

TOXICOLOGIA DE CIANOTOXINAS: MICROCISTINAS AS ESTRELAS DO TEMA

Raquel Moraes Soares^{1, 2*}

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ). Rua Lúcio Tavares, 1045. Centro. CEP 26530-060. Nilópolis, RJ, Brasil.

² Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Bloco G, CCS. Universidade Federal do Rio de Janeiro. CEP 21949-900. Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

* E-mail: rmsoares@biof.ufrj.br

RESUMO

Atualmente, a preocupação mais séria em relação às florações de cianobactérias em ambientes aquáticos, é o fato de que as mesmas são potencialmente produtoras de toxinas que podem causar sérios danos a mamíferos e diversos organismos da biota aquática. As cianotoxinas mais comuns, as chamadas microcistinas, têm como órgão alvo principal, nos vertebrados, o fígado, uma vez que os hepatócitos são capazes de captá-las através dos transportadores de ácidos biliares. No interior da célula, essa toxina é um potente inibidor de proteínas fosfatases do tipo 1 e 2A, às quais se ligam irreversivelmente. Em dose letal e aguda, a consequência final desta inibição é uma hemorragia intra-hepática. Em dose subletal e crônica, essas moléculas também podem gerar danos a outros tecidos e já são reconhecidas como promotoras de tumores. Ainda existe uma carência de estudos toxicológicos de longo prazo desta toxina em doses subletais nas espécies potencialmente alvo. Em relação à população humana, após o incidente de Caruaru, onde mais de 100 pacientes de hemodiálise faleceram após tratamento com água contaminada com microcistinas, aumentou consideravelmente a preocupação mundial quanto aos riscos impostos pela ocorrência de cianobactérias em corpos d'água utilizados para o abastecimento público. Isto se reflete na criação de legislação específica para o aperfeiçoamento do controle da qualidade da água, incluindo o monitoramento de cianotoxinas, sendo o Brasil o primeiro país a estabelecer tal medida. Portanto, os estudos toxicológicos experimentais são uma importante ferramenta na avaliação dos riscos dessas toxinas para a população humana.

Palavras-chave: Cianotoxinas, microcistinas, toxicologia.

ABSTRACT

TOXICOLOGY OF CYANOTOXINS: ON THE MICROCYSTINS: Cyanobacterial blooms are of worldwide concern as these microorganisms may produce toxins, including neurotoxins and hepatotoxins that can be seriously harmful to mammals and aquatic organisms. The most common type of cyanotoxin, microcystin, can affect the liver of vertebrates since hepatocytes are able to uptake it through the bile acid transporters. Microcystins are potent inhibitors of phosphatases 1 and 2A, by covalently and irreversibly binding to these enzymes. The ultimate consequence, when a lethal and acute dose is achieved, is hepatic hemorrhage. At sublethal and chronic doses, the toxin damages other tissues and promotes tumor formation. However, little is known about the toxicology, biodistribution and effects of long-term exposure to microcystins. Concern about the effects of such toxins on human populations are in fact quite recent. For instance, public health authorities began to realize the risk of the presence of cyanobacteria in water supplies only after an incident in 1996 in Caruaru (Northeast Brazil) resulting in the deaths of 100 patients from hemodialysis using microcystin-contaminated water. This led to the elaboration of specific laws regarding water quality control, including monitoring for cyanotoxins, making Brazil the first country to establish such a measure. This illustrates the importance of toxicological studies to assess the risk of cyanotoxins toward human populations.

Keywords: Cyanotoxins, microcystins, toxicology.

RESUMEN

TOXICOLOGÍA DE CIANOTOXINAS: LAS MICROCISTINAS SON LAS PROTAGONISTAS:

Actualmente hay una gran preocupación por las floraciones de cianobacterias en ambientes acuáticos, particularmente por el hecho de que éstas son productoras potenciales de toxinas que pueden causar daños severos en los mamíferos y en otros organismos acuáticos. Las cianotoxinas más comunes, conocidas como microcistinas, afectan principalmente el hígado de los vertebrados, pues los hepatocitos son capaces de captarlas a través de los transportadores de los ácidos biliares. En el interior de las células esta toxina es un potente inhibidor de las proteínas fosfatasa tipo 1 y 2A a las que se unen irreversiblemente. En dosis letales y agudas, la consecuencia final es una hemorragia intrahepática. En dosis subletales y crónicas, estas moléculas también pueden generar daños a otros tejidos y además ya son reconocidas en la actualidad como promotoras de tumores. No obstante, aun son pocos los estudios toxicológicos a largo plazo sobre el efecto de esta toxina en dosis subletales en las especies que podrían ser potencialmente afectadas. Respecto a las poblaciones humanas, luego del incidente de Caruaru en Brasil en 1996 en donde más de 100 pacientes de hemodiálisis fallecieron luego de tratarse con agua contaminada con microcistinas, aumentó considerablemente, la preocupación mundial sobre los riesgos que existen por la presencia de cianobacterias en cuerpos de agua usados para el abastecimiento de la población. Esto se ha reflejado en la elaboración de legislación específica para perfeccionar el control de la calidad del agua, por lo que ahora se incluye el monitoreo de cianotoxinas, siendo Brasil el primer país en establecer esta medida. Por esto, los estudios toxicológicos experimentales son una herramienta importante para la evaluación de los riesgos de estas toxinas en las poblaciones humanas.

Palabras clave: Cianotoxinas, microcistinas, toxicología.

INTRODUÇÃO

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

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

O processo de eutrofização, que é o enriquecimento por nutrientes dos corpos d'água continentais e costeiros, tem se manifestado como um fenômeno mundial que vem se intensificando a partir dos anos 50 e cujas causas principais estão relacionadas ao desenvolvimento urbano, industrial e agrícola (Chorus & Bartram 1999). Corpos d'água eutróficos favorecem o surgimento de florações de cianobactérias

que muitas vezes podem se apresentar como espessas camadas de células na superfície do corpo d'água. Este fenômeno tem sido registrado com grande frequência em vários países como: Canadá, EUA, Portugal, Inglaterra, Alemanha, África do Sul, China, Brasil, Austrália, entre outros (Yoo *et al.* 1995).

Atualmente, a preocupação mais séria quanto ao surgimento de uma floração é o fato de que cianobactérias são potencialmente produtoras de toxinas que podem causar sérios danos a mamíferos e prejudicar também a biota aquática (Carmichael 1997). No Brasil, a intensa eutrofização de vários rios, reservatórios, lagoas e lagos tem favorecido a dominância desses organismos nestes ambientes. Além disso, grande parte das cepas de cianobactérias isoladas de corpos d'água brasileiros mostrou-se produtora de toxinas (Costa & Azevedo 1994, Domingos *et al.* 1999, Sant'Anna & Azevedo 2000). Sabendo-se que muitos desses mananciais são utilizados para o abastecimento público, a liberação dessas toxinas na água representa um risco para a saúde pública.

