UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Efeitos das microcistinas sobre funções de neutrófilos

Paula da Silva Kujbida

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Ernani Pinto

Co-Orientadora:
Profa. Dra. Elaine Hatanaka

São Paulo
2008

Paula da Silva Kujbida

Efeitos das microcistinas sobre funções de neutrófilos

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Ernani Pinto
orientador/presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

_____
3º. examinador

_____
4º. examinador

São Paulo, 9 de Janeiro de2009.

"Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado, mas nada pode ser modificado até que seja enfrentado".

(Albert Einstein)

"Tu és fiel Senhor

Meu Pai Celeste pleno poder
aos Teus filhos darás
nunca Mudaste, Tu nunca Faltaste
tal como Eras Tu sempre Seras.

Tu és fiel Senhor
Tu és fiel senhor
dia apos dia com bençãos sem fim.
Tua merce me sustenta e me guarda.
Tu és Fiel Senhor,Fiel a mim.

Flores e frutos
montanhas e mares
sol, lua, estrela no ceu a brilhar
tudo Criaste na terra e no ares
todo o universo vem pois Te louvar

Tu és fiel Senhor
Tu és fiel senhor
dia apos dia com bençãos sem fim.
Tua merce me sustenta e me guarda.
Tu és Fiel Senhor,Fiel a mim.

Pleno perdao Tu dás,
Paz, segurança
Cada momento me guias Senhor
E no porvir
Oh que doce esperança
Desfrutarei do Teu rico favor."

(Thomas Obediah Chiholm)

Dedico esse trabalho às pessoas mais importantes na minha vida...

À **Deus**, por me iluminar sempre em todos os momentos, e me permitir sentir a Sua presença em tudo o que eu faço.

Aos meus amados pais, **Francisco e Edite**, por terem me ensinado a persistir pelos meus sonhos, e por terem me auxiliado com carinho a conquistar mais esse.

Ao meu querido marido, **Cláudio**, por ter sido companheiro, dedicando a mim muita paciência e amor durante toda a realização desse trabalho.

Ao meu irmão, **Juninho**, pelo incentivo e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador **Prof. Dr. Ernani Pinto**, por todo o incentivo e enriquecimento proporcionado em mais essa etapa da minha vida acadêmica. Sua amizade, paciência, sabedoria e confiança no meu trabalho ficarão sempre registradas em minha memória.

À minha co-orientadora **Profa. Dra. Elaine Hatanaka**, pela ajuda em todos os protocolos, discussões dos resultados e correção da tese. Agradeço também pela amizade sempre presente.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (**FAPESP**), por ter me concedido uma bolsa de estudos e auxílio pesquisa, o que possibilitou minha dedicação exclusiva na concretização desse projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), por ter me concedido suporte financeiro, o que possibilitou a realização de um valioso estágio na Universidade de Jena, Alemanha.

À querida **Profa. Dra. Ana Campa** pela ajuda inicial, o comprometimento com o meu trabalho e sua amizade tão valiosa.

Ao querido **Prof. Dr. Rui Curi**, pelas contribuições imprescindíveis, carinho e oportunidade de trabalhar num ambiente tão acolhedor como seu laboratório.

À querida **Profa. Dra Sandra Helena Poliselli Farsky**, pelo comprometimento constante com o meu trabalho e sugestões desde o mestrado, sempre regado com sinceridade e amizade. Agradeço também pela colaboração de todas as suas doces alunas **Dani Maia**, **Kaline Waismam** e **Cris Hebeda**, a qual foi imprescindível para realização de parte dos experimentos.

À Profa. **Dra. Lígia Ferreira Gomes** que muito me auxiliou no isolamento das células hepáticas. Seu incentivo também muito contribuiu nos momentos difíceis.

Ao querido **Prof. Pio Colepicolo**, pela preciosa ajuda no mestrado, a qual eu nunca me esquecerei. Ter trabalhado em seu laboratório me proporcionou amadurecimento científico, o qual muito me ajudou no desenvolvimento da tese de doutorado. Agradeço também a suas sempre alunas, já doutoras no momento, Ana, Karina, Thais, Adriana, Ângela e Vanessa. Além do técnico Ed, é claro.

A todos os **docentes do Programa de Pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas** por não serem apenas mestres, mas amigos que me guiam pelo exemplo de amor à profissão de educadores e pesquisadores.

Ao **Prof. Dr. Bernd Luckas** e **Profa. Dra. Beatrice L. Pool-Zobel** (in *memorian*) pela oportunidade de estagiar em seus respectivos laboratórios na Universidade de Jena, na Alemanha. Agradeço também a secretária **Elena Winter** e as alunas **Adrienne Schön** e **Nina Habermann** pela ajuda constante e preciosa amizade.

A todos os amigos do grupo de pesquisa do Prof. Ernani Pinto: Fabiana (Pós-Doc); Fabyana, Felipe, Sidnei, Stella, Vanessa, Vania (Doutorado); Vinícius (Mestrado); Ariane, Mariah, Regiane e Sara (IC) e aos ex-alunos Humberto, Meron e Raphael; pelo companheirismo sempre presente.

A querida amiga **Juliana Antunes Galvão** (ESALQ), pela colaboração com o envio das amostras de peixe e água a Alemanha e principalmente pela doce amizade.

A **Profa. Dra. Ivaneide Soares** (UFRN) pela colaboração no envio de amostras à Universidade de Jena.

Aos **amigos e funcionários do bloco 13B**, pela amizade, convivência harmoniosa e pela colaboração valiosa.

À **Profa. Dra. Helenice Spinosa**, **Profa. Dra Karin Argenti** e **Profa. Dra Paulina Sannomiya** pela leitura, comentários e sugestões apresentados no exame de qualificação.

A minha querida amiga “mineirinha” **Sarinha**, pelos 10 anos de alegre amizade e companheirismo e pela paciência, orações e conforto nos momentos de angústias, indecisões e incertezas.

À querida **Aninha**, também amiga sempre presente e sincera. Companheira importante durante toda a pós graduação.

Aos queridos tios, tias, primos e priminhas pelas orações e carinho sempre presentes.

E a todas as pessoas que apesar de eu não ter citado, direta ou indiretamente, contribuíram para que fosse possível a realização desse trabalho.

Efeitos das microcistinas sobre funções de neutrófilos

RESUMO

Microcistinas (MCs) são heptapeptídeos cíclicos produzidos por cianobactérias e possuem potente hepatotoxicidade e atividade promotora de tumor. Em intoxicações agudas induzidas por MCs ocorre infiltração leucocitária no foco inflamatório. Embora os mecanismos de hepatotoxicidade não são claros, o recrutamento de neutrófilos no fígado pode contribuir ao dano tecidual e desenvolvimento tumoral causados por xenobióticos. O objetivo dessa tese foi investigar os efeitos de três estruturalmente distintas MCs (MC-LA, MC-YR e MC-LR) nas seguintes funções de neutrófilos: síntese e expressão de moléculas de adesão, rolamento, adesão, migração e liberação de citocinas e de ROS. Nos ensaios de migração em bolsa de ar, as três MCs induziram similarmente a migração de leucócitos *in vivo* em tecido subcutâneo de ratos e diferencialmente a secreção de citocinas pró-inflamatórias (CINC, IL-1β, TNF-α, VEGF-α e MIP) no exsudato. Concentrações elevadas de CINC-2αβ foram encontradas nos exsudatos inflamatórios de animais após injeção de MC-LA, MC-LR ou MC-YR. MIP-2 elevou-se apenas em exsudatos de animais expostos a MC-LR. Não foram observadas alterações em secreção de IL-1β, TNF-α e VEGF-α. Estudos de microscopia intravital mostraram que apenas a aplicação tópica de MC-LR reforçou o rolamento e a adesão de leucócitos no endotélio de vênulas mesentéricas pós-capilares. Esses últimos resultados podem ser dependentes de aumento e expressão da síntese da L-selectina e β2-integrina nos neutrófilos, tal como avaliado por FACS e PCR-RT, respectivamente. Adicionalmente, em ensaios em câmara de Boyden *in vitro,* as três MCs promoveram locomoção direta de neutrófilos e aumentaram a migração dessas células em resposta ao fMLP, além do aumento de cálcio intracelular observado por microscopia confocal. Os efeitos das MC-LA, MC-YR e MC-LR em neutrófilos humanos e de ratos tiveram o mesmo padrão de resposta. A análise de viabilidade celular, fragmentação de DNA, despolarização de membrana mitocondrial e liberação de ROS intracelulares foram avaliadas pela técnica de FACS. A concentração de ROS extracelular foi medida por quimiluminescência amplificada por lucigenina. A produção de citocinas em células tratadas foram determinadas por ELISA. Observamos aumento da liberação de IL-8, CINC-2αβ e da concentração de ROS extracelular por neutrófilos humanos e de ratos pela exposição dessas células com as MCs. Os resultados aqui obtidos mostram o efeito pró-inflamatório direto das MC-LA, MC-YR e MC-LR. A possibilidade de os neutrófilos migrarem e responderem localmente a MCs contribui para a toxicidade destas toxinas

Palavras chave: microcistinas, neutrófilos, migração, espécies reativas de oxigênio, moléculas de adesão.

