ohio, pelo apoio durante este período tão importante em que estive em seu laboratório, pela orientação e colaboração durante estes dois últimos anos.

À equipe do laboratório do Prof. Carmichael, especialmente ao Dr. Yuan e Dr. Servaites, pelos ensinamentos, ajuda e apoio durante o período em que trabalhamos juntos.

À Profa. Denise Pires de Carvalho pela grande ajuda experimental no final deste doutorado, pelas valiosas dicas na defesa do plano de tese e pela revisão desta tese. Agradeço imensamente também a equipe do laboratório da Profa. Denise: Waldo, Wagner e Norma pela ajuda no experimento com os ratos Wistar.

Ao Dr. Alvimar Delgado pela amizade e colaboração na realização do trabalho junto ao Hospital Clementino Fraga Filho –UFRJ.

Ao Rodrigo Ferraro por ser mais que um colega na realização de um trabalho em colaboração, por ser um verdadeiro amigo e professor. MUITÍSSIMO obrigada por toda a sua ajuda.

À Viviane Cagido pela amizade, colaboração, companheirismo e ajuda nestes dois últimos anos.

Aos amigos e “vizinhos”, Prof. Olaf Malm, Prof. Jean Remy, Prof. João Paulo Torres e toda equipe, pela amizade e apoio ao longo destes anos no Instituto. Um agradecimento especial ao amigo Antônio Azeredo pelas dicas sobre o HPLC.

Ao meu amigo Prof. Marcelo Einicker Lamas, pelo apoio, enorme carinho e importantes ajudas profissionais ao longo desta nossa amizade que acredito ser eterna.

Ao Ricardo Garrido por estar ao meu lado sempre que precisei, pelo apoio total que me foi tão valioso no início desta jornada.

Aos amigos do grupo Coqueiral pelos momentos alegres, pela força, pela troca de idéias que sempre me impulsionaram.

À amiga Carla Nunes por me receber e me ensinar tanto no período em que estive em Brasília.

Ao Prof. Luiz Otávio Azevedo por ser sempre tão prestativo e amigo em todas as circunstâncias, pelos ensinamentos, dicas e pela implicância (sempre divertida!) nestes quase 12 anos de convivência.

À Profa. Valéria Magalhães pela amizade de todo dia, pelos momentos alegres, pela ajuda e apoio em todos os momentos difíceis, e também pelos ensinamentos e colaborações científicas passadas e futuras!

Às amigas tão queridas Ana Cláudia Pimentel, Simone Maciel, Andréia Gomes e Alessandra Delazari pelo apoio irrestrito, pelo ombro, pela troca de idéias, por tantas ajudas, colaborações e pela amizade de hoje e de sempre.

Aos amigos do laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias-IBCCF-UFRJ: Aloysio, Alessandra, Isabel, Jobson, Levi, Marcelo, Pedro, Rodrigo e em especial ao João Carlos e Ricardo pelo carinho, amizade e apoio ao desenvolvimento deste trabalho. Sem esta equipe tudo ficaria muito difícil!

Às minhas amigas-irmãs Adriana Almeida e Margareth Guimarães pela amizade incondicional que compreende as ausências, apóia a todo o momento e incentiva a melhorar sempre.

A todos que de alguma maneira contribuíram para que este doutorado fosse realizado. Muito obrigada!

E, finalmente, a meu pai Hélio, minha mãe Libânia, minha irmã Eliana e meu irmão Marcelino, por serem a minha base, meu porto seguro, fonte de amor e alegrias!

Abstract

The most commonly reported cyanobacteria toxicosis is caused by microcystins, cyanotoxins described as potent and specific inhibitors of protein phosphatases, especially PP1 and PP2A in liver. The general objective of this study was to contribute to elucidation of MCYSTs accumulation and redistribution processes in animals and human beings, as well as analyzing the effects of these toxins on liver and lung of mice through experiments using sub-lethal doses intraperitoneally injected. The results showed that sub-lethal doses of microcystins damaged the physiology of liver and lung in young and adult animals. However, adult animal livers showed signs of recovery, observed by the increase in protein phosphatases activity as well as the return of glutathione concentration to the control levels. In mice lungs, MCYSTs caused alveolar collapse and an acute inflammatory process since the first hours, being characterized by PMN cells infiltration and interstitial edema. The inflammation probably caused to the observed increase in resistive and viscoelastic pressures and in elastances as well, indicating damage to the respiratory process. The results of studies with serum indicated that microcystins can remain in the organism for a long period. These toxins were detected over 2 months in serum of renal patients who were exposed to water containing MCYSTs during hemodialysis treatment at HUCFF-UFRJ. Therefore, this study contributed to demonstrate that it is always worth to stand out the importance of monitoring and control of cyanobacteria blooms in recreational and source waters, once this a critical issue to the public health.

Resumo

Microcistinas (MCYST) são as toxinas de cianobactérias mais frequentemente encontradas em florações destes microrganismos. Estes heptapeptídeos são potentes inibidores de proteínas fosfatases 1 e 2A e atingem preferencialmente o fígado nos animais vertebrados. O objetivo deste trabalho foi contribuir para a elucidação dos processos de acúmulo e redistribuição de microcistinas, tanto em animais como em seres humanos que sofreram exposição a estas toxinas. Além disso, pretendemos analisar seus efeitos no fígado e pulmão de camundongos, através de experimentos onde foram utilizadas doses sub-letais. Os resultados demonstraram que microcistinas foram capazes de prejudicar a fisiologia do fígado e do pulmão tanto em animais jovens quanto adultos. No entanto, os fígados dos animais adultos apresentaram sinais de recuperação, uma vez que a atividade fosfatásica e a concentração de glutathione retornaram aos níveis dos controles. No pulmão, MCYSTs causaram um processo inflamatório agudo, caracterizado pela infiltração de células polimorfonucleares e edema. O colapso alveolar também foi verificado, assim como aumento nas pressões resistivas e elastâncias do pulmão, indicando prejuízo à mecânica respiratória. Os resultados dos estudos com soro indicaram que microcistinas podem recircular no organismo por um longo período. Essas toxinas foram detectadas durante 2 meses no soro de pacientes que foram expostos a estas moléculas através de hemodiálise no HUCFF-UFRJ. Portanto, este estudo contribuiu para ressaltar a necessidade do monitoramento e controle de florações de cianobactérias em corpos d'água utilizados tanto para recreação quanto abastecimento da população, uma vez que esta questão é de importância crucial para a saúde pública.

Sumário

1 – Introdução	1
1.1 – Considerações gerais	1
1.2 – Microcistinas	3
1.2.1- Estrutura química e farmacocinética	3
1.2.2 – Metabolização e detoxificação	5
1.2.3 - Efeitos	8
2 – Objetivos	19
3 - Acúmulo e efeitos de doses sub-letais de microcistina-LR na variação da concentração de glutathione e na atividade de proteínas fosfatases 1 e 2 A em fígado de camundongos	21
3.1 - Material e Métodos	21
3.1.1 – Experimentos	21
3.1.1.2 - Efeitos da dose sub-letal de 48µg MCYST-LR /Kg de peso corpóreo	21
3.1.1.3 –Efeitos da dose sub-letal de 40µg de MCYST-LR /Kg de peso corpóreo	22
3.1.3 – Análise da atividade de proteínas fosfatases 1 e 2 A	23
3.1.4 – Análise de MCYST-LR por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	25
3.1.5 – Análise de glutathione	27
3.1.6 – Análise estatística	28
3.2 – Resultados e Discussão	29
4- Acúmulo e efeitos de doses sub-letais de extrato de cianobactéria contendo microcistinas e microcistina-LR pura em pulmão de camundongos	41
4.1- Material e Métodos	42
4.1.1– Cultivo e produção de extrato de <i>Microcystis aeruginosa</i>	42

4.1.2 – Experimentos	42
4.1.2.1 –Efeitos de dose sub-letal de extrato de <i>Microcystis aeruginosa</i> contendo microcistinas em pulmão de camundongos	42
4.1.2.2 -Efeitos de dose sub-letal de microcistina-LR pura na mecânica respiratória, histologia pulmonar e atividade fosfatásica em pulmão de camundongos	43
4.1.3 – Análise da mecânica respiratória	44
4.1.3.1- Método de Oclusão ao Final da Inspiração	48
4.1.4 -Análise histológica do parênquima pulmonar	51
4.1.5 -Análise estatística	53
4.2 – Resultados e Discussão	54
5- Análise da presença de microcistinas no soro de pacientes renais crônicos do HUCFF-UFRJ intoxicados durante tratamento de hemodiálise e avaliação experimental da presença desta toxina em soro de cobaias (ratos Wistar)	67
5.1–Histórico do estudo da exposição de pacientes hemodialisados a microcistinas	68
5.2 - Material e Métodos	70
5.2.1– Coleta de soro do pacientes do HUCFF	70
5.2.2– Extração de microcistinas das amostras de soro	71
5.2.3– Análises das amostras de soro dos pacientes por ELISA	72
5.2.4 - Análises das amostras de soro dos ratos por ELISA	72
5.2.5– Análise de microcistinas totais no soro de pacientes	72
5.2.6– Análises de LC/MS e MS/MS dos extratos das amostras de soro de pacientes	74
5.2.6.1–Condições analíticas de cromatografia líquida (LC)	74
5.2.6.2 – Condições analíticas de espectrometria de massas (MS)	75
5.2.7 – Análise estatística	76
5.2.8 – Exposição de ratos Wistar a uma dose sub-letal de MCYST-LR	76
5.3 – Resultados e Discussão	77

6 – Discussão Geral	89
7 – Conclusões	97
8 – Referências Bibliográficas	99
9 – Anexo –Artigo publicado	112

1 – Introdução

1.1 – Considerações gerais:

As cianobactérias, também chamadas de cianofíceas, algas-azuis ou cianoprocaríotos, são microrganismos procariontes, fotossintetizantes, com uma organização bioquímica e celular bastante semelhante às bactérias. Além disso, apresentam uma distribuição geográfica bastante ampla, o que reflete a diversidade genotípica e fenotípica do grupo. Isto faz com que sejam encontradas cianobactérias planctônicas, bentônicas, terrestres e até em simbiose com plantas e animais.

Sua morfologia básica inclui formas unicelulares, coloniais e filamentosas. Os habitats com maior ocorrência de cianobactérias se encontram nos ecossistemas de água doce (naturais ou artificiais), mares e águas salobras (Hum & Vicks, 1980). Nesses ambientes, quando surgem condições favoráveis, tais como abundância de luz, temperaturas elevadas e abundância de nitrogênio e fósforo, pode-se verificar o intenso crescimento (ou florações) de cianobactérias.

O processo de eutrofização, que é o enriquecimento por nutrientes dos corpos d'água continentais e costeiros, tem se manifestado como um fenômeno mundial que vem se intensificando a partir dos anos 50 e cujas causas principais estão relacionadas ao desenvolvimento urbano, industrial e agrícola (Chorus & Bartram, 1999). Corpos d'água eutróficos favorecem o surgimento de florações de cianobactérias que muitas vezes podem se apresentar como espessas camadas de células na superfície do corpo d'água. Este fenômeno tem sido registrado com grande frequência em vários países como: Canadá, E.U.A., Portugal, Inglaterra, Alemanha, África do Sul, China, Brasil, Austrália, entre outros (Yoo *et al.*, 1995).

Atualmente, a preocupação mais séria quanto ao surgimento de uma floração é o fato de que cianobactérias são potencialmente produtoras de toxinas que podem causar sérios danos a mamíferos e prejudicar também a biota aquática (Carmichael *et al.*, 1997).

No Brasil, a intensa eutrofização de vários rios, reservatórios, lagoas e lagos tem favorecido a dominância desses organismos nestes ambientes. Além disso, grande parte das cepas de cianobactérias isoladas de corpos d'água brasileiros mostrou-se produtora de toxinas (Costa & Azevedo, 1994; Domingos *et al.*, 1999; Sant'Anna *et al.*, 2000). Sabendo-se que muitos desses mananciais são utilizados para o abastecimento público, a liberação dessas toxinas na água representa um risco para a saúde pública.

As toxinas de cianobactérias são caracterizadas como endotoxinas por serem, geralmente, apenas liberadas quando acontece o rompimento da célula. Uma espécie de cianobactéria pode produzir mais de um tipo de toxina e dentro de uma mesma espécie podem existir cepas produtoras e cepas não produtoras de toxinas. Estas moléculas estão divididas em três classes principais: dermatotoxinas, neurotoxinas e hepatotoxinas, sendo estas duas últimas as mais freqüentemente encontradas em corpos d'água e que geram maiores preocupações (Carmichael, 1997).

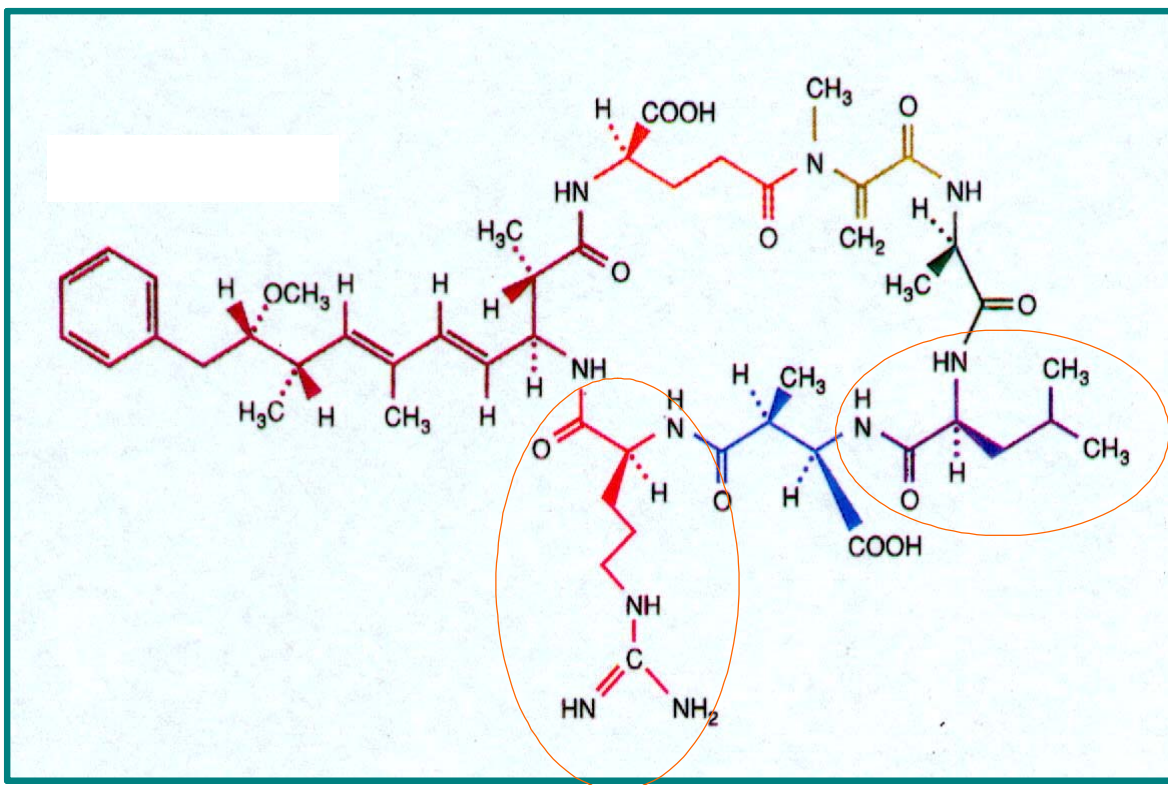
As hepatotoxinas estão divididas em três grupos: os heptapeptídeos cíclicos, as chamadas microcistinas, o pentapeptídeo cíclico chamado nodularina e o alcalóide cilindrospermopsina. Todas foram assim nomeadas por terem sido primeiramente isoladas dos gêneros *Microcystis*, *Nodularia* e *Cylindrospermopsis*, respectivamente. Os gêneros já identificados como potencialmente produtores de microcistinas são *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria* (*Planktothrix*), *Nostoc* e *Anabaenopsis*. Já a nodularina só foi encontrada até o momento em *Nodularia spumigena* e a cilindrospermopsina já foi relatada sendo produzida por *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Umezakia natans* e *Aphanizomenon ovalisporum* (Chorus & Bartram, 1999).

1.2 – Microcistinas:

1.2.1 – Estrutura química e farmacocinética:

As microcistinas (MCYST) são as cianotoxinas mais freqüentemente encontradas nos ambientes aquáticos e seus efeitos tóxicos já foram descritos em diversos grupos de organismos, tais como macrófitas, zooplâncton, peixes e mamíferos (Francis, 1878; Sahin *et al.*, 1995; Ferrão-Filho *et al.*, 2002, Pflugmacher, 2002). A bioacumulação também já foi bem caracterizada em zooplâncton, peixes, crustáceos e moluscos (Ferrão-Filho & Azevedo, 2002; Magalhães *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2004; Vasconcelos, 1995).

Essas toxinas são caracterizadas pela presença de 5 D-aminoácidos e 2 L-aminoácidos, sendo sua estrutura geral descrita como: ciclo-(D-alanina¹-X²-D-MeAsp³-Y⁴-Adda⁵-D-glutamato⁶-Mdha⁷), onde D-MeAsp³ é D-eritro-β-ácido metilaspártico, Mdha é *N*- metildehidroalanina e Adda é (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienóico. Na Figura.1.1 podem ser observados em destaque os dois L-aminoácidos da molécula (no caso a arginina =R e a leucina=L). A variabilidade dos L- aminoácidos é uma das principais razões da existência de mais de 60 congêneres de microcistinas até então descritos (Gulledge *et al.*, 2002).



Carmichael, 1994. Scientific American, 270:78-86

Figura 1.1 – Desenho esquemático da molécula de microcistina-LR. Os dois L-aminoácidos variáveis estão destacados na figura.

Por serem moléculas hidrofílicas, microcistinas apresentam pouca capacidade de ultrapassar membranas lipídicas. Mas, uma vez captadas pelas células, são potentes inibidores de proteínas fosfatases da família serina/treonina, especialmente PP1 e 2A. Nos animais vertebrados, essas toxinas têm o fígado como órgão alvo, pois os hepatócitos são capazes de captá-las através dos transportadores dos ácidos biliares. Este fato foi constatado com a observação *in vitro* de que essa captação é inibida por ácidos biliares. No entanto, as moléculas transportadoras envolvidas no processo ainda não foram identificadas; sabe-se apenas que não estão entre os transportadores de ácidos biliares tradicionalmente conhecidos (Runnegar *et al.*, 1995). Já foi também observado que este transporte ocorre de forma rápida. Em estudos com camundongos injetados intraperitonealmente (i.p.) com [³H]-MCYST-LR, Robinson *et al.* (1989, 1991a)

verificaram que 1 hora após a injeção entre 60 e 70% da toxina já se encontrava no fígado.

A dose de microcistinas letal para 50% (DL₅₀) dos camundongos injetados intraperitonealmente varia de 50 a 1200µg/Kg de peso corpóreo. Tais doses causam a morte dos animais após 1 a 3 horas em ensaios de laboratórios (Watanabe *et al.*, 1996). Já a DL₅₀ oral pode variar bastante entre diferentes roedores, apresentando valores de 50 a 170 vezes mais altos que a DL₅₀ intraperitoneal. No entanto, não há evidências de que microcistinas sejam hidrolisadas por peptidases no estômago. Existe pouca informação na literatura sobre os processos de absorção gastrointestinal, mas aparentemente uma quantidade significativa destas toxinas é capaz de ultrapassar a barreira intestinal e ser absorvida (Chorus & Bartram, 1999).

1.2.2 – Metabolização e detoxificação:

A principal via de metabolização e detoxificação das microcistinas no fígado ocorre através da glutatona reduzida (GSH). Este tripeptídeo (L-γ-glutamina-L-cisteína-glicina) é conhecido por sua importância direta ou indireta em diversas funções biológicas, tais como síntese de proteínas e DNA, atividade enzimática, metabolismo e proteção da célula. Sabe-se que a glutatona também reage com uma grande variedade de xenobióticos formando conjugados de GSH. Muitos desses conjugados podem ser convertidos em ácidos mercaptúricos para posteriormente serem excretados (Meister & Anderson, 1983).

Um dos primeiros estudos a sugerir a participação de glutatona no processo de detoxificação de microcistinas foi o trabalho de Runnegar *et al.* (1987) em que foi descrito um decréscimo no “pool” de GSH em hepatócitos expostos a estas toxinas, de modo dose-dependente.

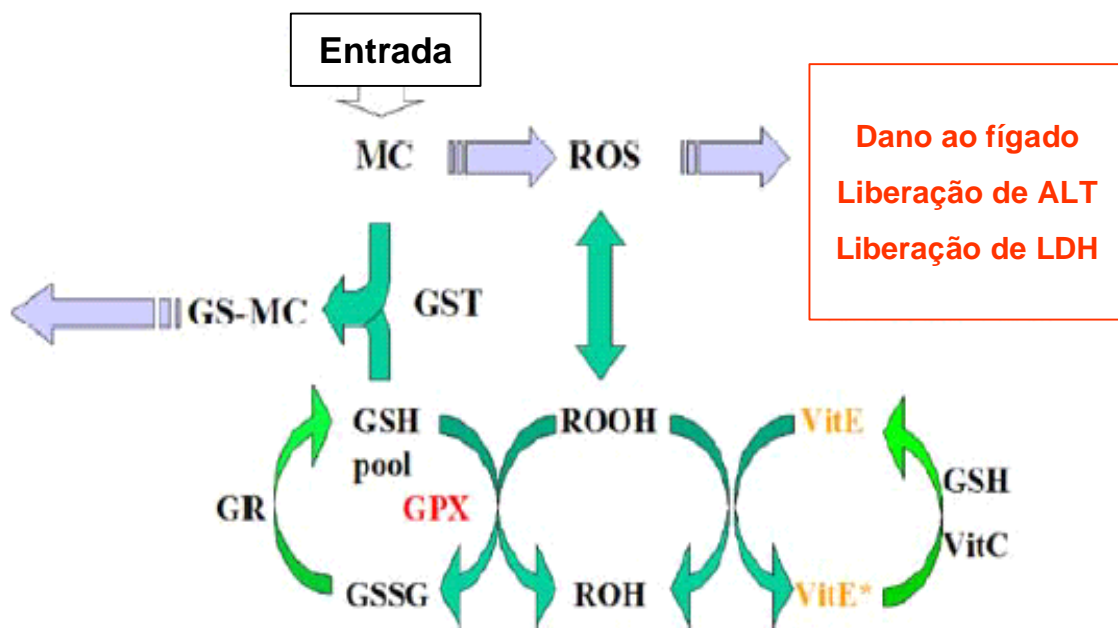
Até uma certa concentração, as microcistinas podem ser biotransformadas através de ligação não-enzimática com GSH ou através da ação da glutathione S-transferase (GST). Esta enzima é membro do grupo de enzimas de detoxificação de fase II e age conjugando substâncias eletrofílicas à glutathione, tornando-as mais hidrossolúveis e facilitando, deste modo, o processo de excreção. Uma ampla gama de substratos está associada a várias isoenzimas de GST solúveis e a uma GST microsomal. As microcistinas são conjugadas a GSH através do terminal metileno do aminoácido Mdha, o qual é também a unidade que se liga covalentemente ao resíduo de cisteína 273 das proteínas fosfatases. Assim, o conjugado MCYST-SG além de ser um composto mais facilmente excretável, também fica impossibilitado de estabelecer a ligação covalente com as fosfatases (Wiegand *et al.*, 2002). No entanto, já foi observado que este conjugado, apesar de muito menos tóxico, ainda pode causar danos ao fígado, pois o aminoácido Adda das microcistinas continua disponível para a ligação com o sítio ativo das fosfatases (Kondo *et al.*, 1992).

Em organismos aquáticos, este processo de detoxificação é especialmente importante devido ao contato mais direto e freqüente com as microcistinas. Vários estudos já demonstraram a conjugação de MCYST à glutathione, assim como o aumento da atividade de GST, em organismos tão diversos quanto macrófitas, invertebrados, peixes e embriões de peixe (Pflugmacher *et al.*, 1998; Wiegand *et al.*, 2002).

Gehring *et al.* (2004), em experimentos com camundongos injetados com 75% da DL₅₀ de MCYST-LR, verificaram que após aumento da peroxidação lipídica (o que gera estresse oxidativo), causada por esta toxina, ocorre um aumento na atividade de glutathione peroxidase (GPX). Também foi observado um decréscimo inicial de GSH total, o que foi relacionado ao aumento da atividade de glutathione S-transferase. Posteriormente, os níveis de GSH voltaram ao normal, claramente devido ao aumento

da atividade da glutatona sintetase. Neste trabalho, o aumento da atividade enzimática, em todos os casos, foi regulado pelo aumento da transcrição destas enzimas.

A Figura 1.5 mostra um diagrama que ilustra o papel da glutatona na proteção da célula contra os efeitos de microcistinas, dentre os quais a formação de espécies reativas de oxigênio.

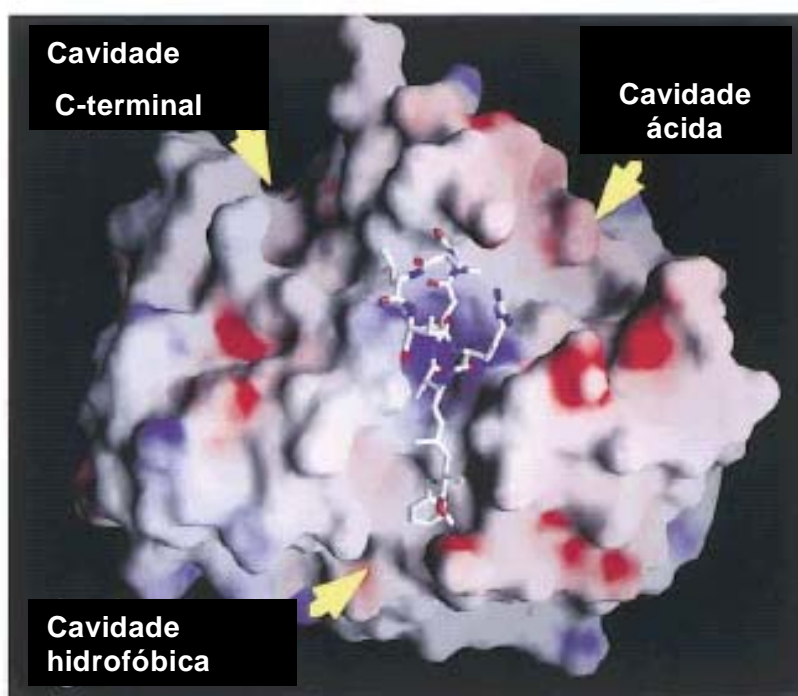


Gehring, 2004. Inter. J. Biochem. Cell. Biol., 36:931-941

Figura 1.5 – Representação diagramática do papel da glutatona na proteção da célula contra os efeitos de microcistinas. MC= microcistina, ROS= espécies reativas de oxigênio, GSH= glutatona reduzida, GSSH= dímero de glutatona oxidada, GS-MC= conjugado microcistina-glutatona, GST= glutatona S-transferase, GR= glutatona redutase, ROOH= peróxidos lipídicos, ROH= álcoois, VitE= vitamina E, VitE*= radical quinona de vitamina E, Vit C= vitamina C, ALT= alanina aminotransferase, LDH= lactato desidrogenase.

1.2.3 – Efeitos :

Ao nível molecular, os principais alvos das microcistinas são as proteínas fosfatases (PP) da família serina/treonina, dentre estas: PP1, PP2A, PP4 e PP5 (e também PP2B quando expostas a altas concentrações de microcistinas). A ligação MCYST-PPase ocorre em duas etapas principais: inicialmente, o aminoácido hidrofóbico Adda das microcistinas ocupa o sítio ativo das proteínas fosfatases através de ligação não-covalente, o que produz o efeito inibitório da toxina. Em seguida, o aminoácido Mdha se liga covalentemente ao resíduo de cisteína 273 das fosfatases (Honkanen & Golden, 2002) (Fig. 1.2). Essa ligação é irreversível e prolonga o efeito deletério causado ao tecido. As constantes de inibição (K_i) de PP1 e PP2A para MCYST-LR estão entre 0,06-6nM e 0,01-2nM, respectivamente, o que mostra uma maior afinidade desta toxina pela PP2A (Dawson, 1998).



Gupta *et al.*, 1997. *Journal of Medicinal Chemistry*, 40(20):3199-3206

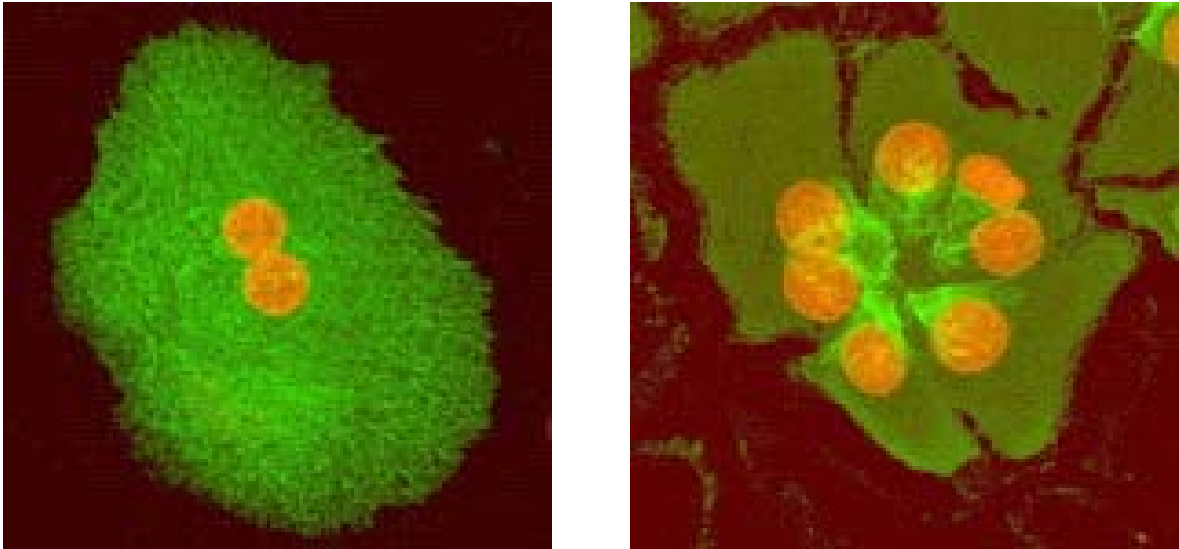
Figura 1.2 – Superfície molecular do complexo PP1-MCYST-LR. No centro está a molécula de microcistina-LR com o aminoácido Adda ocupando o sítio ativo da enzima (na cavidade hidrofóbica).

A relevância do efeito inibitório de microcistinas se deve ao fato de que o “status” de fosforilação de qualquer proteína é um processo dinâmico que reflete a ação combinada de proteínas cinases e fosfatases. Nas células eucarióticas, a maior parte da fosforilação protéica ocorre em resíduos de serina e treonina. Portanto, o papel das fosfatases do grupo PP1 e PP2 é crucial, uma vez que estas enzimas são responsáveis por grande parte da atividade fosfatásica celular (Honkanen & Golden, 2002).

Sabe-se que PP1 está diretamente envolvida em múltiplos controles de funções celulares, tais como metabolismo do glicogênio, contração muscular, progressão do ciclo celular, atividades neuronais, entre outros. Já a PP2A está envolvida em sinalizações, controle do ciclo celular e da atividade da telomerase (Barford *et al.*, 1998). No entanto, ainda há muito que se investigar sobre a importância destas enzimas no funcionamento celular. A proteína fosfatase 2A é descrita como crucial no controle da proliferação celular, o que pode indicar um papel importante em processos de tumorigênese. Outros estudos mostraram que a mesma enzima também é fundamental para que haja crescimento celular e sobrevivência da célula. Assim, alguns autores atribuem esta dualidade de funções ao fato desta proteína ser uma enzima de “múltiplas tarefas”, apresentando diferentes sítios subcelulares como alvo e diferentes especificidades a substratos (Schonthal, 2001).

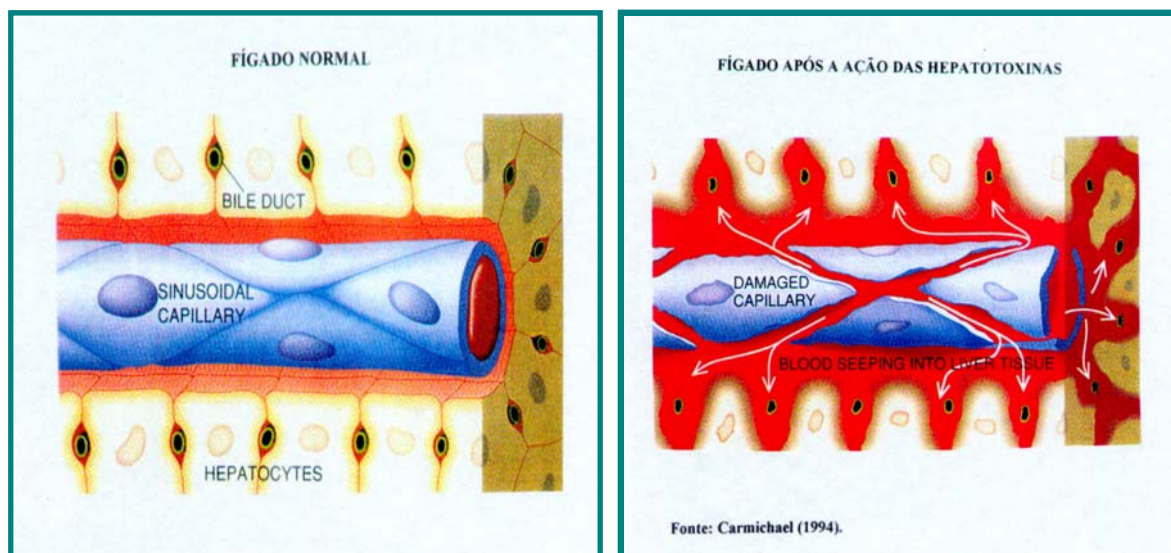
A inibição de fosfatases por microcistinas leva a um aumento da fosforilação de diversos alvos subcelulares, inclusive proteínas do citoesqueleto e proteínas associadas ao mesmo, provocando o seu desarranjo (Fig. 1.3). Como consequência, as células hepáticas tendem a se arredondar, se separam e perdem sua estrutura parenquimal. Concomitantemente, os capilares sinusoidais rompem e ocorre um extravasamento de sangue para o espaço intersticial. Não há evidências de que o rompimento dos capilares sinusoidais esteja relacionado a efeitos da microcistina nas células endoteliais. Considera-se que o rompimento dos sinusóides é uma consequência das alterações que

essas toxinas provocam na estrutura dos hepatócitos (Falconer *et al.*, 1981; Hooser *et al.*; 1990; Wickstrom *et al.*; 1996) (Fig. 1.4). Em situações de intoxicação aguda, se observa uma hemorragia intra-hepática e o sangue retido no fígado faz com que o mesmo tenha seu peso dobrado e a morte ocorre por choque hemorrágico ou falência hepática (Carmichael, 1994).