TOXINAS DE CIANOBACTÉRIAS

As toxinas de cianobactérias são caracterizadas como endotoxinas por serem, geralmente, liberadas apenas quando acontece o rompimento da célula.

Uma espécie de cianobactéria pode produzir mais de um tipo de toxina e dentro de uma mesma espécie podem existir cepas produtoras e cepas não produtoras de toxinas. Estas moléculas estão divididas em três classes principais: dermatotoxinas (aplysiatoxina e lyngbyatoxina-a), neurotoxinas e hepatotoxinas, sendo estas duas últimas as mais frequentemente encontradas em corpos d'água e que geram maiores preocupações (Carmichael 1997).

As neurotoxinas já foram isoladas nos seguintes gêneros: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Trichodesmium*, *Lyngbya* e *Cylindrospermopsis*. A anatoxina-a é um alcalóide que age como bloqueador neuromuscular pós-sináptico de receptores nicotínicos e colinérgicos. A ligação irreversível desta molécula aos receptores de acetilcolina gera o efeito neurotóxico pelo fato da toxina não ser degradada pela acetilcolinesterase. A dose letal para 50% (DL_{50}) dos camundongos injetados intraperitonealmente (i.p) com anatoxina-a é de $375\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de peso corpóreo, com um tempo de sobrevivência de 1 a 20 minutos. A anatoxina-a(s) é um organofosforado natural e tem um mecanismo de ação semelhante à anatoxina-a, pois inibe a ação da acetilcolinesterase, impedindo a degradação da acetilcolina ligada aos receptores. A DL_{50} da anatoxina-a(s) por injeção i.p. em camundongos é de $20\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de peso corpóreo. Saxitoxinas é o nome genérico que se tem adotado para um grupo de neurotoxinas conhecidas como 'toxinas paralisantes de mariscos' (PSTs) que foram primeiramente isoladas de dinoflagelados marinhos. Estas moléculas são um grupo de alcalóides carbamatos que podem ser não sulfatados (saxitoxinas), com um único grupamento sulfato (G-toxinas), com dois grupamentos sulfato (C-toxinas) e ainda conter grupamentos decarbamoil (dcSTXs ou dcGTXs). A toxicidade do grupo das PSTs varia bastante, sendo a saxitoxina a mais potente, com uma DL_{50} para camundongos de $10\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de peso corpóreo pela via i.p. e de $263\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de peso corpóreo por consumo oral. As PSTs agem através da inibição do impulso nervoso por bloqueio dos canais de sódio, afetando assim ou a permeabilidade ao potássio ou a resistência das membranas. Os sintomas em animais podem se iniciar 5 minutos após a injeção i.p. e a exposição a doses letais leva a morte entre 2 e 12 horas pela consequência final de parada respiratória, assim como ocorre com as outras neurotoxinas (Carmichael *et al.* 1997, Funasa 2003).

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

As nodularinas são um grupo de pentapeptídeos cíclicos que agem de modo muito semelhantes às microcistinas (que serão abordadas a seguir), principalmente por conter o mesmo aminoácido responsável pela atividade biológica destas moléculas, o Adda (descrito mais adiante), que causa a inibição enzimática das proteínas fosfatases 1 e 2A. As nodularinas apresentam uma DL_{50} que varia de 50 a $200\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de peso corpóreo (Funasa 2003).

As cilindrospermopsinas são alcalóides guanidínicos cíclicos que, apesar de frequentemente serem denominadas como hepatotoxinas, apresentam efeitos bem mais amplos. Estas moléculas além de causarem danos ao fígado, afetam rins, trato gastrointestinal, órgãos endócrinos, sistema imune, sistema vascular e músculos. Cilindrospermopsinas geram duas respostas de toxicidade: uma rápida, provavelmente devido à formação no organismo de um metabólito tóxico resultante da ação da enzima citocromo P-450, e outra mais lenta - resultado da inibição da síntese protéica que esta cianotoxina causa. Isso gera duas diferentes DL_{50} em camundongos pela via i.p.: $2100\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de peso corpóreo para morte até 24 h e $200\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de peso corpóreo para morte entre 5-6 dias (Silva 2008).

Tanto para as nodularinas, quanto para as cilindrospermopsinas há alguns estudos que indicam efeitos genotóxicos, carcinogênicos e, para as cilindrospermopsinas, também mutagênicos. No entanto, existem poucos estudos sobre efeitos reprodutivos e de desenvolvimento embrionário. Além disso, todos estes estudos toxicológicos são deficitários em relação às neurotoxinas (Falconer 2007). Existem possíveis explicações para essa observação: algumas destas moléculas foram

descobertas mais recentemente do que outras, algumas são de difícil purificação para trabalhos experimentais e muitas não têm uma importância global como as moléculas que serão descritas a seguir, as microcistinas. Estas foram descritas pela primeira vez no início da década de 1980 e desde então são largamente estudadas, sendo um dos motivos para tal a sua ampla presença em florações de cianobactérias em todo o mundo.

MICROCISTINAS

ESTRUTURA QUÍMICA E FARMACOCINÉTICA

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

Essas toxinas são caracterizadas pela presença de 5 D-aminoácidos e 2 L-aminoácidos, sendo sua estrutura geral descrita como: ciclo-(D-alanina¹-X²-D-MeAsp³-Y⁴-Adda⁵-D-glutamato⁶-Mdha⁷), onde D-MeAsp³ é D-eritro-β-ácido metilaspártico, Mdha é N- metildehidroalanina e Adda é (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienóico. Na Figura 1 podem ser observados em destaque os dois L-aminoácidos da molécula (no caso a arginina =R e a leucina=L). A variabilidade dos L- aminoácidos é uma das principais razões da existência de mais de 80 congêneres de microcistinas até então descritos.

