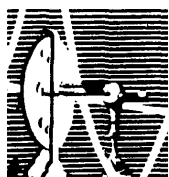


Luana Jotha Mattos

***EFEITOS SUBLETAIS DE MICROCISTINA (CIANOTOXINA)
SOBRE ASPECTOS BIOQUÍMICOS, ESTEREOLÓGICOS E
FISIOLÓGICOS DE MODELOS MURINOS***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOFÍSICA)



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2011**

Luana Jotha Mattos

***EFEITOS SUBLETAIS DE MICROCISTINA (CIANOTOXINA)
SOBRE ASPECTOS BIOQUÍMICOS, ESTEREOLÓGICOS E
FISIOLÓGICOS DE MODELOS MURINOS***

Dissertação de mestrado submetida à
Universidade Federal do Rio de Janeiro visando a
obtenção do grau de mestre em Ciências Biológicas
(Biofísica)

**Orientadoras: Dra. Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo e
Dra. Raquel Moraes Soares
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2011**

Mattos, Luana Jotha

Efeitos subletais de microcistina (cianotoxina) sobre aspectos bioquímicos, estereológicos e fisiológicos de modelos murinos / Luana Jotha Mattos. Rio de Janeiro: UFRJ/ IBCCF, 2011.

xvi, 109 f.: il.

Orientador: Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo e Raquel Moraes Soares

Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho / Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2011.

Referências Bibliográficas: f. 90-108.

1. cianotoxina 2. microcistina 3. subletal 4. estereologia 5. estresse oxidativo 6. inflamação 7. metabolismo 8. função renal. I. Azevedo, Sandra Maria Feliciano de Oliveira & Soares, Raquel Moraes. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). III. Título

Luana Jotha Mattos

EFEITOS SUBLETAIS DE MICROCISTINA (CIANOTOXINA)
SOBRE ASPECTOS BIOQUÍMICOS, ESTEREOLÓGICOS E
FISIOLÓGICOS DE MODELOS MURINOS

Rio de Janeiro, 22 de agosto de 2011.

Aprovada por:

PROFa. PATRÍCIA R. M. ROCCO – IBCCF⁰ / UFRJ

PROF. SAMUEL S. VALENÇA – ICB / UFRJ

PROFa. VALÉRIA F. MAGALHÃES – IBCCF⁰ / UFRJ

PROFa. SANDRA M.F.O. AZEVEDO (ORIENTADORA) – IBCCF⁰ /UFRJ

PROFa. RAQUEL MORAES SOARES (ORIENTADORA) – XERÉM /UFRJ

PROFa. JENNIFER LOWE (REVISORA E SUPLENTE INTERNA) – IBCCF⁰ /UFRJ

PROF. ANTONIO AZEREDO (SUPLENTE EXTERNO) – IESC /UFRJ

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, em colaboração com o Laboratório de Físico-Química Biológica Aida Hassón Voloch e Laboratório Fisiologia Celular e Molecular, presentes no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Da mesma forma, houve colaboração com o Laboratório Compartilhado (LABCOM) do Instituto de Ciências Biomédicas. Os referidos laboratórios estão presentes na Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Durante a realização do presente trabalho, houve vigência de auxílios concedidos pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

"Toda a nossa ciência, comparada à realidade,
é primitiva e inocente."

Albert Einstein

"Não sei como pareço aos olhos do mundo,
mas eu mesmo vejo-me
como um pobre garoto que brincava na praia
e se divertia em encontrar uma pedrinha mais lisa
uma vez por outra, ou uma concha mais bonita
do que de costume, enquanto
o grande oceano da verdade se encontrava
totalmente inexplorado diante de mim."

Isaac Newton

"Faz tempo que a gente cultiva
A mais linda roseira que há
Mas eis que chega a roda viva
E carrega a roseira prá lá..."

Chico Buarque

DEDICATÓRIA

A meu pai, meu “porto-seguro”,
por toda a orientação e apoio
durante a minha vida acadêmica.

A todos que, de alguma forma, aturaram
meu mau-humor, nervosismo e insegurança
nesses dois anos de mestrado.

AGRADECIMENTOS

Não construímos nada na vida sozinhos. Na ciência brasileira, essa frase se aplica perfeitamente. Essa dissertação só pôde ser realizada com a colaboração direta e indireta de diversas pessoas. Se eu for listar todas as pessoas que me ajudaram nessa etapa, seriam mais 100 páginas só de nomes. Então, de forma geral, agradeço.

Aos membros do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias. Passei quase cinco anos da minha vida com essas pessoas maravilhosas. Momentos bons, momentos ruins. Crescemos juntos. Aprendemos e progredimos juntos. A todos que me ajudaram com uma dúvida, com conselho, um carinho, uma referência, uma ajuda no trabalho de bancada... Não teria conseguido nada sem vocês!

Às minhas orientadoras, Professoras Sandra Azevedo e Raquel Soares. Cito uma frase de Piaget: *“O professor não ensina, mas arranja modos de a própria criança descobrir”*. Obrigada por me possibilitar investigar, questionar, instigar, experimentar, observar, discutir e concluir com vocês.

Aos meus colaboradores do grupo do Professor Samuel Valença. Todos sempre foram muito solícitos. Agradeço em especial ao próprio professor e ao Alan, que me auxiliaram nas análises de estresse oxidativo e à Karla, que foi fundamental nas análises estereológicas.

Aos Professores colaboradores Jackson Menezes e Jennifer Lowe, que foram muito importantes nos experimentos com ratos. Sempre foram muito solícitos e dispostos a ajudar e tirar dúvidas.

Não posso deixar de agradecer à Andreza Abreu, que quebrou vários galhos meus, desde a entrevista de seleção de mestrado até à defesa. Da mesma forma, agradeço à compreensão e torcida do Sr. José Maria (em memória). E, claro, agradeço a ajuda muito importante de Cadu, Helaine e todos do *Niterói*.

A algumas das pessoas importantes que se fizeram presentes no mestrado: Renata, Veronika, Amanda, Cléber, Thiago, João. E, no fim da dissertação, Dário, que me ajudou, orientou e consolou muito. Com certeza muitos nomes não constam aqui, mas não deixam de ser importantes.

Ao querido amigo e eterno professor, Fred. Começamos e terminamos o mestrado quase juntos. Você sempre será muito especial pra mim.

À minha irmã Milena. Pode não parecer mas, mesmo distante e assoberbada, foi muito importante para mim. Conselhos, toques, lembranças de eventos familiares, apoio. Com ela, nesse período, tive a certeza que não é o tempo que se passa com a pessoa que é importante e sim, o quanto ela se faz presente. Agradeço também ao meu cunhado Hugo, pelo carinho e conselhos muito importantes em diversos momentos que me senti meio sem norte.

À minha irmã Tatiana e cunhado Renan. Distantes, mas sei que presentes e se preocupando e querendo meu bem.

À minha irmãzinha linda Sofia e meus sobrinhos Caio e Alan. Pode ser o problema mais complexo, a preocupação mais angustiante, frente a eles, ao sorriso e carinho dessas crianças comigo, tudo se esvai.

À minha mãe pelo apoio, carinho, acolhimento. Por amar o Petit assim como eu amo. Por sempre tentar me ajudar. Incondicionalmente, minha mãe.

Ao meu pai, meu porto-seguro. Por mais que tudo esteja nebuloso em minha frente, ele tem a capacidade de me mostrar a luz da solução e me acalmar. Não posso mensurar em palavras o quanto meu pai e minha mãe são fundamentais na minha vida. Acho que ninguém consegue. Mas humildemente, obrigada, queridos pais.

Claro, à Isabel, que me deu a querida Sofia. Mais que isso, sempre foi muito carinhosa e preocupada. Me ajudou bastante em momentos difíceis do mestrado. Como diz meu pai, é “mãe de todo mundo”.

À minha grande e barulhenta família. Desculpa por todos os eventos que deixei de ir.

A Deus, por me proporcionar tudo isso e todas essas pessoas especiais na minha vida. Obrigada a todos que foram importantes e aguentaram meu mau humor, medos, inseguranças, felicidades, êxitos, ausências. Não seria nada e não chegaria a lugar algum sem as grandes e pequenas ajudas de cada um. Obrigada!

RESUMO

Microcistina é a classe de cianotoxina com mais relatos de intoxicação humana, porém seus efeitos em dose subletal são pouco estudados. Com isso, o objetivo desse trabalho foi contribuir para o conhecimento sobre os efeitos da intoxicação subletal por microcistina-LR (MCYST-LR) em mamíferos, investigando alterações bioquímicas e fisiológicas, acúmulo e detoxificação. Assim como, descrever danos teciduais e funcionais nos animais testados. Para tanto, dois modelos experimentais foram utilizados: camundongos e ratos. Os primeiros foram injetados com dose única subletal de 45 µg/Kg de peso corpóreo (pc) de MCYST-LR via intraperitoneal (ip) e analisados em 2, 8, 24, 48 ou 96 h. Os ratos foram injetados com dose única e subletal de 55 µg/Kg pc de MCYST-LR i.p. e analisados em 24 h. Em todos os experimentos, os animais controle foram injetados com solução salina.

Em camundongos, pôde-se detectar estresse oxidativo no fígado, principalmente em 8 h, evidenciado pela alteração das enzimas catalase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase e aumento da peroxidação lipídica. A inibição da atividade das proteínas fosfatases 1 e 2A ocorreu em todo o período experimental. As análises de óxido nítrico e mieloperoxidase não se apresentaram como bons indicadores da inflamação. Ainda, a atividade da glutathione S-transferase se mostrou aumentada nos primeiros tempos amostrais, indicando detoxificação. Os marcadores de dano hepático foram detectados em grandes concentrações no soro em todo o período amostral. A análise histológica e estereológica indicam dois momentos da intoxicação hepática: um inicial, com aumento da esteatose, e um tardio, com aumento da inflamação e binucleação de hepatócitos. A necrose e aumento do calibre dos vasos foram verificados por todo o período experimental. O volume e número de hepatócitos por área também diminuíram, mas pôde-se analisar a recuperação desses parâmetros ao longo do tempo. A MCYST se acumulou nos hepatócitos, podendo ser detectada até o último tempo de análise.

No fígado de ratos, o mesmo padrão histológico pôde ser observado em 24 h. Um possível estresse oxidativo foi verificado no fígado e no rim. Além disso, o índice renal de ratos foi aumentado, indicando um possível edema. Os ratos intoxicados ingeriram menos ração e produziram menos fezes, assim como beberam mais água e produziram mais urina. Da mesma forma, o ritmo de filtração glomerular apresentou aumento nos animais intoxicados. Houve maior eliminação de MCYST na forma livre pela urina, mas em 24 h apenas 14% da dose administrada havia sido eliminada. No entanto, a fração de excreção da mesma foi de $137,9 \pm 9,1 \%$, indicando secreção da mesma para a urina.

Os resultados obtidos confirmam a persistência da MCYST no organismo de camundongos após uma única exposição subletal e do dano causado por ela no fígado. Paralelamente, há alterações metabólicas e funcionais para o rim de ratos. Com isso, confirma-se a necessidade de maior preocupação em relação a exposições subletais.

ABSTRACT

Microcystins (MCYST) are the cyanotoxins with more reports of human poisoning, but the sublethal dose effects of these toxins are poorly studied. Therefore, the aim of this study was to contribute to knowledge about the effects of intoxication by MCYST-LR (sublethal dose) in mammals, investigating biochemical and physiological changes, processes of accumulation and detoxification, as well as investigate the functional and tissue damage in the exposed animals. We used mice and rats as experimental models. The mice were exposed to MCYST-LR i.p. with single sublethal dose of 45 µg MCYST-LR / kg bw. Their organs were collected at 2, 8, 24, 48 or 96 h. The rats were injected (IP) with single sublethal dose of 55 µg MCYST-LR / kg BW and their organs were collected after 24 h. In all experiments, control animals received saline solution. In mice, we could detect oxidative damage in the liver, particularly in 8 h after exposure, justified by the increased activity of SOD (superoxide dismutase), decreased activity of CAT (catalase) and GPx (glutathione peroxidase) and increased lipid peroxidation. Inhibition of protein phosphatase (PP) occurred during the experimental period. Analysis of nitric oxide and myeloperoxidase were not considered as good biomarkers of inflammation. The activity of GST (glutathione S-transferase) increased at early sample days, indicating detoxification. The biomarkers of liver injury were detected in high concentrations in the serum of animals exposed during the sample period. Stereological analysis indicated an initial moment of intoxication, justified by the increase of steatosis, and a later moment of intoxication, justified by the increase of inflammation and hepatocytes binucleation. Necrosis and increase in blood vessel diameter were observed during the experimental period. The volume and number of hepatocytes per unit area also decreased, but it was possible to verify the recovery of these parameters over time of exposure. The MCYST has accumulated in hepatocytes and can be detected until the last analysis time. In the liver of rats, the same histopathological pattern was observed in 24 h. A possible oxidative damage was found in liver and kidney justified by the change of CAT activity and the relationship GSH / GSSG. The kidney index in rat was increased at 24 h, indicating a possible edema. It was observed that the rats intoxicated decreased food intake and feces production, and increased of drink ingestion and elimination of urine. Similarly, the glomerular filtration rate increases in animals exposed to toxin. There was a greater elimination of MCYST in the free form in the urine in 24 h, even though only 14% of the administered dose had been eliminated. However, the fractional excretion of the same was $137.9 \pm 9.1\%$, indicating secretion process. The results of this study confirm the presence of MCYST-LR in mice exposed to a single dose of MCYST. In addition, there were metabolic and functional alterations in the kidneys of rats exposed. These results confirm the necessity for more studies despite of sublethal exposures to MCYST.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADDA – 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienóico
ALT – alanina aminotransferase
AST – aspartato transaminase
ATP – adenosina trifosfato
DL₅₀ – dose letal para 50% dos animais testados
Ca²⁺ – íon cálcio
CAT – catalase
CEUA – Comissão de Ética com Uso de Animais
CYN – cilindrospermopsina
ERO – espécies reativas de oxigênio
FR – fração de excreção
FU – fluxo urinário
GPx – glutathione peroxidase
GR – glutathione reductase
GSH – glutathione reduzida
GSSG – glutathione oxidada
HClO – ácido hipocloroso
HE – hematoxilina e eosina
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
IL – interleucina
i.p. – intraperitoneal
JNK – proteína quinase c-Jun N-terminal
MCYST – microcistina
MCYST-SG – microcistina conjugada a uma glutathione
MCYST-LR – microcistina-LR
MDA – malondialdeído
Mdha – N-metildehidroalanina
MDR – proteínas de multiresistência a drogas
MPO – mieloperoxidase
NaCl – cloreto de sódio
NADP - nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NOD – nodularina
O₂ – oxigênio molecular
OATP – polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos
OMS – Organização Mundial da Saúde
pc – peso corpóreo
Pi – fósforo inorgânico
PP – proteínas fosfatases
PRM – multi proteínas associadas à resistência
RFG – ritmo de filtração glomerular
SOD – superóxido dismutase
TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TDI – ingestão diária tolerável
TNF-α - fator de necrose tumoral alfa
Vv – densidade de volume

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Florações de cianobactérias	19
Figura 2. Esquema da estrutura química da microcistina-LR	23
Figura 3. Desenho esquemático do processo de detoxicação da microcistina	26
Figura 4. Representação esquemática das vias de entrada, toxicidade, efeitos, biotransformação e detoxicação de MCYST em células animais	30
Figura 5. Representação esquemática da inter-relação de causa e efeito entre a intoxicação por microcistina, inibição de proteína fosfatase, formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), inflamação e morte celular	31
Figura 6. Desenho esquemático do efeito de microcistinas sobre hepatócitos e capilares sinusóides	32
Figura 7. Concentração de MCYST livre (ng de MCYST/g de tecido) no fígado e soro de camundongos injetados via i.p. com 45 µg de MCYST-LR/kg pc	54
Figura 8. Peroxidação lipídica mensurada pelo malondialdeído formado (nmol de MDA/mg de proteína) no fígado de camundongos injetados via i.p. com solução salina (controle) ou 45 µg de MCYST-LR/kg pc amostrados em 2, 8, 24, 48 ou 96 horas após a exposição	55
Figura 9. Atividade de enzimas do complexo anti-oxidante (superóxido dismutase, catalase e GPx) no fígado de camundongos injetados via i.p. com solução salina (controle) ou 45 µg de MCYST-LR/kg pc amostrados em 2, 8, 24, 48 ou 96 horas após a exposição	56
Figura 10. Atividade de enzima glutathione S-transferase (µmol de GS-DNB/min/mg de proteína) no fígado de camundongos injetados via i.p. com solução salina (controle) ou 45 µg de MCYST-LR/kg pc amostrados em 2, 8, 24, 48 ou 96 horas após a exposição	57
Figura 11. Concentração de nitrito (µmol/mg de proteína) no fígado de camundongos injetados via i.p. com solução salina (controle) ou 45 µg de MCYST-LR/kg pc amostrados em 2, 8, 24, 48 ou 96 horas após a exposição	58
Figura 12. Atividade da mieloperoxidase (mU de atividade da MPO/mg de proteína) no fígado de camundongos injetados via i.p. com solução salina (controle) ou 45 µg de MCYST-LR/kg pc amostrados em 2, 8, 24, 48 ou 96 horas após a exposição	59
Figura 13. Níveis séricos de marcadores de dano hepático em camundongos injetados via i.p. com solução salina (controle) ou 45 µg de MCYST-LR/kg pc amostrados em 2, 8, 24, 48 ou 96 horas após a exposição	61

Figura 14. Atividade das proteínas fosfatases 1 e 2A (mUde PP/mg de proteína) no fígado de camundongos injetados com solução salina (controle) ou 45 µg de MCYST-LR/kg pc amostrados 2, 8, 24, 48 ou 96 horas após a exposição	62
Figura 15. Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado (1000x) coradas por hematoxilina-eosina	63
Figura 16. Estereologia do fígado de camundongos injetados via i.p. com solução salina (controle) ou 45µg de MCYST-LR/kg pc, amostrados em 2, 8, 24, 48 ou 96 horas após a exposição	65
Figura 17. Fotomicrografias do fígado (1000x) de ratos Wistar coradas por hematoxilina-eosina	67
Figura 18. Atividade da catalase (U de atividade de catalase/mg de proteína) em órgãos de ratos controle e teste	69
Figura 19. Concentração de GSH, GSSH e relação entre os dois peptídeos no fígado de ratos injetados por via i.p. com solução salina (controle) ou 55 µg de MCYST-LR/kg pc e amostrados após 24 horas (MCYST)	70
Figura 20. Concentração de GSH, GSSH e relação entre os dois peptídeos no rim de ratos injetados por via i.p. com solução salina (controle) ou 55 µg de MCYST-LR/kg pc e amostrados após 24 horas (MCYST)	71
Figura 21. Índice renal (massa renal/massa corpórea) de ratos injetados via i.p. com solução salina (controle) ou com 55 µg de MCYST-LR/Kg de pc e amostrados após 24 horas (MCYST)	73
Figura 22. Ritmo de filtração Glomerular (RFG) de ratos injetados via i.p. com solução salina (controle) ou com 55 µg de MCYST-LR/Kg de pc e amostrados após 24 horas (MCYST)	75

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Experimentos e análises realizadas	37
Tabela 2. Estereologia do fígado de camundongos controle, injetados com MCYST-LR e analisados em diferentes tempos amostrais	65
Tabela 3. Estereologia do fígado de animais controle e injetados com MCYST	68
Tabela 4. Consumo de água e ração por ratos controle e injetados com MCYST	72
Tabela 5. Peso corpóreo e dos órgãos analisados	73
Tabela 6. Produção de excretas	73
Tabela 7. Concentração de MCYST no soro e tecidos	74
Tabela 8. Concentração de MCYST nas excretas e detoxificação em 24 horas	75
Tabela 9. Clearance e Fração de Excreção de MCYST	75

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Considerações gerais: cianobactérias e cianotoxinas	17
1.2. Hepatotoxinas de cianobactérias	21
1.3. Microcistinas	23
1.3.1. Estrutura química de microcistinas	23
1.3.2. Transporte celular de microcistinas	25
1.3.3. Detoxificação	26
1.3.4. Biodistribuição de microcistinas	28
1.3.5. Mecanismos de ação celulares de microcistinas	29
1.3.6. Ação tóxica sistêmica de microcistina	32
1.4. Justificativa	34
2. OBJETIVOS	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. Procedimentos experimentais	37
3.2. Procedimentos amostrais	40
3.3. Procedimentos analíticos	41
3.4. Análise estatística	52
4. RESULTADOS	53
5. DISCUSSÃO	76
6. CONCLUSÕES	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

1 – INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais: cianobactérias e cianotoxinas

Cianobactérias são micro-organismos procariontes e fotossintetizantes, de apresentação unicelular, colonial ou filamentosa. Estruturalmente semelhante às bactérias, com características de microalgas, são classificadas no Domínio *Bacteria*. Também denominadas de cianofíceas, algas azuis ou cianoprocariotos acredita-se que estes organismos tiveram origem no período Arqueano (Pré-Cambriano), há cerca de 3,5 bilhões de anos, e que tenham sido responsáveis pelo aparecimento e aumento na concentração de O₂ atmosférico (ALBERT *et al.*, 2004; OHNO, 1997; SALTZMAN *et al.*, 2011).

Devido a sua grande diversidade genotípica e fenotípica, as cianobactérias, atualmente estão amplamente distribuídas no globo, sendo encontradas em ambientes aquáticos, terrestres e em simbiose com plantas e animais (AZEVEDO, 1998)

Nos ambientes aquáticos, alguns fatores favorecem o crescimento das cianobactérias gerando uma floração ou *bloom*. Fatores esses como: temperatura adequada e oferta de luz e nutrientes. Pode-se citar, principalmente, como fator essencial a formação de uma floração, as altas concentrações de nitrogênio e fósforo, processo denominado como eutrofização (YOO *et al.*, 1995). O intenso crescimento destes organismos pode formar até espessas camadas de células na água, como demonstrado na Figura 1.

As florações de cianobactérias podem causar um grande impacto na biota local, ao diminuir a biodiversidade fitoplanctônica. Ademais, cianobactérias são potencialmente produtoras de toxinas (cianotoxinas) e essas podem causar danos diretos a mamíferos e também a biota aquática (CARMICHAEL & AN, 1997). Uma floração pode apresentar mais de uma espécie de cianobactéria, produzindo mais de uma classe ou variantes de cianotoxinas, o que aumenta o impacto no ecossistema. Da mesma forma, em uma mesma espécie de cianobactéria, pode-se encontrar cepas tóxicas e não

tóxicas, provenientes da grande variabilidade genética do grupo (CHORUS & BARTRAM, 1999; BURKHOLDER & GLIBERT 2006, 2009).

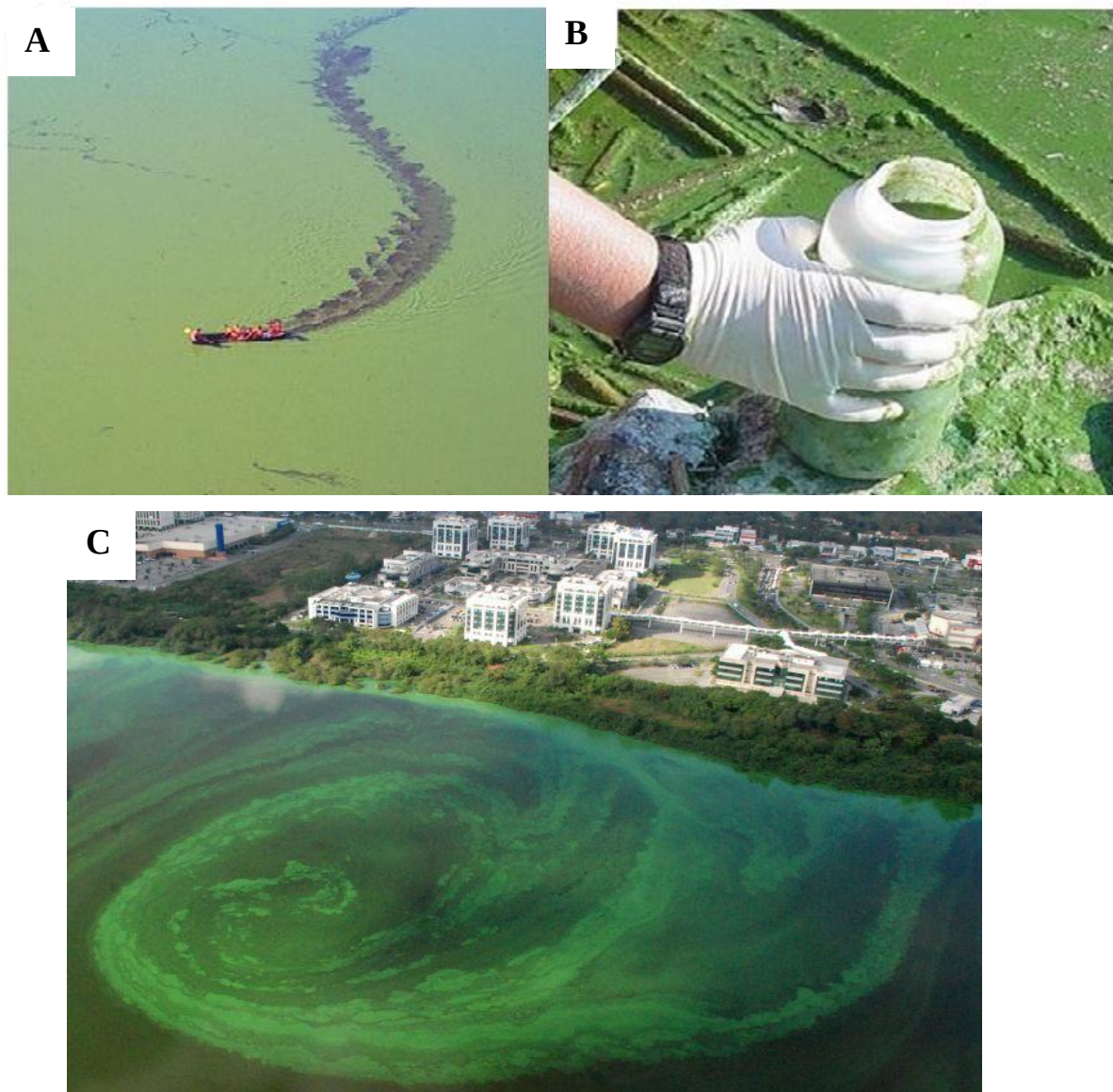


Figura 1. Florações de cianobactérias. Foto A: Lagoa de Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brasil. Foto do jornal *O Globo*, em 13 de agosto de 2001. Observe o barco na parte inferior da foto A abrindo um caminho em meio da densa camada de células. Foto B: Reservatório Copco (Rio Klamath), Sacramento, Califórnia, EUA. Foto tirada por Karuk Tribe, em matéria publicada por Matt Weiser no jornal *The Sacramento Bee*, em 15 de agosto de 2006. Foto C: Lagoa de Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brasil. Foto do Jornal *O Globo* em 27 de junho de 2010.

São conhecidos diversos fatores que influenciam na produção de cianotoxinas, tais como: condições ambientais (WATANABE & OISHI 1985; LONG *et al.*, 2001; WIEDNER *et al.*, 2003); densidade populacional de cianobactérias (RAPALA *et al.*, 1997); e interações ecológicas (de FIGUEIREDO *et al.*, 2004).

Contudo, as funções fisiológicas e ecológicas das cianotoxinas ainda são desconhecidas. Há algumas hipóteses, dentre as quais, aquelas que defendem que as toxinas desempenham um papel na regulação gênica, sinalização química, defesa contra fotoautotróficos concorrentes, defesa contra herbivoria (sabor pouco palatável para o zooplâncton) e favorecimento da sobrevivência de cianobactérias em ambientes com nutrientes limitados (CARMICHAEL, 1992; HENNING *et al.*, 2001; de FIGUEIREDO *et al.*, 2004).

Cianotoxinas são consideradas endotoxinas pois, de forma geral, são pouco excretadas pela célula íntegra. Suas classificações foram feitas de acordo com o órgão-alvo em vertebrados: dermatotoxinas, neurotoxinas e hepatotoxinas (CODD 1984; PILOTTO *et al.*, 2004).

De particular interesse, são as hepatotoxinas por serem as mais freqüentemente encontradas em florações. Nesta classe, estão incluídas as microcistinas (MCYST), nodularinas (NOD) e cilindrospermopsinas (CYN) (CODD 1984; CARMICHAEL, 1994). Dentre essas, as cianotoxinas mais comumente encontradas são as microcistinas (MCYST) e, por esse motivo, são as mais envolvidas em casos de intoxicação animal e humana (CARMICHAEL, 1994).

Corpos d'água continentais geram a maior preocupação em relação a cianobactérias tóxicas, uma vez que os mesmos são utilizados como fonte de água para consumo humano e recreação. Florações tóxicas são comumente encontradas nesses habitats e essas podem ter o potencial para produção de altas concentrações de toxinas, podendo afetar todo o ecossistema e representar um risco à saúde pública (STEWART *et al.*, 2006a, 2006b).