John Eriksson, Univ. de Turku, Finlândia – imagem de website
(http://www.btk.fi/Research_Groups/Protein_Phosphorylation_Group/protein_phosphorylation_group.html)

Figura 1.3 – Fotomicrografia de hepatócitos antes (esquerda) e após (direita) a exposição às microcistinas, onde se pode observar o desarranjo do citoesqueleto.



Carmichael, 1994. Scientific American, 270:78-86

Figura 1.4 – Desenho esquemático do efeito de microcistinas sobre hepatócitos e os capilares sinusoidais.

Em intoxicações agudas e letais com microcistinas, os danos histológicos observados no tecido hepático geralmente são: a congestão dos sinusóides, hepatócitos arredondados, necrose centrolobular e o extravasamento sanguíneo intersticial (Slatkin *et al.*, 1983; Ito *et al.*, 1997b). Alguns autores também acreditam que microcistinas possam desencadear um processo inflamatório no fígado que contribuiria para o choque que leva a morte. Nos hepatócitos, microcistinas, além de inibirem proteínas fosfatases, ativam fosfolipase A₂ e cicloxigenase. Essas duas últimas enzimas participam da via metabólica do ácido aracdônico que leva à produção dos mediadores inflamatórios tromboxano A₂ (um forte mediador de agregação plaquetária) e prostaglandina I₂. Além disso, alguns estudos já demonstraram que microcistinas estimulam macrófagos peritoneais a produzir TNF- α (fator de necrose tumoral- α) e IL-1 (interleucina -1), importantes citocinas que podem levar à produção de PAF (fator de ativação plaquetária) e conseqüente ativação da cicloxigenase. Desta forma, sugere-se que também é possível que macrófagos hepáticos (células de Kupffer) respondam às microcistinas produzindo mediadores inflamatórios (Watanabe *et al.*, 1996).

A toxicidade de microcistinas em animais expostos a doses sub-letais em administração única ou crônica apresenta algumas diferenças em relação aos efeitos causados por doses letais. Segundo Guzman & Solter (2002), a amplitude de lesões no fígado de camundongos observada após uma única dose sub-letal de MCYST-LR (i.p.) inclui hipertrofia hepatocelular, inclusões eosinofílicas intracitoplasmáticas e apoptose. Doses repetidas induzem hepatocitomegalia e cariomegalia, com desarranjo e perda da arquitetura hepatocelular, além de apoptose e perda de vacuolização citosólica. Essa última está relacionada à depleção de glicogênio, causada pela inibição de proteínas fosfatases, que leva a maior ativação de glicogênio fosforilase e inibição de glicogênio sintetase.

As condições que levam à apoptose no fígado intoxicado com microcistinas ainda não estão totalmente claras. Alguns estudos indicam que a apoptose ocorre na periferia de regiões de necrose e, portanto, é resultado de isquemia/hipóxia. Entretanto, outros estudos *in vivo* não constatarem esta relação e alguns estudos *in vitro* com hepatócitos mostraram que a apoptose está diretamente associada à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzida por microcistinas (Guzman & Solter, 2002; Gehringer, 2004).

Espécies reativas de oxigênio, tais como radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila estão relacionadas à toxicidade de vários xenobióticos e ao desenvolvimento de diversas doenças degenerativas, incluindo o câncer. Em hepatócitos expostos às microcistinas, o aumento da formação de ROS está diretamente relacionado ao aumento da liberação de lactato desidrogenase (LDH), um indicativo de dano hepático, e também ao aumento de peroxidação lipídica, o que indica estresse oxidativo (Ding *et al.*, 1998).

Como descrito anteriormente, nos animais vertebrados doses letais de microcistinas levam rapidamente a morte devido aos efeitos extensos e danosos ao

figado. No entanto, estudos com doses sub-letais dessas toxinas mostraram que as mesmas provocam efeitos também em outros órgãos. Já foram observados alterações de atividades enzimáticas (sucrase, fosfatase ácida e succinato desidrogenase) e aumento da peroxidação lipídica na mucosa intestinal de ratos, assim como apoptose em quase todo o trato gastrointestinal de camundongos injetados intraperitonealmente com microcistinas (Moreno *et al.*, 2003; Botha *et al.*, 2004).

A função renal também pode ser afetada por microcistina. Nobre *et al.* (2001) observaram alterações no funcionamento de rins de ratos perfundidos com MCYST-LR que podem estar relacionadas a lesões vasculares e glomerulares.

Apesar de serem poucos os estudos descritos na literatura sobre os efeitos de microcistinas no pulmão, sabe-se que este órgão também pode ser atingido por estas toxinas. Após uma única administração intratraqueal de dose sub-letal de MCYST-LR a camundongos, Ito *et al.* (2001) detectaram, por técnicas de imunohistoquímica, a presença desta toxina no tecido pulmonar por até 7 dias.

Em um dos primeiros estudos, Slatkin *et al* (1983) observaram que camundongos injetados intraperitonealmente com doses altas de MCYST-LR apresentaram uma trombose pulmonar atípica. Falconer *et al* (1988), em um longo estudo de intoxicação crônica, ofereceram a camundongos água contendo extratos de *Microcystis aeruginosa* produtora de MCYSTs e verificaram broncopneumonia nos animais que receberam doses mais altas.

O pulmão pode ser exposto às microcistinas tanto pela via área quanto pela circulação sanguínea. Em um estudo sobre a exposição por inalação, Fitzgeorge *et al.* (1994) comprovaram que a DL₅₀ de MCYST-LR para camundongos por administração intranasal foi igual a DL₅₀ por injeção intraperitoneal. Os autores afirmaram que isto foi resultado de necrose extensiva do epitélio da mucosa tanto da via respiratória quanto

olfatória, o que facilitou a absorção da toxina pela extensa rede de capilares presentes na região.

A exposição a estas toxinas por inalação tem relevância maior quando se considera o uso de corpos d'água com florações de cianobactérias para fins recreativos. Turner *et al* (1990) descreveram um caso de recrutas no Reino Unido que deram entrada no hospital com quadro de pneumonia basal esquerda 5 dias após exercícios de canoagem em um reservatório com alta concentração de células de *Microcystis aeruginosa*, onde beberam e inalaram água. Também foram observados sintomas como garganta inflamada, tosse seca, vômito e dor abdominal. A floração de cianobactéria foi comprovada como sendo tóxica (células produtoras de MCYST-LR) e os autores acreditam ser esta a razão mais plausível para o quadro clínico observado.

A presença de florações de cianobactérias em corpos d'água utilizados para a recreação tem sido cada vez mais freqüente e o risco para a população está diretamente relacionado aos efeitos de irritação dérmica, assim como a potencial ingestão e inalação da água (Chorus & Bartram, 1999; Hobson *et al.*, 2004). O “spray” gerado por esportes aquáticos que utilizam lanchas e jet ski também pode aumentar a exposição por inalação.

Entretanto, em muitos países onde o tratamento da água para abastecimento da população é deficitário, um dos maiores problemas em relação a presença de cianobactérias tóxicas na água é o consumo oral. No Brasil, em 1988, foi descrito um dos primeiros casos de morte humana em que a causa mais provável foi relacionada à intoxicação com cianotoxinas. Neste incidente, dentre os 2000 casos de gastroenterite registrados, 88 pessoas (em sua maioria crianças) faleceram após consumirem água do reservatório de Itaparica-BA que havia sido recém inundado e apresentava uma intensa floração de *Anabaena e Microcystis* (Teixeira *et al.*, 1993).

A China apresenta um dos mais altos índices de carcinoma hepatocelular no mundo. Alguns estudos têm investigado se o consumo de água contaminada com cianobactérias tóxicas é parte da complexa rede de fatores de risco existentes. Foi verificado que a hepatite B e o consumo de grãos contaminados com aflatoxina B1 são as maiores causas. No entanto, o consumo de água contaminada com cianotoxinas foi considerado o terceiro elemento responsável pelos altos índices de câncer hepático (Ueno *et al.*, 1996; Chorus & Bartram, 1999).

Microcistinas são consideradas promotoras de tumores em diversos tecidos, tais como pele, cólon e fígado (Humpage *et al.*, 2000). Um estudo com camundongos que receberam oralmente doses sub-letais de microcistinas por 1 ano mostrou uma incidência maior de tumores hepáticos nos animais que receberam água contaminada em relação aos animais controle (Falconer *et al.* 1988).

Em relação ao câncer, experimentalmente estas toxinas podem apresentar efeitos aparentemente contraditórios, os quais seriam apoptose e proliferação celular. Gehringer (2004) afirma que a resposta celular em direção a um dos dois efeitos possivelmente depende da dose de microcistina a qual o organismo foi exposto. Geralmente, doses mais altas levam à apoptose e doses mais baixas promovem proliferação celular. Essa última parece estar relacionada à inibição de proteínas fosfatases e conseqüente ativação de uma cascata de respostas celulares incluindo a ativação de proteínas cinases, tais como a proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK).

Portanto, a exposição prolongada a doses baixas de microcistinas através do consumo de água contaminada, ou mesmo de peixes e outros alimentos contaminados com esta toxina, pode favorecer o surgimento de câncer. No entanto, a água não afeta a saúde humana apenas pelo consumo oral. O uso de água para tratamento dialítico traz um dos maiores riscos à população humana no que se refere à água contaminada com cianotoxinas.

O primeiro caso de morte humana confirmada por intoxicação por microcistinas ocorreu em Caruaru, Pernambuco, em 1996. Devido à forte seca que atingia a região na época, os reservatórios que abasteciam a cidade estavam com volumes reduzidos e apresentavam intensa floração de cianobactérias. A intermitência no abastecimento de água, devido ao pouco volume nos reservatórios, fez com que as clínicas de diálise da cidade buscassem a água diretamente nos reservatórios através de caminhões pipa. Entretanto, o tratamento dado à água nessas clínicas foi inadequado, o que promoveu lise das células de cianobactérias e liberação da toxina para a água. Os sistemas de colunas de troca iônica e carvão ativado não estavam em condições adequadas de uso e, assim, não puderam reter as toxinas. Conseqüentemente, dos 136 pacientes em tratamento de hemodiálise, 117 sofreram distúrbios visuais, náusea, vômito, fraqueza muscular e hepatomegalia. Destes, 100 desenvolveram falência hepática aguda e 54 faleceram. Análises do soro e do fígado dos pacientes que faleceram indicaram a presença de microcistinas e todo o quadro fisiopatológico foi compatível com o observado para intoxicação por estas toxinas. As análises das colunas de troca iônica e do carvão ativado também mostraram presença de MCYSTs, além de outra hepatotoxina, a cilindrospermopsina (Jochimsen *et al.*, 1998; Carmichael *et al.*, 2001; Azevedo *et al.*, 2002).

Atualmente, existe uma preocupação mundial quanto aos riscos impostos pela ocorrência de cianobactérias em corpos d'água utilizados para o abastecimento público. Isto se reflete na criação de legislação específica para o aperfeiçoamento do controle da qualidade da água, incluindo o monitoramento de cianotoxinas. O Brasil foi o primeiro país a estabelecer tal medida, através da portaria 518 do Ministério da Saúde.

Os estudos toxicológicos experimentais são uma importante ferramenta na avaliação dos riscos dessas toxinas para a população humana. No entanto, a grande maioria dos dados sobre cianotoxinas ainda é obtida em estudos de intoxicação aguda,

mas a intoxicação crônica e sub-letal certamente é mais freqüente e também representa sérios riscos à população.

Portanto, por serem ainda as cianotoxinas mais comumente encontradas nos ambientes aquáticos, as microcistinas e seus efeitos sub-letais em mamíferos foram escolhidos como objeto de estudo desta tese.

2 – Objetivos

Geral:

Contribuir para a elucidação dos processos metabólicos de acúmulo e detoxificação de microcistinas, tanto em animais como em seres humanos que sofreram exposição a estas toxinas e também analisar seus efeitos no fígado e pulmão de camundongos, tratados com doses sub-letais injetadas intraperitonealmente.

Específicos:

Procurou-se atingir os seguintes objetivos específicos através de metodologias que estão descritas em três capítulos desta tese:

- 1- Avaliar o acúmulo de microcistinas no fígado e pulmão em camundongos jovens e adultos;
- 2- Avaliar os efeitos de microcistinas sobre a atividade de proteínas fosfatases 1 e 2A no fígado e pulmão de camundongos jovens e adultos ;
- 3- Avaliar os efeitos de microcistinas sobre a concentração de glutathione no fígado de camundongos jovens e adultos;
- 4- Avaliar os efeitos de microcistinas na histologia pulmonar de camundongos jovens e adultos;
- 5- Avaliar os efeitos de microcistina-LR na mecânica respiratória de camundongos adultos;
- 6- Analisar a concentração de microcistinas no soro de pacientes expostos à estas toxinas através de tratamento de hemodiálise.
- 7- Avaliar a variação temporal da concentração de microcistina-LR no soro de ratos injetados com esta toxina.

3 - Acúmulo e efeitos de doses sub-letais de microcistina-LR na variação da concentração de glutatona e na atividade de proteínas fosfatases 1 e 2 A em fígado de camundongos.

Participaram do estudo descrito neste capítulo:

Raquel M. Soares, Prof^ª Sandra M.F.O Azevedo

Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias – IBCCF^o – UFRJ

Rodrigo B. Ferraro, Prof. José Roberto Meyer Fernandes

Laboratório de Bioquímica Celular - Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ

O objetivo deste capítulo foi verificar os efeitos de doses sub-letais de microcistina-LR na variação da concentração de glutatona e na atividade de proteínas fosfatases 1 e 2 A em fígado de camundongos, analisando também o acúmulo desta microcistina no tecido hepático.

3.1- Material e Métodos:

3.1.1 – Experimentos:

3.1.1.2 – Efeitos da dose sub-letal de 48µg MCYST-LR /Kg de peso corpóreo:

Camundongos Swiss machos adultos (12 semanas), adquiridos no biotério central da Fundação Oswaldo Cruz –RJ, foram alocados em gaiolas (4 animais por gaiola), sendo alimentados com ração comercial e água potável *ad libitum*. Os animais foram aclimatados no laboratório por 2 dias antes do início dos experimentos. Todos foram pesados e do total de 28 animais, 4 foram selecionados aleatoriamente para servirem como controles. Os 24 camundongos restantes foram injetados intraperitonealmente com uma única dose sub-letal de 48µg de MCYST-LR /Kg de peso corpóreo (padrão gentilmente cedido pelo Prof. Wayne Carmichael –Wright State University-EUA) solubilizada em solução salina (NaCl 0,9%). Os animais controle foram injetados com 0,5 mL de solução salina. As amostragens dos animais injetados com microcistina-LR foram feitas a 2, 8, 24, 48, 96 horas e 8 dias após a injeção. Todos foram sacrificados por deslocamento cervical, dissecados, sendo o fígado retirado para análise da atividade fosfatásica (PP1 e 2 A) e da concentração de MCYST-LR livre. Os camundongos controle foram todos amostrados ao final do experimento e sofreram o mesmo procedimento aplicado aos animais teste.

3.1.1.3 – Efeitos da dose sub-letal de 40µg de MCYST-LR /Kg de peso corpóreo:

Camundongos Swiss machos adultos (12 semanas) e jovens (4 semanas), adquiridos no biotério central da Fundação Oswaldo Cruz –RJ, foram alocados e aclimatados como no experimento descrito anteriormente. Todos os animais foram pesados e do total de 48 animais, 4 jovens e 4 adultos foram selecionados aleatoriamente como controles. Os 40 camundongos restantes foram injetados intraperitonealmente com uma única dose sub-letal de 40µg de MCYST-LR /Kg p.c. solubilizada em solução salina (NaCl 0,9%). Os animais controle foram injetados com 0,5mL de NaCl 0,9% para adultos e 0,3mL para jovens. As amostragens dos animais injetados com microcistina-LR foram feitas a 30 minutos, 2, 24, 48 horas e 8 dias após a injeção. Todos foram sacrificados por deslocamento cervical, dissecados, sendo o fígado retirado para análise da concentração de glutatona, MCYST-LR livre e da atividade de proteínas fosfatases 1 e 2A. Os camundongos controle foram amostrados todos ao final do experimento e sofreram o mesmo procedimento aplicado aos animais teste.

Como a análise da concentração de glutatona requer um processamento do tecido hepático bastante diferente do processamento para as análises da atividade fosfatásica e da concentração de microcistinas, o fígado de cada animal (imediatamente após a retirada) foi cortado com bisturi em pedaços tão pequenos quanto possível e aleatoriamente misturados. Em seguida, o tecido, após ser novamente pesado, foi separado em duas porções iguais, alocadas em diferentes frascos Falcon e processadas para as diferentes análises.

3.1.3 – Análise da atividade de proteínas fosfatases 1 e 2 A:

O fígado dos animais que receberam a dose de 48µg/Kg p.c e a parte do fígado dos animais que receberam a dose de 40µg/Kg p.c, separadas para esta análise, foram processados de acordo com a metodologia descrita por Runnegar *et al* (1993).

O tecido hepático foi homogeneizado (0,1g de tecido/mL) em solução tampão contendo EDTA (0,1mM), DTT (1mM), Tris-HCl pH 7,0 (50mM) e o inibidor de protease PMSF (0,1mM) em banho de gelo, utilizando-se homogeneizador Tissuemiser (Fisher Scientific). O homogenato resultante foi centrifugado a 10000 g e o sobrenadante (citosol hepático) obtido foi armazenado em freezer a -20°C até o momento da análise.

Nos hepatócitos, as proteínas fosfatases 1 e 2 A, da família das serina/treoninas, são os alvos diretos e principais de microcistinas. Portanto, para se investigar corretamente os efeitos desta toxina no tecido hepático é importante avaliar a atividade das PP 1 e 2 A especificamente. Para isso, é necessária a utilização do substrato específico das mesmas, a enzima glicogênio fosforilase *a*.

Então, a partir da fosforilase *b*, em presença de [γ - 32 P] ATP, produziu-se fosforilase *a* marcada. Para tanto, foi seguido o procedimento descrito por Shenolikar & Ingebritsen (1984) com pequenas modificações: 5mg de fosforilase *b* (Sigma-Aldrich, Saint Louis – EUA) foram incubados por 1 hora, em banho termostatzado a 30°C, com 400 μ L de solução contendo 0,08mg de fosforilase cinase (Sigma-Aldrich, Saint Louis – EUA), 300 μ M de ATP e 5000 cpm/pmol de [γ - 32 P] ATP (Amersham Biosciences, Buckinghamshire-UK), 2mM de acetato de magnésio, 125 μ M de CaCl₂, 60mM de glicerofosfato de sódio (pH 8,2), 50mM de Tris-HCl (pH 8,2). A reação foi interrompida com solução de sulfato de amônio 90% saturada e transferida para banho de gelo, onde foi mantida por mais 1 hora. Em seguida, após centrifugação a 15000 g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em 0,4mL de solução contendo Tris-HCl (5,0mM pH 7,0), EDTA (1,0mM), 2-mercaptoetanol (0,3% v/v). Os cristais de [32 P] fosforilase *a* formados foram então diafiltrados em Microcon YM-10 (Millipore, Bedford, MA - EUA) através de centrifugação a 14000 g por aproximadamente 2 horas a 4°C. O filtrado foi descartado, o material retido no filtro foi ressuspensão na solução citada anteriormente, diafiltrado, sendo este processo repetido ainda mais uma vez e o precipitado final ressuspensão em solução contendo Tris-HCl (50mM pH 7,0), NaCl (250mM), 2-mercaptoetanol (0,3% v/v).

Este processo permitiu a remoção de grande parte do ATP radioativo residual, no entanto permite um rendimento máximo de 65% na produção de fosforilase *a*. A concentração final da mesma foi determinada através de diluição de uma pequena alíquota e determinação de sua absorbância em 280nm (λ 1,31=1mg/mL, de acordo com o protocolo de Shenolikar & Ingebritsen, 1984).

A determinação da atividade de PP 1 e 2 A no citosol hepático foi realizada incubando-se 10 μ L de citosol, 10 μ L de solução de reação (50mM de Tris-HCL , pH 7,0 e 1mM de DTT) e 10 μ L de solução [32 P] fosforilase *a* (3mg/mL) por 10 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 0,1mL de ácido tricloroacético 10% e a liberação de fosfato radioativo foi determinada através de cintilação líquida.

3.1.4 – Análise de MCYST-LR por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay):

As mesmas amostras de citosol hepático utilizadas para a análise da atividade fosfatásica foram também analisadas por ELISA para a detecção de MCYST-LR, de acordo com a metodologia descrita por Chu *et al* (1990), An & Carmichael (1994) e Carmichael & An (1999). O método utiliza anticorpos policlonais de coelho anti-MCYST-LR, com reatividade cruzada também contra vários congêneres de microcistina.

O método de ELISA competitivo direto, utilizado para estas análises, se constitui da identificação do antígeno (a microcistina) através de anticorpos específicos fixos a uma placa. Simplificadamente, a placa é incubada com a amostra contendo o antígeno e posteriormente com um conjugado composto de antígeno ligado a uma enzima, neste caso a peroxidase. O antígeno ligado à enzima e o não ligado (a amostra) competem pela ligação com os anticorpos, sendo que a amostra tem a vantagem de ter entrado antes em contato com os anticorpos. Após a reação, a placa é lavada e somente o que foi ligado aos anticorpos permanece. O substrato da enzima é adicionado e a reação é colorimétrica. O resultado é obtido através dos valores de densidade ótica das amostras, e assim, quanto mais reação de cor houver, menos toxina existe na amostra. Cabe ressaltar que este método somente é capaz de detectar microcistinas livres, ou seja, microcistinas conjugadas com proteínas fosfatases, ou com qualquer outro peptídeo, não são reconhecidas pelos anticorpos.

Os anticorpos e o conjugado MCYST-aminoetilíio-peroxidase de mostarda (MCYST-HRP) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Wayne Carmichael (Wright State University – EUA). Assim, placas de 96 poços com volume 200µL (Nunc-Maxisorb) foram incubadas por 24 h com anticorpos policlonais de coelho anti-MCYST LR-BSA (5 µg/mL) e armazenadas em geladeira por até 1 semana. Para a análise de amostras, a placa, após lavagem com solução tampão fosfato (PBS)- Tween 20 0,05%, foi incubada por 60 minutos com solução tampão bloqueadora (caseína 1% em PBS), sendo em seguida lavada novamente com PBS-Tween. Diferentes concentrações de padrão de MCYST-LR e controle negativo (para obtenção da curva padrão), assim como as amostras, foram adicionadas aos poços em duplicata, sendo incubadas por 30 minutos. Após este período, o conjugado MCYST-HRP (12.5 nM) foi adicionado à placa e incubado pelo mesmo período. Em seguida, a placa foi lavada com a solução de lavagem descrita anteriormente e recebeu a solução de substrato preparada no momento com o-fenilenodiamina (OPD) (0,4mg/mL), tampão citrato (50mM de ácido cítrico e 0,1M de NaH₂PO₄, pH 5,0) e peróxido de hidrogênio 30%, sendo incubada novamente por 10 minutos, observando-se o desenvolvimento de cor. A

reação foi interrompida com solução de HCL 1N e a densidade ótica foi determinada em leitora de placas (Molecular Devices – Vmax) em 490nm. A partir da curva padrão de MCYST-LR obtida, calculou-se as concentrações nas amostras.

3.1.5 – Análise de glutatona:

O procedimento para o processamento do tecido hepático e análise de glutatona (GSH) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) seguiu os métodos descritos por Anderson (1985) e Yan & Huxtable (1995), com pequenas modificações.

Após a retirada do fígado dos animais, a fração separada para a análise de glutatona foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido, descongelada e homogenizada em 5-ácido sulfosalicílico 5% (5 vol/g). O homogenato foi centrifugado por 5 minutos a 10000 g, sendo o precipitado descartado e o sobrenadante submetido ao processo de derivatização.

Glutatona e outros compostos tiol reagem com monobromobimano de Kosower (mBBr) e o derivado GSH-bimano pode ser, então, quantificado por HPLC com detector de fluorescência. Neste trabalho, foi feita a substituição do mBBr pelo monoclorobimano (mBCl) (Calbiochem, La Jolla, CA-EUA), o qual apresenta uma maior afinidade específica pela glutatona.

A derivatização foi realizada em ambiente pouco iluminado para que fosse reduzida a formação de produtos de degradação do mBCl. Deste modo, 120µL do citosol acidificado foram adicionados a 340µL de água Milli-Q e 100 µL de *N*-etilmorfilina (1M). Em seguida, 20 µL de mBCl foram adicionados, agitando-se imediatamente. A mistura foi incubada por 20 minutos no escuro e a reação interrompida com 20 µL de ácido acético para a redução do pH. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até o momento da análise por HPLC.

Um equipamento Shimadzu com bombas LC-10AT, controlador SPD 10A e detector de fluorescência RF-A foi utilizado nas análises de HPLC. Para tanto foi utilizada uma coluna analítica de fase reversa Lichrospher 100 RP-18 125 mm x 4 mm (5µm - Merck) em condições isocráticas e fase móvel de metanol 8% /ácido acético 0,25% (v/v) em pH 3,9. O volume de injeção de amostras foi de 100 µL e o detector de fluorescência foi programado com excitação em 300nm e emissão em 470nm. Para a quantificação de glutatona nas amostras, uma curva padrão foi produzida através da derivatização e análise de padrão de GSH em diferentes concentrações (0,25 – 2mM) (Calbiochem, La Jolla, CA-EUA).

3.1.6 – Análise estatística:

Os resultados das análises de MCYST-LR, glutathiona e atividade de PP1 e 2 A no citosol hepático dos camundongos em ambos os experimentos foram analisados estatisticamente através do software STATISTICA, utilizando-se análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Turkey. Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando $p \leq 0,05$.

3.2 – Resultados e Discussão:

Como pode ser observado na Figura 3.1, a atividade de proteínas fosfatases 1 e 2 A no fígado de camundongos adultos injetados i.p. com uma dose sub-letal de MCYST-LR (48 μ g/Kg p.c.) esteve reduzida em média a 40% da atividade observada nos controles até 8hs após a injeção. A partir de então, verificou-se uma recuperação desta atividade enzimática nos tempos de 24 horas e 8 dias após a injeção

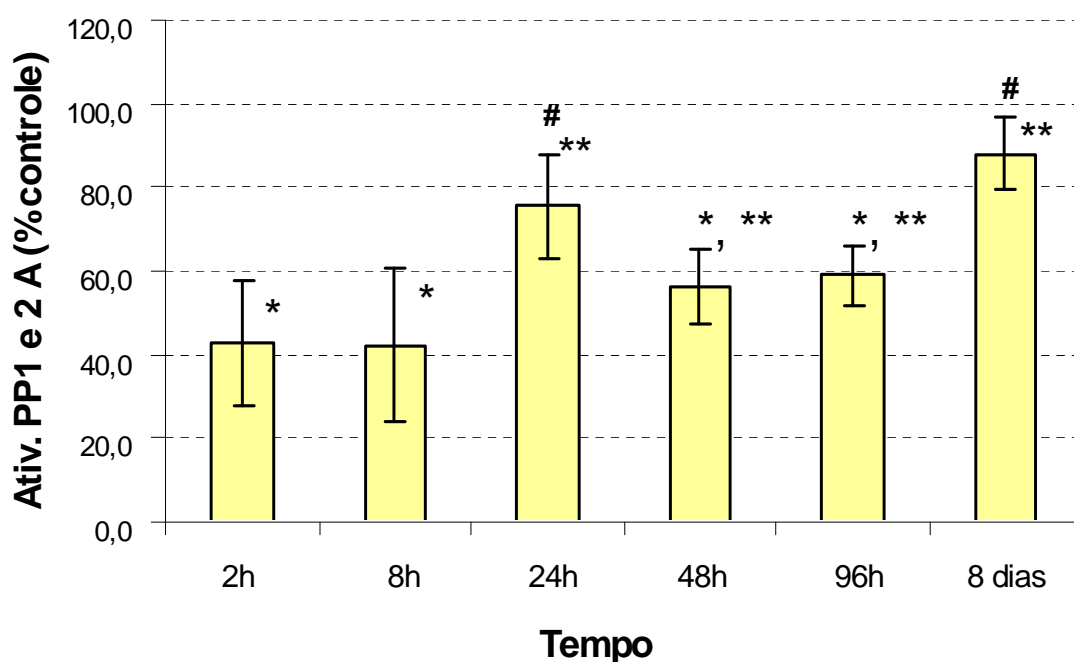


Figura 3.1 – Atividades de proteínas fosfatases 1 e 2A dos fígados de camundongos injetados intraperitonealmente com 48 μ g MCYST-LR/Kg p.c. em relação ao controle. Os valores representam médias \pm erro padrão (*, ** indicam valores não significativamente diferentes entre si e # indica valores não significativamente diferentes do controle, $p \leq 0,05$, $n = 4$ animais por tempo amostral).

Ainda neste experimento, os fígados dos animais foram analisados quanto à concentração de MCYST-LR livre no tecido. A Figura 3.2 mostra os resultados das análises do citosol hepático por

ELISA. Pode-se verificar que até 8h após a injeção i.p. as concentrações obtidas foram muito baixas. No entanto, a partir de 24h foi detectado um aumento expressivo de MCYST-LR livre nos fígados, o qual se manteve estatisticamente estável até 96h, com um valor máximo de 50,5 ng/g de tecido. Ao final do experimento, 8 dias após a injeção, a concentração de MCYST-LR livre no tecido hepático estava novamente reduzida (6,5ng/g).

Na Figura 3.3 estão apresentados os valores percentuais, em relação ao controle, da atividade de PP1 e 2A no fígado dos animais injetados com a dose de 40 µg de MCYST-LR /Kg p.c. Pode-se observar que 30 minutos após a injeção da toxina a atividade das fosfatases já estava reduzida em média a 34% nos animais adultos e 40% nos animais jovens. Nos animais adultos ocorreu uma recuperação significativa da atividade enzimática 2 horas após a injeção. Estes valores foram equivalentes aos dos controles e não diferiram nas amostragens seguintes, mostrando que a recuperação foi estável até o final do experimento. Quanto aos resultados com animais jovens, observou-se valores médios de atividade fosfatásica mais elevados a partir de 2 horas após a injeção, mas uma recuperação significativa só foi observada a partir de 48h após a injeção de MCYST-LR. Também devido à grande variabilidade, não foi possível verificar diferença estatística entre os valores de atividade fosfatásica de jovens e adultos.

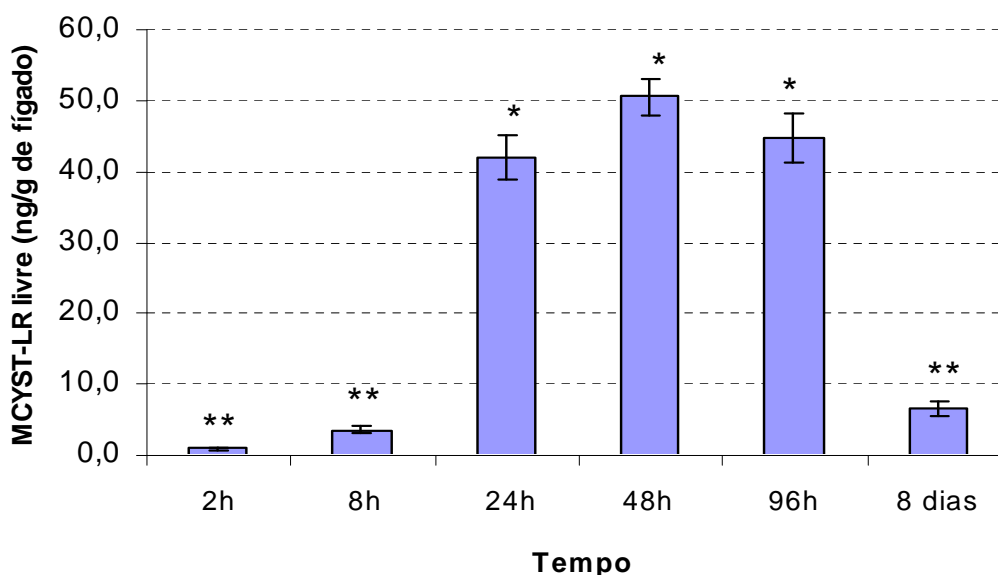


Figura 3.2 – Concentração de MCYST-LR livre (análise de ELISA) no citosol de hepatócitos de camundongos injetados intraperitonealmente com 48 µg/Kg p.c. Os valores representam médias ± erro padrão (*, ** indicam valores não significativamente diferentes entre si, $p \leq 0,05$, $n = 4$ animais por tempo amostral).

