CAMILA QUEIROZ MOREIRA

**Toxicidade em camundongos devido à exposição prolongada a uma
floração de cianobactérias contendo microcistinas: avaliações
comportamental, hematológica, bioquímica e anatomopatológica**

São Paulo
2007

CAMILA QUEIROZ MOREIRA

**Toxicidade em camundongos devido à exposição prolongada a uma
floração de cianobactérias contendo microcistinas: avaliações
comportamental, hematológica, bioquímica e anatomopatológica**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Patologia
Experimental e Comparada da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa

São Paulo
2007

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1889
FMVZ

Moreira, Camila Queiroz

Toxicidade em camundongos devido à exposição prolongada a uma floração de cianobactérias contendo microcistinas: avaliações comportamental, hematológica, bioquímica e anatomopatológica / Camila Queiroz Moreira. – São Paulo: C. Q. Moreira, 2007.

155 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa.

1. Floração. 2. Toxicidade em animal. 3. Comportamento animal.
4. Histopatologia em animal. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo comparativo da toxicidade provocada pela exposição prolongada a uma floração de cianobactérias e à microcistina-LR em camundongos", protocolo nº 866/2006, utilizando 50 (cinquenta) camundongos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Comparative study of the toxicity induced by the repeated exposure to a bloom of cyanobacteria and to microcystin-LR in mice", protocol number 866/2006, utilizing 50 (fifty) mice, under the responsibility of Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 14 de março de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MOREIRA, Camila Queiroz

Título: Toxicidade em camundongos devido à exposição prolongada a uma floração de cianobactérias contendo microcistinas: avaliações comportamental, hematológica, bioquímica e anatomopatológica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, com bolsa de mestrado concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), de 08/2005 a 03/2006, e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), de 04/2006 a 07/2007.

*"Não fiz o melhor, mas fiz tudo para que o
melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser,
mas não sou o que era antes."*

Martin Luther King

Agradecimentos

Aos meus pais Maria Amélia e Virgílio, pela paciência, apoio, carinho, amor e compreensão em todos os momentos da realização deste trabalho.

À minha orientadora Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa, pelos conhecimentos transmitidos, pela amizade, confiança, paciência, apoio e exemplo de dedicação ao trabalho.

À Dra. Luciana Retz de Carvalho do Instituto de Botânica de São Paulo, por ter doado a floração utilizada neste trabalho, pela disponibilização de seu laboratório para as etapas de extração, pela realização da análise qualitativa do extrato e pela amizade e ensinamentos transmitidos.

À Profa. Dra. Lílian Rose Marques de Sá do Departamento de Patologia (VPT) da FMVZ-USP, pela amizade, ensinamentos transmitidos e por toda paciência e tempo dispensado no imprescindível auxílio na análise histopatológica.

Ao Prof Dr. Ernani Pinto da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela disponibilização de seu laboratório para etapas importantes do trabalho, pela amizade e ensinamentos transmitidos.

À Dra. Cristina de Oliveira Massoco, pela amizade e paciência no auxílio da avaliação da morte celular por citometria de fluxo.

À Dra. Aline Schwartz, por toda ajuda e ensinamentos transmitidos no início do mestrado, pela simpatia, paciência e grande amizade.

Aos professores Antônio José Piantino Ferreira e Maria Lúcia Zaidan Dagli, pela disponibilização de seus laboratórios para a realização de etapas deste trabalho; aos professores João Palermo Neto e Luiz Carlos de Sá Rocha, por permitirem a utilização do citômetro de fluxo.

Aos demais professores do VPT, especialmente Jorge Camilo Flório, Luciano Freitas Felício, Maria Martha Bernardi, Paulo César Maiorka e Silvana Lima Górnaiak, pelas idéias e pelo auxílio quando necessário.

Aos funcionários do biotério do VPT Claudia, Herculano, Idalina, Luís, Nelson e Rosiris, pelos cuidados dispensados aos animais utilizados nos experimentos, por todo auxílio e ótima convivência.

Aos técnicos do Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do VPT Magali, Priscila e Ricardo, pela paciência, auxílio nos experimentos e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Histologia do VPT Luciano e Cláudio, pela confecção das lâminas estudadas.

Às secretárias do VPT, da pós-graduação da FMVZ e da pós-graduação do VPT Cláudia, Cristina, Cláudia, Deise, Joana e Sílvia, pelo auxílio sempre que preciso.

Aos funcionários da informática Antônio e Miro, aos seguranças, e aos demais funcionários do VPT Cíntia, Livia, Lúcia, Luciana, Marguiti, Romeika, Shirley e Tony, pela ótima convivência.

A todas as funcionárias da biblioteca da FMVZ, pelo auxílio sempre que necessário.

A todos os colegas do VPT que contribuíram com alguma etapa deste trabalho, tanto com ensinamentos para a utilização de diversos aparelhos quanto na ajuda direta nos experimentos: Andréia, Antônio Carlos, Caio Rodrigues, Dario, Denise, Domenica, Elaine, Fabiana, Heidge, Karin, Luciana Cunha, Milena Soares, Mônica, Selma, Tereza e Thiago.

Aos pesquisadores e funcionários da Seção de Ficologia do Instituto de Botânica de São Paulo e especialmente aos alunos Camila, Felipe, Fernando e Mônica, pela amizade e ajuda na obtenção do extrato utilizado nos experimentos.

Aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Análises Toxicológicas da FCF-USP, especialmente Carolina, Daniela, Fabyana, Felipe, Leandro, Prof. Maurício, Paula, Sidnei, Stella, Rafael, Raphael, Vanessa, Vânia e Wagner, pela amizade e ajuda nos experimentos.

A todos os colegas da pós-graduação do VPT: Alex, Alexandre, Aline, Alison, Altamir, Ana Carolina, Ana Paula, Andréa, Andréia, Antônio Carlos, Augusto, Beatriz, Beth, Bruno, Caio Rodrigues, Caio Silvestre, Camila Lima, Camila Simões, Carlos Portela, Daniel Cohn, Daniel Sanches, Daniel Stankevicius, Daniela, Dario, Denise, Domenica, Eduardo, Elaine, Fabiana, Felipe, Gisele, Glaucie, Heidge, Isis, João Paulo,

Julia, Karin, Lucas, Luciana Cunha, Luciana Lippi, Luciana Vismari, Marcos, Milena, Mirela, Mônica, Patrícia, Ricardo Akinaga, Ricardo Garé, Ricardo Lazzarini, Silmara, Soraya, Tereza, Thaís, Thiago, Viviane e Wanderley.

Aos demais familiares e amigos, especialmente tia Maria Helena, Fabrícia, Fernando, Carolina, Clara, Érica, Ernane, Estefânia, Junior, Kathelin, Marcelo e Sandra, pela amizade e apoio sempre que necessário.

E a todos aqueles que, apesar de não terem sido mencionados individualmente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

MOREIRA, C. Q. **Toxicidade em camundongos devido à exposição prolongada a uma floração de cianobactérias contendo microcistinas: avaliações comportamental, hematológica, bioquímica e anatomopatológica.** [Toxicity in mice due to prolonged exposure to a cyanobacterial bloom containing microcystins: behavioral, hematological, biochemical and anatomopathological evaluations]. 2007. 155 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

As cianobactérias (algas azuis) são organismos procariontes, fotossintéticos, encontrados em praticamente todo tipo de habitat líquido e que podem formar grandes massas superficiais de cor verde intensa denominadas florações. O aparecimento de florações na superfície da água ocorre com uma incidência cada vez mais elevada e é considerado um risco potencial à saúde, devido à natureza tóxica de algumas algas. As cianobactérias podem produzir hepatotoxinas, neurotoxinas e dermatotoxinas, que já causaram reações adversas e morte de animais e seres humanos. A maioria das hepatotoxinas são microcistinas (MCs), uma família de toxinas produzidas por espécies de cianobactérias de água doce. A MC-LR foi a primeira a ser identificada e a mais estudada, pois tem sido associada à maioria dos casos de intoxicação envolvendo cianotoxinas. O presente trabalho visou avaliar a toxicidade causada em camundongos pela exposição prolongada ao extrato aquoso de uma floração de cianobactérias contendo microcistinas. Para tanto, camundongos machos *Swiss* receberam o extrato (300 ou 900 mg/kg) por quatro semanas, sendo avaliados: ganho de peso, consumo de ração e água, comportamento no campo aberto (CA) e no labirinto em cruz elevado (LCE), hemograma, bioquímica sanguínea, achados anatomopatológicos e presença de MC no plasma e fígado. Além disso, quantificou-se as MCs presentes no extrato e avaliou-se *in vitro* a morte celular de leucócitos expostos a esse extrato e à MC-LR. A análise química do extrato mostrou que este possui, além das MCs, anabaenopeptinas; dentre as MCs foram encontradas a MC-LR, MC-RR, MC-YR e [D-Asp³] MC-LR. A exposição prolongada ao extrato por 28 dias não alterou o ganho de peso e o peso relativo de órgãos. Na necropsia também não foram observadas alterações macroscópicas, contudo alterações histopatológicas foram encontradas no fígado e no rim. No fígado foram observados focos discretos de necrose lítica hepatocelular associada a infiltrado de neutrófilos e células mononucleares. No rim, o tratamento com o extrato aumentou significativamente a intensidade de nefrose tubular, sendo esta mais acentuada nos animais tratados com a maior dose. O

tratamento prolongado com o extrato em ambas doses causou efeitos comportamentais dose-dependentes no CA: aumento significativo da distância percorrida, do número de entradas, do tempo em movimento e do número de levantamentos no centro do CA, além de um aumento do tempo de permanência no centro, com conseqüente diminuição deste parâmetro na periferia. No entanto, nenhum dos parâmetros avaliados no LCE foi alterado. A exposição prolongada ao extrato causou alterações sutis em parâmetros hematológicos e bioquímicos, caracterizadas por tendência de diminuição de leucócitos e de aumento dos níveis de creatinina sérica nos animais tratados com a maior dose do extrato. O tratamento prolongado com o extrato permitiu a detecção de MC apenas no fígado. Tanto a MC-LR como o extrato promoveram aumento das taxas de apoptose em leucócitos de camundongo *in vitro*. Finalizando, observou-se que a exposição prolongada a uma floração contendo MCs causou baixa toxicidade e efeitos comportamentais dose-dependentes, mostrando que o comportamento animal é bastante útil para avaliar efeitos mais sutis de agentes tóxicos sobre o sistema nervoso central.

Palavras-chave: Floração. Toxicidade em animal. Comportamento animal. Histopatologia em animal.

ABSTRACT

MOREIRA, C. Q. Toxicity in mice due to prolonged exposure to a cyanobacterial bloom containing microcystins: behavioral, hematological, biochemical and anatomopathological evaluations [Toxicidade em camundongos devido à exposição prolongada a uma floração de cianobactérias contendo microcistinas: avaliações comportamental, hematológica, bioquímica e anatomopatológica]. 2007. 155 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Cyanobacteria (blue-green algae) are prokaryotic and photosynthetic organisms found in practically every type of liquid habitat and that can form great superficial masses of intense green color called blooms. The development of algal blooms on water surface occurs with a higher incidence and is recognised as being a potential health hazard due to the toxic nature of some algae. Cyanobacteria can produce hepatotoxins, neurotoxins and dermatotoxins, which already caused adverse effects and death of animals and human beings. Most of the hepatotoxins are microcystins (MCs), a family of toxins produced by species of freshwater cyanobacteria. MC-LR was the first to be identified and is the more studied, therefore, it has been associated to most of the cases of intoxication involving cyanotoxins. The present study was performed to evaluate the toxicity in mice after prolonged exposure to a cyanobacteria bloom extract containing microcystins. For this, male Swiss mice were treated with the extract (300 or 900 mg/kg) for four weeks and was evaluated: weight gain, food and water consumption, behavior in the open field (OF) and in the elevated plus-maze (EPM), blood count, clinical biochemistry, anatomopathological findings and presence of MC in the plasma and liver. Besides, the MCs present in the extract were quantified and the cellular death of leukocytes exposed in vitro to MC and to the extract was evaluated. The chemical analysis of the extract showed that it presented, besides MCs, anabaenopeptins; the MCs found were MC-LR, MC-RR, MC-YR and [D-Asp3] MC-LR. The prolonged exposure to the extract for 28 days did not alter the weight gain and the relative weight of organs. At necropsy, macroscopic alterations were not observed, however, histopathological alterations were found in the liver and in the kidney. In the liver, discreet necrosis focuses associated with neutrophils and mononuclear cells were found. In the kidney, the treatment with the extract increased significantly the intensity of tubular nephrosis, and this was more accentuated in the animals treated with the largest dose. The prolonged treatment with both doses caused dose-dependent behavioral effects in the OF: significant increase of moved

distance, number of entries, time moving and rearing in the center of the OF, besides an increase of time spent in the center, with consequent decrease of this parameter in the periphery. None of the parameters evaluated in EPM were altered. The prolonged exposure to the extract caused subtle alterations in hematological and biochemical parameters, characterized by tendency for leukocyte decrease and increase of the levels of serum creatinine in the animals treated with the largest dose of the extract. The prolonged treatment with the extract allowed the detection of MC just in the liver. As much MC-LR as the extract promoted increase of the apoptosis levels in mouse leukocytes in vitro. Concluding, it was observed that the prolonged exposure to the cyanobacteria bloom containing MCs caused low toxicity and dose-dependent behavioral effects, showing that animal behavior is useful to evaluate subtler effects of toxic agents on the central nervous system.

Key words: Bloom. Toxicity. Behavior. Histopathology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química geral e exemplos de microcistinas. Para detalhes veja o texto.....	30
Figura 2 -	Esquema do processo de obtenção do extrato de algas para a análise de peptídeos e para os ensaios toxicológicos.....	43
Figura 3 -	Esquema ilustrativo do procedimento de preparação do extrato por extração em fase sólida para quantificação de microcistina-LR por HPLC/DAD.....	45
Figura 4 -	Esquema ilustrativo do procedimento de preparação do extrato por extração em fase sólida para quantificação de microcistinas por HPLC/MS.....	47
Figura 5 -	Ilustração do local, dos equipamentos, do campo aberto e labirinto em cruz elevado utilizados.....	50
Figura 6 -	Ilustração esquemática da arena do campo aberto (vista de cima) subdividida em centro e periferia.....	51
Figura 7 -	Ilustração esquemática da arena do labirinto em cruz elevado (vista de cima), subdividida em zona central, braços abertos e fechados.....	52
Figura 8 -	Esquema ilustrativo dos tubos contendo leucócitos nos quais avaliou-se a morte celular (apoptose/necrose) por citometria de fluxo.....	58
Figura 9 -	Esquema ilustrativo de análise da morte celular (apoptose/necrose) de leucócitos por citometria de fluxo utilizando-se o <i>software Cell Quest Pro®</i> . A: Gráfico de SSC por FSC (<i>dot plot</i>) com <i>gate</i> selecionando as populações celulares analisadas; B: Histograma da intensidade de fluorescência verde (AnexV) da população de leucócitos selecionada (neste caso, controle negativo de apoptose).....	61
Figura 10 -	Esquema ilustrativo da extração das amostras de fígado.....	63
Figura 11 -	Esquema ilustrativo da extração das amostras de plasma.....	64
Figura 12 -	Ilustração das cianobactérias presentes na floração utilizada neste trabalho.....	70
Figura 13 -	Compostos majoritários presentes no extrato aquoso da floração de cianobactérias, obtido por MALDI - TOF /MS.....	71
Figura 14 -	Cromatograma obtido por HPLC/MS mostrando as MC-RR, MC-LR, MC-YR e [D-Asp ³] MC-LR no extrato.....	73
Figura 15 -	Espectros de massas obtidos por HPLC/MS/ESI característicos das MC-RR e MC-LR.....	74

Figura 16 - Espectros de massas obtidos por HPLC/MS/ESI característicos das MC-YR e [D-Asp ³] MC-LR.....	75
Figura 17 - Comportamento no campo aberto de camundongos expostos agudamente ao extrato aquoso da floração de cianobactérias ($p>0,05$, Teste t de Student).....	79
Figura 18 - Comportamento no campo aberto de camundongos expostos agudamente ao extrato aquoso da floração de cianobactérias ($p>0,05$, Teste t de Student).....	80
Figura 19 - Comportamento no labirinto em cruz elevado de camundongos expostos agudamente ao extrato aquoso da floração de cianobactérias ($p>0,05$, Teste t de Student).....	83
Figura 20 - Comportamento no labirinto em cruz elevado de camundongos expostos agudamente ao extrato aquoso da floração de cianobactérias ($p>0,05$, Teste t de Student).....	84
Figura 21 - Porcentagem de entradas e de tempo no labirinto em cruz elevado de camundongos expostos agudamente ao extrato aquoso da floração de cianobactérias ($p>0,05$, teste de Mann-Whitney).....	85
Figura 22 - Ganho de peso, consumo de ração e consumo de água, a cada 3 dias, de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias (* $p<0,05$, ANOVA seguida do teste de Tukey).....	88
Figura 23 - Ganho de peso, consumo de ração e consumo de água totais de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias ($p>0,05$, ANOVA).....	89
Figura 24 - Comportamento no campo aberto de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias. Médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes (* $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$, ANOVA seguida de Tukey).....	92
Figura 25 - Comportamento no campo aberto em camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias. Médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes (* $p<0,05$, ANOVA seguida do teste de Tukey).....	93
Figura 26 - Comportamento no labirinto de cruz elevado de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias ($p>0,05$, ANOVA)...	96
Figura 27 - Comportamento no labirinto em cruz elevado de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias ($p>0,05$, ANOVA).....	97

Figura 28 - Porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias ($p>0,05$, Kruskal-Wallis).....	98
Figura 29 - Peso relativo de órgãos (g) de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias ($p>0,05$, ANOVA).....	100
Figura 30 - Análise microscópica semiquantitativa do fígado, rim e timo dos camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias. Médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, Kruskal-Wallis).....	103
Figura 31 - Fotomicrografias do fígado de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias, visando avaliar os parâmetros intensidade de necrose hepatocelular e intensidade de infiltrado inflamatório neutrofílico.....	104
Figura 32 - Fotomicrografias do rim de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias, visando a avaliação da intensidade de nefrose tubular.....	105
Figura 33 - Fotomicrografias do timo de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias, visando a avaliação da intensidade de infiltrado de neutrófilos.....	106
Figura 34 - Parâmetros hematológicos de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias (# $p= 0,08$, ANOVA).....	108
Figura 35 - Parâmetros bioquímicos de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias ($p>0,05$, ANOVA ou Kruskal-Wallis)..	111
Figura 36 - Parâmetros bioquímicos de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias. Médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes (# $p<0,07$, * $p<0,05$, ANOVA ou Kruskal-Wallis).....	112
Figura 37 - Morte celular (apoptose/necrose) de leucócitos após tratamento <i>in vitro</i> por 12 h com diferentes concentrações de microcistina e do extrato aquoso da floração de cianobactérias (# $p<0,05$, * $p<0,01$, ** $p<0,001$ em relação ao controle negativo, Kruskal-Wallis).....	116
Figura 38 - Cromatogramas de amostras de fígado para a presença de microcistina.....	118
Figura 39 - Cromatogramas de amostras de plasma para a presença de microcistina.....	119

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Descrição dos achados histológicos de fígado e timo com os respectivos escores.....	55
------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Áreas dos picos obtidas por HPLC/MS dos padrões de microcistinas e do extrato, bem como as respectivas concentrações destas presentes no extrato.....	76
Tabela 2 -	Comportamento no campo aberto de camundongos expostos agudamente ao extrato aquoso da floração de cianobactérias.....	78
Tabela 3 -	Comportamento no labirinto em cruz elevado de camundongos expostos agudamente ao extrato aquoso da floração de cianobactérias.....	82
Tabela 4 -	Porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado de camundongos expostos agudamente ao extrato aquoso da floração de cianobactérias.....	85
Tabela 5 -	Ganho de peso, consumo de ração e consumo de água, a cada 3 dias, de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias.....	87
Tabela 6 -	Ganho de peso, consumo de ração e consumo de água totais de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias.....	89
Tabela 7 -	Comportamento no campo aberto de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias.....	91
Tabela 8 -	Comportamento no labirinto em cruz elevado de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias.....	95
Tabela 9 -	Porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias.....	98
Tabela 10 -	Peso relativo de órgãos (g) de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias.....	99
Tabela 11 -	Análise microscópica semiquantitativa do fígado, rim e timo de camundongos tratados com extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias.....	103
Tabela 12 -	Parâmetros hematológicos de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias.....	107

Tabela 13 -	Parâmetros bioquímicos séricos de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias.....	110
Tabela 14 -	Avaliação da morte celular (apoptose/necrose) de leucócitos após tratamento <i>in vitro</i> por 12 h com diferentes concentrações de microcistina-LR (MC-LR) e do extrato aquoso da floração de cianobactérias.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADDA	ácido (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico
ALP	fosfatase alcalina
ALT	alanina aminotransferase
AnexV	Anexina-V
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	aspartato aminotransferase
BA	braços abertos
BF	braços fechados
CA	campo aberto
CHCM	concentração da hemoglobina corpuscular média
CK-MB	creatina cinase fração - MB
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
Cys	cisteína
DAD	detector de arranjo de diodos
D-Ala	alanina
D-Glu	ácido glutâmico
DL50	dose letal 50%
D-MeAsp	ácido D-eritro- β -metil-aspartico
ESI	ionização por <i>electrospray</i>
FCF-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

FITC	isotiocianato de fluoresceína
FMVZ-USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
FSC	Forward Scatter
GABA	ácido γ -aminobutírico
GGT	γ -glutamilttransferase
HE	hematoxilina e eosina
HCM	hemoglobina corpuscular média
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
LCE	labirinto em cruz elevado
LDH	lactato desidrogenase
LPS	lipopolissacarídeo (s)
m/z	relação massa carga
MC(s)	microcistina(s)
Mdha	N-metil-deidroalanina
MeOH	metanol
MS	espectrometria de massas
PI	iodeto de propídeo
SFB	soro fetal bovino
SPE	extração em fase sólida
SSC	Side Scatter
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
VCM	volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	27
2 OBJETIVOS.....	39
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1 Animais.....	42
3.2 Floração.....	42
3.3 Procedimentos.....	44
3.3.1 <i>Quantificação de microcistinas no extrato.....</i>	44
3.3.1.1 <i>Quantificação da microcistina-LR por HPLC/DAD.....</i>	44
3.3.1.2 <i>Quantificação de microcistinas por HPLC/MS.....</i>	46
3.3.2 <i>Ensaio de toxicidade aguda.....</i>	47
3.3.3 <i>Avaliação do ganho de peso e do consumo de água e ração.....</i>	48
3.3.4 <i>Avaliações comportamentais.....</i>	48
3.3.4.1 <i>Avaliação do comportamento no campo aberto.....</i>	49
3.3.4.2 <i>Avaliação do comportamento no labirinto em cruz elevado (LCE).....</i>	51
3.3.5 <i>Coleta de amostra de sangue, hemograma e bioquímica sanguínea.....</i>	53
3.3.6 <i>Coleta de tecidos para dosagem de microcistina e estudo anatomopatológico qualitativo e semiquantitativo.....</i>	54
3.3.7 <i>Avaliação <u>in vitro</u> da morte celular/apoptose de leucócitos por citometria de fluxo.....</i>	56
3.3.7.1 <i>Coleta de células, quantificação e teste de viabilidade de leucócitos.....</i>	57
3.3.7.2 <i>Incubação dos leucócitos com as diferentes concentrações de MC-LR e do extrato.....</i>	58