Além disso, a grande adaptabilidade das cianobactérias e crescente eutrofização dos ambientes aquáticos - decorrente da poluição e uso inadequado dos recursos hídricos - são fatores que facilitam a distribuição geográfica global das cianobactérias (YOO *et al.*, 1995 ; CHORUS &

BARTRAM, 1999 ; CODD *et al.*, 2005). Com isso, as cianotoxinas tornam-se uma preocupação crescente e universal.

1.2. Hepatotoxinas de cianobactérias

As hepatotoxinas são um grupo de moléculas que têm a capacidade de causar lesão hepática aguda e promover o desenvolvimento de tumores após exposição crônica (WHO 1998, 2003). Há ainda indícios de que as microcistinas sejam iniciadoras de tumor (LI *et al.*, 2009; SVIRCEV, *et al.*, 2010). A toxicidade aguda resultante da exposição às hepatotoxinas foi amplamente estudada em ensaios *in vivo* e *in vitro*, porém as exposições subletal, crônica e subcrônica ainda requerem maiores investigações.

Há inúmeros relatos na literatura que documentam a mortalidade dos animais após exposição às hepatotoxinas através de água contaminada (JACKSON *et al.*, 1984; CARMICHAEL, 1992, THOMAS *et al.*, 1998; DUY *et al.*, 2000). No entanto, relatos de intoxicação humana são raros (CARMICHAEL *et al.*, 2001 ; SOARES *et al.*, 2006).

O único caso confirmado de fatalidade humana após exposição às hepatotoxinas ocorreu em fevereiro de 1996, em uma clínica de hemodiálise em Caruaru, Pernambuco, Brasil, onde 131 pacientes receberam tratamento hemodialítico com água de abastecimento inadequadamente tratada, oriunda de manacial densamente povoado com cianobactérias tóxicas. Após a hemodiálise, 116 pacientes apresentaram distúrbios gastrointestinais e confusões neurológicas. Dos 131 pacientes expostos, 76 morreram de insuficiência hepática (CARMICHAEL *et al.*, 2001). As análises da água de abastecimento, filtros e / ou de amostras teciduais dos pacientes indicaram altas concentrações de microcistinas (LR, YR e AR) (JOCHIMSEN *et al.*, 1998; POURIA *et al.*, 1998; CARMICHAEL *et al.*, 2001; AZEVEDO *et al.*, 2002; YUAN *et al.*, 2006). Cilindrospermopsina também pôde ser detectada no carvão ativado da clínica de hemodiálise (AZEVEDO *et al.*, 2002).

Para orientar as práticas de tratamento de água em relação à contaminação com microcistinas a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda limites (ainda provisórios) em água potável para consumo humano

(WHO 1998, 2003). Baseado em estudos de toxicidade oral da MCYST-LR, a ingestão total diária tolerável (TDI) foi estabelecida no valor de 0,04 µg/kg de peso corpóreo por dia. Esse valor é calculado baseando-se em modelos matemáticos, considerando-se muitos fatores de incerteza devido aos poucos estudos toxicológicos da literatura.

A partir desse valor, um limite máximo aceitável de 1 µg/L de microcistinas em água para consumo humano oral foi calculado e adotado, baseando-se no princípio de que uma pessoa de 60 kg bebe aproximadamente 2 litros de água por dia. Contudo, esse limite é variável entre países.

Devido à falta mais significativa de dados na literatura sobre a toxicidade oral para as outras hepatotoxinas (CYN e NOD) a OMS não pôde recomendar valores limites para essas moléculas. Humpage & Falconner (2003), realizaram um estudo toxicológico em camundongos e sugerem um limite de 1µg/L para a CYN.

As hepatotoxinas de cianobactérias se apresentam em duas classes estruturais distintas, cujos mecanismos de ação também são diversos. As microcistinas (MCYST) e nodularinas (NOD) são oligopeptídeos e as cilindrospermopsinas (CYN) são alcalóides guanidínicos (WHO 1998, 2003, SHAW *et al.*, 2000 ; ZURAWELL *et al.*, 2005 ; VAN APELDOORN *et al.*, 2007).

A toxicidade variável dessas moléculas depende da via de exposição: ingestão oral através de água contaminada ou alimentos, inalação, contato dérmico ou endovenosa (WHO 1998, 2003; DIETRICH *et al.*, 2008).

De modo geral, todas as hepatotoxinas apresentam grande estabilidade e resistência na água à degradação por fatores abióticos. A estrutura química das MCYST, por exemplo, pode resistir a grandes variações de temperatura e pH. Watanabe *et al.*, (1996) estimaram a meia-vida dessa toxina na água, com pH 1 e temperatura de 40°C, como sendo de aproximadamente três semanas. Assim, uma vez dissolvidas, a remoção dessas moléculas pode ser laboriosa e cara, necessitando de um tratamento baseado muitas vezes com o uso de carvão ativado (WESTRICK *et al.*, 2010).

1.3. Microcistinas

Microcistinas (MCYST), originalmente isoladas no início da década de 1980 a partir da espécie *Microcystis aeruginosa*, são heptapeptídeos cíclicos produzidos por síntese não ribossomal (BOTES *et al.*, 1984, 1985). Apesar de *Microcystis* ser o gênero de cianobactéria mais comumente identificado como produtor de MCYST, outros também já foram descritos como potencialmente produtores: *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria* e *Nostoc* (BOTES *et al.*, 1982; CARMICHAEL, 1988a, 1988b, 1992; MERILUOTO *et al.*, 1989; HARADA *et al.*, 1991; SIVONEN *et al.*, 1990, 1992).

1.3.1. Estrutura química de microcistinas

A estrutura química geral das MCYST se compõe de 5 D-aminoácidos conservados e 2 L-aminoácidos variáveis, formando uma estrutura cíclica. Além da maior parte dos aminoácidos da molécula ser de isomeria D, pouco comum em estruturas biológicas, há dois aminoácidos raros: 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienóico (ADDA) e N-metildehidroalanina (Mdha) (BOTES *et al.*, 1982, 1984, 1985; HARADA *et al.*, 1996).

Atualmente, já foram descritas mais de 90 variantes de MCYST sendo comum uma mesma cepa de cianobactéria produzir mais de uma variante. A variação estrutural da MCYST pode ocorrer em todos os sete aminoácidos, no entanto, mais substituições ocorrem nas duas regiões variáveis de L-aminoácidos. Essas variações garantem à molécula maior ou menor hidrofília e potencial tóxico.

Essa toxidez se deve principalmente a sua capacidade de ligar-se covalente e irreversivelmente com proteínas fosfatases (PP) do tipo serina-treonina, principalmente as PP 1 e 2A. O aminoácido ADDA bloqueia o sítio ativo de proteínas fosfatases e a ligação covalente entre o aminoácido Mdha da toxina e o resíduo de cisteína 273 das fosfatases resulta na ligação irreversível com essas enzimas (ERIKSSON *et al.*, 1990; CARMICHAEL, 1992, 1994; MACKINTOSH *et al.*, , 1990, 1995; CRAIG *et al.*, 1996; IKEHARA *et al.*,

2009). A região do aminoácido metilaspártico também tem sido descrita como contribuidora para a inibição: a mutação desta região diminui a capacidade da MCYST interagir e inibir a proteína fosfatase 1, mas não afeta a proteína fosfatase 2A (CHEN *et al.*, 2006b).

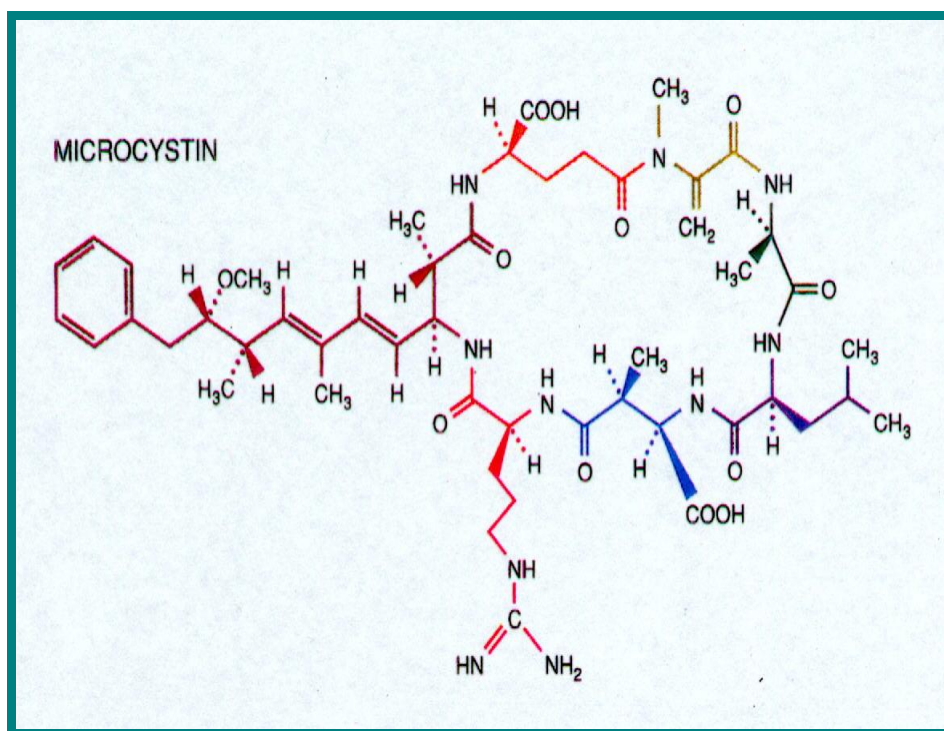


Figura 2. Esquema da estrutura química da microcistina-LR. Retirado de: CARMICHAEL *et al.*, (1994).

Das variantes conhecidas, a MCYST-LR (com uma leucina e arginina nas regiões variáveis dos L-aminoácidos) é uma das mais tóxicas, freqüentemente detectada e amplamente estudada (BOTES *et al.*, 1985; CODD & BEATTIE, 1991; RINEHART *et al.*, 1994, WATANABE *et al.*, 1996; CODD *et al.*, 2005). A DL_{50} (dose letal para 50% dos animais expostos) pela via intraperitoneal (i.p.) para camundongos está entre 50 e 59 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal (pc) (ELLEMAN *et al.*, 1978; RUNNEGAR *et al.*, 1995a,b; CARMICHAEL, 1994; WHO 1998, 2003). Para ratos, os valores de DL_{50} variam entre 66 e 122 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (DAWSON, 1998; WHO 1998, 2003).

1.3.2. Transporte celular de microcistinas

Devido ao seu tamanho e característica hidrofílica, as microcistinas não podem penetrar a membrana celular por difusão simples. Com isso, a entrada nas células é dependente da expressão de determinados polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATP, sigla em inglês) (RUNNEGAR *et al.*, 1995a; FISCHER *et al.*, 2005, BOARU *et al.*, 2006; MEIER-ABT *et al.*, 2007; VAN APELDOORN *et al.*, 2007; EVERS, 2008). Os OATP fazem parte de uma família de transportadores constitutivos e são expressos em diversas células, incluindo as renais, epiteliais e hepatócitos, bem como nas células do coração, pulmão, baço e cérebro (KIM, 2003; CHEN *et al.*, 2005 e 2006b; FISCHER *et al.*, 2005; NIEMI, 2007).

Diversos estudos *in vitro* têm comprovado que os OATP1B1, OATP1B3, e OATP1A2 são os transportadores específicos necessários para o fluxo de entrada da MCYST na célula (FISCHER *et al.*, 2005; EVERS & CHU, 2008). Órgãos que não expressam nenhum desses transportadores teriam dificuldade em absorver a toxina, o que significaria proteção a seus efeitos tóxicos (FISCHER *et al.*, 2005; MONKS *et al.*, 2007, LU *et al.*, 2008).

OATP1A2 é expresso no fígado, intestino e rins, mas principalmente em neurônios e no endotélio da barreira hemato-encefálica e sangue-medula espinhal (MARZOLINI *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2005). A grande distribuição dos OATP1A2 nos tecidos nervosos, contribuiria para os efeitos neurológicos decorrentes da exposição a essas hepatotoxinas (FISCHER *et al.*, 2005; LU *et al.*, 2008).

A afinidade das diferentes variantes de MCYST pelos OATP também é diversa e explica parcialmente a diferença de toxicidade das mesmas (MILUTINOVIC *et al.*, 2002, 2003 ; DIETRICH *et al.*, 2008; FISHER *et al.*, 2010). Dietrich *et al.*, (2010) demonstraram que as MCYST-LW e LF têm maior afinidade pelos OATP1B1 e OATP1B3 que a variante LR da toxina. Os autores defendem que, devido às diferentes afinidades, pode-se explicar a biodistribuição distinta das variantes de MCYST.

Recentemente, o transporte de MCYST vem sendo abordado como um processo bidirecional (de entrada e saída) que envolve OATP, proteínas de multiresistência a drogas (MDR) e multi proteínas associadas à resistência (PRM) (DIETRICH *et al.*, 2008). MDR e MRP são membros da superfamília *ATP-binding cassette* (transportadores ABC). Esses dois grupos, expressos em hepatócitos e células biliares, respectivamente, medeiam a saída da MCYST conjugada a glutathione (molécula de detoxificação) (HAGENBUCH *et al.*, 2003, 2004; OKAMURA *et al.*, 2004). Esse fato, explicaria a presença desses conjugados na bile de animais expostos à MCYST (PFLUGMACHER *et al.*, 1998; ITO *et al.*, 2002).

A distribuição da MCYST em diversos órgãos pode ser explicada pela distribuição dos transportadores OATP (FISCHER *et al.*, 2010). Ainda assim, Runnegar *et al.*, (1994) demonstraram que a MCYST também pode ser endocitada por pinocitose, se em altas concentrações.

1.3.3. Detoxificação

A principal via de detoxificação de MCYST é pela glutathione reduzida (GSH), um tripeptídeo (L-glutamina-L-cisteína-glicina) com diversas atividades na célula, inclusive detoxificar diversos xenobióticos (GEHRINGER *et al.*, 2004). A ligação entre MCYST e GSH pode ocorrer espontaneamente, dependendo da concentração, ou através da ação da enzima glutathione S-transferase (GST) (STRANGE *et al.*, 2000; BURATTI *et al.*, 2011).; Esta proteína é a principal envolvida na detoxificação celular de compostos eletrofílicos. Sua ação detoxificante é importante na proteção contra estresse oxidativo e consequentes processos cancerígenos e outras doenças degenerativas (Figura 3).

No entanto, Kondo *et al.*, (1992) demonstrou que o conjugado formado pela ligação da MCYST com a GSH, a MCYST-SG, continua com o aminoácido Adda disponível podendo, ainda, causar danos ao tecido.

A conjugação de substâncias eletrofílicas à glutathione as torna mais hidrossolúveis e facilita o processo de excreção. Vários trabalhos já elucidaram o processo de detoxificação de MCYST em invertebrados (PALÍCOVÁ *et al.*, 2007; BEST *et al.*, 2002) porém há poucos relatos para mamíferos (GEHRINGER *et al.*, 2004), havendo necessidade de maiores estudos nesta área.

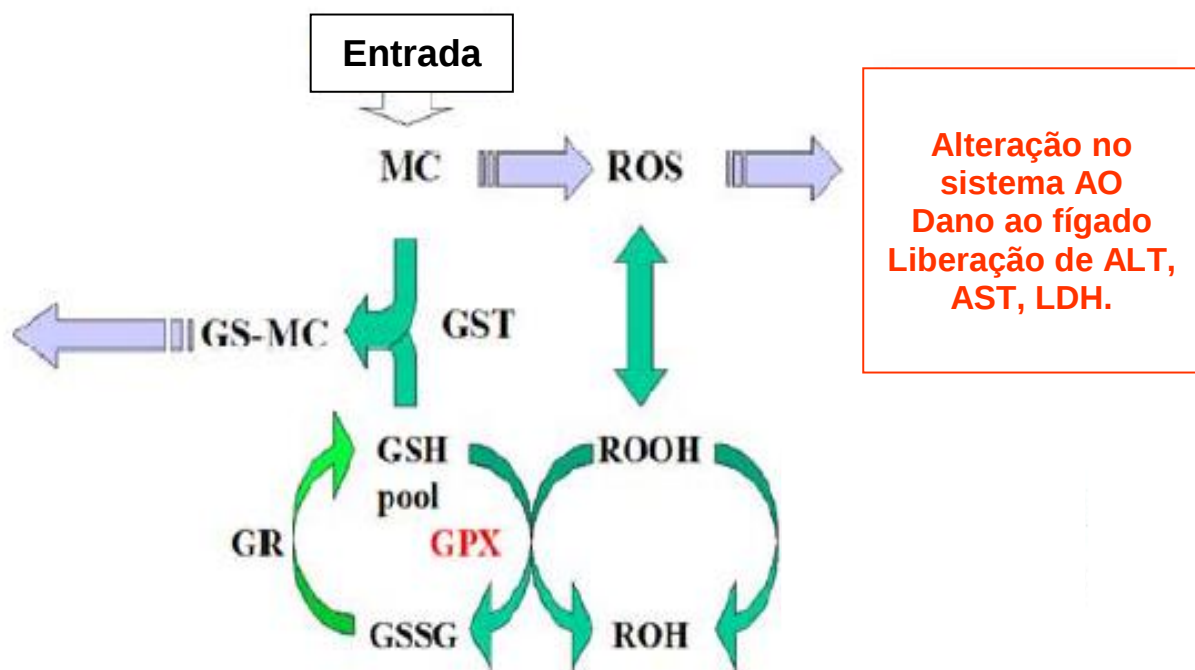


Figura 3: Desenho esquemático do processo de detoxificação da microcistina. MC= microcistina, ROS= espécies reativas de oxigênio, GSH, glutathione reduzida, GSSG= dímero de glutathione oxidada, GS-MC= conjugado glutathione-microcistina, GST= glutathione s-transferase, GR= glutathione redutase, ROOH= peróxidos lipídicos, ROH= álcoois, ALT= alanina aminotransferase, AST= aspartato transaminase, LDH= lactato desidrogenase, Sistema AO= sistema antioxidante . Retirado e modificado de Gehringer *et al.*, 2004.

1.3.4. Biodistribuição de microcistinas

A distribuição sistêmica da MCYST depende da expressão de OATP e o grau de perfusão de sangue em uma área específica do organismo. Após a administração oral ou intraperitoneal, o fígado é o principal órgão que acumula a toxina (YOSHIDA *et al.*, 1997; ITO *et al.*, 2000; BOARU *et al.*, 2006). O acúmulo de MCYST, em ensaios *in vivo*, foi descrito, além do fígado, nos intestinos, rins, pâncreas, cérebro, pulmão, baço, estômago, coração, gônadas e o sistema endócrino (WILLIAMS *et al.*, 1995, 1997; TENCALLA & DIETRICH 1997; BURY *et al.*, 1998; MALBROUCK *et al.*, 2003; JANG *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2008). Wang *et al.*, (2008) observaram que a distribuição da MCYST-LR por injeção intravenosa (i.v.), em ratos durante um período de 24 horas era localizada principalmente no rim, pulmão, estômago e fígado, e em menor concentração no coração, intestino, baço, cérebro e gônadas

Contudo, ainda existe uma carência de estudos mais detalhados sobre a dinâmica da biodistribuição em mamíferos. Alguns trabalhos com toxina marcada radiotivamente (FALCONER *et al.*, 1986; ROBINSON *et al.*, 1989; 1991a, 1991b; ITO *et al.*, 2000) indicam que microcistinas, logo após a entrada no organismo de camundongos, permanecem por pouco tempo na circulação e atingem rapidamente o fígado. Sua eliminação se dá pela urina e fezes (pela bile) e, de acordo com Robinson *et al.*, (1991a), este processo não levaria mais que 6 dias. No entanto, hoje existem algumas considerações sobre o fato da MCYST marcada com trítio (método utilizado no referido trabalho) não ser eficiente em se ligar covalentemente às proteínas fosfatases. Essa pode ser uma das explicações para o curto período de permanência da toxina nestes animais e pouca distribuição sistêmica nesse estudo.

Dados preliminares de nosso laboratório (SOARES, 2005) demonstram que, através da metodologia de ELISA (ensaio imunoenzimático), a microcistina pode ser detectada no soro de ratos Wistar por até 60 dias após uma única injeção intraperitoneal desta toxina. Da mesma forma, outro trabalho que relata um incidente ocorrido no Brasil, demonstrou que pacientes expostos por via endovenosa, por meio de hemodiálise com água contaminada com MCYST, ainda apresentavam a toxina no soro cinquenta dias após a

exposição (SOARES *et al.*, 2006). Ainda, dados obtidos em minha monografia, corroboram os resultados observados em humanos: também foi possível detectar MCYST livre no soro e danos teciduais em ratos injetados com dose subletal única por até 50 dias (MATTOS, 2008).

1.3.5. Mecanismos de ação de microcistinas

Foi proposto por Ito *et al.*, (2002) que a toxicidade da microcistina, assim como na maioria dos xenobiontes, depende de três fatores principais: acúmulo, metabolização e excreção. A base do mecanismo principal proposto pelo qual as MCYST induzem dano celular envolve a inibição das fosfatases 1 e 2A (CRAIG *et al.*, 1996; BAGU *et al.*, 1997; BILLAM *et al.*, 2008). Esta inibição enzimática resulta na hiperfosforilação de diversos alvos subcelulares. O efeito estrutural mais pronunciado dessa hiperfosforilação é a desorganização do citoesqueleto e perda de forma celular (NISHIWAKI-MATSUSHIMA *et al.*, 1991, 1992; FALCONER & YEUNG 1992; NISHIWAKI *et al.*, 1994).

Outros mecanismos complementares e/ou subsequentes têm sido estudados e ajudam a explicar a toxicidade da MCYST. Entre eles está a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e conseqüente estresse oxidativo. O mesmo pode ser observado através do aumento da peroxidação lipídica (RUNNEGAR *et al.*, 1995a, 1995b; SEKIJIMA *et al.*, 1999; ZEGURA *et al.*, 2003, 2004, 2006, FALCONER & HUMPAGE 2005, CHEN *et al.*, 2006a). Igualmente, já se verificou que as espécies reativas de oxigênio geradas por uma exposição à MCYST, podem promover a inibição da superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, e catalase, todas enzimas do completo antioxidante (DAWSON, 1998; CHORUS & BARTRAM 1999; DING *et al.*, 2001, DING & NAM ONG, 2003; VAN APELDOORN *et al.*, 2007, ZHANG *et al.*, 2007a).

A atividade apoptótica também tem sido descrita como uma resposta à exposição subletal à MCYST (DING & NAM ONG, 2003; CHEN *et al.*, 2005). ZHANG *et al.*, (2007a) descreveram aumento do influxo celular de Ca^{2+} , o que diminui o potencial de membrana mitocondrial, prejudicando a produção de ATP e promovendo a apoptose. Em ensaios *in vitro* com a toxina, Wei *et al.*,

(2008) relataram alterações da atividade da proteína quinase JNK, envolvida na regulação do ciclo celular, e ativação de fatores de expressão gênica para proliferação e apoptose, como as proteínas AP-1. Outros trabalhos *in vivo* com camundongos, verificaram que exposições à MCYST-LR promovem o aumento da expressão de iniciadores de apoptose tais como as proteínas Bax e Bid (ZEGURA *et al.*, 2004, CHEN *et al.*, 2005; WENG *et al.*, 2007). Essas mudanças foram acompanhadas por aumento de permeabilidade da membrana mitocondrial e perda de potencial de membrana mitocondrial (DING & NAMONG 2003, ZHANG *et al.*, 2007a; CAMPOS & VASCONCELOS, 2010) (Figura 4).

Outro potencial mecanismo da toxina para indução da morte celular vem sendo descrito e inclui a síntese de enzimas proteolíticas como as catepsinas D e L, dipeptidase II, dipeptidase IV. Essas enzimas proteolíticas resultam em desestabilização das membranas lisossômicas e necrose celular (RUNNEGAR *et al.*, 1995a; LANKOFF & KOLATAJ, 2001; ALVERCA *et al.*, 2009).

Nos tecidos, sabe-se que a MCYST também pode gerar um processo inflamatório. Esse pode ser em decorrência do estresse oxidativo uma vez que sabe-se que ERO são capazes de gerar inflamação (NAIK & DIXIT, 2011). Contudo, a MCYST também pode agir diretamente, como verificado no fígado, ativando enzimas que participam da via metabólica do ácido aracdônico, tais como a fosfolipase A2 e ciclooxigenase, induzindo a produção dos mediadores inflamatórios tromboxano A2 e prostaglandina E2 (WATANABE *et al.*, 1996; NOBRE *et al.*, 2001 e 2003). Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que MCYST têm a capacidade de estimular macrófagos peritoniais a produzirem TNF- α (fator de necrose tumoral- α) (NAKANO *et al.*, 1991). Kujbida *et al.*, (2008 e 2009) descreveram que essa toxina também estimula a migração de neutrófilos para o fígado e culmina na produção de IL-8.

Campos & Vasconcelos (2010) abordam como mecanismo de ação das microcistinas: (a) inibição de proteínas fosfatases 1 e 2A; (b) alteração regulação da atividade / expressão de fosfoproteínas envolvidas no ciclo e reparo celular; (c) geração de espécies reativas de oxigênio e (d) estresse oxidativo (Figura 4). Contudo, os mecanismos de ação citados e discutidos anteriormente não são isolados e, sim, correlacionados: há amplificação mútua e relação de causa e consequência entre eles, como mostra a Figura 5. A

correlação entre esses fatores e a não separação dos mesmos já foi discutido por Franco *et al.*, (2009), analisando outros xenobiontes.

Por fim, a literatura indica que a intoxicação por MCYST tem perfis diferentes, dependendo da dose e da via de exposição. Em exposição crônica, ocorre alteração do ciclo celular, apoptose, necrose ou mesmo formação de tumores. Em 2006, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer avaliou todos os estudos existentes e concluiu que existem evidências de genotoxicidade e propriedades epigenéticas das microcistinas suficientes para considerá-las possivelmente carcinogênicas para seres humanos (LANKOFF & CARMICHAEL, 2006).

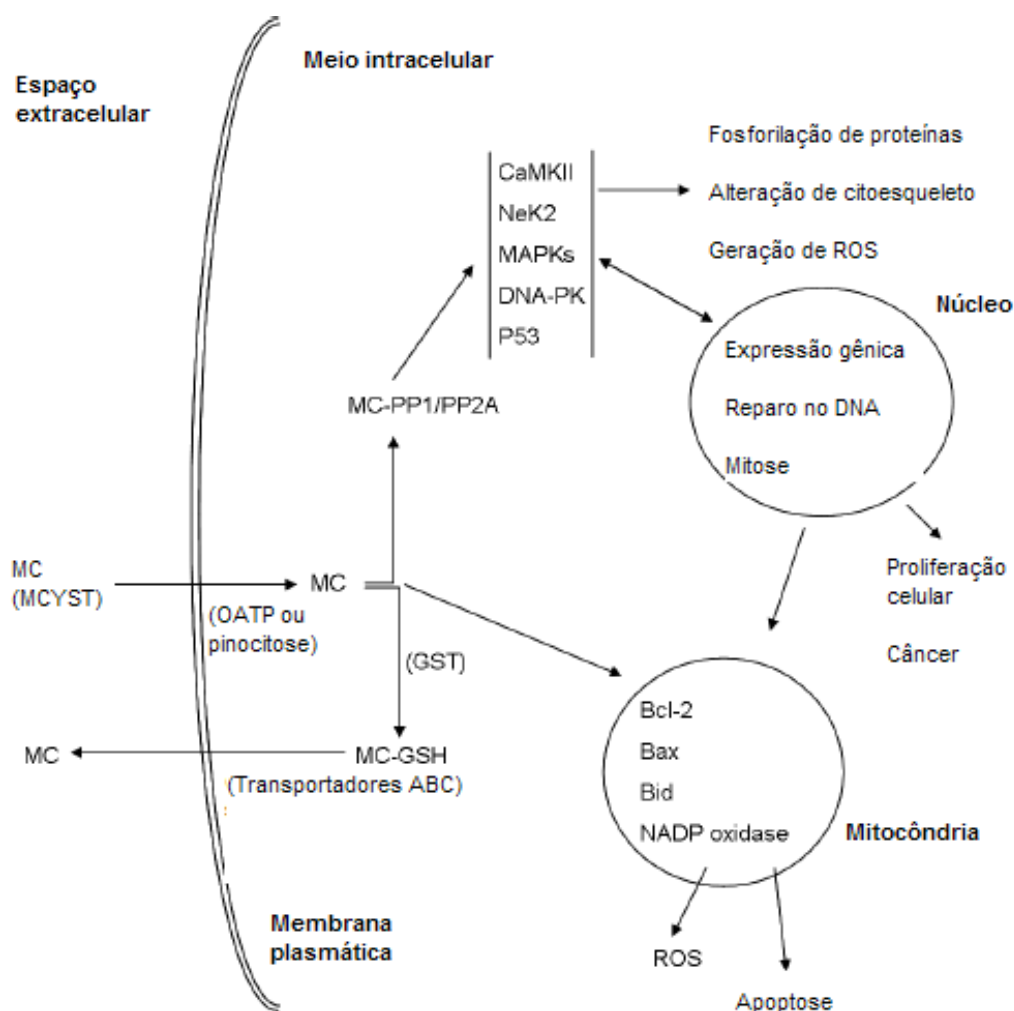


Figura 4: Representação esquemática das vias de entrada, toxicidade, efeitos, biotransformação e detoxificação de MCYST em células animais. Modificado de Campos & Vasconcelos (2010).