Por serem moléculas hidrofílicas, microcistinas apresentam pouca capacidade de ultrapassar membranas lipídicas. Mas, uma vez captadas pelas células, são potentes inibidores de proteínas fosfatases da família serina/treonina, especialmente PP1 e 2A. Nos animais vertebrados, essas toxinas têm o fígado como órgão alvo, pois os hepatócitos são capazes de captá-las através dos transportadores dos ácidos biliares. Este fato foi constatado com a

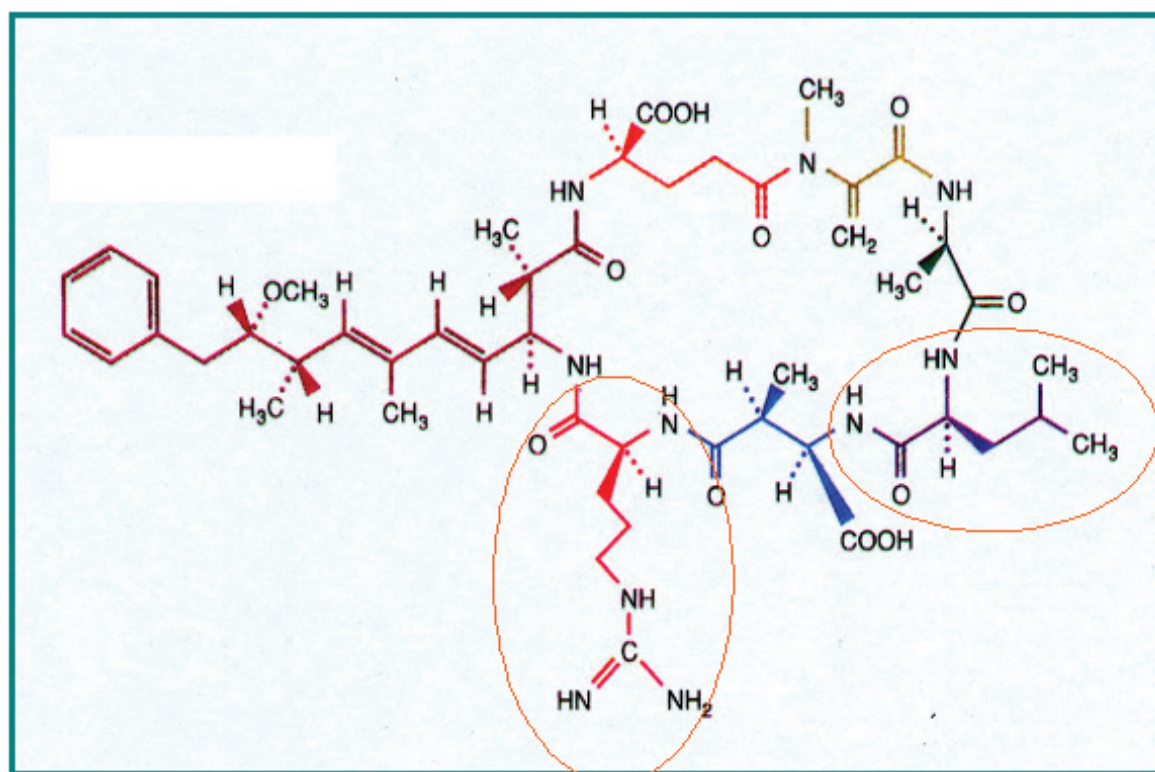


Figura 1. Desenho esquemático da molécula de microcistina-LR. Os dois L-aminoácidos variáveis estão destacados na figura (neste caso: arginina-esquerda; leucina- direita). Fonte: Modificado de Carmichael (1994).

Figure 1. Schematic representation of the molecule microcystin-LR. The two variable L-amino acids are indicated on the figure (arginine to the left and leucine to the right). Modified from Carmichael (1994).

observação *in vitro* de que essa captação é inibida por ácidos biliares. No entanto, as moléculas transportadoras envolvidas no processo ainda não foram especificamente identificadas; sabe-se apenas que estão entre os transportadores de ácidos biliares do sistema de transportadores de ânions orgânicos sódio-dependente e sódio-independente (Runnegar *et al.* 1995, Boaru *et al.* 2006). Já foi também observado que este transporte ocorre de forma rápida. Em estudos com camundongos injetados intraperitonealmente (i.p.) com [³H]-MCYST-LR, Robinson *et al.* (1989, 1991) verificaram que 1 hora após a injeção entre 60 e 70% da toxina já se encontrava no fígado. Neste mesmo estudo, os autores indicam uma eliminação rápida, cerca de poucos dias, das microcistinas pela urina e fezes. No entanto, um estudo recente com ratos Wistar mostrou a presença destas toxinas no soro sanguíneo por até dois meses (Soares 2005). No incidente em Caruaru-PE (1996), onde 76 pacientes renais faleceram após intoxicação com microcistinas contidas na água utilizada no tratamento de hemodiálise, os pacientes sobreviventes chegaram a apresentar toxinas no soro por mais de três meses após o período de exposição (dados não publicados).

A DL₅₀ de microcistinas para camundongos injetados intraperitonealmente varia de 50 a 1200 µg.Kg⁻¹ de peso corpóreo entre as variantes desta toxina. Tais doses causam a morte dos animais após um período que varia de 1 a 3h em ensaios de laboratórios (Watanabe *et al.* 1996). Já a DL₅₀ oral pode variar bastante entre diferentes roedores, apresentando valores de 50 a 170 vezes mais altos que a DL₅₀ intraperitoneal. No entanto, não há evidências de que microcistinas sejam hidrolisadas por peptidases no estômago. Existe pouca informação na literatura sobre os processos de absorção gastrointestinal, mas, aparentemente, uma quantidade significativa destas toxinas é capaz de ultrapassar a barreira intestinal (Chorus & Bartram 1999). Enterócitos do intestino delgado podem absorvê-las ativamente e mostram respostas de deformação *in vitro* a essas toxinas semelhantes às observadas em fígado (Falconer 2007).

METABOLIZAÇÃO E DETOXIFICAÇÃO

A principal via de metabolização e detoxificação das microcistinas no fígado ocorre através da glutathiona reduzida (GSH). Este tripeptídeo (L-γ-glutamil-

L-cisteinil-glicina) é conhecido por sua importância direta ou indireta em diversas funções biológicas, tais como síntese de proteínas e DNA, atividade enzimática, metabolismo e proteção da célula. Sabe-se que a glutathiona também reage com uma grande variedade de xenobióticos formando conjugados de GSH. Muitos desses conjugados podem ser convertidos em ácidos mercaptúricos para posteriormente serem excretados (Meister & Anderson 1983).

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

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

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

Gehring *et al.* (2004), em experimentos com camundongos injetados com 75% da DL₅₀ de MCYST-LR, verificaram que após aumento da

peroxidação lipídica (o que gera estresse oxidativo), causada por esta toxina, ocorre um aumento na atividade de glutathione peroxidase (GPX). Também foi observado um decréscimo inicial de GSH total, o que foi relacionado ao aumento da atividade de glutathione S-transferase. Posteriormente, os níveis de GSH voltaram ao normal, claramente devido ao aumento da atividade da glutathione sintetase. Neste trabalho, o aumento da atividade enzimática, em todos os casos, foi regulado pelo aumento da transcrição destas enzimas.