3.3.7.3 Marcação com AnexV FITC e PI.....	59
3.3.7.4 Leitura no citômetro de fluxo.....	60
3.3.8 Detecção de microcistina em fígado e plasma por HPLC/MS.....	61
3.3.8.1 Detecção de microcistinas em fígado.....	61
3.3.8.2 Detecção de microcistinas em plasma.....	64
3.4 Delineamento experimental.....	65
3.4.1 Experimento 1 - Identificação das cianobactérias e dos peptídeos presentes na floração.....	65
3.4.2 Experimento 2 - Quantificação das microcistinas no extrato.....	65
3.4.3 Experimento 3 - Avaliação da toxicidade aguda do extrato administrado pelas vias oral e intra-peritoneal em camundongos.....	65
3.4.4 Experimento 4 - Efeitos da exposição aguda ao extrato no comportamento de camundongos no campo aberto e no labirinto em cruz elevado.....	66
3.4.5 Experimento 5 - Efeitos em camundongos da exposição prolongada ao extrato....	66
3.4.6 Experimento 6 - Avaliação <i>in vitro</i> da morte celular/apoptose de leucócitos por citometria de fluxo.....	67
3.4.7 Experimento 7 - Detecção de microcistina em fígado e plasma por HPLC/MS.....	67
3.5 Análise estatística.....	68
4 RESULTADOS.....	70
4.1 Experimento 1 - Identificação das cianobactérias e dos peptídeos presentes na floração.....	70
4.2 Experimento 2 - Quantificação de microcistinas no extrato.....	72
4.2.1 Quantificação da microcistina-LR por HPLC/DAD.....	72
4.2.2 Quantificação de microcistinas por HPLC/MS.....	72

4.3 Experimento 3 - Avaliação da toxicidade aguda do extrato administrado pelas vias oral e intra-peritoneal em camundongos.....	77
4.4 Experimento 4 - Efeitos da exposição aguda ao extrato no comportamento de camundongos no campo aberto e no labirinto em cruz elevado.....	77
4.4.1 <i>Comportamento no campo aberto.....</i>	77
4.4.2 <i>Comportamento no labirinto em cruz elevado.....</i>	81
4.5 Experimento 5 - Efeitos em camundongos da exposição prolongada ao extrato.....	86
4.5.1 <i>Ganho de peso, consumo de ração e consumo de água.....</i>	86
4.5.2 <i>Comportamento no campo aberto.....</i>	90
4.5.3 <i>Comportamento no labirinto em cruz elevado.....</i>	94
4.5.4 <i>Estudo anatomopatológico qualitativo e semiquantitativo.....</i>	99
4.5.4.1 <i>Exame macroscópico.....</i>	99
4.5.4.2 <i>Exame microscópico.....</i>	101
4.5.5 <i>Parâmetros hematológicos.....</i>	107
4.5.6 <i>Parâmetros bioquímicos.....</i>	109
4.6 Experimento 6 - Avaliação <i>in vitro</i> da morte celular/apoptose de leucócitos por citometria de fluxo.....	113
4.7 Experimento 7 - Detecção de microcistinas em fígado e plasma.....	117
4.7.1 <i>Detecção de microcistinas em fígado.....</i>	117
4.7.2 <i>Detecção de microcistinas em plasma.....</i>	119
5 DISCUSSÃO.....	120
6 CONCLUSÕES.....	136
REFERÊNCIAS.....	138

Introdução

1 INTRODUÇÃO

As cianobactérias (algas azuis) são organismos procariontes, fotossintéticos, encontrados em praticamente todo tipo de habitat líquido. Ocorrem em águas com as mais diversas composições orgânicas e graus de salinidade (desde águas doces a hipersalinas). As algas azuis são um componente normal do fitoplâncton e têm necessidades metabólicas muito simples. Como possuem clorofila-a e pigmentos fotossintetizantes acessórios, essas algas se desenvolvem muito rapidamente em condições de alta luminosidade, temperaturas elevadas da água (15-30°C), pH entre 6 e 9 e abundância de nutrientes, formando grandes massas superficiais de cor verde intensa denominadas florações.

O desenvolvimento de florações é estimulado pelo aumento de nutrientes na água (eutrofização), como sais de nitrato e fosfato. Esses nutrientes podem derivar dos esgotos, detergentes, da poluição industrial, dos fertilizantes da agricultura e da deposição dos restos de animais (BELL; CODD, 1994). Como na sociedade atual não há sinais de declínio dessas atividades (com exceção da poluição industrial), o problema das florações nos rios e reservatórios de água do mundo todo tende a continuar (DAWSON, 1998).

O aparecimento de florações na superfície da água ocorre em todo o mundo com uma incidência cada vez mais elevada (FALCONER et al., 1994; DUY et al., 2000) e é considerado um risco potencial à saúde, devido à natureza tóxica de algumas algas. Deve-se ter cuidado especialmente quando o crescimento das florações ocorre em reservatórios de água potável ou em rios e lagos usados para a recreação e para o consumo de animais. A ocorrência de um gênero ou espécie particular de cianobactéria ao redor do mundo é aparentemente influenciada por diferenças regionais na constituição química da água e nas condições climáticas. Em geral, 50-

75% de isolados de florações podem produzir toxinas, freqüentemente apresentando mais de um tipo de toxina. Florações tóxicas e não-tóxicas de uma mesma espécie podem ser encontradas juntas (SKULBERG et al., 1993; YOO et al. 1995; CODD; BELL, 1996).

A toxicidade geral de uma floração é incerta, porque podem ocorrer variações na concentração da toxina dentro de um período curto de tempo e mesmo espacialmente, dentro de um corpo d'água (HRUDEY; LAMBERT; KENEFICK, 1994). Considerando que os fatores que estimulam a produção e liberação de toxinas por essas algas ainda não estão totalmente claros (FAWELL et al., 1999) e que não existe nenhum método simples para distinguir as formas tóxicas das não-tóxicas (RESSOM; SOONG; FITZGERALD, 1994), todas as florações devem ser consideradas potencialmente perigosas e suspeitas, e sua prevenção é a chave para o controle das florações tóxicas.

Os dois principais fatores que afetam a produção de toxinas são a luminosidade e temperatura. A temperatura ideal para a produção de toxinas por cianobactérias é entre 20 e 25°C (GORHAM, 1964; VAN DER WESTHUIZEN; ELOFF, 1985; WATANABE; OISHI, 1985), o que sugere que as cianobactérias são mais tóxicas nos períodos com temperaturas moderadas e em áreas com clima ameno.

As florações de cianobactérias estão associadas à toxicidade há vários séculos, mas somente recentemente as toxinas responsáveis foram identificadas. Cerca de 40 gêneros de cianobactérias podem produzir cianotoxinas, mas os principais são: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Oscillatoria* (*Planktothrix*) e *Nostoc* (APELDOORN et al., 2007). As cianobactérias podem produzir hepatotoxinas (microcistina, nodularina e cilindrospermopsina), neurotoxinas (anatoxinas e saxitoxinas) e dermatotoxinas (lipopolissacarídeos - LPS), que já causaram reações adversas e morte de animais e seres humanos (DUY et al., 2000). A maioria das hepatotoxinas são microcistinas (MCs), uma família

de toxinas produzidas por espécies de cianobactérias de água doce, principalmente por *Microcystis aeruginosa* (CARMICHAEL, 1992; WATANABE et al., 1996), mas também por outras espécies deste gênero e outros gêneros como *Anabaena*, *Oscillatoria* (*Planktothrix*), *Anabaenopsis* e *Nostoc* (DAWSON, 1998).

Bittencourt-Oliveira (2003) realizou um estudo com amostras de 15 reservatórios de água de diferentes regiões do Brasil e detectou florações com cepas tóxicas produtoras de MCs em 8 destes. Entre estes reservatórios que apresentavam MCs estavam: o reservatório da Cantareira, que abastece nove milhões de habitantes da região metropolitana de São Paulo (SP); o reservatório de Duas Unas, que abastece 2,6 milhões de habitantes da região metropolitana de Recife (PE); e o reservatório de Irai, que abastece cerca de 2 milhões de habitantes da região metropolitana de Curitiba (PR). Além destes estavam os reservatórios Três Marias (MG), Barra Bonita (SP) e Salto Grande (SP), que além de serem utilizados para a geração de energia, são também usados para a recreação e para a pesca comercial.

As MCs são heptapeptídeos monocíclicos compostos por uma D-alanina (D-Ala) na posição 1, dois L aminoácidos variáveis nas posições 2 e 4, o ácido glutâmico (D-Glu) na posição 6, e três aminoácidos incomuns: um ácido D-eritro- β -metil-aspartico (D-MeAsp) na posição 3, um ácido (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico (ADDA) na posição 5, e uma N-metil-deidroalanina (Mdha) na posição 7 (DAWSON, 1998).

Cerca de 70 tipos de MCs já foram identificados e documentados. As diferenças encontram-se principalmente nos L-aminoácidos das posições 2 e 4, mas algumas variações menos comuns incluem modificações no ADDA e a desmetilação dos aminoácidos Mdha e D-MeAsp (LAWTON; EDWARDS, 2001). A nomenclatura das MCs é baseada nos aminoácidos variáveis e na ausência de grupos metil (CH₃) nos aminoácidos Mdha e D-MeAsp, como ilustra a

figura 1. A MC mais comum é a LR, cujos aminoácidos variáveis são a leucina (L) e a arginina (R) (FRANGEZ et al., 2003); além desta, as MC-RR e MC-YR estão entre as mais comuns e amplamente distribuídas (GUPTA et al., 2003).

Figura 1 - Estrutura química geral e exemplos de microcistinas. Para detalhes veja o texto.

MCs diferentes têm polaridades diferentes, o que pode afetar sua toxicidade. A toxicidade é maior nos tipos mais hidrofóbicos, como nas MCs contendo os aminoácidos leucina e arginina (MC-LR) ou tirosina e metionina (MC-YM), sendo que a MC que apresenta duas argininas (MC-

RR) está entre as menos tóxicas (FALCONER, 2005). A MC-LR, que possui peso molecular de 994 daltons, foi a primeira a ser identificada quimicamente e é a mais estudada, pois esta tem sido associada à maioria dos casos de intoxicação envolvendo cianotoxinas em vários países (FAWELL et al., 1993).

As MCs já foram implicadas na morte de animais selvagens e domésticos que consumiram água contendo florações densas de algas azuis (DUY et al., 2000). O primeiro registro de intoxicação de animais por água contendo cianobactérias ocorreu no lago Alexandrina no Sul da Austrália em 1878. Desde então, têm aparecido cada vez mais relatos de intoxicações de pássaros, peixes e outros animais por cianotoxinas, principalmente por MCs (DAWSON, 1998).

A principal via de exposição às MCs é a oral. Estima-se que 80% da exposição à MC ocorra pela água de bebida (KUIPER-GOODMAN et al., 1994). A MC é bastante estável em água e resistente a extremos de pH e temperaturas até 300 °C (WANNEMACHER, 1989). Há relatos também de pessoas expostas às cianotoxinas através do consumo de certos alimentos que contêm algas. A bioacumulação de cianotoxinas por animais aquáticos, incluindo peixes, moluscos e zooplâncton já foi demonstrada (AMORIN; VASCONCELOS, 1999), indicando que o consumo de tecidos animais contendo cianotoxinas é possível e pode levar à toxicidade humana. Além disso, o consumo de plantas comestíveis (alface, arroz) expostas às microcistinas via irrigação pode representar um risco à saúde (CODD; METCALF; BEATTIE, 1999; CHEN et al., 2004). Após a ingestão de MC-LR, o estômago absorve alguma quantidade dessa toxina, mas a maior parte é absorvida pelo íleo (ITO; KONDO; HARADA, 2000), através do sistema orgânico multiespecífico de transporte de íons (RUNNEGAR; GERDES; FALCONER, 1991).

O primeiro caso documentado de morte de seres humanos por hepatotoxinas produzidas por cianobactérias ocorreu após exposição intravenosa em uma clínica de hemodiálise em

Caruaru, no estado de Pernambuco, em 1996. Neste episódio, conhecido como “Síndrome de Caruaru”, dos 131 pacientes da clínica de hemodiálise, 116 (89%) apresentaram sintomas de intoxicação pouco tempo após a exposição, sendo estes sintomas predominantemente neurológicos: tontura, vertigem, surdez, distúrbios visuais (dor nos olhos, visão turva, cegueira) e convulsões, além de náusea e vômitos. Destes, 100 pacientes desenvolveram falência hepática aguda devido à presença de MC no reservatório (aproximadamente 19 µg/L) que forneceu a água para a hemodiálise (JOCHIMSEN et al., 1998; CARMICHAEL et al., 2001; AZEVEDO et al., 2002) e, em menos de um ano, 52 morreram, demonstrando a toxicidade da MC-LR por via intravenosa. Este incidente ocorreu porque, após um período de seca na região, esta clínica passou a receber água sem tratamento completo distribuída por caminhões-pipa. Esta água foi obtida do Reservatório Tabocas e tratada com altas doses de cloro, o que levou à lise das cianobactérias e à liberação de altas quantidades de microcistinas na água.

A MC-LR é bastante hidrofílica e, conseqüentemente, não atravessa prontamente membranas celulares e não entra na maioria dos tecidos. As MCs utilizam um mecanismo de transporte ativo para penetrar nas células animais: o sistema de transporte multi-específico de ácidos biliares (ERIKSSON et al., 1990). O fígado é o alvo principal das MCs (RUNNEGAR; FALCONER, 1986; MERILUOTO et al., 1990; FALCONER et al., 1994; STOTTS et al., 1997), já que os hepatócitos possuem o transportador de ácidos biliares e podem capturar a MC ativamente (ERIKSSON et al., 1990; RUNNEGAR; GERDES; FALCONER, 1991). Além disso, foi demonstrado recentemente (FISCHER et al., 2005) que a MC-LR atravessa a barreira hematoencefálica de ratos e seres humanos por meio de um polipeptídeo transportador de ânions orgânicos que é encontrado em altas concentrações no cérebro (KULLACK-UBLICK et al., 1995). Portanto, acredita-se que o transporte da MC-LR através da barreira hematoencefálica por

esse transportador possa estar ligado aos sintomas neurológicos encontrados na intoxicação por MC (JOCHIMSEM et al., 1998; POURIA et al., 1998).

Após injeção intravenosa ou intraperitoneal de doses sub-letais de MC em camundongos e ratos, cerca de 70% da toxina é rapidamente localizada no fígado (BROOKS; CODD, 1987; MERILUOTO et al., 1990; LIN; CHU, 1994). O rim e o intestino também acumulam quantidades significativas de MC-LR (MERILUOTO et al., 1990; ROBINSON et al., 1991). Existem alguns estudos sobre a distribuição da microcistina após administração por diferentes vias. Nishiwaki et al. (1994) relatou que, após a administração intraperitoneal de [^3H] di-hidromicrocistina-LR, esta foi encontrada no fígado, intestino delgado, intestino grosso, ceco, rim, estômago e cérebro. Em um outro estudo (BROOKS; CODD, 1987), no qual também administrou-se a microcistina por via intraperitoneal (100 $\mu\text{g/kg}$) em camundongos, esta foi encontrada no fígado, pulmão, rim, coração, baço, íleo e intestino grosso. Ito, Kondo e Harada (2000) administraram microcistina (500 $\mu\text{g/kg}$) por via oral em camundongos e encontraram esta toxina no fígado, pulmão e coração. Estes mesmos autores, em 2001, mostraram que uma dose letal (100 $\mu\text{g/kg}$) de microcistina-LR, administrada por via intratraqueal, foi encontrada no fígado, pulmão, intestino delgado, rim e adrenal, enquanto após uma injeção sub-letal (50 $\mu\text{g/kg}$) esta foi encontrada no ceco, intestino grosso e estômago, além dos órgãos anteriormente citados. Após a administração intravenosa de microcistina-LR (35 $\mu\text{g/kg}$), esta foi encontrada no pulmão, fígado, intestino, rim e na carcaça do animal, mas não no coração e baço (ROBINSON et al., 1991).

Quando atingem o espaço intracelular, as MCs interagem com as proteínas-fosfatase 1 e 2A e inibem a ação dessas por um processo que envolve 2 etapas (CRAIG et al., 1996). Após uma ligação inicial rápida e não-covalente da cadeia lateral do aminoácido hidrofóbico ADDA da MC com o grupo carboxil da enzima, as MCs podem formar uma ligação covalente do α,β carbonil insaturado do resíduo de Mdha com o grupamento tiol da cisteína (Cys)-273 da fosfatase

1 ou da Cys-266 da fosfatase 2A (MACKINTOSH et al., 1995; RUNNEGAR et al., 1995; DAWSON, 1998). A exposição à MC-LR, com subsequente inibição da atividade da proteína fosfatase, leva à super-fosforilação dose- e tempo-dependente. A fosforilação e desfosforilação de proteínas são processos rigidamente controlados para manter a homeostase das proteínas do citoesqueleto. As mudanças na forma celular induzidas pelas MCs são provocadas principalmente por mudanças no citoesqueleto, como redistribuição dos filamentos de actina (ERIKSSON et al., 1989; HOOSER et al., 1991; FALCONER; YEUNG, 1992) e microtúbulos (KHAN et al., 1995; WICKSTROM et al., 1995). No fígado, a inibição das fosfatases 1 e 2A leva à hiperfosforilação das proteínas do citoesqueleto, resultando na deformação dos hepatócitos. O fígado aumenta de tamanho devido à massiva hemorragia intra-hepática centrolobular que é precedida pelo arredondamento e dissociação de hepatócitos e pela ruptura do epitélio sinusoidal.

Além de inibir proteínas fosfatase, as MCs também ativam a fosforilase a (RUNNEGAR et al., 1987), o que pode explicar a depleção acentuada do glicogênio hepático após sua administração (MERILUOTO et al., 1989; MIURA et al., 1991). Recentemente, foi encontrado um novo alvo para a MC, a ATP-sintetase (MIKHAILOV et al., 2003). *In vitro* ela também induz apoptose e é citotóxica para várias linhagens de células de mamíferos (MCDERMOTT et al., 1998). No entanto, são necessários tempos maiores de incubação e concentrações mais elevadas da toxina para induzir o mesmo nível de efeito observado em hepatócitos (CHONG et al., 2000). Além disso, já foi demonstrado o potencial promotor de tumor de fígado da MC-LR (MACKINTOSH et al., 1990; ITO et al., 1997).

Os animais têm a habilidade de produzir conjugados de MCs para torná-las mais hidrofílicas e menos tóxicas (METCALF et al., 2000). Considerando o efeito protetor dos indutores de enzimas microsossomais, é evidente que o fígado desempenha um papel importante na detoxificação das microcistinas (CHORUS; BARTRAM, 1999). Três produtos metabólicos já

foram identificados: conjugados da glutathione e cisteína com a porção M_{dh}a das MCs e um conjugado ainda não identificado formado com o resíduo ADDA (KONDO et al., 1992, 1996). Acredita-se que a MC-LR possa ser excretada tanto pelo fígado quanto pelo rim (APELDOORN et al., 2007).

Em animais de laboratório, a toxicidade aguda da MC é significativamente menor por via oral do que pelas outras vias. A dose letal 50% (DL₅₀) da MC por via oral variou de 3 mg/kg (FITZGEORGE; CLARK; KEEVIL, 1994) a 10,9 mg/kg (YOSHIDA et al., 1997). Pelas outras vias de administração, a DL₅₀ da MC foi de: 43 µg/kg por inalação (CREASIA, 1990), 250 µg/kg por via intranasal (FITZGEORGE; CLARK; KEEVIL, 1994), 36-250 µg/kg por via intraperitoneal e intravenosa (FITZGEORGE; CLARK; KEEVIL, 1994; DAWSON, 1998) e variou entre 50 e 100 µg/kg por via intratraqueal (ITO; KONDO; HARADA, 2001). Fawell et al. (1999) demonstraram que o camundongo é mais susceptível à MC-LR que o rato.

A hepatotoxicidade da MC-LR já foi confirmada por vários trabalhos utilizando as vias: oral, intra-peritoneal, intranasal e intratraqueal (FITZGEORGE; CLARK; KEEVIL, 1994; FAWELL et al., 1999; ITO; KONDO; HARADA, 2001; GUPTA et al., 2003). Não existem diferenças entre as vias de administração oral e intraperitoneal quanto aos sintomas e dano hepático em camundongos (YOSHIDA et al., 1997). Em um estudo realizado por Benson et al. (2005), que administraram a MC por inalação, não foi observada hepatotoxicidade. A ausência de hepatotoxicidade pode ser explicada pela baixa dose empregada de MC (2,5 µg/kg), já que outro estudo, realizado por Ueno et al. (1999), com 2,5 µg/kg/dia de MC administrada na água de bebida por 18 meses em camundongos, também não resultou em hepatotoxicidade.

Aumentos na atividade sérica de enzimas consideradas indicativas de dano hepatocelular já foram observados em estudos de exposição crônica e aguda realizados com a MC (HERMANSKI et al., 1991; MIURA et al., 1991; ROBINSON et al., 1991; NISHIWAKI-

MATSUSHIMA et al., 1992; FAWELL et al., 1999; RAO et al., 2005). Já foi demonstrado, por exemplo, um aumento dos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), γ -glutamiltanspeptidase (GGT) e lactado desidrogenase (LDH) após administração de MC-LR (GUPTA et al., 2003). Há relatos também de depleção dos níveis de glutathione, a qual é essencial para a preservação do balanço redox na célula normal e para proteger os hepatócitos contra o estresse oxidativo (RUNNEGAR; GERDES; FALCONER, 1991).

Apesar dos hepatócitos serem as células mais susceptíveis às MCs, já foram encontradas alterações em células do intestino e rim (MERILUOTO et al., 1989; ITO et al., 1997; FISCHER; DIETRICH, 2000; NOBRE et al., 2001) e nas adrenais (FITZGEORGE et al., 1994). O dano, entretanto, não é restrito a esses órgãos, já que há relatos de alterações no baço de pássaros (TAKAHASHI; KAYA, 1993). Benson et al. (2005), por exemplo, encontraram lesões microscópicas na cavidade nasal relacionadas à administração de MC por inalação, provavelmente devido à inibição da fosfatase 2A do epitélio olfatório, assim como ocorre no fígado (DUY et al., 2000; ITO; KONDO; HARADA, 2000).

A Organização Mundial da Saúde, por meio do adendo da segunda edição do “*Guidelines for Drinking-water Quality*” (WHO, 1998) recomendou o valor limite máximo para microcistina-LR total (livre mais intracelular) de 1 $\mu\text{g/L}$, considerando a exposição através da água de consumo humano. Este valor foi baseado em estudo feito em camundongos (FAWELL et al., 1999) e é considerado apenas provisório, já que ainda existem poucos trabalhos na literatura avaliando a toxicidade crônica da MC-LR e de outros cianopeptídeos produzidos por cianobactérias.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da portaria nº 1467 do Ministério da Saúde (publicada em 2 de janeiro de 2001), que estabelece procedimentos

e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e os padrões de potabilidade, foi pioneira ao inserir numa normal legal a obrigatoriedade do monitoramento de cianotoxinas. O valor máximo estabelecido para microcistinas foi de 1 µg/L e, ainda, foi recomendada a inclusão da determinação de cilindrospermopsina e saxitoxinas, observando os valores limites de 15 µg/L e 3 µg/L, respectivamente (BRASIL, 2001b). Além disso, com relação a normas ambientais, o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), por meio da resolução nº 274, de 29 de novembro de 2000, sobre as condições de balneabilidade, estabelece restrições à recreação de contato primário quando verificada a ocorrência de florações de cianobactérias (BRASIL, 2001a).