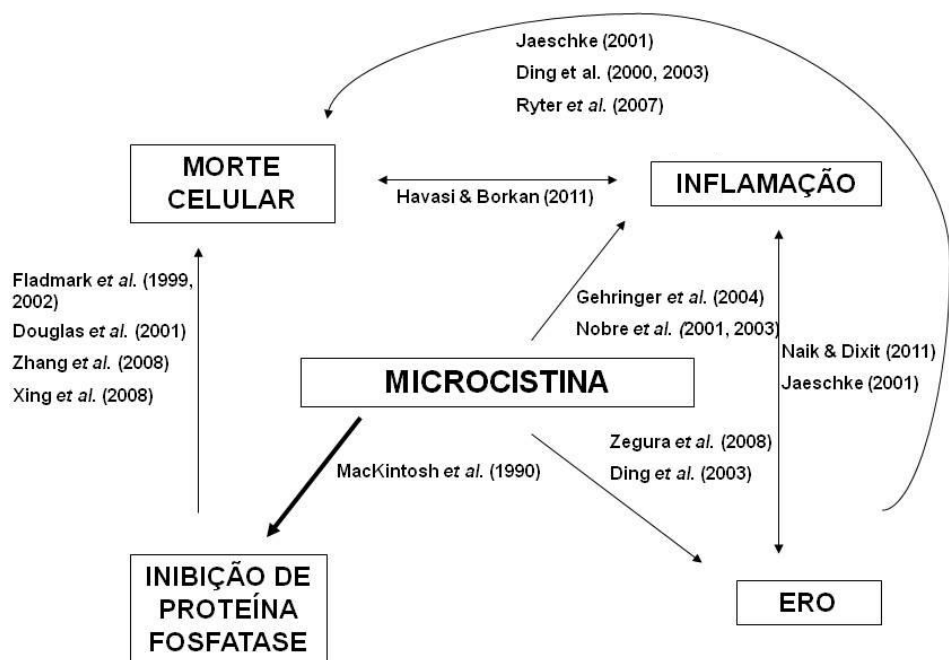


Figura 5: Representação esquemática da inter-relação de causa e efeito entre a intoxicação por microcistina, inibição de proteína fosfatase, formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), inflamação e morte celular.

1.3.6. Ação tóxica sistêmica de microcistina

Como abordado anteriormente, de forma aguda, a inibição das PP causa desarranjo do citoesqueleto, modificando a forma celular. No fígado, os hepatócitos ficam arredondados, se separam e perdem sua estrutura parenquimal. Supõe-se que isso leve ao rompimento dos capilares sinusoidais, com extravasamento de sangue para o espaço intersticial e conseqüente hemorragia (FALCONER *et al.*, 1981; HOOSER *et al.*, 1990; WICKSTROM *et*

al., 1996) (Figura 6). Na hemorragia intra-hepática, o sangue extravasado no fígado faz com que o órgão duplique de peso.

A letalidade ocorre quando há dilatação do retículo endoplasmático rugoso, mudanças no formato celular, lise dos hepatócitos, necrose, desestruturação dos sinusóides e hemorragia, resultando em choque hipovolêmico ou falência hepática (MIURA *et al.*, 1989; CARMICHAEL, 1994).

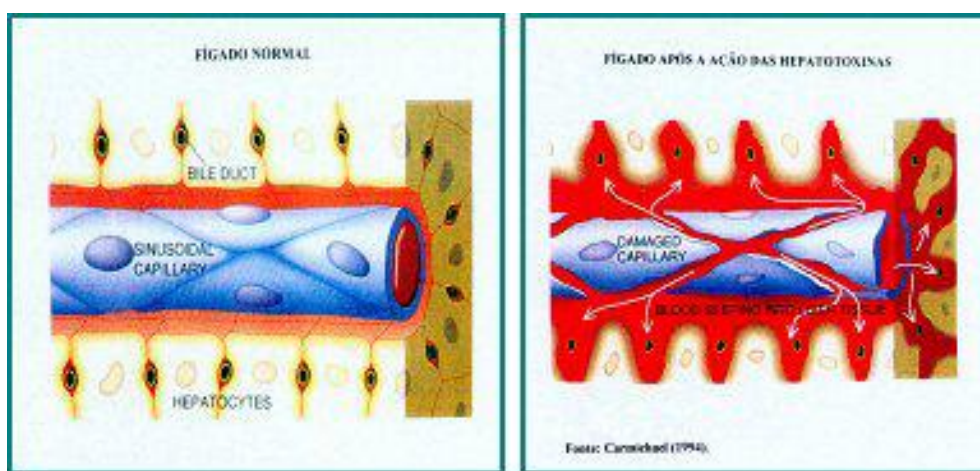


Figura 6. Desenho esquemático do efeito de microcistinas sobre hepatócitos e capilares sinusóides. Retirado de CARMICHAEL *et al.*, (1994).

Embora o fígado seja o órgão mais afetado pela microcistina, sua ação tóxica não é restrita ao órgão, conforme dito anteriormente.

O rim parece ser o segundo órgão mais afetado pelas MCYST. Em estudos de distribuição da toxina após injeção i.p., foi verificado que este é o órgão que mais concentra MCYST, depois do fígado (FALCONER *et al.*, 1986; LOVELL *et al.*, 1989). Em doses letais, as lesões renais, podem estar relacionados com a hipóxia, edema e a presença de fragmentos ou debris hepático (HOOSER *et al.*, 1989; LOVELL *et al.*, 1989, NOBRE *et al.*, 2001).

Alguns estudos *in vitro*, com células epiteliais de rim, demonstraram que doses elevadas causam efeitos semelhantes aos observados nos hepatócitos, a maioria relacionados com a desestruturação do citoesqueleto (KHAN *et al.*, 1995). Também foi observado má formação dos glomérulos renais e da medula em fetos de ratos fêmeas com injeção i.p. diária de 62 µg/ kg de peso corporal (ZHANG *et al.*, 2002). Além disso, Nobre *et al.*, (2001, 2003) observaram nefrotoxicidade em ratos perfundidos, relacionada a um intenso processo inflamatório.

Outro órgão muito afetado é o pulmão. Doses altas de MCYST via i.p. causaram trombose pulmonar atípica em camundongos (SLATKIN *et al.*, 1983). Turner *et al.*, (1990) descreveram um caso de recrutas do Reino Unido que deram entrada no hospital com quadro de pneumonia basal esquerda cinco dias após exercícios de canoagem em um reservatório com intensa floração de *Microcystis aeruginosa* (produtora de MCYST-LR), onde beberam e inalaram água. Também apresentaram garganta inflamada, tosse seca, vômito e dor abdominal.

Nosso grupo e colaboradores observaram, em camundongos injetados com dose subletal dessa toxina i.p., um processo inflamatório agudo com colapso alveolar, alteração de parâmetros de mecânica respiratória como elastância do pulmão e aumento da resistência das vias aéreas (PICANÇO *et al.*, 2004; SOARES *et al.*, 2007). Igualmente, em minha monografia, experimentos de longa duração com dose única subletal de MCYST-LR i.p., resultaram em inflamação persistente no pulmão de ratos ao longo de 3 semanas (MATTOS, 2008).

Danos cardíacos envolvendo fibrose, diminuição do volume do cardiomiócito, apoptose e infiltrado de células mononucleares foram observados com doses aguda e crônica em camundongos (MILUTINOVIĆ *et al.*, 2006; SUPUT *et al.*, 2010). Qiu *et al.*, (2009) discutem que a morte por hipovolemia provocada na intoxicação por MCYST seja também, entre as causas conhecidas, em decorrência da cardiotoxicidade.

Há relatos de danos ocasionados por exposição à MCYST em células ovarianas e de testículos, afetando a fertilidade (LI *et al.*, 2008; 2009; GÁCSI *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2010). Assim como, há relatos de danos no trato gastrointestinal (BOTHÁ *et al.*, 2004), cérebro e memória (MAIDANA *et al.*,

2006), células do sistema imune (GONÇALVES *et al.*, 2006), entre outros. Todos esses estudos comprovam que a MCYST afeta de forma sistêmica o organismo.

1.4. Justificativa

Um dos maiores problemas em relação às florações de cianobactérias tóxicas na água de superfície é a contaminação das mesmas com as potentes cianotoxinas, principalmente em países onde o tratamento da água para abastecimento da população é deficitário. Há alguns relatos, de diferentes regiões do mundo, sobre intoxicações humanas devido à ingestão de cianobactérias tóxicas ou de suas toxinas (BILLINGS *et al.*, 1981; FALCONER *et al.*, 1986; AZEVEDO *et al.*, 2002; SOARES *et al.*, 2006).

Deste modo, é de grande importância investir no estudo sobre os processos de acúmulo da microcistina em órgãos de modelos murinos, seus efeitos nos diversos órgãos, além de sua detoxificação, tendo em vista o risco que estas substâncias representam para a saúde humana e disponibilidade da mesma nas águas eutrofizadas, comuns nas sociedades atuais. Da mesma forma, o estudo dos efeitos de dose subletal é de grande relevância, uma vez que são as doses mais comuns e subnotificadas de intoxicação humana.

2 – OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Contribuir para o conhecimento sobre os efeitos da intoxicação subletal por microcistina-LR em modelos murinos, investigando alterações metabólicas, acúmulo e detoxificação. Assim como, descrever danos teciduais e funcionais nos animais testados.

2.2. Objetivos específicos

Através de experimentos com camundongos Suíços injetados uma única vez com dose subletal e analisados em diversos tempos amostrais ao longo de 96 horas, pretendeu-se:

- Avaliar o acúmulo de MCYST no fígado
- Avaliar a inibição das proteínas fosfatases no fígado;
- Avaliar estresse oxidativo no fígado;
- Analisar alterações histopatológicas e estereológicas no fígado;
- Analisar indicadores inflamatórios e alterações de parâmetros da função hepática.

Escolhido um tempo amostral através das análises com camundongos, ratos Wistar foram injetados uma única vez com dose subletal e analisados em 24 horas para se analisar:

- A excreção e acúmulo de MCYST;
- Histopatologia e estereologia de fígado;
- Estresse oxidativo no fígado e rim;
- Função renal;
- Alterações metabólicas digestiva e excretórias.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

Para analisar os diversos objetivos propostos para o estudo da intoxicação subletal única por MCYST, foram realizados experimentos com dois modelos experimentais: com camundongos Suíços, analisados em diversos tempos amostrais, e com ratos Wistar, analisando-os vinte e quatro horas após a exposição.

A escolha dos modelos experimentais foi em decorrência do desenho experimental para se alcançar os objetivos propostos. Inicialmente, objetivou-se analisar as variações temporais (ao longo de 96 horas de experimento) dos seguintes parâmetros: (a) o acúmulo de MCYST, (b) alterações bioquímicas no fígado, (c) função hepática, (d) histologia e estereologia hepáticas. Como nesse modelo, necessitava-se um número grande de animais para se analisar cada tempo experimental, os camundongos Suíços se mostraram mais viáveis devido ao seu menor tamanho e menor custo de manutenção em biotério.

Determinadas as respostas temporais observadas em camundongos, foi escolhido um tempo amostral - 24 horas - para se realizar o segundo modelo experimental em que se objetivou: (a) confirmar os alguns parâmetros analisados no fígado e analisá-los também para o rim, (b) analisar a função renal, (c) analisar aspectos da função metabólica, (d) determinar excreção de MCYST. Como as análises propostas necessitavam de um volume grande de material biológico (urina, fezes, soro, rim ou fígado), o modelo animal escolhido foi o de ratos Wistar.

As análises realizadas, em cada modelo experimental, estão listadas na tabela 1.

Tabela 1: experimentos e análises realizadas

Camundongos Suíços amostrados em 2, 8, 24, 48 e 96 horas.		Ratos Wistar amostrados em 24 horas.	
Análises: • Detecção de MCYST ^{a, b} • Concentração de proteínas ^b • Peroxidação lipídica ^b • Atividade da mieloperoxidase ^b • Atividade da SOD ^b • Atividade da CAT ^b • Concentração de óxido nítrico ^b • Atividade de GST ^b • Atividade de GPx ^b	Análises: • Concentração de proteínas ^a • Atividade PP1 e 2A ^b • Marcadores hepáticos ^a • Histologia ^b • Estereologia ^b	Análises: • Detecção de MCYST ^{b, c} • Concentração de proteínas ^{b, c} • Histologia ^b • Estereologia ^b • Atividade de GST ^{b, c} • Concentração de GSH/GSSG ^{b, c} • Atividade da CAT ^{b, c}	Análises: • Determinação do fluxo urinário e produção fecal • Detecção de MCYST ^{a, b, c, d, e} • Determinação da eliminação diária de MCYST • Índice renal • Determinação do clearance de MCYST • Determinação da fração de excreção de MCYST

^a soro ^b fígado ^c rim ^d urina ^e fezes

MCYST – microcistina SOD – superóxido dismutase CAT – catalase GST – glutathione s-transferase
GPx – glutathione peroxidase GSH – glutathione reduzida GSSG – glutathione oxidada

3.1. Procedimentos experimentais

3.1.1. Modelo experimental de camundongos

Camundongos Suíços machos adultos (n=30), pesando entre 25 e 30 gramas, com 6 semanas de idade, foram obtidos do Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro e mantidos em biotério apropriado para experimentação. Os animais receberam cuidados conforme o Guia de Cuidados e Usos de Animais de Laboratório, preparado pelo Comitê de

Cuidados e Uso dos Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (National Institute of Health, 2011). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa (CAUAP) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Os camundongos (n=25) foram aleatoriamente escolhidos e injetados via i.p. uma única vez com uma solução aquosa de MCYST-LR (padrão cedido pelo Prof. Wayne Carmichael, Wright State University, EUA) em dose subletal de 45 µg/Kg de peso corpóreo. A dose corresponde a aproximadamente 80% da LD₅₀ para camundongos. Outros 5 animais controle foram injetados com 0,5 ml de solução salina (NaCl 0,9%).

Os animais-teste foram escolhidos aleatoriamente para os devidos tempos amostrais, sendo sacrificados 2, 8, 24, 48 ou 96 horas após a exposição. Para cada amostragem, 5 animais-teste foram utilizados. Os animais-controle foram eutanasiados ao final do experimento.

Em cada amostragem, os animais foram decapitados com guilhotina e tiveram o sangue coletado. O mesmo foi centrifugado a 3000 g por 5 minutos e temperatura de 4°C, para obtenção do soro. O sobrenadante foi mantido em freezer -20°C e analisado posteriormente.

Os fígados dos animais foram coletados, processados e analisados como descrito posteriormente nos procedimentos amostrais.

3.1.2. Modelo experimental de ratos mantidos em gaiolas convencionais

Os animais utilizados foram ratos Wistar machos obtidos no biotério central da Universidade Estadual do Rio de Janeiro. Os mesmos foram mantidos no biotério do Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular, conforme o Guia de Cuidados e Usos de Animais de Laboratório, preparado pelo Comitê de Cuidados e Uso dos Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (National Institute of Health, 2011). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Avaliação do Uso de Animais em

Pesquisa (CAUAP) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Os animais possuíam entre 8 a 9 semanas de idade, pesando entre 180-230 gramas e foram divididos em dois grupos experimentais aleatoriamente: controle e injetado com microcistina-LR (MCYST).

O grupo controle (n=10) recebeu injeção intraperitoneal de 0,5 ml de solução salina (NaCl 0,9%). O grupo tratado com microcistina-LR (n=10) recebeu injeção intraperitoneal de microcistina-LR na dose subletal de 55 µg/kg de peso corpóreo. A dose corresponde a aproximadamente 80% da LD₅₀ para ratos.

No momento do sacrifício, vinte e quatro horas após a injeção, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de ketamina (75 mg/Kg) e xilasina (10 mg/Kg) e tiveram a cavidade abdominal exposta para coleta de órgãos. A eutanásia ocorreu por rompimento da veia cava inferior.

3.1.3. Modelo de ratos mantidos em gaiolas metabólicas

Os resultados obtidos com esse modelo fazem parte de um amplo projeto em colaboração multilaboratorial, em que se pretende estudar alterações fisiológicas renais e metabólicas decorrentes da intoxicação por MCYST-LR. O experimento seguiu o mesmo modelo descrito em 3.1.2. com algumas modificações. Os animais obtidos foram aclimatados previamente em gaiolas metabólicas e no decorrer das 24 horas entre a injeção e o sacrifício, todos os animais também ficaram em gaiolas metabólicas individuais.

A gaiola metabólica permite a acomodação individual dos animais e é desenhada para permitir a separação da urina e das fezes dos animais em recipientes diferentes. Também possui sistemas isolados de comedouro e bebedouro, permitindo mensurar a quantidade de ração e de água ingeridas.

Após 19 horas na gaiola metabólica, os animais foram deixados em jejum por mais 5 horas com livre acesso à água. Ao final de 24 horas, a urina e fezes foram, então, coletadas e o seu volume ou peso mensurados. O volume

de água e a quantidade de ração ingeridas de cada animal também foram determinados.

No momento da eutanásia, 24 horas após a injeção, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de ketamina (75 mg/Kg) e xilasina (10 mg/Kg) e tiveram a cavidade abdominal exposta. O sangue foi colhido com seringa previamente lavada com EDTA 0,1 M a partir da veia cava inferior, centrifugado por 5 minutos a 3000 g a 4°C e o plasma transferido para um novo tubo, sendo mantido em freezer -20°C para análises posteriores.

3.2. Procedimentos amostrais

3.2.1. Preparo de amostras teciduais para análises bioquímicas

O órgão (fígado ou rim) recém-coletado, foi homogeneizado (0,1 g de tecido/ml) em solução de homogeneização contendo EDTA (0,1 mM), DTT (1mM), Tris-HCl pH 7,0 (50 mM) e inibidor de protease PMSF (0,1 mM) em banho de gelo, utilizando-se homogeneizador Tissuemiser (Fisher Scientific) de acordo com Runnegar *et al.*, (1993). O homogenato resultante foi centrifugado a 10000 g e, com o sobrenadante (citossol) obtido, foram feitas alíquotas e essas, armazenadas em freezer a -20°C até o momento das análises.

3.2.2. Preparo de amostras de excretas

As fezes coletadas foram homogeneizadas em solução de homogeneização contendo EDTA (0,1 mM), DTT (1 mM), Tris-HCl pH 7,0 (50 mM) e inibidor de protease PMSF (0,1 mM) em banho de gelo utilizando-se cadinho e pilão. O homogenato resultante foi centrifugado a 10000 g por 10 minutos e, com o sobrenadante obtido foram feitas alíquotas, sendo essas armazenadas em freezer a -20°C até o momento das análises.

A urina recém-coletada foi armazenada diretamente em -20°C até o momento das análises.

3.2.3. Preparo de amostras para histologia e estereologia

Após eutanásia, os fígados foram dissecados e fragmentos de cada um dos 4 lobos hepáticos de cada animal foram imersos em solução fixadora de formaldeído 10% por 24 horas em temperatura ambiente. Após este período, os órgãos foram processados em concentrações crescentes de álcool e xilol (10, 20, 30, 50, 70 e 100%) e foram incluídos em parafina. Os blocos obtidos foram seccionados em 4 µm de espessura e corados em Hematoxilina e Eosina.

As fases de inclusão em parafina, cortes e coração foram realizadas utilizando instrumentação do Laboratório de Patologia Celular, no Instituto de Ciências Biomédicas na UFRJ, com o auxílio do histotécnico Luis Fernando Fragoso.

3.3. Procedimentos analíticos

3.3.1 Detecção de MCYST livre

O método utilizado foi o imunoensaio do tipo ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando-se kits comerciais da Beacon Analytical Systems (Portland, EUA) de acordo com o protocolo determinado pelo fabricante. O limite de detecção do kit é de 0,1 ppb. Cabe ressaltar que as amostras dos animais controle também foram analisadas para se determinar o falso positivo da técnica (reatividade cruzada com outras proteínas da amostra) para, quando acima do limite de detecção, descontá-los nas amostras contendo MCYST.

A análise da concentração de MCYST foi realizada para o modelo experimental de camundongos, nas amostras de soro e fígado, e no modelo de ratos, nas amostras de soro, fígado, rim, urina e fezes.

3.3.2 Concentração de proteínas

A concentração de proteína dos homogenatos teciduais foi mensurada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). O método baseia-se na reação de proteínas com o reagente de Bradford que utiliza o corante *coomassie brilliant blue* G-250 (Sigma-Aldrich, EUA). O corante liga-se com as proteínas da amostra, gerando um produto que pode ser mensurado a 595 nm, sendo a quantificação realizada de acordo com uma curva-padrão produzida com albumina em diversas concentrações variando de 0 a 10 µg/µL.

A concentração de proteína de cada amostra foi utilizada para normalizar todos os resultados dos testes bioquímicos e foi realizada em todas as amostras de tecido – hepático e renal – de todos os experimentos.

3.3.3 Atividade da mieloperoxidase

A determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) é uma medida indireta do infiltrado celular no tecido, principalmente de neutrófilos, e de sua atividade inflamatória. O ensaio bioquímico utilizado para quantificação da atividade da MPO foi descrito por Bradley *et al.*, (1982). À amostra tecidual foi adicionado brometo hexadeciltrimethylamônio (HTAB) na concentração final de 0,5% para que se separe a mieloperoxidase de outras peroxidases do tecido. As amostras, então, foram centrifugadas a 3000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Com o sobrenadante foi feito o ensaio e o substrato utilizado foi o peróxido de hidrogênio na concentração inicial de 30%. A atividade enzimática foi mensurada pela alteração nos valores de absorbância (devido a quebra do substrato) a 630 nm e a quantificação foi realizada através

de uma curva-padrão, estabelecida utilizando-se mieloperoxidase purificada em concentrações variando de 0 a 120 mU/mL.

O ensaio da atividade da mieloperoxidase foi realizado nas amostras de fígado do camundongo.

3.3.4 Análise de óxido nítrico

O óxido nítrico é um importante mediador inflamatório. Os níveis de óxido nítrico são estimados através do produto da degradação estável do mesmo, o nitrito (NO_2). Este método é chamado de reação de Griess. As análises foram feitas seguindo-se o método descrito por Green *et al.*, (1982). Simplificadamente, às amostras dos homogenatos (50 μL) foram adicionados sulfanilamida a 2,5% (v/v) por 10 minutos e, posteriormente, com nãfitiletenodiamina 1% (v/v). O produto formado é mensurado pela leitura da absorbância no espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm e a quantificação foi realizada de acordo com uma curva-padrão estabelecida utilizando nitrito em concentrações variando de 0 a 100 μM .

A quantificação de nitrito foi realizada nas amostras de fígado de camundongos.

3.3.5 Atividade da enzima glutathione S-transferase

A metodologia utilizada nesta análise é descrita por Habig *et al.*, (1974; 1981) e utilizada em diversos trabalhos atuais. O método é baseado na utilização de 100 mM de CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) como substrato da enzima glutathione S-transferase (GST) presente nas amostras, em presença de 200 mM de GSH (glutathione reduzida). O produto resultante da reação enzimática (GS-DNB) foi detectado por espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm. As leituras utilizadas foram a absorbância inicial e final (5

minutos após a adição do substrato à amostra). Com isso, pode-se calcular a atividade da enzima por minuto. O resultado é obtido em μMol de GS-DNB/min/mL.

A determinação da atividade da GST foi realizada nas amostras de fígado do modelo de camundongos e fígado e rim do modelo de ratos.

3.3.6 Análise da glutathiona oxidada e reduzida

O ensaio é baseado na reação de glutathiona reduzida (GSH) com o 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) que produz o cromóforo 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB). A cinética de formação desse cromóforo é determinada por 5 minutos através da absorbância em 412 nm e é proporcional a concentração de GSH da amostra (RAHMAN *et al.*, 2007).

Para se determinar a concentração de glutathiona oxidada (GSSG), alíquotas das amostras foram previamente tratadas com 2-vinilpirimidina. Esse composto se liga covalentemente a GSH, retirando-a da reação seguinte. O excesso de 2-vinilpirimidina é neutralizado com trietanolamina. O ensaio inicia-se com a reciclagem de GSSG pela enzima GSSG redutase (RAHMAN *et al.*, 2007). A GSH formada a partir da GSSG é então determinada de acordo com método descrito anteriormente. As concentrações no homogenato foram determinadas de acordo com curvas-padrão produzidas com diluições de padrões de GSH e GSSG em concentrações de 0 a 1,65 mM.

A quantificação de GSH/GSSG foi realizada nas amostras de fígado e rim do modelo animal de ratos.

3.3.7 Peroxidação lipídica

A metodologia utilizada foi a de quantificação da peroxidação lipídica através do ácido tiobarbitúrico (TBARS, a sigla em inglês) descrita por Draper & Hadlee (1990). O método consiste na capacidade do subproduto da lipoperoxidação, o malondialdeído (MDA), reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA) a 100 g/mL (100 µL de homogenato tecidual) em temperatura de 100°C. Ou seja, quanto mais lipídios oxidados, maior concentração de MDA, maior reação com o TBA e, conseqüentemente, maior absorbância no comprimento de onda de 532 nm. Uma curva-padrão com o MDA em concentrações de 0 a 1 µmol/mL foi produzida para quantificação do mesmo nas amostras de homogenatos.

A quantificação da peroxidação lipídica foi realizada nas amostras de fígado do modelo de camundongos.

3.3.8 Atividade da enzima catalase

A atividade da catalase nos homogenatos teciduais foi determinada de acordo com Aebi (1984) por espectrofotometria. A atividade da enzima é medida pela cinética do decaimento da concentração do substrato adicionado à amostra, o peróxido de hidrogênio na concentração inicial de 30%, a 240 nm. O resultado é expresso em U de catalase/mL.

A atividade da catalase foi determinada nas amostras de fígado do modelo de camundongos e fígado e rim do modelo de ratos.

3.3.9 Atividade da enzima superóxido dismutase

A superóxido dismutase (SOD) tem sua atividade verificada através da sua ação na inibição da auto-oxidação da adrenalina, evitando assim a transformação da mesma em adenocromo. Às amostras (30 µL) foram adicionadas a adrenalina (60 mM) e catalase (1,5 mM). A última é responsável pela quebra do peróxido de hidrogênio, produto formado pela ação da SOD, o qual é necessário retirar da reação uma vez que interferiria no ensaio.

De forma resumida, quanto maior a atividade da SOD, menor a oxidação da adrenalina, menor produção de adenocromo, menor a cor gerada. A atividade foi mensurada por alteração na absorbância no comprimento de onda de 480 nm, em espectrofotômetro. O resultado é obtido em U de SOD/mL. O método adotado para este ensaio bioquímico é descrito por Bannister & Calabrese (1987).

A atividade da SOD foi determinada nas amostras de fígado do modelo de camundongos.

3.3.10 Atividade da enzima glutathione peroxidase

A glutathione peroxidase (GPx) é uma peroxidase que utiliza a glutathione reduzida (GSH) para quebrar o peróxido de hidrogênio, gerando água, oxigênio molecular e glutathione oxidada (GSSG). A GPx utiliza o NADPH (1 mM) durante esta reação. O ensaio bioquímico para mensurar a atividade da GPx é descrito por Flohé & Gunzler (1984). Às amostras são adicionadas glutathione reduzida (1,5 mM), glutathione reductase a 1,5 mM (para retornar a glutathione ao seu estado reduzido) e NADPH (1,0 mM). A atividade é mensurada pela quebra do NADPH. O produto resultante desta última reação é colorimétrico e pode ser analisado no comprimento de onda de 340 nm. O resultado é expresso em nMol de NADP formado/min/mL.

A atividade da GPx foi determinada nas amostras de fígado do modelo de camundongo.

3.3.11 Atividade enzimática das proteínas fosfatases 1 e 2A

Para se analisar a atividade conjunta das proteínas fosfatases 1 (PP1) e 2A (PP2A), foi necessária a produção do substrato específico das mesmas, a

fosforilase a, marcada com fósforo radioativo. Para tanto, seguiu-se o procedimento descrito por Shenolikar & Ingebritsen (1984), com pequenas modificações: 5 mg de fosforilase b (Sigma-Aldrich, EUA) foram incubados por 1 hora em banho termostatzado a 30°C com 400 µL de solução contendo 0,08 mg de fosforilase cinase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), 300 µM de ATP e 5000 cpm/pmol de [γ - 32 P] ATP (IPEN, BR), marcado segundo método de Maia *et al.*, (1983), 2 mM de acetato de magnésio, 125 µM de CaCl₂, 60 mM de glicerofosfato de sódio (pH 8,2), 50 mM 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 por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 0,4 mL de solução contendo Tris-HCl (50 mM, pH = 7,0), EDTA (1,0 mM), 2-mercaptoetanol (0,3% v/v). Os cristais de [32 P] fosforilase a formados foram, então, diafiltrados em Microcon YM-10 (Millipore, EUA) por meio de centrifugação a 14000 g por aproximadamente 2 horas a 4°C. O filtrado foi descartado, o material retido no filtro foi ressuspenso na solução citada anteriormente, diafiltrado, sendo este processo repetido ainda mais uma vez e o precipitado final ressuspenso em solução contendo Tris-HCl (50 mM, pH = 7,0), NaCl (250 mM), 2-mercaptoetanol (0,3% v/v). Este processo permitiu a remoção de grande parte do ATP radioativo residual. No entanto, resultou em um rendimento máximo de 65% na produção de fosforilase a. A concentração final da mesma foi determinada por meio de diluição de uma pequena alíquota e determinação de sua absorbância em 280 nm (abs 1,31 = 1 mg/mL) (SHENOLIKAR & INGEBRITSEN, 1984).