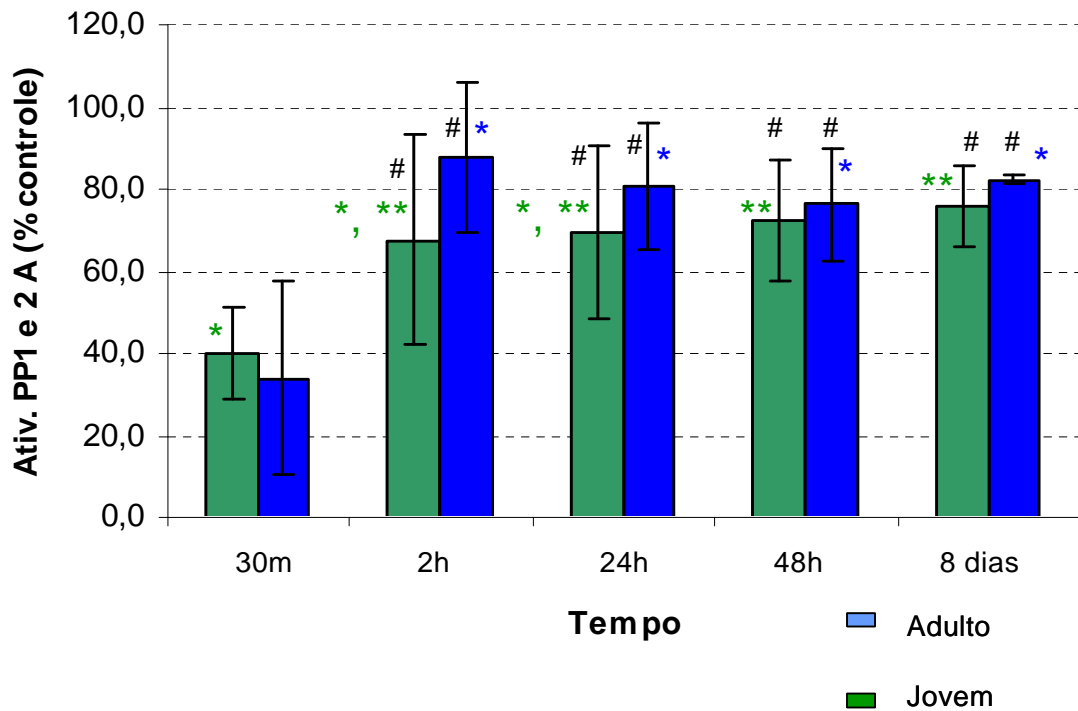


Figura 3.3 – Atividades de proteínas fosfatases 1 e 2A dos fígados de camundongos adultos e jovens injetados intraperitonealmente com 40 μ g MCYST-LR/Kg p.c. em relação ao controle. Os valores representam médias \pm erro padrão (*, ** indicam valores não significativamente diferentes entre si e # indica valores não significativamente diferentes do controle, $p \leq 0,05$, $n = 4$ animais jovens e 4 adultos por tempo amostral).

As análises de MCYST-LR livre nas amostras de citosol de hepatócitos mostraram que, até as duas primeiras horas após a injeção da toxina, os valores da mesma estavam abaixo do limite de detecção do método de ELISA utilizado (0,16ng/mL). A partir da amostragem de 24 horas, pode-se observar um aumento crescente e significativo na concentração de MCYST-LR livre tanto nos animais jovens quanto nos adultos. No entanto, ao contrário do experimento anterior, as concentrações de MCYST-LR livres no oitavo dia foram tão elevadas quanto na amostragem de 48 horas, alcançando, ao final, valores máximos de 5,8 e 5,6 ng/g de tecido nos animais adultos e jovens, respectivamente (Fig. 3.4).

Nesse experimento, também foram analisadas as concentrações de glutathiona no citosol hepático. Na Figura 3.5 pode-se observar que 30 minutos após a injeção de MCYST-LR, ocorreu uma redução significativa dos valores de glutathiona apenas nos animais adultos. Entretanto, as concentrações deste peptídeo foram reduzidas expressivamente, tanto em adultos quanto em jovens, 2 horas após a injeção, sendo que estes últimos apresentaram uma concentração de GSH equivalente a apenas 29,6% da observada no controle. Nas amostragens seguintes, foi verificada uma recuperação significativa na

concentração de GSH, tanto em jovens quanto em adultos, alcançando os níveis dos controles e permanecendo assim até o final do experimento.

Os resultados descritos acima demonstraram que doses sub-letais de MCYST-LR entre 40 e 48 μ g/Kg p.c. são suficientes para provocar forte inibição da atividade de proteínas fosfatases 1 e 2A. No experimento com a dose mais baixa, logo nos primeiros 30 minutos após a injeção intraperitoneal da toxina 66% da atividade destas enzimas já estavam inibidas nos animais adultos.

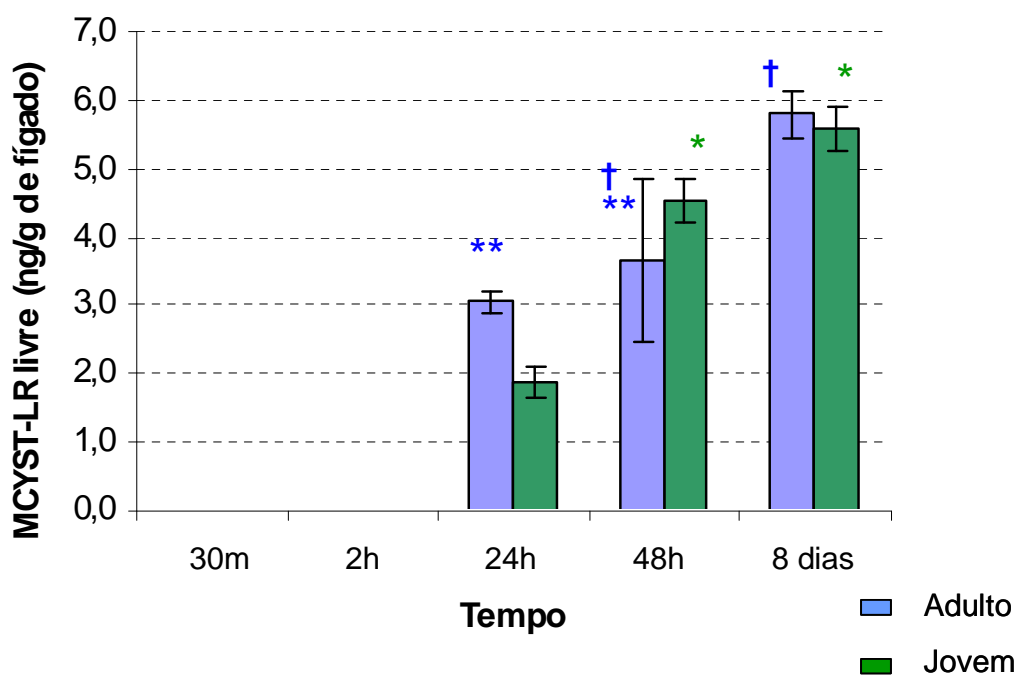


Figura 3.4 – Concentração de MCYST-LR livre (análise de ELISA) no citosol de hepatócitos de camundongos adultos e jovens injetados intraperitonealmente com 40 μ g/Kg p.c. Os valores representam médias \pm erro padrão (*, **, † indicam valores não significativamente diferentes, $p \leq 0,05$, $n = 4$ animais jovens e 4 adultos por tempo amostral).

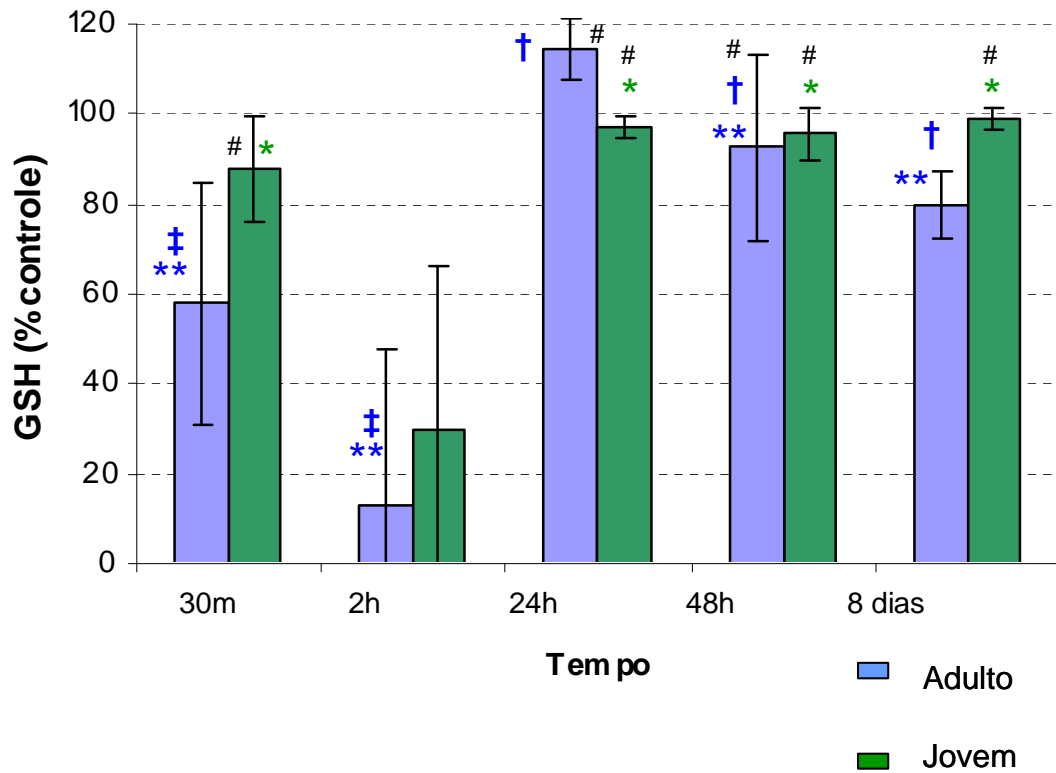


Figura 3.5 – Concentração de glutationa no citosol de hepatócitos de camundongos adultos e jovens injetados intraperitonealmente com 40 μ g MCYST-LR/Kg p.c. em relação ao controle. Os valores representam médias \pm erro padrão (*, **, †, ‡ indicam valores não significativamente diferentes entre si e # indica valores significativamente diferentes do controle, $p \leq 0,05$, $n = 4$ animais jovens e 4 adultos por tempo amostral).

Sabe-se que após injeção intraperitoneal ou intravenosa, a captação hepática de MCYSTs é bastante rápida. Em diferentes experimentos com [3 H]MCYST-LR foi observado que até aproximadamente 70% da dose injetada em camundongos já era encontrada no fígado 30 minutos após a injeção (Robinson *et al*, 1991a; Lin & Chu, 1994). Esta rápida captação é atribuída ao mecanismo de transporte de microcistinas para hepatócitos que se dá através dos transportadores de ácidos biliares (Watanabe *et al*, 1996). Então, uma vez no citosol, MCYSTs se ligam rápida e covalentemente a proteínas fosfatases da família serina/treonina, cujas principais representantes são as PP1 e 2 A, havendo também inibição de PP4 e PP5 que estão em muito menor concentração no citosol (Hokanen & Golden, 2002).

Os resultados obtidos demonstraram também que após uma forte inibição inicial, atividade fosfatásica se recuperou expressivamente nos animais adultos, e se pôde observar que o tempo requerido para esta recuperação parece estar relacionado à dose recebida pelo animal. Os camundongos injetados

com 40µg/Kg p.c. já apresentaram recuperação na atividade enzimática 2 horas após receberem MCYST-LR, enquanto que nos animais que receberam a dose mais alta (48µg/Kg p.c.) a recuperação somente se iniciou após 8 horas. Em ambos os experimentos, esta recuperação é estatisticamente estável e a atividade fosfatásica atinge os níveis do controle.

Entre os animais jovens, uma recuperação significativa somente ocorre a partir de 48h, o que sugere uma diferença relacionada à idade do animal na metabolização das MCYSTs e/ou reação do fígado a esta toxina. Esta é uma observação importante que merece estudos complementares para se confirmar a maior sensibilidade de animais jovens a MCYSTs.

Uma vez que essas toxinas se ligam covalentemente e irreversivelmente a proteínas fosfatases, a hipótese mais plausível que explicaria a recuperação da atividade destas enzimas no fígado seria o aumento da síntese das mesmas. A única evidência de que pode ocorrer maior expressão de fosfatases, após injeção de dose sub-letal de MCYST-LR, foi obtida através de uma comunicação pessoal de Michelle Gehinger (University of New South Wales, Sidney, Austrália) sobre alguns de seus resultados preliminares, descritos parcialmente aqui com sua permissão. Após a injeção em camundongos de uma dose de aproximadamente 40µg de MCYST-LR/Kg p.c., a pesquisadora analisou as mudanças na expressão de PP1 e 2A e seus gens regulatórios através de análises de microarranjo. O resultados indicaram aumentos significativos na expressão de ambas as enzimas, em relação ao controle, a partir de 8h após a injeção da toxina. Deste modo, estes dados preliminares suportam a hipótese de que a recuperação da atividade fosfatásica nos fígados dos animais injetados com MCYST-LR, no trabalho descrito neste capítulo, ocorreu possivelmente devido ao aumento na síntese de proteínas fosfatases.

Em ambos os experimentos, as concentrações de MCYST-LR livres no citosol hepático foram detectadas em níveis muito baixos ou até mesmo não chegaram a ser detectada nas primeiras horas de amostragem. Entretanto, a partir de 24h foi observado um aumento que foi mais expressivo até 96 horas no fígado dos animais que receberam a dose mais alta (48 µg/Kg p.c). Neste intervalo de tempo, a diferença das concentrações detectadas no fígado nos dois experimentos pareceu estar diretamente relacionada à dose injetada nos animais. No entanto, esta diferença mostra que enquanto a dose diminui apenas 8µg/Kg p.c. do primeiro para o segundo, as concentrações observadas de MCYST-LR livres no citosol chegaram a ser 10 vezes menores.

Contudo, a maior concentração detectada no fígado representou apenas aproximadamente 4% da massa de MCYST-LR injetada nos animais. Possivelmente, a maior parte das toxinas realmente se

encontrava ligada às proteínas fosfatases, mas as microcistinas livres podem também ter sido detoxificadas pela glutatona, excretadas ou redistribuídas para outros tecidos.

Considerando-se que os animais receberam uma única dose de MCYST-LR por injeção intraperitoneal e que a ligação destas toxinas com proteínas fosfatases é irreversível, uma das hipóteses que explicaria o aumento de microcistinas livres no tecido hepático ao longo do tempo seria a liberação das toxinas inicialmente ligadas às fosfatases durante o processo de “turnover” destas enzimas. Alguns estudos com peixes e moluscos demonstraram haver aumento na concentração de MCYSTs livres em tecidos destes animais vários dias após a exposição a estas toxinas (Vasconcelos, 1995; Soares *et al.*, 2004).

Outros estudos já sugeriram que a retenção de MCYSTs no tecido hepático está relacionada ao maior ou menor dano que esta toxina tenha causado ao mesmo. Ou seja, fígados mais danificados reteriam mais MCYSTs que fígados pouco danificados (Runnegar *et al.*, 1986). Solter *et al.* (1998) observaram que pequenos aumentos na dose de MCYST-LR injetadas repetidamente em camundongos provocavam danos ao tecido que levavam a um aumento na concentração de MCYSTs livre muito maior do seria esperado pelo aumento da dose. Sabe-se que pelo menos parte da excreção de MCYSTs se dá através da bile (Robinson *et al.*, 1991b). Portanto, danos ao sistema excretório biliar, através de desarranjos no citoesqueleto das células que formam os canículos biliares, podem comprometer a excreção de MCYSTs (Watanabe *et al.*, 1988; Solter *et al.*, 1998).

Assim, de acordo com o exposto acima, no presente trabalho, os danos provocados ao fígado pela dose mais alta de toxina podem ter favorecido a maior retenção das mesmas. Embora não tenha sido analisada MCYST total (livre e ligada às proteínas fosfatases), pode-se supor que as microcistinas livres sejam um bom indicativo da concentração das microcistinas totais.

No processo de detoxificação de MCYSTs no fígado, o tripeptídeo glutatona é reconhecido como molécula chave (Kondo *et al.*, 1996). A conjugação de GSH a MCYSTs livres torna esta toxina um composto mais polar e menos tóxico. Esta ligação ocorre principalmente através da atividade da glutatona S-transferase (GST) e isto inicia todo processo de excreção de microcistinas pela urina ou pelas fezes através da bile (Ito *et al.*, 2002). Já foi demonstrado que GST também atua como importante ferramenta de detoxificação destas toxinas em diversos organismos aquáticos (Pflugmacher *et al.*, 1998; Pietsch *et al.*, 2001).

No experimento apresentado neste capítulo, as análises de glutatona no fígado dos animais injetados com MCYST-LR indicaram uma resposta deste órgão à intoxicação. Logo nas primeiras 2 horas após a injeção foi verificada uma diminuição significativa na concentração de GSH. No entanto, a

concentração desse peptídeo voltou aos níveis do controle a partir de 24 horas, sendo esta dinâmica observada tanto em animais adultos quanto jovens.

Esses dados indicam que a glutathiona foi rapidamente consumida em resposta a entrada de microcistina no tecido hepático, o que está de acordo com outros experimentos descritos na literatura. Gehringer *et al.* (2004) observaram que após injeção de dose sub-letal de MCYST-LR em camundongos houve uma maior expressão de GST e uma concomitante redução na concentração de glutathiona nos fígados dos animais. Neste mesmo trabalho, também foi verificado um aumento da expressão de outras enzimas envolvidas no processo de detoxificação, tais como glutathiona peroxidase (GPX) e glutathiona sintetase (Gss). Esta última teve sua expressão aumentada exatamente 24h após a injeção. Deste modo, no experimento descrito neste capítulo, o aumento da expressão de GST explicaria o decréscimo inicial de glutathiona observado (que estaria sendo utilizada na conjugação com MCYSTs), assim como o aumento da expressão de glutathiona sintetase poderia explicar o retorno subsequente (a partir de 24h) deste tripeptídeo aos níveis do controle. Outros registros da literatura também afirmam que a concentração intracelular de GSH aumenta rapidamente após uma depleção aguda (Meister & Anderson, 1983).

Por fim, com esses dois experimentos pôde-se verificar que apesar de doses sub-letais de MCYST-LR provocarem algum dano hepático, os fígados dos camundongos intoxicados foram capazes de responder a esta agressão através da recuperação da atividade das proteínas fosfatases 1 e 2 A. Além disso, a variação da concentração de glutathiona no citosol hepático indicou que o aparato enzimático responsável pelo processo de detoxificação de MCYSTs esteve atuante e provavelmente contribuiu para a resposta positiva do órgão à intoxicação.

4- Acúmulo e efeitos de doses sub-letais de extrato de cianobactéria contendo microcistinas e microcistina-LR pura em pulmão de camundongos.

Participaram do estudo descrito neste capítulo:

Raquel M. Soares, Prof^ª Sandra M.F.O Azevedo

Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias – IBCCF^o – UFRJ

Viviane R. Cagido, Fábio Camargo, Miguel R. Picanço, Prof. Walter A. Zin

Laboratório de Fisiologia da Respiração – IBCCF^o - UFRJ

Prof^ª Patrícia R.M. Rocco

Laboratório de Investigação Pulmonar – IBCCF^o -UFRJ

Rodrigo B. Ferraro, Prof. José Roberto Meyer Fernandes

Laboratório de Bioquímica Celular - Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ

Parte dos estudos descritos neste capítulo foi publicada no artigo: “Toxicity of a cyanobacterial extract containing microcystins to mouse lungs”. Autores: M.R. Picanço, **R.M. Soares**, V.R. Cagido, S.M.F.O. Azevedo, P.R.M. Rocco & W.A. Zin. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2004, Volume 37(8) 1225-1229. – Em anexo.

O objetivo deste capítulo foi verificar os efeitos de doses sub-letais de extrato de microcistinas e microcistina-LR pura sobre os aspectos histológicos do pulmão e/ou mecânica respiratória de camundongos, assim como os efeitos sobre a atividade de proteínas fosfatases 1 e 2 A e acúmulo dessas toxinas no tecido pulmonar desses animais.

4.1- Material e Métodos:

4.1.1 – Cultivo e produção de extrato de *Microcystis aeruginosa*:

A cepa de *Microcystis aeruginosa* NPJB-1 foi cultivada em meio ASM-1, pH 8,0, temperatura de $\pm 24^{\circ}\text{C}$ e intensidade luminosa de $100 \mu\text{E m}^2\text{s}^{-1}$, de acordo com Ferrão-Filho & Azevedo (2002). O cultivo não foi axênico, mas a contaminação bacteriana foi considerada muito baixa.

Na fase exponencial de crescimento, entre 15 e 20 dias, a cultura foi desmontada, as células foram concentradas com a utilização de um filtrador tangencial (Pellicon Cassette System, Millipore, MA-USA), ressuspensas em água deionizada e rompidas através de ciclos de congelamento e descongelamento. O material orgânico particulado foi filtrado em filtros de fibra de vidro com o uso de sistema de vácuo e o extrato aquoso contendo microcistinas foi utilizado no experimento.

A cepa NPJB-1 já foi caracterizada como produtora de dois tipos de microcistinas: MCYST-LR e MCYST-LF (Azevedo *et al.*, 1994), sendo a primeira produzida em quantidade mais expressiva que a última. A quantificação de microcistinas totais produzidas por esta cepa foi feita através da análise do extrato por ELISA. Para tanto, utilizou-se kit de ELISA de placa comercial da Envirologix Inc. (Portland, ME, USA), seguindo-se os procedimentos indicados pelo fabricante.

4.1.2 – Experimentos:

4.1.2.1 – Efeitos de dose sub-letal de extrato de *Microcystis aeruginosa* contendo microcistinas em pulmão de camundongos:

Camundongos Swiss machos, adultos (12 semanas) e jovens (4 semanas), adquiridos do Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz –RJ, foram alocados em gaiolas, sendo alimentados com ração comercial e água potável *ad libitum*. Os animais foram aclimatados no laboratório por 2 dias antes do início dos experimentos. Todos os animais foram pesados e do total de 90 animais, 30 adultos foram selecionados aleatoriamente para servirem como controles. Dos 60 camundongos restantes, 30 jovens e 30 adultos foram injetados intraperitonealmente (i.p.) uma única vez com uma dose sub-letal de extrato contendo microcistinas ($48,2 \mu\text{g/Kg}$ de peso corpóreo). Os animais controle foram injetados com 0,5mL de solução salina (NaCl 0,9%). As amostragens dos animais para análise do pulmão foram feitas a 2, 8,

24, 48, 72 e 96 horas após a injeção i.p. Os animais foram sacrificados após a retirada adequada do pulmão, como descrito na seção 4.1.4, para a análise histológica.

4.1.2.2 - Efeitos de dose sub-letal de microcistina-LR pura na mecânica respiratória, histologia pulmonar e atividade fosfatásica em pulmão de camundongos:

Trinta e seis camundongos Swiss machos adultos, adquiridos também do Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz- RJ, foram divididos, aleatoriamente, em dois grupos, a saber: grupo controle (n=6 animais) e grupo teste (n=30 animais). No grupo controle, 0,3 mL de solução salina foram injetados intraperitonealmente, enquanto o grupo teste recebeu uma dose sub-letal (48 µg/kg i.p.) de MCYST-LR (padrão cedido pelo Prof. Wayne Carmichael –Wright State University-EUA). Este último grupo foi subdividido em 5 grupos de 6 animais, baseado-se no tempo de amostragem pós-injeção i.p. que foi estabelecido em 2, 8, 24, 48 e 96 horas. Já os 6 animais controle foram amostrados aleatoriamente ao longo do experimento. Após a retirada do pulmão, como descrito na seção 4.1.4, parte do tecido pulmonar foi separada para análise de atividade de proteínas fosfatases 1 e 2 A e presença de microcistina como descrito no capítulo anterior, seções 3.1.3 e 3.1.4.

4.1.3 – Análise da mecânica respiratória:

Os animais foram sedados com diazepam (1 mg i.p.), pesados e, então, anestesiados com pentobarbital sódico (20 mg/kg i.p.). Depois de anestesiados, os animais foram colocados em mesa sob foco cirúrgico em decúbito dorsal. Após o posicionamento cirúrgico, foi realizada uma traqueotomia com introdução de jelco 20G com 32 mm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno, sendo a cânula fixada à traquéia por meio de fios de algodão. Os animais foram paralisados com injeção intravenosa de brometo de vecurônio (0,005 mg/kg)

Os camundongos foram então acoplados à prótese ventilatória e ventilados por um ventilador de fluxo constante (Samay VR15, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguai), com frequência de 100 incursões respiratórias por minuto e um volume corrente (VT) de 0,2 mL.

Após a adaptação ao respirador, os animais foram submetidos à incisão cirúrgica por tesoura na linha média do abdômen justo abaixo do apêndice xifóide. A cavidade abdominal foi aberta, sendo possível visualizar o diafragma que foi perfurado e seccionado. Imediatamente antes da perfuração do diafragma foi instalada pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH₂O (Saldiva et al., 1992). A utilização

da PEEP evita o colapso alveolar e o desenvolvimento de atelectasias resultantes da retirada da parede torácica.

Após a retirada do diafragma, a parede torácica foi removida por cortes longitudinais bilaterais ao nível da linha axilar anterior em toda sua extensão e corte superior abaixo da clavícula.

O ventilador foi ajustado previamente para gerar, quando desejado, uma pausa de 5 segundos ao final da inspiração. Foram tomados cuidados especiais na manutenção do volume ($V_T = 0,2$ mL) e fluxo ($V' = 1$ mL/s) constantes em todos os animais, a fim de evitar os efeitos de diferentes fluxos, volumes e duração da inspiração nas variáveis medidas (Kochi et al., 1988 a, 1988 b).

O tubo traqueal foi conectado a um pneumotacógrafo para pequenos animais, descrito por Mortola e Noworaj (Mortola & Noworaj, 1983), sendo o respirador acoplado a outra extremidade do pneumotacógrafo. Este é constituído por cânula metálica com duas saídas laterais conectadas a um transdutor diferencial de pressão Validyne MP 45-2 (Engineering Corp, Northridge, CA, EUA) para medida de fluxo aéreo e volume corrente. Através de outra saída lateral, a via aérea foi conectada a outro transdutor diferencial de pressão Validyne MP45-2 para medida da pressão traqueal (Ptr). (Figura 4.1)

Uma vez que não existiram modificações abruptas no diâmetro do nosso circuito, erros de medida da resistência ao fluxo (Chang & Mortola., 1981; Loring *et al.*, 1979) foram evitados. Todos os sinais foram condicionados e amplificados num polígrafo Beckman tipo R (Beckman Instruments Schiller Park, IL, EUA). Os sinais de pressão e fluxo foram passados através de filtros Bessel de 8 pólos (902LPF, Frequency Devices, Haverhill, MA, EUA), convertidos de analógico para digital (DT-2801A, Data Translation, Malboro, MA, EUA) e armazenados em computador. Todos os dados foram coletados usando o software LABDAT (RHT-InfoData Inc., Montreal, Quebec, Canadá) (Figura 4.1). Durante os experimentos evitou-se ao máximo a manipulação da cânula traqueal com aspirações e insuflações, para eliminar possíveis interferências sobre os parâmetros medidos.

Os parâmetros da mecânica respiratória foram obtidos através da captação de 15 ciclos respiratórios, pelo método da oclusão ao final da inspiração.

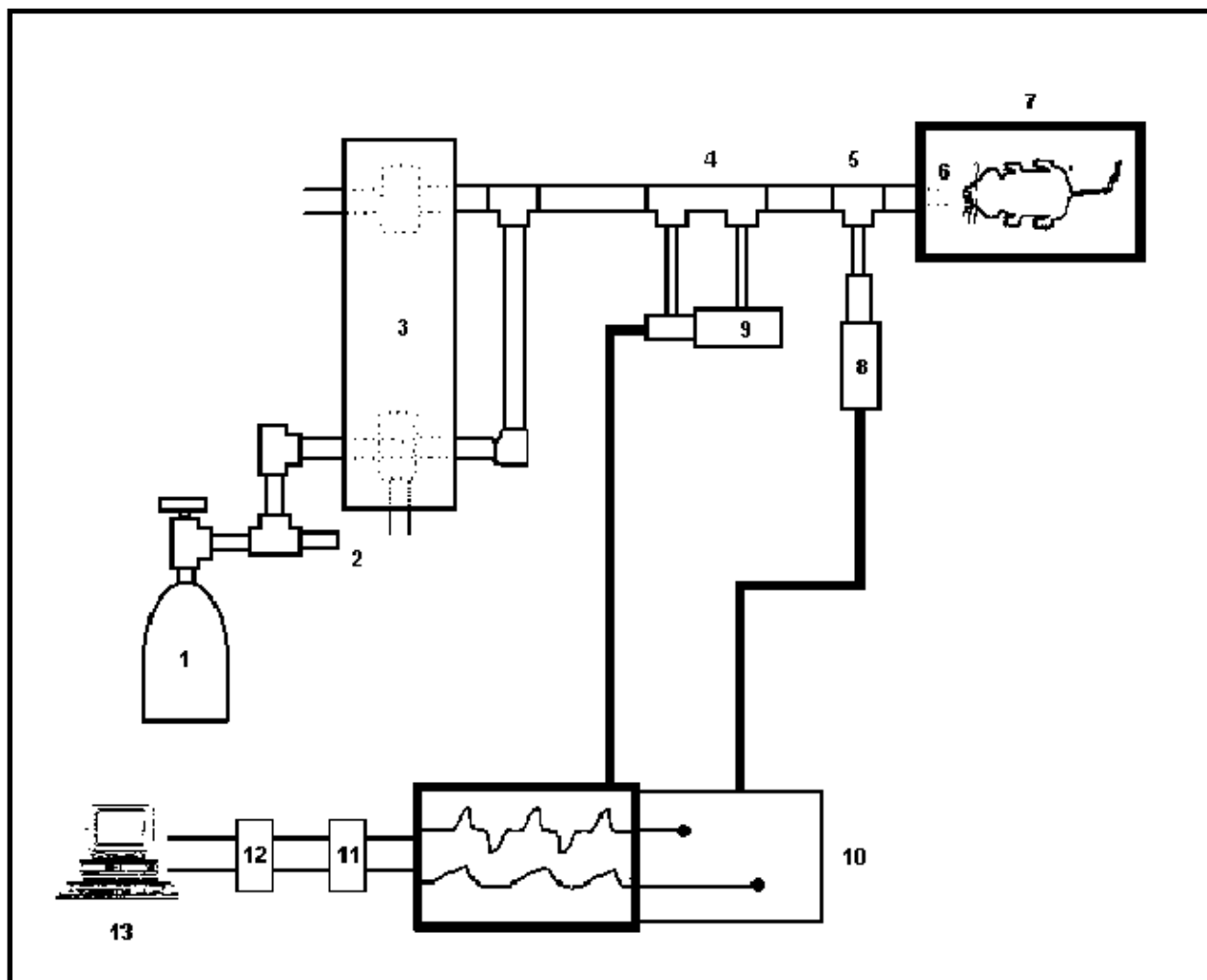


Figura 4.1 – Montagem experimental consistindo de:

- 1 - Cilindro de ar comprimido.
- 2 - Rotâmetro.
- 3 - Ventilador de fluxo inspiratório constante composto por duas válvulas solenóides.
- 4 - Pneumotacógrafo.
- 5 - Peça T para medida de pressão nas vias aéreas.
- 6 - Cânula traqueal.
- 7 - Mesa cirúrgica.
- 8 - Transdutor de pressão traqueal.
- 9 - Transdutor diferencial de pressão para medida de fluxo.
- 10 - Polígrafo de oito canais para amplificação dos sinais de fluxo e pressão traqueal
- 11 - Filtros.
- 12 - Conversor analógico-digital de 12 bits.
- 13 - Microcomputador.

A resistência total do equipamento (R_{eq}), incluindo a cânula traqueal, foi previamente aferida através da aplicação de fluxos de ar ao sistema, com concomitante registro das variações de pressão (ΔP). Uma vez que $R = \Delta P / V'$, a resistência do equipamento corresponde ao coeficiente angular da curva $\Delta P \times V'$. A R_{eq} , constante até fluxos de 26 mL/s (bem acima da faixa de fluxo utilizada no presente experimento), foi de 0,12 cmH₂O/mL/s. A variação de pressão determinada pelo equipamento ($\Delta P_{eq} = R_{eq} \cdot V'$) foi subtraída das pressões resistivas do pulmão, de tal forma que os resultados representam as propriedades mecânicas intrínsecas do órgão.

4.1.3.1- Método de Oclusão ao Final da Inspiração:

A mecânica respiratória foi avaliada pelo método de oclusão ao final da inspiração (Bates *et al.*, 1985), o qual permite analisar separadamente os componentes elástico, resistivo e viscoelástico e/ou inhomogêneo do sistema respiratório.

No animal com o tórax aberto, a pressão traqueal (P_{tr}) é na realidade a pressão transpulmonar (PL). Após a oclusão das vias aéreas ao final da inspiração, sob fluxo constante, ocorre uma queda súbita da PL até um ponto de inflexão ($P_{i,L}$) a partir do qual o decaimento da pressão assume caráter mais lento, atingindo um platô em sua porção terminal. Esta fase de platô corresponde à pressão de retração elástica do pulmão ($P_{el,L}$). A diferença de pressão ($\Delta P_{1,L}$) que caracteriza a queda rápida inicial, representada pela diferença entre a pressão máxima inicial ($P_{max,L}$) e o ponto a partir do qual a queda se torna mais lenta ($P_{i,L}$), corresponde ao componente viscoso pulmonar. A segunda variação de pressão ($\Delta P_{2,L}$), representada pela queda lenta, do $P_{i,L}$ ao platô ($P_{el,L}$), reflete a pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico (*stress relaxation*) e/ou inhomogêneo (*pendelluft*) do tecido pulmonar. A soma de $\Delta P_{1,L}$ e $\Delta P_{2,L}$ fornece a variação total de pressão no pulmão ($\Delta P_{tot,L}$) (Figura 4.2).