EFEITOS AO NÍVEL MOLECULAR, CELULAR E TECIDUAL

Ao nível molecular, os principais alvos das microcistinas são as proteínas fosfatases (PP) da família serina/treonina, dentre estas: PP1, PP2A, PP4 e PP5 (e também PP2B quando expostas a altas concentrações de microcistinas). A ligação MCYST-PPase ocorre em duas etapas principais: inicialmente,

o aminoácido hidrofóbico Adda das microcistinas ocupa o sítio ativo das proteínas fosfatases através de ligação não-covalente, o que produz o efeito inibitório da toxina. Em seguida, o aminoácido Mdha se liga covalentemente ao resíduo de cisteína 273 das fosfatases (Honkanen & Golden 2002) (Figura 2). Essa ligação é irreversível e prolonga o efeito deletério causado ao tecido. As constantes de inibição (K_i) de PP1 e PP2A para MCYST-LR estão entre 0,06-6nM e 0,01-2nM, respectivamente, o que mostra uma maior afinidade desta toxina pela PP2A (Dawson 1998).

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

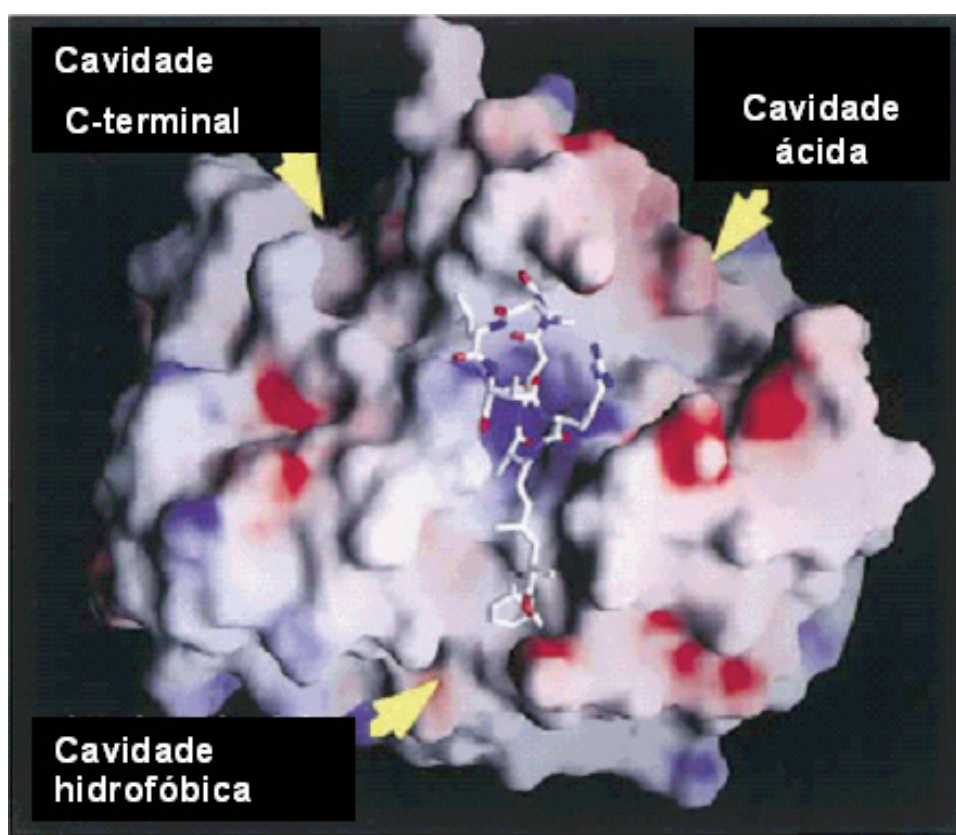


Figura 2. Superfície molecular do complexo PP1-MCYST-LR. No centro está a molécula de microcistina-LR com o aminoácido Adda ocupando o sítio ativo da enzima (na cavidade hidrofóbica). Fonte: Adaptado de Gupta *et al.* (1997).

Figure 2. Digital representation of the surface of the molecular complex PP1-MCYST-LR. In the center lies the microcystin-LR molecule with the amino acid Adda blocking the active site of the enzyme (hydrophobic groove). Adapted from Gupta *et al.* (1997).

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

A inibição de fosfatases por microcistinas leva a um aumento da fosforilação de diversos alvos subcelulares, inclusive proteínas do citoesqueleto e proteínas associadas ao mesmo, provocando o seu desarranjo (Figura 3). Como consequência, no fígado, as células hepáticas tendem a se arredondar, se separam e o tecido perde sua estrutura parenquimal. Concomitantemente, os capilares

sinusoidais rompem e ocorre um extravasamento de sangue para o espaço intersticial. Não há evidências de que o rompimento dos capilares sinusoidais esteja relacionado a efeitos da microcistina nas células endoteliais. Considera-se que o rompimento dos sinusóides é uma consequência das alterações que essas toxinas provocam na estrutura dos hepatócitos (Falconer *et al.* 1981, Hooser *et al.* 1990, Wickstrom *et al.* 1996). Em situações de intoxicação aguda, se observa uma hemorragia intra-hepática e o sangue retido no fígado faz com que o mesmo tenha seu peso dobrado e a morte ocorre por choque hemorrágico ou falência hepática (Carmichael 1994).

Em intoxicações agudas e letais com microcistinas, os danos histológicos observados no tecido hepático geralmente são: a congestão dos sinusóides, hepatócitos arredondados, necrose centrolobular e o extravasamento sanguíneo intersticial (Slatkin *et al.* 1983, Ito *et al.* 1997). Alguns autores também acreditam que microcistinas possam desencadear um processo inflamatório no fígado que contribuiria para o choque que leva a morte. Nos hepatócitos, além das microcistinas inibirem proteínas fosfatases, ativam fosfolipase A_2 e ciclooxigenase. Essas duas últimas enzimas participam da via metabólica do ácido aracônico que leva à produção dos mediadores inflamatórios tromboxano A_2 (um forte mediador