A liberação de toxinas das células para a água parece ocorrer principalmente durante a senescência, morte e lise celular do que pela excreção contínua, e é aumentada por tratamento químico para a erradicação de cianobactérias, especialmente com o uso de algicidas (sulfato de cobre ou herbicidas orgânicos). Infelizmente, as toxinas produzidas por cianobactérias não são removidas pelos processos convencionais de tratamento de água como floculação, sedimentação, filtração em areia e cloração, e pelos tratamentos que incluem permanganato de potássio ou cloro, que podem liberar as toxinas das cianobactérias (DUY et al., 2000).

A descoberta de novos peptídeos produzidos por cianobactérias está crescendo de forma exponencial (FASTNER; ERHARD; VON DÖHREN, 2001; HARADA, 2004; WELKER, 2004), já que estas são capazes de produzir uma grande variedade de peptídeos bioativos em adição às MCs (HARADA, 2004). Apesar de as MCs, sem dúvida, serem os peptídeos mais estudados, vários outros oligopeptídeos lineares e cíclicos como as aeruginosinas, anabaenopeptilídeos, anabaenopeptinas, cianopeptolíneas, microgininas, microviridinas e nostoficinas têm sido encontrados (NAMIKOSHI; RINEHART, 1996; GKELIS et al., 2005). Entretanto, o número de peptídeos conhecidos até hoje está provavelmente longe de refletir a

diversidade total de compostos produzidos por cianobactérias (WELKER et al., 2004). Sabe-se que estes peptídeos apresentam diversas propriedades bioativas que incluem principalmente a inibição de proteases (NAMIKOSHI; RINEHART, 1996). No entanto, ainda não se sabe ao certo a função destes peptídeos para os próprios organismos produtores; parece que a produção de peptídeos estruturalmente diversos é mais benéfica que a produção de apenas um ou poucos tipos estruturais, já que a seleção natural não levou à dominância de poucos compostos peptídicos (WELKER et al., 2004).

Considerando que há poucos relatos na literatura sobre os efeitos tóxicos produzidos pela exposição prolongada aos cianopeptídeos, no presente projeto foi proposto fazer um estudo da toxicidade provocada pela exposição prolongada a uma floração de cianobactérias. Vale ressaltar também que foram utilizados modelos comportamentais para avaliação da toxicidade no sistema nervoso central, uma vez que, embora a MC atravesse a barreira hematoencefálica, não há relatos consistentes de alterações comportamentais.

Objetivos

2 OBJETIVOS

O presente trabalho visou avaliar a toxicidade provocada pela exposição prolongada a uma floração de cianobactérias em camundongos. Para tanto, os animais receberam a floração (300 ou 900 mg/kg) por quatro semanas, sendo avaliados:

- ganho de peso;
- consumo de ração e água;
- comportamento (atividade motora no campo aberto e desempenho no labirinto em cruz elevado);
- hemograma;
- bioquímica sanguínea;
- achados anatomopatológicos;
- detecção de microcistina no plasma e fígado.

Além disso, quantificou-se as microcistinas presentes na floração e avaliou-se *in vitro* a morte celular (apoptose/necrose) de leucócitos expostos ao extrato aquoso da floração de cianobactérias e à microcistina-LR.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos, com aproximadamente 40 dias de vida, da linhagem *Swiss*, provenientes do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Os animais foram alojados individualmente em gaiolas de polipropileno com tampas de arame zincado medindo 30 x 20 x 13 cm, forradas com maravalha autoclavada. Os animais foram mantidos em salas com temperatura ambiente (20 a 24° C) e ciclo de 12 horas claro-escuro (luz ligada às 6 h) controlados. Água filtrada e ração comercial foram fornecidas *ad libitum*. Os animais passaram por um período de aclimação de sete dias no biotério setorial antes do início do experimento.

3.2 Floração

O material foi coletado de uma floração ocorrida na Lagoa do Violão, RS, em 13 de janeiro de 2005. O estudo taxonômico das cianobactérias presentes nesta floração foi realizado pela Dra. Vera Regina Werner da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. Para identificação dos peptídeos presentes na floração, a massa algácea foi, inicialmente, liofilizada, para determinação do peso seco. A seguir, o material liofilizado foi ressuspense em água, submetido a ultrassom (4 x 20 minutos, 50 W) e centrifugado a 1045 g, por 60 min, para

eliminação dos *debris*. O sobrenadante foi liofilizado e pesado (extrato aquoso da floração de cianobactérias).

Uma porção deste material foi pré-purificada em sílica octadecilsilanizada e submetida à espectrometria de massas, para pesquisa de peptídeos (Figura 2), que foi realizada pela Dra. Luciana Retz de Carvalho do Instituto de Botânica de São Paulo com a colaboração do Dr. Katsuhiro Konno do Instituto Butantan. O restante do material foi utilizado nos ensaios toxicológicos.

Figura 2 - Esquema do processo de obtenção do extrato de algas para a análise de peptídeos e para os ensaios toxicológicos

3.3 Procedimentos

3.3.1 Quantificação de microcistinas no extrato

Esta etapa foi realizada com a colaboração do Prof. Dr. Ernani Pinto do Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). Primeiramente, foi realizada a quantificação da MC-LR por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) acoplada a detector de arranjo de diodos (DAD) e, posteriormente, foi realizada a quantificação de MCs totais no extrato por HPLC acoplada à espectrometria de massas (MS).

3.3.1.1 Quantificação da microcistina-LR por HPLC/DAD

O extrato liofilizado (0,4644 g) foi ressuspenso em 10 mL de metanol acidificado (MeOH : ácido acético 0,1%, v/v), submetido a ultrassom por 25 min (120 W), centrifugado (centrífuga Eppendorf 5804R[®], 10000 rpm, 15 min, 4°C) e o sobrenadante resultante foi coletado. O precipitado obtido foi extraído mais duas vezes de acordo com o procedimento descrito acima. Em seguida, os sobrenadantes foram reunidos e secos à vácuo (SpeedVac[®], Savant) até cerca de 3 mL para a extração em fase sólida (SPE), que foi feita utilizando-se um cartucho de sílica octadecilsilanizada-C18 (Sep-Pak[®], Waters). Após o condicionamento desta coluna com 10mL de MeOH e 10 mL de H₂O , adicionou-se a amostra (cerca de 3 mL) e a

coluna foi lavada com 10 mL de H₂O e 5 mL de MeOH/H₂O (1:1, v/v). A eluição das MCs foi realizada com 10 mL de MeOH 100%. Essa fração (MeOH 100%) foi totalmente seca à vácuo e o precipitado resultante foi ressuspensão em 200 µL de MeOH/H₂O (1:1,v/v), conforme ilustrado pela figura 3.

As análises de MC foram realizadas pelo Sistema de HPLC equipado com bombas LC-10AD, DAD SPD 10AV e controlador de sistema SCL-10Avp (Shimadzu®); coluna analítica C₁₈ tipo Luna, 5 µm, 250 x 4,6 mm (Phenomenex®). A fase móvel foi NH₄CH₃COO 20 mM (pH=5)/ACN (27% em ACN), 30 minutos de corrida isocrática, em fluxo de 1 mL.min⁻¹. A detecção é fixada em 238 nm com o detector DAD. A amostra (100 µl) e o padrão de MC- LR (Sigma-Aldrich® - 100 µL) foram introduzidos no HPLC e as áreas dos picos obtidas foram utilizadas para calcular a concentração de MC-LR no extrato.

Figura 3 - Esquema ilustrativo do procedimento de preparação do extrato por extração em fase sólida para quantificação de microcistina-LR por HPLC/DAD

3.3.1.2 Quantificação de microcistinas por HPLC/MS

O extrato liofilizado (0,1008 g) foi ressuspense em 10 mL de H₂O mili-Q, submetido a ultrassom por 15 min (120 W) e então centrifugado (centrífuga Eppendorf 5804R[®], 7000 rpm, 4°C, 15 min). Em seguida, o sobrenadante resultante foi coletado, filtrado (microfiltro Millipore Millex[®], PVDF 0,45 µm) e transferido para um cartucho de sílica octadecilsilanizada-C18 (Sep-Pak[®], Waters) para a SPE. Após o condicionamento desta coluna com 3 mL de MeOH e 3 mL de H₂O, adicionou-se a amostra (10 mL) e a coluna foi lavada com 3 mL de MeOH a 30%. A eluição de MCs foi realizada com 3 mL de MeOH 100%. Essa fração (MeOH 100%) foi seca à vácuo (SpeedVac[®], Savant) e o precipitado resultante ressuspense em 200 µL de MeOH/H₂O (1:1, v/v), conforme a figura 4.

O sistema de HPLC-MS utilizado é composto por um HPLC (LC-20AD, Shimadzu[®]) e um espectrômetro de massas (Esquire HCT, Bruker Daltonics[®]) dotado de fonte de ionização por *electrospray* (ESI). A separação cromatográfica das MCs foi obtida em coluna tipo Fusion-RP (4 µm, 150 x 2,0 mm, Phenomenex[®]) em fluxo de 0,2 mL/min e utilizando-se o seguinte gradiente: 0-10 min: 30 A 50% B; 10-15 min: 50 A 90% B; 15-17 min: 90% B; 17-18 min: 90 A 30% B; 18-25 min: 30% B, onde A corresponde a H₂O e B a ACN/H₂O 9:1, ambas contendo formiato de amônio 1 mM e ácido fórmico 0,1%.

Para a detecção das MCs presentes no extrato, o espectrômetro de massas foi operado no modo positivo (ESI+) monitorando-se os íons correspondentes a cada toxina, a saber: MC-LR m/z 995 [M+H]⁺, MC-RR m/z 520 [M+2H]²⁺, MC-YR m/z 1045 [M+H]⁺ e [D-Asp³] MC-LR m/z 981 [M+H]⁺. Para a quantificação destas toxinas a amostra (1 µl) e os padrões de MC-LR,

MC-RR e MC-YR (5 μ L, ou seja, 0,25 ng de cada variante) foram injetados no HPLC/MS e as áreas dos picos obtidas foram utilizadas para calcular as concentrações dessas MCs no extrato.

Figura 4 - Esquema ilustrativo do procedimento de preparação do extrato por extração em fase sólida para quantificação de microcistinas por HPLC/MS

3.3.2 Ensaio de toxicidade aguda

Os camundongos receberam, por *gavage* e pela via intra-peritoneal, diferentes doses do extrato até a dose de 5.000 mg/kg (dose máxima estabelecida pela USEPA - *United States Environmental Protection Agency*, 2002, para avaliação da toxicidade aguda) e foram observados por 14 dias, para detecção de possíveis alterações físicas e ocorrência de morte.

3.3.3 Avaliação do ganho de peso e do consumo de água e ração

Os animais foram pesados a cada três dias, durante os 28 dias de tratamento, para a avaliação do ganho de peso. Além disso, foram medidos também a cada três dias o consumo de ração (g) e de água (mL).

3.3.4 Avaliações comportamentais

Para as avaliações comportamentais foi utilizado o EthoVision® (NOLDUS INFORMATION TECHNOLOGY, 1997), que consiste em um sistema de rastreamento em vídeo, análise de movimento e reconhecimento comportamental. O sistema é composto pelo programa EthoVision Pro-Color 1.9 e pelos itens de *hardware*: câmera filmadora, monitor de vídeo, computador com placa de captura de vídeo, monitor, teclado e mouse (Figura 5A). A partir de imagens recebidas pela câmera filmadora e digitalizadas na placa de captura, o programa gera coordenadas espaciais do centro de gravidade do animal, permitindo que o sistema reconheça em qual zona do campo aberto ou do labirinto em cruz elevado que o animal se encontra.

3.3.4.1 Avaliação do comportamento no campo aberto

O campo aberto (CA) é bastante utilizado para avaliar a atividade locomotora, exploração e emocionalidade de roedores (BROADHURST, 1960); consiste em uma arena circular de madeira pintada de preto com 40 cm de diâmetro protegida em todo o perímetro por parede vertical (25 cm de altura) – figura 5B. O chão da arena desenhada no Ethovision foi subdividido virtualmente em 2 regiões concêntricas: centro e periferia (Figura 6).

Cada animal foi colocado individualmente no centro da arena e, por 5 minutos, os seguintes parâmetros foram quantificados em cada região da arena: distância percorrida (cm), número de entradas, tempo de permanência (s), tempo em movimento (s) e número de levantamentos. Além disso, o comportamento de auto-limpeza (movimentos executados com as patas anteriores em direção à boca ou cabeça, podendo haver continuidade destes em direção aos pavilhões auriculares e/ou movimentos de lambar dirigidos, principalmente, às porções laterais do corpo e região genital) foi registrado semi-automaticamente, por meio do acionamento de uma tecla pelo observador. Após a avaliação de cada animal, a arena foi limpa com uma solução de álcool a 5%.

Figura 5 - Ilustração do local, dos equipamentos, do campo aberto e labirinto em cruz elevado utilizados

Figura 6 - Ilustração esquemática da arena do campo aberto (vista de cima) subdividida em centro e periferia

3.3.4.2 Avaliação do comportamento no labirinto em cruz elevado (LCE)

O LCE é um aparelho para avaliação de ansiedade que foi validado farmacologicamente, fisiologicamente e comportamentalmente por Pellow et al. (1985). O LCE consiste em uma plataforma de madeira elevada (55 cm do chão) em forma de cruz e pintada de preto, com dois braços sem proteção lateral (braços abertos, medindo 30 x 5 cm) ortogonais a dois braços com paredes verticais (braços fechados, medindo 30 x 5 x 15) e uma zona central que comunica os quatro braços (medindo 5 x 5 cm) – Figura 5C.

A arena desenhada no Ethovision foi subdividida em três regiões: braços abertos (BA), braços fechados (BF) e zona central (Figura 7). O animal foi colocado na zona central da arena e, por 5 minutos, os seguintes parâmetros foram obtidos: número de entradas e tempo de

permanência (s). A partir desses dados foram calculadas a porcentagem de entradas nos braços abertos [n° de entradas nos BA / (n° de entradas nos BA + BF) x 100] e a porcentagem de tempo nos braços abertos [tempo nos BA / (tempo nos BA + BF) x 100]. Além disso, os comportamentos de avaliação de risco (comportamento de estiramento do corpo, em que o animal estende a cabeça, mantendo o dorso reto e esticado) e mergulho de cabeça (movimento exploratório de cabeça e ombros sobre as bordas do labirinto em cruz elevado) foram registrados semi-automaticamente, por meio do acionamento de uma tecla pelo observador. Após a avaliação de cada animal, a arena foi limpa com uma solução de álcool a 5%.

Figura 7 - Ilustração esquemática da arena do labirinto em cruz elevado (vista de cima), subdividida em zona central, braços abertos e fechados

3.3.5 Coleta de amostra de sangue, hemograma e bioquímica sanguínea

Os animais foram anestesiados (xilazina e cetamina, pela via intra-peritoneal), as cavidades abdominal e torácica foram abertas e amostras de sangue foram coletadas com e sem anticoagulante (EDTA 10%) por punção cardíaca.

O hemograma foi realizado logo após a coleta do sangue com anticoagulante em contador automático de células (CELM CC-550®). Os seguintes parâmetros foram obtidos automaticamente: número de glóbulos brancos (leucócitos), número de glóbulos vermelhos (hemácias) e quantidade de hemoglobina. A partir desses dados foram calculados: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM). Além disso, o hematócrito foi determinado pela centrifugação de um tubo de micro-hematócrito preenchido com $\frac{3}{4}$ de sangue e selado com massa de modelar (microcentrífuga Fanem® 241), com a leitura sendo realizada em cartão específico para este fim. Após a realização do hemograma, o sangue foi centrifugado (centrífuga Sanyo–Harrier 18/80®, 10 minutos, 4000 rpm) e o plasma obtido armazenado a -80°C até o momento da avaliação da presença de MC.

O sangue coletado sem anticoagulante foi mantido em temperatura ambiente até a formação de coágulo (45 min) e então centrifugado (centrífuga Sanyo–Harrier 18/80®, 10 min, 4000 rpm). Em seguida, o soro obtido foi armazenado a -80°C até o momento da análise por meio do Autoanalisador CELM SBA-200® utilizando-se kits comerciais CELM®. Foram determinados os níveis séricos de glicose, triglicérides, albumina, proteínas, creatinina, uréia e das seguintes enzimas: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), creatina cinase - fração MB (CK-MB) e γ -glutamilttransferase (GGT).

3.3.6 Coleta de tecidos para dosagem de microcistina e estudo anatomopatológico qualitativo e semiquantitativo

Os animais foram mortos por hipovolemia com a retirada total do sangue circulante (item 3.3.5). A necropsia completa foi realizada em todos os animais (controle: n=16, tratados: n=14 por grupo) segundo a técnica padrão de exame macroscópico de pequenos mamíferos não ruminantes. Seguida ao exame *in situ* e retirada dos conjuntos, os seguintes órgãos foram pesados: encéfalo, fígado, rim direito, testículo direito, epidídimo direito, baço, timo e pulmões. O peso relativo dos órgãos foi calculado dividindo-se o peso do órgão pelo peso do animal e multiplicando-se por 100. Foi coletado o fígado de metade dos animais de cada grupo e armazenado a -80°C para a avaliação da presença de MC. Foram coletados também coração, bexiga urinária, vesículas seminais, pâncreas, adrenal direita, tireóide, paratireóide, traquéia, esôfago, quadríceps, estômago, intestinos e placas de Peyer para o estudo histopatológico.

Os fragmentos de todos os órgãos coletados para exame histopatológico (n=7 por grupo) foram fixados em formol a 10% e processados no Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia da FMVZ-USP. Os mesmos foram incluídos em parafina e, posteriormente, seccionados em cortes de aproximadamente 5 µm de espessura e corados por hematoxilina e eosina (HE). Os segmentos do trato intestinal (duodeno, jejuno, íleo e intestino grosso) foram representados em cortes transversais e longitudinais. O fígado foi representado em três fragmentos e o cérebro em dois fragmentos transversais.

A avaliação histológica contou com a colaboração da Profa. Dra. Lilian Rose Marques de Sá, do Departamento de Patologia da FMVZ-USP. O exame histológico das lâminas foi

realizado em microscópio de luz com aumentos de 40, 100, 200 e 400x. As alterações teciduais foram avaliadas qualitativamente quanto à presença de distúrbios circulatórios, degenerativos e inflamatórios. A intensidade das alterações observadas no fígado, rim e timo foi avaliada semiquantitativamente na escala de 0 a 3, onde: 0 = parâmetro tido como dentro da normalidade (ausência), 1 = alterações mínimas, 2 = alterações em grau moderado e 3 = grau máximo de alteração (severa). O quadro 1 apresenta a descrição em detalhes para cada escala utilizada nos fragmentos de fígado e timo.

Quadro 1 – Descrição dos achados histológicos de fígado e timo com os respectivos escores

Órgão	Escores	Parâmetro
Fígado		<i>Necrose hepatocelular</i>
	0	ausente
	1	células individuais isoladas
	2	pequenos focos de tamanho correspondente a 3 hepatócitos
	3	grandes focos de tamanho correspondente a mais do que 3 hepatócitos
		<i>Intensidade de infiltrado inflamatório neutrofilico lobular</i>
	0	ausente
	1	1 ou 2 focos pequenos de 1 a 5 neutrófilos sem necrose de hepatócitos em 10 campos de 400x
	2	focos maiores de 6 a 10 neutrófilos com ou sem necrose de hepatócitos em 10 campos de 400x
	3	focos ainda maiores com mais de 10 neutrófilos e com necrose de hepatócitos em 10 campos de 400x
Timo		<i>Intensidade de infiltrado de neutrófilos</i>
	0	ausente
	1	de 1 a 5 neutrófilos em 10 campos de 400x
	2	de 6 a 10 neutrófilos em 10 campos de 400x
	3	mais de 10 neutrófilos em 10 campos de 400x

3.3.7 Avaliação *in vitro* da morte celular/apoptose de leucócitos por citometria de fluxo

Esta etapa contou com a colaboração da Dra. Cristina de Oliveira Massoco. Sucintamente, a fosfatidilserina é um fosfolípido carregado negativamente que está presente predominantemente na porção interna da membrana plasmática (OP DEN KAMP, 1979). Fadock et al. (1992) demonstraram que células em apoptose externalizam a fosfatidilserina; assim, durante as fases iniciais da morte celular por apoptose, a fosfatidilserina é translocada para a camada externa da membrana plasmática, que ainda está intacta. A anexina-V (AnexV) é uma proteína que se liga à fosfatidilserina e pode ser marcada com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), uma molécula que emite fluorescência verde quando excitada por um laser. Por outro lado, durante a morte celular por necrose, a membrana perde sua integridade, permitindo a entrada de iodeto de propídeo (PI), uma substância que intercala na molécula de DNA sendo, portanto, um marcador de células necróticas que, quando excitado por um laser, emite fluorescência vermelha. Deste modo, a mensuração da fluorescência verde (AnexV FITC) e da fluorescência vermelha (PI) utilizando um citômetro de fluxo, é um modelo adequado para detectar células em apoptose e para discriminá-las das células em necrose. Isso porque, durante a fase inicial da apoptose, as células ainda são capazes de excluir o PI e, assim, não mostram qualquer sinal de fluorescência vermelha. Já em células com a membrana danificada, ou seja, em necrose, o PI será o indicador. Para detectar o número de células em apoptose (AnexV+/PI-) ou necrose (AnexV-/PI+), foi utilizada a técnica de citometria de fluxo proposta por Lora et al. (2004).

3.3.7.1 Coleta de células, quantificação e teste de viabilidade de leucócitos

Os animais foram anestesiados (xilazina e cetamina, pela via intra-peritoneal), as cavidades abdominal e torácica foram abertas e amostras de sangue foram coletadas com heparina por punção cardíaca, sendo reunidas em um único *pool*. Para a obtenção dos leucócitos, foi primeiramente realizada a lise de hemácias pela adição de NaCl 0,2 % e, depois de 20 segundos, foi adicionado o mesmo volume de NaCl 1,6%, seguido de centrifugação (centrífuga Sanyo–Harrier 18/80[®], 7 minutos, 1400 rpm). Esse procedimento foi realizado duas vezes para a completa lise das hemácias e, após a segunda centrifugação, as células foram ressuspensas em meio RPMI (GIBCO[®]) com 5% de soro fetal bovino (SFB - GIBCO[®]) para a contagem de células e quantificação da viabilidade celular. Para isto, foram transferidos para um *eppendorf* 10 µl dessa suspensão celular e acrescentados 10 µl de azul de tripan (GIBCO[®]). A quantificação dos leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio de luz (Nikon – binocular), sendo feita a média das células contadas nos quatro quadrantes externos. As células que adquiriram a coloração azul pelo azul de tripan foram consideradas como inviáveis. Somente foram utilizadas suspensões celulares com viabilidade superior a 90%. O número de células foi ajustado para 1×10^6 de leucócitos/mL.