Effects of microcystins on functions of neutrophils

ABSTRACT

Microcystins (MCs) are a family of heptapeptide toxins produced by some genera of Cyanobacteria. MCs have potent hepatotoxicity and tumor-promoting activity. Leukocyte infiltration in the liver was observed in MC-induced acute intoxication. Although the mechanisms of hepatotoxicity induced by MCs are still unclear, neutrophil infiltration in the liver may play an important role in triggering toxic injury and tumor development. The purpose of this thesis was to investigate the effects of three structurally distinct MCs (MC-LA, MC-YR and MC-LR) in the neutrophil' functions: synthesis and expression of adhesion molecules, rolling, adhesion, migration and release of cytokines and ROS. In migration assays of the air pouch, the three MCs similarly induced the migration of leukocytes *in vivo* in subcutaneous tissue of rats and differentially the secretion of pro-inflammatory cytokines (CINC-2αβ, IL-1β, TNF-α, VEGF-α and MIP-2) in exudates. Elevated concentrations of CINC-2αβ were found in the inflamed exudates from animals injected with MC-LA, MC-LR or MC-YR, although MIP-2 was only detected in the exudates from animals injected with MC-LR. There were no changes in the secretion of IL-1β, TNF-α and VEGF-α. Intravital microscopic studies showed that topical application of MC-LR enhanced the numbers of rolling and adhered leukocytes in the endothelium of postcapillary mesenteric venules. The latter effects may be dependent upon induction of the synthesis and expression of L-selectin and β2-integrin in neutrophils, as assessed by flow cytometry and RT-PCR, respectively. Conversely, the three toxins promoted direct locomotion of neutrophils and enhanced their migration in response to fMLP, as measured by Boyden chamber assays, and increased intracellular calcium, a messenger in the chemotaxic process. The effects of MC-LA, MC-YR and MC-LR in human neutrophils and mice had the same pattern of response. The analyses of cell viability, DNA fragmentation, mitochondrial membrane depolarization of and release of intracellular ROS were evaluated by the technique of FACS. Extracellular ROS content was measured by lucigenin-amplified chemiluminescence, and cytokines were determined by ELISA. We found that these MCs increased interleukin-8 (IL-8), cytokine-induced neutrophil chemoattractant-2αβ (CINC-2αβ) and extracellular ROS levels in human and rat neutrophils. In conclusion, our results showed that MCs act on specific pathways of neutrophil recruitment, indicating their potential effect on neutrophils activation. This process can significantly contribute to the pathogenesis of hepatic damage due to generation of ROS by neutrophils as well as act on hepatocytes under such conditions and potentially increase injury processes induced by MCs.

Key words: microcystins, neutrophils, migration, reactive oxygen species, molecules of adhesion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura molecular geral das MCs. Resíduos dos aminoácidos específicos (R_1 e R_2) das diferentes variantes de MCs (LA, YR e LR).....29

Figura 2. Representação esquemática das interações entre MC-LR e o sítio catalítico da proteína fosfatase-1 (PP-1).....32

Figura 3. Interações celulares e moleculares durante migração de neutrófilos.....38

Figura 4. Mecanismos propostos de dano hepático mediado por neutrófilos.....39

Figura 5. Esquema da formação de ânions superóxido pela NADPH oxidase e da desgranulação com liberação de mieloperoxidase e protases.....41

Figura 6. Influxo de neutrófilos em cavidade de bolsa de ar de ratos, 4 horas após injeção de veículo, fMLP (10 nM), MC-LA, MC-YR or MC-LR (1000 nM).....62

Figura 7. Concentrações determinadas por ELISA de **(A)** CINC-2αβ e **(B)** MIP-2 liberadas na cavidade de bolsa de ar de ratos, 4 horas após injeção de veículo, MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1000 nM).....64

Figura 8. Leucócitos na microcirculação de mesentério de ratos observados antes (I) (basal) e após (II) exposição a MC-LR (1 nM) obtidos por microscopia intravital.....65

Figura 9. Número de neutrófilos em **(A)** rolamento e **(B)** aderidos em vênulas pós-capilares (20-30 µm de diâmetro) do mesentério de ratos expostos ao veículo (PBS), MC-LA, MC-YR e MC-LR (1 nM).....66

Figura 10. Efeitos dos tratamentos com MC-LA, MC-YR ou MC-LR na expressão gênica de moléculas de adesão.....68

Figura 11. Expressão de moléculas de adesão em neutrófilos incubados com MCs por 4 horas.....68

Figura 12. Respostas quimiotáticas de neutrófilos (sistema de filtros de papel) ao veículo (HBSS), fMLP (10 nM), MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1, 100 e 1000 nM).....70

Figura 13. Histogramas da intensidade de fluorescência emitida no comprimento de onda 560-580 nm (FL2) obtidos no ensaio de determinação de integridade de membrana por citometria de fluxo.....72

Figura 14. Histogramas da intensidade de fluorescência emitida no comprimento de onda 560-580 nm (FL2) obtidos no ensaio de determinação de fragmentação de DNA por citometria de fluxo.....73

Figura 15. Concentrações de **(A)** IL-8 determinadas no sobrenadante de culturas de neutrófilos humanos (2,5 x 10^6 células/mL) e de **(B)** CINC-2αβ por neutrófilos de ratos, incubadas com MC-LA, MC-YR e MC-LR (1 e 1000 nM) por 24 h, quantificadas por ELISA.....75

Figura 16. Concentrações de ânions superóxido extracelular em neutrófilos humanos e de ratos (2,5 x 10^6 células/mL) determinadas pelo método de quimiluminescência amplificada por lucigenina, na presença e ausência de MC-LA, MC-YR e MC-LR (1 e 1000 nM).....76

Figura17. Imagens obtidas por microscopia confocal mostrando o efeito da MC-LA, MC-YR ou MC-LR sobre a $[Ca^{2+}]i$ em neutrófilos de rato.....78

Figura 18. Indução do aumento de Ca^{2+} intracelular após a exposição de neutrófilos ao veículo (—□—), MC-LA (—●—), MC-YR (—▲—) ou MC-LR (—⬟—).....79

Figura 19. (A) Citocina quimioatraente induzida (CINC-2αβ) e **(B)** fator de necrose tumoral (TNF-α) determinadas no sobrenadante de culturas de células de Kupffer isoladas de ratos (1,0 x 10^5 células/mL) e **(C)** CINC-2αβ determinadas no sobrenadante de culturas de hepatócitos isolados de ratos (1,0 x 10^5 células/mL).....81

Figura 20. Esquema dos prováveis efeitos das microcistinas (MCs) em funções de neutrófilos.....88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Toxinas de culturas axênicas de cianobactérias de água doce ou salobra.....25 e 26

Tabela 2. Valores do limite máximo permitido para toxinas de cianobactérias em água potável estabelecidos pela Portaria nº. 518 (25/03/04) do MS, para padrão de potabilidade da água para consumo humano.....28

Tabela 3. Produção de IL-1β, TNF-α e VEGF-α (em pg/mL ± SE) nos exsudatos de bolsa de ar obtidos de ratos tratados com MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1000 nM).....63

Tabela 4. Respostas quimiotáticas de neutrófilos tratados com veículo (HBSS), MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1, 100 e 1000 nM) em resposta ao fMLP (10 nM) obtidas nos ensaios em câmara de Boyden.....71

Tabela 5. Porcentagem de integridade de membrana celular e fragmentação de DNA de neutrófilos humanos e de ratos tratados com MC-LA, MC-YR e MC-LR (1 e 1000 nM).....74

Tabela 6. Produção de CINC-2αβ, TNF-α e IL-1β ((pg/mL) ± SE), por células de Kupffer e CINC-2αβ por hepatócitos isolados de rato (1,0 x 10^5 células/mL) tratados com veículo, MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1, 100 ou1000 nM).....82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$[Ca^{2+}]_i$: concentração intracelular de íons cálcio.

aa (s): aminoácido (s)

ANOVA: análise de variância.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

AP-1: ativador de proteína 1.

Arg: arginina.

BMAA: β-metilamino alanina.

BPI: proteínas aumentadoras da permeabilidade de bactericidas.

BSA: soro de albumina bovina.

C: citocina pró-inflamatória que possui somente 1 cisteína.

CC: quimiocina pró-inflamatória que possui 2 cisteínas.

CD11b: subunidade da integrina αM.

CD18: integrina de cadeia-β2, expressada por todos os leucócitos, plaquetas ativadas e linhagem de células megacariocíticas.

CD62: molécula de adesão encontrada na maioria dos leucócitos e tem uma função primária em mediar a interação inicial de leucócitos com o endotélio vascular ativado.

CI_{50}: concentração necessária para 50% de inibição.

CINC: citocina quimiotraente induzida.

CX3C: quimiocina que possui três aminoácidos inseridos entre as duas primeiras cisteínas.

CYN (s): cilindrospermopsina (s).

Cys: cisteína.

DL_{50}: é a dose letal média, a quantidade de uma determinada substância que causa a morte de 50% da população em estudo.

DNA: ácido desoxirribonucleíco.

dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados.

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético.

ELISA: ensaio imunoenzimático.