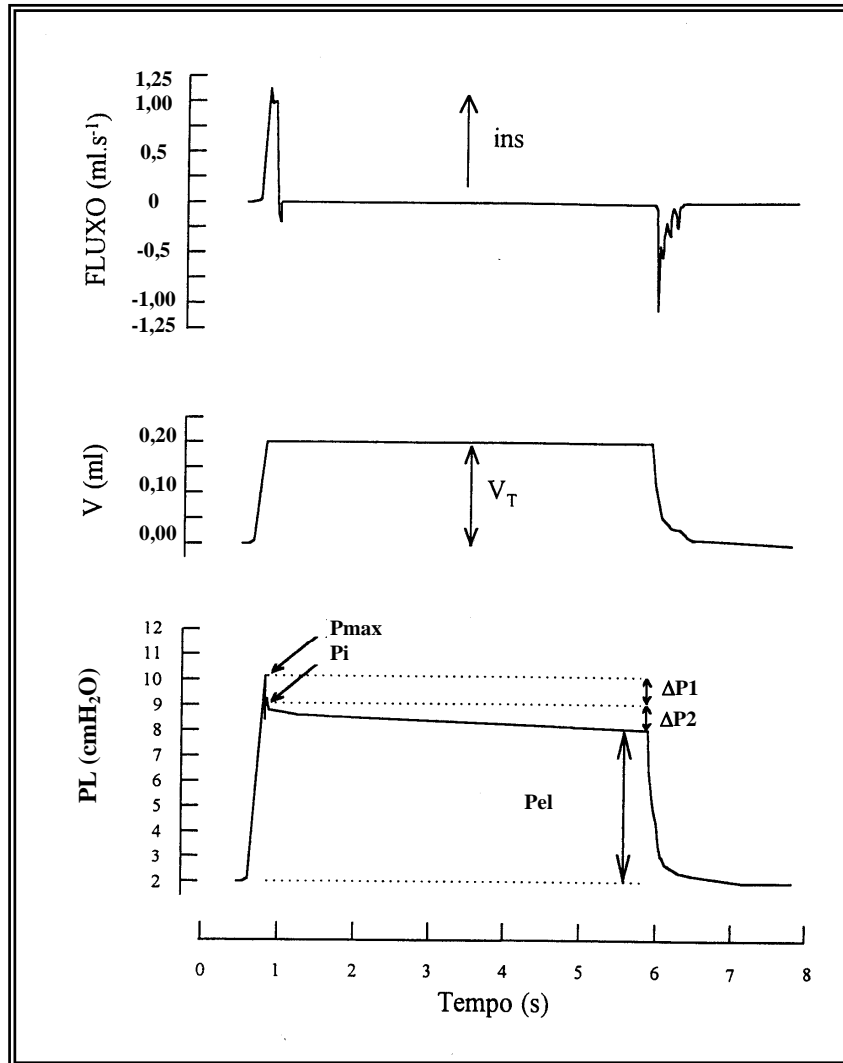


Figura 4.2 – Método de Oclusão ao Final da Inspiração. Registros dos sinais de fluxo aéreo, volume (V) e pressão transpulmonar (PL) em função do tempo. Os pulmões foram ventilados com volume corrente de 0,2 mL e fluxo aéreo de 1 mL/s. O platô foi alcançado após uma pausa inspiratória de 5 s. Após a oclusão das vias aéreas, há uma queda rápida na PL ($\Delta P1,L$) que corresponde a $P_{max,L} - P_{i,L}$, pressão dissipada para vencer o componente viscoso do pulmão, seguida por uma queda lenta ($\Delta P2,L$), pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão, até um ponto de equilíbrio elástico, representado pela pressão de retração elástica pulmonar ($P_{el,L}$). A linha de base do registro de pressão corresponde à pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH₂O.

As elastâncias estática (Est,L) e dinâmica ($Edyn,L$) do pulmão podem, então, ser obtidas dividindo-se $P_{el,L}$ e $P_{i,L}$, respectivamente, pelo volume corrente. $\Delta E,L$ é a diferença entre $Edyn,L$ e Est,L .

Para a realização da oclusão, o aparelho utiliza uma válvula com tempo de fechamento definido (10 ms). Como este fechamento não é absolutamente instantâneo, o volume nunca cai a zero imediatamente após a oclusão, propiciando, assim, a existência de um pequeno fluxo. Este fluxo será responsável pelo aumento do volume pulmonar e, conseqüentemente, de $P_{i,L}$ e $P_{e,L}$. Por isso, foi feita correção de acordo com Kochi *et al.* (1988a).

As seguintes fórmulas foram utilizadas na análise da mecânica pulmonar:

$$\Delta P_{1,L} = P_{max,L} - P_{i,L}$$

$$\Delta P_{2,L} = P_{i,L} - P_{e,L}$$

$$\Delta P_{tot,L} = \Delta P_{1,L} + \Delta P_{2,L}$$

$$E_{st,L} = P_{e,L} / V_T$$

$$E_{dyn,L} = P_{i,L} / V_T$$

$$\Delta E_{,L} = E_{dyn,L} - E_{st,L}$$

ONDE:

$\Delta P_{1,L}$ = VARIAÇÃO DE PRESSÃO RELATIVA AO COMPONENTE VISCOZO PULMONAR

$\Delta P_{2,L}$ = VARIAÇÃO DE PRESSÃO RELATIVA AO COMPONENTE VISCOELÁSTICO E/OU INOMOGÊNEO PULMONAR

$\Delta P_{TOT,L}$ = VARIAÇÃO TOTAL DE PRESSÃO PULMONAR

$P_{MAX,L}$ = PRESSÃO PULMONAR MÁXIMA ATINGIDA

$P_{I,L}$ = PRESSÃO PULMONAR NO PONTO DE INFLEXÃO

$P_{E,L}$ = PRESSÃO DE RETRAÇÃO ELÁSTICA PULMONAR

$E_{ST,L}$ = ELASTÂNCIA ESTÁTICA DO PULMÃO

E_{DYN} = ELASTÂNCIA DINÂMICA DO PULMÃO

$\Delta E_{,L}$ = DIFERENÇA ENTRE AS ELASTÂNCIAS ESTÁTICA E DINÂMICA DO PULMÃO

V_T = VOLUME CORRENTE

4.1.4 -Análise histológica do parênquima pulmonar:

Os pulmões, ocluídos pela traquéia com linha de algodão ao final da expiração (ou capacidade residual funcional -CRF), foram retirados e 1/2 parte foi separada para análise de ELISA e atividade de proteínas fosfatases no experimento em as mesmas foram realizadas. Os pulmões a serem levados para análise histológica foram congelados através de imersão, por aproximadamente 3 minutos, em nitrogênio líquido, sendo a seguir retirados e mantidos em solução Carnoy (etanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%, por volume) a -70° C por 24 h (Nagase *et al.*, 1992). Após este período, o material foi

desidratado progressivamente em etapas, através de imersão em soluções com concentração crescente de etanol, como discriminado abaixo:

- 1: Etanol 70%, clorofórmio 22,5% e ácido acético 7,5%, a -20° C durante 1 h;
- 2: Etanol 80%, clorofórmio 15% e ácido acético 5%, a -20° C durante 1 h;
- 3: Etanol 90%, clorofórmio 7,5% e ácido acético 2,5%, a -20° C durante 1 h;
- 4: Etanol 100%, sendo mantidos a -20° C por 1 h.

Posteriormente, os pulmões foram mantidos a -4° C por 24 h. Após a fixação, o material foi embebido em parafina, obtendo-se cortes histológicos com 4 μm de espessura. As lâminas contendo os cortes pulmonares foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). As mesmas foram analisadas por microscopia óptica (microscópio Axioplan, Zeiss, OberKochen, Alemanha), segundo seus aspectos qualitativos e quantitativos. Para a análise descritiva, toda a superfície da lâmina foi observada com todas as estruturas pulmonares representadas, em aumento de 200 e 1000x.

A análise quantitativa foi realizada através da técnica convencional de contagem de pontos (“point-counting”) (Gundersen *et al.*, 1988), utilizando uma ocular acoplada ao microscópio contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 linhas dispostos em paralelo (Figura 4.3).

Em um aumento de 200x foram analisados dez campos aleatórios e não coincidentes por lâmina. Foi quantificada a fração de área ocupada por alvéolos normais, colapsados e hiperinsuflados (Weibel, 1990).

Em um aumento de 1000x (área de 10.000 μm^2) foram analisados cinco a dez campos aleatórios e não coincidentes. Os seguintes parâmetros foram quantificados: tecido pulmonar, células polimorfonucleares (neutrófilos) e células mononucleares (macrófagos + linfócitos + monócitos).

O tecido pulmonar foi analisado através do número de pontos do campo que coincidiam com a área de tecido e não sobre o espaço aéreo. Pontos que coincidem com a área de tecido foram computados e divididos pelo número total de pontos.

O resultado foi apresentado como fração de área de tecido pulmonar, obtido pela razão entre a média do número de pontos computados nos cinco campos analisados pela área total da amostra (10.000 μm^2). No caso dos polimorfo e mononucleares, foi quantificado o número total de cada tipo celular, bem como a celularidade total (polimorfonucleares + mononucleares). Os valores finais foram expressos como média \pm erro padrão (SEM).

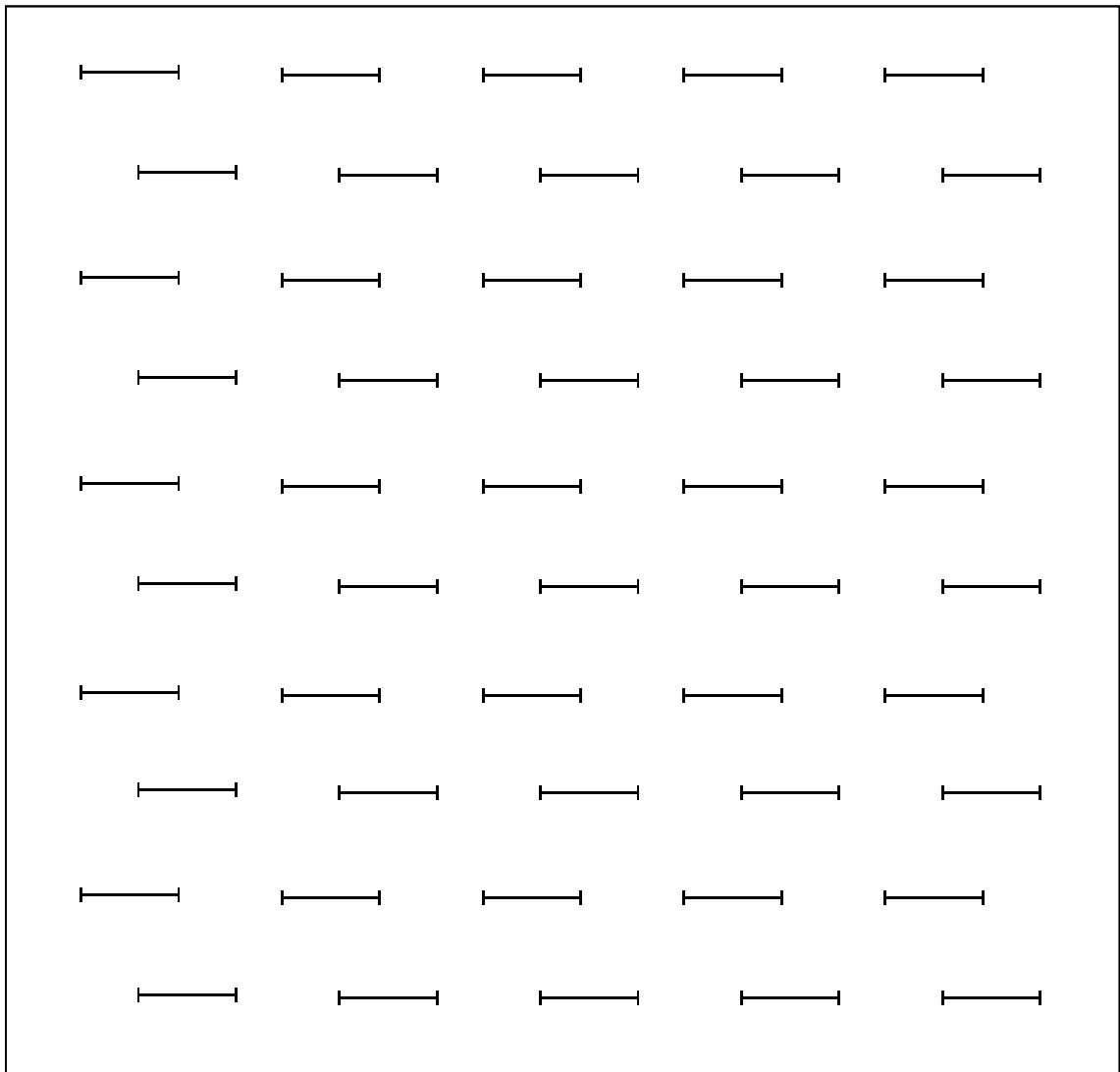


Figura 4.3. Representação esquemática do retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos.

4.1.5 - Análise estatística:

Os parâmetros mecânicos e histológicos dos grupos controle e teste foram comparados através de análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Student Newman-Keuls. Em todos os testes, o nível de significância foi 5%.

4.2 – Resultados e discussão:

Os efeitos da dose sub-letal de extrato de *Microcystis aeruginosa*, contendo microcistinas, no pulmão dos camundongos injetados i.p. estão ilustrados na Figura 4.4. Pode-se observar que houve um aumento, em relação ao controle, da fração de colapso alveolar em todos os tempos de amostragem. Nos animais jovens, o valor máximo de colapso (de até 400% do valor do controle) foi atingido logo nas 2 primeiras horas após a injeção; já nos animais adultos este valor (igual ao dos animais jovens) foi atingido 8 horas após receberem as toxinas. Ao final do período de 4 dias, tanto os animais jovens quanto os adultos ainda apresentavam níveis bastante elevados (acima de 300%) de fração de colapso alveolar.

A quantidade de células polimorfonucleares (PMN) no tecido pulmonar aumentou com a evolução temporal da lesão. É interessante observar que esta resposta inflamatória também atingiu níveis mais altos nos animais jovens mais cedo do que nos animais adultos. A quantidade de PMN no pulmão dos jovens aumentou significativamente a partir de 8h após a injeção i.p. do extrato e estatisticamente permaneceu estável em aproximadamente 250% do valor do controle até o final dos 4 dias. Nos animais adultos a maior quantidade de PMN foi observada a partir de 48h e também permaneceu estável, até o final do experimento, em percentuais muito próximos ao dos animais jovens (Fig 4.4).

Esses resultados demonstram que a injeção de uma dose sub-letal do extrato de *M. aeruginosa* contendo microcistinas foi capaz de gerar uma resposta inflamatória aguda em pulmão de camundongos. Foi possível observar que, em ambos os grupos, o colapso alveolar ocorreu mais rapidamente, seguido da infiltração de células polimorfonucleares. A Figura 4.5 mostra fotomicrografias do tecido pulmonar no controle e nos animais adultos injetados com o extrato tóxico.

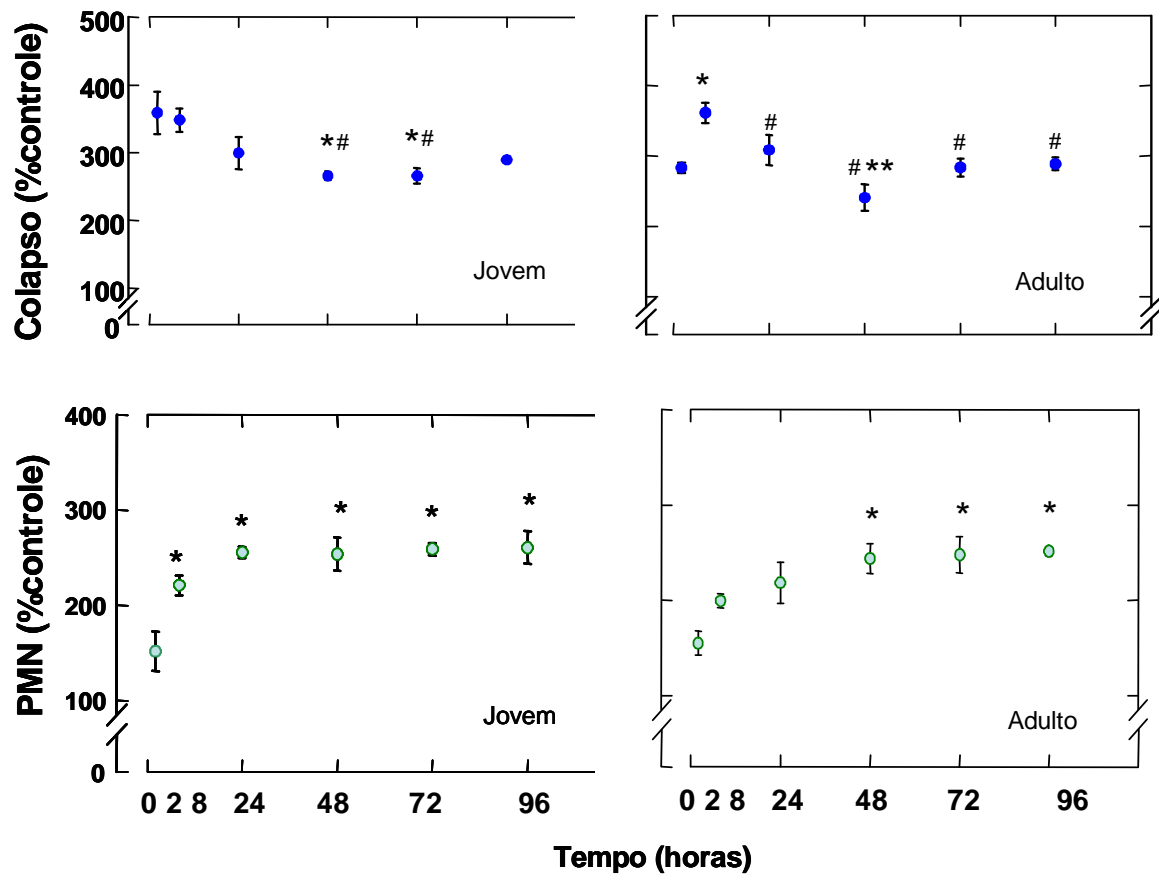


Figura 4.4 – Efeitos de extrato de *M. aeruginosa* contendo microcistinas sobre a fração de colapso alveolar e concentração de polimorfonucleares (PMN) em pulmão de camundongos injetados i.p. (48,2 µg/Kg) quando comparados ao controle. Os valores são médias (\pm erro padrão) de cinco animais em 2, 8, 24, 48, 72 e 96 horas após a injeção i.p. Os símbolos *, #, ** indicam valores significativamente diferentes em relação a 2h, 8h e 24h respectivamente ($p < 0,05$).

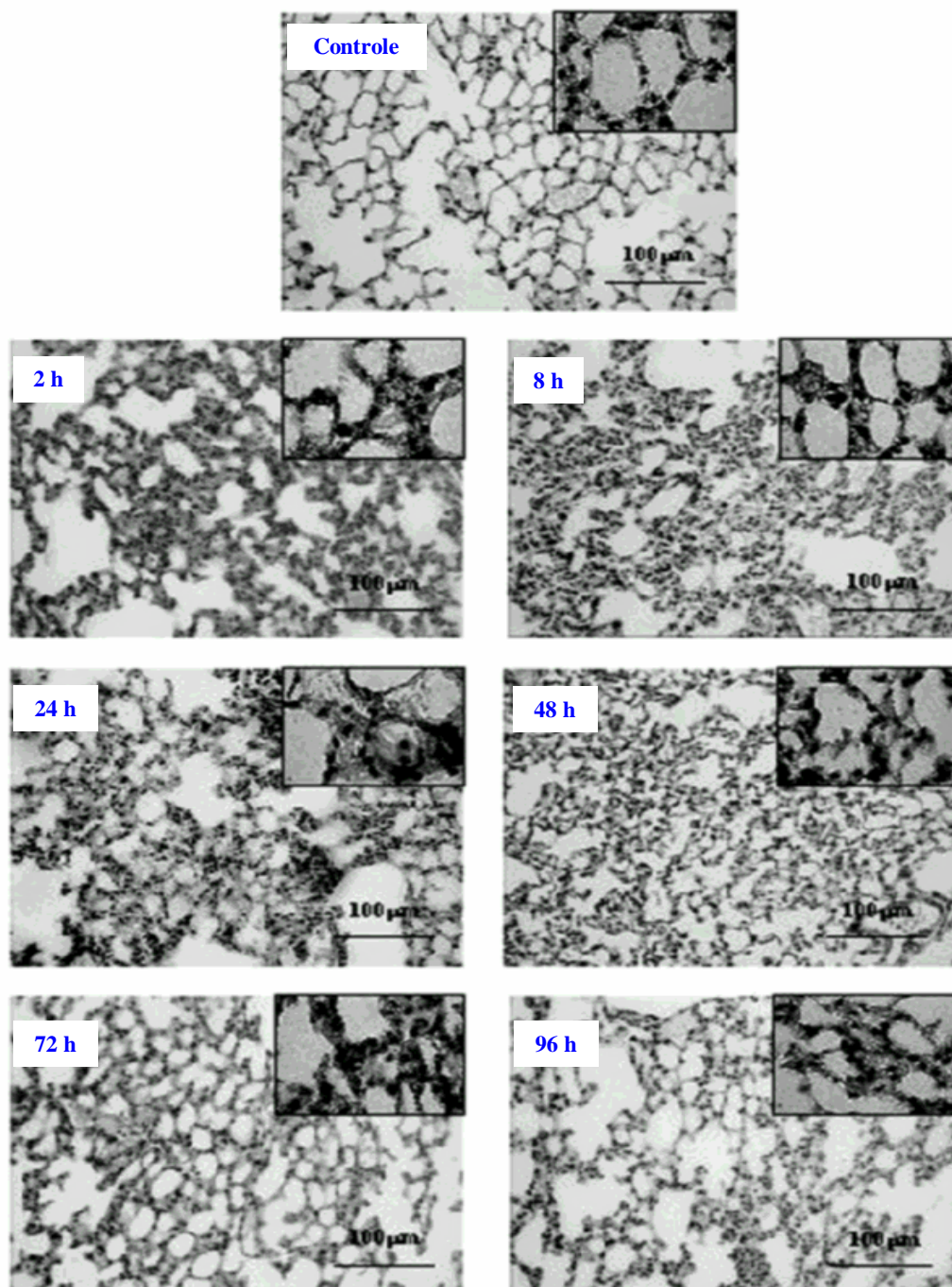


Figura 4.5 - Fotomicrografias do parênquima pulmonar (200X) de camundongos adultos sacrificados 2, 8, 24, 48, 72 e 96 horas após a injeção i.p. de extrato de microcistinas (48,2 µg/Kg p.c.).

No experimento que utilizou microcistina-LR pura (i.p.), as análises da presença desta toxina no tecido pulmonar dos camundongos, através de ELISA, não foram capazes de detectá-la dentro do limite de quantificação do método (0,1 ppb). A análise da atividade de proteínas fosfatases 1 e 2 A no pulmão também indicou não haver qualquer tipo de inibição das mesmas após a injeção i.p. de MCYST-LR (Fig. 4.6)

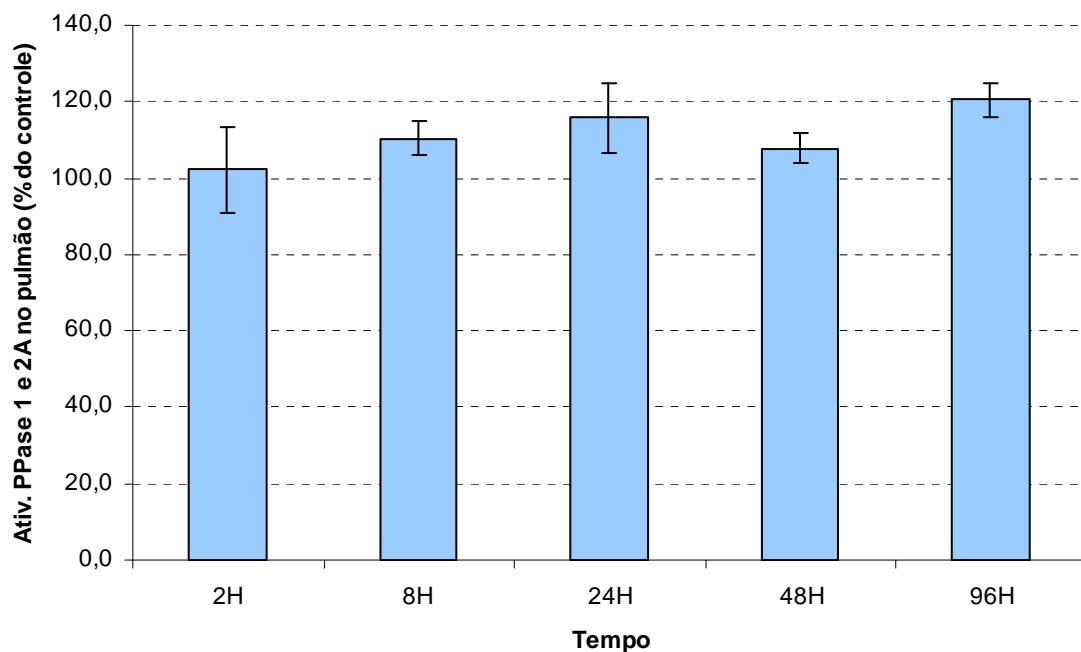


Figura 4.6- Atividade de proteínas fosfatases 1 e 2 A no pulmão de camundongos adultos injetados com MCYST-LR (48 µg/Kg p.c.). Os valores representam média ± erro padrão (não houve diferença significativa entre os resultados de cada tempo amostral e em relação ao controle, $p \leq 0,05$, $n=6$)

Entretanto, os resultados indicaram que, mesmo não tendo sido detectada, a toxina pura causa efeitos no tecido pulmonar equivalentes ao extrato tóxico de *M. aeruginosa*. A Tabela 4.1 apresenta os valores de fração de colapso alveolar nos animais controle e injetados com MCYST-LR. Pode-se observar que a fração de colapso aumenta significativamente a partir de 2h após a injeção da toxina e nesta amostragem atingiu 23,2% da área alveolar, valor que equivale a 440% do valor do controle. O percentual de células polimorfonucleares no tecido pulmonar também apresentou um aumento significativo a partir de 2h. Nesta amostragem, PMNs representavam 28,8% do tecido, o que chegou a ser 291% do valor do controle. Tanto os valores de colapso alveolar quanto a quantidade de PMNs se estabilizaram nestes patamares elevados até o final dos 4 dias de experimento (Tabela 4.2).

A Figura 4.7 mostra fotomicrografias do tecido pulmonar no controle e animais injetados com MCYST-LR.

Os parâmetros de mecânica respiratória também foram avaliados nestes animais. Os resultados indicaram que os camundongos injetados com a toxina apresentaram alterações na mecânica pulmonar. A Figura 4.8 mostra que, após 2 horas, os valores de ΔP_1 , ΔP_2 e ΔP_{tot} estiveram em média 54%, 23% e 28%, respectivamente, mais elevados que o controle. A partir de então, estes valores permaneceram estatisticamente estáveis até o 4º dia, ao final do experimento.

A Figura 4.9 mostra a variação da elastância estática e dinâmica, além da diferença entre as mesmas, no pulmão dos camundongos. Os valores de ΔE mostraram haver pouca diferença entre a

estática e a dinâmica, sendo que ambas elastâncias estiveram aproximadamente 50% mais elevadas que o controle a partir de 2h após a injeção i.p. da toxina. Este aumento significativo também permaneceu estável até o final do experimento, de acordo com a análise estatística efetuada.

Tabela 2.1 – Dados morfométricos do pulmão em percentagem de áreas normais e colapsadas. Os valores são médias (\pm erro padrão) de seis animais adultos em 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a injeção i.p. de MCYST-LR (48 μ g/Kg p.c.). Letras iguais (de a-c) indicam valores não significativamente

Grupo	Áreas normais (%)	Colapso alveolar (%)
CTRL	94,7 \pm 0,87 ^a	5,2 \pm 0,87 ^a
2h	76,6 \pm 2,33 ^{b,c}	23,2 \pm 2,22 ^{b,c}
8h	70,3 \pm 1,45 ^b	29,0 \pm 1,17 ^b
24h	75,5 \pm 2,38 ^{b,c}	24,5 \pm 2,38 ^{b,c}
48h	79,4 \pm 2,21 ^c	20,1 \pm 2,35 ^c
96h	81,3 \pm 1,69 ^c	18,6 \pm 1,69 ^c

diferentes (p<0,05).

Tabela 2.2 – Dados de celularidade pulmonar em percentagem de polimorfonucleares (PMN), mononucleares (MN) e o somatório de ambas ou células totais (TOT). Os valores são médias (\pm erro padrão) de seis animais adultos em 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a injeção i.p. de MCYST-LR (48 μ g/Kg p.c.). Letras iguais (de a-c) indicam valores não significativamente diferentes (p<0,05).

Grupo	% TOT	% PMN	% MN
CTRL	29,6 \pm 1,89 ^a	9,9 \pm 1,42 ^a	19,6 \pm 0,95 ^a
2h	38,0 \pm 2,74 ^b	28,8 \pm 2,43 ^b	9,1 \pm 0,83 ^b
8h	39,6 \pm 1,79 ^b	29,0 \pm 1,01 ^b	10,6 \pm 1,28 ^b
24h	37,5 \pm 2,01 ^b	25,1 \pm 2,93 ^{b,c}	12,3 \pm 1,63 ^b
48h	38,9 \pm 0,73 ^b	25,7 \pm 0,55 ^{b,c}	13,2 \pm 0,74 ^b
96h	33,4 \pm 2,07 ^a	22,0 \pm 1,34 ^c	11,4 \pm 0,89 ^b

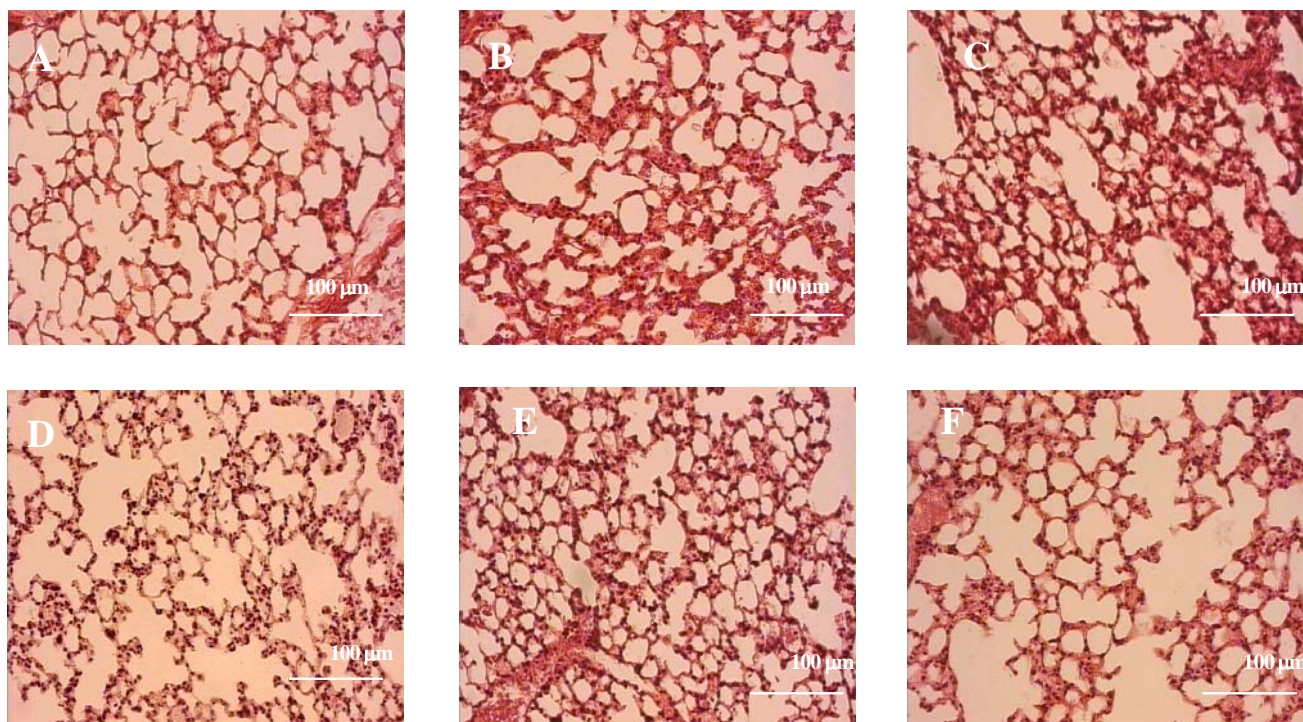


Figura 4.7 – Fotomicrografias do parênquima pulmonar (200X). A, grupo controle; B, C, D, E, F, camundongos adultos sacrificados em 2, 8, 24, 48 e 96 horas, respectivamente, após a injeção i.p. de MCYST-LR (48µg/Kg p.c.).