3.3.7.2 Incubação dos leucócitos com as diferentes concentrações de MC-LR e do extrato

Foram colocados 100 μ L da suspensão de leucócitos (1×10^5 células) em cada um dos seguintes tubos: branco, controle negativo, controle apoptose, controle necrose e tubos com diferentes concentrações de MC-LR e com diferentes concentrações do extrato.

Nos tubos branco, controle negativo e controle necrose foi adicionado apenas o meio (RPMI com 5% de SFB) até completar o volume de 1 mL. No tubo controle positivo para apoptose foram adicionados 100 μ L de peróxido de hidrogênio a 3 μ M (H_2O_2) e o meio até completar o volume de 1 mL. No restante dos tubos foram adicionados 100 μ L das diferentes concentrações de MC-LR ou do extrato, sendo completado o volume de 1 mL com o meio (Figura 8).

A seguir, todos os tubos foram incubados em estufa (ShellLab[®]) por 12 h a 37 °C e 5% de CO_2 .

Figura 8 - Esquema ilustrativo dos tubos contendo leucócitos nos quais avaliou-se a morte celular (apoptose/necrose) por citometria de fluxo

3.3.7.3 Marcação com *AnexV FITC* e *PI*

Após a incubação por 12 h, as seguintes etapas foram seguidas:

- a) Todos os tubos foram centrifugados (centrífuga Sanyo[®]–Harrier 18/80) por 7 minutos a 1400 rpm;
- b) O sobrenadante foi desprezado e a cada tubo foi adicionado 1 mL de tampão de ligação (10 mM Hepes/NaOH; 140mM NaCl; 2,5 mM CaCl₂; pH=7,4), sendo estes novamente centrifugados (7 minutos, 1400 rpm);
- c) Em seguida, os leucócitos foram ressuspensos em 100 µl de tampão de ligação contendo *AnexV* previamente conjugada com FITC (1 µg/mL - Laboratório de Imunologia do ICB-USP, São Paulo-SP), na diluição de 1:500; exceto o tubo branco, que recebeu apenas o tampão de ligação e o tubo controle necrose, que recebeu apenas o PI (15 µg/ml; Sigma Chemicals[®], St. Louis, USA) em volume de 40 µl, na concentração de 100 µg/ml de tampão de ligação. Todos os demais tubos (controle negativo, controle positivo, MC-LR e extrato) receberam marcação dupla com *AnexV FITC* e PI;
- d) A seguir, todos os tubos foram mantidos no escuro, à temperatura ambiente, por 15 minutos;
- e) Após este período, adicionou-se em todos os tubos 1 mL de tampão de ligação, sendo então centrifugados por 7 minutos a 1400 rpm;
- f) O sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 200 µl de PBS (solução de NaCl tamponada com fosfato) a cada tubo, sendo feita a leitura em citômetro de fluxo.

3.3.7.4 Leitura no citômetro de fluxo

A detecção da porcentagem de células em apoptose e necrose foi determinada em citômetro de fluxo (Becton Dickinson Immunocytometry System[®], San Jose, CA, USA) acoplado a um computador (Macintosh Apple[®], CA, USA), utilizando-se o *software* Cell Quest Pro[®]. Sucintamente, neste aparelho as populações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades *Forward Scatter* (FSC) e *Side Scatter* (SSC), que avaliam o tamanho e a complexidade interna da célula, respectivamente.

A quantificação da expressão dos marcadores (AnexV FITC e PI) foi estimada pela porcentagem de células que emitiram fluorescência. A fluorescência verde do FITC foi mensurada a 530 ± 30 nm (detector FL1) e a fluorescência vermelha do PI foi mensurada a 585 ± 42 nm (FL2). Inicialmente, o aparelho foi calibrado com o tubo branco como controle de fluorescência basal, e com os tubos controle apoptose e controle necrose. A figura 9 ilustra o esquema de análise da população de leucócitos do sangue periférico delimitada pelo *gate* (Figura 9A), excluindo, assim, outros tipos celulares das amostras (*debris* celulares).

Figura 9 - Esquema ilustrativo de análise da morte celular (apoptose/necrose) de leucócitos por citometria de fluxo utilizando-se o *software Cell Quest Pro®*. **A:** Gráfico de SSC por FSC (*dot plot*) com *gate* selecionando as populações celulares analisadas; **B:** Histograma da intensidade de fluorescência verde (AnexV) da população de leucócitos selecionada (neste caso, controle negativo de apoptose)

3.3.8 Detecção de microcistina em fígado e plasma por HPLC/MS

Esta etapa foi realizada com a colaboração do Prof. Dr. Ernani Pinto do Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas da FCF-USP. O método de análise de MCs em fígado e plasma foi baseado naquele proposto por Carmichael et al. (2001).

3.3.8.1 Detecção de microcistinas em fígado

Amostras de fígado descongeladas (aproximadamente 0,5 g) foram trituradas e homogeneizadas com 5 mL de MeOH 100% por 1 h. Após este período, estas amostras foram

centrifugadas (centrífuga Sanyo-Harrier 18/80[®], 2500 rpm, 10 min) e o sobrenadante resultante coletado. O precipitado obtido foi extraído por mais uma vez de acordo com o procedimento descrito acima. Em seguida, os sobrenadantes reunidos foram transferidos para funis de separação, sendo adicionados 10 mL de hexano e feita agitação. A fração metanólica foi reservada e o hexano foi descartado; este procedimento foi repetido quatro vezes. As cinco frações metanólicas obtidas foram reunidas e secas à vácuo (SpeedVac[®], Savant). Após secagem total, as amostras foram ressuspensas em 3 mL de H₂O para a SPE. Após o condicionamento da coluna de sílica octadecilsilanizada-C18 (Sep-Pak[®], Waters) com 3 mL de MeOH e 3 mL de H₂O, adicionou-se a amostra (3 mL) e a coluna foi lavada com 3 mL de H₂O e 3 mL de MeOH a 20%. A eluição de MCs foi realizada com 3 mL de MeOH 100%. Essa fração (MeOH 100%) foi seca à vácuo e o precipitado resultante foi ressuspenso em 200 µL de MeOH/H₂O (1:1, v/v), conforme ilustra a figura 10.

O sistema de HPLC-MS utilizado foi descrito no item (3.3.1.2). Para a detecção das MCs o espectrômetro de massas foi operado no modo positivo (ESI+) monitorando-se os íons correspondentes a cada toxina, a saber: MC-LR m/z 995 [M+H]⁺, MC-RR m/z 520 [M+2H]²⁺, MC-YR m/z 1045 [M+H]⁺ e [D-Asp³] MC-LR m/z 981 [M+H]⁺.

3.3.8.2 Detecção de microcistinas em plasma

Amostras de plasma descongeladas (150 µL) foram diluídas em ácido acético 0,1M (1 : 3, v/v) para a SPE. Após o condicionamento da coluna Oasis HLB (Waters®) com 1 mL de MeOH/ H₂O (1:1, v/v) , adicionou-se a amostra (0,6 mL) e a coluna foi lavada com 1 mL de MeOH a 30% em ácido acético 0,1 M. A eluição de MCs foi realizada com 1 mL de MeOH 80%. Essa fração (MeOH 80%) foi seca à vácuo e o precipitado resultante foi ressuspensão em 60 µL de MeOH/H₂O (1:1, v/v), conforme ilustra a figura 11. A detecção das MCs no plasma foi realizada por HPLC/MS, como descrito anteriormente (item 3.3.1.2).

Figura 11 - Esquema ilustrativo da extração das amostras de plasma

3.4 Delineamento experimental

3.4.1 Experimento 1 - Identificação das cianobactérias e dos peptídeos presentes na floração

O estudo taxonômico das cianobactérias presentes na floração utilizada neste trabalho foi realizado pela Dra. Vera Regina Werner da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul.

A identificação dos peptídeos presentes na floração foi realizada pela Dra. Luciana Retz de Carvalho do Instituto de Botânica de São Paulo com a colaboração do Dr. Katsuhiko Konno do Instituto Butantan.

3.4.2 Experimento 2 - Quantificação das microcistinas no extrato

Primeiramente, foi realizada a quantificação da MC-LR por HPLC/DAD e, posteriormente, foi realizada a quantificação de MCs no extrato por HPLC/MS.

3.4.3 Experimento 3 - Avaliação da toxicidade aguda do extrato administrado pelas vias oral e intra-peritoneal em camundongos

Preliminarmente, um ou dois camundongos receberam, por *gavage*, as seguintes doses do extrato: 20, 200, 1000, 2000 e 5000 mg/kg. Outros camundongos receberam o extrato pela via intra-peritoneal nas doses de 20, 200, 1000 e 2000 mg/kg. A seguir, todos os animais foram observados em suas gaiolas moradia aos 30, 60, 120, 240 e 360 minutos após a administração e, depois, a cada 24 horas. Ao término do período de observação (14º dia) os animais foram mortos

pela inalação de CO₂ e submetidos à necropsia para observação macroscópica de possíveis alterações.

3.4.4 Experimento 4 - Efeitos da exposição aguda ao extrato no comportamento de camundongos no campo aberto e no labirinto em cruz elevado

Os camundongos foram divididos em dois grupos: um tratado com 1000 mg/kg do extrato aquoso da floração de cianobactérias (n=7) e um grupo controle (n=7), que recebeu apenas água filtrada, por *gavage*. Uma hora após o tratamento, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto seguido pelo labirinto em cruz elevado, conforme descrito no item 3.3.4.

3.4.5 Experimento 5 - Efeitos em camundongos da exposição prolongada ao extrato

Os camundongos foram distribuídos em três grupos: um grupo controle (n=16) que recebeu água filtrada, por *gavage*, e dois grupos experimentais (n=14 por grupo) que receberam, pela mesma via, o extrato, nas doses de 300 e 900 mg/kg, por 28 dias. Estas doses foram estabelecidas com base nos Experimentos 3 e 4. A cada 3 dias, os animais foram pesados e foram avaliados o consumo de água e ração, conforme descrito no item 3.3.3.

No 28º dia, uma hora após o último tratamento, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto seguido pelo labirinto em cruz elevado, conforme descrito no item 3.3.4. Ao término desta avaliação todos os animais foram submetidos à eutanásia e tiveram seus órgãos pesados (item 3.3.6).

Sete animais de cada grupo tiveram o sangue coletado para a realização do hemograma e da detecção de MC no plasma (item 3.3.5) e o fígado congelado também para a detecção de MC

(item 3.3.6). Dos outros animais (controle n=10, 300 e 900 mg/kg extrato n=7 cada) foi coletado sangue (soro) para realização da bioquímica (item 3.3.5) e de sete animais de cada grupo foi realizada a análise histopatológica de todos os tecidos coletados (item 3.3.6).

3.4.6 Experimento 6 - Avaliação *in vitro* da morte celular/apoptose de leucócitos por citometria de fluxo

A escolha das concentrações de MC-LR utilizada neste experimento foi embasada nos achados de Gonçalves et al. (2006) que demonstraram um aumento das taxas de apoptose de leucócitos polimorfonucleares de seres humanos após exposição *in vitro* à MC. Assim, no presente experimento, empregou-se as seguintes concentrações de MC-LR: 1,0; 10; 50 e 100 µg/L.

A fim de se comparar os efeitos da exposição isolada à MC-LR com a exposição ao extrato sobre a morte celular/apoptose de leucócitos, empregou-se diluições do extrato com idênticas concentrações de MC-LR (1,0; 10; 50 e 100 µg/L). A quantificação desta toxina no extrato foi feita por HPLC/DAD, conforme descrito no item 3.3.1.1. O estudo *in vitro* foi feito em sextuplicata e conforme descrito no item 3.3.7.

3.4.7 Experimento 7 - Detecção de microcistina em fígado e plasma por HPLC/MS

Foram analisadas quatro amostras de fígado: na primeira foram adicionados 0,5 µg de MC-LR (fígado positivo para MC-LR); a segunda foi proveniente de um camundongo que recebeu uma dose letal de MC-LR (500 µg/kg); a terceira amostra foi proveniente de um

camundongo que recebeu 300 mg/kg do extrato administrado por 28 dias; e a quarta amostra foi proveniente de um camundongo que recebeu 900 mg/kg do mesmo extrato por 28 dias.

Além disso, foram analisadas três amostras de plasma: na primeira foram adicionados 0,6 µg de MC-LR (plasma positivo para MC-LR); a segunda foi proveniente de um camundongo que recebeu 300 mg/kg do extrato por 28 dias; e a terceira proveniente de um camundongo que recebeu 900 mg/kg do mesmo extrato por 28 dias.

Todas as análises foram realizadas conforme descrito no item 3.3.8.

3.5 Análise estatística

Foi empregado o *software* GraphPad InStat para a realização das análises estatísticas. Os seguintes testes foram utilizados:

- Teste *t* de Student para dados paramétricos, comparando-se a média de dois grupos;
- Teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos, comparando-se dados de dois grupos;
- ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey, para dados paramétricos, comparando-se a média de mais de dois grupos;
- Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn, para dados não paramétricos, comparando-se dados de mais de dois grupos.

O nível de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$) para todas as análises realizadas.

Todos os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (epm), inclusive os referentes aos dados não paramétricos, a fim de se padronizar a apresentação dos resultados.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Experimento 1 - Identificação das cianobactérias e dos peptídeos presentes na floração

O estudo taxonômico da floração (Figura 12) mostrou que 50% desta era constituído pelas cianobactérias *Microcystis protocystis* (cianobactéria potencialmente tóxica) e *Sphaerocavum brasiliense* (uma cianobactéria encontrada somente no Brasil e não tóxica). A outra metade era composta pelas cianobactérias *Microcystis panniformis*, *Anabaena oumiana*, *Anabaenopsis elenkinni* f. *circularis* e *Cylindrospermopsis raciborskii*, todas potencialmente tóxicas.

Figura 12 - Ilustração das cianobactérias presentes na floração utilizada neste trabalho

Além disso, a análise química do extrato aquoso da floração de cianobactérias por espectrometria de massas (MALDI-TOF/MS) mostrou que os compostos majoritários presentes foram: anabaenopeptinas B e F e MC-LR e MC-RR (Figura 13).

Figura 13 - Compostos majoritários presentes no extrato aquoso da floração de cianobactérias, obtido por MALDI - TOF /MS

4.2 Experimento 2 - Quantificação de microcistinas no extrato

4.2.1 Quantificação da microcistina-LR por HPLC/DAD

A análise do extrato por HPLC/DAD mostrou que a quantidade de MC-LR foi de 46,70 µg/g de extrato.

4.2.2 Quantificação de microcistinas por HPLC/MS

A figura 14 ilustra o cromatograma do extrato obtido por HPLC/MS, mostrando as MC-RR, MC-LR, MC-YR e [D-Asp³] MC-LR. Para confirmar a presença dessas toxinas foram feitos MS/MS dos íons com m/z (relação massa/carga) 520 [M+2H]²⁺, 995 [M+H]⁺, 1045 [M+H]⁺ e 981 [M+H], referentes a MC-RR, MC-LR, MC-YR e [D-Asp³] MC-LR, respectivamente. As figuras 15 e 16 mostram os espectros de massas característicos de cada toxina, obtidos por HPLC/MS/ESI.

Figura 14 - Cromatograma obtido por HPLC/MS mostrando as MC-RR, MC-LR, MC-YR e [D-Asp³] MC-LR no extrato

Figura 15 - Espectros de massas obtidos por HPLC/MS/ESI característicos das MC-RR e MC-LR

Figura 16 - Espectros de massas obtidos por HPLC/MS/ESI característicos das MC-YR e [D-Asp³] MC-LR

Foram quantificadas apenas as MC-LR, MC-RR e MC-YR, uma vez que ainda não existe padrão comercial disponível para a [D-Asp³] MC-LR. As áreas dos picos obtidas, que foram utilizadas para calcular as concentrações dessas MCs no extrato, são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 - Áreas dos picos obtidas por HPLC/MS dos padrões de microcistinas e do extrato, bem como as respectivas concentrações destas presentes no extrato

	Áreas obtidas		Concentrações obtidas (µg/g de extrato)
	Padrão	Extrato	
Microcistina - LR	253492	16987824	33,24
Microcistina - RR	126404	39441708	154,78
Microcistina - YR	148438	2454918	8,20

4.3 Experimento 3 - Avaliação da toxicidade aguda do extrato administrado pelas vias oral e intra-peritoneal em camundongos

Nenhum dos camundongos tratados com as diferentes doses do extrato (20, 200, 1000, 2000 e 5000), por ambas vias, apresentou qualquer alteração digna de nota durante os 14 dias de observação. Além disso, não foi observada nenhuma morte durante este período e nenhuma alteração na necropsopia.

4.4 Experimento 4 - Efeitos da exposição aguda ao extrato no comportamento de camundongos no campo aberto e no labirinto em cruz elevado

4.4.1. Comportamento no campo aberto

A tabela 2 e as figuras 17 e 18 mostram a distância percorrida, o número de entradas, o tempo de permanência, o tempo em movimento, o número de levantamentos e o tempo de limpeza no centro e na periferia do CA de camundongos expostos agudamente ao extrato aquoso da floração de cianobactérias. Assim, pode-se observar que não houve diferença entre os grupos em nenhuma das áreas consideradas.

Tabela 2 – Comportamento no campo aberto de camundongos expostos agudamente ao extrato aquoso da floração de cianobactérias

Parâmetro	Área da arena	Controle (n=7)	1000 mg/kg extrato (n=7)
<i>Distância percorrida (cm)</i>	Centro	648,0 ± 73,8	751,6 ± 65,4
	Periferia	2089,9 ± 185,4	1815,4 ± 99,4
	Total	2739,24 ± 228,0	2567,0 ± 120,3
<i>Número de entradas</i>	Centro	36,4 ± 4,1	40,9 ± 2,1
	Periferia	36,7 ± 3,9	41,3 ± 2,0
	Total	1	1
<i>Tempo de permanência (s)</i>	Centro	68,1 ± 6,2	76,3 ± 6,3
	Periferia	231,9 ± 6,3	223,7 ± 6,3
	Total	300	300
<i>Tempo em movimento (s)</i>	Centro	35,6 ± 4,4	42,6 ± 3,3
	Periferia	124,6 ± 10,8	112,4 ± 7,4
	Total	160,2 ± 13,8	155,0 ± 9,0
<i>Número de levantamentos</i>	Centro	15,0 ± 6,6	12,7 ± 3,6
	Periferia	38,6 ± 3,5	41,4 ± 3,5
	Total	53,7 ± 10,0	54,1 ± 5,5
<i>Tempo de limpeza (s)</i>	Centro	0,73 ± 0,58	0,13 ± 0,06
	Periferia	4,95 ± 1,95	2,83 ± 0,92
	Total	5,7 ± 1,8	3,0 ± 1,0

Dados expressos como média ± epm, n = número de animais por grupo ($p > 0,05$, Teste *t* de Student).

Figura 17 - Comportamento no campo aberto de camundongos expostos agudamente ao extrato aquoso da floração de cianobactérias ($p > 0,05$, Teste t de Student)

Figura 18 - Comportamento no campo aberto de camundongos expostos agudamente ao extrato aquoso da floração de cianobactérias ($p > 0,05$, Teste t de Student)

4.4.2 Comportamento no labirinto em cruz elevado

A tabela 3 e as figuras 19 e 20 mostram o número de entradas, o tempo de permanência, o número de avaliações de risco e o número de mergulhos de cabeça nos braços abertos e fechados e na zona central do LCE de camundongos expostos agudamente ao extrato aquoso da floração de cianobactérias. Pode-se observar que não houve diferença entre os grupos em nenhuma das áreas consideradas.

Além disso, a tabela 4 e a figura 21 mostram a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos do LCE de camundongos expostos agudamente ao extrato aquoso da floração de cianobactérias. Pode-se notar que estes parâmetros também não diferiram entre os grupos.

Tabela 3 - Comportamento no labirinto em cruz elevado de camundongos expostos agudamente ao extrato aquoso da floração de cianobactérias

Parâmetro	Área da arena	Controle (n=7)	1000 mg/kg extrato (n=7)
<i>Número de entradas</i>	Braços abertos	23,0 ± 3,8	26,1 ± 3,4
	Braços fechados	34,9 ± 2,4	35,4 ± 2,5
	Centro	55,3 ± 5,1	58,4 ± 4,1
	Total	1	1
<i>Tempo de permanência (s)</i>	Braços abertos	46,2 ± 12,0	53,3 ± 14,6
	Braços fechados	183,0 ± 13,6	165,6 ± 15,0
	Centro	70,6 ± 4,5	80,9 ± 6,8
	Total	300	300
<i>Número de avaliações de risco</i>	Braços abertos	9,9 ± 1,4	10,9 ± 2,6
	Braços fechados	2,9 ± 0,5	2,1 ± 0,7
	Centro	8,1 ± 1,1	8,1 ± 1,1
	Total	21,0 ± 2,2	21,1 ± 2,1
<i>Número de mergulhos de cabeça</i>	Braços abertos	7,7 ± 2,2	8,3 ± 2,3
	Braços fechados	0,3 ± 0,2	0,0 ± 0,0
	Centro	3,1 ± 0,7	4,6 ± 1,4
	Total	11,1 ± 2,4	12,9 ± 2,4

Dados expressos como média ± epm, n = número de animais por grupo (p>0,05, Teste *t* de Student).

Figura 19 - Comportamento no labirinto em cruz elevado de camundongos expostos agudamente ao extrato aquoso da floração de cianobactérias ($p > 0,05$, Teste t de Student)

Figura 20 - Comportamento no labirinto em cruz elevado de camundongos expostos agudamente ao extrato aquoso da floração de cianobactérias ($p > 0,05$; Teste t de Student)

Tabela 4 - Porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado de camundongos expostos agudamente ao extrato aquoso da floração de cianobactérias

Braços abertos	Controle	1000 mg/kg extrato
	(n=7)	(n=7)
% entradas	38,4 ± 3,5	41,8 ± 4,1
% tempo	20,4 ± 5,2	23,5 ± 6,3

Dados expressos como média ± epm, n = número de animais por grupo (p>0,05, teste de Mann-Whitney).

Figura 21 - Porcentagem de entradas e de tempo no labirinto em cruz elevado de camundongos expostos agudamente ao extrato aquoso da floração de cianobactérias (p>0,05, teste de Mann-Whitney)

4.5 Experimento 5 - Efeitos em camundongos da exposição prolongada ao extrato

4.5.1 Ganho de peso, consumo de ração e consumo de água

A tabela 5 e a figura 22 mostram o ganho de peso, o consumo de ração e o consumo de água, a cada 3 dias, dos animais tratados com 300 e 900 mg/kg do extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias. Assim, nota-se que o ganho de peso não foi alterado pelo tratamento em nenhum momento do estudo. Quanto ao consumo de ração, a ANOVA seguida do teste de Tukey mostrou aumento deste nos dias 4-7 [$F(2/43)=3,271$; $p<0,05$] e 7-10 [$F(2/43)=3,377$; $p<0,05$] nos animais tratados com a maior dose do extrato em relação ao controle. Além disso, o consumo de água mostrou-se reduzido nos dias 10-13 [$F(2/43)= 3,637$; $p<0,05$] nos animais tratados com 900 mg/kg do extrato e nos dias 22-25 [$F(2/43)= 3,370$; $p<0,05$] nos animais tratados com 300 mg/kg do extrato quando comparados aos controles.