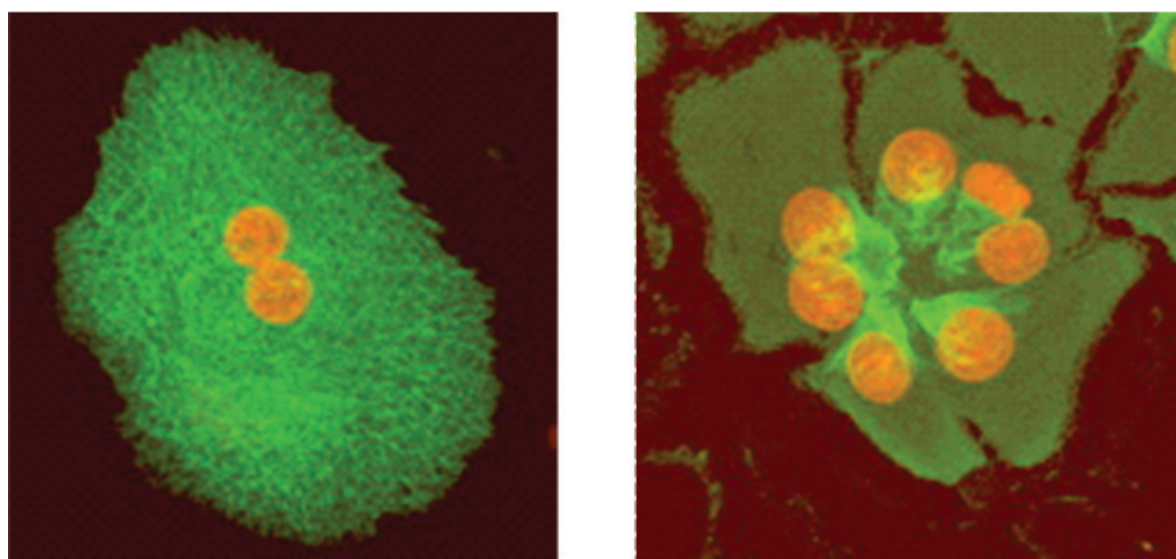


Figura 3. Fotomicrografia de hepatócitos antes (esquerda) e após (direita) a exposição às microcistinas, onde se pode observar o desarranjo do citoesqueleto. **Fonte:** John Eriksson, Universidade de Turku, Finlândia– imagem de website (2005, http://www.btk.fi/Research_Groups/Protein_Phosphorylation_Group/protein_phosphorylation_group.htm)

Figure 3. Photomicrography of hepatocytes before (left) and after (right) exposure to microcystins. Note disruption of the cytoskeleton architecture. **Source:** John Eriksson, University of Turku, Finland, from website (2005, http://www.btk.fi/Research_Groups/Protein_Phosphorylation_Group/protein_phosphorylation_group.htm)

de agregação plaquetária) e prostaglandina I_2 . Além disso, alguns estudos já demonstraram que microcistinas estimulam macrófagos peritoneais a produzir TNF- α (fator de necrose tumoral- α). Também já foi sugerido que IL-1 (interleucina-1) possa ser produzida por estes macrófagos. Estas importantes citocinas podem levar à produção de PAF (fator de ativação plaquetária) e consequente ativação da cicloxigenase. Desta forma, sugere-se que também é possível que macrófagos hepáticos (células de Kupffer) respondam às microcistinas produzindo estes mediadores inflamatórios (Watanabe *et al.* 1996). Recentemente, foi demonstrado o potencial atrativo de microcistinas para neutrófilos e os mesmos autores também verificaram que estas células quando estimuladas por essas toxinas, *in vitro*, produzem maiores quantidades de duas quimiocinas, IL-8 e CINC-2 $\alpha\beta$, envolvidas no processo de migração leucocitária (Kujbida *et al.* 2008). Essas observações estão de acordo com outros estudos *in vivo* que já verificaram processo inflamatório em alguns tecidos, originado por microcistinas.

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

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

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

Após uma única injeção intraperitoneal de uma dose subletal de microcistina-LR, há estudos que indicam que o fígado tem a capacidade de reversão do quadro de dano. Soares (2005) verificou que após uma depleção inicial, a partir de 24h após a exposição houve aumento da atividade das fosfatases 1 e 2A. Isso possivelmente ocorreu através de aumento da síntese destas enzimas alvo das MCYSTs, ou seja, *turnover* das mesmas devido ao reconhecimento pelas células das fosfatases inativas (Guzman *et al.* 2003, Gehringer comunicação pessoal). Andrinolo *et al.* (2008) também observaram evidências citológicas e fisiológicas de recuperação da função hepática até 2 meses após exposição a uma dose subletal a microcistina-LR.

Como descrito anteriormente, nos animais vertebrados doses letais de microcistinas levam rapidamente a morte devido aos efeitos extensos e danosos ao fígado. No entanto, estudos com doses subletais dessas toxinas mostraram que as mesmas provocam efeitos também em outros órgãos. Coração, gônadas e cérebro estão entre os órgãos que não são frequentemente estudados, mas podem ser afetados por microcistinas (Wang *et al.* 2008). Em alguns dos órgãos afetados, tais como rins e cérebro, já foram identificados os transportadores da família OATP já descritos no fígado (Feurstein *et al.* 2008).

Já foram observados alterações de atividades enzimáticas (sucrase, fosfatase ácida e succinato desidrogenase) e aumento da peroxidação lipídica na mucosa intestinal de ratos, assim como apoptose em quase todo o trato gastrointestinal de camundongos injetados intraperitonealmente com microcistinas (Moreno *et al.* 2003, Botha *et al.* 2004). A função renal também pode ser afetada: Nobre *et al.* (2001) observaram alterações no funcionamento de rins de ratos perfundidos com MCYST-LR que podem estar relacionadas a lesões vasculares e glomerulares.

Apesar de serem poucos os estudos descritos na literatura, sabe-se que o pulmão também pode ser atingido por estas toxinas. Após uma única administração intratraqueal de dose subletal de MCYST-LR a camundongos, Ito *et al.* (2001) detectaram, por técnicas de imunohistoquímica, a presença desta toxina no tecido pulmonar por até sete dias. Em um dos primeiros estudos toxicológicos, Slatkin *et al.* (1983) observaram que camundongos injetados intraperitonealmente com doses altas de MCYST-LR apresentaram uma trombose pulmonar atípica. Falconer *et al.* (1988), em um longo estudo de intoxicação crônica, ofereceram a camundongos água contendo extratos de *Microcystis aeruginosa* produtora de MCYSTs e verificaram broncopneumonia nos animais que receberam doses mais altas.

O pulmão pode ser exposto às microcistinas tanto pela via área quanto pela circulação sanguínea. Em um estudo sobre a exposição por inalação, Fitzgeorge *et al.* (1994) comprovaram que a DL_{50} de MCYST-LR para camundongos por administração intranasal foi igual a DL_{50} por injeção intraperitoneal. Os autores afirmaram que isto foi resultado de necrose extensiva do epitélio da mucosa tanto da via respiratória quanto olfatória, o que facilitou a absorção da toxina pela extensa rede de capilares presentes na região.