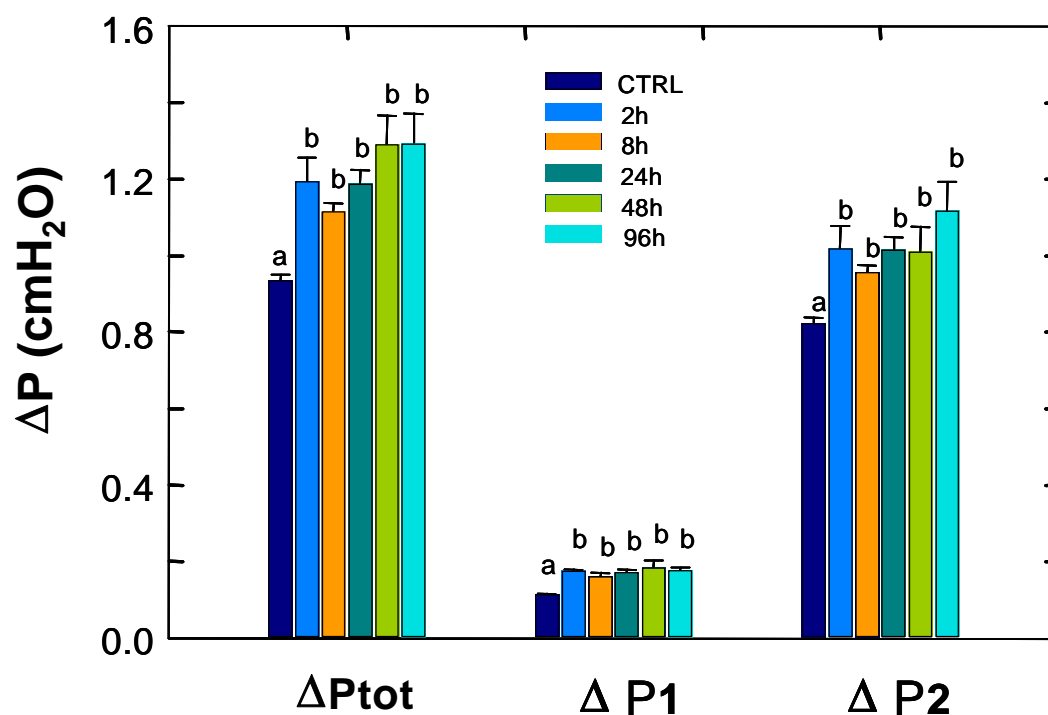


Figura 4.8 – Variação de pressão total (ΔP_{tot}), pressões resistivas (ΔP_1) e dissipações de pressões viscoelásticas/inomogêneas (ΔP_2) do pulmão de camundongos adultos em cada grupo: 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a injeção i.p. de MCYST-LR (48µg/Kg p.c.). Os valores são médias (\pm erro padrão) de seis animais. Letras iguais (de a-b) indicam valores não significativamente diferentes ($p < 0,05$).

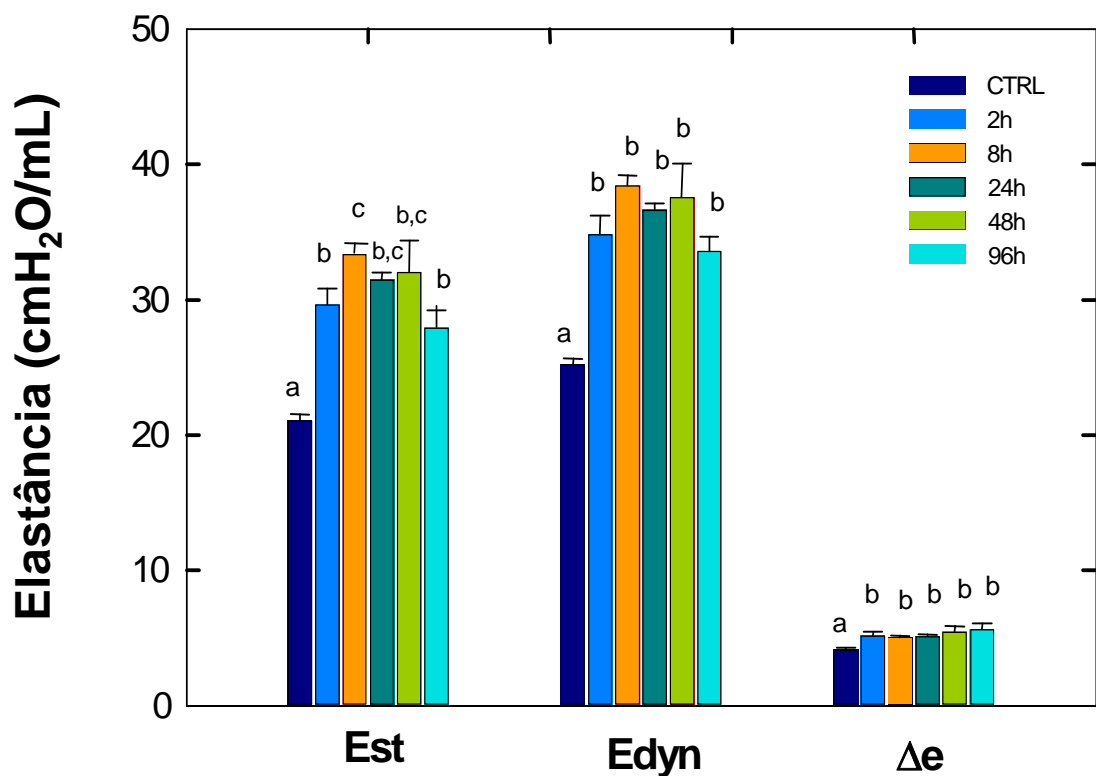


Figura 4.9 – Elastância estática (Est) e dinâmica (Edyn) e a diferença entre ambas (Δe) em cada grupo: 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a injeção i.p. de MCYST-LR (48 μ g/Kg p.c.). Os valores são médias (\pm erro padrão) de seis animais adultos. Letras iguais (de a-c) indicam valores não significativamente diferentes ($p < 0,05$).

A análise dos parâmetros mecânicos do pulmão indicou um aumento da pressão resistiva ($\Delta P1$), sugerindo uma alteração das vias aéreas. Já o aumento das pressões de dissipação do componente elástico e viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão (elastâncias, $\Delta P2$, ΔP_{tot}) indicou uma maior rigidez deste órgão, estando provavelmente relacionada ao aumento da migração de células (PMNs) e aumento do colapso alveolar. Vários estudos já relacionaram o processo inflamatório e dano ao tecido pulmonar a alterações na mecânica respiratória. Substâncias tais como veneno de cobra e lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias podem desencadear estes efeitos (Silveira *et al.*, 2004; Faffe *et al.*, 2000)

As análises de MCYST-LR no tecido pulmonar através de ELISA não foram capazes de detectar a presença desta toxina dentro do limite de quantificação do método (0,1 ppb). No entanto, essa toxina

pode ter alcançado o tecido, mas, se esteve presente, isso se deu em concentrações muito baixas. Estes dados corroboram o resultado da análise da atividade de proteínas fosfatases 1 e 2 A no pulmão, que indicou não haver qualquer tipo de inibição das mesmas após a injeção i.p. de MCYST-LR. Estas observações estão de acordo com o conhecimento existente sobre a distribuição de microcistinas no organismo. Uma vez na circulação sanguínea, estas toxinas têm como órgão alvo principal o fígado, pois nos hepatócitos são transportadas especificamente pelos transportadores de ácidos biliares (Robinson *et al.*, 1991b; Carmichael, 1994). No entanto, microcistinas também atingem em menor grau outros órgãos, tais como os rins e intestino (Falconer *et al.*, 1988).

Através de técnicas de imunohistoquímica, Ito *et al.* (2000, 2001) também detectaram a presença de MCYST-LR no tecido pulmonar, após a administração desta toxina a camundongos pela via oral ou traqueal. Após a administração intratraqueal de uma dose sub-letal de MCYST-LR, esses os autores puderam verificar a presença da toxina no pulmão por até 7 dias. No entanto, neste mesmo estudo nenhuma lesão no tecido foi verificada.

O processo inflamatório, causado tanto por extratos de *M. aeruginosa* produtora de microcistinas quanto por MCYST-LR pura, pode ser explicado por algumas hipóteses.

Nos experimentos descritos acima, tanto o extrato quanto a toxina pura foram injetados nos animais intraperitonealmente; isto leva a um estímulo imediato de macrófagos peritoneais que passam a liberar mediadores inflamatórios, dentre eles o TNF (tumor necrosis factor). Isto já foi observado por Nakano *et al.* (1991) que utilizou tanto MCYST-LR quanto um extrato tóxico de *M. aeruginosa* em experimentos com camundongos, sendo que este último se mostrou mais potente no estímulo à produção do mediador inflamatório. Estes autores também levantaram a possibilidade de que além de TNF, esses macrófagos peritoneais poderiam estar produzindo a citocina IL-1 (interleucina -1). Wagner & Roth (2000) afirmam que IL-1 é um dos principais estímulos à migração de PMN (neutrófilos) para o parênquima pulmonar. Como microcistinas não foram detectadas no tecido pulmonar por ELISA, pode-se levantar a hipótese de que o processo inflamatório possa ter sido causado por estímulo indireto, ou seja, mediadores inflamatórios produzidos por macrófagos peritoneais, estimulados por microcistina, poderiam gerar inflamação no pulmão. Por outro lado, no caso dessas toxinas terem alcançado o pulmão, mesmo em concentrações muito baixas, não detectáveis por ELISA, existe possibilidade, então, de que tenham promovido o processo inflamatório diretamente. Estudos *in vitro* mostraram que macrófagos alveolares foram estimulados por MCYST-LR a produzir prostaglandinas F2 e PGE2, além de tromboxano B2 e ácido aracdônico, todos mediadores inflamatórios (Naseen *et al.*, 1989)

A migração de neutrófilos para o parênquima pulmonar apresenta algumas particularidades em relação ao resto do organismo. A maior concentração de PMN vascular pulmonar se encontra nos capilares alveolares. Estes são extremamente finos e para que uma célula polimorfonuclear (de diâmetro maior que a luz do capilar) percorra seu trajeto é preciso mudar sua forma, o que ocorre em um tempo mais longo do que para os eritrócitos. Desta forma, PMNs apresentam um trânsito mais lento pelo capilares e isto permite que as mesmas estejam mais tempo próximas às moléculas de adesão da parede endotelial capilar. Moléculas de adesão do tipo ICAM se apresentam, inclusive, em maiores concentrações na parede de capilares alveolares. Por estes motivos, se considera que a adesão e o extravasamento de neutrófilos para o parênquima pulmonar seja em geral facilitado (Wagner & Roth, 2000).

Já foi verificado que concentrações muito baixas de MCYST-LR (ppb) podem aumentar diretamente em até 28% a aderência *in vitro* de PMN humanos (Hernández *et al.*, 2000). Portanto, a adesão de PMN às células endoteliais capilares (o que subsequente pode levar a migração para o parênquima pulmonar), além de ser estimulada por mediadores inflamatórios, pode ser favorecida diretamente pelas microcistinas.

O processo inflamatório pode gerar dano ao tecido pulmonar também através da formação de espécies reativas de oxigênio por células de defesa ativadas, tais como neutrófilos, monócitos e macrófagos (Klaassen, 1996). Caso este estresse oxidativo tenha ocorrido em nossos experimentos, tal fato também poderia explicar o aumento do colapso alveolar, que possivelmente foi decorrente de dano aos pneumócitos do tipo II e conseqüente deficiência na produção de surfactante.

Nos experimentos descritos neste capítulo, foi visto que extratos de *M. aeruginosa* e MCYST-LR pura, injetados i.p. em doses sub-letais, causam um processo inflamatório agudo em pulmão de camundongos. São poucos os relatos da literatura que descrevem efeitos danosos ao pulmão relacionados ao contato com cianobactérias tóxicas ou suas toxinas isoladamente. De fato, a maioria se refere aos efeitos de doses altas ou efeitos das toxinas diretamente administradas pela via aérea. Este estudo demonstrou que uma única injeção i.p. de dose sub-letal de microcistinas pode causar injúria ao pulmão por períodos contínuos, direta ou indiretamente. Em face disso, fica evidente a necessidade de novos estudos que possam contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no processo inflamatório causado por microcistinas.

Por fim, os resultados aqui apresentados deixam claro que o uso de água contaminada com cianobactérias produtoras de microcistinas, seja para fins de consumo oral, recreação ou clínico (como a

hemodiálise), representa um risco para a população não apenas pelos efeitos no fígado, mas também pelos possíveis danos causados a outros órgãos vitais, tais como o pulmão.

5- Análise da presença de microcistinas no soro de pacientes renais crônicos do HUCFF-UFRJ, intoxicados durante tratamento de hemodiálise e avaliação experimental da presença desta toxina em soro de cobaias (ratos Wistar).

Participaram do estudo descrito neste capítulo:

Raquel M. Soares, Prof^a Valéria F. Magalhães, Prof^a Sandra M.F.O Azevedo

Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias – IBCCF^o – UFRJ

Dr. Alvimar Delgado

Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – Setor de Nefrologia -UFRJ

Dr. Jerome Servaites, Dr. Moucun Yuan, Prof. Wayne W. Carmichael

Dept. Biological Sciences - Wright State University – Ohio – EUA

Prof^a Denise P. Carvalho

Laboratório de Fisiologia Endócrina – IBCCF^o –UFRJ

A partir de colaborações científicas estabelecidas entre os grupos acima citados e através do Programa de Doutorado com Estágio no Exterior da CAPES, objetivou-se investigar a presença de microcistinas no soro de pacientes renais crônicos do HUCFF-UFRJ, intoxicados durante tratamento dialítico. Como objetivo complementar, também foi investigado experimentalmente a presença de microcistinas em soro de cobaias (ratos Wistar).

5.1 – Histórico do estudo da exposição de pacientes hemodialisados a microcistinas:

Aproximadamente na primeira semana de novembro de 2001, a água tratada distribuída à cidade do Rio de Janeiro começou a apresentar cheiro e gosto desagradáveis, possivelmente relacionados a geosmina (substância produzida por cianobactérias e fungos), o que levou a reclamações por parte da população. Análises do fitoplâncton em amostras de água bruta do reservatório do Funil e do rio Guandu, que fica a jusante do reservatório e é responsável pelo abastecimento de grande parte do município do Rio de Janeiro, confirmaram a dominância de dois gêneros de cianobactéria provavelmente responsáveis pelo cheiro e odor da água – *Anabaena* e *Microcystis*. O número de células de cianobactérias no reservatório chegou a 2.000.000/mL na primeira amostragem em 22/11/01 e subseqüentes contagens de célula de

amostras do rio Guandu mostraram dominância total do gênero *Microcystis* (Tabela 5.1). Um bioensaio realizado por injeção intraperitoneal em camundongos, com uma amostra de células liofilizadas da floração de cianobactérias obtida do reservatório do Funil (27/11/01), apresentou uma dose letal mínima de 60mg/Kg de peso corpóreo. Os sintomas de intoxicação observados foram típicos de hepatotoxicose causada por microcistinas.

Tabela 5.1 – Número de células do fitoplâncton no Rio Guandu

Rio Guandu	Células / mL
<i>Microcystis</i> – 26/11/01	4,62 x 10 ⁶
Fitoplâncton total - 26/11/01	4,68 x 10 ⁶
<i>Microcystis</i> - 27/11/01	1,95 x 10 ⁶

Análises de microcistinas por ELISA na água tratada distribuída a população confirmaram a presença de 0,4µg /L durante a última semana de novembro. Nesta época, havia 45 clínicas de diálise na área do Grande Rio de Janeiro, incluindo 32 na área municipal que eram responsáveis pelo tratamento de aproximadamente 4.000 pacientes renais crônicos. Todas estas clínicas empregavam a osmose reversa no tratamento da água a ser utilizada na hemodiálise. Para avaliar a eficiência deste sistema em reter a passagem das microcistinas para os pacientes, análises da água antes e após a osmose reversa foram requisitadas pela Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro. Amostras de água de todas as 45 clínicas da cidade foram analisadas utilizando-se kits comerciais de ELISA para microcistinas da Envirologix Inc (1 amostra dupla por clínica durante o período de 6 a 13/12/01). Em quatro clínicas foram obtidos resultados positivos na água após o sistema de osmose reversa (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 – Microcistinas detectadas por ELISA em amostras de água após osmose reversa em 4 clínicas de diálise no Rio de Janeiro.

Concentração de MCYSTs ($\mu\text{g/L}$)	
Clínica 1	0,150
Clínica 2	0,001
Clínica 3	1,600
Clínica 4	0,028

A água utilizada no setor de diálise do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) foi positiva para microcistinas antes e depois da coluna de carvão ativado (**0,33 e 0,32** $\mu\text{g/L}$ respectivamente) em 03/12/01. A partir de então, um estudo em colaboração com o Setor de Nefrologia deste hospital foi estabelecido e amostras de água antes e após a osmose reversa foram coletadas diariamente até 14/12/01 e semanalmente até o final de janeiro de 2002. Todas apresentaram resultados abaixo do limite de detecção do método (0,16 $\mu\text{g/L}$ - kits Enviroligix) até o final do período de monitoramento.

Considerando-se que a cada sessão de hemodiálise um paciente renal entra em contato, pela via intravenosa, com 120 litros de água, uma possível contaminação da mesma com microcistinas representaria um sério risco aos pacientes, mesmo que estas toxinas estivessem presentes em baixas concentrações. Portanto, em face deste risco, objetivou-se avaliar o grau de exposição dos pacientes renais do Setor de Nefrologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – UFRJ às microcistinas neste episódio.

5.2 - Material e Métodos

5.2.1 – Coleta de soro do pacientes do HUCFF:

De 5/12/01 a 29/01/02, estabeleceu-se o monitoramento dos 44 pacientes que recebiam tratamento hemodialítico no HUCFF. A equipe do hospital realizou a coleta de sangue destes pacientes durante as sessões de hemodiálise neste período e parte do soro nos foi cedida (0,4 a 1mL) para análise da

presença de microcistinas. Após análise dos dados clínicos, 12 pacientes foram selecionados de acordo com a frequência e o número de amostras disponíveis e negatividade para vírus da hepatite C e HIV.

5.2.2 – Extração de microcistinas das amostras de soro:

A mesma metodologia foi aplicada para a extração de microcistinas tanto do soro de pacientes do HUCFF quanto dos ratos utilizados no experimento de exposição à MCYST-LR. Para tanto, foram adicionados às amostras 10mL de metanol 100%. A mistura foi agitada por 30 minutos, centrifugada a 10000g por 10 minutos, sendo o sobrenadante separado e o precipitado novamente submetido à extração com metanol. Ao volume final de extrato metanólico foi adicionado igual volume de hexano para a separação da fração lipídica do extrato. A mistura foi agitada vigorosamente e a camada de hexano descartada e substituída por um novo volume de hexano. Este processo foi repetido por mais duas vezes, o extrato metanólico foi recuperado, evaporado totalmente e ressuspensão em 1mL de água deionizada. Este extrato final foi parcialmente purificado em um cartucho de C18 (Oasis HLB– 6cc) previamente ativado com 5mL de metanol 100% e 5mL de água deionizada. O cartucho foi lavado com 5mL de água seguidos de 5mL de metanol 30% e eluído com 5 mL de metanol 100%. Esta fração metanólica foi evaporada e ressuspensão em 1mL de água deionizada. Em seguida, uma alíquota de 100 µL foi separada para análise por ELISA e o volume restante foi novamente evaporado e ressuspensão em 200µL de uma solução de acetonitrila/ água/ ácido heptafluorbutírico (25%:50%:0,02% v/v) e analisado por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS).

5.2.3 – Análises das amostras de soro dos pacientes por ELISA:

Os extratos foram analisados por ELISA de acordo com a metodologia descrita por Chu *et al* (1990), An & Carmichael (1994) e Carmichael & An (1999), descrita em detalhes na seção 3.1.4. A partir da curva padrão de MCYST-LR obtida na análise, calculou-se as concentrações de microcistinas nas amostras de soro, expressas como equivalentes de MCYST-LR.

5.2.4 - Análises das amostras de soro dos ratos por ELISA:

Os extratos das amostras de soro de ratos foram analisados em duplicata por ELISA utilizando-se kits comerciais para microcistinas (formato tubos) da Beacon Analytical Systems Inc. (Portland, ME,

EUA), seguindo-se o protocolo do fabricante. Este método segue basicamente os mesmos princípios do método de ELISA descrito na seção 3.1.4.

5.2.5 – Análise de microcistinas totais no soro de pacientes:

Amostras de soro de pacientes hemodialisados e amostra de soro controle (de doadores que não recebiam tratamento dialítico, portanto potencialmente não expostos às MCYSTs) foram preparadas para análise de MCYSTs totais, através da análise indireta do subproduto de oxidação destas toxinas, o ácido 2-metil-3-metoxi-4-fenilbutírico (MMPB). Uma alíquota do soro controle foi propositalmente contaminado com MCYST-LR (0,01-25 µg/ml) para se obter um controle positivo.

A molécula de MMPB é produzida durante o processo de oxidação Lemieux do aminoácido Adda das moléculas de MCYSTs (Figura 5.1). Como a oxidação ocorre tanto em MCYST livres quanto ligadas a outras moléculas ou peptídeos, esta análise é a mais adequada para se obter a concentração total desta toxina em matrizes orgânicas (tecidos). Além disso, devido ao fato do MMPB se originar do aminoácido Adda, o qual é bastante incomum e específico das microcistinas, esta análise permite a investigação da presença destas toxinas sem o risco de resultado falso positivo. Neste trabalho, seguiu-se o método descrito por Ott & Carmichael (2001), sendo o padrão de MMPB fornecido pelo Dr. Michio Namikoshi (Tokyo University of Fishers, Japão).

O procedimento de oxidação se iniciou adicionando-se uma solução de permanganato de potássio e meta-periodato de sódio a iguais molaridades (0,02M) às amostras. O pH foi ajustado a aproximadamente 9 com solução de bicarbonato de potássio. Permanganato de potássio sólido foi continuamente adicionado para manter o estado oxidado da solução durante o curso da reação (3h) em agitador a 100 rpm. A reação foi interrompida com 0,5 – 1,5 g de bisulfito de sódio sólido, o que foi indicado pela mudança da cor da solução de púrpura para branca. Em seguida, foi feito o ajuste do pH para 2 com ácido sulfúrico 10% e adicionou-se metanol 100% (grau HPLC) à solução atingindo uma concentração de 7,5% (v/v).

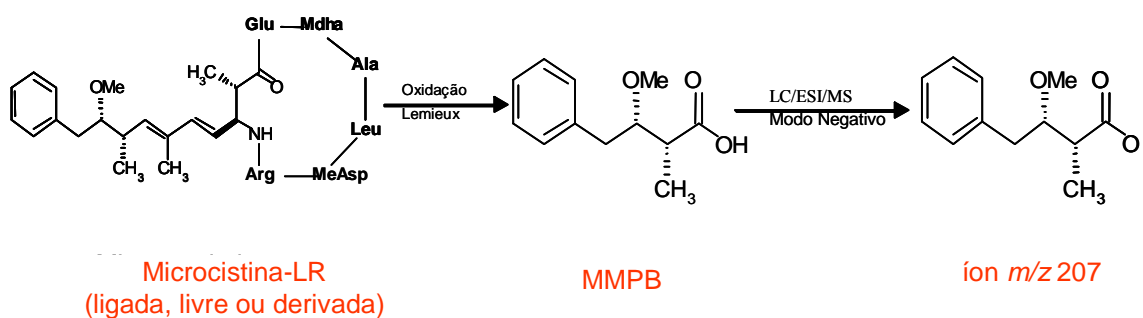


Figura 5.1 – Diagrama esquemático da produção de MMPB por oxidação Lemieux.

Para a extração de MMPB da solução de oxidação foram utilizados cartuchos 3M Empore SDB-XC 7mm/3mL (Fisher Scientific, Pittsburgh PA, EUA), os quais foram ativados previamente com metanol e água deionizada. Em seguida, as amostras oxidadas foram adicionadas e os cartuchos foram lavados com solução de metanol 15%/ ácido acético 0,05% (v/v) e água deionizada/ ácido acético 0,05%. A eluição foi feita com metanol 70% e as amostras foram evaporadas e reconstituídas em metanol 30%/ ácido acético 0,05% (v/v) para análises de LC/MS em SIM/ Modo negativo (m/z 207).

5.2.6 – Análises por LC/MS e MS/MS dos extratos das amostras de soro de pacientes:

5.2.6.1 – Condições analíticas da cromatografia líquida (LC):

A separação de MCYSTs foi realizada em uma coluna de C8 - Symmetry (3.5 μ m, 2,1x100 mm, fase reversa da Waters), utilizando com fase móvel solução de acetonitrila/ ácido trifluoracético 0,05%, água deionizada/ ácido trifluoracético 0,05% (condições de gradiente: 10% orgânica de 0 a 3 min, 60% orgânica de 3,1 a 9 min, 10% orgânica de 9,1 a 20 min) em um fluxo de 0,2 mL/ minuto. O volume de amostra injetado foi de 20 μ L.

5.2.6.2 – Condições analíticas da espectrometria de massas (MS):

A análise de massas das amostras (sejam de MMPB ou MCYSTs diretamente) foi feita em um espectrômetro ThermoQuest LCQ de bancada com modos de scan MS e MS/MS. Uma fonte de íon para ionização de “eletron spray” (ESI) foi utilizada e uma sintonização (tune file) foi criada para cada análise. O sistema foi otimizado para a transmissão de um único íon carregado [M + H]⁺. A voltagem do spray foi de +5 kV e a temperatura do capilar foi de 250°C. Para aumentar a razão sinal/ ruído, o modo “scan” de monitoramento de reação (SRM) foi utilizado. O íon parental de m/z 995,5 (equivalente as microcistinas) foi monitorado em 2 amu de amplitude de massa e a energia de colisão relativa foi de 5%.

Para a determinação da concentração de microcistinas nas amostras, uma curva padrão foi feita com as diferentes concentrações de padrão de MCYST-LR variando de 0,97 a 250 ng/mL.

5.2.7 – Análise estatística:

Os dados dos pacientes do HUCFF selecionados para este estudo foram divididos em dois grupos, de acordo com os dias da semana em que os pacientes recebiam tratamento hemodialítico. O grupo 1 refere-se aos pacientes que recebiam o tratamento às segundas, quartas e sextas-feiras e o grupo 2 aos que recebiam tratamento às terças, quintas e sábados. Para a análise da variação de microcistinas ao longo do tempo, o conjunto de dados (resultados de ELISA) de cada grupo foi dividido em 4 subgrupos (cada um representando o período seqüencial de 2 semanas a partir da data estimada de exposição às MCYSTs (3/12/01)). Um teste t para amostras independentes foi utilizado para comparar os 4 grupos de dados de 2 semanas através da análise de variância (ANOVA) ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram feitas com o software STATISTICA.

5.2.8 – Exposição de ratos Wistar a uma dose sub-letal de MCYST-LR:

Ratos Wistar machos adultos, pesando entre 260 e 318 g (n=10), mantidos em gaiolas em seu biotério de origem, o Laboratório de Fisiologia Endócrina– IBCCF^o –UFRJ, foram injetados uma única vez com uma solução aquosa de MCYST-LR (padrão gentilmente cedido pelo Prof. Wayne Carmichael, Wright State University, EUA) em dose sub-letal de 45µg/Kg de peso corpóreo. Outros 10 ratos utilizados como controle foram injetados com 0,5mL de solução salina (NaCl 0,9%).

Ambos os grupos teste e controle foram subdivididos em 2 subgrupos de 5 animais. Uma amostra de sangue (aproximadamente 3mL) foi retirada a cada semana aproximadamente, tanto do grupo teste quanto do controle, alternando-se os subgrupos de 5 animais a cada semana. Assim, cada subgrupo somente sofreu a retirada de sangue a cada 15 dias. Após anestesia dos animais com xilazina (5mg/Kg) e cetamina (50mg/kg), o sangue foi retirado com seringa descartável a partir da veia jugular exposta. Em seguida, o tecido acima da veia foi suturado e esterilizado com álcool. O sangue, coletado em frascos Falcon, foi imediatamente centrifugado a 3000 g para a obtenção do soro e este armazenado em frasco de vidro em freezer -20°C até o momento da extração e análise por ELISA, como descrito nos itens 5.2.2 e 5.2.4.

Os animais de todos os grupos foram sacrificados por decapitação ao final do período de amostragem.

5.3 – Resultados e Discussão

Durante o período de amostragem (5/12/01 a 29/01/02) 96 amostras de soro foram obtidas dos 12 pacientes renais selecionados (em média de 5 a 10 amostras por paciente). Deste total, 89% foram positivas para MCYSTs quando analisadas por ELISA. Todos os 12 pacientes apresentaram amostras positivas, mas também houve amostras com concentrações abaixo do limite de detecção do método. A Figura 5.2 apresenta os valores da concentração de MCYSTs em cada amostra de soro durante o período de amostragem. A mais baixa e a mais alta concentração detectadas foram 0,16 e 0,96ng/mL em 28/12/01 e 03/01/02, respectivamente, em diferentes pacientes.

MCYSTs foram detectadas nas amostras ao longo de todo o período de amostragem, portanto, quase 2 meses após a primeira data considerada de exposição – 03/12/01. As mais altas concentrações

foram encontradas na primeira semana de janeiro, tanto no grupo de pacientes com tratamento às segunda/quarta/sexta-feiras (SQS) quanto nos de terça/quinta/sábado (TQS).

A análise estatística demonstrou que os valores de MCYSTs no soro não foram, de maneira geral, significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) entre dezembro e janeiro. A única diferença estatística ocorreu entre os dois grupos de pacientes (SQS x TQS) no período de 14-28 de dezembro. No entanto,

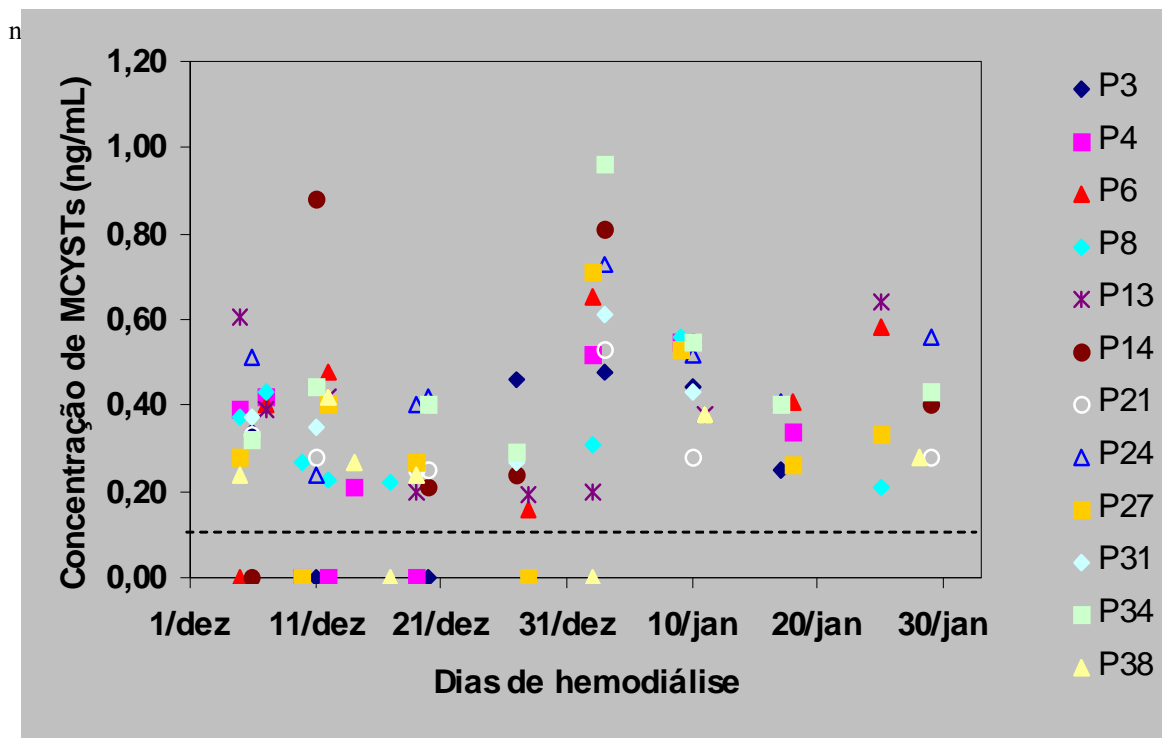


Figura 5.2 – Concentração de microcistinas no soro de pacientes renais do setor de diálise do HUCFF - UFRJ. O período de amostragem se estendeu de 5/12/01 a 29/01/02. A linha tracejada indica o limite de detecção do método de análise (ELISA) – 0,16 ng/mL. P= paciente.

Uma amostra de soro positiva de cada um dos 12 pacientes e uma amostra de soro controle (de doador - negativa para MCYSTs) foram analisadas por LC/MS para confirmar e caracterizar a presença de MCYSTs.

A Figura 5.3a mostra o espectro do padrão de MCYST-LR (7,8ng/mL) no modo de scan SEM, com um tempo de retenção de 11,74 minutos (m/z 995,31). Os sinais de fragmentos oriundos da análise de MS/MS podem ser observados na Figura 5.3b. Nenhum sinal com o mesmo tempo de retenção e massa do sinal do padrão de MCYST-LR foi observado nas amostras de soro dos pacientes. Entretanto, um sinal entre os tempos de retenção de 10,90 e 11,10 minutos e 995 m/z foi detectado em todas as amostras analisadas, como exemplificado na Figura 5.4a. Este sinal, quando analisado por MS/MS, não produz os fragmentos característicos da molécula de microcistina, o que seria necessário para a confirmação da

molécula. Entretanto, um sinal com estas características de tempo de retenção e massa não foi detectado na amostra de soro controle (Figura 5.4b), o que contribui para a hipótese de que a presença de MCYSTs foi realmente confirmada por LC/MS nas amostras de soro dos pacientes renais.

As análises de LC/MS das amostras de soro não foram conclusivas. Possivelmente, isso ocorreu devido a interferência da matriz (o soro) que contém um incontável número de peptídeos, muitos deles com características de polaridade e massa semelhantes as das MCYSTs, portanto, de difícil separação. Uma outra hipótese, que explicaria a dificuldade na identificação de MCYSTs no soro por LC/MS, é o fato das amostras terem estado armazenadas a -20°C por 10 meses antes do início das análises. Isto pode ter levado a mudanças estruturais na molécula que resultaram em alteração no tempo de retenção e/ou dificuldades na obtenção dos fragmentos específicos nas análises por MS/MS.