ELR: quimiocinas que contém sítios glutamina-leucina-arginina adjacente ao seu primeiro aminoácido cisteína na região NH2 terminal.

FACS: seleção de células ativadas pela fluorescência.

FITC: fluoresceína-isotiocianato.

fMLP: N-formila-metionila-leucila-fenilalanina.

GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

Glu: ácido glutâmico.

HBSS: solução salina balanciada de Hanks.

HOCl: ácido hipocloroso.

HRP: peroxidase de raiz forte.

i.p.: intra-peritoneal.

i.v.: intra-venoso.

ICAM-1: molécula de adesão intercelular-1.

IL: interleucina.

Ile: isoleucina.

IP: iodeto de propídeo.

JNK: proteína quinase de N terminal c-Jun.

DL_{50}: Dose letal média.

Leu: leucina.

LPS: lipopolissacarídeo.

Lucigenina: 5- amino- 2,3- dihidro- 1,4- ftalazina.

Mac-1: antígeno de macrófago-1.

MAPK (s): proteínas quinases ativadas por mitógenos.

MC (s): microcistina (s).

Mdha: metildehidroalanina.

MIP: proteína inflamatória de macrófago.

MPO: mieloperoxidase.

MS: Ministério da Saúde.

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato.

NK: células exterminadoras naturais (“natural killer cells”).

Oatp (s): polipeptídeo(s) transportador(es) de ânion(s) biológico(s) de roedor(es).

OATP(s): polipeptídeo(s) transportador(es) de ânion(s) biológico(s) humano(s).

p.c.: peso corpóreo.

P/E: fosfoetalonamina.

PAF: fator de ativação de plaquetas.

PBS: solução tampão fosfato salina.

PCR-RT: reação em cadeia de polimerase pela transcriptase reversa.

PMA: acetato de forbol miristato.

PP: proteína fosfatase 1.

ROS: espécies reativas do oxigênio.

RPMI-1630: mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular.

SAX: saxitoxina.

SE: erro padrão.

SOD: superóxido dismutase

$T_{1/2}$: tempo de meia vida.

TNF-α: fator de necrose tumoral alfa.

Trp: triptofano.

Tyr: tirosina.

URL: unidade relativa de luz.

v.o.: via oral.

VCAM-1: moléculas de adesão vascular-1.

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular.

vs.: versus.

SUMÁRIO

FOLHA DE APROVAÇÃO.....*Erro! Indicador não definido.*
DEDICATÓRIA .....*v*
AGRADECIMENTOS.....*vi*
RESUMO.....*ix*
ABSTRACT.....*x*
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....*xi*
LISTA DE TABELAS.....*xiii*
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....*xiv*
SUMÁRIO .....*xvii*
1. INTRODUÇÃO.....*22*
2. REVISÃO DE LITERATURA *23*
2.1. CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS.....**23**
2.2 MICROCISTINAS **28**
2.2.1 Estruturas químicas e propriedades.....28
2.2.2 Toxicocinética 30
2.2.3 Toxicodinâmica. 31
2.2.3.1 Inibição de Proteínas Fosfatases. 31
2.2.3.2 Estresse Oxidativo 33
2.2.4 Toxicidade.....34
2.3 ENVOLVIMENTO DOS NEUTRÓFILOS EM LESÕES TECIDUAIS INFLAMATÓRIAS AGUDAS.....**36**
2.3.1 Ativação e acumulação de neutrófilos no foco inflamatório.....36
2.3.2 Dano tecidual mediado por neutrófilos em inflamação hepática. 39
2.3.3 Influência de neutrófilos na toxicidade de microcistinas.....42
3. OBJETIVOS.....*44*
3.1 Objetivos específicos **44**
4. MATERIAL E MÉTODOS *45*
4.1 MATERIAL **45**
4.1.1 Reagentes.....45
4.1.2 Equipamentos 46
4.2 MÉTODOS.....**46**
4.2.1 Casuística. 46
4.2.2 Isolamento de neutrófilos de ratos. 47
4.2.3 Isolamento de neutrófilos humanos.....48
4.2.4 Avaliação da migração de leucócitos pelo modelo de bolsa de ar. 48
4.2.5 Avaliação de citocinas (CINC-2αβ, IL-1β, TNF-α, VEGF-α e MIP-2) presentes nos exsudatos obtidos nos ensaios da bolsa de ar. 49

4.2.6 Avaliação do comportamento de rolamento e aderência de leucócitos pela técnica de microscopia intravital. 51
4.2.7 Avaliação da síntese de mRNA de moléculas de adesão pelo ensaio de PCR-RT.....51
4.2.8 Avaliação de expressão de moléculas de adesão na membrana plasmática de neutrófilos pela técnica de citometria de fluxo.....53
4.2.9 Avaliação de migração *in vitro* pelo ensaio com câmara de quimiotaxia de Boyden. 54
4.2.10 Avaliação da integridade de membrana celular de neutrófilos pela técnica de citometria de fluxo. 55
4.2.11 Avaliação da fragmentação de DNA de neutrófilos pela técnica de citometria de fluxo. 56
4.2.12 Avaliação de potencial transmembrânico mitocondrial (MTP) de neutrófilos pela técnica de citometria de fluxo.....57
4.2.13 Avaliação da produção das citocinas: IL-8 (por neutrófilos humanos), CINC-2αβ (por neutrófilos de ratos) e TNF-α (por neutrófilos humanos e de ratos). 57
4.2.14 Avaliação de produção de ROS por neutrófilos pela técnica de quimiluminescência amplificada por lucigenina.....58
4.2.15 Avaliação de produção de ROS por neutrófilos pela técnica de citometria de fluxo.....58
4.2.16 Avaliação do influxo de cálcio intracelular em neutrófilos pela técnica de microscopia confocal.....59
4.2.17 Isolamento de hepatócitos e células de Kupffer de ratos 60
4.2.18 Avaliação da produção das citocinas: CINC-2αβ (por hepatócitos e células de Kupffer de ratos), TNF-α e IL-1β (por células de Kupffer de ratos)...60
4.2.19 Análise estatística 61

5. RESULTADOS.....62

5.1 RECRUTAMENTO DE LEUCÓCITOS DURANTE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA. 62

5.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRESENTES NO EXSUDATO DA BOLSA DE AR: CINC-2αβ, IL-1β, TNF-α, VEGF-α E MIP-2.....63

5.3 EFEITOS DA APLICAÇÃO TÓPICA DAS MCS SOBRE A REDE MICROCIRCULATÓRIA DE MESENTÉRIO DE RATO. 64

5.4 AVALIAÇÕES DA SÍNTESE DE RNAm E DA EXPRESSÃO EM MEMBRANA CELULAR DE L-SELECTINA E β_2-INTEGRINA EM NEUTRÓFILOS. 66

5.5 EFEITOS DAS MCs NA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS *in vitro.*.....69

5.6 EFEITOS DAS MCs NA INTEGRIDADE DE MEMBRANA, FRAGMENTAÇÃO DE DNA E POTENCIAL TRANSMEMBRÂNICO MITOCONDRIAL DE NEUTRÓFILOS HUMANOS E DE RATOS. 71

5.7 PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR NEUTRÓFILOS HUMANOS E DE RATOS. 74

5.8 PRODUÇÃO DE ROS POR NEUTRÓFILOS HUMANOS E DE RATOS.....75

5.9 EFEITOS DAS MCs NA MOBILIZAÇÃO DE Ca^{2+} INTRACELULAR EM NEUTRÓFILOS. 77

5.10 PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR HEPATÓCITOS E CÉLULAS DE KUPFFER DE RATOS. 80

6. DISCUSSÃO 83

7. CONCLUSÕES 91

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS* 92

9. ANEXOS 108

9.1 ANEXO I: Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado 108

9.2 ANEXO II: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-FCF/USP 109

9.3 ANEXO III: Termo de Consentimento pós informativo 110

9.4 ANEXO IV: Aprovação do Comitê de ética em Experimentação Animal 113

9.5 ANEXO V: Curriculum vitae 114

9.6 ANEXO VI: Trabalhos originados no período 120

Effects of microcystins on human polymorphonuclear leukocytes. 121

Analysis of chemokines and reactive oxygen species formation by rat and human neutrophils induced by microcystin-LA, -YR and -LR. 126

The role of microcystins -LA, -YR, and -LR on neutrophil migration. 133

Saxitoxins accumulation in freshwater fish (*Oreochromis niloticus*) for human consumption 169

9.9 ANEXO VIII: Certificado do estágio realizado na Universität Jena, Co-orientador estrangeiro: Prof. Dr. Bernd Luckas (CAPES-DAAD-PROBAL - Processo BEX 2243/07-5). 181

.

1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de florações de cianobactérias em reservatórios utilizados para abastecimento público contendo microcistinas (MCs) tem sido muito freqüente e tem prejudicado os usos múltiplos das águas. As MCs, heptapeptídeos cíclicos produzidos por alguns gêneros de cianobactérias, têm potente hepatotoxicidade e potencial para promover tumores. Em 2004, o Ministério da Saúde passou a exigir dos órgãos competentes e responsáveis pelo tratamento e fornecimento de água, a monitorização de cianobactérias e algumas cianotoxinas (MCs, cilindrospermopsina (CYN) e saxitoxina (SAX)), pois sabe-se que essas toxinas não são eliminadas nos procedimentos convencionais usados em estações de tratamento de água.