A tabela 6 e a figura 23 mostram o ganho de peso, consumo de ração e consumo de água totais dos animais durante os 28 dias de tratamento. Assim, pode-se observar que não houve diferenças entre os grupos nos três parâmetros avaliados [ganho de peso- $F(2/43)= 0,2754$; consumo de ração- $F(2/43)=0,4117$; e consumo de água- $F(2/43)=0,0595$].

Tabela 5 - Ganho de peso, consumo de ração e consumo de água, a cada 3 dias, de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias

		Controle (n=16)	300 mg/kg extrato (n=14)	900 mg/kg extrato (n=14)
Ganho de peso (g)				
Dias	1-4	0,76 ± 0,26	0,78 ± 0,23	0,79 ± 0,25
	4-7	0,71 ± 0,25	0,78 ± 0,21	0,55 ± 0,24
	7-10	0,25 ± 0,15	0,45 ± 0,22	0,67 ± 0,21
	10-13	0,68 ± 0,18	0,25 ± 0,17	0,65 ± 0,16
	13-16	0,42 ± 0,15	0,52 ± 0,17	0,31 ± 0,16
	16-19	0,16 ± 0,16	0,46 ± 0,15	0,14 ± 0,14
	19-22	0,73 ± 0,14	0,36 ± 0,17	0,27 ± 0,20
	22-25	0,29 ± 0,16	0,74 ± 0,15	0,73 ± 0,22
	25-28	0,55 ± 0,23	-0,09 ± 0,21	0,66 ± 0,27
Consumo de ração (g)				
Dias	1-4	17,68 ± 0,46	17,09 ± 0,59	17,96 ± 0,76
	4-7	17,99 ± 0,59 ^{ab}	17,12 ± 0,61 ^a	19,79 ± 1,00 ^b
	7-10	17,03 ± 0,55 ^a	17,14 ± 0,57 ^a	19,34 ± 0,95 ^b
	10-13	17,22 ± 0,47	17,05 ± 0,52	17,74 ± 0,70
	13-16	16,90 ± 0,37	17,92 ± 0,75	17,54 ± 0,71
	16-19	16,90 ± 0,38	16,82 ± 0,41	17,15 ± 0,54
	19-22	16,81 ± 0,44	16,89 ± 0,57	16,36 ± 0,51
	22-25	16,56 ± 0,29	16,89 ± 0,47	16,37 ± 0,51
	25-28	16,72 ± 0,43	17,92 ± 0,63	16,46 ± 0,57
Consumo de água (mL)				
Dias	1-4	37,38 ± 1,15	41,79 ± 1,37	37,14 ± 2,00
	4-7	38,50 ± 1,18	40,79 ± 1,14	37,43 ± 1,79
	7-10	45,25 ± 1,80	44,36 ± 1,85	45,29 ± 1,46
	10-13	38,25 ± 1,32 ^b	36,79 ± 1,47 ^{ab}	33,14 ± 1,36 ^a
	13-16	36,50 ± 1,41	36,57 ± 1,60	38,64 ± 1,14
	16-19	42,31 ± 2,26	45,29 ± 2,48	46,50 ± 3,16
	19-22	36,50 ± 0,99	36,79 ± 1,24	35,86 ± 1,26
	22-25	40,44 ± 1,96 ^b	34,79 ± 1,56 ^a	41,36 ± 2,12 ^b
	25-28	37,69 ± 2,84	33,50 ± 2,55	34,14 ± 2,87

Dados expressos como média ± epm, n = número de animais por grupo. Médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes (p<0,05, ANOVA seguida do teste de Tukey).

Figura 22 - Ganho de peso, consumo de ração e consumo de água, a cada 3 dias, de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias (* $p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Tukey)

Tabela 6 - Ganho de peso, consumo de ração e consumo de água totais de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias

	Controle (n=16)	300 mg/kg extrato (n=14)	900 mg/kg extrato (n=14)
Ganho de peso (g)	4,5 ± 0,5	4,3 ± 0,6	4,8 ± 0,3
Consumo de ração (g)	153,8 ± 2,7	154,9 ± 4,0	158,7 ± 5,3
Consumo de água (mL)	352,8 ± 7,9	350,6 ± 6,4	349,5 ± 6,2

Dados expressos como média ± epm, n = número de animais por grupo (p>0,05, ANOVA).

Figura 23 - Ganho de peso, consumo de ração e consumo de água totais de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias (p>0,05, ANOVA)

4.5.2 Comportamento no campo aberto

A tabela 7 e as figuras 24 e 25 mostram a distância percorrida, o nº de entradas, o tempo de permanência, o tempo em movimento, o nº de levantamentos e o tempo de limpeza totais e no centro e na periferia do CA de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias. A análise de variância não foi capaz de revelar diferença significativa entre os grupos quanto à distância total percorrida na arena [$F(2/43)=1,104$]. No entanto, foi observado um aumento significativo da distância percorrida no centro da arena nos animais tratados com a maior dose do extrato em relação aos controles [$F(2/43)=8,726$; $p<0,001$], enquanto na periferia do CA [$F(2/43)=0,237$] este parâmetro não diferiu entre os grupos. Além disso, pode-se notar que houve um aumento do nº de entradas tanto no centro [$F(2/43)=3,914$; $p<0,05$] quanto na periferia [$F(2/43)=3,806$; $p<0,05$] do CA nos animais tratados com a maior dose do extrato em relação aos controles. Quanto ao tempo de permanência, nota-se que houve aumento no centro [$F(2/43)=5,416$; $p<0,01$], com conseqüente diminuição na periferia [$F(2/43)=5,482$; $p<0,01$]. Considerando o tempo total em movimento [$F(2/43)=0,9735$] e na periferia [$F(2/43)=0,2890$] não foi observada alteração entre os grupos; no entanto, este parâmetro apresentou aumento no centro do CA [$F(2/43)=4,793$; $p<0,01$] em animais tratados com 900 mg/kg em relação aos controles. Nota-se também que não houve alteração do nº de levantamentos total [$F(2/43)=1,089$] e na periferia [$F(2/43)=0,5058$]; no entanto, quando considerou-se o centro do CA, houve um aumento significativo nos animais tratados com a maior dose do extrato, quando comparados aos controles [$F(2/43)=5,114$; $p<0,01$]. O tempo de limpeza não foi alterado [centro - $F(2/43)=1,435$; periferia - $F(2/43)=0,1429$].

Tabela 7 - Comportamento no campo aberto de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias

Parâmetro	Área da arena	Controle (n=16)	300 mg/kg extrato (n=14)	900 mg/kg extrato (n=14)
<i>Distância percorrida (cm)</i>	Centro	480,1 ± 30,1 ^a	608,2 ± 42,6 ^{ab}	684,1 ± 33,7 ^{b***}
	Periferia	1750,7 ± 61,5 ^a	1767,1 ± 72,2 ^a	1691,1 ± 106,2 ^a
	Total	2230,8 ± 67,7 ^a	2375,9 ± 81,1 ^a	2393,5 ± 110,5 ^a
<i>Número de entradas</i>	Centro	27,7 ± 1,8 ^a	32,2 ± 2,1 ^{ab}	34,7 ± 1,5 ^{b*}
	Periferia	27,9 ± 1,8 ^a	32,4 ± 2,1 ^{ab}	35,1 ± 1,8 ^{b*}
	Total	1	1	1
<i>Tempo de permanência (s)</i>	Centro	55,8 ± 5,2 ^a	67,2 ± 4,0 ^{ab}	82,3 ± 7,5 ^{b**}
	Periferia	244,2 ± 5,2 ^b	232,8 ± 4,0 ^{ab}	217,6 ± 7,5 ^{a***}
	Total	300	300	300
<i>Tempo em movimento (s)</i>	Centro	27,3 ± 2,0 ^a	36,2 ± 3,4 ^{ab}	37,7 ± 2,3 ^{b*}
	Periferia	101,2 ± 5,6 ^a	107,3 ± 6,6 ^a	100,9 ± 7,7 ^a
	Total	128,5 ± 6,7 ^a	143,4 ± 7,8 ^a	138,6 ± 9,2 ^a
<i>Número de levantamentos</i>	Centro	4,0 ± 0,9 ^a	7,6 ± 1,2 ^{ab}	8,4 ± 1,2 ^{b*}
	Periferia	32,5 ± 2,5 ^a	36,4 ± 4,4 ^a	29,4 ± 4,6 ^a
	Total	36,5 ± 2,4 ^a	45,4 ± 5,3 ^a	42,9 ± 5,5 ^a
<i>Tempo de limpeza (s)</i>	Centro	1,20 ± 0,71	0,05 ± 0,04	0,49 ± 0,35
	Periferia	3,52 ± 2,97	2,91 ± 0,74	3,16 ± 0,94
	Total	4,72 ± 0,74	2,97 ± 0,73	3,65 ± 0,90

Dados expressos como média ± epm, n= número de animais por grupo. Médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001, ANOVA seguida do teste de Tukey).

Figura 24 - Comportamento no campo aberto de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias. Médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001, ANOVA seguida de Tukey)

Figura 25 - Comportamento no campo aberto de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias. Médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes (* $p < 0,05$, ANOVA seguida do teste de Tukey)

4.5.3 Comportamento no labirinto em cruz elevado

A tabela 8 e a figuras 26 e 27 mostram o número de entradas, o tempo de permanência, o número de avaliações de risco e o número de mergulhos de cabeça nos braços abertos e fechados e na zona central do LCE de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias. Assim, nota-se que não houve diferença nestes parâmetros entre os grupos em nenhuma das áreas consideradas [Número de entradas: braços abertos - $F(2/42)=1,864$; braços fechados - $F(2/42)=0,3960$; zona central - $F(2/42)=1,072$] / [Tempo de permanência: braços abertos - $F(2/42)=0,2161$; braços fechados - $F(2/42)=0,1091$; zona central - $F(2/42)=0,0750$] / [Número de avaliações de risco: total - $F(2/42)=0,1432$; braços abertos - $F(2/42)=1,008$; braços fechados - $F(2/42)=0,8260$; zona central - $F(2/42)=0,6948$] / [Mergulhos de cabeça: total - $F(2/42)=1,064$; braços abertos - $F(2/42)=0,7754$; zona central - $F(2/42)=0,6964$].

Além disso, a tabela 9 e a figura 28 mostram a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos do LCE de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias. Pode-se notar estes parâmetros também não diferiram entre os grupos [% entradas - $KW=2,553$; % tempo - $KW=0,3874$].

Tabela 8 - Comportamento no labirinto em cruz elevado de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias

Parâmetro	Área da arena	Controle (n=16)	300 mg/kg extrato (n=14)	900 mg/kg extrato (n=14)
<i>Número de entradas</i>	Braços abertos	29,3 ± 1,8	29,3 ± 2,5	24,5 ± 1,9
	Braços fechados	31,9 ± 1,9	29,9 ± 1,9	30,3 ± 1,5
	Centro	59,7 ± 3,2	58,3 ± 3,1	53,6 ± 2,9
	Total	1	1	1
<i>Tempo de permanência (s)</i>	Braços abertos	87,9 ± 7,5	88,6 ± 8,1	94,2 ± 6,5
	Braços fechados	132,5 ± 7,8	133,2 ± 27,7	128,7 ± 5,9
	Centro	79,6 ± 5,7	78,2 ± 4,1	77,1 ± 2,9
	Total	300	300	300
<i>Número de avaliações de risco</i>	Braços abertos	22,1 ± 1,6	22,8 ± 1,7	25,7 ± 2,4
	Braços fechados	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,3 ± 0,1
	Centro	9,2 ± 1,4	8,1 ± 1,7	7,1 ± 0,7
	Total	31,9 ± 1,7	31,3 ± 3,3	33,1 ± 2,4
<i>Número de mergulhos de cabeça</i>	Braços abertos	11,4 ± 1,5	14,6 ± 1,7	13,3 ± 2,4
	Braços fechados	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	Centro	1,6 ± 0,3	2,2 ± 0,6	1,5 ± 0,3
	Total	12,9 ± 1,3	16,8 ± 2,0	14,8 ± 2,3

Dados expressos como média ± epm, n = número de animais por grupo (p>0,05, Teste *t* de Student).

Figura 26 – Comportamento no labirinto em cruz elevado de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias ($p > 0,05$, ANOVA)

Figura 27 - Comportamento no labirinto em cruz elevado de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias ($p>0,05$, ANOVA)

Tabela 9 - Porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias

Parâmetro	Controle (n=16)	300 mg/kg extrato (n=14)	900 mg/kg extrato (n=14)
% entradas	47,9 ± 1,5	48,9 ± 2,7	44,2 ± 1,6
% tempo	39,8 ± 3,1	39,8 ± 3,4	42,1 ± 2,7

Dados expressos como média ± epm, n = número de animais por grupo (p>0,05, Kruskal-Wallis).

Figura 28 - Porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias (p>0,05, Kruskal-Wallis)

4.5.4 Estudo anatomopatológico qualitativo e semiquantitativo

4.5.4.1 Exame macroscópico

Não foram encontradas alterações macroscópicas nos órgãos dos animais tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias. A tabela 10 e a figura 29 mostram que o peso relativo de nenhum dos órgãos avaliados foi alterado pelo tratamento com o extrato da floração de cianobactérias [encéfalo - $F(2/43)=0,9778$; fígado - $F(2/43)=0,2501$; rim direito - $F(2/43)=0,0537$; testículo direito - $F(2/43)=1,722$; epidídimo direito - $F(2/43)=1,492$; baço - $F(2/43)=0,7971$; timo - $F(2/43)=0,2328$; e pulmões - $F(2/42)=1,023$].

Tabela 10 - Peso relativo de órgãos (g) de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias

Órgão	Controle (n=16)	300 mg/kg extrato (n=14)	900 mg/kg extrato (n=14)
Encéfalo	1,430 ± 0,025	1,416 ± 0,026	1,385 ± 0,018
Fígado	4,806 ± 0,093	4,774 ± 0,110	4,712 ± 0,082
Rim direito	0,747 ± 0,016	0,754 ± 0,018	0,750 ± 0,014
Testículo direito	0,329 ± 0,009	0,319 ± 0,008	0,306 ± 0,010
Epidídimo direito	0,124 ± 0,003	0,125 ± 0,003	0,117 ± 0,003
Baço	0,251 ± 0,010	0,267 ± 0,008	0,258 ± 0,007
Timo	0,090 ± 0,005	0,093 ± 0,005	0,088 ± 0,006
Pulmões	0,531 ± 0,011	0,540 ± 0,010	0,518 ± 0,012

Dados expressos como média ± epm, n = número de animais por grupo ($p>0,05$, ANOVA).

Figura 29 - Peso relativo de órgãos (g) de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias ($p > 0,05$, ANOVA)

4.5.4.2 Exame microscópico

No exame microscópico, não foram encontradas alterações circulatórias, degenerativas nem inflamatórias nos seguintes órgãos: cérebro, cerebelo, coração, traquéia, esôfago, pulmões, pâncreas, adrenal, tireóide, paratireóide, bexiga urinária, testículo, epidídimo, vesícula seminal, músculo (quadríceps), estômago, intestinos, baço e placas de Peyer. No exame histológico do fígado, rim e timo foram observadas alterações degenerativas, necróticas e/ou inflamatórias nos animais tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias. A tabela 11 e a figura 30 mostram a avaliação histopatológica semiquantitativa.

No fígado dos animais tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias foram observados focos de necrose lítica hepatocelular focal a multifocal associada a infiltrado de neutrófilos e células mononucleares (linfócitos, plasmócitos e macrófagos). Foram encontrados focos de necrose em 83,3% dos animais do grupo tratado com 300 mg/kg do extrato e em 57,1% dos animais do grupo tratado com 900 mg/kg do extrato, enquanto nenhum dos animais controles avaliados apresentou necrose. A análise semiquantitativa mostrou diferença estatisticamente significativa em relação à intensidade de necrose entre os grupos controle e o tratado com a menor dose do extrato ($KW=8,767$; $p<0,01$); no entanto, não houve diferença entre os grupos controle e o tratado com a maior dose do extrato e nem entre os grupos tratados (Figuras 30 e 31). A análise semiquantitativa do fígado para a intensidade de infiltrado inflamatório neutrofilico também mostrou diferença significativa entre o grupo controle e o tratado com a menor dose do extrato ($KW=10,608$; $p<0,01$). No entanto, também não houve diferença entre os grupos controle e o tratado com a maior dose do extrato e nem entre os grupos tratados (Figuras 30 e 31).

No rim, houve um aumento estatisticamente significativo da intensidade de nefrose tubular (tumefação celular com citoplasma de aspecto rendilhado) nos grupos tratados com a menor e com a maior dose do extrato em relação ao grupo controle (KW=10,838; $p<0,01$). As figuras 30 e 32 mostram que a tumefação celular foi mais acentuada nos animais tratados com a maior dose do extrato.

No timo, pode-se observar um aumento do número de neutrófilos, porém não significativo (KW=2,215), nos animais tratados com 300 mg/kg do extrato em relação aos controles (Figuras 30 e 33). Quando considerado o grupo tratado com 900 mg/kg do extrato, não foi observada alteração em relação ao grupo controle.

Tabela 11 - Análise microscópica semiquantitativa do fígado, rim e timo de camundongos tratados com extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias

Órgão/parâmetro	Controle (n=7)	300 mg/kg extrato (n=7)	900 mg/kg extrato (n=7)
Fígado			
Necrose hepatocelular	0,00 ± 0,00 ^a	2,33 ± 0,49 ^b	1,57 ± 0,57 ^{ab}
Intensidade de infiltrado inflamatório neutrofílico	1,00 ± 0,00 ^a	2,33 ± 0,21 ^b	1,86 ± 0,34 ^{ab}
Rim			
Nefrose tubular	0,86 ± 0,14 ^a	1,71 ± 0,29 ^{b*}	2,00 ± 0,22 ^{b**}
Timo			
Intensidade de infiltrado de neutrófilos	1,14 ± 0,14	1,67 ± 0,33	1,29 ± 0,18

Dados expressos como média ± epm, n = número de animais por grupo. Médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes (* p<0,05, ** p<0,01, Kruskal-Wallis).

Figura 30 - Análise microscópica semiquantitativa do fígado, rim e timo de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias. Médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes (* p<0,05, ** p<0,01, Kruskal-Wallis)

4.5.5 Parâmetros hematológicos

A tabela 12 e a figura 34 mostram que o tratamento com o extrato aquoso da floração de cianobactérias não alterou significativamente os parâmetros hematológicos avaliados [hematócrito - $F(2/20)=2,019$; número de hemácias - $F(2/20)=1,318$; hemoglobina - $F(2/20)=2,051$; VCM - $F(2/20)=1,894$; HCM - $F(2/20)=0,3272$; e CHCM - $F(2/20)=1,600$]. No entanto, houve uma tendência ($p=0,08$) de redução do número de leucócitos nos animais tratados com a maior dose do extrato [$F(2/43)=2,908$; $p=0,08$].

Tabela 12 - Parâmetros hematológicos de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias

	Controle	300 mg/kg extrato	900 mg/kg extrato
	(n=7)	(n=7)	(n=7)
Hematócrito (%)	41,86 $\pm$ 0,76	39,57 $\pm$ 1,21	41,57 $\pm$ 0,52
Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	7,93 $\pm$ 0,14	7,50 $\pm$ 0,25	7,60 $\pm$ 0,18
Hemoglobina (g/dl)	10,96 $\pm$ 0,30	10,21 $\pm$ 0,27	10,59 $\pm$ 0,19
VCM (fl)	52,81 $\pm$ 0,88	52,79 $\pm$ 0,78	54,81 $\pm$ 0,86
HCM (pg)	13,81 $\pm$ 0,29	13,64 $\pm$ 0,26	13,96 $\pm$ 0,27
CHCM (%)	26,15 $\pm$ 0,30	25,84 $\pm$ 0,27	25,46 $\pm$ 0,25
Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	2,81 $\pm$ 0,39	2,53 $\pm$ 0,26	1,86 $\pm$ 0,15 [#]

Dados expressos como média $\pm$ epm, n = número de animais por grupo ([#] $p=0,08$, ANOVA).

Figura 34 - Parâmetros hematológicos de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias (# $p=0,08$, ANOVA)

4.5.6 Parâmetros bioquímicos

A tabela 13 e as figuras 35 e 36 mostram que o tratamento com o extrato aquoso da floração de cianobactérias não alterou os seguintes parâmetros bioquímicos séricos avaliados: ALT [F(2/22)=0,4194] , AST [F(2/21)=0,1868], ALP [KW=1,629], CK-MB [F(2/19)=1,390], GGT [F(2/22)=1,390], glicose [F(2/22)=0,02054], triglicérides [F(2/22)=0,5095], globulinas [F(2/23)= 0,2254] e uréia [F(2/23)=2,127]. No entanto, foi observado um aumento dos níveis de albumina sérica nos animais tratados com 300 mg/kg do extrato em relação aos animais controles e aos animais tratados com a maior dose do extrato [F(2/23)=3,842; $p < 0,05$], com conseqüente tendência ($p=0,07$) de aumento do nível de proteínas totais neste mesmo grupo [F(2/23)=3,144]. Além disso, houve uma tendência ($p=0,07$) de aumento do nível de creatinina nos animais tratados com a maior dose do extrato (900 mg/kg) em relação aos controles e aos tratados com a menor dose [KW=5,491].

Tabela 13 - Parâmetros bioquímicos séricos de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias

	Controle	300 mg/kg extrato	900 mg/kg extrato
	(n=10)	(n=7)	(n=7)
ALT (U/L)	45,00 ± 3,07	41,67 ± 3,07	41,43 ± 3,40
AST (U/L)	176,67 ± 15,90	163,33 ± 34,12	160,00 ± 15,89
ALP (U/L)	69,14 ± 3,10	76,26 ± 8,20	107,17 ± 22,96
CK-MB (U/L)	112,00 ± 13,57	124,80 ± 12,63	152,80 ± 26,64
GGT (U/L)	7,75 ± 0,88	7,67 ± 1,12	10,21 ± 1,63
Glicose (mg/dL)	284,90 ± 12,65	285,00 ± 25,34	290,29 ± 28,52
Triglicérides (mg/dL)	136,08 ± 30,62	168,91 ± 44,55	183,75 ± 26,41
Proteínas totais (g/dL)	4,28 ± 0,17	4,94 ± 0,25 [#]	4,37 ± 0,17
Albumina (g/dL)	2,94 ± 0,14 ^a	3,54 ± 0,25 ^{b*}	2,89 ± 0,14 ^a
Globulina (g/dL)	1,34 ± 0,13	1,40 ± 0,17	1,49 ± 0,18
Creatinina (mg/dL)	0,32 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,46 ± 0,12 [#]
Uréia (mg/dL)	46,80 ± 3,25	49,86 ± 2,76	58,14 ± 5,80

Dados expressos como média ± epm, n = número de animais por grupo. Médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes ([#] p<0,07, * p<0,05, ANOVA ou Kruskal-Wallis).

Figura 35 - Parâmetros bioquímicos de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias ($p > 0,05$, ANOVA ou Kruskal-Wallis)

Figura 36 - Parâmetros bioquímicos de camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias. Médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes ($\# p=0,07$, $* p<0,05$, ANOVA ou Kruskal-Wallis)

4.6 Experimento 6 - Avaliação *in vitro* da morte celular/apoptose de leucócitos por citometria de fluxo

A tabela 14 e a figura 37 mostram a avaliação da morte celular (apoptose inicial, apoptose final e necrose) de leucócitos expostos por 12 h a 1,0; 10; 50 e 100 µg/L de MC-LR ou do extrato.