A determinação da atividade conjunta de PP1 e 2A no fígado foi realizada, misturando-se 10 µL do sobrenadante do homogenato, 10 µL de solução de reação (50 mM de Tris-HCL, pH = 7,0 e 1 mM de DTT) e 10 µL de solução [32 P] fosforilase a (3 mg/mL) por 10 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 0,1 mL de ácido tricloroacético a 10%, e a liberação de fosfato radioativo foi determinada através de cintilação líquida.

A atividade conjunta das PP1 e PP2A foi determinada nas amostras de fígado do modelo de camundongos.

3.3.12 Detecção de marcadores de dano hepático no soro

As aminotransferases ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase) são enzimas que catalisam a transferência de um grupo alfa amínico de um aminoácido para um alfa-cetoácido. São enzimas intracelulares. Os valores séricos absolutos das aminotransferases podem servir como indicadores da integridade hepatocelular. Níveis séricos elevados dessas enzimas estão associados o comprometimento hepatocelular agudo.

Para dosagem de ALT e AST foram utilizados, respectivamente, o kit ALT/GPT (Bioliquid) e AST/GOT (Bioliquid) da Laborclin (Pinhais, PR, Brasil), seguindo metodologia recomendada pelo fabricante. A cinética enzimática foi determinada em 340 nm em espectrofotômetro.

Os marcadores hepáticos foram analisados nas amostras de soro de camundongos.

3.3.13 Histologia e Estereologia

As lâminas histológicas com os cortes de tecido hepático foram analisadas por microscópio óptico (Olympus BX51) tanto qualitativa quanto quantitativamente.

Para obter uniformidade e proporcionalidade das amostras, para cada um dos quatro lobos hepáticos, foram feitos 4 cortes. Em cada corte, foram analisados 10 campos aleatórios. Foram analisados, no total, 40 campos aleatórios e não consecutivos por fígado de animal.

A estereologia foi realizada por meio da técnica convencional de contagem de pontos (*point-counting*), utilizando um sistema-teste, segundo método de Mandarim-de-Lacerda (2003) e Mandarim-de-Lacerda *et al.*, (2010). Cada ponto sobrepondo-se a uma determinada estrutura de referência foi quantificado e feita a relação:

$$V_v = P_p / P_t$$

em que:

V_v = densidade de volume da estrutura

P_p = pontos sobrepostos a estrutura analisada

P_t = total de pontos do sistema-teste utilizado.

A densidade de volume da estrutura é obtida em porcentagem, considerando-se um sistema-teste de 100 pontos. Com esse método, foram analisadas as V_v de hepatócitos, sinusóides, esteatose e necroses.

Foram quantificadas por área (cm^2) analisada, a quantidade de hepatócitos normais, hepatócitos binucleados e células inflamatórias.

As análises histológica e estereológica foram realizadas no fígado de camundongos e ratos.

3.3.14 Determinação do fluxo urinário

O fluxo urinário de cada animal foi calculado a partir do volume urinário e do tempo de permanência na gaiola metabólica em minutos:

$$FU (\text{mL/min}) = V (\text{mL}) / 1440 (\text{min})$$

Sendo, FU o fluxo urinário, V o volume de urina coletado em 24 horas (1440 minutos).

A determinação do fluxo urinário foi realizada com o modelo animal de ratos Wistar.

3.3.15 Determinação do ritmo de filtração glomerular

O ritmo de filtração glomerular (RFG) é uma medida direta da filtração glomerular e da função renal. Para determinar o RFG é necessário conhecer a quantidade de uma dada substância filtrada no glomérulo, em determinada unidade de tempo, e a sua concentração no filtrado glomerular. Desde que a substância utilizada seja completamente ultrafiltrada no glomérulo, sua concentração no filtrado glomerular será igual à sua concentração plasmática. Se, após ser filtrada, a substância não for secretada, reabsorvida, metabolizada e produzida ao longo do epitélio tubular, sua quantidade filtrada será igual à quantidade excretada na urina.

Para medir o RFG foi utilizado o clearance da creatinina corrigido pelo peso corpóreo de cada animal. A dosagem da creatinina plasmática e urinária foi realizada através de um método colorimétrico no laboratório veterinário ProLab diagnósticos (Rio de Janeiro, RJ). A creatinina reage em meio alcalino com o picrato, originando um complexo colorido. A leitura da absorbância do complexo formado é realizada a 500 nm em espectrofotômetro e é comparada com a leitura de um padrão de creatinina de 2 mg/dL, permitindo o cálculo da concentração de creatinina na amostra de plasma ou de urina analisada.

O RFG a partir do *clearance* da creatinina foi calculado através da seguinte equação:

$$\text{RFG (mL/min)} = \frac{\text{creatinina urinária (mg/dL)} \times \text{FU (mL/min) de 24 horas}}{\text{creatinina plasmática (mg/dL)}}$$

A determinação do RFG foi realizada com o modelo de ratos Wistar.

3.3.16 Índice renal

Foram pesados os animais minutos antes da eutanásia e, *pós-mortem*, também foram pesados os seus rins. A relação entre essas duas medidas fornece o índice renal que indicava possível dano ao órgão.

A determinação do índice renal foi realizada com modelo de ratos Wistar.

3.3.17 Determinação do *clearance* de MCYST

O *clearance* de uma substância é volume de plasma que é completamente depurado dessa substância pelos rins por unidade de tempo, determinada pela fórmula:

$$\text{Clearance}_{\text{MCYST}} \text{ (mL/min)} = \frac{\text{MCYST urinária (ng/mL)} \times \text{FU (mL/min) de 24h}}{\text{MCYST plasmática (ng/mL)}}$$

A determinação do *clearance* de MCYST foi realizada com o modelo ratos Wistar.

3.3.18 Determinação da fração de excreção de MCYST

A fração de excreção de uma substância é o *clearance* da mesma, relacionado com o *clearance* de outra substância padrão, no caso, a creatinina, conforme fórmula:

$$FE_{MCYST} (\%) = \frac{C_{MCYST}}{C_{creatinina}} \times 100$$

Onde: FE_{MCYST} é a fração de excreção da microcistina

C_{MCYST} é o *clearance* da microcistina

$C_{creatinina}$ é o *clearance* da creatinina

A determinação da fração de excreção de MCYST foi realizada com o modelo animal de ratos Wistar.

3.4. Análise estatística

Inicialmente os dados de todos os experimentos e análises foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov (com correção de Lilliefors) para avaliar a normalidade de suas distribuições. A seguir foi aplicado o teste da mediana de Levene para verificar a igualdade de variâncias. Em todos os casos, a normalidade foi obtida.

Com os experimentos de camundongos, com vários grupos amostrais, foram aplicadas a análise de variância para um fator (one-way ANOVA), seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas.

Com os experimentos de ratos, com dois grupos, foi realizada o análise de teste t com correção de Welch para comparação.

Em todos os testes, o nível de significância mínimo considerado foi de 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism versão 4.0 para Windows.

4 – RESULTADOS

4.1. Avaliação do acúmulo e parâmetros bioquímicos do processo de intoxicação por MCYST-LR no modelo animal de camundongos Suíços

Camundongos suíços injetados uma única vez com dose subletal de 45 µg/kg pc de MCYST-LR, foram amostrados nos seguintes tempos amostrais: 2, 8, 24,48 e 96 horas após a injeção. Foi analisada a concentração da toxina livre no fígado e soro, como mostra a Figura 7. As maiores concentrações de MCYST livre no fígado foram obtidas nos últimos tempos amostrais.

A MCYST livre no soro apresentou concentrações mais altas em 2 e 24 horas, com uma tendência à diminuição no último tempo amostral, sugerindo uma correlação com o acúmulo no fígado.

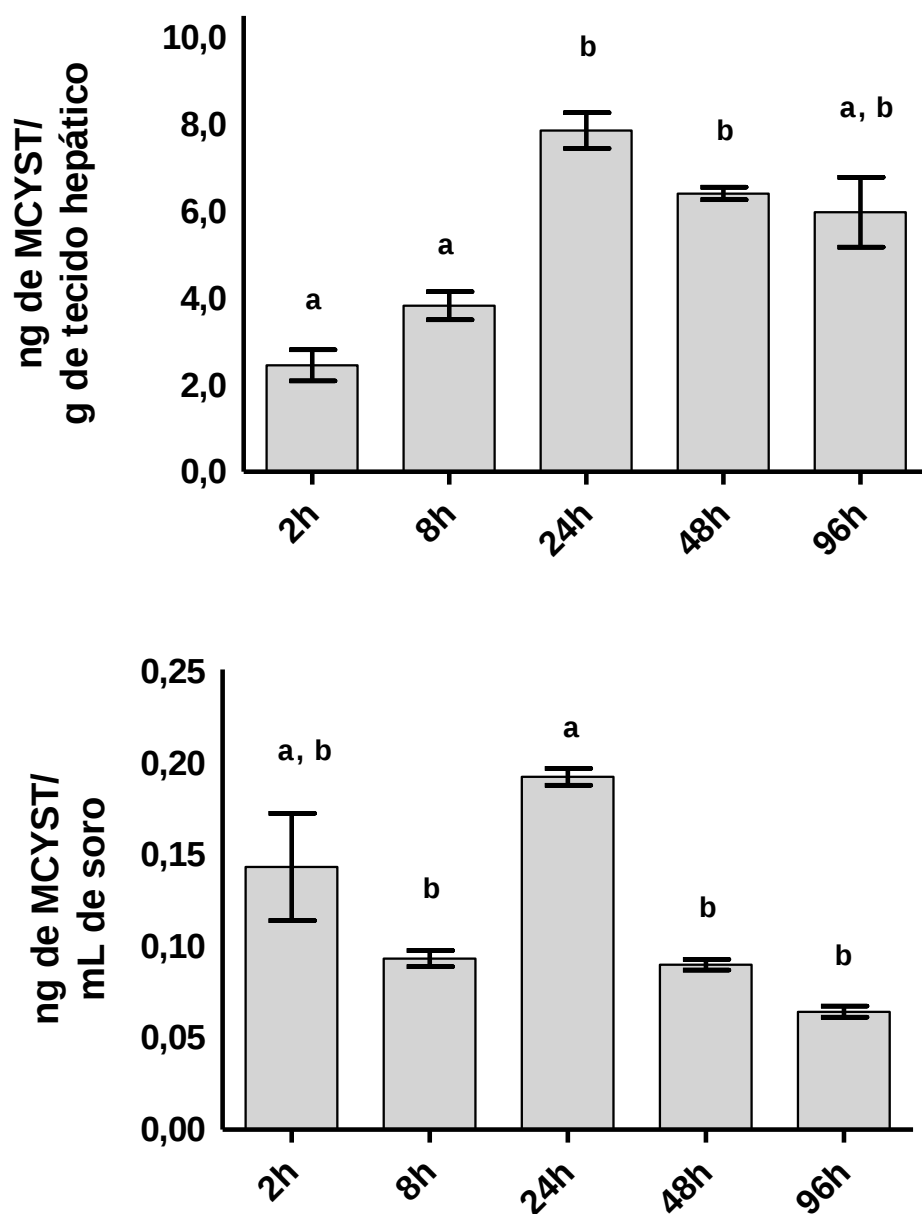


Figura 7: Concentração de MCYST livre (ng de MCYST/g de tecido) no fígado e soro de camundongos injetados via i.p. com 45 μ g de MCYST-LR/kg pc. Os animais controle foram injetados com solução salina. Valores indicam médias e erros padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa. $p < 0,001$. $n=5$.

Um processo agudo de desequilíbrio no sistema redox e estresse oxidativo pôde ser observado no fígado dos animais injetados com a toxina. A peroxidação lipídica, um dos primeiros efeitos de dano celular das espécies reativas de oxigênio, apresentou um aumento significativo no fígado 8 horas após a injeção de MCYST-LR (Figura 8).

Um perfil semelhante da peroxidação lipídica, foi observado analisando-se a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), que é uma das primeiras linhas de defesa do complexo enzimático anti-oxidante (Figura 9A). Essa enzima converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, que é, então, degradado em água e oxigênio pela enzima catalase (CAT) ou pela enzima glutathione peroxidase (GPx). A SOD apresentou um aumento em sua atividade em 8 horas. Já a CAT e a GPx apresentaram-se inibidas no mesmo tempo amostral (Figura 9B e 9C). A GPx, no entanto, se mostrou mais sensível já a partir das primeiras 2 horas após a injeção de MCYST-LR. A atividade das enzimas do complexo anti-oxidante alteradas, indicam o desequilíbrio no sistema redox do tecido.

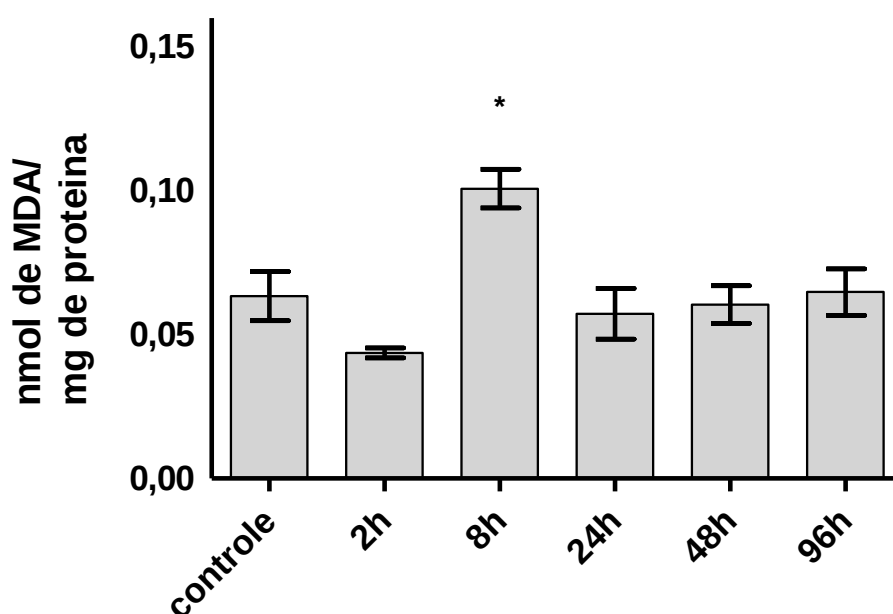


Figura 8: Peroxidação lipídica, mensurada pelo malondialdeído formado (nmol de MDA/mg de proteína) no fígado de camundongos injetados via i.p. com solução salina (controle) ou 45 µg de MCYST-LR/kg pc, amostrados em 2, 8, 24, 48 ou 96 horas após a exposição. Valores indicam médias e erros padrão. Símbolos indicam diferença significativa em relação ao controle.* $p < 0,05$. $n=5$.

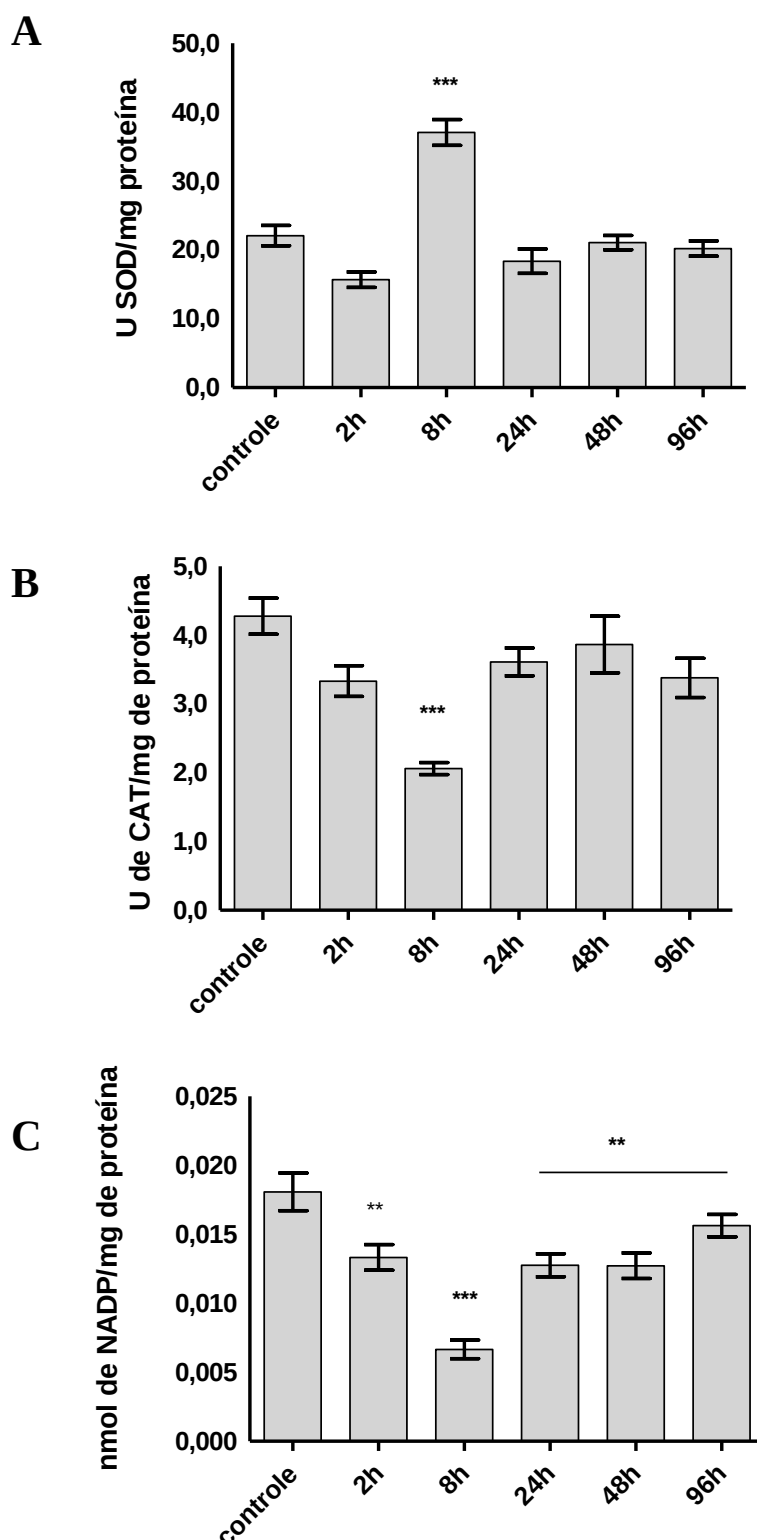


Figura 9: Atividade de enzimas do complexo anti-oxidante (superóxido dismutase, catalase e GPx) no fígado de camundongos injetados via i.p. com solução salina (controle) ou 45 μ g de MCYST-LR/kg pc, amostrados em 2, 8, 24, 48 ou 96 horas após a exposição. A: Atividade da SOD (U de SOD/mg de proteína). B: Atividade da catalase (U de atividade de CAT/mg de proteína). C: Atividade da GPx (nmol de NADP/mg de proteína). Valores indicam médias e erros padrão. Símbolos indicam diferença significativa em relação ao controle. *** $p < 0,001$. ** $p < 0,01$. * $p < 0,05$. $n = 5$.

O processo de detoxificação de MCYST pode ser catalizado pela enzima glutiona S-transferase (GST). A atividade dessa enzima no fígado de animais intoxicados apresentou aumento significativo nos dois primeiros tempos amostrais (2 e 8h), apresentando tendência a se igualar aos níveis do controle até o final do período amostral (Figura 10).

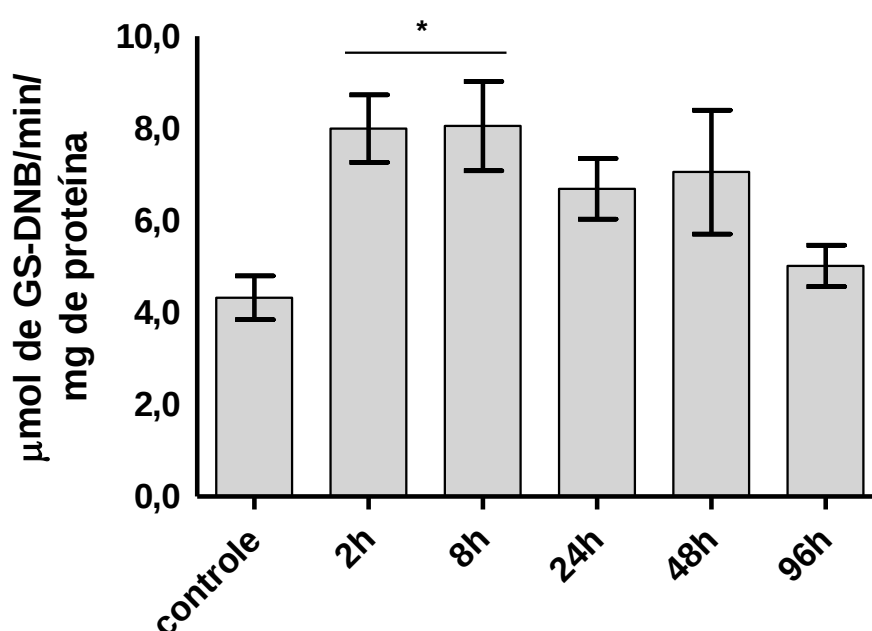


Figura 10: Atividade de enzima glutiona S-transferase (μmol de GS-DNB/min/mg de proteína) no fígado de camundongos injetados via i.p. com solução salina (controle) ou $45 \mu\text{g}$ de MCYST-LR/kg pc, amostrados em 2, 8, 24, 48 ou 96 horas após a exposição. Valores indicam médias e erros padrão. Símbolo indica diferença significativa em relação ao controle. * $p < 0,05$.

Ainda nesse experimento, foi feita a tentativa de estimar a inflamação tecidual através de um metabólito de óxido nítrico, importante mediador inflamatório produzido por macrófagos e células endoteliais, principalmente. O óxido nítrico não é um composto estável e, por esse motivo, o método utilizado detecta o nitrito. O mesmo apresentou uma

diminuição na sua concentração no primeiro tempo amostral e manteve uma tendência a oscilação nas concentrações até o último tempo de análise, como mostra a figura 11. Esse resultado indica que a análise de nitrito não é um bom indicador para inflamação provocada pela intoxicação por MCYST.

Outro parâmetro bioquímico indicativo de inflamação tecidual é a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), expressa principalmente por neutrófilos sendo sua atividade utilizada como indicador de infiltração dos mesmos no tecido. Nos fígados analisados, houve uma redução da atividade da MPO nos animais injetados com MCYST a partir de 8 horas após a injeção. Essa redução se tornou permanente por todos os tempos amostrais seguintes, como mostra a figura 12. O resultado demonstra que a MPO não é bom indicador para inflamação provocada pela intoxicação por MCYST.

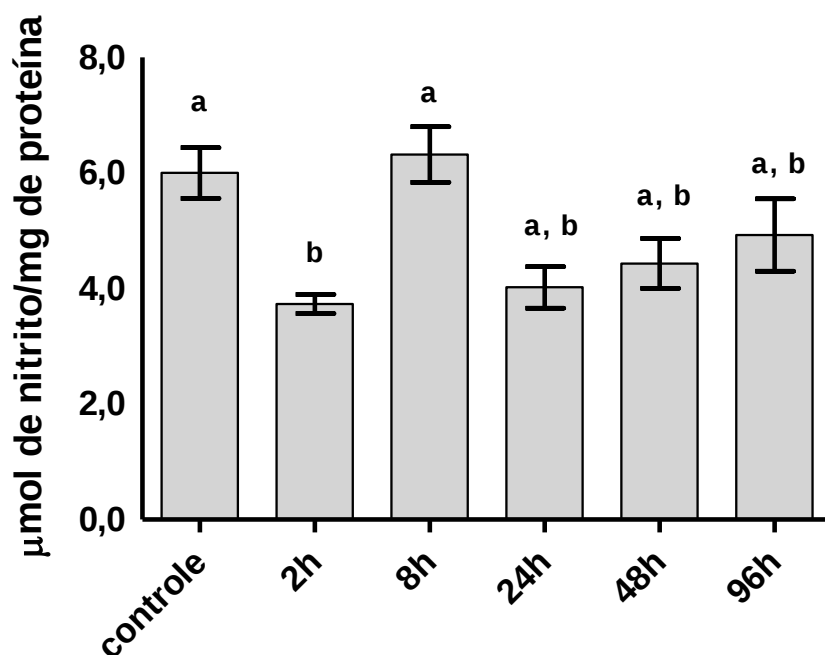


Figura 11: Concentração de nitrito ($\mu\text{mol/mg}$ de proteína) no fígado de camundongos injetados via i.p. com solução salina (controle) ou $45 \mu\text{g}$ de MCYST-LR/kg pc, amostrados em 2, 8, 24, 48 ou 96 horas após a exposição. Valores indicam médias e erros padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa. $p < 0,01$. $n = 5$.

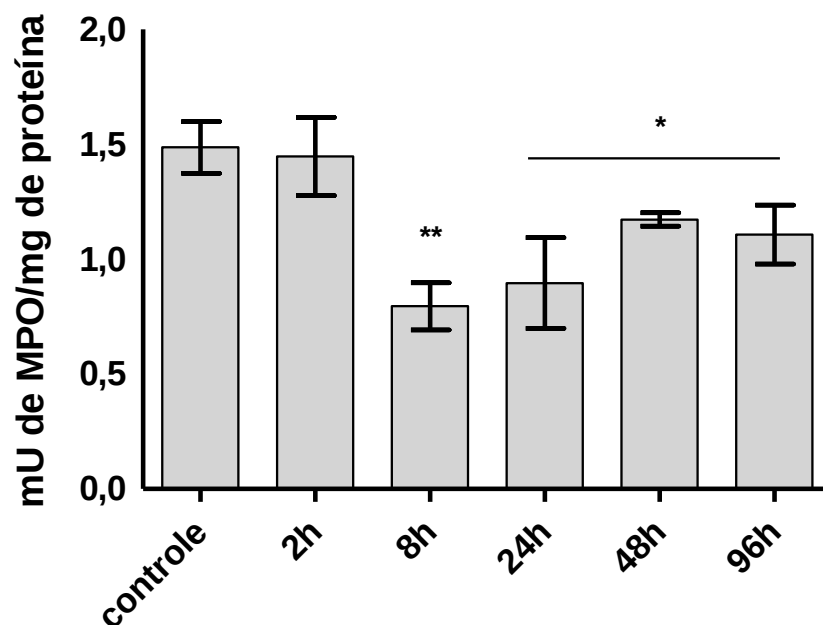


Figura 12: Atividade da mieloperoxidase (mU de atividade da MPO/mg de proteína) no fígado de camundongos injetados via i.p. com solução salina (controle) ou 45 µg de MCYST-LR/kg pc, amostrados em 2, 8, 24, 48 ou 96 horas após a exposição. Valores indicam médias e erros padrão. Símbolos indicam diferença significativa em relação ao controle. * $p < 0,05$ p ** $p < 0,001$. n=5.

4.2. Avaliação dos efeitos de microcistina-LR na função hepática, histologia e estereologia no modelo animal de camundongos Suíços

A função normal do fígado pode ser avaliada pela concentração de enzimas hepáticas no soro. O fígado lesionado libera enzimas do metabolismo hepático no sangue, dentre estas pode-se citar as transaminases: alanina transaminase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST). A concentração sérica de AST apresentou grande aumento nos animais-teste desde o primeiro tempo amostral (2 horas), não retornando ao nível do controle até o último tempo amostral (96 horas), conforme demonstrado na Figura 13. Da mesma forma, a concentração sérica de ALT apresentou aumento nos tempos iniciais de análise, até 24 horas. Porém, a partir de 48 horas, já se encontravam próximas ao grupo controle.

As proteínas fosfatases 1 e 2A apresentaram atividade conjunta diminuída, como demonstrado na Figura 14. A inibição da atividade já se apresenta reduzida logo nos primeiros tempos amostrais sendo significativa a partir de 8 horas.