As MCs são potentes hepatotoxinas, e casos de exposição de humanos e animais em alguns países, e inclusive no Brasil, já foram relatados. Os estudos histológicos de amostras de fígado de seres humanos e de animais intoxicados agudamente a essas toxinas revelam intensa infiltração de neutrófilos no foco inflamatório. O nosso trabalho anterior mostrou que a MC-LR tem capacidade de alterar algumas funções de neutrófilos *in vitro*, como a migração, a fagocitose e morte de *Candida albicans* e a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS).

A compreensão dos mecanismos de ação das MCs é importante para promover uma abordagem de intervenção terapêutica em casos de intoxicação por essas toxinas. Os resultados obtidos nesses três anos e 4 meses de doutorado mostraram o fato relevante de que as MC-LA, MC-YR e MC-LR induzem migração de neutrófilos *in vivo* e *in vitro* e que esses leucócitos podem representar uma fonte a mais de dano tecidual. Essa sugestão está embasada na ativação de neutrófilos por essas MCs, gerando citocinas e ROS, que são compostos pró-inflamatórios que danificam tecidos, sugerindo que a presença de neutrófilos no fígado como um possível mecanismo adicional de hepatotoxicidade das MCs.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS

As cianobactérias são um grupo de procariontes fotossintetizantes gram-negativos amplamente difundidos devido a sua capacidade de realizar fotossíntese, tanto aeróbica como anaerobicamente [Lee, 1991]. Ecologicamente são importantes como constituintes do plâncton marinho ou dulcícola, ocupando a posição de produtores primários nas cadeias alimentares [Cardozo *et al*., 2007]. São encontradas tanto em água doce como salobra e marinha; além de fontes termais, geleiras e solos de desertos [Codd *et al*., 2005; Wiegand e Pflugmacher, 2005].

Em ambientes não-impactados normalmente as cianobactérias não causam problemas em razão da dinâmica dos ecossistemas. Porém, a atividade antropogênica pode promover a chamada eutrofização artificial, que é o aumento das concentrações de nutrientes - principalmente fósforo e nitrogênio - nas bacias hidrográficas pela poluição, e provocar o crescimento acelerado de cianobactérias, definido como floração [Codd, 2000; Wiegand e Pflugmacher, 2005].

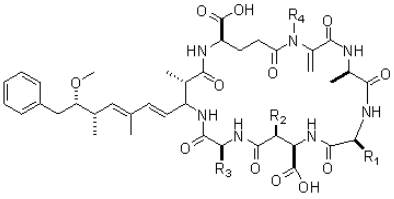
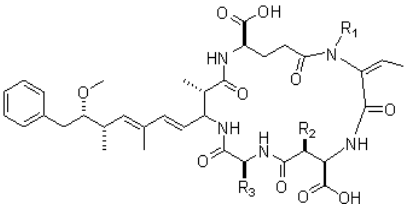
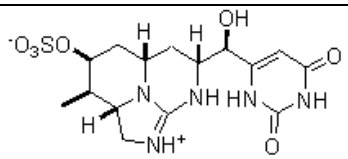
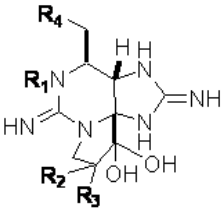
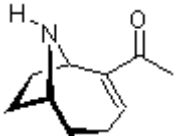
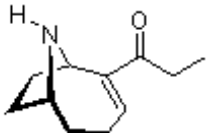
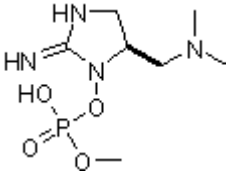
A floração de cianobactérias em reservatórios de água pode trazer sérios problemas à saúde pública e ao meio ambiente [Codd *et al*., 2005; Bittencout-Oliveira e Molica, 2003]. Esta não se restringe a locais específicos, prova disso é a diversidade de países nos quais sua presença tem sido documentada [Carmichael, 2008]. A duração e o período da estação da floração de cianobactérias dependem muito das condições climáticas da região. Em zonas temperadas, as florações de cianobactéria são mais proeminentes durante o final do verão e início do outono e pode durar de 2 a 4 meses. Em regiões com climas subtropical ou mediterrâneo, os períodos de floração podem iniciar mais cedo e persistir por mais tempo. Na França as florações podem ocorrer por 4 meses, e no Japão, Portugal, Espanha e África do Sul por 6 meses ou mais. Em anos de seca em áreas de clima tropical ou subtropical da China, Brasil e Austrália, as florações de cianobactérias podem ocorrer quase o ano todo [Chorus e Bartram, 2003; van Apeldoorn *et al*., 2007]. Esses eventos alteram o gosto e o odor da água (em razão da presença de geosmina e 2-metilisoborneol) e o equilíbrio ecológico do ecossistema aquático, além da problemática de algumas cianobactérias poderem também produzir toxinas – as cianotoxinas – e assim gerar as denominadas florações tóxicas [Skulberg, 2000; Sinclair *et al*., 2008].

Entre os principais gêneros de cianobactérias produtores de toxinas estão: *Anabaena, Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Lyngbya, Microcystis, Nodularia, Nostoc e Oscillatoria* (conhecida também como *Planktothrix*) [Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2005; Botana, 2007].

As cianotoxinas são consideradas produtos do metabolismo secundário das cianobactérias e podem permanecer no interior da célula ou serem liberadas para o meio. A função desses compostos na natureza não está clara. Existe uma hipótese de que teriam a finalidade de conferir vantagens na competição (alelopatia) com outras cianobactérias e microalgas (o que explicaria o domínio das espécies tóxicas em ambientes eutrofizados), ou na defesa, já que essas toxinas inibem a predação desses microrganismos pelo zooplâncton [Lee, 1991; Carmichael, 1992; Chorus e Bartram, 2003].

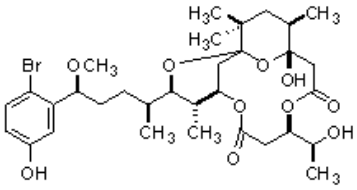
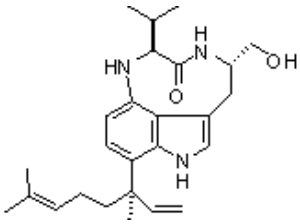
Esses metabólitos secundários tóxicos a mamíferos incluem microcistinas (MCs), cilindrospermopsinas (CYNs), saxitoxina (SAX) e seus análogos, nodularinas, anatoxina-*a*, homoanatoxina-*a*, anatoxina-*a*(*s*), aplisiatoxina e lingbiatoxina. Recentemente foi sugerido que a β-metilamino alanina (BMAA) pode ser uma nova toxina de cianobactéria [Cox *et al*., 2005; Humpage, 2008]. Essas toxinas podem causar efeito deletério em tecidos e células de animais. Seus mecanismos de ação são diversos, podendo ser hepatotóxicas, neurotóxicas, dermatotóxicas, promotoras de inibição da síntese de proteínas ou produtoras de alteração no sistema imune [Quilliam, 1999; Humpage, 2008). As cianotoxinas mais estudadas, suas estruturas químicas gerais e mecanismos de toxicidade são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Toxinas de culturas axênicas de cianobactérias de água doce ou salobra.

	Toxinas	Estrutura molecular	Modo de toxicidade
Hepatotoxinas	Microcistinas	 (Heptapeptídeo cíclico)	Promotor de tumor, inibidor de fosfatases [Mackintosh *et al.*, 1990].
	Nodularinas	 (Pentapeptídeo cíclico)	Promotor de tumor, inibidor de fosfatases [Ueno *et al.*, 1996].
	Cilindrospermopsinas	 (Alcalóide)	Inibidor de síntese proteica [Sverck e Smith, 2004]
Neurotoxinas	Saxitoxina e seus análogos	 (Alcalóide)	Bloqueiam a geração e propagação de potenciais de ação dos neurônios e fibras de músculos esquelético e cardíaco. Esse bloqueio da transmissão nervosa induz paralisia muscular [Humpage, 2008].
	Anatoxina-*a*	 (Alcalóide)	Potentes agonistas nicotínico da acetilcolina [Osswald *et al.*, 2007]
	Homoanatoxina	 (Alcalóide)	
	Anatoxina-*a*(s)		Organofosforado natural que age como inibidor irreversível da acetilcolinesterase (“s” de salivação) [van Apeldoorn *et al.*, 2007]

(Continuação da tabela 1 na próxima página)

Continuação da tabela 1. Toxinas de culturas axênicas de cianobactérias de água doce ou salobra.

	Toxinas	Estrutura molecular	Modo de toxicidade
Dermatotoxinas	Aplisiatoxina	 (Bilactona fenólica)	Causam dermatite [van Apeldoorn *et al.*, 2007].
	Lingbiatoxina-a	 (Alcalóide indólico)	Causam dermatite e severa inflamação gastrintestinal [Osborne *et al.*, 2001].