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

Estudos experimentais já verificaram que tanto MCYST-LR pura quanto o extrato de *M. aeruginosa* produtora de microcistinas em doses subletais produziram no pulmão de camundongos uma resposta inflamatória aguda e colapso alveolar. Os danos ocorreram em níveis praticamente iguais. Isto indica que no extrato de *Microcystis* os principais agentes

devem ser as microcistinas. Esta é uma constatação importante, uma vez que em condições reais, seres humanos ou animais se intoxicam com células de cianobactérias ou seus metabólitos como um todo (Picanço *et al.* 2004, Soares *et al.* 2007).

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

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

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

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

Em relação ao câncer, experimentalmente estas toxinas podem apresentar efeitos aparentemente

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

Vários estudos já foram realizados com o objetivo de se verificar a genotoxicidade de microcistinas, com uma série de diferentes abordagens, e alguns destes resultados pareceram contraditórios. No entanto, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, através de um grupo de trabalho reunido em 2006, 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).

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

O primeiro caso de morte humana confirmada por intoxicação por microcistinas ocorreu em Caruaru, Pernambuco, em 1996. Devido à forte seca que atingia a região na época, os reservatórios que abasteciam a cidade estavam com volumes reduzidos e apresentavam intensa floração de cianobactérias. A intermitência no abastecimento de água, devido ao pouco volume nos reservatórios, fez com que as clínicas de diálise da cidade buscassem a água diretamente nos reservatórios através de caminhões pipa. Entretanto, o tratamento dado à água nessas clínicas foi inadequado, o que promoveu lise das células de cianobactérias e liberação da toxina para a água. Os sistemas de colunas de troca iônica e carvão ativado não estavam em condições adequadas de uso e, assim, não puderam reter as toxinas. Consequentemente, dos 136 pacientes em tratamento de hemodiálise, 117 sofreram

distúrbios visuais, náusea, vômito, fraqueza muscular e hepatomegalia. Destes, 100 desenvolveram falência hepática aguda e 76 faleceram. Análises do soro e do fígado dos pacientes que faleceram indicaram a presença de microcistinas e todo o quadro fisiopatológico foi compatível com o observado para intoxicação por estas toxinas. As análises das colunas de troca iônica e do carvão ativado também mostraram presença de MCYSTs, além de outra hepatotoxina, a cilindrospermopsina (Jochimsen *et al.* 1998, Carmichael *et al.* 2001, Azevedo *et al.* 2002). Em 2001, o Rio de Janeiro presenciou outro incidente de contaminação de pacientes renais através de hemodiálise. Felizmente, não houve sintomas ou morte associada à baixa dose de microcistinas a qual estes pacientes foram expostos (Soares *et al.* 2006).

Atualmente, existe uma preocupação mundial quanto aos riscos impostos pela ocorrência de cianobactérias em corpos d'água utilizados para o abastecimento público. Isto se reflete na criação de legislação específica para o aperfeiçoamento do controle da qualidade da água, incluindo o monitoramento de cianotoxinas. O Brasil foi o primeiro país a estabelecer tal medida, através da portaria 518 do Ministério da Saúde, e neste momento a concentração máxima de microcistinas permitida na água para consumo humano no país é $1\mu\text{g.L}^{-1}$.

Concluindo, cabe ressaltar que os estudos toxicológicos experimentais são uma importante ferramenta na avaliação dos riscos dessas toxinas para a população humana. No entanto, a grande maioria dos dados sobre cianotoxinas ainda é obtida em estudos de intoxicação aguda, mas a intoxicação crônica e subletal certamente é mais frequente, também representa sérios riscos à população e deve merecer, assim, uma maior atenção das pesquisas científicas neste campo.

REFERÊNCIAS

- ANDRINOLO, D.; SEDAN, D.; TELESE, L.; AURA, C.; MASERA, S.; GIANUZZI, L.; MARRA, C.A. & ALANIZ, M.J.T. 2008. Hepatic recovery after damage produced by sub-chronic intoxication with the cyanotoxin microcystin-LR. *Toxicon*, 51: 457-467.
- AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W.; JOCHIMSEN, E.M.; RINEHART, K.L.; LAU, S.; SHAW, G.R. & EAGLESHAM,