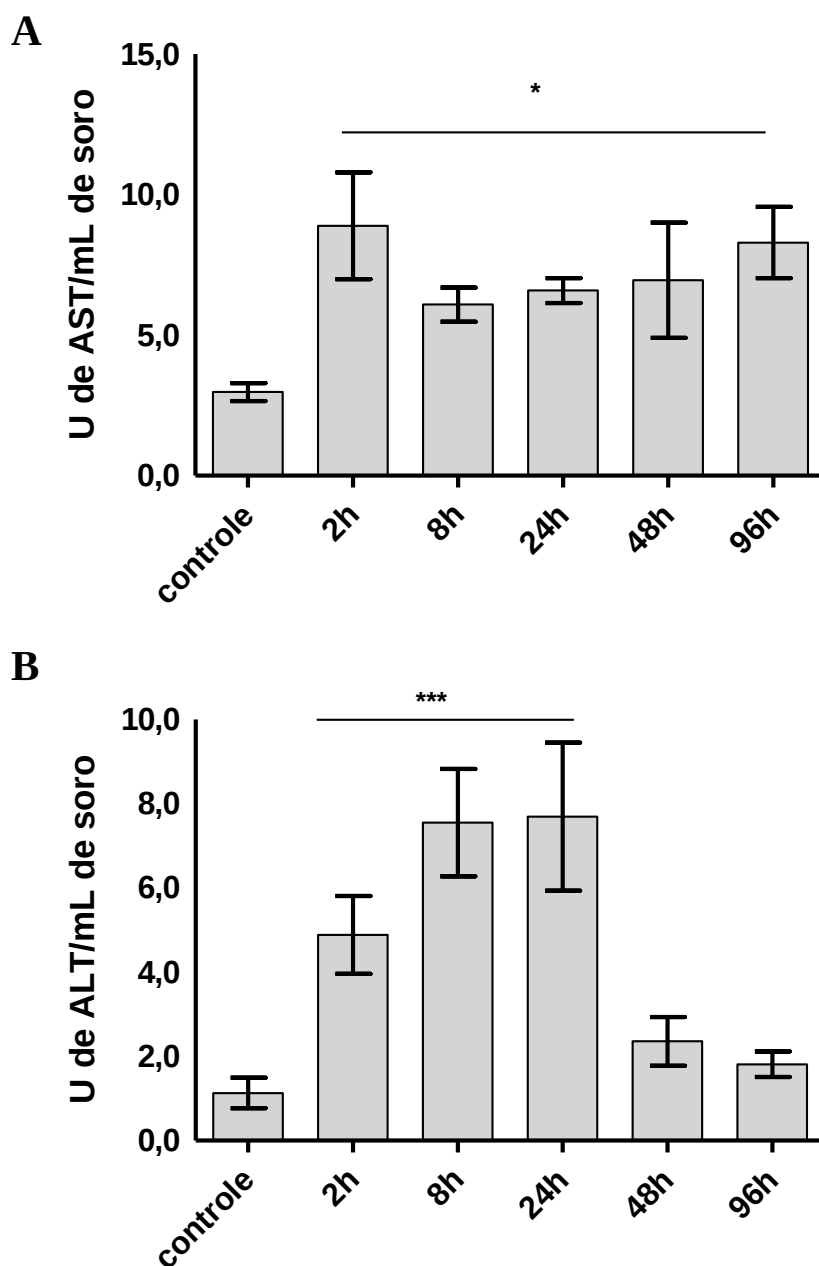


Figura 13: Níveis séricos de marcadores de dano hepático em camundongos injetados via i.p. com solução salina (controle) ou 45 μ g de MCYST-LR/kg pc, amostrados em 2, 8, 24, 48 ou 96 horas após a exposição. A: Atividade da aspartato aminotransferase (U de AST/mL de soro). B: Atividade da alanina transaminase (U de ALT/mL de soro). Valores indicam médias e erros padrão. Símbolos indicam diferença significativa em relação ao controle. * $p < 0,05$ p *** $p < 0,001$. n=5.

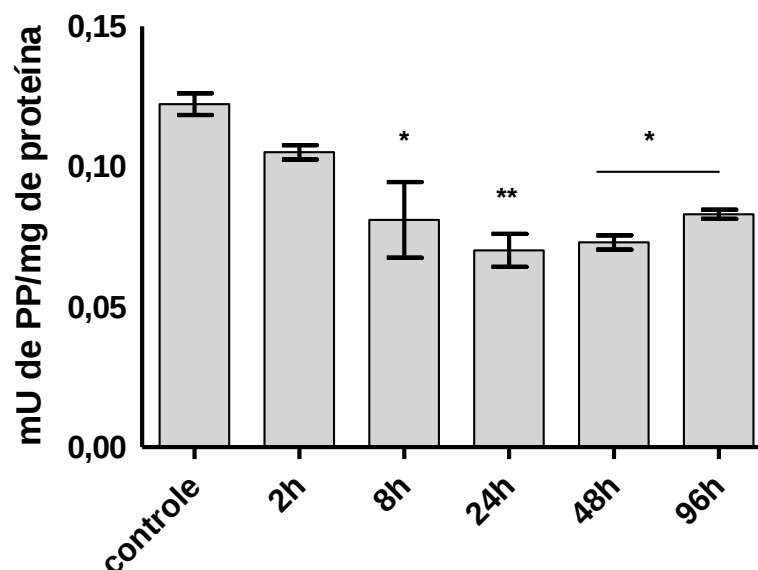


Figura 14: Atividade das proteínas fosfatases 1 e 2A (mUde PP/mg de proteína) no fígado de camundongos injetados com solução salina (controle) ou 45 µg de MCYST-LR/kg pc, amostrados 2, 8, 24, 48 ou 96 horas após a exposição. Valores indicam médias e erros padrão. Símbolos indicam diferença significativa em relação ao controle. * $p < 0,05$ p ** $p < 0,01$. n=5.

Os dados que indicam alterações bioquímicas de desequilíbrio no sistema redox e dano oxidativo corroboram os resultados de inflamação obtidos com a análise qualitativa das lâminas histológicas de fígado de camundongo (Figura 15). Os mesmos demonstram um processo inflamatório e dano tecidual persistente. O acúmulo de lipídio citoplasmático nos hepatócitos foi detectado frequentemente, assim como a maior incidência de células binucleadas. Ambas as observações são comumente verificadas em processos de injúria ao fígado. Pontos necróticos também foram bastante observados.

Células inflamatórias, mononucleadas e polimorfonucleadas, foram observadas em maior quantidade ao longo de todo o tecido, em todos os tempos amostrais, concentrando-se principalmente perto dos vasos e de áreas necrosadas.

De forma temporal, em 2 horas já se observa o dano tecidual, evidenciado por esteatose e alguns pontos de necrose e inflamação. Em 8 horas, a esteatose permanece e aumentam pontos de necrose, assim como de

inflamação, que permanecem até 24 horas. Nos tempos subsequentes parece haver melhora para a esteatose. Contudo, pode-se analisar que não houve recuperação do dano histológico uma vez que há aumento de pontos com morte celular e de inflamação (Tabela 2).

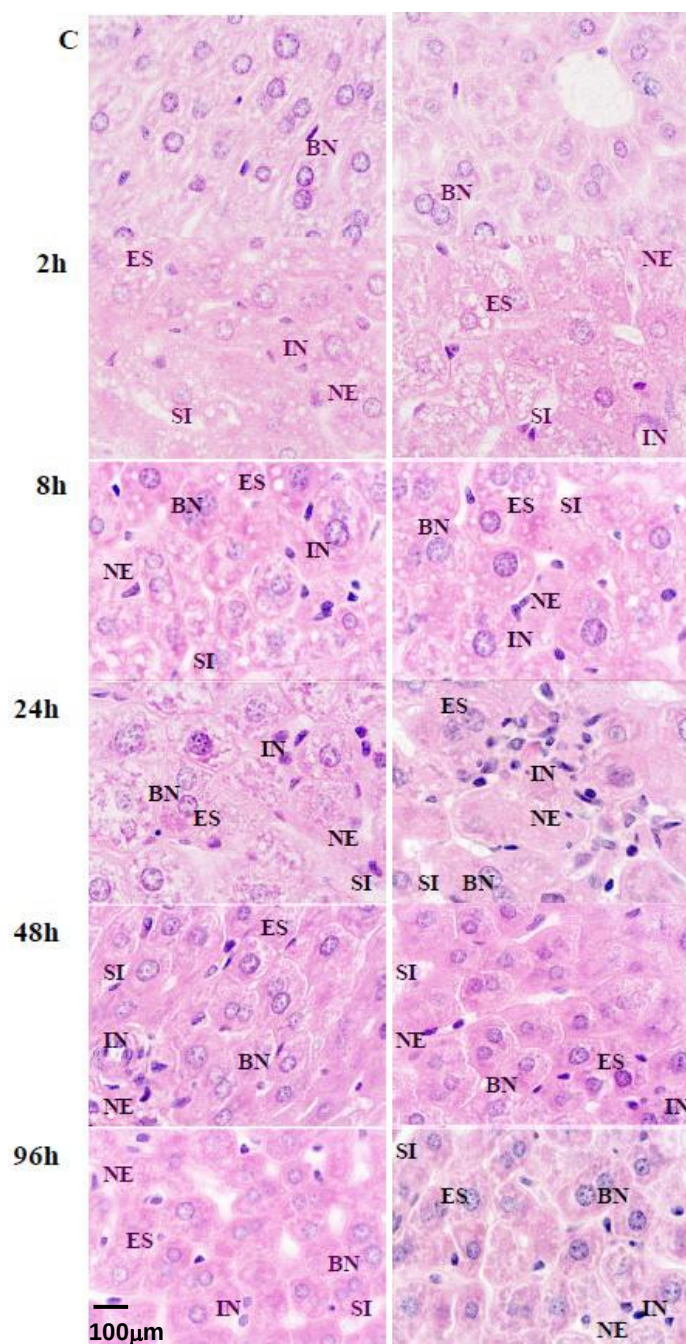


Figura 15: Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado (1000x) coradas por hematoxilina-eosina. Fotos representativas de fígado de camundongos injetados via i.p. com solução salina (controle) ou 45 µg de MCYST-LR/kg pc, amostrados em 2, 8, 24, 48 ou 96 horas após a exposição. As letras indicam: IN-inflamação, ES- esteatose, BN- binucleação, NE- necrose, SI- aumento do calibre dos sinusóides.

As análises estereológicas, que possibilitaram a quantificação do volume das estruturas hepáticas, confirmam a análise qualitativa (Figura 16). O volume dos hepatócitos diminuiu em relação ao controle e o pior dano foi observado 8 horas após a exposição à MCYST. Nos tempos amostrais subsequentes, houve uma tendência à recuperação do volume dos hepatócitos, em relação aos tempos iniciais, porém ainda apresentam diferença em relação ao grupo controle.

Ainda de forma quantitativa, o número de hepatócitos por área apresentou diminuição nos grupos tratados com MCYST, com uma tendência a recuperação posterior. A binucleação dos hepatócitos também foi um importante parâmetro alterado, apresentando um aumento significativo progressivo até o último tempo de análise (Tabela 2).

A MCYST parece ter causado aumento do volume dos sinusóides, porém nenhum grupo tratado com MCYST apresentou diferença estatística quanto ao volume dos vasos na metodologia utilizada (Figura 16).

Pôde-se detectar muitos pontos de esteatose nos primeiros tempos amostrais. A partir de 24 horas, esse dano foi diminuído, mas ainda permaneceu maior que o grupo controle.

Os fígados dos camundongos injetados com MCYST apresentaram necrose em todos os tempos amostrais chegando a mais de 20% de densidade de volume no fígado dos animais do grupo de 48 horas.

Já a inflamação pôde ser quantificada pelo infiltrado de células do sistema imune. Esse processo se iniciou já nas primeiras horas após a exposição e se manteve ao longo do tempo experimental, com tendência ao aumento. As maiores concentrações de células inflamatórias foram observadas nos últimos tempos amostrais: 48 e 96 horas.

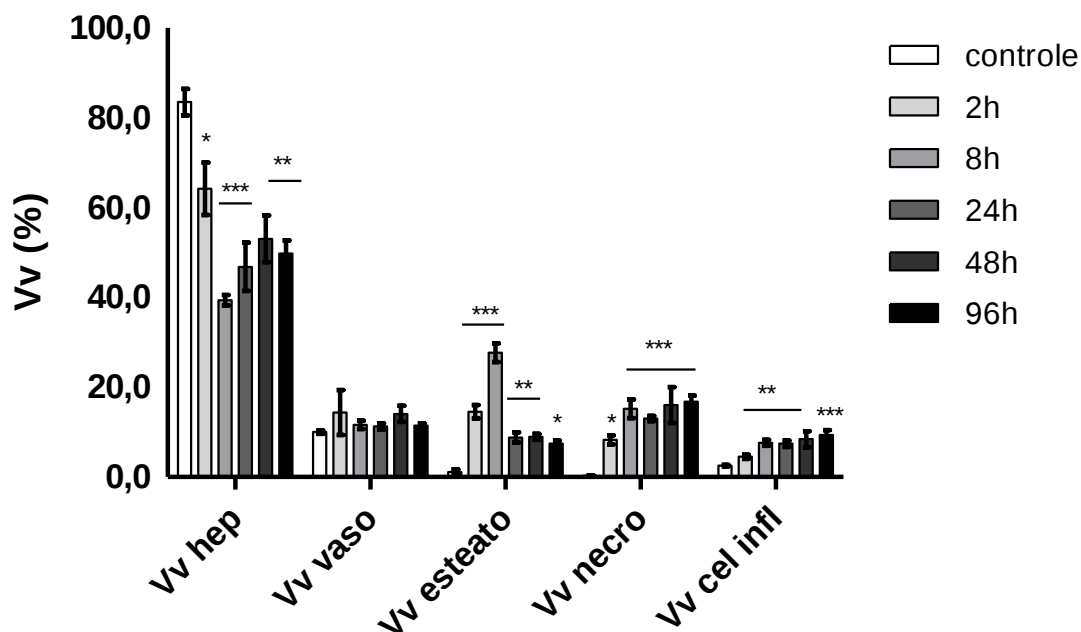


Figura 16: Estereologia do fígado de camundongos injetados via i.p. com solução salina (controle) ou 45 µg de MCYST-LR/kg pc, amostrados em 2, 8, 24, 48 ou 96 horas após a exposição. A densidade de volume, em porcentagem, foi analisada para hepatócitos (Vv hep), vasos (Vv vasos), esteatose (Vv esteato), necrose (Vv necro) e células inflamatórias (Vv cel infl). Os dados foram obtidos analisando-se 10 campos dos 4 lobos de cada animal de cada grupo (n=5). Valores indicam médias e erros padrão. Os símbolos indicam diferença significativa. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Tabela 2: Estereologia do fígado de camundongos controle, injetados com MCYST-LR e analisados em diferentes tempos amostrais

	controle	2h	8h	24h	48h	96h
hep/ área (cm ²)	4023,3 ± 188,1	4067,0 ± 308,7	3075,1 ± 286,6	3374,5 ± 382,6	3708,9 ± 212,8	3618,6 ± 290,1
% hep binucle	16,66 ± 0,77	26,24 ± 0,61	23,73 ± 0,99	31,82 ± 0,80	29,59 ± 0,93	38,10 ± 1,35

Nota: hepatócitos/área (hep/área), em cm². Porcentagem de hepatócitos binucleados (% hep binucle). Valores com símbolo indicam diferença significativa em relação ao controle. * p<0,05. *** p<0,001.

Média e SEM obtidos com 10 campos de cada um dos 4 lobos, de cada animal do grupo (n=5).

4.3. Avaliação de parâmetros dos processos de estresse oxidativo e detoxificação de microcistina-LR, e efeitos da mesma sobre a histologia e estereologia hepática no modelo animal de ratos Wistar

Os ratos Wistar, injetados uma única vez com dose de 55 µg/Kg de pc, foram analisados 24 horas após a injeção. A análise histológica qualitativa do fígado dos ratos, da mesma forma que em camundongos, demonstrou um processo inflamatório e dano tecidual, principalmente próximo a vasos e sinusóides.

O acúmulo de lipídio citoplasmático nos hepatócitos foi também detectado de forma freqüente, assim como a maior incidência de células binucleadas.

Pôde-se observar uma diminuição do volume e da arquitetura da célula hepática e da organização do tecido e dos vasos. Ademais, pôde-se visualizar o aumento do calibre dos sinusóides.

Fotomicrografias representativas do fígado de animais controle e de animais injetados com MCYST-LR estão apresentadas na Figura 17.

Os parâmetros morfométricos analisados por estereologia indicaram o aumento do calibre dos sinusóides, da esteatose, da necrose e da binucleação. Em contraponto, o volume dos hepatócitos e a concentração dos mesmos por área diminuíram nos animais-teste, como mostra a Tabela 3.

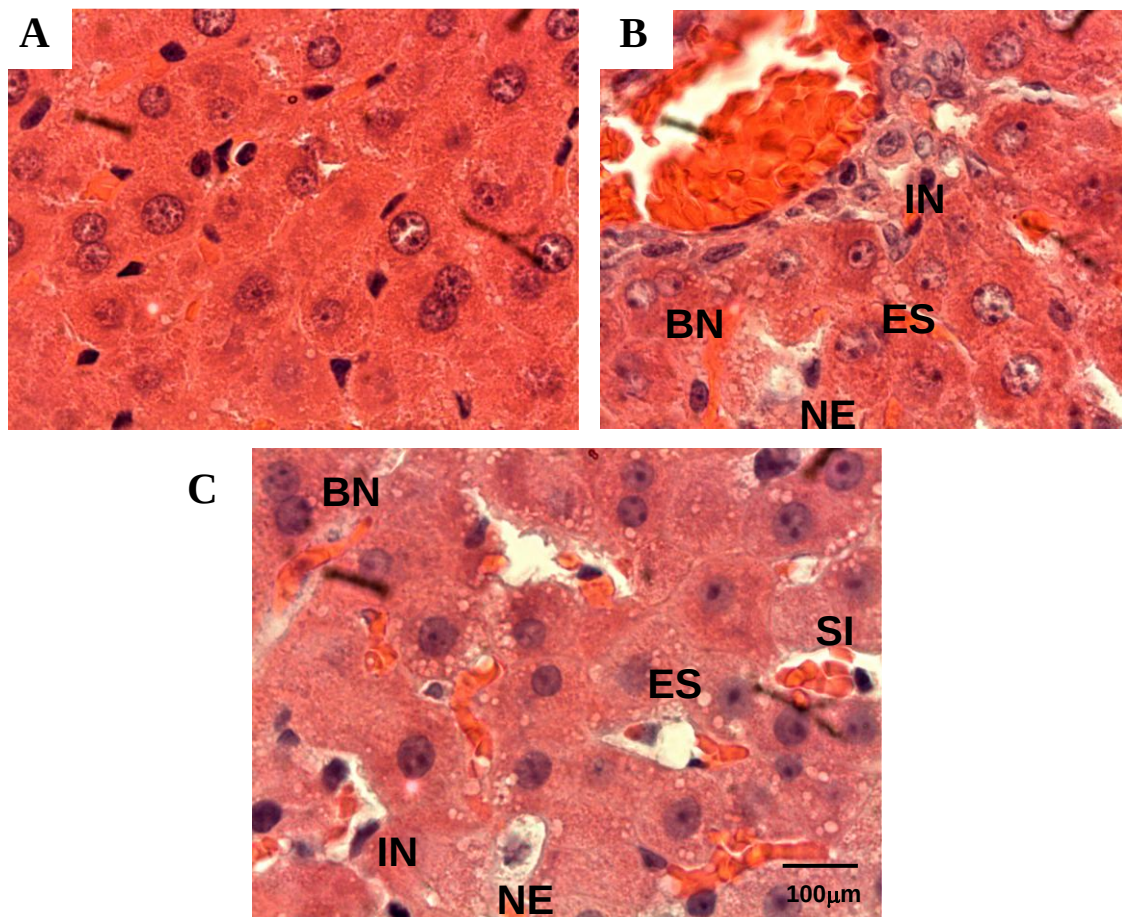


Figura 17: Fotomicrografias do fígado (1000x) de ratos Wistar coradas por hematoxilina-eosina. Fotos representativas de fígado de ratos. Os animais-teste foram injetados por via i.p. com 55 µg de MCYST-LR/kg pc e os animais-controle foram injetados com solução salina. A: Foto representativa do tecido hepático de animais controle. B: Foto representativa do dano próximo aos vasos sanguíneos no fígado de animais-teste. C: Foto representativa do dano tecidual no fígado de animais-teste. As letras indicam: IN-inflamação, ES-esteatose, BN-binucleação, NE-necrose, SI-aumento do calibre dos sinusóides.

Tabela 3: Estereologia do fígado de ratos Wistar controle e injetados com MCYST

	Hep/área (cm ²)	Vv Hep	Vv vasos	Vv esteato	Vv necro	N total de hep bin/ 100 campos
controle	1943,59 ± 636,19	60,0% ± 18,0%	16,5% ± 6,0%	5,3% ± 1,7%	0,0% ± 0,0%	67,00 ± 2,0
MCYST	1708,58 ± 238,62	36,2%*** ± 11,1%	21,4% ± 6,9%	30,3%*** ± 5,1%	18,3%*** ± 2,2%	105,00*** ± 3,0

Nota: Ratos injetados via i.p. com solução salina (controle) ou com 55 µg de MCYST-LR/Kg de pc e amostrados após 24 horas (MCYST). Parâmetros analisados: hepatócitos/área (hep/área), volume dos hepatócitos (VvHep), volume dos vasos (VvVasos), volume de esteatoses (VvEsteato), volume de necroses (VvNecro) e número total de hepatócitos binucleados a cada 100 campos (Ntotal de hep bi/100 campos). Valores indicam médias e erros padrão. Símbolo indica diferença significativa. p<0,001. n=6.

O provável estresse oxidativo foi parcialmente analisado tanto no fígado quanto no rim dos animais injetados com MCYST-LR pela atividade da enzima catalase, como apresentado na Figura 18. A atividade da enzima esteve alterada em ambos os órgãos: aumentada no fígado e diminuída no rim.

Os peptídeos de glutathione reduzida, oxidada e a relação entre os dois apresentaram aumento em suas concentrações no fígado de ratos injetados com MCYST, conforme demonstrado na Figura 19.

No rim desses animais, a glutathione reduzida apresentou um decréscimo em sua concentração. Em contraponto, a concentração renal de glutathione oxidada aumentou. A relação entre esses dois peptídeos diminuiu em relação ao controle, conforme demonstrado na Figura 20. Já a atividade da GST não apresentou alteração no fígado nem no rim (dado não mostrado).

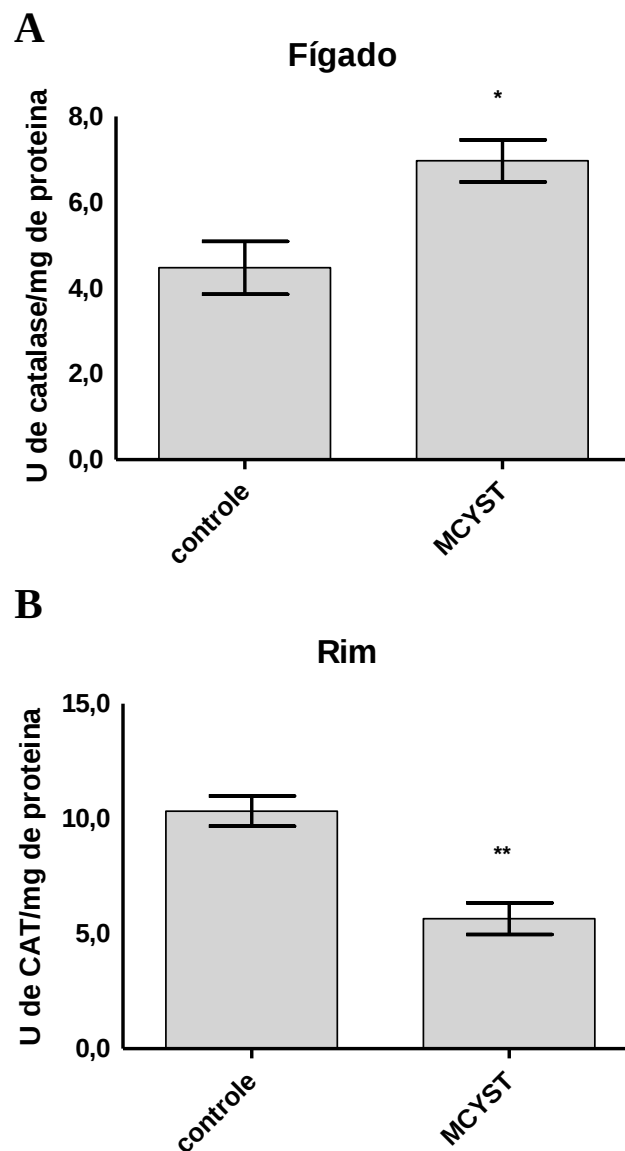


Figura 18: Atividade da catalase (U de atividade de catalase/mg de proteína) em órgãos de ratos controle e teste. Os animais-teste foram injetados por via i.p. com 55µg de MCYST-LR/kg pc e os animais-controle foram injetados com solução salina. A: atividade da catalase no fígado. B: atividade da catalase no rim. Valores indicam médias e erros padrão. Símbolos indicam diferença significativa. * $p < 0,05$. ** $p < 0,001$. $n = 6$.

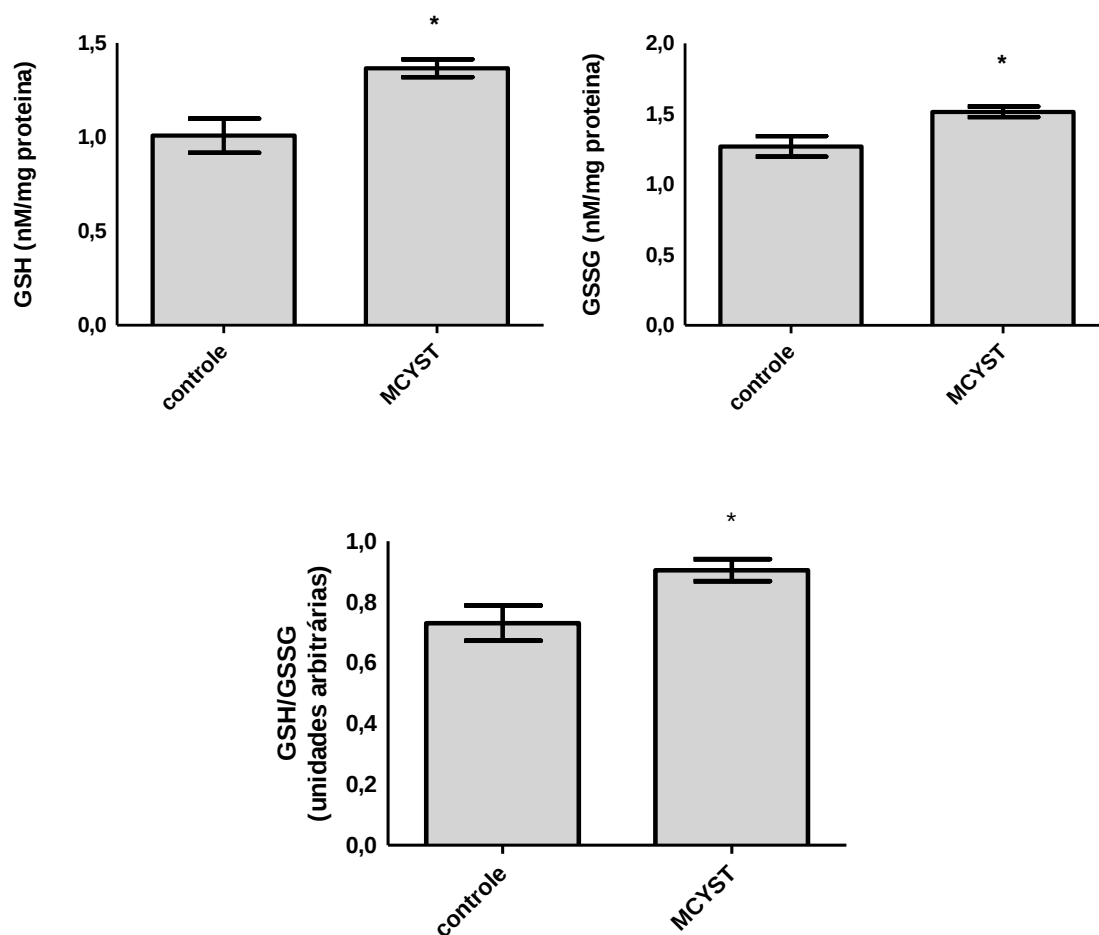


Figura 19: Concentração de GSH, GSSH e relação entre os dois peptídeos no fígado de ratos injetados por via i.p. com solução salina (controle) ou 55 μ g de MCYST-LR/kg pc e amostrados após 24 horas (MCYST). Valores indicam médias e erros padrão. Símbolo indica diferença significativa em relação ao controle. * $p < 0,05$. $n = 6$.