O primeiro relato de morte de animais causada por floração de cianobactérias ocorreu em 1878, no sul da Austrália, onde ovelhas, cavalos e cães foram intoxicados após beberem água de um lago eutrofizado [Sinclair *et al.*, 2008]. Existem alguns exemplos na literatura que demonstram efeitos adversos à saúde pública provocados pela ingestão de cianotoxinas. A maioria destes casos foi observada após a aplicação de sulfato de cobre em águas com elevada densidade fitoplanctônica. Compreensível, pois a aplicação constante do sulfato de cobre utilizado para controlar o desenvolvimento das algas e cianobactérias não é recomendada porque, quando as cianobactérias morrem, rompem a parede celular, liberando as toxinas do seu interior para o meio aquoso. Uma epidemia de gastro e hepatoenterite ocasionada por algas ocorreu nos Estados Unidos em 1975, atingindo aproximadamente 63% da população conectada ao sistema público de abastecimento. A investigação realizada comprovou que a água distribuída à população estava isenta de bactérias, vírus patogênicos ou qualquer anormalidade química. Contudo, as análises biológicas realizadas demonstraram que o manancial continha elevada densidade de cianobactérias flutuando na superfície do corpo de água e no interior da massa líquida após a aplicação do sulfato de cobre [Batalha, 1998]. Outra epidemia de hepatoenterite provocada por cianotoxinas foi constatada

na Austrália em 1979. Os sintomas clínicos observados em 140 crianças e 10 adultos foram danos no fígado, rins, intestinos além de vômitos, dor de cabeça, cólica abdominal, perda de sangue, diminuição dos níveis de glicose e perda de proteínas e cetonas na urina e desequilíbrio eletrolítico. Essa epidemia foi associada com o consumo de água potável de uma reserva contendo floração de *Cylindrospermopsis raciborskii* [Chorus e Bartram, 2003]. No Brasil, uma severa epidemia de gastroenterite na região de Paulo Afonso, no Estado da Bahia, foi relacionada com a construção da Represa de Itaparica em 1988 [Teixeira *et al*., 1993]. De 2000 casos, restritos a áreas com fornecimento de água dessa represa, 88 resultaram em morte. Na água foram encontradas quase 10000 unidades de cianobactérias/mL dos gêneros *Anabaena* e *Microcystis*. Outro desastroso incidente com cianotoxinas, que também ocorreu no Brasil, relacionou 76 mortes com o uso de água contaminada com MCs e CYNs em equipamento de diálise [Jochimsen *et al.*, 1998, Carmichael *et al*. 2001; Azevedo *et al*. 2002].

É descrito que algumas toxinas produzidas por cianobactérias não são facilmente removidas por processos convencionais de tratamento de água [Dietrich e Hoeger, 2005]. Por essa razão, há grande interesse na regulamentação das concentrações de cianotoxinas na água para o consumo humano [Sverck e Smith, 2004]. Em caso de suspeita de ocorrência de uma floração tóxica, nas estações de tratamento de água, é realizado o monitoramento para identificar os gêneros envolvidos e sua concentração por mL de água. Em seguida, são realizados bioensaios para verificação de toxicidade, além da identificação do tipo de cianotoxina presente no manancial envolvido. Depois, diante dos resultados obtidos com os processos físico-químicos ou medidas de biodegradação e biorremediação realizados para a remoção das toxinas, podem ser tomadas medidas de interdição de uma área recreacional ou impedimento de uso como água potável de um ambiente impactado por cianotoxinas [Zagatto *et al*., 1997]. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da portaria n° 1469/00 (21/01/01), passou a exigir dos órgãos competentes e responsáveis pelo tratamento e fornecimento de água, o controle de toxinas de cianobactérias (MCs, CYNs e SAX). E, em 2004, o Ministério da Saúde (MS), por meio da portaria nº. 518 (25/03/04), reformulou e revogou a portaria n° 1469/00, que passou a exigir procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para

consumo humano, e seu padrão de potalidade, obrigando o monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas. A tabela 2 mostra os valores máximos permitidos para toxinas de cianobactérias em água potável.

Tabela 2. Valores do limite máximo permitido para toxinas de cianobactérias em água potável estabelecidos pela Portaria nº. 518 (25/03/04) do MS, para padrão de potabilidade da água para consumo humano.

TOXINAS	*LIMITE MÁXIMO PERMITIDO (µg/L)*
MICROCISTINAS	1
CILINDROSPERMOPSINAS	15*
SAXITOXINA	3*

*Há apenas uma recomendação pela Portaria nº. 518 do MS para a determinação de cilindrospermopsina e saxitoxinas, observando os valores limites.

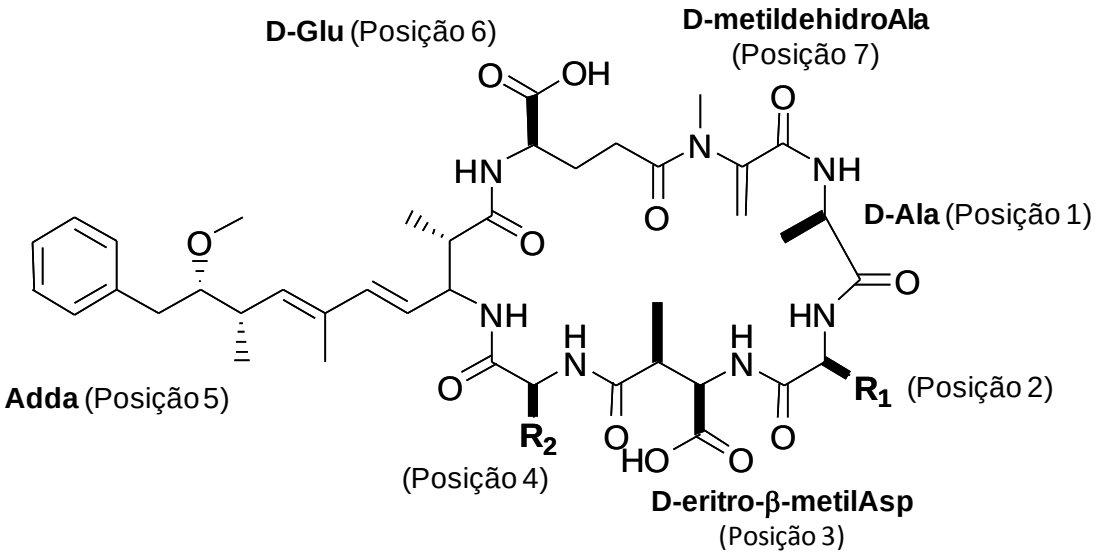
Foram observados acumulações de cianotoxinas em moluscos bivalves e peixes de água doce, quando ocorrem florações de cianobactérias tóxicas onde esses animais habitam ou estão sendo cultivados foram observados, o que pode ser um risco, impondo que o monitoramento dos produtos de aqüicultura também deveria ser estabelecido [Ibelings e Chorus, 2007].

2.2 MICROCISTINAS

2.2.1 Estruturas químicas e propriedades

As MCs pertencem a um grupo de no mínimo 80 variantes baseadas na estrutura de um heptapeptídeo cíclico, com peso molecular entre 900 e 1100 Daltons. Suas estruturas químicas são formadas por cinco aminoácidos (aa) praticamente invariáveis: D-alanina (posição 1), ácido D-metilaspártico (posição 3), ADDA (ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6-dienóico) (posição 5), ácido D-glutâmico (Glu) (posição 6), e N-metildehidroalanina (Mdha) (posição 7) [US EPA, 2006; van Apeldoorn *et al.*, 2007] (Figura 1). Todas as variantes estruturais tóxicas das MCs contêm um único aa hidrofóbico, o ADDA. A MC-LR é a MC mais estudada, e tem uma leucina (Leu) e uma arginina (Arg) nas duas posições hiper-variáveis na

estrutura do anel (R_1 e R_2, respectivamente, na Figura 1). A substituição de outros aas nesses sítios, ou a desmetilação de resíduos em outros sítios, leva a vasta variabilidade estrutural [US EPA, 2006]. Essas toxinas são produzidas por uma grande variedade de cianobactérias incluindo *Microcystis aeruginosa, M. viridis, M. ichthyoblabe, M. botrys, Planktothrix argardhii, P. rubescens, P. mougeotii, Anabaena flos-aquae, A. circinalis, A. lemmermannii, Nostoc spp.* e *Snowella lacustris* [van Apeldoorn *et al*., 2007].



Toxina	R_1	R_2
MC-LR	Leucina	Arginina
MC-YR	Tirosina	Arginina
MC-LA	Leucina	Alanina

Figura 1. Estrutura molecular geral das MCs. Resíduos dos aminoácidos específicos (R_1 e R_2) das diferentes variantes de MCs (LA, YR e LR).

Poucas informações das propriedades química e físicas das MCs são descritas. As MCs não são voláteis e geralmente completamente solúveis em água, metanol e etanol, e insolúveis em acetona, clorofórmio e benzeno [Duy *et al*., 2000]. Estudos mostram que as MCs são estáveis em águas de reservatórios no mínimo durante uma semana, mas por um período mais longo em água deioniozada ou destilada. A luz ultra-violeta próxima da máxima de absorção (280 nm) de MC-LR e MC-RR decompõe rapidamente estas MCs [van Alperdoorn *et al*., 2007].