Em relação à porcentagem de apoptose inicial, a análise de variância não-paramétrica mostrou diferença entre os grupos (KW = 54,238; $p < 0,0001$). O teste de Dunn mostrou aumento significativo da porcentagem de apoptose inicial de leucócitos expostos ao extrato nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/L e também à MC-LR na concentração 100 µg/L em relação ao controle negativo. Nenhuma diferença significativa foi encontrada quando comparou-se as concentrações de MC-LR entre si e nem com as suas respectivas concentrações de extrato. Contudo, quando comparou-se as concentrações do extrato entre si, encontrou-se diferença significativa na porcentagem de apoptose inicial apenas entre as concentrações de 1,0 e 100 µg/L do extrato. O controle positivo foi significativamente diferente apenas do grupo exposto ao extrato na concentração de 100 µg/L.

Em relação à porcentagem de apoptose final, a análise de variância não-paramétrica mostrou diferença entre os grupos (KW = 62,811; $p < 0,0001$). O teste de Dunn mostrou aumento significativo nos leucócitos expostos às concentrações de 10, 50 e 100 µg/L do extrato e também à MC-LR na concentração 100 µg/L em relação ao controle negativo. Nenhuma diferença significativa foi encontrada quando comparadas as concentrações do extrato entre si, as concentrações de MC-LR entre si e também entre as concentrações de extrato e suas respectivas

concentrações de MC-LR. O controle positivo foi significativamente diferente apenas do grupo exposto ao extrato na concentração de 50 e 100 µg/L.

Em relação à porcentagem de necrose, a análise de variância não-paramétrica mostrou diferença entre os grupos (KW = 56,249; $p < 0,0001$). O teste de Dunn mostrou aumento significativo nos leucócitos expostos às concentrações de 50 e 100 µg/L do extrato em relação ao controle negativo. Nenhuma diferença significativa foi encontrada quando comparadas as concentrações do extrato entre si, as concentrações de MC-LR entre si e também entre as concentrações de extrato e suas respectivas concentrações de MC-LR. O controle positivo foi significativamente diferente dos grupos expostos a 1,0; 10 e 50 µg/L de MC-LR.

Tabela 14 - Avaliação da morte celular (apoptose/necrose) de leucócitos após tratamento *in vitro* por 12 h com diferentes concentrações de microcistina-LR (MC-LR) e do extrato aquoso da floração de cianobactérias

	Controle	Controle	1,0 µg/L		10 µg/L		50 µg/L		100 µg/L	
	negativo	positivo	MC-LR	Extrato	MC-LR	Extrato	MC-LR	Extrato	MC-LR	Extrato
Apoptose inicial (%)										
	0,67 ± 0,06	16,00 ± 1,46	9,63 ± 1,09	17,20 ± 0,77	16,02 ± 1,29	27,08 ± 0,89*	18,32 ± 0,70	30,15 ± 0,55**	24,74 ± 1,02*	42,62 ± 0,64**
Apoptose final ou necrose (%)										
	0,30 ± 0,04	1,33 ± 0,21	11,40 ± 1,27	13,93 ± 0,70	16,08 ± 0,92	22,60 ± 0,59#	21,08 ± 0,52	30,48 ± 1,83**	22,30 ± 0,49#	27,02 ± 0,68**
Necrose (%)										
	3,27 ± 0,29	91,00 ± 0,73**	3,73 ± 0,35	9,43 ± 0,18	4,38 ± 0,30	11,87 ± 0,69	6,62 ± 0,55	18,58 ± 0,63*	10,72 ± 0,58	19,57 ± 0,74**

Dados expressos como média ± epm (#p<0,05, *p<0,01, **p<0,001 em relação ao controle negativo, Kruskal-Wallis).

Figura 37 - Morte celular (apoptose/necrose) de leucócitos após tratamento *in vitro* por 12 h com diferentes concentrações de microcistina e do extrato aquoso da floração de cianobactérias ([#]p<0,05, *p<0,01, **p<0,001 em relação ao controle negativo, Kruskal-Wallis)

4.7 Experimento 7 - Detecção de microcistinas em fígado e plasma

4.7.1 Detecção de microcistinas em fígado

A figura 38 mostra os cromatogramas de amostras de fígado analisadas quanto a presença de MCs. Em A observa-se o pico correspondente a 0,5 µg de MC-LR, que foi adicionado à amostra de tecido hepático. Em B observa-se um discreto pico de MC presente no fígado de um animal que veio à óbito após a administração de 500 µg/kg de MC-LR desta toxina. Em C e D observa-se traços de MC presente no fígado de animais tratados, respectivamente, com 300 e 900 mg/kg do extrato, por 28 dias.

Figura 38 - Cromatogramas de amostras de fígado para a presença de microcistina

4.7.2 Detecção de microcistinas em plasma

A figura 39 mostra os cromatogramas de amostras de plasma analisadas quanto a presença de MCs. Em A observa-se o pico correspondente a 0,6 µg de MC-LR adicionada à amostra de plasma. Em B e C não foi possível detectar MC no plasma dos animais tratados com 300 e 900 mg/kg do extrato, por 28 dias.

Figura 39 - Cromatogramas de amostras de plasma para a presença de microcistina

Discussão

5 DISCUSSÃO

A análise química inicial do extrato aquoso da floração de cianobactérias por espectrometria de massas mostrou que este possui, além das MCs, anabaenopeptinas (Experimento 1). Estas últimas pertencem a uma classe de peptídeos produzida por algas ainda muito pouco estudada. Vale também ressaltar que este método, embora não tenha permitido quantificar as anabaenopeptinas, indicou que o extrato possui uma quantidade maior destes peptídeos em relação àquela de MCs (Figura 13).

A análise das MCs presentes no extrato por HPLC/MS mostrou que este apresentava quatro tipos desta toxina: MC-LR, MC-RR, MC-YR e [D-Asp³] MC-LR. Destas, só foram quantificadas três, as MC-LR (33,24 µg/g), MC-RR (154,78 µg/g) e MC-YR (8,20 µg/g), que são as mais comuns e amplamente distribuídas (GUPTA et al., 2003).

A co-ocorrência de MCs e anabaenopeptinas em populações naturais dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* e *Nodularia* foi demonstrada recentemente por diversos autores (FUJII et al., 1997, 2000, 2002; ERHARD; VON DÖHREN; JUNGBLUT, 1999; KODANI et al., 1999; FASTNER; ERHARD; VON DÖHREN, 2001; GRACH-PROGREBINSKI; SEDMAK; CARMELI, 2003; GKELIS et al., 2005). Além disso, as anabaenopeptinas mais comumente encontradas são as anabaenopeptinas B e F (WELKER et al., 2006), sendo estas também observadas no presente estudo.

Neste trabalho observou-se que a administração aguda do extrato aquoso, por via oral, nas doses de 20, 200, 1000, 2000 e 5000 mg/kg não causou morte em camundongos observados por até 14 dias após a administração. A maior dose administrada levou em consideração àquela estabelecida pela USEPA (2002) para estudos de toxicidade aguda. Estes achados iniciais podem

ser explicados pelo fato do extrato empregado no presente estudo apresentar baixas concentrações de MCs, uma vez que se sabe que a administração em dose única da MC-LR nas doses de 3 a 10,9 mg/kg, por via oral, é capaz de levar camundongos a óbito em pouco tempo (FITZGEORGE; CLARK; KEEVIL, 1994; YOSHIDA et al., 1997).

Por outro lado, sabe-se que as anabaenopeptinas B e F têm ações que incluem a inibição das proteínas fosfatase 1 e 2A (SANO et al., 2001; GKELIS; LANARAS; SIVONEN, 2006), de forma semelhante a das MCs. Contudo, alguns testes indicaram que, ao contrário do que se esperava, as anabaenopeptinas não potencializam a toxicidade produzida pela MC-LR (HARADA, 2004) e não são tóxicas agudamente para animais (HARADA, 1995), apesar de suas propriedades bioativas (SANO; KAYA, 1995; SANO et al., 2001) poderem ser significativas em nível subletal e suficientes para afetar organismos aquáticos e seres humanos (MORRISON; PARKIN; CODD, 2006). No entanto, ainda não existem trabalhos na literatura avaliando os efeitos da exposição prolongada de animais às anabaenopeptinas.

Os efeitos tóxicos de uma substância química no organismo de um animal podem ser avaliados pelo exame físico diário, peso corporal e de órgãos, avaliação do consumo de água e de ração, exames hematológicos, dentre outros. No presente trabalho estes parâmetros foram usados para avaliar a toxicidade do extrato aquoso da floração de cianobactérias administrado em camundongos por 28 dias.

O peso corporal é um dos parâmetros mais empregados em avaliações toxicológicas para indicar o aparecimento, muitas vezes precoce, de efeitos tóxicos de uma determinada substância no organismo animal (DIXON, 1989; ZENICK; CLEGG, 1989). No presente estudo, a administração por 28 dias do extrato aquoso da floração de cianobactérias não causou alterações no ganho de peso dos animais. Deve ser ressaltado também que apesar de terem sido detectadas algumas flutuações no consumo de água (dias 10-13 e 22-25) e ração (dias 4-7 e 7-10), estas não

foram acompanhadas de alterações no peso corpóreo dos camundongos. Em relação ao peso relativo dos órgãos dos animais que receberam o extrato aquoso da floração de cianobactérias, não foram observadas alterações relacionadas ao tratamento.

A Toxicologia Comportamental ganhou maior importância quando constatou-se que a exposição a substâncias tóxicas pode resultar em alterações funcionais significativas do sistema nervoso central. Assim, a avaliação do comportamento pode fornecer subsídios importantes sobre o funcionamento cerebral e direcionar para o uso de medidas mais específicas e sutis (WEISS; CORY-SLECHTA, 2001). No presente estudo, não foram observadas alterações significativas no campo aberto e no labirinto em cruz elevado após exposição aguda ao extrato aquoso da floração de cianobactérias. Entretanto, após exposição prolongada (28 dias) de camundongos ao extrato, os seguintes resultados foram obtidos no campo aberto: aumento significativo da distância percorrida, do número de entradas, do tempo em movimento e do número de levantamentos no centro do campo aberto, além de um aumento do tempo de permanência no centro, com conseqüente diminuição deste parâmetro na periferia. Por outro lado, como observado no experimento agudo, nenhum dos parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado foi alterado.

O campo aberto é um teste amplamente utilizado para a avaliação da ansiedade, exploração e atividade locomotora de roedores (ARCHER, 1973; WALSH; CUMMINS, 1976). Como um teste de atividade espontânea (incondicionada), ele permite que o animal exiba uma ampla variedade de comportamentos e, deste modo, é bastante apropriado para o estudo de um fenômeno complexo como a ansiedade (LIPKIND et al., 2004). Tipicamente, entretanto, apenas duas medidas espaciais são avaliadas neste teste: a distância total percorrida (considerada como uma medida da atividade geral) e alguma medida da tendência do animal de evitar o centro da arena. Este último parâmetro é considerado relacionado à ansiedade, baseado no conhecimento de que o centro da arena é mais ameaçador para roedores do que a periferia e, portanto, a ocupação

do centro é maior após a administração de drogas ansiolíticas (TREIT; FUNDYTUS, 1988; SIMON; DUPUIS; COSTENTIN, 1994). Por isso, o comportamento de evitar o centro da arena é considerado como um indicador de ansiedade, uma interpretação que é apoiada por estudos genéticos e farmacológicos (SIMON; DUPUIS; COSTENTIN, 1994; CLEMENT et al., 1997; GERSHENFELD; PAUL, 1997).

Além do campo aberto, foi utilizado o labirinto em cruz elevado, um dos testes comportamentais mais utilizados atualmente para a avaliação da ansiedade. Neste teste, os roedores têm uma preferência clara pelos braços fechados em relação aos braços abertos. Existem evidências que mostram que drogas que aumentam a atividade nos braços abertos mostraram ser agentes ansiolíticos em outros modelos comportamentais, enquanto drogas que reduzem a atividade nos braços abertos são ansiogênicas (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

Os efeitos comportamentais observados no campo aberto, após exposição prolongada ao extrato, sugerem um possível efeito ansiolítico, já que não houve alteração da atividade locomotora (distância total percorrida no campo aberto), mas os animais permaneceram mais tempo, se locomoveram mais, tiveram maior tempo em movimento e maior número de entradas e de levantamentos no centro do campo aberto. Assim, esperava-se que estes permanecessem maior tempo e tivessem maior número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, o que não ocorreu após exposição aguda e prolongada ao extrato. No entanto, este resultado pode ser atribuído ao fato de que o labirinto em cruz elevado é considerado uma excelente ferramenta para detectar substâncias com atividade semelhante aos benzodiazepínicos/GABA e ao glutamato (RODGERS et al., 1997; MENARD; TREIT, 1999; CAROBREZ; TEIXEIRA; GRAEFF, 2001; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2003; CAROBREZ, 2003), contudo não possibilita a obtenção de resultados consistentes relacionados a drogas que modulam os sistemas serotoninérgico (MENARD; TREIT, 1999; BORSINI; PODHORNA;

MARAZZITI, 2002) e alguns dos sistemas de neuropeptídeos (GRIEBEL, 1999; MENARD; TREIT, 1999). Isso porque, além do sistema GABA (ácido γ -aminobutírico) e do neurotransmissor glutamato, existem outros neurotransmissores relacionados à ansiedade, como a serotonina e a noradrenalina (KENT; MATHEW; GORMAN, 2002; GORMAN, 2003; VASWANI; LINDA; RAMESH, 2003), bem como outros neuromoduladores, incluindo a adenosina, os canabinóides, diversos neuropeptídeos, hormônios, neurotrofinas, citocinas e diversos moduladores celulares (GRIEBEL, 1999; KENT; MATHEW; GORMAN, 2002; HOOD; ARGYROPOULOS; NUTT, 2003; MILLAN, 2003). Este perfil tem levado alguns autores a duvidar do valor do labirinto em cruz elevado para avaliação dos efeitos ansiolíticos e ansiogênicos das substâncias químicas (MOSER, 1989; DAWSON; TRICKLEBANK, 1995; GRIEBEL, 1999; BORSINI; PODHORN; MARAZZITI, 2002).

Os efeitos comportamentais observados neste estudo, tomados isoladamente, ainda são difíceis de serem explicados, porém podem estar sim relacionados à ação das MCs e/ou anabaenopeptinas no sistema nervoso central. Ainda não existem trabalhos na literatura avaliando a distribuição das anabaenopeptinas no organismo, porém, para as MCs, já foram encontrados transportadores específicos que mediam sua passagem pela barreira hematoencefálica (FISCHER et al., 2005). Apesar deste conhecimento, existe apenas um trabalho na literatura, bastante recente, avaliando a ação das MCs no sistema nervoso central. Nesse trabalho, Maidana et al. (2006) mostraram que a infusão intra-hipocampal de uma única dose de MC melhorou a memória de longa duração de ratos. Já se sabe que a ativação de proteínas-quinase ou a inibição de proteínas fosfatase está relacionada ao aumento da eficiência sináptica (MULKEY; HERRON; MALENKA, 1993). Portanto, a fosforilação de proteínas é um processo bioquímico chave envolvido na plasticidade sináptica, que opera através de um balanço entre a ação de proteínas-

cinase e fosfatase; acredita-se que este processo seja a principal base celular da aprendizagem e da memória (MILNER; SQUIRE; KANDEL, 1998).

Por outro lado, neste mesmo trabalho realizado por Maidana et al. (2006), foi demonstrado que após oito dias de injeção intra-hipocampal de MC, a memória espacial de ratos foi prejudicada. Estes autores sugeriram que o dano à memória observado em ratos que receberam doses cumulativas de MC seja devido a um efeito secundário da exposição a esta toxina, como o dano neuronal, que pode estar diretamente relacionado ao estresse oxidativo, como a peroxidação lipídica ou o dano ao DNA.

O estudo anatomopatológico dos animais expostos ao extrato aquoso da floração de cianobactérias não mostrou alterações macroscópicas em nenhum órgão, enquanto alterações microscópicas evidentes foram encontradas em fígado e rim. Na análise histopatológica do fígado foram observados focos discretos de necrose lítica hepatocelular focal a multifocal associada a infiltrado de neutrófilos e células mononucleares (linfócitos, plasmócitos e macrófagos) nos animais tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias. Foram encontrados focos de necrose em 83,3% dos animais do grupo tratado com 300 mg/kg do extrato e em 57,1% dos animais do grupo tratado com 900 mg/kg do extrato, enquanto nenhum dos animais controles avaliados apresentou necrose.

Já se sabe que o fígado é o órgão-alvo da MC. De fato, após a administração de grandes quantidades de MC, os fígados apresentam-se aumentados, hemorrágicos e friáveis, macroscopicamente. Histologicamente, a toxicidade aguda é caracterizada por arredondamento, dissociação e necrose dos hepatócitos da região centrolobular, com ruptura do endotélio sinusoidal, o que resulta em hemorragia intra-hepática severa (GUZMAN; SOLTER, 2002). Em estudos de toxicidade aguda em camundongos, que incluíam a administração de doses subletais

orais e intraperitoniais, foram observadas alterações como necrose, hemorragia, apoptose e hipertrofia celular 24 h e 7 dias após o tratamento (GUZMAN; SOLTER, 2002).

Comparados aos estudos de toxicidade aguda, os efeitos da exposição prolongada (subletal) à MC foram pouco investigados (ELLEMAN et al., 1978; FALCONER et al., 1988 e 1994; CARBIS et al., 1994). No número limitado de estudos feitos, a evidência de dano hepático incluiu degeneração hepatocelular, necrose individual de células, fibrose, infiltrado de neutrófilos e promoção tumoral (ELLEMAN et al., 1978; FALCONER et al., 1988 e 1994; NISHIWAKI-MATSUSHIMA et al., 1992). Lesões de fígados de ratos expostos a doses intraperitoneais subletais por 28 dias incluíram apoptose hepatocelular, esteatose e fibrose celular com infiltração por neutrófilos e células mononucleares (SOLTER et al., 1998; GUZMAN; SOLTER, 1999).

A análise histopatológica do rim revelou um aumento estatisticamente significativo da intensidade de nefrose tubular (tumefação celular com citoplasma de aspecto rendilhado) nos grupos tratados com as duas doses do extrato em relação ao grupo controle, apesar de esta tumefação celular ser mais acentuada nos animais tratados com a maior dose. Este achado pode ser comparado com o estudo realizado por Milutinovic et al. (2003), que trataram ratos Wistar a cada dois dias por oito meses com 10 µg/kg de MC-LR ou MC-YR, e observaram diversas alterações renais, entre elas, a presença de células epiteliais dos túbulos contorcidos proximais e distais com grandes vacúolos citoplasmáticos. Estes autores constataram que as alterações patológicas observadas nos rins do grupo tratado com MC-LR foram mais severas do que aquelas do grupo tratado com MC-YR.

Outros autores encontraram alterações degenerativas em rins de ratos e peixes que sobreviveram um curto período de tempo após serem intoxicados com uma alta dose de MC-LR (HOOSER et al., 1989; KOTAK et al., 1996; FISCHER; DIETRICH, 2000). Além disso, Ito et al. (2002), que utilizaram um método de imunomarcação, revelaram que conjugados da MC com

glutathiona e cisteína podem se acumular nos rins e, a partir desta informação, pode-se especular que nas condições de exposição crônica à MC-LR pode ocorrer um acúmulo desses metabólitos nos rins. Assim, a exposição crônica a baixas doses de MCs representa um risco considerável para o dano renal.

Vale ressaltar que os achados histopatológicos em fígado e rins acima descritos referem-se à exposição apenas a um tipo de MC, diferente do que ocorre em condições naturais. No extrato empregado no presente estudo, além da MC-LR, existem outras MCs e cianopeptídeos, contudo os achados histopatológicos encontrados nestes órgãos corroboram aqueles que empregaram apenas uma MC em particular.

Os parâmetros clínico-patológicos usados para avaliar a função hepática podem ser divididos em testes de avaliação de enzimas séricas e testes funcionais (MEYER et al., 1995). Os testes de enzimas séricas podem ser subdivididos naqueles que refletem lesão hepatocelular e naqueles que refletem aumento da produção enzimática. Os primeiros incluem a medida dos níveis de ALT e de AST. Os testes que refletem aumento da produção enzimática consequente à colestase ou indução por drogas, incluem a medida dos níveis de ALP e de GGT. Os testes funcionais estão relacionados à medida de substâncias produzidas pelo fígado, como a albumina, uréia e glicose.

O tratamento com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias não alterou os níveis das enzimas hepáticas avaliadas: ALT, AST, ALP e GGT. Apesar de diversos autores (JACKSON et al., 1984; FALCONER et al., 1994; SOLTER et al., 1998; FAWELL et al., 1999; UENO et al., 1999; GUPTA et al., 2003; RAO et al., 2004 e 2005) já terem observado aumento da atividade sérica de enzimas indicativas de dano hepático (AST, ALT, ALP, GGT e LDH) em diferentes espécies (ovelhas, porcos, ratos e camundongos) após tratamento agudo e crônico com MCs por várias vias de administração (intraruminal, *gavage*, água de bebida, intraperitoneal e

infusão intraperitoneal contínua), no presente estudo a ausência de alterações dessas enzimas pode ser atribuída aos discretos achados histopatológicos observados nos camundongos tratados.

Os níveis de glicose e uréia também não foram afetados pelo tratamento com o extrato. No entanto, foi observado aumento significativo da albumina, com conseqüente tendência de aumento ($p < 0,07$) das proteínas totais nos animais tratados com a menor dose do extrato (300 mg/kg), em relação aos grupos controle e tratado com 900 mg/kg. Os níveis de globulinas não foram significativamente alterados pelo tratamento. O significado toxicológico do aumento de albumina nos animais tratados com 300 mg/kg do extrato é de difícil entendimento. A albumina, que representa cerca da metade do total de proteínas em um indivíduo adulto, é produzida exclusivamente pelo fígado, mas sua mensuração não é um teste sensível de função hepática, além de sua sensibilidade diagnóstica variar entre as espécies (MEYER et al., 1995). Este resultado também parece não ter importância toxicológica, pois a maioria dos autores que avaliaram os níveis de albumina sérica em animais tratados com MCs não observou alteração deste parâmetro (JACKSON et al., 1984; UENO et al., 1999; GUPTA et al., 2003; BENSON et al., 2005), apesar de outros terem encontrado uma diminuição desta proteína (FALCONER et al., 1994; SOLTER et al., 1998; FAWELL et al., 1999). A maioria desses trabalhos também não observou alterações nos níveis totais de proteínas (JACKSON et al., 1984; FALCONER et al., 1994; SOLTER et al., 1998; GUPTA et al., 2003; BENSON et al., 2005).

Os testes de função renal incluem a mensuração da uréia e creatinina no soro (MEYER et al., 1995). Devido à grande importância dos rins na função de eliminação e conservação de diversos componentes químicos do sangue, uma doença renal pode alterar também as proteínas séricas. O tratamento com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias levou a uma tendência de aumento ($p < 0,07$) dos níveis de creatinina nos animais tratados com a maior dose do extrato. Quanto à uréia, apesar de ser observado um aumento no grupo tratado com a maior dose

do extrato, este não foi estatisticamente significativo. Esses achados corroboram aqueles histopatológicos que mostraram nefrose tubular nos animais tratados com 300 e 900 mg/kg do extrato.