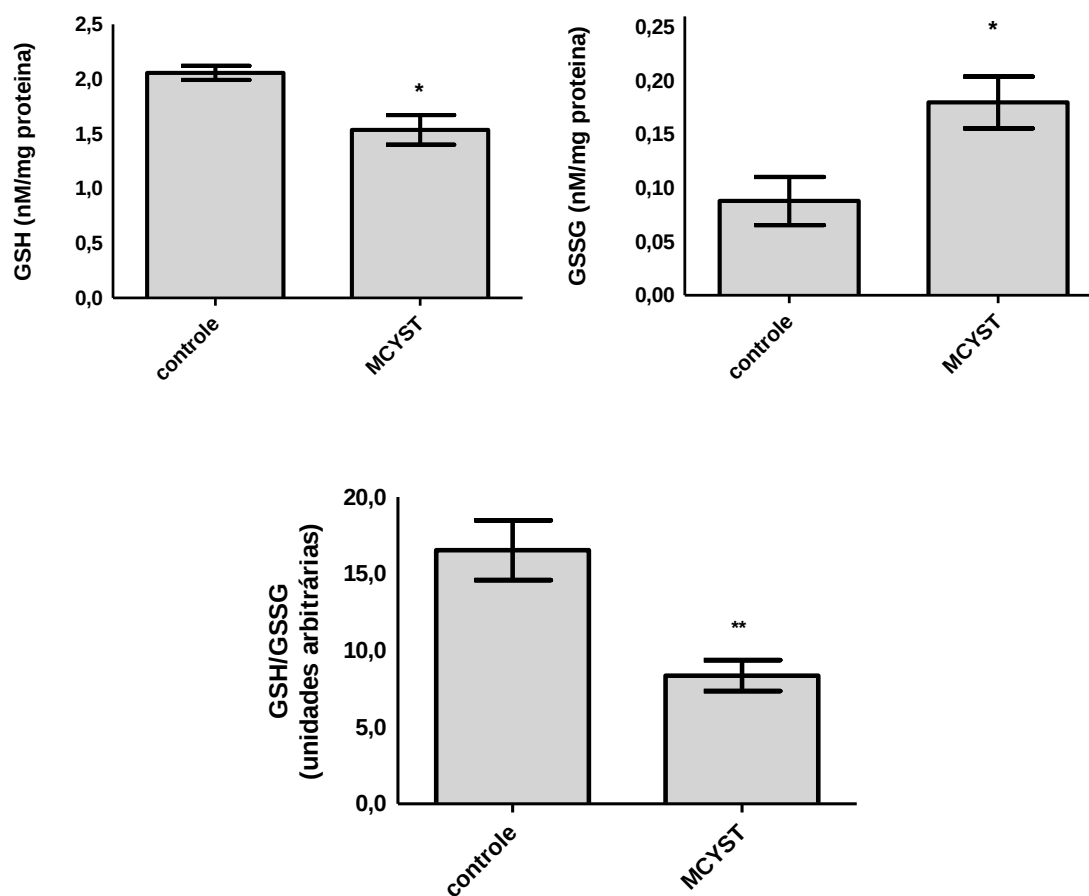


Figura 20: Concentração de GSH, GSSG e relação entre os dois peptídeos no rim de ratos injetados por via i.p. com solução salina (controle) ou 55 µg de MCYST-LR/kg pc e amostrados após 24 horas (MCYST). Valores indicam médias e erros padrão. Símbolo indica diferença significativa em relação ao controle. * $p < 0,05$. $n = 6$.

4.4. Avaliação de alterações metabólicas induzidas por microcistina-LR em modelo animal de ratos Wistar

Para analisar parâmetros metabólicos de ratos Wistar, os mesmos foram colocados em gaiolas metabólicas individuais. A gaiola metabólica possibilita a obtenção de dados de consumo de água e alimento, além da produção de fezes e urina.

Os ratos injetados com MCYST apresentaram, de forma geral, um comportamento pouco ativo. Houve menor consumo de ração e maior consumo de água, como mostra a Tabela 4.

Após as 24 horas de experimento, o peso corpóreo do animal não se alterou significativamente, bem como o peso do fígado, como mostra a Tabela 5. Já o peso do rim aumentou e com isso, o índice renal se alterou, como demonstrado na Figura 21.

Além disso, a produção de fezes pelos ratos injetados com MCYST foi diminuída e a produção de urina, medida pelo fluxo urinário, aumentou (Tabela 6).

Tabela 4: Consumo de água e ração por ratos controle e injetados com MCYST

	Controle	MCYST
Consumo de água (mL/hora)	0,6713 ± 0,1131	1,420 ± 0,1726 **
Consumo de ração (g/hora)	0,6274 ± 0,0366	0,3296 ± 0,0501 ***

Nota: Ratos injetados via i.p. com solução salina (controle) ou com 55µg de MCYST-LR/Kg de pc e amostrados após 24 horas (MCYST). Valores indicam médias e erros padrão. ** p<0,01. *** p<0,001 n=6.

Tabela 5: Peso corpóreo e dos órgãos analisados

	Controle	MCYST
Corpo (g)	282,20 ± 12,82	279,0 ± 10,55
Fígado (g)	10,07 ± 0,46	10,19 ± 0,26
Rins (g)	1,918 ± 0,07	2,367 ± 0,16 *

Nota: Ratos injetados via i.p. com solução salina (controle) ou com 55 µg de MCYST-LR/Kg de pc e amostrados após 24 horas (MCYST). Valores indicam médias e erros padrão. * p<0,05. n=6.

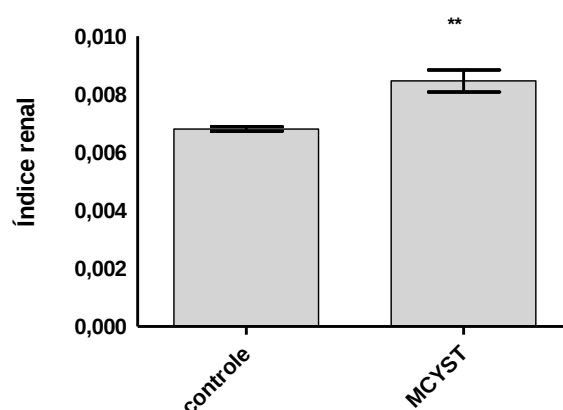


Figura 21: Índice renal (massa renal/massa corpórea) de ratos injetados via i.p. com solução salina (controle) ou com 55 µg de MCYST-LR/Kg de pc e amostrados após 24 horas (MCYST). Valores indicam médias e erros padrão. Símbolo indica diferença significativa em relação ao controle. **p<0,01. n=6.

Tabela 6: Produção de excretas

	Controle	MCYST
Fluxo urinário (mL/min)	12,12 ± 2,43	30,37 ± 4,45
Produção fecal (g)	9,69 ± 0,96	2,75 ± 0,53

Nota: Ratos injetados via i.p. com solução salina (controle) ou com 55 µg de MCYST-LR/Kg de pc e amostrados após 24 horas (MCYST). Valores indicam médias e erros padrão. Todos os parâmetros tiveram diferença estatística em relação ao controle. p<0,0001. n=6.

A MCYST livre pôde ser detectada no soro, fígado, rim, fezes e urina dos animais injetados, conforme mostrado na Tabela 7 e 8.

Analisando-se a concentração de creatinina no soro e na urina, se obtém o dado de Ritmo de Filtração Glomerular (RFG), que infere sobre a função renal. Assim foi possível observar que o RFG dos ratos injetados com MCYST foi aumentado em relação ao controle, como mostra a Figura 22.

Já o clearance de uma substância é o quanto de soro é depurado de uma determinada substância na forma livre / minuto / cm^2 . Essa informação mostra a capacidade de filtração do glomérulo para a substância e sua persistência no organismo. O clearance da MCYST está indicado na Tabela 9. Na mesma tabela, pode-se obter a fração de excreção da MCYST e o valor obtido (acima de 100%) demonstra ter havido secreção da mesma.

Tabela 7: Concentração de MCYST no soro e tecidos de ratos Wistar expostos a MCYST

	SORO (ng/mL)	FÍGADO (ng/g de tecido)	RIM (ng/g de tecido)
Média da concentração de MCYST livre	0,5 ± 0,2	377,5 ± 43,7	113,5 ± 21,9

Nota: Ratos injetados via i.p. com 55 μg de MCYST-LR/Kg de pc e amostrados após 24 horas (MCYST). Valores indicam médias e erros padrão. n=6.

Tabela 8: Concentração de MCYST nas excretas e detoxificação em 24 horas

	Concentração de MCYST livre (ng/mL ou ng/g)	Eliminação de MCYST livre em 24 horas (ng)
Urina	73,27 ± 14,95	2225,21 ± 3,32
Fezes	229,3 ± 31,68	619,11 ± 15, 84

Nota: Ratos injetados via i.p. com 55 µg de MCYST-LR/Kg de pc e amostrados após 24 horas. n=6.

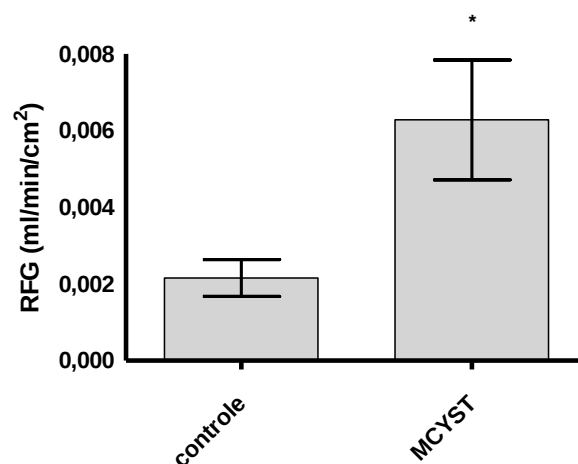


Figura 22: Ritmo de filtração Glomerular (RFG) de ratos injetados via i.p. com solução salina (controle) ou com 55 µg de MCYST-LR/Kg de pc e amostrados após 24 horas (MCYST). Valores indicam médias e erros padrão. Símbolo indica diferença significativa em relação ao controle. *p<0,05. n=6.

Tabela 9: Clearance e Fração de Excreção de MCYST

Clearance de MCYST (mL/min/cm²)	Fração de Excreção de MCYST (%)
0,009 ± 0,003	137,8 ± 9,1

Nota: Ratos injetados via i.p. com 55 µg de MCYST-LR/Kg de pc e amostrados após 24 horas. Valores indicam médias e erros padrão. n=6.

5 – DISCUSSÃO

A presença da MCYST na forma livre no soro de camundongos até 96 horas, após uma injeção única e subletal, demonstra a persistência da mesma na circulação. A persistência dessa toxina no organismo já foi demonstrada anteriormente em dados preliminares obtidos para a minha monografia, onde ratos injetados intraperitonealmente com uma única dose subletal da MCYST permaneceram com a toxina livre e circulante no soro por até três semanas (último tempo de análise) (MATTOS, 2008). No mesmo trabalho, foi demonstrado dano ao tecido pulmonar por até sete semanas (último tempo de análise). Ademais, outros trabalhos prévios de nosso grupo também demonstraram a longa permanência da MCYST no organismo de murinos e humanos (SOARES, 2005; SOARES *et al.*, 2006).

Mediante ao fato abordado, deve-se ter uma preocupação maior com exposições subletais e crônicas, onde acredita-se que sejam as mais comuns tanto para a população humana quanto para animais. Exposições crônicas seriam acumulativas, o que amplificaria os efeitos tóxicos. Esse fato é de grande relevância para a determinação de uma TDI (ingestão diária tolerável) de MCYST para a água de consumo humano. Uma vez que a toxina permanece muito tempo nos organismos, doses frequentes teriam suas concentrações somadas e seus efeitos sistêmicos amplificados.

Além disso, comparando-se a concentração de MCYST no soro e no fígado, pode-se observar uma toxicodinâmica de acúmulo da toxina no órgão. As maiores concentrações de MCYST no soro ocorreram nos primeiros tempos amostrais. Em contraponto, as maiores concentrações da toxina no fígado ocorreram nos últimos tempos amostrais. Com isso, pode-se inferir que possivelmente grande parte da MCYST saiu da circulação e foi acumulada no fígado, como abordado pela literatura (Figura 7) (ROBINSON *et al.*, 1989, 1991a; ITO *et al.*, 2000; CARMICHAEL *et al.*, 2001).

Embora haja o acúmulo de MCYST no fígado, alguns trabalhos indicam que possa haver liberação da MCYST do tecido de volta para a circulação. Esse processo seria em decorrência de um possível “*turnover*” ou reciclagem, das proteínas fosfatases. As PP inativas, ligadas à MCYST, seriam

catabolizadas. Com a quebra da PP, a MCYST ficaria livre, podendo recircular. Esse perfil de recirculação da MCYST foi observado e discutido anteriormente por Soares *et al.*, (2006). Os autores analisaram, através do método de ELISA, o soro de pacientes de hemodiálise contaminados uma única vez, a princípio, por MCYST na cidade do Rio de Janeiro. Um mês após a considerada data de exposição, houve aumento dos níveis séricos de MCYST livre nos pacientes. O resultado observado na exposição humana foi confirmado experimentalmente com ratos Wistar (SOARES, 2005). Considera-se a possibilidade de que essa toxina recirculante ainda esteja biologicamente ativa, causando danos contínuos aos tecidos.

Em relação ao processo de detoxificação da MCYST, no presente trabalho, a atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) no fígado de camundongos apresentou um aumento nos primeiros tempos amostrais: 2 e 8 horas após a injeção (Figura 10). O aumento da atividade *in vivo* corrobora os dados obtidos *in vitro* por Buratti *et al.*, (2011), utilizando GST humanas *in vitro*. Contudo, Gehringer *et al.*, (2004) não observaram alteração na atividade da enzima no fígado de camundongos, porém demonstraram que há superexpressão da GST em decorrência da exposição à toxina. A diferença entre os resultados obtidos pelos últimos autores e o presente trabalho pode ser em decorrência do uso de uma dose menor de toxina pelos primeiros, utilização de outra linhagem de camundongos como modelo experimental, e amostragem dos animais em tempos maiores após a exposição. Alverca *et al.*, (2009) demonstraram em experimentos *in vitro* que com doses diferentes de MCYST os efeitos são distintos. Da mesma forma, o uso pelos primeiros autores de outra linhagem de camundongos pode influenciar no efeito biológico observado pela MCYST. Esse fato decorre da diferença entre metabolismos, biodistribuição e de LD₅₀ distintas. A extrapolação da LD₅₀ de uma linhagem de camundongos à outra linhagem poderia resultar em diferenças nos efeitos, como a observada no presente trabalho.

Essas diferenças abordadas, devido ao uso de modelos experimentais distintos, podem explicar também os diferentes resultados obtidos no presente trabalho entre a atividade da GST no fígado de camundongos e ratos. A atividade da GST em camundongos apresentou aumento somente nos tempos amostrais de 2 e 8 horas. Em 24 horas, a atividade da enzima já não tinha

diferença significativa em relação ao controle. Todavia, a atividade da GST em ratos, em 24 horas, não apresentou alteração (dados não apresentados). Da mesma forma, a atividade da catalase no fígado de camundongos também não apresentou semelhança com a observada no mesmo órgão, em ratos. No primeiro animal, a atividade dessa enzima já se encontrava em recuperação, após uma inibição em 8 horas (Figura 9). Já em ratos, em 24 horas, se encontrava aumentada (Figura 18). Ambos os resultados – diminuição da atividade em 8 horas em camundongos e aumento em 24 horas em ratos – indicam alteração no sistema redox da célula, porém as diferenças nos metabolismos das diferentes espécies podem influenciar no efeito biológico da toxina.

Abordando o estresse oxidativo causado por MCYST, o mesmo já foi demonstrado na literatura tanto *in vitro* quanto *in vivo* (DING *et al.*, 1998; GUZMAN & SOLTER, 1999). Alverca *et al.*, (2009) demonstraram que uma das causas do estresse oxidativo causado por MCYST na célula seria decorrente de dano à mitocôndria e, conseqüentemente, à cadeia respiratória. Com isso, haveria formação de ERO e alterações no sistema redox. Os dados obtidos nessa dissertação diferem dos demais pela análise da variação temporal, que mostrou que, após dose única e subletal de MCYST, o dano oxidativo no fígado de camundongos é agudo, evidenciado pela peroxidação lipídica 8 horas após a exposição, e reversível (Figura 8).

Já as peroxidases catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), também indicadoras do equilíbrio redox da célula, de modo semelhante entre si, apresentaram redução em suas atividades, principalmente em 8 horas (Figura 9). A GPx se mostrou mais sensível, pois a redução em sua atividade foi significativa até as 96 horas após a exposição. Esse foi o único parâmetro no fígado de camundongos que não apresentou recuperação em todo o período de análise.

Os resultados de inibição das peroxidases possivelmente estão relacionados às espécies reativas de oxigênio oriundas da intoxicação por MCYST. Haveria grandes concentrações de peróxido de hidrogênio, parcialmente geradas pelo aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD). Tais concentrações de peróxido de hidrogênio formadas seriam tóxicas até mesmo para suas enzimas detoxificantes (MIYAMOTO *et al.*, 2003). Esse

fato explicaria os baixos valores de atividade das peroxidases no momento de produção elevada de peróxido pela SOD – 8 horas após a injeção (Figura 9).

Da mesma forma, o consumo da GSH, evidenciado no presente trabalho no fígado e rim de ratos (Figuras 19 e 20), também é apontado como uma das causas para o descontrole do sistema redox. O consumo de GSH, em sua ligação com a MCYST no processo de detoxificação, reduziria a concentração desse peptídeo para o combate às ERO geradas nas células. Embora no fígado a concentração da GSH tenha aumentado, a concentração de GSSG também foi aumentado, indicando sua formação a partir do consumo da primeira. O aumento na concentração de GSH no fígado, não observada no rim, pode ser em decorrência do fígado ser um órgão de detoxificação.

A atividade biológica conhecida das MCYST foi avaliada no presente trabalho: a inibição de proteínas fosfatases 1 e 2A (Figura 14). Essa inibição foi amplamente demonstrada *in vitro* (MACKINTOSH *et al.*, 1990; CRAIG *et al.*, 1996; BAGU *et al.*, 1997; BILLAM *et al.*, 2008). Contudo, há poucos trabalhos analisando a inibição *in vivo*, e somente utilizando-se doses letais (RUNNEGAR *et al.*, 1993; 1995a, 1995b). Dados anteriores do nosso laboratório demonstraram, pela primeira vez, a inibição das PP *in vivo* utilizando dose subletal de MCYST (SOARES, 2005). Contudo, o resultado deveria ser confirmado para se corrigir possíveis pontos críticos da técnica recém-implementada na época. Os resultados obtidos no presente trabalho obtiveram menores diferenças estatísticas entre as réplicas e reprodutibilidade, e demonstram inibição de até 42% na atividade das PP, com uma pequena tendência a recuperação ao final de 96h. Tal efeito biológico primário da MCYST na célula corrobora com todos os outros efeitos observados no presente trabalho: todos, direta ou indiretamente, seriam decorrentes da inibição da PP.

Para se avaliar, com ferramentas bioquímicas, o processo inflamatório causado por MCYST, a análise de óxido nítrico foi realizada. Porém, o perfil oscilatório desse composto no fígado de camundongos, avaliado através das concentrações de nitrito, é de difícil interpretação (Figura 11). Sabe-se que a MCYST está envolvida no estímulo de vias inflamatórias e a indução à vasodilatação já foi observada (NAKANO *et al.*, 1991; NOBRE *et al.*, 2003). O óxido nítrico (ON), um dos sinalizadores dessa última resposta, é um

importante mediador inflamatório produzido por macrófagos e diversas outras células, inclusive endoteliais. Uma vez que a MCYST gera dano ao tecido e estimula macrófagos, esperaria-se que a produção de ON pudesse estar aumentada. O resultado observado, porém foi uma diminuição em 2 horas, recuperação em 8 horas e diminuição nos tempos amostrais seguintes. Uma hipótese que explicaria a diminuição do óxido nítrico das amostras seria a reação do mesmo com o ânion superóxido, decorrente do processo de estresse oxidativo. O óxido nítrico, ligando-se com o superóxido, gera peroxinitrito (RADI, 2004). O último não pode ser detectado pela técnica utilizada. Um dado que corrobora esta hipótese é o resultado encontrado para a atividade da superóxido dismutase (SOD), que converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (comparar Figura 9a e 11). Duas horas após a exposição, a atividade da SOD não está aumentada, havendo provavelmente concentrações elevadas no tecido do ânion superóxido. Esse reagiria com o óxido nítrico e geraria peroxinitrito, explicando a redução de óxido nítrico encontrada em 2 horas. O oposto ocorre 8 horas após a exposição. Neste tempo amostral, a atividade da SOD estava alta, levando provavelmente ao menor acúmulo do ânion superóxido e consequente menor reação com óxido nítrico e menor produção de peroxinitrito. O óxido nítrico, então, poderia ser quantificado pela técnica utilizada no presente trabalho. Analisando os dados obtidos da atividade da SOD e concentração de nitrito no fígado de camundongos, pode-se observar um mesmo perfil oscilatório.

Outra hipótese que pode fornecer explicação complementar para o resultado encontrado é a inibição da proteína fosfatase pela MCYST. Xu & Krukoff (2007) demonstram que a proteína fosfatase 2A está envolvida na ativação da óxido nítrico sintetase. Uma vez a PP2A estando inativa, a óxido nítrico sintetase também estaria inativada, o que diminuiria a produção e consequente concentração de óxido nítrico. Isso pôde ser observado em dois estudos que utilizaram o ácido ocadáico (inibidor de proteína fosfatase tal qual a MCYST), onde verificou-se tal fenômeno (WU & WILSON, 2008). Essa hipótese, seria adequada principalmente entre 24 e 48 horas após a exposição de MCYST (comparar Figura 11 e 14). No entanto, não explicaria o aumento da concentração de óxido nítrico em oito horas.

Contudo, embora haja uma interpretação para os resultados obtidos com a análise de nitrito no fígado de camundongos expostos à MCYST, pode-se concluir que o óxido nítrico possivelmente não é um mediador inflamatório relevante na inflamação causada pela MCYST.

Ainda sobre parâmetros bioquímicos indicadores de inflamação tecidual, como o óxido nítrico supracitado, a atividade de mieloperoxidase (MPO) é igualmente utilizada como parâmetro indicador. A MPO é a única peroxidase conhecida que utiliza o peróxido de hidrogênio para a formação de ácido hipocloroso, de grande ação microbicida (HAMPTON *et al.*, 1998). Analisando a atividade da MPO em um tecido, obtém-se de maneira indireta uma estimativa do infiltrado de neutrófilos no tecido como descrito por Bradley *et al.*, (1982) e Loria *et al.*, (2008). Contudo, no fígado de camundongos injetados com MCYST esse parâmetro também não foi um bom indicador, uma vez que houve inibição da atividade da enzima (Figura 12). A inibição indicaria uma diminuição da quantidade de neutrófilos no tecido. No entanto, pôde-se detectar, através da análise histológica qualitativa, a maior presença de neutrófilos no fígado dos animais expostos à MCYST, em relação ao grupo controle. O infiltrado de células inflamatórias estimulados por MCYST é descrito na literatura, como no estudo de Pouria *et al.*, (1998), onde foram analisados fígados das vítimas do acidente de Caruaru em 1996 e observou-se infiltrado de células polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos. Da mesma forma, Kujbida *et al.*, (2009) demonstraram, em ensaio *in vitro*, que MCYST promove migração de neutrófilos. Com isso, os resultados do presente trabalho, levantam algumas hipóteses: (a) a inibição direta da MPO pela MCYST, (b) a inibição indireta da síntese ou da atividade da enzima decorrentes da alteração no status de fosforilação celular causado pela inibição da PP. Porém, estudos *in vitro* com neutrófilos são necessários para se investigar os resultados obtidos no presente trabalho com a atividade da MPO.

Tem sido demonstrado que a inflamação parece ser muito importante para o dano causado por essa toxina. Casquilho *et al.*, (2010 e 2011) demonstraram que o uso de um antiinflamatório (em fase de desenvolvimento do fármaco) pôde diminuir o dano tecidual em fígado e recuperar o pulmão de camundongos injetados com dose subletal de MCYST. A inflamação, no presente trabalho, foi confirmada na análise qualitativa e quantitativa dos cortes

histológicos de fígado de camundongos (Figura 15 e 16). Além do aumento do infiltrado de células inflamatórias no tecido, a análise qualitativa demonstrou uma melhora natural, porém não recuperação total do tecido 96 horas após a exposição de MCYST. Um efeito muito presente foi a binucleação de hepatócitos. A binucleação é um fenômeno normal de um fígado saudável no qual, em humanos, taxas entre 20 e 30% de hepatócitos com essa característica são comuns (NADAL & ZAJDELA, 1967). Seater *et al.*, (1988) discutem ainda, que a binucleação está envolvida com a recuperação hepática após uma injúria. O aumento da binucleação, avaliada no presente trabalho, tanto em camundongos (Tabela 2) quanto em ratos (Tabela 3), demonstra ter havido dano hepático. Alguns autores também relacionam o aumento desse efeito como resultado tardio ao estresse oxidativo (NAKATAMI *et al.*, 1997; GORLA *et al.*, 2001). Essa relação é corroborada pelos resultados do presente trabalho em que, no fígado de camundongos, em um primeiro momento, se observa estresse oxidativo e, de forma progressiva, passa a ser verificado um aumento do número de hepatócitos binucleados.

Nos maiores tempos amostrais (48 e 96 horas), observou-se no tecido, regiões com muita inflamação e necrose e outras com poucos danos e com muitos hepatócitos binucleados. O mesmo padrão não foi observado nos tempos iniciais, onde só havia áreas lesionadas (Figura 15). Essa observação demonstra a tentativa de recuperação do órgão após a injúria causada. O perfil desigual da histologia, durante a recuperação após o dano, pode ser explicado pela distribuição não homogênea da MCYST no fígado (ITO *et al.*, 2000). Áreas do fígado, com maiores concentrações da toxina, ainda sofreriam de forma mais intensa os efeitos da mesma. Porém, áreas com menores concentrações, poderiam já estar em processo de recuperação.

Ademais, a esteatose, observada no fígado tanto de camundongos (Figura 15) quanto de ratos (Figura 17), é uma alteração típica de dano hepático, observado em casos de hepatites infecto-contagiosas ou alcoólicas. Com esses dados, a MCYST pode ser comparada com as substâncias classificadas como agentes indutores de esteato-hepatite não-alcoólica (em inglês: *nonalcoholic steatohepatitis*, NASH) (LUDWIG *et al.*, 1980; KOTEISH & DIEHL, 2001). A NASH, de forma crônica, tende a causar cirrose e carcinoma hepatocelular (SCHATTENBERG & GALLE, 2010). Essa relação poderia ser

uma das causas desse tipo de câncer em humanos em que suspeita-se do envolvimento da intoxicação da MCYST (UENO *et al.*, 1996; ITO *et al.*, 1997; YU *et al.*, 2001; SVIRCEV *et al.*, 2010).

De forma geral, os hepatócitos de animais expostos a MCYST perderam a arquitetura celular. As células se tornaram menores e disformes. Esse fenômeno já foi amplamente discutido na literatura, uma vez que a MCYST inibe proteína fosfatase e, com isso, causa desarranjo de citoesqueleto (CARMICHAEL, 1994; CARMICHAEL *et al.*, 2001). Como resultado, os hepatócitos tendem a diminuir de tamanho. Em contraponto, a análise qualitativa dos cortes histológicos hepáticos do presente trabalho demonstrou a presença de muitas células inchadas. Esse padrão celular provavelmente seriam células pré-necróticas ou pré-apoptóticas (GUIDUGLI-NETO, 1997).

A morte celular por necrose foi muito observada nos cortes histológicos de fígado de camundongos. Não foi realizada marcação específica para se analisar apoptose, mas acredita-se que seja outro tipo de morte celular muito presente. Outros trabalhos já demonstraram que a MCYST causa apoptose (DOUGLAS *et al.*, 2001; XING *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2008).

Assim, a avaliação histológica sugere duas fases com efeitos característicos: a fase inicial, predominando esteatose, e a fase mais duradoura, predominando inflamação e necrose. A esteatose, é decorrente do mal funcionamento da célula hepática, que não consegue secretar lipídios (NADAL & ZAJDELA, 1967). Assim, em primeiro momento, a MCYST, quando não promove a morte celular, afeta o funcionamento do hepatócito. Com o tempo, a célula pode se recuperar ou morrer. Os dois destinos celulares puderam ser observados nos tempos amostrais mais longos: a recuperação tecidual, evidenciada pelo aumento da binucleação, e a morte, pelo aumento da necrose. Essa diferença, como já abordada, pode ser em decorrência da distribuição desigual da MCYST no fígado.

O aumento do calibre dos vasos sanguíneos hepáticos já foi descrito por Carvalho (2009), por análise qualitativa. No presente trabalho, o aumento do calibre dos vasos, não foi significativo quando analisado quantitativamente. Contudo, a ausência de resultado significativo, é decorrente da característica do método, que orienta a análise de parênquima hepático, evitando áreas de vasos grandes. No entanto, de forma qualitativa, o aumento do calibre foi

observado e persistente até o último tempo de análise. Esse efeito observado pode ter sido em consequência da vasodilatação promovida pela inflamação tecidual, também observada. Da mesma forma, há estudos mostrando que a MCYST é tóxica para células endoteliais e endotélio vascular, o que poderia provocar desarranjo do mesmo e do calibre dos vasos (WICKSTROM *et al.*, 1996; MCDERMOTT *et al.*, 1998).