2.2.2 Toxicocinética

A intoxicação por MCs envolve principalmente as seguintes rotas de exposição: (i) pelo consumo de água, alimento ou suplemento alimentar contaminados pelas MCs, especialmente se são usadas as superfícies dos corpos de água; (ii) durante o uso recreacional de corpos de água, o qual pode conter um grande desenvolvimento de cianobactérias; (iii) por hemodiálise se a água usada no preparo da solução de diálise não for purificada adequadamente [Dittmann e Wiegang, 2006; van Apeldoorn *et al.*, 2007].

Apesar de a principal via de exposição ser a oral, a maioria dos estudos de toxicocinética das MCs é primariamente focada em exposição pela via intra-peritonial (i.p.) ou intra-venosa (i.v.) [US EPA 2006]. Não há dados na literatura sobre absorção, metabolismo ou eliminação de MCs após exposição por via oral ou inalatória em seres humanos ou animais *in vivo*.

A distribuição de MCs é limitada devido à baixa capacidade dessas toxinas de atravessar membranas celulares. Estudos realizados com animais de laboratório, por administração de MC por i.v. ou i.p., demonstraram que o fígado é o órgão alvo primário para toxicidade das MCs. As MCs chegam ao fígado por um sistema de transporte ativo multi-específico de ácidos biliares. Isso requer a captação da MC através da membrana plasmástica dos sinusóides de hepatócitos [Eriksson *et al.*, 1990, Hermansky *et al.*, 1990]. Foi identificado que os polipeptídeos transportadores de ânions biológicos (OATPs) Oatp1b2, OATP1B1 e OATP1B3 são transportadores de MC-LR em hepatócitos de ratos e de seres humanos [Fischer *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2008]. Esses OATPs compreendem uma família de transportadores exibindo ampla distribuição e vários substratos, além de exibir uma função importante na distribuição e toxicidade de fármacos [Evers e Chu, 2008]. Uma vez dentro da célula, as MCs se ligam covalentemente a proteínas citosólicas (enzimas fosfatases 1 e 2A), resultando em retenção no fígado. Camundongos tratados por via i.p. com [^{3}H]-MC-LR mostraram que o tempo de meia vida ($T_{1/2}$) no plasma foi de 29 minutos e de 42 minutos por administração via i.v. [Chorus e Bartram, 2003]. Da dose injetada (101 µg/Kg de peso corpóreo (p.c.)), 56 % foram encontradas no fígado, 7 % no intestino e 0,9 % nos rins, enquanto o coração, baço, pulmões e músculo esquelético tiveram menos de 1% da MC-LR radiomarcada.

O metabolismo hepático da MC-LR foi estudado após injeção por via i.p. em camundongos e ratos [Kondo *et al*., 1996]. Esse estudo mostrou que essa MC e seus metabólitos são excretados tanto como conjugados com glutationa, como com cisteína ou como um dieno do a.a. ADDA oxidado, os quais são eliminados rapidamente do corpo por excreção biliar [Chorus e Bartram, 2003].

2.2.3 Toxicodinâmica.

Muitos estudos de mecanismos de ação têm sido conduzidos para caracterizarem os aspectos toxicológicos das MCs, mas ainda não estão totalmente elucidados. Esses estudos, que incluem investigações *in vivo* em animais, estudos *in situ* em sistemas de órgão isolados, e ensaios *in vitro* com preparações de células isoladas, sugerem que a inibição de proteínas fosfatases (PPs) e o estresse oxidativo são importantes eventos moleculares de toxicidade por MCs [Chorus e Bartram, 2003; US EPA., 2006].

2.2.3.1 Inibição de Proteínas Fosfatases.

A MC-LR é um inibidor das PPs serina/ treonina 1 e 2A tanto *in vitro* [Honkanen *et al.*, 1990; Mackintosh *et al*., 1990] quanto *in vivo* [Runnegar *et al.*, 1995], com CI_{50} de 0,1 – 1 nM [Mackintosh *et al.,* 1990]. As PPs têm uma função importante na manutenção da homeostase celular e a inibição dessas enzimas resulta na fosforilação aumentada de várias proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular.

A inibição da atividade das PPs pelas MCs é resultado de uma interação não-covalente inicial, mediada pelo Adda hidrofóbico da MC com a parte apolar do triptofano (Trp)-208 e isoleucina (Ile)-130 da enzima. Foi demonstrado também uma interação do grupamento carbonila do Glu da MC com um íon metálico (ferro ou manganês), além da ligação do aa Leu da MC com a tirosina (Tyr)-272 no sítio catalítico da PP1. Uma interação adicional é a ligação covalente do α,β-carbonila insaturado do resíduo de metildeidroalanina (Mdha) da MC com o grupamento tiol da cisteína (Cys)-273 da PP1 (Cys-266 na PP2A) [Dawson, 1998; US EPA, 2006] (figura 2).

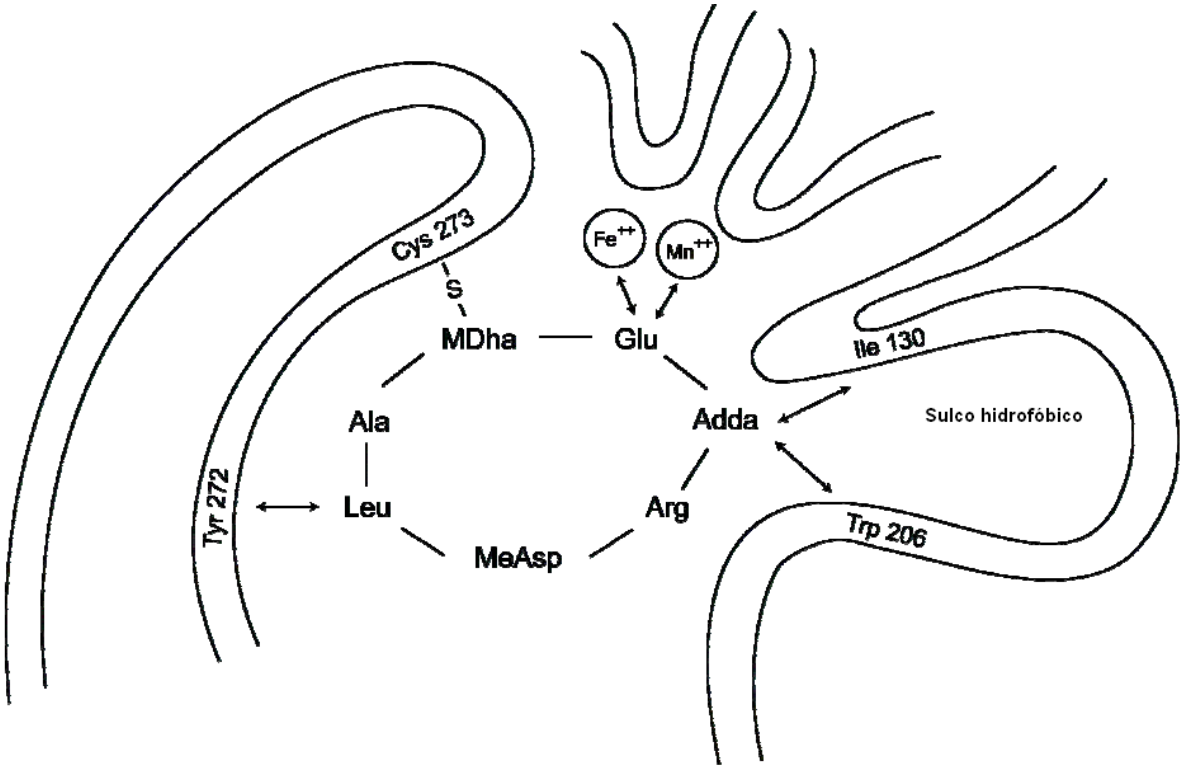


Figura 2. Representação esquemática das interações entre MC-LR e o sítio catalítico da proteína fosfatase-1 (PP-1) [adaptado de US EPA, 2006]. Tyr: tirosina; Cys: cisteína; Ile: isoleucina; Trp: triptofano; Glu: ácido glutâmico; Adda: ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6-dienóico; Arg: arginina; MeAsp: ácido metilaspártico; Leu: leucina; Ala: alanina; MDha: metildehidroalanina.

A inibição de PPs tem efeitos dualistas nas células expostas às MC-LR, resultando tanto em aumento de apoptose, quanto em proliferação celular. A apoptose observada em altas doses (≥ 32 µg/kg *in vivo*; ≥ 10 nM *in vitro*) é um resultado de hipóxia causada por obstrução do fluxo sangüíneo para os tecidos hepáticos. Já em baixas doses (≤ 20 µg/kg *in vivo*; ≤ 1 nM *in vitro*), é possível que a promoção de tumor observada seja pela ativação da via de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), a qual estimula o aumento da fosforilação de proteínas-alvo, tais como proteínas supressoras de tumor, pode levar a proliferação celular e a processos carcinogênicos [Toivola e Eriksson, 1999; Gehringer *et al.,* 2004; Fu *et al.,* 2005]. Porém, não está comprovado se na exposição crônica, à baixas concentrações de MCs, as PPs sejam inibidas em seres humanos. Com respeito a possibilidade da ação das MCs na promoção de tumor,

mais estudos são necessários para estabelecer a dose efetiva relacionada à indução de nódulo hepático, usando várias vias de administração [US EPA, 2006].