Para avaliar uma possível lesão muscular cardíaca foi mensurada a CK-MB, que não foi alterada pelo tratamento. O metabolismo lipídico também foi avaliado, por meio da mensuração de triglicérides, que são a principal forma de armazenamento de lipídeos. Neste trabalho, não foram observadas diferenças nos níveis de triglicérides relacionadas ao tratamento com o extrato.

O único parâmetro hematológico alterado após exposição subcrônica ao extrato aquoso da floração de cianobactérias foi o número de leucócitos, que apresentou uma tendência de diminuição. Este resultado pode ser explicado pela presença de MCs no extrato, já que, recentemente, Gonçalves et al. (2006) demonstraram um aumento das taxas de apoptose de leucócitos polimorfonucleares de seres humanos após exposição *in vitro* à MC por 24 h. É importante notar que as concentrações utilizadas para induzir este efeito foram baseadas em valores próximos àqueles encontrados ocasionalmente na água fornecida à população e que abastece os centros de hemodiálise. Assim, é possível que, com a exposição crônica, esta resposta possa ser intensificada e, ainda, outras funções possam ser afetadas (GONÇALVES et al., 2006).

O sistema imune, dentre todos, é o que apresenta a probabilidade máxima de exposição e susceptibilidade a agentes tóxicos (SHEN et al., 2003). A primeira descrição da toxicidade letal da MC em seres humanos ocorreu em 1996 em uma população de uma clínica de hemodiálise, em Caruaru - Pernambuco. Neste evento agudo dramático, a necropsia do fígado das vítimas revelou um denso infiltrado inflamatório constituído, predominantemente, por neutrófilos e linfócitos nos tratos portais (POURIA et al., 1998). A partir desta evidência, vários autores avaliaram o possível efeito imunomodulatório da MC (HERNÁNDEZ et al., 2000; MANKIEWICZ et al., 2001, 2002; YEA et al., 2001; SHEN et al., 2003; KUJBIDA et al., 2006).

Inicialmente, foi demonstrada a modulação da produção de citocinas em macrófagos pela MC (NAKANO et al., 1989, 1991). Mais tarde, em 2000, Hernández et al. mostraram que as hepatotoxinas MC e nodularina são capazes de aumentar significativamente a aderência espontânea de leucócitos polimorfonucleares periféricos de seres humanos. Além disso, alguns autores relataram que algumas cianotoxinas podem suprimir a função linfocítica pela diminuição da linfoproliferação induzida por LPS e a inibição dose-dependente da produção de anticorpos policlonais *in vitro* (YEA et al., 2001; SHEN et al., 2003). Outros estudos avaliando a imunotoxicidade das cianotoxinas, utilizando um extrato de uma floração de cianobactérias ocorrida em um reservatório polonês, indicaram um efeito apoptótico em hepatócitos de rato e linfócitos de seres humanos (MANKIEWICZ et al., 2001), além de um potencial efeito genotóxico deste extrato em imunócitos, que foi revelado pelo dano ao DNA em linfócitos de seres humanos (MANKIEWICZ et al., 2002). Recentemente, Kujbida et al. (2006) demonstraram que a MC-LR tem uma atividade quimiotática direta para leucócitos polimorfonucleares e induz *burst* oxidativo.

No presente trabalho, foram utilizadas diferentes concentrações de MC-LR (1, 10, 50 e 100 µg/L) para comparar os efeitos desta toxina com aqueles do extrato sobre a morte celular de leucócitos de camundongos. Estas concentrações foram escolhidas baseadas no estudo de Gonçalves et al. (2006); esses autores incubaram leucócitos polimorfonucleares de seres humanos com 0,1; 1,0 e 10 µg/L de MC por 24 h e observaram aumento das taxas de apoptose apenas no grupo de leucócitos tratados com a maior concentração (10 µg/L). Por outro lado, no presente trabalho, não foi observada diferença significativa das taxas de apoptose em leucócitos tratados com 1, 10 e 50 µg/L de MC-LR em relação ao controle negativo; no entanto, foi observado aumento significativo destas taxas de apoptose em leucócitos tratados com 10, 50 e 100 µg/L do extrato e 100 µg/L de MC-LR. Este fato se deve, provavelmente, à presença de outros tipos de

MC no extrato em adição à MC-LR, como a MC-RR, MC-YR e [D-Asp³] MC-LR, além de outros constituintes.

Gonçalves et al. (2006) observaram aumento da porcentagem de apoptose a partir da concentração de 10 µg/L de MC-LR, enquanto que neste estudo observou-se apoptose somente a partir de 100 µg/L de MC-LR. Este fato pode ser atribuído a diferenças no tempo de incubação (12 h), a espécie animal (células de camundongo) e a população de leucócitos (leucócitos totais, ao invés de apenas polimorfonucleares) aqui utilizados. Contudo, apesar das taxas de apoptose observadas nas concentrações de 10 e 50 µg/L de MC-LR não serem significativamente diferentes do controle negativo, estas também não foram significativamente diferentes das suas respectivas concentrações de extrato. Isto pode indicar que a MC-LR, por si só, é, de fato, a principal responsável pela toxicidade do extrato, apesar de as demais MCs contribuírem com a toxicidade deste.

Embora ainda haja pouca informação na literatura sobre o perfil de toxicidade das diferentes MCs, Gupta et al. (2003) compararam os efeitos das três MCs mais comuns e amplamente distribuídas, as MC-LR, MC-RR e MC-YR, que estão presentes no extrato utilizado neste trabalho. Estes autores concluíram que a MC-LR é realmente a mais tóxica, sendo seguida pela MC-YR e, então, pela MC-RR. Estes achados reforçam a hipótese de que a MC-LR encontrada no extrato é a principal responsável pelas alterações aqui encontradas, uma vez que neste extrato encontrou-se maior quantidade de MC-RR, seguida de MC-LR e MC-YR.

Quanto à porcentagem de necrose, só foi observado aumento nos leucócitos tratados com 50 e 100 µg/L do extrato em relação ao controle negativo, indicando que as MCs são primariamente indutoras de apoptose, levando ao aumento das taxas de necrose somente quando administradas em altas doses.

A avaliação de apoptose induzida pelas MCs já foi realizada por outros autores em diferentes populações celulares. Mc Dermott et al. (1998) observaram apoptose em hepatócitos expostos à MC (0,8 μM) após apenas 30 min de incubação. Outros autores, trabalhando com outros tipos celulares (células endoteliais humanas, fibroblastos humanos, células epiteliais humanas e promielócitos de rato) mostraram apoptose com concentrações muito maiores de MC (100 μM) e necessitaram de períodos maiores de incubação (GONÇALVES et al., 2006). Botha et al. (2004) observaram apoptose em células de carcinoma de cólon humano após 48 h de exposição à MC (50 μM). Estes trabalhos mostram que a resposta à MC pode variar de acordo com o tipo celular, a concentração de toxinas e a duração da exposição.

A concentração máxima aceitável na água de bebida estipulada pela Organização Mundial de Saúde é de 1 μg de MC-LR/L. Esse nível é muito mais alto que aqueles suficientes para modificar significativamente a função de linfócitos polimorfonucleares de seres humanos *in vitro*, como demonstrado por Hernández et al. (2000). Vale ressaltar que concentrações de MC entre 1 e 10 $\mu\text{g/L}$ já foram observadas no suprimento de água em São Paulo (GONÇALVES et al., 2006). É bastante provável que as práticas usuais de descontaminação da água possam levar à exposição crônica de animais e seres humanos a concentrações de cianotoxinas que, apesar de muitas vezes serem baixíssimas, podem ser suficientes para agir no sistema imune e induzir a diminuição da resistência a infecções, aumentar a incidência de tumores, a mortalidade, os episódios alérgicos, dentre outros efeitos (HERNÁNDEZ et al., 2000). De fato, alguns estudos epidemiológicos revelaram que a contaminação da água de bebida por MCs em certas áreas da China possa ser a responsável pela alta incidência de câncer primário hepático nas pessoas que vivem nessas regiões (YU; CHEN, 1994; YU, 1995; UENO et al., 1996). Além disso, a exposição crônica a essas cianotoxinas pode também ser uma das principais causas de outras doenças sazonais e

endêmicas em áreas com recorrente contaminação da água por cianobactérias (HERNÁNDEZ et al., 2000).

Os experimentos realizados com amostras de fígado dos camundongos tratados com o extrato aquoso da floração de cianobactérias por 28 dias demonstraram que a MC foi detectada por HPLC/MS em baixas concentrações (apenas traços), o que não permitiu a sua quantificação. Nas amostras de plasma destes animais não foram encontradas quantidades detectáveis de MC por este método. Estes achados podem ser atribuídos à complexidade das amostras. De fato, em amostras biológicas, como fígado e plasma, a concentração do composto-alvo é geralmente baixa (ng/mL ou menos) e a matriz é complexa, apresentando altas quantidades de proteínas e outras macromoléculas que podem interferir com a detecção por HPLC/DAD e HPLC/MS. Além disso, o composto-alvo de análise está geralmente ligado a proteínas ou conjugado covalentemente para formar outro composto (YUAN; CARMICHAEL; HILBORN, 2006), o que dificulta ainda mais a análise.

Relatos anteriores da extração quantitativa de MC em tecido hepático demonstraram que os resíduos de Mdha das MCs formam ligações covalentes com as subunidades catalíticas das proteínas fosfatase 1 e 2A (MACKINTOSH et al., 1995; RUNNEGAR et al., 1995; WILLIAMS et al., 1997). As MCs também podem formar conjugados com a glutathione (KONDO et al., 1996). Por isso, apesar de experimentos indicarem que camundongos e ratos que receberam doses agudas ou letais da MC apresentaram de 10 a 90 % desta toxina no fígado (RUNNERGAR et al., 1986; ROBINSON et al., 1989), acredita-se que cerca de 80% das MC não pode ser reconhecida pelo método aqui utilizado, já que a maior parte desta toxina não se encontra na forma livre (ROBINSON et al., 1991; WILLIAMS et al., 1997).

A detecção de MCs livres é feita utilizando-se métodos baseados em HPLC/MS (como o utilizado neste estudo) ou ELISA. Entretanto, a formação dos adutos de MCs interfere com a

eficácia da extração, tornando estas análises inadequadas para detectar MCs totais. Assim, seria necessário utilizar um método como o proposto por Yuan, Carmichael e Hilborn (2006), no qual as MCs conjugadas são convertidas em uma pequena molécula, o MMPB (ácido 3-metoxi-2-metil-4-fenilbutírico), que então é analisada por CG (Cromatografia a Gás) ou HPLC/MS. Portanto, seria mais adequado detectar as MCs totais (livres e conjugadas) nas amostras biológicas.

Embora não haja relatos até o momento de interações das MCs com proteínas presentes no sangue, a extração de toxinas no soro ou plasma parece ser prejudicada devido à complexidade da matriz e à pequena quantidade de plasma obtida de camundongos. Além disso, a meia-vida plasmática da MC-LR, após administração intravenosa, é de 0,8 e 6,9 minutos para a primeira e segunda fase de eliminação, respectivamente (CHORUS et al., 1999). Estes fatos podem justificar a ausência de detecção, no presente estudo, de MC no plasma de camundongos expostos ao extrato por 28 dias.

Finalizando, as análises mostraram que o extrato possui além da MC-LR, outras MCs (MC-RR, MC-YR e [D-Asp³] MC-LR), bem como anabaenopeptinas e outros componentes, o que, embora mais se aproxime das condições naturais de exposição, torna complexa a avaliação da toxicidade. Assim, os resultados aqui obtidos permitem concluir que o extrato, administrado prolongadamente nas doses de 300 e 900 mg/kg, não causou mortalidade, alterações no ganho de peso e peso relativo de órgãos. Por outro lado, a exposição ao extrato promoveu discretas alterações no consumo de água e ração, em parâmetros hematológicos e bioquímicos, bem como nos tecidos hepático e renal. Tanto a MC-LR como o extrato promoveram apoptose de leucócitos *in vitro*. A avaliação comportamental dos camundongos revelou efeitos dose-dependentes do extrato, mostrando que o comportamento animal é bastante útil para avaliar efeitos mais sutis de agentes tóxicos sobre o sistema nervoso central.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

- ✓ A análise química do extrato aquoso da floração de cianobactérias mostrou que este possui, além das microcistinas, anabaenopeptinas. A análise do extrato por HPLC/MS mostrou a presença de MC-LR, MC-RR, MC-YR e [D-Asp³] MC-LR.
- ✓ O tratamento agudo com o extrato não causou morte em camundongos observados por até 14 dias após a administração, nem alterações no comportamento dos animais avaliados no campo aberto e no labirinto em cruz elevado.
- ✓ A exposição prolongada ao extrato por 28 dias não alterou o ganho de peso e o peso relativo de órgãos. Na necropsia também não foram observadas alterações macroscópicas, contudo alterações histopatológicas foram encontradas no fígado e no rim.
- ✓ O tratamento prolongado com o extrato em ambas doses causou efeitos comportamentais dose-dependentes no campo aberto.
- ✓ A exposição prolongada ao extrato causou alterações sutis em parâmetros hematológicos e bioquímicos, caracterizadas por tendência de diminuição de leucócitos e de aumento dos níveis de creatinina sérica nos animais tratados com a maior dose do extrato.
- ✓ O tratamento prolongado com o extrato permitiu a detecção de MC apenas no fígado.
- ✓ Tanto a MC-LR como o extrato promoveram aumento das taxas de apoptose em leucócitos de camundongo *in vitro*.

Referências

REFERÊNCIAS

- AMORIN, A.; VASCONCELOS, V. Dynamics of microcystin in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Toxicon**, v. 37, p. 1041-1052, 1999.
- APELDOORN, M. E.; EGMOND, H. P.; SPEIJERS, G. J. A.; BAKKER, G. J. I. Toxins of cyanobacteria. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, p. 7-60, 2007.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behavior**, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.
- AZEVEDO, S. M. F. O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L.; LAU, S.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru - Brazil. **Toxicology**, v. 181-182, p. 441-446, 2002.
- BELL, S. G.; CODD, G. A. Cyanobacterial toxins and human health. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 256-264, 1994.
- BENSON, J. M.; HUTT, J. A.; REIN, K.; BOGGS, S. E.; BARR, E. B.; FLEMING, L. E. The toxicity of microcystin LR in mice following 7 days of inhalation exposure. **Toxicon**, v. 45, n. 6, p. 691-698, 2005.
- BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Anxiolytic-like effects of NMDA /glycine-B receptor ligands are abolished during the elevated plus-maze Trial 2 in rats. **Psychopharmacology**, v. 170, n. 4, p. 335-342, 2003.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a *mcyB* molecular marker. **Harmful Algae**, v. 2, n. 1, p. 51-60, 2003.
- BORSINI, F.; PODHORNA, J.; MARAZZITI, D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? **Psychopharmacology**, v. 163, n. 2, p. 121-141, 2002.
- BOTHA, N.; GEHRINGER, M. M.; DOWNING, T. G.; VENTER, M.; SHEPARD, E. G. The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo2 cells. **Toxicon**, v. 43, n. 1, p. 85-92, 2004.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Meio Ambiente - CONAMA. Resolução nº 274. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 08 jan. 2001a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1467. Norma de qualidade da água para consumo humano. **Diário Oficial da União**, 39 p. Brasília, DF, 22 fev. 2001b.

BROADHURST, P. L. Experiments in psychogenetics. In: EYSENK, H. J. **Experiments in personality**. London: Routledge and Kegan Paul Press, 1960. p. 31-71.

BROOKS, W. P.; CODD, G. A. Distribution of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin and interactions with hepatic microsomes in mice. **Pharmacology and Toxicology**, v. 60, n. 3, p. 187-191, 1987.

CARBISS, C. R.; SIMONS, J. A.; MITCHELL, G. F.; ANDERSON, J. W.; MCCAULEY, I. A biochemical profile for predicting the chronic exposure of sheep to *Microcystis aeruginosa*, an hepatotoxic species of blue-green alga. **Research in Veterinary Science**, v. 57, n. 3, p. 310-316, 1994.

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

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

CAROBREZ, A. P. Glutamatergic neurotransmission as molecular target in anxiety. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, s. 2, p. 52-58, 2003.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1193-1205, 2005.

CAROBREZ, A. P.; TEIXEIRA, K. V.; GRAEFF, F. G. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 697-709, 2001.

CHEN, J.; SONG, L.; DAI, J.; GAN, N.; LIU, Z. Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). **Toxicon**, v. 43, n. 4, p. 393-400, 2004.

CHONG, M. W.; GU, K. D.; LAM, P. K.; YANG, M.; FONG, W. F. Study on the cytotoxicity of microcystin-LR on cultured cells. **Chemosphere**, v. 41, n. 1-2, p. 143-147, 2000.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management**, London: Spon Press, 1999. 416 p.

CLEMENT, Y.; PROESCHEL, M. F.; BONDOUX, D.; GIRAD, F.; LAUNAY, J. M.; CHAPOUTHIER, G. Genetic factors regulate processes related to anxiety in mice. **Brain Research**, v. 752, n. 1-2, p. 127-135, 1997.

CODD, G. A.; BELL, S. G. The occurrence and fate of blue-green algal toxins in freshwaters. **National Rivers Authority R and D Report 29**. London: Her Majesty's Stationery Office, 1996.

CODD, G. A.; METCALF, J. S.; BEATTIE, K. A. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. **Toxicon**, v. 37, n. 8, p. 1181-1185, 1999.

CRAIG, M.; LUU, H. A.; MCCREADY, T. L.; WILLIAMS, D.; ANDERSEN, R. J.; HOLMES, C. F. B. Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporin and microcystins with type-1 and type-2A protein phosphatases. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 74, n. 4, p. 569-578, 1996.

CREASIA, D. A. Acute inhalation toxicity of microcystin-LR with mice. **Toxicon**, v. 28, p. 605, 1990.

DAWSON, G. R.; TRICKLEBANK, M. D. Use of the elevated plus-maze in the search for novel anxiolytic agents. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 16, n. 2, p. 33-36, 1995.

DAWSON, R. M. The toxicology of microcystins. **Toxicon**, v. 36, n. 7, p. 953-962, 1998.

DIXON, R. L. Toxic responses of the reproductive system. In: HAYES, A.W. **Principles and Methods of Toxicology**. 2. ed. New York: Raven Press, 1989. p. 432.

DUY, T. N.; LAM, P. K. S.; SHAW, G. R.; CONNELL, D. W. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 163, p. 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. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 31, n. 3, p. 209-218, 1978.

ERHARD, M.; VON DÖHREN, H.; JUNGBLUT, P. Rapid identification of the new anabaenopeptin G from *Planktothrix agardhii* HUB 011 using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 13, n. 5, p. 337-343, 1999.

ERIKSSON, J. E.; GRÖNBERG, L.; NYGARD, S.; SLOTTE, J. P.; MERILUOTO, J. A. O. Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1025, n. 1, p. 60-66, 1990.

ERIKSSON, J. E.; PAATERO, G. L.; MERILUOTO, J. A.; CODD, G. A.; KASS, G. E.; NICOTERA, P.; ORRENIUS, S. Rapid microfilament reorganization induced in isolated rat hepatocytes by microcystin-LR, a cyclic peptide toxin. **Experimental Cell Research**, v. 185, n. 1, p. 86-100, 1989.

FADOCK, V. A.; VOELKER, D. R.; CAMPBELL, P. A.; COHEN, J. J.; BRATTON, D. L.; HENSON, P. M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **Journal of Immunology**, v. 148, n. 7, p. 2207-2216, 1992.

FALCONER, I. R. Is there a human health hazard from microcystins in the drinking water supply? **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, v. 33, n. 1, p. 64-71, 2005.

FALCONER, I. R.; BURCH, M. D.; STEFFENSEN, A. D.; CHOICE, M.; COVERDALE, B. R. Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 9, n. 2, p. 131-139, 1994.

FALCONER, I. R.; SMITH, J. V.; JACKSON, A. R. B.; JONES, A.; RUNNEGAR, M. T. C. Oral toxicity of a bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* administered to mice over periods of up to 1 year. **Journal of and Environmental Health**, v. 24, n. 3, p. 291-305, 1988.

- FALCONER, I. R.; YEUNG, D. S. Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by *Microcystis* toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins. **Chemico-Biological Interactions**, v. 81, n. 1-2, p. 181-196, 1992.
- FASTNER, J.; ERHARD, M.; VON DÖHREN, H. Determination of oligopeptide diversity within a natural population of *Microcystis spp.* (Cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 3-12, p. 5069-5076, 2001.
- FAWELL, J. K.; HART, J.; JAMES, H. A.; PARR, W. Blue-green algae and their toxins - analysis, toxicity, treatment and environmental control. **Water Supply**, v. 11, n. 3-4, p. 109-121, 1993.
- FAWELL, J. K.; MITCHELL, R. E.; EVERETT, D. J.; HILL, R. E. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I Microcystin-LR. **Human and Experimental Toxicology**, v. 18, n. 3, p. 162-167, 1999.
- FISCHER, W. J.; ALTHEIMER, S.; CATTORI, V.; MEIER, P. J.; DIETRICH, D. R.; HAGENBUCH, B. Organic ion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, n. 3, p. 257-263, 2005.
- FISCHER, W. J.; DIETRICH, D. R. Pathological and biochemical characterization of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 164, n. 1, p. 73-81, 2000.
- FITZGEORGE, R. B.; CLARK, S. A.; KEEVIL, C. W. Routes of intoxication. In: CODD, G. A.; JEFFERIES, T. M.; KEEVIL, C. W.; POTTER, E. **Detection methods for cyanobacterial toxins**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1994. p. 69-74.
- FRANGEZ, R.; ZUZEK, M. C.; MRKUN, J.; SUPUT, D.; SEDMAK, B.; KOSEC, M. Microcystin-LR affects cytoskeleton and morphology of rabbit primary whole embryo cultured cells in vitro. **Toxicon**, v. 41, n. 8, p. 999-1005, 2003.
- FUJII, K.; MAYUMI, T.; NOGUCHI, K.; KASHIWAGI, T.; SATO, A.; SIVONEN, K.; HIRAYAMA, K.; HARADA, K-I. Mass spectrometric studies of peptides from cyanobacteria under FAB MS/MS conditions. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 48, n. 1, p. 56-64, 2000.