O dano hepático em camundongos, analisado por histologia, pôde ser correlacionado com o aumento na concentração sérica das enzimas marcadoras de dano hepático: alanina aminotransferase (ALT) e aspartato transaminase (AST). A concentração de ALT foi muito alterada, apresentando aumento de mais de 700% (Figura 13). Porém, a mesma mostrou uma recuperação nos últimos tempos amostrais. Já a concentração de AST se mostrou alterada por todo o período amostral indicando que o fígado provavelmente não se recuperou funcionalmente até 96 horas após a injeção (Figura 13).

Um padrão histológico e estereológico semelhante ao descrito para camundongos foi observado no fígado de ratos, 24 horas após a injeção de MCYST em dose subletal, sugerindo, nesse caso, a possibilidade de extrapolação de efeitos histológicos entre espécies.

Supõe-se que houve o estresse oxidativo no fígado e rins de ratos, mediante as alterações da atividade da catalase e da relação GSH/GSSG (Figura 18, 19 e 20). Vale acrescentar que no rim de ratos foi feita, ainda, a análise de peroxidação lipídica (dado não apresentado) que se mostrou aumentada. O estresse oxidativo já foi descrito *in vivo* no rim de ratos após exposição à MCYST, porém foi utilizada outra via de administração (i.v.) e dose letal (MORENO *et al.*, 2005).

A verificação do índice renal alterado nos ratos é um indicativo de que houve edema e, possivelmente, inflamação no órgão (Figura 21). Esse efeito esteve relacionado a alterações funcionais do órgão, evidenciada pelo aumento do ritmo de filtração glomerular (RFG), aumentado em mais de 400% e do fluxo urinário, aumentado em 125% (Figura 22 e Tabela 6, respectivamente). Nobre *et al.*, (2001 e 2003) observaram aumento do RFG e indicadores de inflamação decorrentes da exposição a MCYST, inicialmente com rim perfundido e posteriormente *in vivo* em camundongo.

Alteração no RFG é reflexo da má filtração pelo glomérulo, permitindo a passagem de mais e maiores moléculas para a urina (RIELLA *et al.*, 2003). No presente trabalho, esse fato pode ser evidenciado pelo aumento do conteúdo protéico na urina (resultados de colaboradores do projeto no qual o experimento está inserido). Paralelamente, é importante ressaltar que o RFG aumentado pode permitir que a MCYST conjugada às proteínas séricas passe para a urina, aumentando o clearance da toxina (discutido posteriormente).

O hábito de dessedentação dos ratos, como já citado, foi alterado (Tabela 4). Acredita-se que a relação entre o aumento do consumo de água e aumento do fluxo urinário se deva à maior fração de excreção de sódio (resultado de colaboradores do projeto no qual o experimento esteve inserido). A maior concentração de sódio na urina aumenta a osmolaridade da mesma, resultando em um maior volume de urina produzida. Com isso, os animais sentiriam mais sede, por causa da possível desidratação decorrente do grande aumento de fluxo urinário.

Os hábitos alimentares dos animais expostos à MCYST também foram alterados, com diminuição à metade do consumo de alimentos dos animais-controle (Tabela 4). Da mesma forma, a produção fecal diminuiu ainda mais, chegando a 30% da produção dos animais-controle (Tabela 6). A menor produção fecal pode ser atribuída, em parte, ao menor consumo de ração, porém a ação da MCYST no epitélio intestinal pode contribuir para a diminuição do trânsito intestinal (BOTHÁ *et al.*, 2004; NOBRE *et al.*, 2004). Além disso, o possível estado de desidratação do animal, evidenciado pelo aumento intenso do fluxo urinário, poderia influenciar na formação do bolo fecal, tornando-o mais ressecado e de difícil motilidade. Aparentemente, havia mais quantidade de bolo fecal no intestino dos animais injetados com MCYST, porém tal observação não foi quantificada.

A eliminação de MCYST livre foi aparentemente maior na urina que nas fezes (Tabela 8). Robinson *et al.*, (1991a), utilizando MCYST marcada com o isótopo radioativo de hidrogênio – o trítio –, observou eliminação da toxina em porcentagens semelhantes de toxina via fezes e urina, com ligeira predominância nas fezes. Porém, o método utilizado pelos autores, analisa a MCYST total, e não a livre como no presente trabalho. A MCYST total é a toxina livre somada a ligada com PP e outras proteínas de interação mais fraca

(VELA *et al.*, 2008). Considerando a maior concentração de proteínas e peptídeos nas fezes, acredita-se que grande parte da MCYST esteja conjugada, não podendo ser detectada eficientemente pelo método de ELISA utilizado. Da mesma forma, deve-se levar em consideração o menor trânsito intestinal: a MCYST pode não estar sendo depurada do corpo por essa via simplesmente porque as fezes não estão sendo eliminadas.

Nesse estudo, foi demonstrada a secreção de MCYST pelo rim de ratos (Tabela 9). Esse dado, pelos nossos conhecimentos, é inédito na literatura. Investigações complementares sobre os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos no processo de secreção de MCYST são de grande interesse para o estudo toxicológico dessa molécula.

Analisando a eliminação diária de MCYST via fezes e urina (Tabela 8), chega-se a um valor de 2,3 µg. Considerando-se que, na dose de 55 µg/kg de pc, um rato de 300 g em média, tenha recebido, 16,5 µg de MCYST, quase 14% da dose foi eliminada na forma livre em 24 horas. Se for considerada essa taxa de eliminação diária constante, em menos de 8 dias, o organismo estaria completamente detoxificado. Contudo, sabe-se que a eliminação não se dá em taxas constantes. Resultados obtidos com a minha monografia, com experimentos de longa duração em ratos amostrados semanalmente, foi demonstrado que a maior eliminação de MCYST ocorre na primeira semana (MATTOS, 2008). Após esse tempo amostral, por até sete semanas, a concentração de MCYST no fígado permaneceu menor, porém constante. Com isso, pode-se considerar que a eliminação, e até mesmo a secreção da MCYST, deva ocorrer, nas taxas observadas no presente trabalho, somente nos primeiros dias de análise após intoxicação.

Sabendo-se, com o presente trabalho, que fígado e rins são afetados em dose subletal única, necessita-se analisar se há recuperação da função desses órgãos. Em camundongos, no presente trabalho, analisando-se de forma temporal, o fígado não apresentou recuperação até 4 dias após a exposição.

Nosso grupo de pesquisa já demonstrou que o dano agudo ao funcionamento pulmonar também é permanentemente alterado por até 4 dias (PICANÇO *et al.*, 2004; SOARES *et al.*, 2007). Como já discutido anteriormente, dados da minha monografia já demonstraram que o dano tecidual ao pulmão continua por até 7 semanas após uma única injeção

subletal em ratos (MATTOS, 2008). Com isso, mais investigações sobre a possível recuperação da função desses órgãos (fígado, rim e pulmão) são necessárias.

Os resultados obtidos no presente trabalho, permitem comprovar a importância de estudos toxicológicos com cianotoxinas, utilizando-se doses subletais. Investigar efeitos subletais agudos fornecem dados para posterior estudo de efeitos crônicos e subcrônicos. Os últimos, acredita-se, sejam as mais comuns formas de intoxicação humana e podem representar um risco maior, pois muitas vezes são negligenciadas. Da mesma forma, a sintomatologia podrômica e falta de orientação médica, favorecem ao não diagnóstico, tratamento, profilaxia e notificação. Ademais, a intoxicação crônica e subcrônica são perigosas pois, como descritos no presente trabalho, a MCYST é persistente no organismo: as doses freqüentes seriam cumulativas. Além disso, a longa permanência e recirculação no organismo podem significar que uma única exposição à toxina pode levar a consequências crônicas. Essas poderiam resultar em efeitos não analisados nesse trabalho (devido ao curto período amostral) como o aparecimento de nódulos e tumores, câncer, alterações hormonais, cirrose hepática, entre outros efeitos ainda não estudados e descritos. O presente trabalho fornece informações para essas novas e necessárias investigações utilizando doses subletais agudas e crônicas.

6 – CONCLUSÕES

- 1- A intoxicação subletal por MCYST no fígado de camundongos Suíços, segundo os resultados obtidos, pode ser observada em duas fases com características histológicas próprias: uma aguda (horas), marcada pela esteatose, e a outra mais tardia (dias), onde se verificou principalmente necrose e a binucleação de hepatócitos, assim como o infiltrado de células inflamatórias.
- 2- Alguns parâmetros analisados permaneceram alterados similarmente nas duas fases, como a atividade das proteínas fosfatases, alguns indicadores de estresse oxidativo, calibre dos vasos (aumentado) e indicadores bioquímicos de dano hepático.
- 3- As alterações do óxido nítrico e da atividade da enzima mieloperoxidase no fígado de camundongos sugerem que ambos não são bons indicadores de processo inflamatório causado por MCYST nesse tecido.
- 4- Ratos Wistar intoxicados com MCYST em dose subletal e única, durante 24 horas, apresentaram aumento do consumo de água e fluxo urinário, assim como diminuição do consumo de ração e produção fecal, sendo tais mudanças uma indicação de alteração no metabolismo desses animais.
- 5- O rim também foi um órgão impactado nos ratos. Nessa dissertação, que faz parte de um amplo estudo sobre alterações renais provocadas por MCYST, pôde-se constatar alterações enzimáticas que sugerem estresse oxidativo, e alterações morfo-fisiológicas indicadas pelo aumento do índice renal e do ritmo de filtração glomerular.
- 6- A MCYST é parcialmente eliminada durante 24 horas e esse processo parece ser, em parte, de natureza secretória. Mais estudos são necessários para se esclarecer esse mecanismo de eliminação.

- 7- Ratos Wistar e camundongos Suíços apresentaram semelhança de respostas à intoxicação por MCYST, principalmente nos parâmetros histológicos e estereológicos hepáticos analisados.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H.: **Catalase *in vitro***. Met Enzymol, 105(3): 121-126.; 1984.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P.: **Molecular Biology of the Cell**. 5^a ed. Garland Science; 2004.

ALVERCA, E., ANDRADE, M.; DIAS, E.; BENTO, F.S.; BATORÉU, M.; JORDAN, P.; SILVA, M.; PEREIRA, P.: **Morphological and ultrastructural effects of microcystin-LR from *Microcystis aeruginosa* extract on a kidney cell line**. Toxicon, 54(3):283 – 294; 2009.

AZEVEDO, S.M.F.O.: **Toxinas de cianobactérias: causas e consequências para a saúde pública**. Medicina on line 1(3), 1998.

AZEVEDO, S. M., W. W. CARMICHAEL, E. M. JOCHIMSEN, K. L. RINEHART, S. LAU, G. R. SHAW, & G. K. EAGLESHAM: **Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru–Brazil**. Toxicology, 181(2): 441 – 446; 2002.

BAGU, J.R.; SYKES, B.D.; CRAIG, M.M.; HOLMES, C.F.: **A molecular basis for different interactions of marine toxins with protein phosphatase-1: molecular models for bound motuporin, microcystins, okadaic acid, and calyculin A**. J. Biol. Chem. 272 (8): 5087-5097; 1997.

BANNISTER, J.V.; CALABRESE, L.: **Assays for SOD**. Meth. Biochem. Anal., 32, 279-312; 1987.

BEST, J. H.; PFLUGMACHER, S.; WIEGAND, C.; EDDY, F.B; METCALF, J.S.; CODD, G.A.: **Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin- LR, on glutathione S-transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*)**. Aqua. Toxic., 60(4):223 – 231; 2002.

BILLAM, M.; S. MUKHI, S.; TANG, L.; GAO, W.; WANG, J.S.: **Toxic response indicators of microcystin-LR in F344 rats following a single-dose treatment**. Toxicon, 51(6):1068 – 1080; 2008.

BILLINGS, W. H.: **Water-associated human illness in north-east Pennsylvania and its suspected association with blue-green alagae bloom**. Em The water Environment: algal toxins and health. Ed Plenum press, New York, p.243; 1981.

BOARU, D. A., DRAGOS, N., SCHIRMER, K.: **Microcystin-LR induced cellular effects in mammalian and fish primary hepatocyte cultures and cell lines: A comparative study**.Toxicology, 218(2):134 – 148; 2006.

BOTES, D. P., KRUGER, H.; VILJOEN, C.C: **Isolation and characterization of four toxins from the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa***. *Toxicon*, 20(6):945 – 954; 1982.

BOTES, D. P., TUINMAN, A.A.; WESSELS, P.L.; VILJOEN, C.C.; KRUGER, H.; WILLIAMS, D.H.; SANTIKARN, S.; SMITH, R.J.; HAMMOND, J.: **The structure of cyanoginosin-LA, a cyclic heptapeptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa***. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*:2311–2318; 1984.

BOTES, D. P., WESSELS, P.L.; KRUGER, H.; RUNNEGAR, M.T.C.; SANTIKARN, S.; SMITH, R.J.; BARNA, J.C.; WILLIAMS, D.H.: **Structural studies on cyanoginosins-LR, -YR, -YA, and -YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa***. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*:2747– 2748; 1985.

BOTHA, N., VAN DE VENTER, M.; DOWNING, T.G.; SHEPHARD, E.G.; GEHRINGER, M.M.: **The effect of intraperitoneally administered microcystin-LR on the gastrointestinal tract of Balb/c mice**. *Toxicon*, 43(3):251 – 254; 2004.

BRADFORD, M.M.: **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein–dye binding**. *Anal. Biochem.* 72, 248–254; 1976.

BRADLEY, P.P., PRIEBAT, D.A., CHRISTENSEN, R.D., ROTHSTEIN, G.: **Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker**. *J Invest Dermatol.* 78, 206-209; 1982.

BURATTI, F.M., SCARDALA, S., FUNARI, E., TESTAI, E.: **Human Glutathione Transferases Catalyzing the Conjugation of the Hepatoxin Microcystin-LR**. *Chem Res Toxicol.* 20 (6):926-933; 2011.

BURKHOLDER, J.M., GLIBERT, P.M.: **Intraspecific variability: an important consideration in forming generalizations about toxigenic algal species**. *S. Afr. J. Mar. Sci.* 28: 177-180; 2006.

BURKHOLDER, J.M., GLIBERT, P.M. **The importance of intraspecific variability in harmful algae: preface to a collection of topical papers**. *Harmful Algae*, 8(5): 744–745. 2009

BURY, N. R., CODD, A.G.; WENDELAAAR BONGA, S.E., FLIK, G.: **Fatty acids from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* with potent inhibitory effects on fish gill Na⁺/K⁺- ATPase activity**. *J. of Exp. Biol.*, 201(1):81–89; 1998.

CAMPOS, A.; VASCONCELOS, V.: **Molecular Mechanisms of Microcystin Toxicity in Animal Cells**. *Inter. J. of Mol. Scie.*, 11(1):268–287; 2010.

CARMICHAEL, W.W.: **Toxins of freshwater algae.** Em Handbook of natural toxins. New York. pp. 121–147; 1988a.

CARMICHAEL, W.W.: **Freshwater cyanobacteria (blue-green algae) toxins.** Em Natural toxins: characterization, pharmacology and therapeutics. Pergamon Press, Oxford. pp. 3–16; 1988b.

CARMICHAEL, W.W.: **Cyanobacteria secondary metabolites: the cyanotoxins.** J. Appl. Bacteriol. 72(6): 445-459; 1992.

CARMICHAEL, W.W.: **The toxins of cyanobacteria.** Sci. Am. 270(1): 78-86; 1994.

CARMICHAEL, W.W.; AN, J.S.: **The cyanotoxins.** Adv Bot Res, 27, 221-212; 1997.

CARMICHAEL, W. W., AZEVEDO, S.M., AN, J.S., 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, 109(7); 2001.

CARVALHO, G. M.: **Comparação do tratamento de LASSBio 596 ou dexametasona na lesão pulmonar aguda induzida por microcistina-LR.** Dissertação de mestrado - UFRJ/ CCS/IBCCF, 2009.

CARVALHO, G. M., OLIVEIRA, V.R., SOARES, R.M., AZEVEDO, S.M., LIMA. L.M., BARREIRO, E.J., VALENÇA, S.S., SALDIVA, P.H., FAFFE, D.S., ZIN, W.A.: **Can LASSBio 596 and dexamethasone treat acute lung and liver inflammation induced by microcystin-LR?** Toxicon, 56(4):604 – 612; 2010.

CASQUILHO, N.V., CARVALHO, G.M., ALVES, J.L., MACHADO, M.N., SOARES, R.M., AZEVEDO, S.M., LIMA, L.M., BARREIRO, E.J., VALENÇA, S.S., CARVALHO, A.R., FAFFE, D.S., ZIN, W.A.: **LASSBio 596 per os avoids pulmonary and hepatic inflammation induced by microcystin-LR.** Toxicon. 58(2):195 – 201. 2011

CHEN, T., WANG, Q., CUI, J., YANG, W., SHI, Q., HUA, Z., JI, J., SHEN, P.: **Induction of Apoptosis in Mouse Liver by Microcystin-LR.** Mol. & Cell. Proteo., 4(7):958–974; 2005.

CHEN, T., J. CUI, Y. LIANG, X. XIN, D. O. YOUNG, C. CHEN, & P. SHEN: **Identification of human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase as a potential target for microcystin- LR.** Toxicology, 220(1):71 – 80; 2006a.

CHEN, Y.M., LEE, T.H., LEE, S.J., HUANG, H.B., HUANG, R., CHOU, H.N.: **Comparison of protein phosphatase inhibition activities and mouse toxicities of microcystins.** Toxicon, 47(7):742 – 746; 2006b.

CHORUS, I., BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management.** E and FN Spon, London and New York; 2ed. 1999.

CODD, G.A.: **Toxins of freshwater cyanobacteria.** Microbiol. Sci. 1(2): 48-52; 1984.

CODD, G.A., BEATTIE, K.A.: **Cyanobacteria (blue-green algae) and their toxins: awareness and action in the United Kingdom.** PHLS Microbiol. Dig. 8: 82-86; 1991.

CODD, G.A., MORRISON, L.F., METCALF, J.S.: **Cyanobacterial toxins: risk management for health protection.** Toxicology and Applied Pharmacology, 203(3):264 – 272. Risk Cyanobacterial Toxins: Occurance, Ecology, Detection, Toxicology and Health Effects Assessment; 2005.

CRAIG, M., LUU, H.A., MCCREADY, T.L., WILLIAMS, D., ANDERSEN RJ, HOLMES CF.: **Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporin and microcystins with type-1 and type-2A protein phosphatases.** Biochem. Cell Biol. 74(4): 569-578; 1996.

DAWSON, R.: **The toxicology of microcystins.** Toxicon, 36(7):953 – 962; 1998.

de FIGUEIREDO, D. R., AZEITEIRO, U.M.; ESTEVES, S.M., GONÇALVES, F.J.M., PEREIRA, M.J.: **Microcystin-producing blooms—a serious global public health issue.** Ecotox. and Environ. Safety, 59(2):151 – 163; 2004.

DIETRICH, D., FISCHER, A., MICHEL, C., HOEGER, S.J. **Toxin mixture in cyanobacterial blooms: a critical comparison of reality with current procedures employed in human health risk assesment.** Em Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs. Springer, New York. pp. 886–912; 2008.

DING, W.X., SHEN, M.H., ZHU, H.G., ONG, C.N.: **Studies on Oxidative Damage Induced by Cyanobacteria Extract in Primary Cultured Rat Hepatocytes.** Environ. Research, 78(1):12 – 18; 1998.

DING, W.-X., SHEN, M.H., ONG, C.N: **Critical Role of Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Permeability Transition in Microcystin-Induced Rapid Apoptosis in Rat Hepatocytes.** Hepatology, 32(3):547–555; 2000.

DING, W.-X., SHEN, M.H., ONG, C.N: **Pivotal Role of Mitochondrial Ca²⁺ in Microcystin-Induced Mitochondrial Permeability Transition in Rat Hepatocytes.** Biochem. and Biophys. Research Commun., 285(5):1155 – 1161; 2001.

DING, W.-X., NAM, C., ONG, C.N: **Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity.** FEMS Microbiology Letters, 220(1):1–7; 2003.

DOUGLAS, P.; MOORHEAD, G.B.; YE, R.; LEES-MILLER, S.P.: **Protein phosphatases regulate DNA-dependent protein kinase activity**. J. Biol. Chem. 276, 18992–18998; 2001.

DRAPER, H.H.; HADLEE, M.: **Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation**. Meth Enzimol, 186: 421-431; 1990.

DUY, T.N., LAM, P.K., SHAW, G.R., CONNELL, D.W.: **Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water**. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 163: 113-185; 2000.

ELLEMAN, T.C., FALCONER, I.R., JACKSON, A.R., RUNNEGAR, M.T.: **Isolation, characterization and pathology of the toxin from a *Microcystis aeruginosa* (= *Anacystis cyanea*) bloom**. Aust. J. Biol. Sci. 31(3): 209-218; 1978.

ERIKSSON, J., D. TOIVOLA, J. MERILUOTO, H. KARAKI, Y.-G. HAN, & D. HARTSHORNE: **Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases**. Biochem. and Biophys. Research Commun., 173(3):1347 – 353; 1990.

EVERS, R.; CHU, X.Y.: **Role of the Murine Organic Anion-Transporting Polypeptide 1b2 (Oatp1b2) in Drug Disposition and Hepatotoxicity**. Molec. Pharma., 74(2):309– 311; 2008.

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 34:179-187; 1981.

FALCONER, I.R., BUCKLEY, T., RUNNEGAR, M.T.: **Biological half-life, organ distribution and excretion of 125-I-labelled toxic peptide from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa***. Aust. J. Biol. Sci. 39(1): 17-21; 1986.

FALCONER, I. R., YEUNG, D.S.: **Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by *Microcystis* toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins**. Chemico-Bio Interact., 81(2):181 – 196; 1992.

FALCONER, I. R., HUMPAGE, A.R.: **Health Risk Assessment of Cyanobacterial (Blue-green Algal) Toxins in Drinking Water**. Internat. J. of Environ Research and Pub Health, 2(1):43–50; 2005.

FISCHER, W., ALTHEIMER, S., CATTORI, V., MEIER, P., DIETRICH, D., HAGENBUCH, B.: **Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin**. Toxic and App Pharm, 203(3):257 – 263.; 2005.

FISCHER, A., HOEGER, S., STEMMER, K., FEURSTEIN, D., KNOBELOCH, D., NUSSLER, A., DIETRICH, D.: **The role of organic anion transporting polypeptides (OATPs/SLCOs) in the toxicity of different microcystin congeners in vitro: A comparison of primary human hepatocytes and OATP-transfected HEK293 cells.** Toxic. and App. Pharma., 245(1):9 – 20; 2010.

FLADMARK, K.E.; BRUSTUGUN, O.T.; HOVLAND, R.; BOE, R.; GJERTSEN, B.T.; ZHIVOTOVSKY, B.; DOSKELAND, S.O.: **Ultrarapid caspase-3 dependent apoptosis induction by serine/threonine phosphatase inhibitors.** Cell Death Differ. 6, 1099–1108; 1999.

FLADMARK, K.E.; BRUSTUGUN, O.T.; MELLGREN, G.; KRAKSTAD, C.; BOE, R.; VINTERMYR, O.K.; SCHULMAN, H.; DOSKELAND, S.O.: **Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is required for microcystin-induced apoptosis.** J. Biol. Chem. 277, 2804–2811; 2002.

FLOHÉ, L., GUNZLER, W.: **Assays of glutathione peroxidase.** Methods Enzymol. 105, 114-121; 1984.

GÁCSI, M., O. ANTAL, G. VASAS, C. MÁTHÉ, G. BORBÉLY, M. L. SAKER, J. GYORI, A. FARKAS, ÁGNES VEHOVSZKY, & G. BÁNFALVI: **Comparative study of cyanotoxins affecting cytoskeletal and chromatin structures in CHO-K1 cells.** Toxic. in Vitro, 23(4):710 – 718; 2009.

GEHRINGER, M. M.: **Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response.** FEBS Letters, 557(13):1 – 8; 2004.

GONÇALVES, E. A. P., M. A. DALBONI, A. T. PERES, A. P. MANFREDI, S. R. MANFREDI, S. M. AZEVEDO, V. F. MAGALHÃES, S. DRAIBE, M. E. F. CANZIANI, & M. CENDOROGLO: **Effect of microcystin on leukocyte viability and function.** Toxicon, 47(7):774 – 779; 2006.

GORLA, G.R., MALHI, H., GUPTA, S.: **Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells.** J. Cell. Sci. 114: 2943–51; 2001.

GREEN, L.C., WAGNER, D.A., GLOGOWSKI, J., SKIPPER, P.L., WISHNOK, J.S., TANNENBAUM, S.R.: **Analysis of nitrate, nitrite, and [15 N]nitrate in biological fluids.** Anal. Biochem, 126, 131–138; 1982.

GUIDUGLI-NETO, J. **Elementos de Patologia Geral.** São Paulo : Santos, 1997.

GUZMAN, R. E., SOLTER, P.F.: **Hepatic Oxidative Stress Following Prolonged Sublethal Microcystin LR Exposure.** Toxic Pathol., 27(5):582–588; 1999.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. **Glutathione S-Transferases.** J. OP. B. Chem., v. 249 (22), 7130-7139; 1974

HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B.: **Assays for differentiation of glutathione S-Transferases**. Meth. in Enz., 77, 398-405; 1981.

HAGENBUCH, B., MEIER, P.J.: **The superfamily of organic anion transporting polypeptides**. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1609(1):1 – 18; 2003.

HAGENBUCH, B., MEIER, P.J.: **Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties**. Pflugers Arch. 447(5): 653-665; 2004.

HAMPTON, M.B., KETTLE, A.J., WINTERBOURN, C.C.: **Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing**. Blood. 92(9):3007-3017; 1998

HARADA, K., K. OGAWA, Y. KIMURA, H. MURATA, M. SUZUKI, P. M. THORN, W. R. EVANS, & W. W. CARMICHAEL: **Microcystins from *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17**. Chem. Res. in Toxic., 4(5):535–540; 1991.

HARADA, K., K. FUJII, K. HAYASHI, M. SUZUKI, Y. IKAI, & H. OKA: **Application of -FDLA derivatization to determination of absolute configuration of constituent amino acids in peptide by advanced Marfey's method**. Tetrahedron Letters, 37(17):3001 – 3004; 1996.

HAVASI, A., BORKAN, S.C.: **Apoptosis and acute kidney injury**. Kidney Int. 80(1):29-40; 2011.

HENNING, M., ROHRLACK, T., AND KOHL, J.G.: **Responses of *Daphnia galeata* fed with *Microcystis* strains with and without microcystins**. Em Cyanotoxins: occurrence, causes, consequences. Springer, Berlin. p. 49–56; 2001.

HOOSER, S.B.; BEASLEY, V.R.; LOVELL, R.A; CARMICHAEL, W.W.; HASCHEK, W.M.: **Toxicity of microcystin LR, a cyclic heptapeptide hepatotoxin from *Microcystis aeruginosa*, to rats and mice**. Vet Pathol 26(3):246-252; 1989.

HOOSER, S.B.; BEASLEY, V.R.; BASGALL, E.J.; CARMICHAEL, W.W.; HASCHEK, W.M.: **Microcystin-LR induced ultrastructural changes in rat**. Vet. Pathol, 27, 9-15; 1990.

HUMPAGE, A.R., FALCONER, I.R.. **Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value**. Environ Toxicol. 18(2):94-103; 2003.

IKEHARA, T., S. IMAMURA, T. SANO, J. NAKASHIMA, K. KUNIYOSHI, N. OSHIRO, M. YOSHIMOTO, YASUMOTO, T.: **The effect of structural variation in 21**

microcystins on their inhibition of PP2A and the effect of replacing cys269 with glycine. *Toxicon*, 54(4):539 – 544; 2009.

ITO, E., KONDO, F., TERAOKA, K., HARADA, K.I.: **Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR.** *Toxicon*, 35(9):1453 – 1457; 1997.

ITO, E., KONDO, F., TERAOKA, K., HARADA, K.I.: **First report on the distribution of orally administered microcystin-LR in mouse tissue using an immunostaining method.** *Toxicon*, 38(1):37 – 48; 2000.

ITO, E., TAKAI, A., KONDO, F., MASUI, H., IMANISHI, S., HARADA, K.I.: **Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compounds.** *Toxicon*, 40(7):1017 – 1025; 2002.

JACKSON, A.R., MCINNES, A., FALCONER, I.R., RUNNEGAR, M.T.: **Clinical and pathological changes in sheep experimentally poisoned by the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*.** *Vet. Pathol.* 21(1): 102-113; 1984.

JAESCHKE, H.: **Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts.** *J. of Gastroenter. and Hep.*, 26:173–179; 2011.

JANG, M.H., HA, K., LUCAS, M.C.; JOO, G.J. TAKAMURA, N.: **Changes in microcystin production by *Microcystis aeruginosa* exposed to phytoplanktivorous and omnivorous fish.** *Aqua. Toxicology*, 68(1):51 – 59; 2004.

JOCHIMSEN, E. M., CARMICHAEL, W.W.; AN, J., CARDO, D.M., COOKSON, S.T., HOLMES, C.E., ANTUNES, M.B., DE MELO FILHO, D.A., LYRA, T.M., BARRETO, V.S.T., AZEVEDO, S.M., JARVIS, W.R.: **Liver Failure and Death after Exposure to Microcystins at a Hemodialysis Center in Brazil.** *New England J. of Med.*, 338(13):873–878; 1998.