2.2.3.2 Estresse Oxidativo

Além da inibição de PPs 1 e 2A, estudos sugerem que o estresse oxidativo também tem importância na toxicidade das MCs [Guzman e Solter, 1999; Ding *et al.*, 2000; Ding *et al.*, 2001; Zegura *et al.*, 2004; Bouaïcha e Maatouk, 2004; Sicinska *et al.*, 2006; Wei et al., 2008]. Essas toxinas induzem a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais incluem radicais superóxido, hidroxila e radicais de compostos orgânicos celulares, causando peroxidação de lipídeos e oxidação de proteínas e de DNA. Estudos mostraram que a geração de ROS está relacionada ao dano hepático induzido por MC-LR [Bouaïcha e Maatouk*,* 2004; Ding *et al.,* 2001; Wei *et al*., 2008]. A MC-LR induz a produção de ROS e alteração na concentração intracelular de glutationa em cultura primária de hepatócitos de ratos [Bouaïcha e Maatouk*,* 2004].

A formação de ROS tem uma função importante no rompimento da organização do citoesqueleto e conseqüente hepatotoxicidade [Ding *et al.,* 2001]. As MCs aumentam o estresse oxidativo levando à morte celular porque além dessas hepatotoxinas exaurirem glutationa, levando ao dano oxidativo e morte celular, elas podem aumentar a produção de ROS pela ruptura da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. Essa ruptura leva à transição de permeabilidade de membrana e, conseqüentemente, à ativação de calpaína e proteína quinase II dependente de calmodulina/íons cálcio, resultando assim em apoptose de hepatócitos [Ding e Ong*,* 2003]. Algumas informações recentes mostraram que o estresse oxidativo gerado pela MC-LR pode estimular a ativação sustentada de JNK (proteína quinase de N terminal c-Jun), a qual, por sua vez, induz em hepatócitos apoptose dependente de mitocôndria via fator de transcrição ativador de proteína 1 (AP-1) e via proteína pró-apoptótica Bid, e dano hepático oxidativo [Wei *et al.,* 2008].

O pré-tratamento com antioxidantes, como vitaminas C e E, silimarina e glutationa, atenua a apoptose de hepatócitos e os danos hepáticos causados por MC-LR [Mereish *et al.,* 1991; Gehringer *et al.,* 2004; Hermansky *et al.,* 1991; Weng *et al.,* 2007], o que confirma que o estresse oxidativo também pode contribuir para a toxicidade aguda induzida por MCs.

O estresse oxidativo gerado pelas MCs também induz degradação oxidativa de DNA [Zegura *et al.,* 2004; Maatouk *et al.,* 2004; Dittmann e Wiegang*,* 2006]. A fragmentação de DNA pode ser iniciada com a oxidação de purinas que não são reparadas posteriormente, e assim provoca a quebra da fita de DNA. Além disso, a oxidação de DNA resulta na formação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-OhdG), que é um importante marcador de dano oxidativo. Esse aduto de bases nitrogenadas foi detectado em hepatócitos de ratos tratados com MC-LR *in vitro* e *in vivo* [Maatouk *et al.,* 2004], enquanto o tratamento com MC-LR induziu dano ao DNA em células de hepatoma humano HepG2 [Zegura *et al.,* 2004]. Acredita-se que a exposição crônica a MC-LR pode causar genotoxicidade e carcinogenicidade mediada por ROS [Dittmann e Wiegang*,* 2006; US EPA, 2006].

2.2.4 Toxicidade

O aspecto de intoxicação aguda pela exposição à MCs foi estudado tanto *in vitro* quanto *in vivo* [Miura *et al.*, 1989; Pace *et al.*, 1991; Rao *et al.*, 1995; Wickstrom *et al.*, 1996]. Foi observado que a DL_{50} pela via i.p. em camundongos varia de 50 – 60 µg de MC-LR/Kg de p.c., e é semelhante à das MC-LA, MC-YR e MC-YM. Já a da MC-RR é aproximadamente dez vezes maior. Entretanto, devido às diferenças de lipofilicidade e polaridade entre as variantes de MCs, a DL_{50} pela via i.p. não pode predizer a toxicidade após administração oral. Como exemplo, um estudo de toxicidade aguda oral mostrou que a DL_{50} da MC-LR por essa via em ratos é maior do que 5000 µg/Kg de p.c. [Chorus e Bartram, 2003].

Após administração da dose letal média por via i.p. e i.v. de MCs em camundongos, o dano hepático severo é caracterizado por: desorganização de citoesqueleto, peroxidação lipídica, perda de integridade de membrana, fragmentação de DNA, apoptose, dilaceração celular, necrose e sangramento intra-hepático, os quais podem levar à morte do animal por choque hipovolêmico [Miura *et al.*, 1989; Mackintosh *et al.*, 1990, Thompson e Pace, 1992, Wickstrom *et al.*, 1995, Rao *et al.*, 1996, Fischer *et al.*, 2000, Gupta *et al.*, 2003; Zegura *et al.*, 2003]. Além disso, essas hepatotoxinas são potentes promotoras de tumor [Ito *et al.*, 1997].

As conseqüências da exposição crônica a baixas concentrações de MCs são discutíveis, pois os mecanismos envolvidos na acumulação, na biotransformação e na eliminação dessas toxinas ainda não foram totalmente elucidados. Porém, o

principal problema levantado é a capacidade de promoção de tumor desses heptapeptídeos ciclícos. Estudos epidemiológicos encontraram a correlação entre a alta incidência de câncer de fígado primário na China e o uso de água superficial não tratada como fonte de água de consumo (contaminadas por MCs) [Ueno *et a.l*, 1996; Harada *et al.*, 1996; Dawson, 1998]. Em um estudo similar, na Flórida, foi encontrado um elevado risco de carcinoma hepatocelular primário em residentes próximo de estações de tratamento de água superficial, comparado aos moradores de áreas onde a água tratada para consumo era subterrânea [Fleming *et al.*, 2002]. Além disso, a intoxicação pode ser originada pela via de bioacumulação em organismos aquáticos empregados para consumo humano, principalmente peixes ou moluscos criados em água contaminada por cianobactéria, e também vegetais irrigados com água contendo cianotoxinas [de Magalhães *et al*., 2001; Vasconcelos, 1999; Ibelings e Chorus, 2007]. Nenhum risco de intoxicação para humanos parece existir via bioacumulação em gado expostos a cianobactérias, nem em leite nem pelo consumo de carne [Codd *et al.*, 1999].

Os dois relatos de intoxicações letais atribuídas a cianobactéria em água potável ocorreram no Brasil. Em 1988, uma floração de *Anabaena* e *Microcystis* na Represa de Itaparica, Bahia, foi responsável por 2000 casos de gastrointerites resultando em 88 mortes, na maioria de crianças [Teixeira *et al*., 1993]. O outro caso, conhecido mundialmente como “Síndrome de Caruaru”, aconteceu quando um foco de insuficiência hepática aguda ocorreu em um centro de hemodiálise em Caruaru, Pernambuco. Na clínica 116 dos 131 pacientes apresentaram distúrbios visuais, náuseas e vômitos após rotina de tratamento de hemodiálise entre os dias 13 e 20 de fevereiro de 1996. Posteriormente, cerca de 100 pacientes desenvolveram insuficiência hepática aguda, e, destes, 76 morreram. A comparação dos resultados dos estudos histopatológicos das amostras de fígado das vítimas com os estudos realizados em animais de laboratório levou a conclusão de que o principal fator contribuinte para a morte dos doentes em diálise foi a exposição intravenosa à MCs (MC-YR, MC-LR e MC-AR). A partir dos valores das concentrações no fígado e dos volumes de exposição, estimou-se que 19,5 µg de MCs/L estavam presentes na água utilizada para o tratamento de diálise [Jochimsen *et al.*, 1998; Pouria *et* al., 1998; Codd *et al.*, 1999; Carmichael *et al*., 2001; Azevedo *et al.*, 2002]. Os estudos histopatológicos mostraram um quadro uniforme de hepatite

tóxica aguda nas amostras das vítimas, apresentando deformidade celular, necrose, apoptose, colestase severa, vacuolização citoplasmática, hepatócitos multinucleados e infiltração mista de leucócitos, com predomínio de neutrófilos.

2.3 ENVOLVIMENTO DOS NEUTRÓFILOS EM LESÕES TECIDUAIS INFLAMATÓRIAS AGUDAS.

Traumas teciduais ou estresse excessivo com danos celulares desencadeiam uma inflamação aguda com a ativação de macrofágos residentes, células exterminadoras naturais ("natural killer cells" - NK) e recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) e mononucleares (monócitos e linfócitos) para o foco inflamatório. O principal objetivo dessa resposta imune inata é eliminar microorganismos invasores e corpos estranhos, remover células danificadas ou mortas e preparar o tecido para a regeneração. Por outro lado, há algumas situações fisiopatológicas na qual uma resposta inflamatória excessiva causa um dano tecidual adicional ou ainda desencadeia falência do órgão, como em endotoxemia, hepatite alcóolica e intoxicações agudas por monocrotalina [Jaeschke e Smith, 1997; Copple *et al*., 2003; Jaeschke e Hasegawa,2006].