- FUJII, K.; SIVONEN, K.; ADACHI, K.; NOGUCHI, K.; SANO, H.; HIRAYAMA, K.; SUZUKI, M.; HARADA, K-I. Comparative study of toxic and non-toxic cyanobacterial products: novel peptides from toxic *Nodularia spumigena* AV1. **Tetrahedron Letters**, v. 38, n. 31, p. 5525-5528, 1997.
- FUJII, K.; SIVONEN, K.; NAKANO, T.; HARADA, K-I. Structural elucidation of cyanobacterial peptides encoded by peptide synthetase gene in *Anabaena* species. **Tetrahedron**, v. 58, n. 34, p. 6863-6871, 2002.
- GERSHENFELD, H. K.; PAUL, S. M. Mapping quantitative trait loci for fear-like behaviors in mice. **Genomics**, v. 46, n. 1, p. 1-8, 1997.
- GKELIS, S.; HARJUNPÄÄ, V.; LANARAS, T.; SIVONEN, K. Diversity of hepatotoxic microcystins and bioactive anabaenopeptins in cyanobacterial blooms from Greek freshwaters. **Environmental Toxicology**, v. 20, n. 3, p. 249-56, 2005.
- GKELIS, S.; LANARAS, T.; SIVONEN, K. The presence of microcystins and other cyanobacterial bioactive peptides in aquatic fauna collected from Greek freshwaters. **Aquatic Toxicology**, v. 78, n. 1, p. 32-41, 2006.
- GONÇALVES, E. A. P.; DALBONI, M. A.; PERES, A. T.; MANFREDI, A. P.; MANFREDI, S. R.; AZEVEDO, S. M.; MAGALHÃES, V.F.; DRAIBE, S.; CANZIANI, M. E. F.; CENDOROGLO, M. Effect of microcystin on leukocyte viability and function. **Toxicon**, v. 47, n. 7, p. 774-779, 2006.
- GORHAM, P.R. Toxic algae. In: JACKSON, D. F. **Algae and man**. New York: Plenum Publishing Corp., 1964. p. 307-336.
- GORMAN, J. M. New molecular targets for antianxiety interventions. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 64, s. 3, p. 28-35, 2003.
- GRACH-PROGREBINSKI, O.; SEDMAK, B.; CARMELI, S. Protease inhibitors from a Slovenian lake Bled toxic waterbloom of cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. **Tetrahedron**, v. 59, n. 42, p. 8329-8336, 2003.
- GRIEBEL, G. Is there a future for neuropeptide receptor ligands in the treatment of anxiety disorders? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 82, n. 1, p. 1-61, 1999.

GUPTA, N.; PANT, S. C.; VIJAYARAGHAVAN, R.; RAO, P. V. L. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. **Toxicology**, v. 188, n. 2-3, p. 285-296, 2003.

GUZMAN, R. E.; SOLTER, P. F. Characterization of sublethal microcystin-LR exposure in mice. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 1, p. 17-26, 2002.

HARADA, K.; FUJII, K.; SHIMADA, T.; SUZUKI, M.; SANO, H.; ADACHI, K.; CARMICHAEL, W. W. Two cyclic peptides, anabaenopeptins, a third group of bioactive compounds from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 9, p. 1511-1514, 1995.

HARADA, K-I. Production of secondary metabolites by freshwater cyanobacteria. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 8, p. 889-899, 2004.

HERMANSKY, S. J.; STOHS, S. J.; ELDEEN, Z. M.; ROCHE, V. F.; MEREISH, K. A. Evaluation of potential chemoprotectants against microcystin-LR hepatotoxicity in mice. **Journal of Applied Toxicology**, v. 11, n. 1, p. 65-73, 1991.

HERNÁNDEZ, M.; MACIA, M.; PADILLA, C.; CAMPO, F. F. D. Modulation of human polymorphonuclear leukocyte adherence by cyanopeptide toxins. **Environmental Research Section A**, v. 84, n. 1, p. 64-68, 2000.

HOOD, S. D.; ARGYROPOULOS, S. V.; NUTT, D. J. New directions in the treatment of anxiety disorders. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 13, n. 4, p. 401-423, 2003.

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. **Veterinary Pathology**, v. 26, n. 3, p. 246-252, 1989.

HOOSER, S. B.; BEASLEY, V. R.; WAITE, L. L.; KUHLENSCHMIDT, M. S.; CARMICHAEL, W. W.; HASCHEK, W. M. Actin filament alterations in rat hepatocytes induced in vivo and in vitro by microcystin-LR, a hepatotoxin from the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. **Veterinary Pathology**, v. 28, n. 4, p. 259-266, 1991.

HRUDEY, S.E.; LAMBERT, T.W.; KENEFICK, S.L. Health risk assessment of microcystins in drinking water supplies. In: _____. **Toxic cyanobacteria - a global perspective**. Adelaide: Australian Centre for Water Quality Research, 1994. p. 7-12.

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

ITO, E.; KONDO, F.; HARADA, K-I. Intratracheal administration of microcystin-LR, and its distribution. **Toxicon**, v. 39, n. 2-3, p. 265-271, 2001.

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

ITO, E.; TAKAI, A.; KONDO, F.; MASUI, H.; IMANISHI, S.; HARADA, K. Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compounds. **Toxicon**, v. 40, n. 7, p. 1017-1025, 2002.

JACKSON, A. R. B.; MCINNES, A.; FALCONER, I. R.; RUNNEGAR, M. T. C. Clinical and pathological changes in sheep experimentally poisoned by the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Veterinary Pathology**, v. 21, n. 1, p. 102-113, 1984.

JOCHIMSEN, E. M.; CARMICHAEL, W. W.; AN, J.; CARDO, D. D.; COOKSON, S. T.; HOLMES, C. E. M.; ANTUNES, M. M. C.; MELO FILHO, D. A.; LYRA, T. M.; BARRETO, V. S.; AZEVEDO, S. M.; JARVIS, W. R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 13, p. 873-878, 1998.

KENT, J. M.; MATHEW, S. J.; GORMAN, J. M. Molecular targets in the treatment of anxiety. **Biological Psychiatry**, v. 52, n. 10, p. 1008-1030, 2002.

KHAN, S. A.; GHOSH, S.; WICKSTROM, M.; MILLER, L. A.; HESS, R.; HASCHEK, W. M.; BEASLEY, V. R. Comparative pathology of microcystin-LR in cultured hepatocytes, fibroblasts, and renal epithelial cells. **Natural Toxins**, v. 3, n. 3, p. 119-128, 1995.

KODANI, S.; SUZUKI, S.; ISHIDA, K.; MURAKAMI, M. Five new cyanobacterial peptides from water bloom materials of Lake Teganuma (Japan). **FEMS Microbiology Letters**, v. 178, n. 2, p. 343-348, 1999.

KONDO, F.; IKAI, Y.; OKA, H.; OKUMURA, M.; ISHIKAWA, N.; HARADA, K-I; MATSUURA, K.; MURATA, H.; SUZUKI, M. Formation, characterization and toxicity of the

glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. **Chemical Research in Toxicology**, v. 5, n. 5, p. 591-596, 1992.

KONDO, F.; MATSUMOTO, H.; YAMADA, S.; ISHIKAWA, N.; ITO, E.; NAGATA, S.; UENO, Y.; SUZUKI, M.; HARADA, K-I. Detection and identification of metabolites of microcystins formed *in vivo* in mouse and rat livers. **Chemical Research in Toxicology**, v. 9, n. 8, p. 1355-1359, 1996.

KOTAK, B. G.; SEMALULU, S.; FRITZ, D. L.; PREPAS, E. E.; HRUDEY, S. E.; COPPOK, R. W. Hepatic and renal pathology of intraperitoneally administered microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicon**, v. 34, n. 5, p. 517-525, 1996.

KUIPER-GOODMAN, T.; GUPTA, S.; CAOMBLEY, H.; THOMAS, B. H. Microcystins in drinking water: risk assessment and derivation of a possible guidance value for drinking water. Adelaide, In: PROCEEDING OF TOXIC CYANOBACTERIA: CURRENT STATUS OF RESEARCH AND MANAGEMENT, 1994. Adelaide: Australian Centre for Water Quality Research. p. 67-73.

KUJBIDA, P.; HATANAKA, E.; CAMPA, A.; COLEPICCOLO, P.; PINTO, E. Effects of microcystins on human polymorphonuclear leukocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 341, n. 1, p. 273-277, 2006.

KULLAK-UBLICK, G. A.; HAGENBUCH, B.; STIEGER, B.; SCHTEINGART, C. D.; HOFMANN, A. F.; WOLKOFF, A. W.; MEIER, P. J. Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. **Gastroenterology**, v. 109, n. 4, p. 1274-1282, 1995.

LAWTON, L. A.; EDWARDS, C. Purification of microcystins. **Journal of Chromatography A**, v. 912, n. 2, p. 191-209, 2001.

LIN, J-R; CHU, F. S. In vitro neutralization of the inhibitory effect of microcystin-LR to protein phosphatase 2A by antibody against the toxin. **Toxicon**, v. 32, n. 5, p. 605-613, 1994.

LIPKIND, D.; SAKOV, A.; KAFKAFI, N.; ELMER, G. I.; BENJAMINI, Y.; GOLANI, I. New replicable anxiety-related measures of wall vs. center behavior of mice in the open field. **Journal of Applied Physiology**, v. 97, n. 1, p. 347-359, 2004.

- LORA, J.; ALONSO, F. J.; SEGURA, J. A.; LOBO, C.; MÁRQUEZ, J.; MATÉS, J. M. Antisense glutaminase inhibition decreases glutathione antioxidant capacity and increases apoptosis in Ehrlich ascitic tumour cells. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 21, p. 4298-4306, 2004.
- 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**, v. 264, n. 2, p. 187-192, 1990.
- MACKINTOSH, R. W.; DALBY, K. N.; CAMPBELL, D. G.; COHER, P. T. W.; COHEN, P.; MACKINTOSH, C. The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. **FEBS Letters**, v. 371, n. 3, p. 236-240, 1995.
- MAIDANA, M.; CARLIS, V.; GALHARDI, F. G.; YUNES, J. S.; GERACITANO, L. A.; MONSERRAT, J. M.; BARROS, D. M. Effects of microcystins over short- and long-term memory and oxidative stress generation in hippocampus of rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 159, n. 3, p. 223-234, 2006.
- MANKIEWICZ, J.; TARCZYNSKA, M.; FLADMARK, K. E.; DOSKELAND, S. O.; WALTER, Z.; ZALEWSKI, M. Apoptotic effect of cyanobacterial extract on rat hepatocytes and human lymphocytes. **Environmental Toxicology**, v. 16, n. 3, p. 225-233, 2001.
- MANKIEWICZ, J.; WALTER, Z.; TARCZYNSKA, M.; PALYVODA, O.; WOJTYSIAK-STANIASZCZYK, M.; ZALEWSKI, M. Genotoxicity of cyanobacterial extracts containing microcystins from Polish water reservoirs as determined by SOS chromotest and comet assay. **Environmental Toxicology**, v. 17, n. 4, p. 341-350, 2002.
- MCDERMOTT, C. M.; NHO, C. W.; HOWARD, W.; HOLTON, B. The cyanobacterial toxin microcystin-LR can induce apoptosis in a variety of cell types. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1981-1996, 1998.
- MENARD, J.; TREIT, D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 4, p. 591-613, 1999.
- MERILUOTO, J. A. O.; NIGARD, S. E.; DAHLEM, A. M.; ERIKSSON, J. E. Synthesis, organotropism and hepatocellular uptake of two tritium-labeled epimers of dihydromicrocystin-LR, a cyanobacterial peptide toxin analog. **Toxicon**, v. 28, n. 12, p. 1439-1446, 1990.

MERILUOTO, J. A. O.; SANDSTRÖM, A.; ERIKSSON, J. E.; REMAUD, G.; GREY, C. A.; CHATTOPADHYAYA, J. Structure and toxicity of a peptide hepatotoxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. **Toxicon**, v. 27, n. 9, p. 1021-1034, 1989.

METCALF, J. S.; BEATTIE, K. A.; PFLUGMACHER, S.; CODD, G. A. Immuno-crossreactivity and toxicity assessment of conjugation products of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 189, n. 2, p. 155-158, 2000.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Medicina de laboratório veterinária: interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Roca, 1995, 308 p.

MIKHAILOV, A.; HÄRMÄLÄ-BRASKÉN, A. S.; HELLMAN, J.; MERILUOTO, J.; ERIKSSON, J. E. Identification of ATP-synthase as a novel intracellular target for microcystin-LR. **Chemico-Biological Interactions**, v. 142, n. 3, p. 223-237, 2003.

MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. **Progress in Neurobiology**, v. 70, n. 2, p. 83-244, 2003.

MILNER, B.; SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. Cognitive neuroscience and the study of memory. **Neuron**, v. 20, n. 3, p. 445-468, 1998.

MILUTINOVIC, A.; ZIVIN, M.; ZORC-PLESKOVIC, R.; SEDMAK, B.; SUPUT, D. Nephrotoxic effects of chronic administration of microcystins -LR and -YR. **Toxicon**, v. 42, n. 3, p. 281-288, 2003.

MIURA, G. A.; ROBINSON, N. A.; LAWRENCE, W. B.; PACE, J. G. Hepatotoxicity of microcystin-LR in fed and fasted rats. **Toxicon**, v. 29, n. 3, p. 337-346, 1991.

MORRISON, L. F.; PARKIN, G.; CODD, G. A. Optimization of anabaenopeptin extraction from cyanobacteria and the effect of methanol on laboratory manipulation. **Peptides**, v. 27, n. 1, p. 10-17, 2006.

MOSER, P. C. An evaluation of the elevated plus-maze test using the novel anxiolytic buspirone. **Psychopharmacology**, v. 99, n. 1, p. 48-53, 1989.

MULKEY, R. M.; HERRON, C. E.; MALENKA, R. C. An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. **Science**, v. 261, p. 1051-1055, 1993.

- NAKANO, M.; NAKANO, Y.; SAITO-TAKI, T.; MORI, N.; KOJIMA, M.; OHTAKE, A.; SHIRAI, M. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* K-139 strain. **Microbiology and Immunology**, v. 33, n. 9, p. 787-792, 1989.
- NAKANO, Y.; SHIRAI, M.; MORI, N.; NAKANO, M. Neutralization of microcystin shock in mice by tumor factor alpha antiserum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 327-330, 1991.
- NAMIKOSHI, M.; RINEHART, K. L. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 5-6, p. 373-384, 1996.
- 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**, v. 83, p. 283-289, 1994.
- NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R.; OHTA, T.; NISHIWAKI, S.; SUGANUMA, M.; KOHYAMA, K.; ISHIKAWA, T.; CARMICHAEL, W. W.; FUJIKI, H. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 118, n. 6, p. 420-424, 1992.
- NOBRE, A. C. L.; COÊLHO, G. R.; COUTINHO, M. C. M.; SILVA, M. M. M.; ANGELIM, E. V.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. The role of phospholipase A2 and cyclooxygenase in renal toxicity induced by microcystin-LR. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 721-724, 2001.
- NOLDUS INFORMATION TECHNOLOGY. **EthoVision: video tracking, motion analysis & behavior recognition system**. Reference Manual. Wageningen, 1997.
- OP DEN KAMP, J. A. F. Lipid asymmetry in membranes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 48, p. 47-71, 1979.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.
- POURIA, S.; ANDRADE, A.; BARBOSA, J.; CAVALCANTI, R. L.; BARRETO, V. T. S.; WARD, C. J.; PREISER, W.; POON, G. K.; NEILD, G. H.; CODD, G. A. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **The Lancet**, v. 352, p. 21-26, 1998.

RAO, P. V. L.; GUPTA, N.; JAYARAJ, R.; BHASKAR, A. S. B.; JATAV, P. C. Age-dependent effects on biochemical variables and toxicity induced by cyclic peptide toxin microcystin-LR in mice. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 140, n. 1, p. 11-19, 2005.

RAO, P. V. L.; JAYARAJ, R.; BHASKAR, A. S. B. Protective efficacy and the recovery profile of certain chemoprotectants against lethal poisoning by microcystin-LR in mice. **Toxicon**, v. 44, n. 7, p. 723-730, 2004.

RESSOM, R.; SOONG, F. S.; FITZGERALD, J. **Health effects of toxic cyanobacteria (blue-green algae)**. Australian National Health and Medical Research Council, Canberra: Looking glass press 1994, 108 p.

ROBINSON, N. A.; MIURA, G. A.; MATSON, C. F.; DINTERMAN, R. F.; PACE, J. G. Characterization of chemically tritiated microcystin-LR and its distribution in mice. **Toxicon**, v. 27, n. 9, p. 1035-1042, 1989.

ROBINSON, N. A.; PACE, J. G.; MATSON, C. F.; MIURA, G. A.; LAWRENCE, W. B. Tissue distribution, excretion and hepatic biotransformation of microcystin-LR in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 256, n. 1, p. 176-182, 1991.

RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 3, p. 289-304, 1997.

RUNNEGAR, M.; BERNDT, N.; KONG, S-M.; LEE, E. Y. C.; ZHANG, L. *In vivo* and *in vitro* binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 216, n. 1, p. 162-169, 1995.

RUNNEGAR, M. T. C.; ANDREWS, J.; GERDES, R. G.; FALCONER, I. R. Injury to hepatocytes induced by a peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon**, v. 25, n. 11, p. 1235-1239, 1987.

RUNNEGAR, M. T. C.; FALCONER, I. R. Effect of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructure morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. **Toxicon**, v. 24, n. 2, p. 109-115, 1986.

- RUNNEGAR, M. T. C.; FALCONER, I. R.; BUCKLEY, T.; JACKSON, A. R. B. Lethal potency and tissue distribution of ¹²⁵I-labelled toxic peptides from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon**, v. 24, n. 5, p. 506-509, 1986.
- RUNNEGAR, M. T. C.; GERDES, R. G.; FALCONER, I. R. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. **Toxicon**, v. 29, n. 1, p. 43-51, 1991.
- SANO, T.; KAYA, K. Oscillamide Y, a chymotrypsin inhibitor from toxic *Oscillatoria agardhii*. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 33, p. 5933-5936, 1995.
- SANO, T.; USUI, T.; UEDA, K.; OSADA, H.; KAYA, K. Isolation of new protein phosphatase inhibitors from two cyanobacteria species, *Planktothrix* spp. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 8, p. 1052-1055, 2001.
- SHEN, P. P.; ZHAO, S. W.; ZHENG, W. J.; HUA, Z. C.; SHI, Q.; LIU, Z. T. Effects of cyanobacteria bloom extract on some parameters of immune function in mice. **Toxicology Letters**, v. 143, n. 1, p. 27-36, 2003.
- SIMON, P.; DUPUIS, R.; COSTENTIN, J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmission. **Behavioral Brain Research**, v. 61, n. 1, p. 59-64, 1994.
- SKULBERG; O. M.; CARMICHAEL, W. W.; CODD, G. A.; SKULBERG, R. Taxonomy of toxic Cyanophyceae (cyanobacteria). In: FALCONER, I.R. **Algal toxins in seafood and drinking water**. London: Academic Press, 1993. p. 145-164.
- SOLTER, P. F.; WOLLENBERG, G. K.; HUANG, X.; CHU, F. S.; RUNNEGAR, M. T. Prolonged sublethal exposure to the protein phosphatase inhibitor microcystin-LR results in multiple dose-dependent hepatotoxic effects. **Toxicological Sciences**, v. 44, n. 1, p. 87-96, 1998.
- STOTTS, R. R.; TWARDOCK, A. R.; HASCHEK, W. M.; CHOI, B. W.; RINEHART, K. L.; BEASLEY, V. R. Distribution of tritiated dihydromicrocystin in swine. **Toxicon**, v. 35, n. 6, p. 937-953, 1997.
- TAKAHASHI, S.; KAYA, K. Quail spleen is enlarged by microcystin RR as a blue-green algal hepatotoxin. **Natural Toxins**, v. 1, n. 5, p. 283-285, 1993.

TREIT, D.; FUNDYTUS, M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 31, n. 4, p. 959-962, 1988.

UENO, Y.; MAKITA, Y.; NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; YOSHIDA, F.; TAMURA, S.-I.; SEKIJIMA, M.; TASHIRO, F.; HARADA, T.; YOSHIDA, T. No chronic oral toxicity of a low dose of microcystin-LR, a cyanobacterial hepatotoxin, in female BALB/c mice. **Environmental Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 45-55, 1999.

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, edemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 6, p. 1317-1321, 1996.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Health effects test guidelines OPPTS 870.1100 – Acute oral toxicity**. 2002, 35 p.

VAN DER WESTHUIZEN, A. J.; ELOFF, J. N. Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Planta**, v. 163, n. 1, p. 55-59, 1985.

VASWANI, M.; LINDA, F.K.; RAMESH, S. Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 27, n. 1, p. 85-102, 2003.

YEA, S. S.; KIM, H. M.; OH, H. M.; PAIK, K. M.; YANG, K. H. Microcystin-induced down-regulation of lymphocyte functions through reduced IL-2 mRNA stability. **Toxicology Letters**, v. 122, n. 1, p. 21-31, 2001.

YOO, R. S.; CARMICHAEL, W. W.; HOEHN, R. C.; HRUDEY, S. E. **Cyanobacterial (blue-green algal) toxins: a resource guide # 925**. Denver: AWWA Research Foundation and American Water Works Association, 1995.

YOSHIDA, T.; MAKITA, Y.; NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; YOSHIDA, F.; SEKIJIMA, M.; TAMURA, S.-I.; UENO, Y. Acute oral toxicity of microcystin-LR, a cyanobacterial hepatotoxin, in mice. **Natural Toxins**, v. 5, n. 3, p. 91-95, 1997.

YU, S. Z. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, n. 6, p. 674-682, 1995.

YU, S. Z.; CHEN, G. Blue-green algae toxins and liver cancer. **Chinese Journal of Cancer Research**, v. 6, n. 1, p. 9-17, 1994.

YUAN, M.; CARMICHAEL, W. W.; HILBORN, E. D. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996. **Toxicon**, v. 48, n. 6, p. 627-640, 2006.

ZENICK, H.; CLEGG, E. D. Assessment of the male reproductive toxicity: a risk assessment approach. In: HAYES, A. W. **Principles and methods of toxicology**. 2. ed. New York: Raven Press, 1989. p. 275.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: a critical review. **Psychological Bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.

WANNEMACHER, R. W. **Chemical stability and laboratory safety of naturally occurring toxins**. Fort Detrick, Frederick: US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, 1989.

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

WATANABE, M. F.; OISHI, S. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. **Applied Environmental Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1342-1344, 1985.

WEISS, B.; CORY-SLECHTA, D. A. Assessment of Behavioral Toxicity. In: HAYES, A. W. **Principles and methods of toxicology**. 4. ed. Philadelphia: Taylor & Francis, 2001. p. 1451-1528.

WELKER, M.; BRUNKE, M.; PREUSSEL, K.; LIPPERT, I.; VON DÖHREN, H. Diversity and distribution of *Microcystis* (Cyanobacteria) oligopeptide chemotypes from natural communities studied by single-colony mass spectrometry. **Microbiology**, v. 150, p. 1785-1796, 2004.

WELKER, M.; MARSALEK, B.; SEJNOHOVA, L.; VON DÖHREN, H. Detection of oligopeptides in *Microcystis* (cyanobacteria) colonies: toward an understanding of metabolic diversity. **Peptides**, v. 27, n. 9, p. 2090-2103, 2006.

WICKSTROM, M. L.; KHAN, S. A.; HASCHEK, W. M.; WYMAN, J. F.; ERIKSSON, J. E.; SCHAEFFER, D.; BEASLEY, V. R. Alterations in microtubules, intermediate filaments, and microfilaments induced by microcystin-LR in cultured cells. **Toxicologic Pathology**, v. 23, n. 3, p. 326-337, 1995.

WILLIAMS, D. E.; CRAIG, M.; DAWE, S. C.; KENT, M. L.; ANDERSON, R. J.; HOLMES, C. F. B. ¹⁴C-labelled microcystin-LR administered to Atlantic salmon via intraperitoneal injection provides *in vivo* evidence for covalent binding of microcystin-LR in salmon livers. **Toxicon**, v. 35, n. 6, p. 985-989, 1997.

WHO (World Health Organization). **Guidelines for drinking-water quality**. 2. ed. Geneva: WHO, 1998. p. 83-97. Disponível em: < <http://www.who.int/water...vol2a.pdf> >. Acesso em: 04 set. 2007.