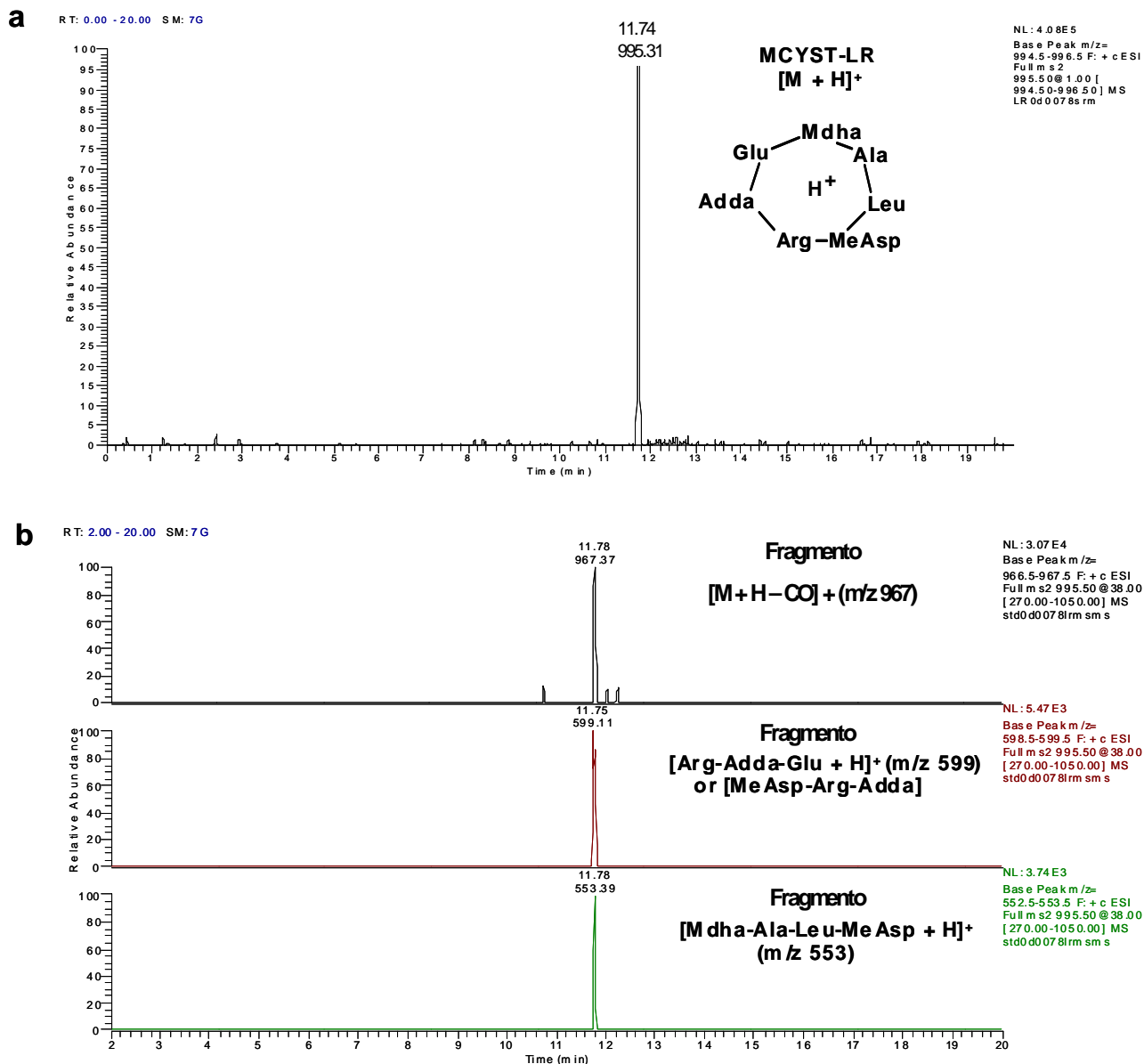


Figura 5.3 – Espectros da análise de LC/MS (a) de padrão de MCYST-LR (7,8ng/mL) em modo “scan” SRM e da análise de MS/MS (b) do mesmo padrão mostrando os íons de fragmentação no mesmo tempo de retenção e massas características para: $[M + H - CO]^+$ (m/z 967), Arg-Adda-Glu + H ou β MeAsp-Arg-Adda+H (m/z 599) e Mdha-Ala-Leu- β MeAsp +H (m/z 553).

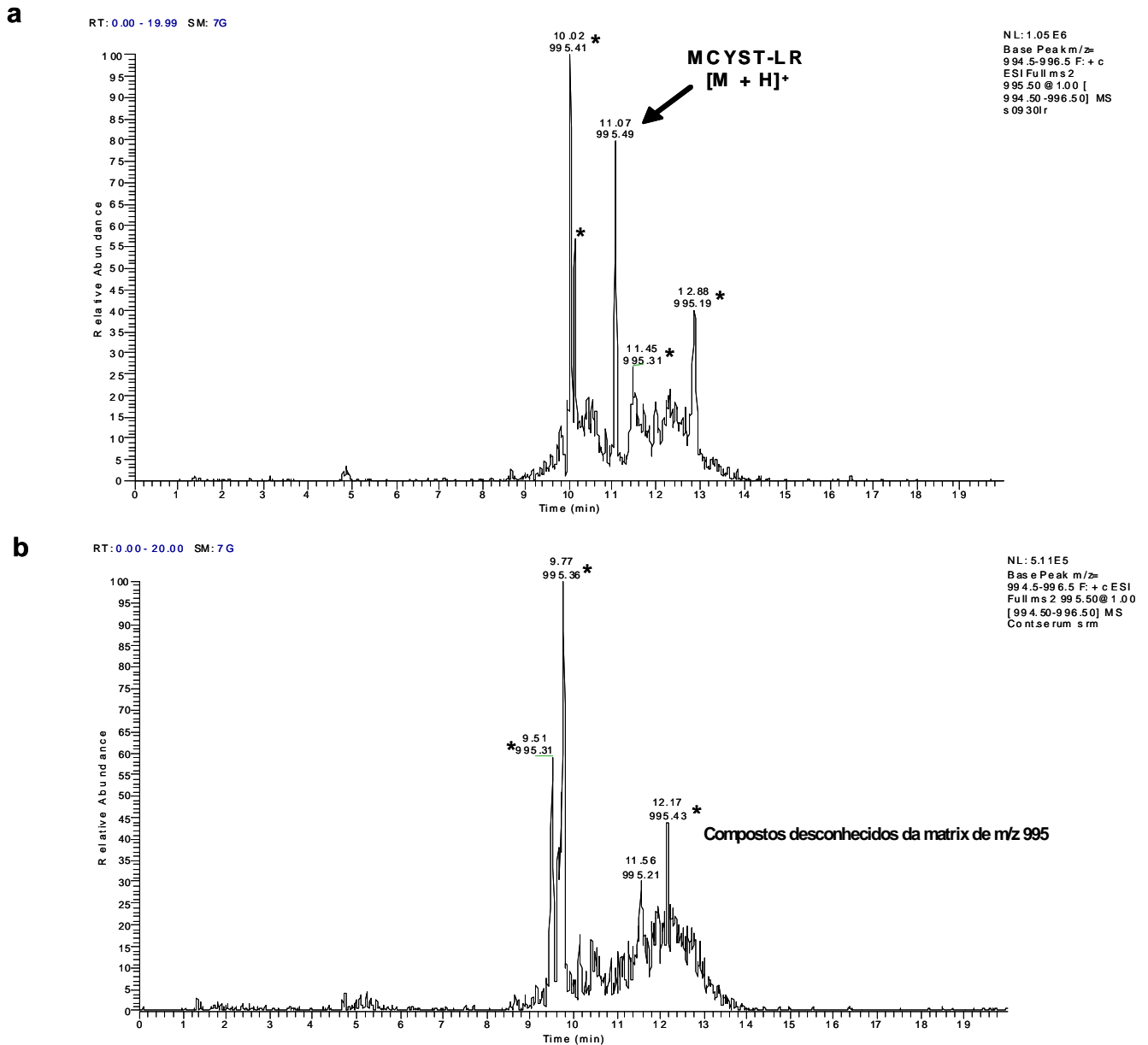


Figura 5.4 - Espectros da análise de LC/MS (a) da amostra de soro de um dos pacientes e (b) da amostra de soro controle em modo “scan” SRM. A amostra do paciente mostra um sinal em 11,07 minutos, m/z 995,19, que não é observado na amostra de soro controle.

Entretanto, as análises de LC/MS no soro controle contaminado com MCYST-LR mostraram a presença de MMPB em um sinal com tempo de retenção de 8,4 minutos e 207m/z. O mesmo sinal foi observado nas amostras de soro dos pacientes (Fig 5.5). Estes sinais são equivalentes ao sinal verificado na análise do padrão de MMPB.

Estas análises indiretas e qualitativas de MCYSTs totais no soro, combinadas com os resultados obtidos com ELISA, indicam que estes pacientes renais crônicos foram expostos a doses baixas destas toxinas. Dentre 12 pacientes selecionados, nenhum apresentou níveis de enzimas hepáticas no soro que

indicasse algum dano ao fígado, tão pouco foram observados sintomas que pudessem ser atribuídos a intoxicação com MCYSTs. Contudo, do total de 44 pacientes renais que faziam hemodiálise no HUCFF, alguns apresentaram altos níveis de enzimas hepáticas no soro no período do monitoramento. Entretanto, estes pacientes também apresentavam um quadro de problemas hepáticos, tais como hepatite C, que impossibilitaram qualquer correlação direta com intoxicação por MCYSTs.

A concentração média de MCYSTs em amostras de soro de pacientes de hemodiálise que foram vítimas fatais em Caruaru em 1996 foi estimado em 2,2 ng/mL (Carmichael *et al.*, 2001; Azevedo *et al.*, 2002). Este valor é mais que o dobro da concentração mais alta encontrada no soro dos pacientes renais do Rio analisados neste estudo.

No entanto, mesmo doses baixas podem representar um risco para o organismo exposto a microcistinas. Experimentos laboratoriais têm mostrado que exposições sub-letais a essas toxinas podem promover tumores de fígado, cólon e pele (Falconer, 1991; Ito *et al.*, 1997a; Humpage *et al.*, 2000). Portanto, uma vez que essas toxinas foram detectadas continuamente no soro desses pacientes renais nos dois meses após o período de exposição, não se pode deixar de considerar o risco potencial dessa exposição crônica de órgãos e tecidos a MCYSTs na promoção de tumores.

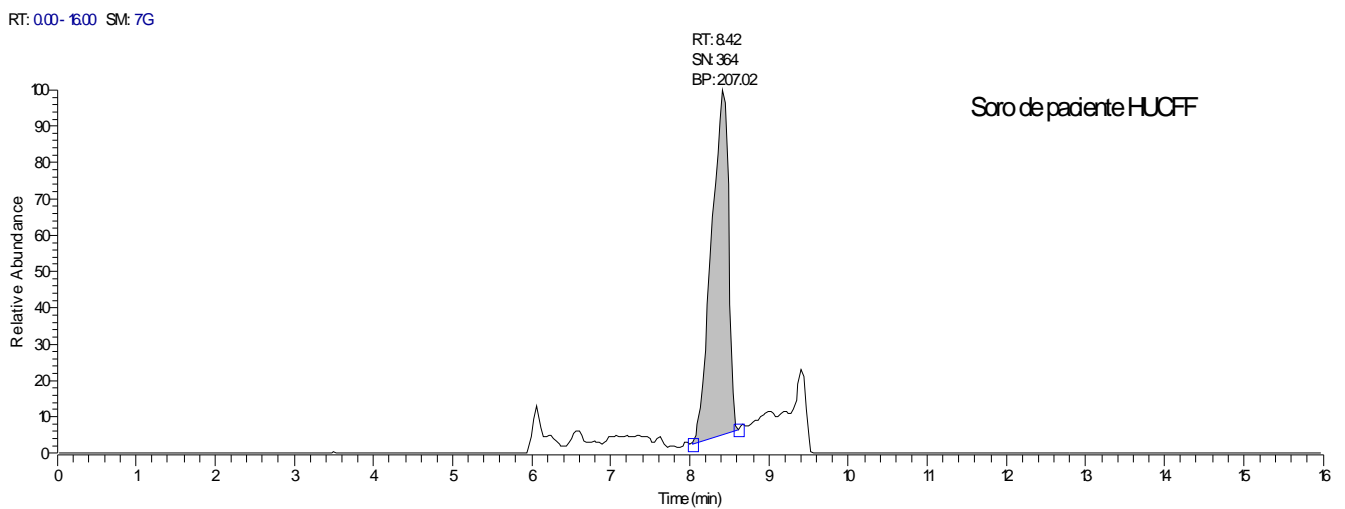
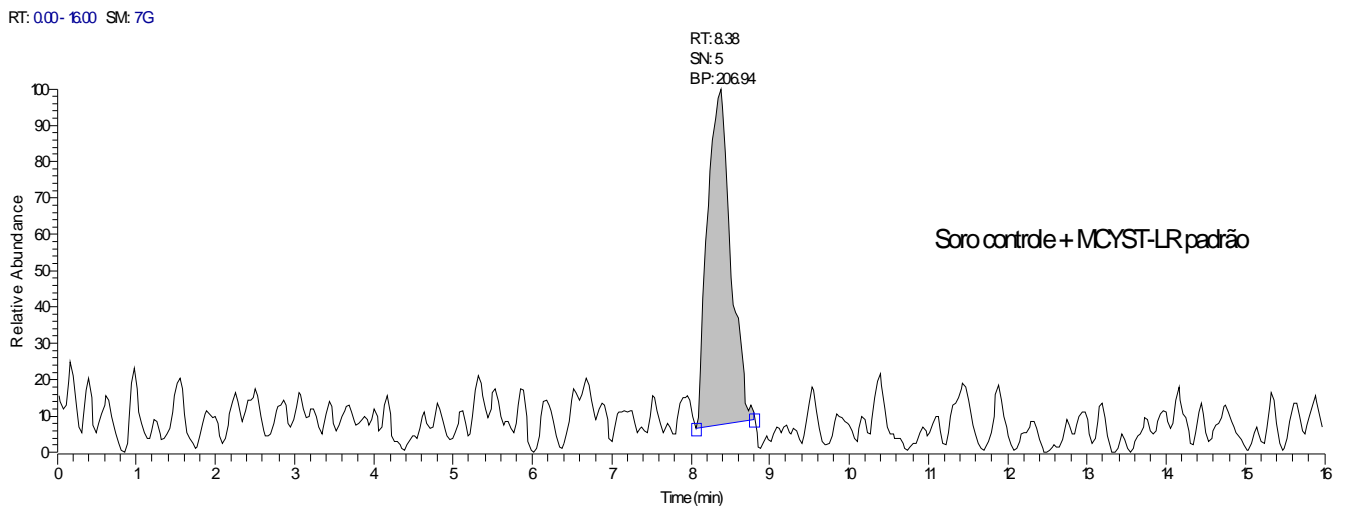


Figura 5.5 – Detecção de MMPB por análise de LC/MS: (a) sinal de MMPB em 8,4 minutos no soro controle contaminado com MCYST-LR, (b) sinal de MMPB em 8,4 minutos na amostra de soro de um paciente.

Durante o monitoramento semanal da água utilizada no setor de diálise do HUCFF por ELISA não foi detectada a presença de MCYSTs após 03/12/01. Isto sugere que não ocorreu exposição a estas toxinas, até o final de janeiro de 2002, pelo tratamento dialítico. Desta forma, a hipótese mais provável para explicar a presença de MCYSTs no soro dos pacientes é que as mesmas sejam oriundas do fígado. Entretanto, a liberação de microcistinas deste órgão, assim como a cinética de detoxificação e eliminação destas toxinas do organismo ainda não estão elucidadas.

Uma vez no fígado, MCYSTs se ligam covalente e irreversivelmente às proteínas fosfatases (PP1 e 2 A) (Carmichael, 1994). No entanto, alguns estudos com peixes e moluscos demonstram haver

aumento na concentração de MCYSTs livres em tecidos destes animais vários dias após a intoxicação (Soares *et al*, 2004; Vasconcelos , 1995). Isto sugere que estas toxinas possam ter sido liberadas de proteínas fosfatases durante o “turnover” das mesmas e, assim, voltaram a circular no organismo. Esta hipótese explicaria as concentrações de MCYSTs encontradas no soro dos pacientes durante os dois meses subseqüentes à exposição e levanta a questão de qual seria a “meia vida” dessas toxinas em seres humanos ou outros organismos.

O experimento realizado com ratos, injetados com uma dose sub-letal de MCYST-LR (45µg/Kg), teve como objetivo confirmar o observado nos pacientes renais. De fato, os resultados mostraram que os animais apresentaram MCYST-LR no soro durante os 2 meses de amostragem após a data da única injeção intraperitoneal (Tabela 5.3). Várias amostras apresentaram concentrações abaixo do limite de detecção do método de ELISA utilizado (0,1 ng/mL). Dentre as amostras que apresentaram concentrações mensuráveis, o valor mais baixo foi de 0,1 ng/mL e valor mais alto foi de 45,65 ng/mL , sendo este último encontrado na última amostragem, portanto, 55 dias após a injeção i.p. Estimando-se como sendo de 3ml o volume total de soro dos ratos utilizados, então esta concentração máxima de MCYST-LR significaria 1% da massa originalmente injetada no animal (aproximadamente 13,5µg de MCYST-LR para cada animal de 300g). Os valores médios de MCYST-LR encontrados no soro dos ratos ao longo do período de estudo estão apresentados na Tabela 5.3. Observam-se dois momentos de concentrações significativamente mais altas: o primeiro 14 dias após a injeção e o segundo no final do período de amostragem.

Apesar de não ser possível uma comparação direta entre a dinâmica de MCYSTs em ratos e seres humanos, estes resultados se assemelham ao verificado nos pacientes renais do Rio que também apresentaram as mais altas concentrações de MCYSTs no soro muitos dias após a data de exposição (30 dias).

Tabela 5.3 – Concentração de MCYST-LR no soro de ratos Wistar injetados com 45µg MCYST-LR/Kg

Amostragem (dias após a injeção i.p.)	Concentração de MCYST-LR (ng /mL)	Erro padrão
6	0,55	0,24
14	12,69	5,69
20	0,23	0,13
27	0,14	0,14
34	0,22	0,13
41	0,27	0,15
55	18,27	5,94

Todo o exposto acima revela que o sistema de osmose reversa utilizado no setor de diálise do HUCFF não previniu a contaminação da água por microcistinas utilizada no tratamento hemodialítico dos pacientes renais. De acordo com Neumann & Weckesser (1998), que avaliaram 3 diferentes membranas de osmose reversa, as taxas de retenção para duas diferentes MCYSTs variaram de 96,7 a 99,9%.

Segundo informações prestadas pelo setor de Nefrologia do HUCFF, o sistema que estava em uso na época era novo e estava operando de acordo com as instruções do fabricante. No entanto, sabe-se também que o mesmo foi projetado para funcionar em temperatura ambiente de $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$, mas a temperatura local na época desta investigação era de aproximadamente 40°C (período de verão). Sendo assim, esta é uma possível explicação para o fato de uma membrana teoricamente capaz de reter moléculas acima de 200 daltons ter permitido a passagem para a água de diálise de moléculas como as MCYSTs (cerca de 1000 daltons). Certamente outros fatores podem estar envolvidos nesta falha e deveriam ser cuidadosamente investigados.

Considerando-se que microcistinas, em certas circunstâncias, podem passar pela membrana de osmose reversa e que em cada sessão de hemodiálise o paciente entra em contato, pela via intravenosa, com 120 litros de água, fica claro que a recomendação de $1\mu\text{g/L}$ de MCYSTs, adotada pela Organização Mundial da Saúde, como limite máximo para a água tratada para consumo humano (Falconer *et al.*, 1994, Chorus & Bartram, 1999) é apenas adequada para água utilizada para consumo oral e com o conhecimento atual ainda não é possível estabelecer nenhum limite aceitável para concentração de MCYSTs em água utilizada em procedimentos dialíticos.

Neste trabalho foi apresentado mais um exemplo de exposição de pacientes renais às MCYSTs durante tratamento de hemodiálise, o que ilustra o quanto é importante o monitoramento dos mananciais de abastecimento que podem ser periodicamente contaminados com cianobactérias potencialmente tóxicas e que são utilizados para o fornecimento de água para os diversos tipos de uso, incluindo o clínico.

Esse estudo também revelou que métodos de tratamento de água (como a osmose reversa, por exemplo) para usos específicos precisam ser testados quanto à sua habilidade em remover novas fontes de contaminação, tais como cianotoxinas, antes de serem rotineiramente aplicados.

5- Análise da presença de microcistinas no soro de pacientes renais crônicos do HUCFF-UFRJ, intoxicados durante tratamento de hemodiálise e avaliação experimental da presença desta toxina em soro de cobaias (ratos Wistar).

Participaram do estudo descrito neste capítulo:

Raquel M. Soares, Prof^a Valéria F. Magalhães, Prof^a Sandra M.F.O Azevedo

Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias – IBCCF^o – UFRJ

Dr. Alvimar Delgado

Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – Setor de Nefrologia -UFRJ

Dr. Jerome Servaites, Dr. Moucun Yuan, Prof. Wayne W. Carmichael

Dept. Biological Sciences - Wright State University – Ohio – EUA

Prof^a Denise P. Carvalho

Laboratório de Fisiologia Endócrina – IBCCF^o – UFRJ

A partir de colaborações científicas estabelecidas entre os grupos acima citados e através do Programa de Doutorado com Estágio no Exterior da CAPES, objetivou-se investigar a presença de microcistinas no soro de pacientes renais crônicos do HUCFF-UFRJ, intoxicados durante tratamento dialítico. Como objetivo complementar, também foi investigado experimentalmente a presença de microcistinas em soro de cobaias (ratos Wistar).

5.1 – Histórico do estudo da exposição de pacientes hemodialisados a microcistinas:

Aproximadamente na primeira semana de novembro de 2001, a água tratada distribuída à cidade do Rio de Janeiro começou a apresentar cheiro e gosto desagradáveis, possivelmente relacionados a geosmina (substância produzida por cianobactérias e fungos), o que levou a reclamações por parte da população. Análises do fitoplâncton em amostras de água bruta do reservatório do Funil e do rio Guandu, que fica a jusante do reservatório e é responsável pelo abastecimento de grande parte do município do Rio de Janeiro, confirmaram a dominância de dois gêneros de cianobactéria provavelmente responsáveis pelo cheiro e odor da água – *Anabaena* e *Microcystis*. O número de células de cianobactérias no reservatório chegou a 2.000.000/mL na primeira amostragem em 22/11/01 e subseqüentes contagens de célula de

amostras do rio Guandu mostraram dominância total do gênero *Microcystis* (Tabela 5.1). Um bioensaio realizado por injeção intraperitoneal em camundongos, com uma amostra de células liofilizadas da floração de cianobactérias obtida do reservatório do Funil (27/11/01), apresentou uma dose letal mínima de 60mg/Kg de peso corpóreo. Os sintomas de intoxicação observados foram típicos de hepatotoxicose causada por microcistinas.

Tabela 5.1 – Número de células do fitoplâncton no Rio Guandu

Rio Guandu	Células / mL
<i>Microcystis</i> – 26/11/01	4,62 x 10 ⁶
Fitoplâncton total - 26/11/01	4,68 x 10 ⁶
<i>Microcystis</i> - 27/11/01	1,95 x 10 ⁶

Análises de microcistinas por ELISA na água tratada distribuída a população confirmaram a presença de 0,4µg /L durante a última semana de novembro. Nesta época, havia 45 clínicas de diálise na área do Grande Rio de Janeiro, incluindo 32 na área municipal que eram responsáveis pelo tratamento de aproximadamente 4.000 pacientes renais crônicos. Todas estas clínicas empregavam a osmose reversa no tratamento da água a ser utilizada na hemodiálise. Para avaliar a eficiência deste sistema em reter a passagem das microcistinas para os pacientes, análises da água antes e após a osmose reversa foram requisitadas pela Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro. Amostras de água de todas as 45 clínicas da cidade foram analisadas utilizando-se kits comerciais de ELISA para microcistinas da Envirologix Inc (1 amostra dupla por clínica durante o período de 6 a 13/12/01). Em quatro clínicas foram obtidos resultados positivos na água após o sistema de osmose reversa (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 – Microcistinas detectadas por ELISA em amostras de água após osmose reversa em 4 clínicas de diálise no Rio de Janeiro.

Concentração de MCYSTs ($\mu\text{g/L}$)	
Clínica 1	0,150
Clínica 2	0,001
Clínica 3	1,600
Clínica 4	0,028

A água utilizada no setor de diálise do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) foi positiva para microcistinas antes e depois da coluna de carvão ativado (**0,33 e 0,32** $\mu\text{g/L}$ respectivamente) em 03/12/01. A partir de então, um estudo em colaboração com o Setor de Nefrologia deste hospital foi estabelecido e amostras de água antes e após a osmose reversa foram coletadas diariamente até 14/12/01 e semanalmente até o final de janeiro de 2002. Todas apresentaram resultados abaixo do limite de detecção do método (0,16 $\mu\text{g/L}$ - kits Enviroligix) até o final do período de monitoramento.

Considerando-se que a cada sessão de hemodiálise um paciente renal entra em contato, pela via intravenosa, com 120 litros de água, uma possível contaminação da mesma com microcistinas representaria um sério risco aos pacientes, mesmo que estas toxinas estivessem presentes em baixas concentrações. Portanto, em face deste risco, objetivou-se avaliar o grau de exposição dos pacientes renais do Setor de Nefrologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – UFRJ às microcistinas neste episódio.

5.2 - Material e Métodos

5.2.1 – Coleta de soro do pacientes do HUCFF:

De 5/12/01 a 29/01/02, estabeleceu-se o monitoramento dos 44 pacientes que recebiam tratamento hemodialítico no HUCFF. A equipe do hospital realizou a coleta de sangue destes pacientes durante as sessões de hemodiálise neste período e parte do soro nos foi cedida (0,4 a 1mL) para análise da presença de microcistinas. Após análise dos dados clínicos, 12 pacientes foram selecionados de acordo com a frequência e o número de amostras disponíveis e negatividade para vírus da hepatite C e HIV.

5.2.2 – Extração de microcistinas das amostras de soro:

A mesma metodologia foi aplicada para a extração de microcistinas tanto do soro de pacientes do HUCFF quanto dos ratos utilizados no experimento de exposição à MCYST-LR. Para tanto, foram adicionados às amostras 10mL de metanol 100%. A mistura foi agitada por 30 minutos, centrifugada a 10000g por 10 minutos, sendo o sobrenadante separado e o precipitado novamente submetido à extração com metanol. Ao volume final de extrato metanólico foi adicionado igual volume de hexano para a separação da fração lipídica do extrato. A mistura foi agitada vigorosamente e a camada de hexano descartada e substituída por um novo volume de hexano. Este processo foi repetido por mais duas vezes, o extrato metanólico foi recuperado, evaporado totalmente e ressuspensão em 1mL de água deionizada. Este extrato final foi parcialmente purificado em um cartucho de C18 (Oasis HLB– 6cc) previamente ativado com 5mL de metanol 100% e 5mL de água deionizada. O cartucho foi lavado com 5mL de água seguidos de 5mL de metanol 30% e eluído com 5 mL de metanol 100%. Esta fração metanólica foi evaporada e ressuspensão em 1mL de água deionizada. Em seguida, uma alíquota de 100 µL foi separada para análise por ELISA e o volume restante foi novamente evaporado e ressuspensão em 200µL de uma solução de acetonitrila/ água/ ácido heptafluorbutírico (25%:50%:0,02% v/v) e analisado por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS).

5.2.3 – Análises das amostras de soro dos pacientes por ELISA:

Os extratos foram analisados por ELISA de acordo com a metodologia descrita por Chu *et al* (1990), An & Carmichael (1994) e Carmichael & An (1999), descrita em detalhes na seção 3.1.4. A partir da curva padrão de MCYST-LR obtida na análise, calculou-se a concentrações de microcistinas nas amostras de soro, expressas como equivalentes de MCYST-LR.

5.2.4 - Análises das amostras de soro dos ratos por ELISA:

Os extratos das amostras de soro de ratos foram analisados em duplicata por ELISA utilizando-se kits comerciais para microcistinas (formato tubos) da Beacon Analytical Systems Inc. (Portland, ME, EUA), seguindo-se o protocolo do fabricante. Este método segue basicamente os mesmos princípios do método de ELISA descrito na seção 3.1.4.

5.2.5 – Análise de microcistinas totais no soro de pacientes:

Amostras de soro de pacientes hemodialisados e amostra de soro controle (de doadores que não recebiam tratamento dialítico, portanto potencialmente não expostos às MCYSTs) foram preparadas para análise de MCYSTs totais, através da análise indireta do subproduto de oxidação destas toxinas, o ácido 2-metil-3-metoxi-4-fenilbutírico (MMPB). Uma alíquota do soro controle foi propositalmente contaminado com MCYST-LR (0,01-25 µg/ml) para se obter um controle positivo.

A molécula de MMPB é produzida durante o processo de oxidação Lemieux do aminoácido Adda das moléculas de MCYSTs (Figura 5.1). Como a oxidação ocorre tanto em MCYST livres quanto ligadas a outras moléculas ou peptídeos, esta análise é a mais adequada para se obter a concentração total desta toxina em matrizes orgânicas (tecidos). Além disso, devido ao fato do MMPB se originar do aminoácido Adda, o qual é bastante incomum e específico das microcistinas, esta análise permite a investigação da presença destas toxinas sem o risco de resultado falso positivo. Neste trabalho, seguiu-se o método descrito por Ott & Carmichael (2001), sendo o padrão de MMPB fornecido pelo Dr. Michio Namikoshi (Tokyo University of Fishers, Japão).

O procedimento de oxidação se iniciou adicionando-se uma solução de permanganato de potássio e meta-periodato de sódio a iguais molaridades (0,02M) às amostras. O pH foi ajustado a aproximadamente 9 com solução de bicarbonato de potássio. Permanganato de potássio sólido foi

continuamente adicionado para manter o estado oxidado da solução durante o curso da reação (3h) em agitador a 100 rpm. A reação foi interrompida com 0,5 – 1,5 g de bisulfito de sódio sólido, o que foi indicado pela mudança da cor da solução de púrpura para branca. Em seguida, foi feito o ajuste do pH para 2 com ácido sulfúrico 10% e adicionou-se metanol 100% (grau HPLC) à solução atingindo uma concentração de 7,5% (v/v).

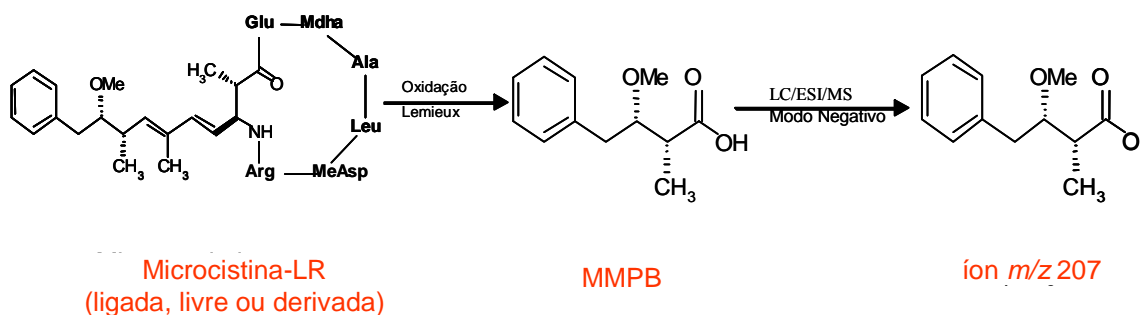


Figura 5.1 – Diagrama esquemático da produção de MMPB por oxidação Lemieux.

Para a extração de MMPB da solução de oxidação foram utilizados cartuchos 3M Empore SDB-XC 7mm/3mL (Fisher Scientific, Pittsburgh PA, EUA), os quais foram ativados previamente com metanol e água deionizada. Em seguida, as amostras oxidadas foram adicionadas e os cartuchos foram lavados com solução de metanol 15%/ ácido acético 0,05% (v/v) e água deionizada/ ácido acético 0,05%. A eluição foi feita com metanol 70% e as amostras foram evaporadas e reconstituídas em metanol 30%/ ácido acético 0,05% (v/v) para análises de LC/MS em SIM/ Modo negativo (m/z 207).

5.2.6 – Análises por LC/MS e MS/MS dos extratos das amostras de soro de pacientes:

5.2.6.1 – Condições analíticas da cromatografia líquida (LC):

A separação de MCVSTs foi realizada em uma coluna de C8 - Symmetry (3.5 μ m, 2,1x100 mm, fase reversa da Waters), utilizando com fase móvel solução de acetonitrila/ ácido trifluoracético 0,05%, água deionizada/ ácido trifluoracético 0,05% (condições de gradiente: 10% orgânica de 0 a 3 min, 60%

orgânica de 3,1 a 9 min, 10% orgânica de 9,1 a 20 min) em um fluxo de 0,2 mL/ minuto. O volume de amostra injetado foi de 20µL.

5.2.6.2 – Condições analíticas da espectrometria de massas (MS):

A análise de massas das amostras (sejam de MMPB ou MCYSTs diretamente) foi feita em um espectrômetro ThermoQuest LCQ de bancada com modos de scan MS e MS/MS. Uma fonte de íon para ionização de “eletron spray” (ESI) foi utilizada e uma sintonização (tune file) foi criada para cada análise. O sistema foi otimizado para a transmissão de um único íon carregado $[M + H]^+$. A voltagem do spray foi de +5 kV e a temperatura do capilar foi de 250°C. Para aumentar a razão sinal/ ruído, o modo “scan” de monitoramento de reação (SRM) foi utilizado. O íon parental de m/z 995,5 (equivalente as microcistinas) foi monitorado em 2 amu de amplitude de massa e a energia de colisão relativa foi de 5%.