- G.K. 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru - Brazil. *Toxicology*, 181: 441-446.
- BARFORD, D.; DAS, A.K. & EGLOFF, M-P. 1998. The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 27: 133-164.
- BOARU, D.A.; DRAGOS, N. & SCHIRMER, K. 2006. Microcystin-LR induced cellular effects in mammalian and fish primary hepatocyte cultures and cell lines: A comparative study. *Toxicology*, 218(2-3):134-148.
- BOTHA, N.; VENTER, M.V.; DOWNING, T.G.; SHEPHARD, E.G. & GEHRINGER, M.M. 2004. The effect of intraperitoneally administered microcystin-LR on gastrointestinal tract of Balb/c mice. *Toxicon*, 43: 251-254.
- CARMICHAEL, W.W. 1994. The toxins of cyanobacteria. *Scientific American*, 270:78-86.
- CARMICHAEL, W.W. 1997. The cyanotoxins. *Advances in Botanical Research*, 27: 211-212.
- CARMICHAEL, W.W.; EVANS, W.R.; YIN, Q.Q.; BELL P. & MOCZYDLOWSKI, E. 1997. Evidence for paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) comb. nov. *Applied Environmental Microbiology*, 63:3104-3110.
- CARMICHAEL, W.W.; AZEVEDO, S.M.F.O.; AN, J.; MOLICA, R.J.R.; JOCHIMSEN, E.M.; LAU, S.; RINEHART, K.L.; SHAW, G.R. & EAGLESHAM, G.K. 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*, 109: 663-668.
- CHORUS, I. & BARTRAM, J. 1999. *Toxic cyanobacteria in water – A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E & FN Spon, London. 416p.
- COSTA, S.M. & AZEVEDO, S.M.F.O. 1994. Implantação de um Banco de Culturas de Cianofíceas Tóxicas. *Iheringia - Série Botânica*, 45: 5º artigo.
- DAWSON, R.M. 1998. The toxicology of microcystins. *Toxicon*, 36: 953-962.
- DING, W-X.; SHEN, H-M.; ZHU, H-G. & ONG, C-N. 1998. Studies on oxidative damage induced by cyanobacteria extract in primary cultured rat hepatocytes. *Environmental Research, section A*, 78: 12-18.
- DOMINGOS, P.; RUBIM, K.T.; MOLICA, R.J.R.; AZEVEDO, S.M.F.O. & CARMICHAEL, W.W. 1999. First report of microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from a northeast Brazilian drinking water supply. *Environmental Toxicology*, 14: 31-35.
- FALCONER, I.R.; JACKSON, A.R.B.; LANGLEY, J. & RUNNEGAR, M.T.C. 1981. Liver pathology in mice in poisoning by blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Australian Journal of Biological Sciences*, 34: 179-187.
- FALCONER, I.R.; SMITH, J.V.; JACKSON, A.R.B.; JONES, A. & RUNNEGAR, M.T.C. 1988. Oral toxicity of a bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* administered to mice over periods up to 1 year. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 24: 291-305.
- FALCONER, I.R. 2007. Health effects associated with controlled exposures to cyanobacterial toxins. Pp:645-650 In: Proceedings of the Interagency, International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms (ISOC-HAB): State of the Science and Research Needs. 952p.
- FERRÃO-FILHO, A.S. & AZEVEDO, S.M.F.O. 2003. Effects of unicellular and colonial forms of toxic *Microcystis aeruginosa* from laboratory cultures and natural populations on tropical cladocerans. *Aquatic Ecology*, 37: 23-35.
- FERRÃO-FILHO, A.S.; KOZLOWSKY-SUZUKI, B. & AZEVEDO, S.M.F.O. 2002. Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community. *Aquatic Toxicology*, 59: 201-208.
- FEURSTEIN, D.; FISCHER, A. & DIETRICH, D.R. 2008. Microcystin congener-specific *in vitro* neurotoxicity. *Toxicology Letters*, 180:S103.
- FITZGEORGE, R.B.; CLARK, S.A. & KELVIN, C.W. 1994. Routes of intoxication. Pp 69-74 In: Codd GA, Jeffries TM, Kelvin CW & Potter E (Editors), *Detection Methods for Cyanobacterial (Blue-Green Algae) Toxins*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. 191p.
- FUNASA. 2003. *Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano*. Vigilância Ambiental em Saúde, Relatório Técnico. Ministério da Saúde – Brasil. 51p.
- GEHRINGER, M.M. 2004. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. *FEBS Letters*, 557: 1-8.
- GEHRINGER, M.M.; SHEPHARD, E.G.; DOWNING, T.G.; WIEGAND, C. & NEILAN, B.A. 2004. An investigation into the detoxification of microcystin-LR by glutathione pathway in Balb/c mice. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36: 931-941.

- GUPTA, V.; OGAWA, A.K.; DU, X.; HOUK, K.N. & ARMSTRONG, R.W. 1997. A model for binding of structurally diverse natural product inhibitors of protein phosphatases PP1 and PP2A. *Journal of Medicinal Chemistry*, 40:3199-3206
- GUZMAN, R.E. & SOLTER, P.F. 2002. Characterization of sublethal microcystin-LR exposure in mice. *Veterinary Pathology*, 39: 17-26.
- GUZMAN, R.E.; SOLTER, P.F. & RUNNEGAR, M.T. 2003. Inhibition of nuclear protein phosphatase activity in mouse hepatocytes by the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Toxicon*, 41: 773-781.
- HOBSON, P.; BURCH, M.D.; PILOTTO, L.; RANMUTHUGALA, G.; ATTEWELL, R. & WEIGHTMAN, W. 2004. Skin contact with cyanobacteria (blue-green algae) and development of a recreational guideline. Pp.35. *In: Proceedings of the 6th International Conference on Toxic Cyanobacteria (ICTC)*, Bergen, Norway. 83p.
- HONKANEN, R.E. & GOLDEN, T. 2002. Regulators of serine/threonine protein phosphatases at the dawn of a clinical era? *Current Medicinal Chemistry*, 9: 2055-2075.
- HOOSER, S.B.; BEASLEY, V.R.; BASGALL, E.J.; CARMICHAEL, W.W. & HASCHEK, W.M. 1990. Microcystin-LR-induced ultrastructural changes in rats. *Veterinary Pathology*, 27: 9-15.
- HUMPAGE, A.R.; HARDY, S.J.; MOORE, E.J.; FROSCIO, S.M. & FALCONER, I.R. 2000. Microcystins (cyanobacterial toxins) in drinking water enhance the growth of aberrant crypt foci in the mouse colon. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 61: 155-165.
- HUMM, H.J. & WICKS, S.R. 1980. *Introduction and guide to the marine blue-green algae*. John Wiley & Sons, New York. 194p.
- ITO, E.; KONDO, F.; TERAOKA, K. & HARADA, K.-I. 1997. Hepatic necrosis in aged mice by oral administration of microcystin-LR. *Toxicon*, 35: 231-239.
- ITO, E.; KONDO, F. & HARADA, K.-I. 2001. Intratracheal administration of microcystin-LR and its distribution. *Toxicon*, 39: 265-271.
- JOCHIMSEN, E.M.; CARMICHAEL, W.W.; AN, J.S.; CARDO, D.M.; COOKSON, S.T.; HOLMES, C.E.M.; ANTUNES, M.B.C.; MELO-FILHO, D.A.; LYRA, T.M.; BARRETO, V.S.T.; AZEVEDO, S.M.F.O. & JARVIS, W.R. 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a haemodialysis center in Brazil. *The New England Journal of Medicine*, 33: 873-878.
- LANKOFF, A. & CARMICHAEL, W.W. 2006. Genotoxicity and carcinogenicity of cyanobacterial toxins. Pp. 145-172. *In: Luc Verschaeve (Ed.), Topical Issues in Applied Microbiology and Biotechnology*. Research Signpost, Kerala, India. 172p.
- KONDO, F.; IKAI, Y.; OKA, H.; OKUMURA, M.; ISHIKAWA, N.; HARADA, K.-I.; MATSUURA, K.; MURATA, H. & SUZUKI, M. 1992. Formation, characterization, and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. *Chemical Research in Toxicology*, 5: 591-596.
- KUJBIDA, P.; HATANAKA, E.; CAMPA, A.; CURI, R.; FARSKY, S.H.P. & PINTO, E. 2008. Analysis of chemokines and reactive oxygen species formation by rat and human neutrophils induced by microcystin-LA, -YR and -LR. *Toxicon*, 51: 1274-1280.
- MAGALHÃES, V.F.; MARINHO, M.M.; DOMINGOS, P.; OLIVEIRA, A.C.P.; COSTA, S.M.; AZEVEDO, L.O. & AZEVEDO, S.M.F.O. 2003. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon*, 42: 289-295.
- MEISTER, A. & ANDERSON, M.E. 1983. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52: 711-760.
- MORENO, I.M.; MATE, A.; REPETTO, G.; VAZQUEZ, C.M. & CAMEAN, A.M. 2003. Influence of microcystin-LR on the activity of membrane enzymes in rat intestinal mucosa. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 59: 293-299.
- NOBRE, A.C.L.; COELHO, G.R.; COUTINHO, M.C.M.; SILVA, M.M.M.; ANGELIM, E.V.; MENEZES, D.B.; FONTELES, M.C. & MONTEIRO, H.S.A. 2001. The role of phospholipase A₂ and cyclooxygenase in renal toxicity induced by microcystin-LR. *Toxicon*, 39: 721-724.
- PICANÇO, M.R.; SOARES, R.M.; CAGIDO, V.R.; AZEVEDO, S.M.F.O.; ROCCO, P.R.M. & ZIN, W.A. 2004. Toxicity of a cyanobacterial extract containing microcystins to mouse lungs. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37: 1225-1229.
- PFLUGMACHER, S.; WIEGAND, C.; OBEREMM, A.; BEATTIE, K.A.; KRAUSE, E.; CODD, G.A. & STEINBERG, C.E.W. 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1425: 527-533.
- PFLUGMACHER, S. 2002. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology*, 17: 407-413.