KHAN, S.A.; GHOSH, S.; WICKSTROM, M.; MILLER, L.A.; HESS, R.; HASCHKE, W.M.; BEASLEY, V.R.: **Comparative pathology of microcystin-LR in cultured hepatocytes, fibroblasts, and renal epithelial cells.** *Nat Toxins* 3(3):119-128; 1995.

KIM, R. B.: **Organic anion-transporting polypeptide (OATP) transporter family and drug disposition.** *Eur. J. of Clin. Inv.*, 33:1–5; 2003.

KONDO, F.; IKAI, Y.; OKA, H.; OKAMURA, M.; ISHIKAWA, N.; HARADA, K.; MATSUURA, K.; MURATA, H.; SUZUKI, M. **Formation, characterization, and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins.** *Chem Res Toxicol* 5(5):591-596, 1992.

KOTEISHI, A., DIEHL, A.M.: **Animal models of steatosis.** *Semin Liver Dis.* 21(1):89-104; 2001.

KRISHNAMURTHY, T., CARMICHAEL, W., SARVER, L.: **Toxic peptides from freshwater cyanobacteria (blue-green algae). I. Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*.** *Toxicon*, 24(9):865 – 873; 1986.

KUJBIDA, P., HATANAKA, E., CAMPA, A., CURI, R., FARSKY, S.H.P., PINTO, E.: **Analysis of chemokines and reactive oxygen species formation by rat and human neutrophils induced by microcystin-LA, -YR and -LR.** *Toxicon*, 51(7):1274 – 1280; 2008.

KUJBIDA, P., HATANAKA, E., VINOLO, M.A.R., WAISMAM, K., DE HOLANDA, D.M., CAVALCANTI, R. CURI, S. H. P. FARSKY, E., PINTO, E.: **Microcystins -LA, -YR, and -LR action on neutrophil migration.** *Bioch. and Biophys. Research Comm.*, 382(1):9 – 14; 2009.

LANKOFF, A., KOLATAJ, A.: **Influence of microcystin-YR and nodularin on the activity of some proteolytic enzymes in mouse liver.** *Toxicon*, 39(2):419 – 423; 2001.

LEE, W., H. GLAESER, L. H. SMITH, R. L. ROBERTS, G. W. MOECKEL, G. GERVASINI, B. F. LEAKE, & R. B. KIM: **Polymorphisms in Human Organic Anion-transporting Polypeptide 1A2 (OATP1A2).** *J. of Biol. Chem.*, 280(10):9610–9617; 2005.

LORIA, V., DATO, I., GRAZIANI, F., BIASUCCI, L.: **Myeloperoxidase: A New Biomarker of Inflammation in Ischemic Heart Disease and Acute Coronary Syndromes.** *Med. of Inflamm.*; 23: 120-134; 2008.

LI, Y., SHENG, J., SHA, J., HAN, X.: **The toxic effects of microcystin-LR on the reproductive system of male rats in vivo and in vitro.** *Reprod Toxic.*, 26(4):239 – 245; 2008.

LI, H., XIE, P., LI, L. HAO, G., XIONG, Q.: **In vivo study on the effects of microcystin extracts on the expression profiles of proto-oncogenes (c-fos, c-jun and c-myc) in liver, kidney and testis of male Wistar rats injected i.v. with toxins.** *Toxicon*, 53(1):169 – 175; 2009.

LIU, Y., XIE, P., QIU, T., LI, H.Y., LI, G.Y., HAO, G., XIONG, Q.: **Microcystin extracts induce ultrastructural damage and biochemical disturbance in male rabbit testis.** *Environ Toxic*, 25(1):9–17; 2010.

LONG, B. M., JONES, G.J., ORR, P.T.: **Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(1):278–283; 2001.

LOVELL, R.A.; SCHAEFFER, D.J.; HOOSER, S.B.; HASCHEK, W.M.; DAHLEM, A.M.; CARMICHAEL, W.W.; BEASLEY, V.R.: **Toxicity of intraperitoneal doses of**

microcystin-LR in two strains of male mice. J Environ Pathol Toxicol Oncol 9(3):221-237; 1989.

LUDWIG, J., VIGGIANO, T.R., MCGILL, D.B., OH, B.J.: **Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease.** Mayo Clin Proc. 55:434-438; 1980.

LU, H., S. CHOUDHURI, S., OGURA, K., CSANAKY, I.L., LEI, X., CHENG, X., SONG, P.Z., KLAASSEN, C.D.: **Characterization of Organic Anion Transporting Polypeptide 1b2-null Mice: Essential Role in Hepatic Uptake/Toxicity of Phalloidin and Microcystin-LR.** Toxic. Sci., 103(1):35–45; 2008.

MACKINTOSH, C., BEATTIE, K.A., KLUMPP, S., COHEN, P., CODD, G.A.: **Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants.** FEBS Letters, 264(2):187 – 192; 1990.

MACKINTOSH, R. W., DALBY, K.N., CAMPBELL, D.G., COHEN, P.T., COHEN, P., MACKINTOSH, C.: **The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1.** FEBS Letters, 371(3):236 – 240; 1995.

MAIA, J.C.C, GOMES, S.L., JULIANI, M.H. **Genes of Parasites: A Laboratory Manual.** Em: Morel CM (ed). Rio de Janeiro, Brasil: Editora Fundação Oswaldo Cruz; 146-167; 1983.

MAIDANA, M., CARLIS, V., GALHARDI, F., YUNES, J., GERACITANO, L., MONSERRAT, J., BARROS, D.: **Effects of microcystins over short- and long-term memory and oxidative stress generation in hippocampus of rats.** Chem-Biol. Inter., 159(3):223 – 234; 2006.

MALBROUCK, C., TRAUSCH, G., DEVOS, P., KESTEMONT, P.: **Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish Carassius auratus L.** Comp Bioch and Physio. 135(1):39 – 48; 2003.

MANDARIM-DE LACERDA, C. A.: **Stereological tools in biomedical research.** Anais da Acad. Brasil. de Cardio., 75:469 – 486; 2003.

MANDARIM-DE-LACERDA, C.A., FERNANDES-SANTOS, C., AGUILA, M.B.: **Image analysis and quantitative morphology.** Methods Mol Biol. 611:211-25; 2010.

MATTOS, L.J. **Efeitos e aspectos de intoxicação, biodistribuição e detoxificação de microcistina-LR (cianotoxina) em mamífero.** Monografia apresentada ao IMPPG, UFRJ; 2008.

MARZOLINI, C., TIRONA, R. G., KIM, R.B.: **Pharmacogenomics of the OATP and OATfamilies.** Pharmacogenomics, 5(3):273–282; 2004.

MCDERMOTT, C. M., NHO, D.C., HOWARD, W., HOLTON, B.: **The cyanobacterial toxin, microcystin-LR, can induce apoptosis in a variety of cell types.** *Toxicon*, 36(12):1981 – 1996; 1998.

MEIER-ABT, F., HAMMANN-HÄNNI, A., STIEGER, B., BALLATORI, N., BOYER, J.: **The organic anion transport polypeptide 1d1 (Oatp1d1) mediates hepatocellular uptake of phalloidin and microcystin into skate liver.** *Toxic. and Appl. Pharma.*, 218(3):274 – 279; 2007.

MERILUOTO, J., SANDSTRÖM, A., ERIKSSON, J., REMAUD, G., GRAIG, A.G., CHATTOPADHYAYA, G.: **Structure and toxicity of a peptide hepatotoxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*.** *Toxicon*, 27(9):1021 – 1034; 1989.

MILUTINOVIĆ, A., SEDMAK, B., HORVAT-ZNIDARSIC, I., SUPUT, D.: **Renal injuries induced by chronic intoxication with microcystins.** *Cell Mol. Biol. Lett.* 7(1): 139-141; 2002.

MILUTINOVIĆ, A., ZIVIN, M., ZORC-PLESKOVIC, R., SEDMAK, B., SUPUT, D.: **Nephrotoxic effects of chronic administration of microcystins -LR and -YR.** *Toxicon*, 42(3):281 – 288; 2003.

MILUTINOVIĆ A, ZORC-PLESKOVIC R, PETROVIC D, ZORC M, SUPUT D.: **Microcystin-LR induces alterations in heart muscle.** *Folia Biol (Praha)*. 52(4):116-118; 2006.

MIURA, G.A.; ROBINSON, N.A.; GEISBERT, T.W.; BOSTIAN, K.A.; WHITE, J.D.; PACE, J.G.: **Comparison of in vivo and in vitro toxic effects of microcystin-LR in fasted rats.** *Toxicon* 27:1229-1240; 1989.

MIYAMOTO, Y.; KOH, Y.H.; PARK, Y.S.; FUJIWARA, N.; SAKIYAMA, H.; MISONOU, Y. **Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses.** *Biol Chem* 384(4):567-574; 2003.

MONKS, N. R., LIU, S., XU, Y., YU, H., BENDELOW, A.S., MOSCOW, J.A.: **Potent cytotoxicity of the phosphatase inhibitor microcystin LR and microcystin analogues in OATP1B1- and OATP1B3-expressing HeLa cells.** *Molec. Cancer Therap.*, 6(2):587–598; 2007.

MORENO, I., S. PICHARDO, A. JOS, L. GÓMEZ-AMORES, A. MATE, C. VAZQUEZ, CAMEÁN, A.: **Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally.** *Toxicon*, 45(4):395 – 402; 2005.

NADAL, C., ZAJDELA, F.: **Hepatic polyploidy in the rat. IV. Experimental changes in the nucleolar volume of liver cells and their mechanisms of regulation.** *Exp. Cell. Res.* 48: 518–528; 1967.

NAIK, E., DIXIT, M.V.: **Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production.** The J. of Exp. Med., 208(3):417–420; 2011.

NAKANO, Y., SHIRAI, M., MORI, N., NAKANO, M.: **Neutralization of microcystin shock in mice by tumor necrosis factor alpha antiserum.** Appl. Environ. Microbiol. 57(1): 327-330; 1991.

NAKATANI, T., INOUE, M., MIROCHNITCHENKO, O.: **Overexpression of antioxidant enzymes in transgenic mice decreases cellular ploidy during liver regeneration.** Exp. Cell. Res. 236: 137–146. 1997.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.** NIH, EUA. 8th Edition; 2011.

NIEMI, M.: **Role of OATP transporters in the disposition of drugs.** Pharmacogenomics, 8(7):787–802; 2007.

NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R., NISHIWAKI, S., OHTA, T., YOSHIZAWA, S., SUGANUMA, M., HARADA, K.: **Structure-function relationships of microcystins, liver tumor promoters, in interaction with protein phosphatase.** Jpn. J. Cancer Res. 82(9): 993-996; 1991.

NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R., OHTA, T., NISHIWAKI, S., SUGANUMA, M., KOHYAMA, K., ISHIKAWA, T.: **Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR.** J. Cancer Res. Clin. Oncol. 118(6): 420-424; 1992.

NISHIWAKI, R., OHTA, T., SUEOKA, E., SUGANUMA, M., HARADA, K.I., WATANABE, M.F., FUJIKI, H.: **Two significant aspects of microcystin-LR: specific binding and liver specificity.** Cancer Letters, 83(2):283 – 289. Comprehensive View of Carcinogenesis. In honor of Dr. T. Sugimura; 1994.

NOBRE, A., COÊLHO, G., COUTINHO, M., SILVA, E. ANGELIM, D. MENEZES, M. FONTELES, C.M., MONTEIRO, H.S.: **The role of phospholipase A2 and cyclooxygenase in renal toxicity induced by microcystin-LR.** Toxicon, 39(5):721 – 724; 2001.

NOBRE, A. C. L., MARTINS, A. HAVT, A., BENEVIDES, C., LIMA, A.A.M., FONTELES, C.M., MONTEIRO, H.S.: **Renal effects of supernatant from rat peritoneal macrophages activated by microcystin-LR: role protein mediators.** Toxicon, 41(3):377 –381; 2003.

NOBRE, A., NUNES-MONTEIRO, S., MONTEIRO, M., MARTINS, A. HAVT, A., BARBOSA, P., LIMA, A., MONTEIRO, H.: **Microcystin-LR promote intestinal secretion of water and electrolytes in rats.** Toxicon, 44(5):555 – 559; 2004.

OHNO, S.: **The reason for as well as the consequence of the Cambrian explosion in animal evolution.** J. of Mol. Evol., 44:S23–S27. 1997.

OKAMURA, N., SAKAEDA, T., OKUMURA, K.: **Pharmacogenomics of MDR and MRP subfamilies.** Pers. Med, 1(1):85–104; 2004.

PALÍKOVÁ, M., KREJČÍ, P., HILSCHEROVÁ, K., BABICA, P., NAVRÁTIL, S., KOPP, R., BLÁHA, R.: **Effect of different cyanobacterial biomasses and their fractions with variable microcystin content on embryonal development of carp (*Cyprinus carpio* L.).** Aqua. Toxic., 81(3):312 – 318; 2007.

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.** Bioch et Biophys Acta (BBA) - General Subjects, 1425(3):527 – 533; 1998.

PICANÇO, M., SOARES, R., CAGIDO, V., AZEVEDO, S., ROCCO, P., ZIN, W.: **Toxicity of a cyanobacterial extract containing microcystins to mouse lungs.** Brazil. J. of Med. and Bio. Res., 37:1225 – 1229; 2004.

PILOTTO, L., HOBSON, P., BURCH, M.D., RANMUTHUGALA, G., ATTEWELL, R., WEIGHTMAN, R.: **Acute skin irritant effects of cyanobacteria (blue-green algae) in healthy volunteers.** Aus and New Zeal J of Pub Health, 28(3):220–224; 2004.

POURIA, S., DE ANDRADE, A., BARBOSA, J., CAVALCANTI, R.L., BARRETO, V.T., WARD, C.J.: **Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil.** Lancet 352(9121): 21-26; 1998.

QIU, T., XIE, P., LIU, Y., LI, G., XIONG, Q., HAO, L., LI, H.: **The profound effects of microcystin on cardiac antioxidant enzymes, mitochondrial function and cardiac toxicity in rat.** Toxicology, 257(1-2):86 – 94; 2009.

RADI, R.: **Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration.** P Nacio of Science of the USA, 101, 12; 2004.

RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S.: **Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method.** Nature Protocol 10; 127-132; 2007.

RAPALA J, SIVONEN K, LYRA C, NIEMELÄ SI.: **Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli.** Appl. Environ. Microbiol. 63(6): 2206-2212; 1997.

RIELLA, M.C., PASCHALY, M.A., ZUNINO, D. **Avaliação clínica e laboratorial da função renal.** Em: RIELLA, M.C. Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrolíticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

RINEHART, K., NAMIKOSHI, M., CHOI, B.: **Structure and biosynthesis of toxins from bluegreen algae (cyanobacteria).** J of Ap Phyc, 6:159–176. 1994.

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.** Toxicol, 27, 1035-1042; 1989.

ROBINSON, N. A., PACE, G.J., MATSON, F.C., MIURA, G.A., LAWRENCE, W.: **Tissue distribution, excretion and hepatic biotransformation of microcystin-LR in mice.** J. of Pharma. and Exp. Ther., 256(1):176–182; 1991a.

ROBINSON, N.A.; ROBINSON, N.A.; PACE, J.G.: **Association of microcystin-LR and its biotransformation products with a hepatic-cytosolic protein.** J. Biochem. Toxicology, 6, 171-180, 1991b;

RUNNEGAR, M. T., KONG, S., BERNDT, N.: **Protein phosphatase inhibition and in vivo hepatotoxicity of microcystins.** Am J of Phys - Gastrointestinal and Liver Physiology, 265(2):G224–G230; 1993.

RUNNEGAR, M. T., KONG, S.M., ZHONG, Y.Z., GE, J.L., LU, S.C.: **The Role of Glutathione in the Toxicity of a Novel Cyanobacterial Alkaloid Cylindrospermopsin in Cultured Rat Hepatocytes.** Bioch and Biophys Res Comm, 201(1):235 – 241; 1994.

RUNNEGAR, M., BERNDT, N., KAPLOWITZ, N.: **Microcystin Uptake and Inhibition of Protein Phosphatases: Effects of Chemoprotectants and Self-Inhibition in Relation to Known Hepatic Transporters.** Toxic and Appl Pharma, 134(2):264 – 272; 1995a.

RUNNEGAR, M., BERNDT, N., KONG, S.M., LEE, E.Y.C., ZHANG, L.F.: **In Vivo and in vitro Binding of Microcystin to Protein Phosphatase 1 and 2A.** Bioch and Biophys Res Comm, 216(1):162 – 169; 1995b.

RYTER, S.W., KIM, H.P., HOETZEL, A., PARK, J.W., NAKAHIRA, K., WANG, X., CHOI, A.M.: **Mechanisms of cell death in oxidative stress.** Antioxid Redox Signal, 9(1):49-89; 2007.

SAETER, G., SCHWARZE, E., SEGLEN, O.: **Shift from polyploidizing to nonpolyploidizing growth in carcinogen-treated rat liver.** J. Natl. Cancer Inst. 80: 950–958; 1988.

SALTZMAN, M. R., YOUNG, S.A., KUMP, L.R., GILL, B.C., LYONS, T.W., RUNNEGAR, B.: **Pulse of atmospheric oxygen during the late Cambrian.** PNAS, 108(10):3876–3881; 2011.

SCHATTENBERG, J.M., GALLE, P.R.: **Animal Models of Non-Alcoholic Steatohepatitis: Of Mice and Man.** Dig Dis. 28:247-254; 2010.

SEKIJIMA, M., TSUTSUMI, T., YOSHIDA, T., HARADA, T., TASHIRO, F., CHEN, G., YU, S.Z., UENO, Y.: **Enhancement of glutathione S-transferase placental-form positive liver cell foci development by microcystin-LR in aflatoxin B1-initiated rats.** Carcinogenesis, 20(1):161–165; 1999.

SHAW, G.R., SEAWRIGHT, A.A., MOORE, M.R., LAM, P.K.: **Cylindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid: evaluation of its toxicologic activity.** Ther. Drug Monit. 22(1): 89-92; 2000.

SHENOLIKAR, S.; INGEBRITSEN, T.S. **Protein (serine and threonine) phosphate phosphatases.** Methods Enzymol 107:102-120; 1984.

SIVONEN, K., KONONEN, K., CARMICHAEL, W.W., DAHLEM, A.M., RINEHART, K.L., KIVIRANTA, J., NIEMELA, S.I.: **Occurrence of the hepatotoxic cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea and structure of the toxin.** Appl. Environ. Microbiol. 55(8): 1990-1995; 1989.

SIVONEN, K., CARMICHAEL, W.W., NAMIKOSHI, M., RINEHART, K.L., DAHLEM, A.M., NIEMELÄ, S.I.: **Isolation and characterization of hepatotoxic microcystin homologs from the filamentous freshwater cyanobacterium *Nostoc sp.* strain 152.** Appl. Environ. Microbiol. 56(9): 2650-2657; 1990.

SIVONEN, K., NAMIKOSHI, M., EVANS, W.R., FARDIG, M., CARMICHAEL, W.W., RINEHART, L.: **Three new microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins, from *Nostoc sp.* strain 152.** Chem Res in Toxic, 5(4):464–469; 1992.

SLATKIN, D., STONER, S., ADAMS, W., KYCIA, J., SIEGELMAN, H.: **Atypical pulmonary thrombosis caused by a toxic cyanobacterial peptide.** Science, 20(4604):1383–1385; 1983.

SOARES, R.M.: **Aspectos da biodistribuição e efeitos de microcistinas (hepatotoxinas de cianobactérias) em mamíferos.** Tese de Doutorado - UFRJ/CCS/IBCCF, 2005.

SOARES, R. M., YUAN, M., SERVAITES, J.C., DELGADO, A., MAGALHÃES, V.F., HILBORN, E.D., CARMICHAEL, W.W., AZEVEDO, S.M.F.O.: **Sublethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro, Brazil.** Environ Toxic, 21(2):95–103; 2006.

SOARES, R. M., CAGIDO, V.R., FERRARO, R.B., MEYER-FERNANDES, J.R., ROCCO, P.R., ZIN, W.A., AZEVEDO, S.M.: **Effects of microcystin-LR on mouse lungs.** Toxicon, 50(3):330 – 338; 2007.

STEWART, I., WEBB, P.M., SCHLUTER, P.J., SHAW, G.R. **Recreational and occupational field exposure to freshwater cyanobacteria: a review of anecdotal and case reports, epidemiological studies and the challenges for epidemiologic assessment.** Environ. Health, 5(1): 6-20. 2006a.

STEWART, I., WEBB, P., SCHLUTER, P., FLEMING, L., BURNS, J., GANTAR, M., BACKER, L., SHAW, G.: **Epidemiology of recreational exposure to freshwater cyanobacteria - an international prospective cohort study.** BMC Public Health, 6(1):93-101; 2006b.

STRANGE, R. C., JONES, P.W., FRYER, A.A.: **Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology.** Toxicology Letters, 112-113:357 – 363; 2000.

SUPUT, D., ZORC-PLESKOVIC, R., PETROVIC, D., MILUTINOVIĆ, A.: **Cardiotoxic injury caused by chronic administration of microcystin-YR.** Folia Biol (Praha). 56(1):14-18; 2010.

SVIRCEV, Z., BALTIC, V., GANTAR, M., JUKOVIC, M., STOJANOVIC, D., BALTIC, M.: **Molecular aspects of microcystin-induced hepatotoxicity and hepatocarcinogenesis.** J of Environ Science and Health, Part C, 28(1):39–59; 2010.

TENCALLA, F., DIETRICH, D.: **Biochemical characterization of microcystin toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** Toxicon, 35(4):583 – 595; 1997.

THOMAS, A., SAKER, M., NORTON, J., OLSEN, R.: **Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* as a probable cause of death in cattle in northern Queensland.** Australian Vet Journal, 76(9):592–594; 1998.

TURNER, P.C.; GAMMIE, A.J.; HOLLINRAKE, K.; CODD, G.A.: **Pneumonia associated with cyanobacteria.** Br Med J 300:1400-1414; 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, 17(6):1317–1321; 1996.

VAN APELDOORN, M. E., VAN EGMOND, H.P., SPEIJERS, J.G.A., BAKKER, G.J.I.: **Toxins of cyanobacteria.** Molec Nutr Food Research, 51(1):7–60; 2007.

VELA, L., SEVILLA, E., GONZALEZ, C., BES, M., FILLAT, M., PELEATO, M.: **Exploring the interaction of microcystin-LR with proteins and DNA.** Toxic in Vitro, 22(7):1714 – 1718; 2008.

WANG, Q., XIE, P., CHEN, J., LIANG, G.: **Distribution of microcystins in various organs (heart, liver, intestine, gonad, brain, kidney and lung) of Wistar rat via intravenous injection.** Toxicon, 52(6):721 – 727; 2008.

WATANABE, M.F., OISHI, S.: **Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions.** Appl. Environ. Microbiol. 49(5): 1342-1344; 1985.

WATANABE, M.F., HARADA, K.I., CARMICHAEL, W.W., FUJIKI, H.: **Toxic *Microcystis*.** CRC Press, Boca Raton, FL, 262; 1996.

WEI, Y., WENG, D., LI, F., ZOU, X., YOUNG, D.O., JI, J., SHEN, P.: **Involvement of JNK regulation in oxidative stress-mediated murine liver injury by microcystin-LR.** Apoptosis 13(8): 1031-1042; 2008.

WENG, D., LU, Y., WEI, Y., LIU, Y., SHEN, P.: **The role of ROS in microcystin-LR-induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice.** Toxicology, 232(1):15 – 23; 2007.

WESTRICK, J.A., SZLAG, D.C., SOUTHWELL, B.J., SINCLAIR, J.: **A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment.** Anal Bioanal Chem. 397(5):1705-1714; 2010.

WHO: **Cyanobacterial toxins: microcystin-LR.** World Health Organization, Geneva, Switzerland. pp. 95–110; 1998.

WHO: **Algae and cyanobacteria in fresh water.** Em Guidelines for safe recreational water environments. World Health Organization, Geneva, Switzerland. pp. 136–158; 2003.

WICKSTROM, M.; HASCHEK, W.; HENNINGSSEN, G.; MILLER, L.A.; WYMAN, J.; BEASLEY, V.: **Sequential ultrastructural and biochemical changes induced by microcystin-LR in isolated perfused rat livers.** Nat Toxins 4:195-205; 1996.

WIEDNER, C., VISSER, P.M., FASTNER, J., METCALF, J.S., CODD, G.A., MUR, L.R.: **Effects of Light on the Microcystin Content of Microcystis Strain PCC 7806.** Appl. Environ. Microbiol., 69(3):1475–1481; 2003.

WILLIAMS, D. E., KENT, M.L., ANDERSEN, R.J., KLIX, H., HOLMES, C.B.: **Tissue distribution and clearance of tritium-labeled dihydromicrocystin-LR epimers administered to Atlantic salmon via intraperitoneal injection.** Toxicon, 33(2):125 – 131; 1995.

WILLIAMS, D. E., CRAIG, M., DAWE, S.C., KENT, M.L., HOLMES, C.F.B., ANDERSEN, F.B.: **Evidence for a Covalently Bound Form of Microcystin-LR in Salmon Liver and Dungeness Crab Larvae.** Chem Res in Toxic, 10(4):463–469; 1997.

WU, F.; WILSON, J.X. **Peroxynitrite-dependent activation of protein phosphatase type 2A mediates microvascular endothelial barrier dysfunction.** Cardiovascular Research. 24, 1086-1093, 2008.

XING, M.L., WANG, X.F., XU, L.H.: **Alteration of proteins expression in apoptotic FL cells induced by MCLR.** Environ Toxic, 23(4):451–458; 2008.

XU, Y.; KRUKOFF, T.L. **Adrenomedullin Stimulates Nitric Oxide Production from Primary Rat Hypothalamic Neurons: Roles of Calcium and Phosphatases.** Molec Pharm, 72(1), 43-50; 2007.

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, 229; 1995.

YOSHIDA, T., MAKITA, Y., NAGATA, S., TSUTSUMI, T., YOSHIDA, F., SEKIJIMA, M.: **Acute oral toxicity of microcystin-LR, a cyanobacterial hepatotoxin, in mice.** Nat. Toxins 5(3): 91-95; 1997.

YU, S., ZHAO, N., ZI, X.: **The relationship between cyanotoxin (microcystin, MC) in pond-ditch water and primary liver cancer in China.** (2):96-9; 2001.

YUAN, M., CARMICHAEL, W.W., HILBORN, E.D.: **Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996.** Toxicon, 48(6):627 – 640; 2006.

UTKILEN, H., GJØLME, N.: **Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance.** Appl. Environ. 1992.

UTKILEN, H., GJØLME, N.: **Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*.** Appl. Environ. Microbiol. 61(2): 797-800; 1995.

ZEGURA, B., SEDMAK, B., FILIPIC, M.: **Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2.** Toxicon, 41(1):41 – 48; 2003.

ZEGURA, B., LAH, T.T., FILIPIC, M.: **The role of reactive oxygen species in microcystin- LR-induced DNA damage.** Toxicology, 200(1):59 – 68; 2004.

ZEGURA, B., LAH, T.T., FILIPIC, M.: **Alteration of intracellular GSH levels and its role in microcystin-LR-induced DNA damage in human hepatoma HepG2 cells.** Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 611(1):25 – 33; 2006.

ZEGURA, B., VOLCIC, M., LAH, T.T., FILIPIC, M.: **Different sensitivities of human colonadenocarcinoma (CaCo-2), astrocytoma (IPDDC-A2) and lymphoblastoid**

(NCNC) celllines to microcystin-LR induced reactive oxygen species and DNA damage. *Toxicol.* 52(3):518 – 525; 2008.

ZEGURA, B., STRASER, A., FILIPIC, M.: **Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review.** *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 727(2):16 – 41; 2011.

ZHANG, Z, LIAN, M, LIU, Y, WEI, G, YU, S, KANG, S, ZHANG, Y, CHEN, C. **Teratosis and damage of viscera induced by microcystin in SD rat fetuses.** *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 82(5):345-347; 2002.

ZHANG, H., ZHANG, J., CHEN, Y., ZHU, Y.: **Influence of intracellular Ca²⁺, mitochondria membrane potential, reactive oxygen species, and intracellular ATP on the mechanism of microcystin-LR induced apoptosis in *Carassius auratus* lymphocytes in vitro.** *Environ Toxicol.* 22(6):559–564; 2007a.

ZHANG, H.J., ZHANG, J.Y., HONG, Y., CHEN, Y.X.: **Evaluation of organ distribution of microcystins in the freshwater phytoplanktivorous fish *Hypophthalmichthys molitrix*.** *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 8(2): 116-120; 2007b.

ZHANG, H.; ZHANG, J.; CHEN, Y.; ZHU, Y.: **Microcystin-RR induces apoptosis in fish lymphocytes by generating reactive oxygen species and causing mitochondrial damage.** *Fish Physiol. Biochem.* 34, 307–312; 2008.

ZURAWELL, R.W., CHEN, H., BURKE, J.M., PREPAS, E.E.: **Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments.** *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 8(1): 1-37; 2005.