Para a determinação da concentração de microcistinas nas amostras, uma curva padrão foi feita com as diferentes concentrações de padrão de MCYST-LR variando de 0,97 a 250 ng/mL.

5.2.7 – Análise estatística:

Os dados dos pacientes do HUCFF selecionados para este estudo foram divididos em dois grupos, de acordo com os dias da semana em que os pacientes recebiam tratamento hemodialítico. O grupo 1 refere-se aos pacientes que recebiam o tratamento às segundas, quartas e sextas-feiras e o grupo 2 aos que recebiam tratamento às terças, quintas e sábados. Para a análise da variação de microcistinas ao longo do tempo, o conjunto de dados (resultados de ELISA) de cada grupo foi dividido em 4 subgrupos (cada um representando o período sequencial de 2 semanas a partir da data estimada de exposição às MCYSTs (3/12/01)). Um teste t para amostras independentes foi utilizado para comparar os 4 grupos de dados de 2 semanas através da análise de variância (ANOVA) ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram feitas com o software STATISTICA.

5.2.8 – Exposição de ratos Wistar a uma dose sub-letal de MCYST-LR:

Ratos Wistar machos adultos, pesando entre 260 e 318 g ($n=10$), mantidos em gaiolas em seu biotério de origem, o Laboratório de Fisiologia Endócrina– IBCCF⁹–UFRJ, foram injetados uma única

vez com uma solução aquosa de MCYST-LR (padrão gentilmente cedido pelo Prof. Wayne Carmichael, Wright State University, EUA) em dose sub-letal de 45µg/Kg de peso corpóreo. Outros 10 ratos utilizados como controle foram injetados com 0,5mL de solução salina (NaCl 0,9%).

Ambos os grupos teste e controle foram subdivididos em 2 subgrupos de 5 animais. Uma amostra de sangue (aproximadamente 3mL) foi retirada a cada semana aproximadamente, tanto do grupo teste quanto do controle, alternando-se os subgrupos de 5 animais a cada semana. Assim, cada subgrupo somente sofreu a retirada de sangue a cada 15 dias. Após anestesia dos animais com xilazina (5mg/Kg) e cetamina (50mg/kg), o sangue foi retirado com seringa descartável a partir da veia jugular exposta. Em seguida, o tecido acima da veia foi suturado e esterilizado com álcool. O sangue, coletado em frascos Falcon, foi imediatamente centrifugado a 3000 g para a obtenção do soro e este armazenado em frasco de vidro em freezer -20°C até o momento da extração e análise por ELISA, como descrito nos itens 5.2.2 e 5.2.4.

Os animais de todos os grupos foram sacrificados por decapitação ao final do período de amostragem.

5.3 – Resultados e Discussão

Durante o período de amostragem (5/12/01 a 29/01/02) 96 amostras de soro foram obtidas dos 12 *pacientes renais selecionados (em média de 5 a 10 amostras por paciente)*. Deste total, 89% foram positivas para MCYSTs quando analisadas por ELISA. Todos os 12 pacientes apresentaram amostras positivas, mas também houve amostras com concentrações abaixo do limite de detecção do método. A Figura 5.2 apresenta os valores da concentração de MCYSTs em cada amostra de soro durante o período de amostragem. A mais baixa e a mais alta concentração detectadas foram 0,16 e 0,96ng/mL em 28/12/01 e 03/01/02, respectivamente, em diferentes pacientes.

MCYSTs foram detectadas nas amostras ao longo de todo o período de amostragem, portanto, quase 2 meses após a primeira data considerada de exposição – 03/12/01. As mais altas concentrações foram encontradas na primeira semana de janeiro, tanto no grupo de pacientes com tratamento às segunda/quarta/sexta-feiras (SQS) quanto nos de terça/quinta/sábado (TQS).

A análise estatística demonstrou que os valores de MCYSTs no soro não foram, de maneira geral, significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) entre dezembro e janeiro. A única diferença estatística ocorreu entre os dois grupos de pacientes (SQS x TQS) no período de 14-28 de dezembro. No entanto, não se dispõe de informação suficiente para explicar esta diferença.

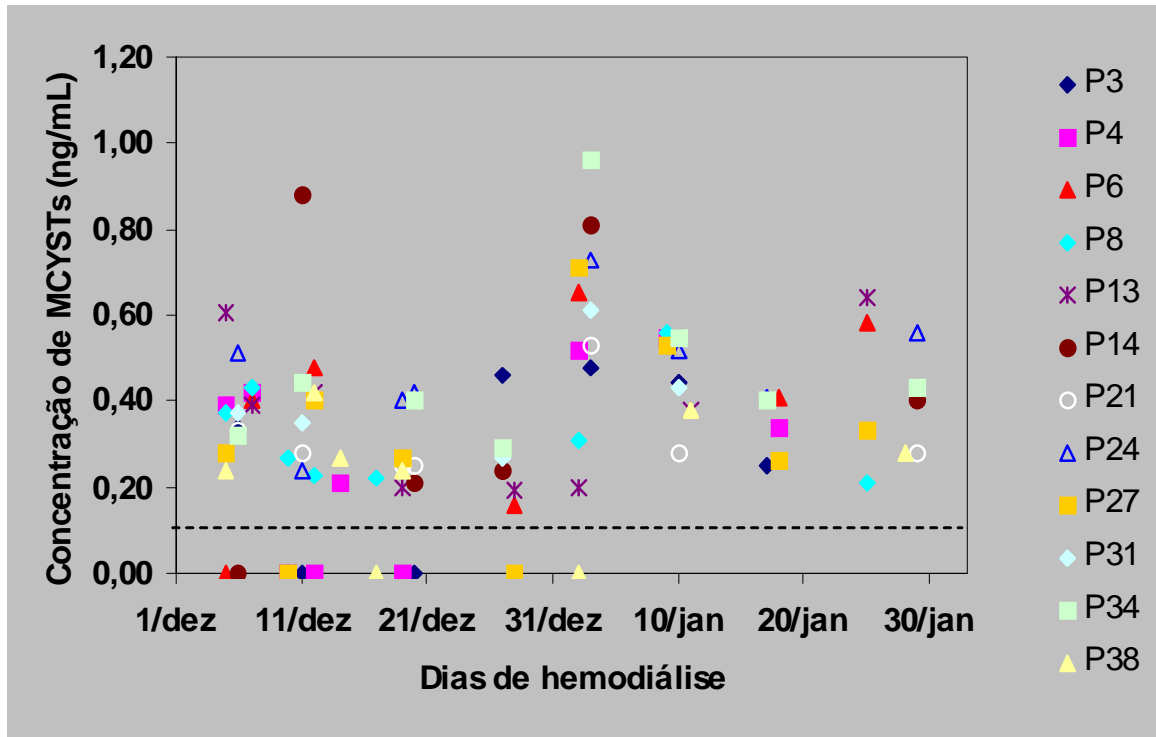


Figura 5.2 – Concentração de microcistinas no soro de pacientes renais do setor de diálise do HUCFF - UFRJ. O período de amostragem se estendeu de 5/12/01 a 29/01/02. A linha tracejada indica o limite de detecção do método de análise (ELISA) – 0,16 ng/mL. P= paciente.

Uma amostra de soro positiva de cada um dos 12 pacientes e uma amostra de soro controle (de doador - negativa para MCYSTs) foram analisadas por LC/MS para confirmar e caracterizar a presença de MCYSTs.

A Figura 5.3a mostra o espectro do padrão de MCYST-LR (7,8ng/mL) no modo de scan SEM, com um tempo de retenção de 11,74 minutos (m/z 995,31). Os sinais de fragmentos oriundos da análise de MS/MS podem ser observados na Figura 5.3b. Nenhum sinal com o mesmo tempo de retenção e massa do sinal do padrão de MCYST-LR foi observado nas amostras de soro dos pacientes. Entretanto, um sinal entre os tempos de retenção de 10,90 e 11,10 minutos e 995 m/z foi detectado em todas as amostras analisadas, como exemplificado na Figura 5.4a. Este sinal, quando analisado por MS/MS, não produz os fragmentos característicos da molécula de microcistina, o que seria necessário para a confirmação da molécula. Entretanto, um sinal com estas características de tempo de retenção e massa não foi detectado na amostra de soro controle (Figura 5.4b), o que contribui para a hipótese de que a presença de MCYSTs foi realmente confirmada por LC/MS nas amostras de soro dos pacientes renais.

As análises de LC/MS das amostras de soro não foram conclusivas. Possivelmente, isso ocorreu devido a interferência da matriz (o soro) que contém um incontável número de peptídeos, muitos deles

com características de polaridade e massa semelhantes as das MCYSTs, portanto, de difícil separação. Uma outra hipótese, que explicaria a dificuldade na identificação de MCYSTs no soro por LC/MS, é o fato das amostras terem estado armazenadas a -20°C por 10 meses antes do início das análises. Isto pode ter levado a mudanças estruturais na molécula que resultaram em alteração no tempo de retenção e/ou dificuldades na obtenção dos fragmentos específicos nas análises por MS/MS.

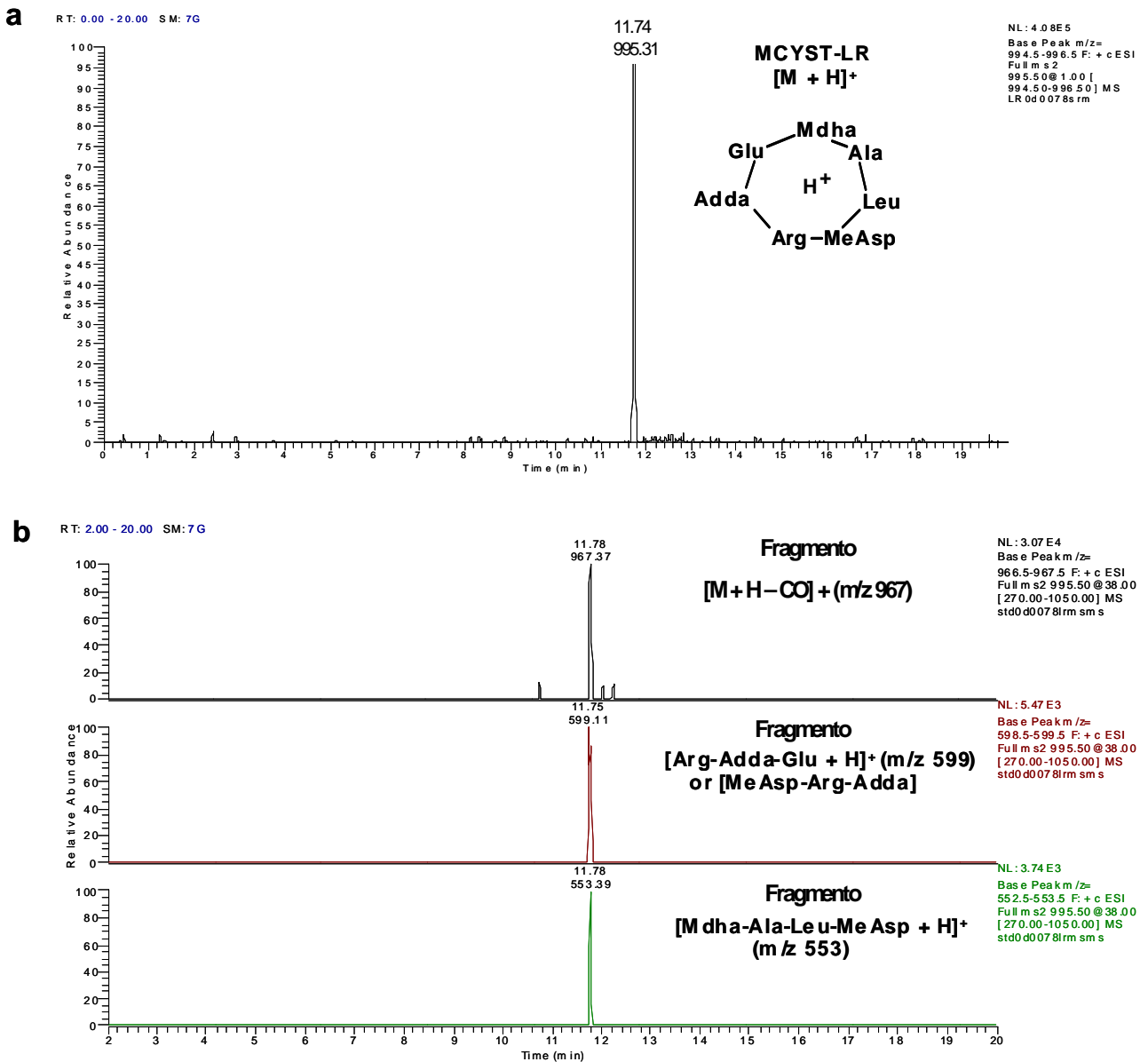
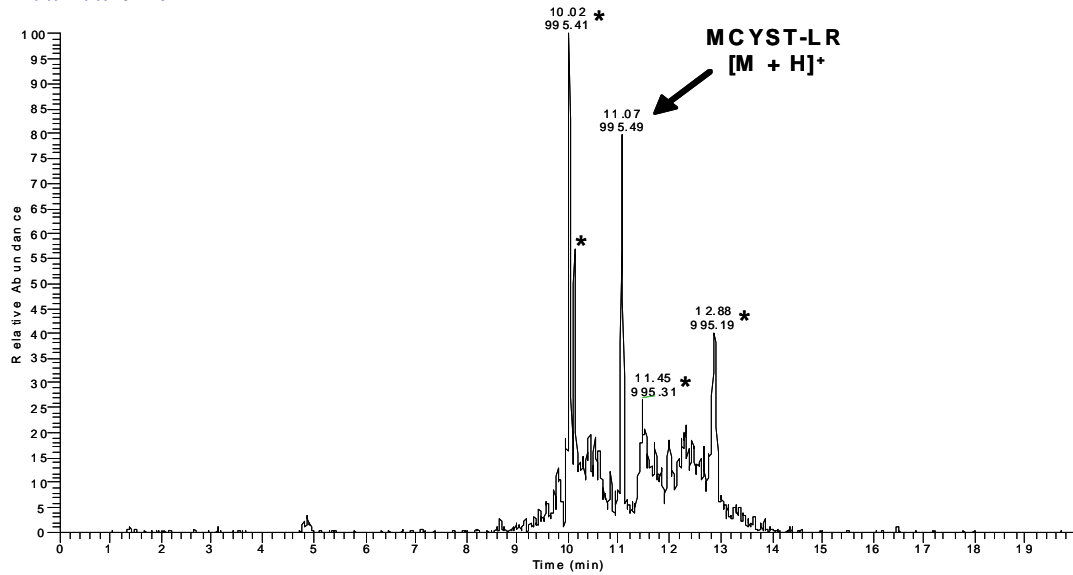


Figura 5.3 – Espectros da análise de LC/MS (a) de padrão de MCYST-LR (7,8ng/mL) em modo “scan” SRM e da análise de MS/MS (b) do mesmo padrão mostrando os íons de fragmentação no mesmo tempo de retenção e massas características para: [M + H - CO]⁺ (m/z 967), Arg-Adda-Glu + H ou βMeAsp-Arg-Adda+H (m/z 599) e Mdha-Ala-Leu- βMeAsp +H (m/z 553).

a

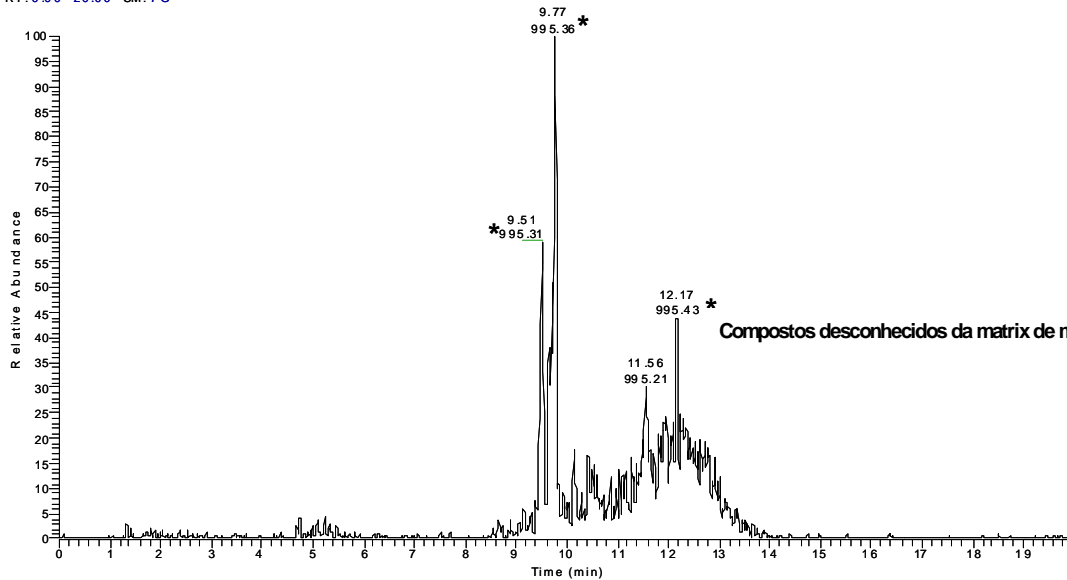
RT: 0.00 - 19.99 SM: 7G



NL: 1.05 E6
 Base Peak m/z= 994.5-996.5 F: + c
 ESI Full ms 2
 995.50 @ 1.00 [
 994.50-996.50] MS
 s 09 301r

b

RT: 0.00 - 20.00 SM: 7G



NL: 5.11 E5
 Base Peak m/z= 994.5-996.5 F: + c ESI
 Full ms 2 995.50 @ 1.00
 [994.50-996.50] MS
 Cont.serum s rm

Figura 5.4 - Espectros da análise de LC/MS (a) da amostra de soro de um dos pacientes e (b) da amostra de soro controle em modo “scan” SRM. A amostra do paciente mostra um sinal em 11,07 minutos, m/z 995,19, que não é observado na amostra de soro controle.

Entretanto, as análises de LC/MS no soro controle contaminado com MCYST-LR mostraram a presença de MMPB em um sinal com tempo de retenção de 8,4 minutos e 207m/z. O mesmo sinal foi observado nas amostras de soro dos pacientes (Fig 5.5). Estes sinais são equivalentes ao sinal verificado na análise do padrão de MMPB.

Estas análises indiretas e qualitativas de MCYSTs totais no soro, combinadas com os resultados obtidos com ELISA, indicam que estes pacientes renais crônicos foram expostos a doses baixas destas toxinas. Dentre 12 pacientes selecionados, nenhum apresentou níveis de enzimas hepáticas no soro que

indicasse algum dano ao fígado, tão pouco foram observados sintomas que pudessem ser atribuídos a intoxicação com MCYSTs. Contudo, do total de 44 pacientes renais que faziam hemodiálise no HUCFF, alguns apresentaram altos níveis de enzimas hepáticas no soro no período do monitoramento. Entretanto, estes pacientes também apresentavam um quadro de problemas hepáticos, tais como hepatite C, que impossibilitaram qualquer correlação direta com intoxicação por MCYSTs.

A concentração média de MCYSTs em amostras de soro de pacientes de hemodiálise que foram vítimas fatais em Caruaru em 1996 foi estimado em 2,2 ng/mL (Carmichael *et al.*, 2001; Azevedo *et al.*, 2002). Este valor é mais que o dobro da concentração mais alta encontrada no soro dos pacientes renais do Rio analisados neste estudo.

No entanto, mesmo doses baixas podem representar um risco para o organismo exposto a microcistinas. Experimentos laboratoriais têm mostrado que exposições sub-letais a essas toxinas podem promover tumores de fígado, cólon e pele (Falconer, 1991; Ito *et al.*, 1997a; Humpage *et al.*, 2000). Portanto, uma vez que essas toxinas foram detectadas continuamente no soro desses pacientes renais nos dois meses após o período de exposição, não se pode deixar de considerar o risco potencial dessa exposição crônica de órgãos e tecidos a MCYSTs na promoção de tumores.

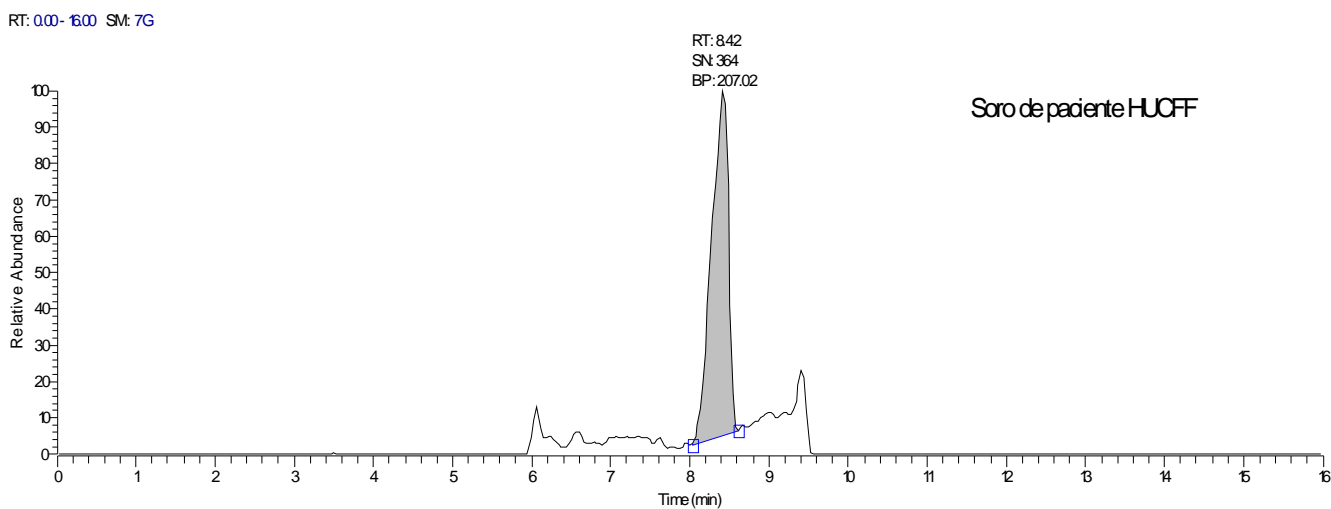
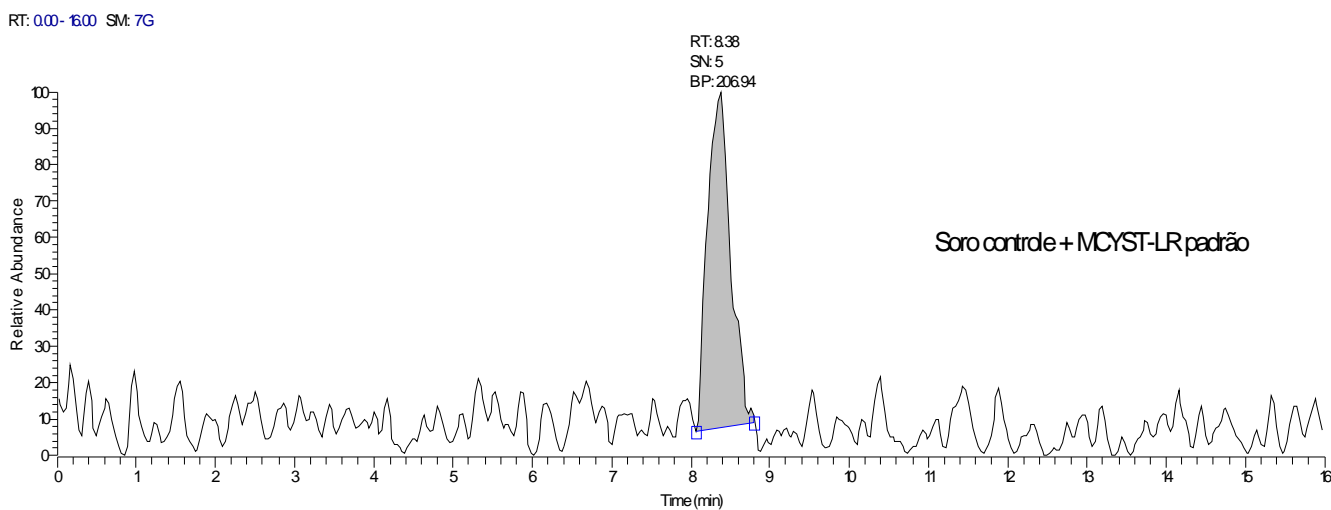


Figura 5.5 – Detecção de MMPB por análise de LC/MS: (a) sinal de MMPB em 8,4 minutos no soro controle contaminado com MCYST-LR, (b) sinal de MMPB em 8,4 minutos na amostra de soro de um paciente.

Durante o monitoramento semanal da água utilizada no setor de diálise do HUCFF por ELISA não foi detectada a presença de MCYSTs após 03/12/01. Isto sugere que não ocorreu exposição a estas toxinas, até o final de janeiro de 2002, pelo tratamento dialítico. Desta forma, a hipótese mais provável para explicar a presença de MCYSTs no soro dos pacientes é que as mesmas sejam oriundas do fígado. Entretanto, a liberação de microcistinas deste órgão, assim como a cinética de detoxificação e eliminação destas toxinas do organismo ainda não estão elucidadas.

Uma vez no fígado, MCYSTs se ligam covalente e irreversivelmente às proteínas fosfatases (PPI e 2 A) (Carmichael, 1994). No entanto, alguns estudos com peixes e moluscos demonstram haver aumento na concentração de MCYSTs livres em tecidos destes animais vários dias após a intoxicação (Soares *et al*, 2004; Vasconcelos, 1995). Isto sugere que estas toxinas possam ter sido liberadas de proteínas fosfatases durante o “turnover” das mesmas e, assim, voltaram a circular no organismo. Esta hipótese explicaria as concentrações de MCYSTs encontradas no soro dos pacientes durante os dois meses subsequentes à exposição e levanta a questão de qual seria a “meia vida” dessas toxinas em seres humanos ou outros organismos.

O experimento realizado com ratos, injetados com uma dose sub-letal de MCYST-LR (45µg/Kg), teve como objetivo confirmar o observado nos pacientes renais. De fato, os resultados mostraram que os animais apresentaram MCYST-LR no soro durante os 2 meses de amostragem após a data da única injeção intraperitoneal (Tabela 5.3). Várias amostras apresentaram concentrações abaixo do limite de detecção do método de ELISA utilizado (0,1 ng/mL). Dentre as amostras que apresentaram concentrações mensuráveis, o valor mais baixo foi de 0,1 ng/mL e valor mais alto foi de 45,65 ng/mL, sendo este último encontrado na última amostragem, portanto, 55 dias após a injeção i.p. Estimando-se como sendo de 3ml o volume total de soro dos ratos utilizados, então esta concentração máxima de MCYST-LR significaria 1% da massa originalmente injetada no animal (aproximadamente 13,5µg de MCYST-LR para cada animal de 300g). Os valores médios de MCYST-LR encontrados no soro dos ratos ao longo do período de estudo estão apresentados na Tabela 5.3. Observam-se dois momentos de concentrações significativamente mais altas: o primeiro 14 dias após a injeção e o segundo no final do período de amostragem.

Apesar de não ser possível uma comparação direta entre a dinâmica de MCYSTs em ratos e seres humanos, estes resultados se assemelham ao verificado nos pacientes renais do Rio que também apresentaram as mais altas concentrações de MCYSTs no soro muitos dias após a data de exposição (30 dias).

Tabela 5.3 – Concentração de MCYST-LR no soro de ratos Wistar injetados com 45µg MCYST-LR/Kg

Amostragem (dias após a injeção i.p.)	Concentração de MCYST-LR (ng /mL)	Erro padrão
6	0,55	0,24
14	12,69	5,69
20	0,23	0,13
27	0,14	0,14
34	0,22	0,13
41	0,27	0,15
55	18,27	5,94

Todo o exposto acima revela que o sistema de osmose reversa utilizado no setor de diálise do HUCFF não previniu a contaminação da água por microcistinas utilizada no tratamento hemodialítico dos pacientes renais. De acordo com Neumann & Weckesser (1998), que avaliaram 3 diferentes membranas de osmose reversa, as taxas de retenção para duas diferentes MCYSTs variaram de 96,7 a 99,9%.

Segundo informações prestadas pelo setor de Nefrologia do HUCFF, o sistema que estava em uso na época era novo e estava operando de acordo com as instruções do fabricante. No entanto, sabe-se também que o mesmo foi projetado para funcionar em temperatura ambiente de $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$, mas a temperatura local na época desta investigação era de aproximadamente 40°C (período de verão). Sendo assim, esta é uma possível explicação para o fato de uma membrana teoricamente capaz de reter moléculas acima de 200 daltons ter permitido a passagem para a água de diálise de moléculas como as MCYSTs (cerca de 1000 daltons). Certamente outros fatores podem estar envolvidos nesta falha e deveriam ser cuidadosamente investigados.

Considerando-se que microcistinas, em certas circunstâncias, podem passar pela membrana de osmose reversa e que em cada sessão de hemodiálise o paciente entra em contato, pela via intravenosa, com 120 litros de água, fica claro que a recomendação de $1\mu\text{g/L}$ de MCYSTs, adotada pela Organização Mundial da Saúde, como limite máximo para a água tratada para consumo humano (Falconer *et al.*, 1994, Chorus & Bartram, 1999) é apenas adequada para água utilizada para consumo oral e com o conhecimento atual ainda não é possível estabelecer nenhum limite aceitável para concentração de MCYSTs em água utilizada em procedimentos dialíticos.

Neste trabalho foi apresentado mais um exemplo de exposição de pacientes renais às MCYSTs durante tratamento de hemodiálise, o que ilustra o quanto é importante o monitoramento dos mananciais de abastecimento que podem ser periodicamente contaminados com cianobactérias potencialmente tóxicas e que são utilizados para o fornecimento de água para os diversos tipos de uso, incluindo o clínico.

Esse estudo também revelou que métodos de tratamento de água (como a osmose reversa, por exemplo) para usos específicos precisam ser testados quanto à sua habilidade em remover novas fontes de contaminação, tais como cianotoxinas, antes de serem rotineiramente aplicados.

6- Discussão Geral

Os resultados dos experimentos descritos nos capítulos anteriores demonstraram que doses sub-letais de microcistinas, injetadas intraperitonealmente em camundongos tanto jovens quanto adultos, foram capazes de alterar a fisiologia do fígado e do pulmão destes animais.

No fígado, observou-se que em apenas 30 minutos MCYST-LR foi capaz de inibir mais de 50% da atividade de proteínas fosfatases 1 e 2A. Neste mesmo período, a concentração de glutatona também foi reduzida e as MCYSTs livres, quando foram detectáveis, ocorreram em concentrações muito baixas, indicando que estavam, em sua maioria, conjugadas com as fosfatases. No entanto, 24 horas após a intoxicação, os fígados dos animais adultos já apresentavam sinais de recuperação, uma vez que tanto a atividade de proteínas fosfatases quanto a concentração de glutatona retornaram aos níveis dos animais controle. Pela análise estatística, esta recuperação permaneceu estável até o oitavo e último dia dos experimentos.

A recuperação da atividade fosfatásica foi mais tardia nos animais jovens, o que pode indicar uma maior sensibilidade dos mesmos. Hermansky *et al.* (1991) verificaram que animais recém-nascidos apresentam maior resistência às MCYSTs que adultos. Isto pode estar relacionado à formação do aparato enzimático do fígado. Recém-nascidos não apresentam o sistema enzimático citocromo P-450 completamente desenvolvido e sabe-se que estas enzimas podem converter xenobióticos em radicais livres, os quais são danosos à célula (Klaassen, 1996). Assim, uma menor concentração de citocromo P-450 poderia contribuir para maior resistência a estas toxinas. Também existem dados na literatura mostrando que camundongos velhos (39 semanas), quando expostos pela via oral, apresentaram maior sensibilidade a MCYST-LR que jovens (5 semanas). Mas, neste caso pode ser devido a degradação natural das células epiteliais do intestino, o que favorece a absorção da toxina (Ito *et al.*, 1997).

Entretanto, no experimento descrito no capítulo 3, os animais jovens não eram recém-nascidos (tinham 4 semanas de idade) e, portanto, apresentavam seus fígados completamente formados. No entanto, a diferença observada na resposta da atividade de proteínas fosfatases indica que pode haver diferenças fisiológicas relacionadas à idade que merecem maiores investigações.

O fígado é responsável por funções vitais no organismo tais como homeostase de glicose e colesterol, síntese proteica, formação da bile, excreção biliar, biotransformação e detoxificação. Portanto, os danos ao tecido hepático provocados pelas doses sub-letais de MCYSTs podem ter causado alterações em uma ou mais destas funções. No entanto, este órgão mostrou capacidade de reversão do quadro

através das duas principais vias de recuperação: 1) aumento da atividade das enzimas alvo das MCYSTs e 2) atuação do aparato enzimático de detoxificação. A primeira possivelmente ocorreu através de aumento de síntese de fosfatases 1 e 2A ou também pelo aumento do “turnover” das mesmas devido ao reconhecimento das fosfatases inativas pelas células (Gehring, comunicação pessoal; Guzman *et al.*, 2003). Já o processo de detoxificação foi constatado indiretamente pela variação da concentração de glutatona no fígado. Esta variação mostrou uma grande depleção inicial de GSH, indicando um consumo devido a atuação da glutatona S-transferase que é a responsável pela conjugação deste peptídeo às MCYSTs. Isto possivelmente iniciou o processo de excreção que inclui a transformação do conjugado MCYST-GS em MCYST-Cys e eliminação principalmente através dos rins (Ito *et al.*, 2002).