- ROBINSON, N.A.; MIURA, G.A.; MATSON, C.F.; DINTERMAN, R.E. & PACE, J.G. 1989. Characterization of chemically tritiated microcystin-LR and its distribution in mice. *Toxicon*, 27: 1035-1042.
- ROBINSON, N.A.; PACE, J.G.; MATSON, C.F.; MIURA, G.A. & LAWRENCE, W.B. 1991. Tissue distribution, excretion and hepatic biotransformation of microcystin-LR in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 256: 176-182.
- RUNNEGAR, M.T.C.; ANDREWS, J.; GERDES, R.G. & FALCONER, I.R. 1987. Injury to hepatocytes induced by a peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon*, 25: 1235-1239.
- RUNNEGAR, M.T.; BERNDT, N.; KAPLOWITZ, N. 1995. Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 134: 264-272.
- SAHIN, A.; TENCALLA, F.G.; DIETRICH, D. R.; MEZ, K. & NAEGELI, H. 1995. Enzymatic analysis of liver samples from rainbow trout for diagnosis of blue-green algae-induced toxicosis. *American Journal of Veterinary Research*, 56: 1110-1115.
- SANT'ANNA, C.L. & AZEVEDO, M.T.P. 2000. Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia*, 71: 359-385.
- SCHONTHAL, A.H. 2001. Role of serine/threonine protein phosphatase 2A in cancer. *Cancer Letters*, 170: 1-13.
- SLATKIN, D.N.; STONER, R.D.; ADAMS, W.H.; KYCIA, J.H. & SIEGELMAN, H.W. 1983. Atypical pulmonary thrombosis caused by a toxic cyanobacterial peptide. *Science*, 220: 1383-1385.
- SILVA, R.C. 2008. *Acúmulo e depuração de Cilindrospermopsina (cianotoxina) e seu efeito no crescimento em tilápias juvenis (Oreochromis niloticus)*. Dissertação de Mestrado, IBCCF-CCS – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 89p.
- SOARES, R.M.; MAGALHÃES, V.F. & AZEVEDO, S.M.F.O. 2004. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology*, 70: 1-10.
- SOARES, R. M. 2005. Aspectos da biodistribuição e efeitos de microcistinas (hepatotoxinas de cianobactérias) em mamíferos. Tese de Doutorado, IBCCF-CCS – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 117p.
- SOARES, R.M.; YUAN, M.; SERVAITES, J.C.; DELGADO, A.; MAGALHÃES, V.F.; HILBORN, E.D.; CARMICHAEL, W.W. & AZEVEDO, S.M.F.O. 2006. Sub-lethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro - Brazil. *Environmental Toxicology*, 21: 95-103.
- SOARES, R.M.; CAGIDO, V.R.; FERRARO, R.B.; MEYER, J.R.F.; ROCCO, P.R.M.; ZIN, W.A. & AZEVEDO, S.M.F.O. 2007. Effects of microcystin-LR on mouse lungs. *Toxicon*, 50: 330-338.
- TEIXEIRA, M.G.; COSTA, M.C.; CARVALHO, V.L.P.; PEREIRA, M.S. & HAGE, E. 1993. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica dam, Bahia, Brazil. *Bulletin of the Pan American Health Organization*, 27: 244-253.
- TURNER, P.C.; GAMMIE, A.J.; HOLLINRAKE, K. & CODD, G.A. 1990. Pneumonia associated with cyanobacteria. *British Medical Journal*, 300: 1400-1414.
- UENO, Y.; NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; HASEGAWA, A.; WATANABE, M.F.; PARK, H.D.; CHEN, G.C.; CHEN, G. & YU, S.Z. 1996. 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: 1317-21.
- VASCONCELOS, V.M. 1995. Uptake and depuration of the heptapeptide toxin microcystin-LR in *Mitilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 32: 227-237.
- WANG, Q.; XIE, P.; CHEN, J. & LIANG, G. 2008. Distribution of microcystins in various organs (Heart, Liver, Intestine, Gonad, Brain, Kidney and Lung) of Wistar rat via intravenous injection. *Toxicon*, doi: 10.1016/j.toxicon.2008.08.004
- WATANABE, M.F.; HARADA, K.-I.; CARMICHAEL, W.W. & FUJIKI, H. 1996. *Toxic Microcystis*. CRC Press, Inc., New York. 262p.
- WICKSTROM, M.; HASCHEK, W.; HENNINGSEN, G.; MILLER, L.A.; WYMAN, J. & BEASLEY, V. 1996. Sequential ultrastructural and biochemical changes induced by microcystin-LR in isolated perfused rat livers. *Natural Toxins*, 4: 195-205.
- WIEGAND, C.; PEUTHERT, A.; PFLUGMACHER, S. & CARMELI, S. 2002. Effects of Microcin SF608 and microcystin-LR, two cyanobacterial compounds produced by *Microcystis* sp., on aquatic organisms. *Environmental Toxicology*, 17: 400-406.
- YOO, R.S.; CARMICHAEL, W.W.; HOEHN, R.C. & HRUDEY, S.E. 1995. *Cyanobacterial (blue-green algae) toxins: a resource guide*. AWWA Research Foundation and American Water Works Association. 229p.

Submetido em 15/10/2008.

Aceito em 08/01/2009.