Substâncias injetadas intraperitonealmente, de um modo geral, atingem diretamente o fígado pela circulação da veia porta, antes mesmo de chegar à circulação sistêmica e alcançar outros órgãos (Klaassen, 1996). Assim, a administração de microcistinas por esta via favorece ainda mais o acúmulo desta toxina no fígado que naturalmente já é o principal órgão alvo das mesmas. Isto corrobora o fato de não ter sido detectada a presença de microcistinas pelo método de ELISA, assim como também não foi detectada qualquer inibição de proteínas fosfatases 1 e 2A, no pulmão dos camundongos injetados intraperitonealmente nos experimentos descritos no capítulo 4. No entanto, ainda assim essas toxinas provocaram danos ao tecido pulmonar e alteraram a mecânica respiratória dos animais.

Os danos ao pulmão derivaram de um processo inflamatório agudo observado logo a partir das primeiras horas após a injeção intraperitoneal de microcistinas, sendo caracterizado principalmente pela infiltração de células polimorfonucleares. O colapso alveolar também foi observado nos animais, sendo que no experimento em que se utilizou extrato de *Microcystis aeruginosa* produtora de microcistinas o colapso ocorreu mais cedo que a infiltração de PMNs. Os resultados deste experimento também indicaram que os animais jovens apresentaram o processo inflamatório mais rapidamente que os adultos.

É interessante observar que tanto MCYST-LR pura quanto o extrato de *M. aeruginosa* produtora de microcistinas produziram no pulmão uma resposta inflamatória e colapso alveolar em níveis praticamente iguais. Isto indica que no extrato de *Microcystis* os principais agentes realmente foram as microcistinas. Esta é uma constatação importante, uma vez que em condições reais, seres humanos ou animais se intoxicam com células de cianobactérias ou seus metabólitos como um todo.

A infiltração de PMNs no parênquima pulmonar pode ter sido causada por microcistinas através de estímulo indireto, ou seja, pela produção de citocinas por macrófagos peritoneais. Além disso, mesmo não tendo sido detectadas, as microcistinas podem ter alcançado o pulmão em concentrações muito baixas, e deste modo também ter estimulado, em algum grau, macrófagos alveolares a produzirem

mediadores inflamatórios. Do mesmo modo, também podem ter promovido a adesão de PMNs às células do endotélio de capilares alveolares, favorecendo sua migração para o parênquima pulmonar (Nakano *et al.*, 1991; Naseen *et al.*, 1989; Hernández *et al.*, 2000).

O colapso alveolar possivelmente foi gerado por uma deficiência na produção de surfactante pelos pneumócitos do tipo II, o que indicaria um efeito direto das microcistinas ou do processo inflamatório sobre estas células. Já as alterações nas pressões resistivas e elastâncias do pulmão dos animais indicaram aumento na resistência das vias aéreas, aumento da rigidez do órgão e conseqüente prejuízo à mecânica respiratória, processos provavelmente desencadeados pela inflamação causada por MCYST-LR.

As microcistinas produziram efeitos no pulmão, direta e/ou indiretamente, por um período contínuo, ou seja, enquanto duraram os experimentos. Isto sugere que estas toxinas, mesmo em pequenas concentrações, devem ter estado presentes na circulação durante todo ou grande parte do período analisado estimulando o sistema imune cuja resposta foi claramente observada no pulmão.

Foi observado que a partir de 24 horas após a injeção intraperitoneal foi possível detectar microcistinas livres no fígado dos animais. Estas toxinas provavelmente foram liberadas de proteínas fosfatases após o “turnover” das mesmas e em seguida podem ter sido conjugadas a glutathione, sendo direcionadas para excreção e/ou entrado novamente na circulação, onde podem ter iniciado um novo ciclo de efeitos no organismo. Alguns xenobióticos apresentam um comportamento de recirculação, o que aumenta muito sua “meia-vida” no organismo. Isto se deve ao fato destas substâncias serem excretadas pelo sistema biliar e poderem ser absorvidas novamente no intestino, formando um ciclo êntero-hepático (Klaassen, 1996).

Um indício de que tal processo possa ter ocorrido com as microcistinas nos experimentos descritos nos capítulos 1 e 2 é o fato destas toxinas terem sido continuamente detectadas no soro de pacientes que foram expostos às microcistinas durante tratamento de hemodiálise (capítulo 5). Durante 2 meses após a exposição a estas toxinas, análises por ELISA e LC/MS foram capazes de detectá-las no soro dos pacientes renais. Experimentalmente, foi possível confirmar que MCYST-LR pode ser detectada no soro de ratos em diferentes momentos ao longo de 2 meses após uma única injeção intraperitoneal.

Possivelmente, uma das principais conseqüências da contínua circulação de microcistinas no organismo é a promoção de tumores. Estudos *in vivo* indicaram claramente o papel de MCYST-LR na promoção de tumores após injeção intraperitoneal de doses sub-letais que variaram de 1-10 µg/Kg ou 382-693 µg/Kg pela via oral, sendo estes tumores associados ao desenvolvimento de câncer de fígado, pele e possivelmente cólon (Gehringer, 2004). O estudo de Ito *et al.* (1997) mostrou que após 100

injeções i.p. de MCYST-LR (20 µg/Kg) em camundongos durante 28 semanas foram verificados nódulos neoplásicos no fígado até 2 meses após o término das injeções. *In vitro*, já foi observado que hepatócitos expostos a doses baixas de microcistinas tendem a se proliferar, enquanto que doses altas preferencialmente induzem apoptose nestas células (Humpage & Falconer, 1999).

A indução de proliferação celular por microcistinas pode estar relacionada à inibição de proteínas fosfatases do núcleo. Guzman *et al.* (2003) observaram que tal inibição leva ao aumento da fosforilação de p53, enzima diretamente relacionada a diversas funções tais como morte celular, proliferação celular, repostas ao stress e dano ao DNA.

Portanto, a presença de microcistinas no soro dos pacientes renais por um período prolongado, como descrito no capítulo 5, pode significar um risco maior ao desenvolvimento de câncer. No incidente em Caruaru-PE (1996), onde 54 pacientes renais faleceram após intoxicação com microcistinas contidas na água utilizada no tratamento de hemodiálise, os pacientes sobreviventes chegaram a apresentar toxinas no soro por mais de 3 meses após o período de exposição (dados não publicados).

Pacientes renais crônicos que estão submetidos ao tratamento hemodialítico podem estar expostos a este risco por estarem em contato intravenoso com 120 litros de água durante cada sessão do tratamento, o qual se repete em média 3 vezes por semana. Para o consumo oral da água existe a recomendação da Organização Mundial da Saúde que estabeleceu o limite máximo aceitável de microcistinas em 1µg/L/dia, valor incorporado pela legislação brasileira através da portaria 518 do Ministério da Saúde, que trata da qualidade da água para consumo humano. No entanto, para usos clínicos como o tratamento dialítico, não existe recomendação oficial, mas é consenso geral que não seja aceitável qualquer concentração destas toxinas na água utilizada. Hospitais e clínicas geralmente têm sistemas de tratamento da água complementares, os quais incluem colunas de resinas de troca iônica, colunas de carvão ativado e sistema de osmose reversa, o qual, quando operado adequadamente, é capaz de reter moléculas a partir de 200 daltons. O funcionamento de cada uma dessas etapas deve ser cuidadosamente monitorado para que esteja garantida a qualidade da água. Colunas de carvão ativado, por exemplo, podem esgotar sua capacidade de reter cianotoxinas muito antes de estarem saturadas para a remoção de outros compostos orgânicos (Chorus & Bartram, 1999). No incidente de Caruaru, a manutenção inadequada dos sistemas de tratamento da água da clínica e a ausência de osmose reversa foram os fatores que permitiram a intoxicação aguda dos pacientes (Jochimsem *et al.*, 1998).

No incidente ocorrido no Rio de Janeiro, descrito no capítulo 5, a água tratada distribuída à população continha microcistinas em concentração dentro do limite permitido pela legislação brasileira (1µg/L). Além disso, o tratamento da água nas clínicas de diálise seguia todas as etapas recomendadas,

entretanto, as microcistinas, que são moléculas de aproximadamente 1000 daltons, não foram totalmente retidas pelo sistema de osmose reversa, uma vez que estas toxinas foram detectadas no soro dos pacientes hemodialisados. Dentre as razões assumidas para explicar tal incidente no serviço de diálise do Hospital Clementino Fraga Filho–UFRJ estão o uso de carvão ativado pouco eficiente na remoção de microcistinas e uso inadequado do sistema de osmose reversa. Este sistema estava alocado em local que apresentava altas temperaturas no verão e era ligado e desligado diariamente. Assim, foi levantada a hipótese de que a membrana pode ter sofrido alterações nas junções do sistema no momento de religamento diário, assim como alterações na sua porosidade devido às altas temperaturas no verão.

Portanto, o tratamento da água contendo cianobactérias tóxicas ainda merece extensas investigações, principalmente em relação ao tratamento responsável por produzir água de qualidade adequada ao uso clínico.

Nos estudos descritos nesta tese, pôde-se observar que uma única exposição a uma dose sub-letal de microcistinas foi capaz de produzir efeitos danosos em fígado e pulmão de camundongos. Apesar de haver recuperação do principal órgão alvo destas toxinas que é o fígado, os estudos com ratos e as análises do soro de pacientes renais expostos demonstraram que microcistinas podem recircular no organismo por ao menos 2 meses. Este fenômeno pode ser uma das razões para a resposta inflamatória prolongada observada nos pulmões de camundongos.

Deste modo, este estudo contribuiu para se ressaltar a importância do monitoramento e controle de florações de cianobactérias em corpos d'água utilizados tanto para recreação quanto abastecimento da população. Como a dominância destes microrganismos produtores de toxinas tem sido registrada com grande frequência em nossos ecossistemas aquáticos, o risco de intoxicações sub-letais e crônicas, seja pelo consumo da água, pelo consumo de organismos aquáticos contaminados ou mesmo através de recreação, se torna de importância crucial para a saúde pública. E a base de toda ação preventiva neste sentido deve estar na preservação dos recursos hídricos.

7 – Conclusões

1- Os resultados deste estudo demonstraram que doses sub-letais de microcistinas, injetadas intraperitonealmente em camundongos tanto jovens quanto adultos, foram capazes de alterar a fisiologia do fígado e do pulmão destes animais.

2- No fígado, MCYST-LR inicialmente inibiu mais da metade da atividade de proteínas fosfatases 1 e 2 A, reduziu a concentração de glutatona, e esteve, em sua maior parte, conjugada com as proteínas fosfatases. Os fígados dos animais adultos apresentaram sinais de recuperação, uma vez que tanto a atividade de proteínas fosfatases quanto a concentração de glutatona retornou aos níveis dos animais controle. Já a recuperação da atividade fosfatásica nos animais jovens foi mais tardia, o que pode indicar uma maior sensibilidade dos mesmos.

3- O processo de detoxificação foi constatado indiretamente pela variação da concentração de glutatona no fígado, indicando um consumo deste tripeptídeo possivelmente devido à atuação da glutatona S-transferase.

4- MCYSTs causaram um processo inflamatório agudo no pulmão, observado logo a partir das primeiras horas, tanto em jovens quanto em adultos, sendo caracterizado pela infiltração de células polimorfonucleares. O colapso alveolar também foi observado. Além disso, tanto MCYST-LR pura quanto o extrato de *M. aeruginosa* produtora de microcistinas produziram tais efeitos em níveis praticamente iguais.

5- As alterações nas pressões resistivas e elastâncias do pulmão dos animais indicaram maior resistência das vias aéreas e aumento da rigidez do órgão, processos provavelmente desencadeados pela inflamação causada por MCYST-LR, com conseqüente prejuízo à mecânica respiratória.

6- Os resultados dos estudos com soro indicaram que microcistinas podem recircular no organismo por um período prolongado. Estas toxinas foram continuamente detectadas ao longo de 2 meses no soro de pacientes expostos durante tratamento de hemodiálise no HUCFF-UFRJ. Experimentalmente, após uma única injeção intraperitoneal, foi possível confirmar que MCYST-LR pode ser detectada no soro de ratos em diferentes momentos ao longo de 2 meses.

7- Este estudo contribuiu para se ressaltar a importância do monitoramento e controle de florações de cianobactérias em corpos d'água utilizados tanto para recreação quanto abastecimento da população, sendo esta questão de importância crucial para a saúde pública.

8 – Referências Bibliográficas

- AN, J.; CARMICHAEL, W.W. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. **Toxicon**, v. 32(12), p. 1495-1507, 1994.
- ANDERSON, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Meth. Enzymol.**, v.113, p.549-585, 1985.
- AZEVEDO S.M.F.O.; EVANS W.R.; CARMICHAEL, W.W.; NAMIKOSHI, M. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **J. Appl. Phycol.**, v.6, p. 261-265, 1994.
- AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W.; JOCHIMSEN, E.M.; RINEHART, K.L.; LAU, S.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru - Brazil. **Toxicology**, v.181, p. 441-446, 2002.
- BARFORD, D.; DAS, A.K.; EGLOFF, M-P. The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. **Annu.Rev.Biophys.Biomol. Struct.**, v.27, p.133-164, 1998.
- BATES, J.H.T.; ROSSI, A.; MILIC-EMILI, J. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiratory flow. **J. Appl. Physiol**, v. 58(6), p. 1840-1848, 1985.
- BOTHA, N.; VENTER, M.V.; DOWNING, T.G.; SHEPHARD, E.G.; GEHRINGER, M.M. The effect of intraperitoneally administered microcystin-LR on gastrointestinal tract of Balb/c mice. **Toxicon**, v.43, p.251-254, 2004.
- CARMICHAEL, W.W. The toxins of cyanobacteria. **Sci. Am.**, v. 270, p. 78-86,1994.
- CARMICHAEL, WW. The cyanotoxins. **Adv Bot Res**, v. 27, p. 211-212, 1997.
- CARMICHAEL, W.W.; AN J.S. Using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and a protein phosphatase inhibition assay (PPIA) for the detection of microcystins and nodularins. **Nat Toxins** v.7 (6), p. 377-385, 1999.
- CARMICHAEL, W.W.; AZEVEDO, S.M.F.O.; AN, J.; MOLICA, R.J.R.; JOCHIMSEN, E.M.; LAU, S.; RINEHART, K.L.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environ Health Perspect**, v.109, p. 663-668, 2001.
- CHANG, H.K.; MORTOLA, J.P. Fluid dynamics factors in tracheal pressure measurement. **J. Appl. Physiol**, v. 51(1), p. 218-225, 1981.

- CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water** – A guide to their public health consequences, monitoring and management. London: E & FN Spon. 416 pp. 1999.
- CHU, F.S.; HUANG, X.; WEI, R.D. Enzyme-linked immunosorbent assay for microcystins in blue-green algal blooms. **J Assoc Off Anal Chem** v.7, p. 451- 454, 1990.
- COSTA, S.M.; AZEVEDO, S.M.F.O. Implantação de um Banco de Culturas de Cianofíceas Tóxicas. **Iheringia - Série Botânica**, v.45, 5^o artigo, 1994.
- DAWSON, R.M. The toxicology of microcystins. **Toxicol**, v.36, p. 953-962, 1998.
- DING, W-X.; SHEN, H-M.; ZHU, H-G.; ONG, C-N. Studies on oxidative damage induced by cyanobacteria extract in primary cultured rat hepatocytes. **Environ Res, section A**, v.78, p. 12-18, 1998.
- DOMINGOS, P.; RUBIM, K.T.; MOLICA, R.J.R.; AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W. First report of microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from a northeast Brazilian drinking water supply. **Environ. Toxicol.**, v. 14, p. 31-35, 1999.
- FAFFE, D.S.; SEIDL, V.R.; CHAGAS, P.S.C.; MORAES, V.L.G.; CAPELOZZI, V.L.; ROCCO, P.R.M.; ZIN, W.A. Respiratory effects of lipopolysaccharide-induced inflammatory lung injury in mice. **Eur. Respir. J.** v.15, p. 85-91, 2000.
- FALCONER, I.R.; JACKSON, A.R.B.; LANGLEY, J.; RUNNEGAR M.T.C. Liver pathology in mice in poisoning by blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Aust. J. Biol. Sci.**, v.34, p. 179-187, 1981.
- FALCONER, I.R.; SMITH, J.V.; JACKSON, A.R.B.; JONES, A.; RUNNEGAR M.T.C. Oral toxicity of a bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* administered to mice over periods up to 1 year. **J. Toxicol. Environ. Health**, v.24, p. 291-305, 1988.
- FALCONER, I.R. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. **Environ Toxicol**, v.6, p. 177-184, 1991.
- FALCONER, I.R.; BURCH, M.D.; STEFFENSEN, D.A.; CHOICE, M.; COVERDALE, O.R. Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. **Environ Toxicol** v.9, p. 131-139, 1994.
- FALCONER, I.R.; HUMPAGE, A.R. Tumor promotion by cyanobacterial toxins. **Phycologia** v.35, p. 74-79, 1996.

- FERRÃO-FILHO, A.S.; AZEVEDO, S.M.F.O. Effects of unicellular and colonial forms of toxic *Microcystis aeruginosa* from laboratory cultures and natural populations on tropical cladocerans. **Aquat Ecol**, v.37, p. 23-35, 2002. (a)
- FERRÃO-FILHO, A.S.; SUZUKI, K.B.; AZEVEDO, S.M.F.O. Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community. **Aquat Toxicol**, v.59, p. 201-208, 2002.(b)
- FITZGEORGE, R.B.; CLARK, S.A.; KELVIN, C.W. Routes of intoxication. In: Codd GA, Jeffries TM, Kelvin CW & Potter E (Editors), **Detection Methods for Cyanobacterial (Blue-Green Algae) Toxins**. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1994.
- FRANCIS, G. Poisonous Australian lake. **Nature**, v. 18, p. 11-12, 1878.
- GEHRINGER, M.M. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. **FEBS Letters**, v.557, p. 1-8, 2004.
- GEHRINGER, M.M.; SHEPHARD, E.G.; DOWNING, T.G.; WIEGAND, C.; NEILAN, B.A. An investigation into the detoxification of microcystin-LR by glutathione pathway in Balb/c mice. **Int J Biochem Cell Biol**, v.36, p.931-941, 2004.
- GULLEDGE, B.M.; AGGEN, J.B.; HUANG, H.-B.; NAIRN, A.C.; CHAMBERLIN, A.R. The microcystins and nodularins: cyclic polypeptide inhibitors of PP1 and PP2A. **Curr Med Chem**, v.9, p. 1991-2003, 2002.
- GUNDERSEN, H.J.G.; BENDTSEN, T.F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MOLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J.R.; PAKKENBERG, B.; SORENSEN, F.B.; VESTERBY, A.; WEST, M.J. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.**, v. 96, p. 379-394, 1988.
- GUZMAN, R.E.; SOLTER, P.F. Characterization of sublethal microcystin-LR exposure in mice. **Vet. Pathol.**, v.39, p.17-26, 2002.
- GUZMAN, R.E.; SOLTER, P.F.; RUNNEGAR, M.T. Inhibition of nuclear protein phosphatase activity in mouse hepatocytes by the cyanobacterial toxin microcystin-LR. **Toxicon**, v.41, p. 773-781, 2003.
- HERMANSKY, S.J.; STOHS, S.J.; ELDEEN, Z.M.; ROCHE, V.F.; MEREISH, K.A. Evaluation of potential chemoprotectants against microcystin-LR hepatotoxicity in mice. **J. Appl. Toxicol.**, v. 11, p. 65-74, 1991.
- HERNÁNDEZ, M.; MACIA, M.; PADILLA, C.; DEL CAMPO, F.F. Modulation of human polymorphonuclear leukocyte adherence by cyanopeptide toxins. **Environ Res, section A**, v.84, p. 64-68, 2000.

- HOBSON, P.; BURCH, M.D.; PILOTTO, L.; RANMUTHUGALA, G.; ATTEWELL, R.; WEIGHTMAN, W. Skin contact with cyanobacteria (blue-green algae) and development of a recreational guideline. **Proceedings of the 6th International Conference on Toxic Cyanobacteria (ICTC)**, June 21-27, 2004, Bergen, Norway (resumo).
- HONKANEN, R.E.; GOLDEN, T. Regulators of serine/threonine protein phosphatases at the dawn of a clinical era? **Curr Med Chem**, v.9, p. 2055-2075, 2002.
- HOOSER, S.B., BEASLEY, V.R., BASGALL, E.J., CARMICHAEL, W.W., HASCHEK, W.M. Microcystin-LR-induced ultrastructural changes in rats. **Vet. Pathol.**, v. 27, p. 9-15, 1990.
- HUMPAGE, A.R.; FALCONER, I.R. Microcystin-LR and liver tumor promotion: Effects on cytokinesis, ploidy, and apoptosis in cultured hepatocytes. **Environ Toxicol**, v.14, p. 61-75, 1999.
- HUMPAGE, A.R.; HARDY, S.J.; MOORE, E.J.; FROSCIO, S.M.; FALCONER, I.R. Microcystins (cyanobacterial toxins) in drinking water enhance the growth of aberrant crypt foci in the mouse colon. **J Toxicol Environ Health**, v.61, p. 155-165, 2000.
- HUMM, H.J.; WICKS, S.R. **Introduction and guide to the marine blue-green algae**. John Wiley & Sons, New York, 1980, 194p.
- ITO, E.; KONDO, F.; TERAOKA, K.; HARADA, K.-I. Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR. **Toxicol**, v.35, p. 1453-1457, 1997.(a)
- ITO, E.; KONDO, F.; TERAOKA, K.; HARADA, K.-I. Hepatic necrosis in aged mice by oral administration of microcystin-LR. **Toxicol**, v.35 (2), p. 231-239, 1997.(b)
- ITO, E.; KONDO, F.; HARADA, K.-I. First report on the distribution of orally administered microcystin-LR in mouse tissue using an immunostaining method. **Toxicol**,v.38,p.37-48,2000.
- ITO, E.; KONDO, F.; HARADA, K.-I. Intratracheal administration of microcystin-LR and its distribution. **Toxicol**, v.39, p.265-271, 2001.
- ITO, E.; TAKAI, A.; KONDO, F.; MASUI, H.; IMANISHI, S.; HARADA, K.-I. Comparison of protein phosphatases inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compounds. **Toxicol**, v.40(7) p. 1017-1025, 2002.
- JOCHIMSEN, E.M.; CARMICHAEL, W.W.; AN, J.S.; CARDO, D.M.; COOKSON, S.T.; HOLMES, C.E.M; ANTUNES, M.B.C.; MELO-FILHO, D.A.; LYRA, T.M.; BARRETO, V.S.T.; AZEVEDO, S.M.F.O.; JARVIS, W.R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a haemodialysis center in Brazil. **N Engl J Med**, v.33, p. 873-878,1998.

- KLAASSEN, C.D. **Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons**. McGraw-Hill, Health Professions Division, 5th Edition, 1996, 1211p.
- KOCHI, T.; OKUBO, S.; ZIN, W.A.; MILIC-EMILI, J. Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats. **J. Appl. Physiol.**, v.64(1), p.441-450, 1988.
- KOCHI, T.; OKUBO, S.; ZIN, W.A.; MILIC-EMILI, J. Chest wall and respiratory system mechanics in cats: effects on flow and volume. **J. Appl. Physiol.**, v.64(6), p.2636-2646, 1988.
- KONDO, F.; IKAI, Y.; OKA, H.; OKUMURA, M.; ISHIKAWA, N.; HARADA, K.-I.; MATSUURA, K.; MURATA, H.; SUZUKI, M. Formation, characterization, and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. **Chem. Res. Toxicol.**, v.5(5), p. 591-596, 1992.
- LIN, J.-R.; CHU, F.S. Kinetics of distribution of microcystin-LR in serum and liver cytosol of mice: an immunochemical analysis. **J Agric Food Chem**, v. 42(4), p. 1035-1040, 1994.
- LORING, S.H.; ELLIOTT, E.A.; DRAZEN, J.M. Kinetic energy loss and convective acceleration in respiratory resistance measurements. **Lung**, v.156, p. 33-42, 1979.
- MAGALHÃES, V.F.; MARINHO, M.M.; DOMINGOS, P.; OLIVEIRA, A.C.P.; COSTA, S.M.; AZEVEDO, L.O.; AZEVEDO, S.M.F.O. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). **Toxicon**, v.42, p. 289-295, 2003.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 52, p. 711-760, 1983.
- MORENO, I.M.; MATE, A.; REPETTO, G.; VAZQUEZ, C.M.; CAMEAN, A.M. Influence of microcystin-LR on the activity of membrane enzymes in rat intestinal mucosa. **J Physiol Biochem**, v. 59(4), p. 293-299, 2003.
- MORTOLA, J.P.; NOWORAJ, J. two-sidearm tracheal cannula for respiratory airflow measurements in small animals. **J. Appl. Physiol.**, v.55(1), p.250-253, 1983.
- NAGASE, T.; LEI, M.; ROBATTO, F.M.; EIDELMAN, D.H.; LUDWIG, M.S. Tissue viscance during induced constriction in rabbit lung: morphological-physiological correlation. **J Appl Physiol**, v.73, p. 1900-1907, 1992.
- NAKANO, Y.; SHIRAI, M.; MORI, N.; NAKANO, M. Neutralization of microcystin shock in mice by tumor necrosis factor alpha antiserum. **Appl Environ Microbiol**, v.57, p. 327-330, 1991.

- NASEEM, S.M.; HINES, H.B.; CREASIA, D.A. Effect of toxins on arachidonic acid metabolism in rat cultured pulmonary alveolar macrophages. **Biochem Inter**, v.19, p.583-592, 1989.
- NEUMANN, U.; WECKESSER, J. Elimination of microcystin peptide toxins from water by reverse osmosis. **Environ Toxicol Water Qual**, v.13 (2), p. 143-148, 1998.
- NOBRE, A.C.L.; COÊLHO, G.R.; COUTINHO, M.C.M.; SILVA, M.M.M.; ANGELIM, E.V.; MENEZES, D.B.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S.A. The role of phospholipase A₂ and cyclooxygenase in renal toxicity induced by microcystin-LR. **Toxicon**, v. 39, p. 721-724, 2001.
- OTT, J.; CARMICHAEL, W.W. LC/MS method development for the analyses of hepatotoxic cyclic peptide microcystins in animal tissue. **Proceedings of the 5th International Conference on Toxic Cyanobacteria (ICTC)**, July 15-19, 2001, Noosa, Queensland, Brisbane, Australia (resumo).
- PFLUGMACHER, S.; WIEGAND, C.; OBEREMM, A.; BEATTIE, K.A.; KRAUSE, E.; CODD, G.A.; STEINBERG, C.E.W. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. **Biochim Biophys Acta**, v. 1425, p. 527-533, 1998.
- PFLUGMACHER, S. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. **Environ Toxicol**, v.17, p. 407-413, 2002.
- PIETSCH, C.; WIEGAND, C.; AME, M.V.; NICKLISCH, A.; WUNDERLIN, D.; PFLUGMACHER, S. The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. **Environ Toxicol**, v.16, p.535-542, 2001.
- ROBINSON, N.A.; MIURA, G.A.; MATSON, C.F.; DINTERMAN, R.E.; PACE, J.G. Characterization of chemically tritiated microcystin-LR and its distribution in mice. **Toxicon**, v.27, p. 1035-1042, 1989.
- ROBINSON, N.A.; PACE, J.G.; MATSON, C.F.; MIURA, G.A.; LAWRENCE, W.B. Tissue distribution, excretion and hepatic biotransformation of microcystin-LR in mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v.256, p. 176-182, 1991. (a)
- ROBINSON, N.A.; MATSON, C.F.; PACE, J.G. Association of microcystin-LR and its biotransformation product with a hepatic-cytosolic protein. **J. Biochem. Toxicology**, v.6, p. 171-180, 1991.(b)
- RUNNEGAR, M.T.C.; FALCONER, I.R.; BUCKLEY, T.; JACKSON, A.R.B. Lethal potency and tissue distribution of ¹²⁵I-labeled toxic peptides from the blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon**, v.24, p.506-509, 1986.

- RUNNEGAR, M.T.C.; ANDREWS, J.; GERDES, R.G.; FALCONER, I.R. Injury to hepatocytes induced by a peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Toxicol**, v.25(11), p.1235-1239, 1987.
- RUNNEGAR, M.T.; KONG, S.; BERNDT, N. Protein Phosphatase inhibition and in vivo hepatotoxicity of microcystins. **Am. J. Physiol.**, v.265 (Gastrointst. Liver Physiol., v.28), p. G224-G230, 1993.
- RUNNEGAR, M.T.; BERNDT, N.; KAPLOWITZ, N. Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.134, p.264-272, 1995.
- SAHIN, A.; TENCALLA, F.G.; DIETRICH, D. R.; MEZ, K.; NAEGELI, H. Enzymatic analysis of liver samples from rainbow trout for diagnosis of blue-green algae-induced toxicosis. **Am. J. Vet. Res.**, v.56(8), p. 1110-1115, 1995.
- SALDIVA, P.H.N.; ZIN, W.A.; SANTOS, R.L.B.; EIDELMAN, D.H.; MILIC-EMILI, J. Alveolar pressure measurement in open-chest rats. **J. Appl. Physiol.**, v. 72(1), p. 302-306, 1992.
- SANO, T.; NOHARA, K.; SHIRAISHI, F.; KAYA, K. A method for microdetermination of total microcystin content in waterblooms of cyanobacteria (blue-green algae). **Int J Environ Anal Chem**, v. 49, p.163-170, 1992.
- SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P. Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. **Nova Hedwigia**, v. 71, p. 359-385, 2000.
- SCHONTHAL, A.H. Role of serine/threonine protein phosphatase 2A in cancer. **Cancer Lett**, v. 170(1), p. 1-13, 2001.
- SHENOLIKAR, S.; INGEBRITSEN, T.S. Protein (serine and threonine) phosphatases. **Meth Enzymol**, v.107, p. 103-129, 1984.
- SILVEIRA, K.S.O.; BOECHEM, N.T.; NASCIMENTO, S.M.; MURAKAMI, Y.L.B.; BARBOZA, A.P.B.; MELO, P.A.; CASTRO, P.; MORAES, V.L.G.; ROCCO, P.R.M.; ZIN, W.A. Pulmonary mechanics and lung histology in acute lung injury induced by *Bothrops jararaca* venom. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 139, p.167-177, 2004.
- SLATKIN, D.N.; STONER, R.D.; ADAMS, W.H.; KYCIA, J.H.; SIEGELMAN, H.W. Atypical pulmonary thrombosis caused by a toxic cyanobacterial peptide. **Science**, v. 220, p. 1383-1385, 1983.
- SOARES, R.M.; MAGALHÃES, V.F.; AZEVEDO, S.M.F.O. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. **Aquat Toxicol**, v. 70(1), p. 1-10, 2004.

- SOLTER, P.F.; WOLLENBERG, G.K.; HUANG, X.; CHU, F.S.; RUNNEGAR, M.T. Prolonged sublethal exposure to the protein phosphatase inhibitor microcystin-LR results in multiple dose-dependent hepatotoxic effects. **Toxicol Sci**, v.44, p.87-96, 1998.
- TEIXEIRA, M.G.; COSTA, M.C.; CARVALHO, V.L.P.; PEREIRA, M.S.; HAGE, E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica dam, Bahia, Brazil. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v.27, p. 244-253, 1993.
- TUNDISI, J.G.; TUNDISI, T.M. Eutrofication of lakes and reservoirs: a comparative analysis, case studies, perspectives. In: **Algae and Environment - a general approach**. Eds.: Cordeiro-Marino, M. *et al.*, Sociedade Brasileira de Ficologia, p. 1-33, 1992.
- TURNER, P.C.; GAMMIE, A.J.; HOLLINRAKE, K.; CODD, G.A. Pneumonia associated with cyanobacteria. **Br Med J** v.300, p.1400-1414, 1990.
- UENO, Y.; NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; HASEGAWA, A.; WATANABE, M.F.; PARK, H.D.; CHEN, G.C.; CHEN, G.; 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**, v.17(6), p.1317-21, 1996.
- VASCONCELOS, V. M. Uptake and depuration of the heptapeptide toxin microcystin-LR in *Mitilus galloprovincialis*. **Aquat Toxicol**, v.32, p. 227-237, 1995.
- WATANABE, M.F.; HARADA, K.-I.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H. **Toxic Microcystis**. CRC Press, Inc., 1996, 261p.
- WAGNER, J.G.; ROTH, R.A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacol Rev**, v.52(3), p.349-374, 2000.
- WEIBEL, E.R. Morphometry: stereological theory and practical methods. In: Gil J (Editor), **Models of Lung Disease - Microscopy and Structural Methods**. Marcel Dekker, New York, 1990.
- WICKSTROM, M., HASCHEK, W., HENNINGSEN, G., MILLER, L.A., WYMAN, J., BEASLEY, V. Sequential ultrastructural and biochemical changes induced by microcystin-LR in isolated perfused rat livers. **Nat. Toxins**, v.4, p. 195-205, 1996.
- WIEGAND, C.; PEUTHERT, A.; PFLUGMACHER, S.; CARMELI, S. Effects of Microcin SF608 and microcystin-LR, two cyanobacterial compounds produced by *Microcystis sp.*, on aquatic organisms. **Environ Toxicol**, v.17, p.400-406, 2002.

YAN, C.C.; HUXTABLE, R.J. Fluorimetric determination of monobromobimane and *o*-phthalaldehyde adducts of γ -glutamylcysteine and glutathione: application to assay of γ -glutamylcysteine synthetase activity and glutathione concentration in liver. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v.672, p.217-224, 1995.

YOO, R.S.; CARMICHAEL, W.W.; HOEHN, R.C.; HRUDEY, S.E. **Cyanobacterial (blue-green algae) toxins: a resource guide**. AWWA Research Foundation and American Water Works Association., 1995, 229 pp.

9 – Anexo – Artigo publicado

Brazilian Journal of Medical and Biological Research, August 2004,
Volume 37(8): 1225-1229.

Toxicity of a cyanobacterial extract containing microcystins to mouse lungs

M.R. Picanço, R.M. Soares, V.R. Cagido, S.M.F.O. Azevedo, P.R.M. Rocco, W.A. Zin