2.3.1 Ativação e acumulação de neutrófilos no foco inflamatório.

Na inflamação aguda, logo nos estágios iniciais, há acúmulo predominante de neutrófilos, enquanto os leucócitos monunucleares são observados nas fases mais tardias e nos processos crônicos. A interação desses leucócitos circulantes com o endotélio vascular é o passo fundamental para o recrutamento destes para o foco de lesão [Farsky *et al*., 1995].

Em condições normais, os leucócitos circulam no centro da corrente sangüínea e os eritrócitos na área mais externa do vaso. Logo nos estágios iniciais da resposta inflamatória, a ação de mediadores químicos liberados pelos leucócitos circulantes e células endoteliais promove vasodilatação, com conseqüente diminuição da velocidade do fluxo sangüíneo e aumento de permeabilidade vascular com extravasamento plasmático. Nessa condição, os leucócitos deslizam sobre o endotélio vascular e aderem, momentaneamente, à parede do vaso. Esse comportamento leucocitário, denominado "roller", é o passo inicial e fundamental para migração leucocitária. Leucócitos "rollers" deslizam sobre o endotélio a uma

velocidade menor que o fluxo sangüíneo. Com o progredir da reação, o tempo de contato entre as membranas celulares aumenta até que finalmente os leucócitos permanecem aderidos à parede do vaso. Uma vez aderidas, as células migram através das junções interendoteliais, permanecendo um período de tempo entre o endotélio e a membrana basal e movem-se, orientadamente, no interstício em direção ao foco da lesão, respondendo a um gradiente de concentração de substâncias quimiotáticas geradas ou liberadas no foco de lesão [Adams e Lloyd, 1997; Niggli, 2003; Kelly *et al*., 2007].

Para ocorrer essa série de eventos de sinalização, aderência e migração, moléculas de adesão são requeridas (Figura 3). O contato inicial dos neutrófilos com o endotélio é mediado por selectinas e seus ligantes [Bevilacqua e Nelson, 1993; Granger e Kubes, 1994]. As selectinas pertencem a uma família de moléculas de adesão que são glicoproteínas transmembranas tipo I, dependente de cálcio [Kelly et al., 2007]. A função principal das selectinas é promover a captação de leucócitos junto aos sítios de inflamação. Sem essas moléculas, o recrutamento das células inflamatórias é significantemente diminuído [Arbones *et al*., 1994; Bullard *et al*., 1995; Johnson *et al*., 1995; Tedder *et al*., 1995; Bullard, *et al*., 1996]. Além disso, são sinalizadores envolvidos na ativação de leucócitos [Crockett-Torabi, 1998].

A família das selectinas é constituída por três membros, a L-selectina (CD62L) que se expressa sobre a superfície da maioria dos leucócitos, a P-selectina (CD62P) na superfície das plaquetas ativadas e células endoteliais, e a E-selectina (CD62E) na superfície das células endoteliais ativadas [Vestweber e Blanks, 1999].

O fenômeno de rolamento é um requisito para a subseqüente adesão e transmigração, as quais são mediadas pelos membros da família das integrinas (como a β2-integrina) e a superfamília das imunoglobulinas (como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1)) [Mayadas e Cullere, 2005]. As integrinas são ativadas por quimiocinas, citocinas quimioatraentes, as quais se ligam a receptores expressos em leucócitos. Além disso, muitas quimiocinas também são capazes de se ligar aos componentes da matriz extracelular, incluindo glicosaminoglicanas, e assim são imobilizadas e apresentadas aos leucócitos. Essa ligação é essencial, particularmente em condições de fluxo e promove ativação, adesão e migração de leucócitos [Kelly *et al*., 2007].

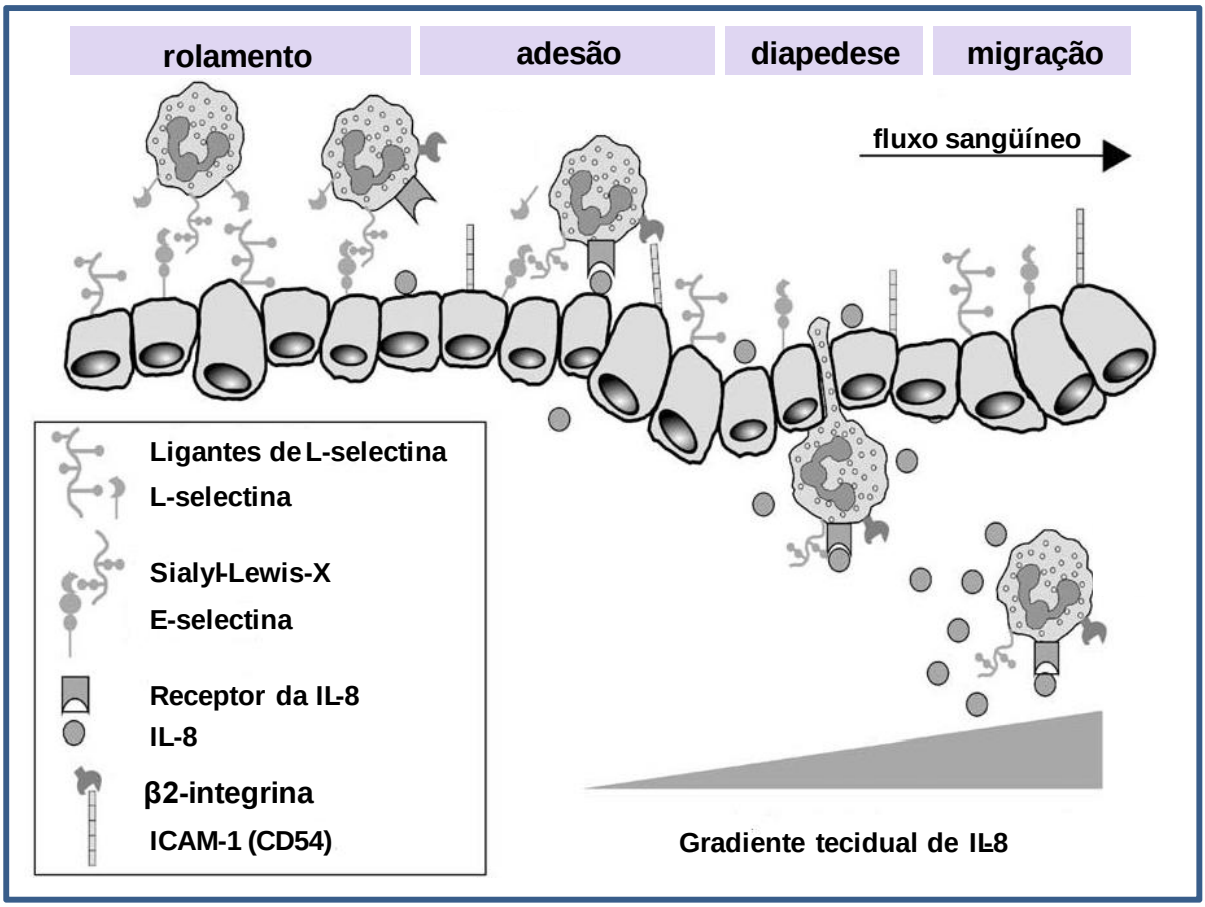


Figura 3. Interações celulares e moleculares durante migração de neutrófilos. Adaptada de Terheggen-Lagro *et al*. [2005].

Entre os fatores quimiotáticos, as quimiocinas são proteínas de baixo peso molecular (8-10 kDa), as quais atraem leucócitos da corrente sanguínea para os tecidos extravasculares. As citocinas são classificadas em quatro subfamílias, com base na presença de cisteínas no grupo amino terminal: CXC, CC, CX3C e C [Murphy *et al*., 2000; Gangur *et al*., 2002]. Dentre elas, as CXC podem ser subclassificadas em CXC Glu - Leu - Arg $(ELR)^+$ e as ELR^-, com base na presença ou ausência de um tripeptídeo ELR no grupo NH_2 terminal. A interleucina-8 (IL-8) pertence à subfamília CXC ELR^+ [Murphy *et al*., 2000]. A característica das quimiocinas ELR^+ é a sua capacidade para recrutar especificamente neutrófilos em tecidos inflamados. A acumulação de neutrófilos mediada por quimiocinas em sítios de inflamação é um processo seqüencial (rolamento - aderência - transmigração) e ocorre como resultado de alterações moleculares na superfície do endotélio em resposta a estímulos inflamatórios [Terheggen-Lagro *et al*., 2005].

2.3.2 Dano tecidual mediado por neutrófilos em inflamação hepática.

Os neutrófilos contribuem para a lesão hepática em algumas doenças, incluindo insuficiência hepática, endotoxemia, septicemia, hepatite por bebidas alcoólicas, choque hemorrágico, colestase obstrutiva e lesões hepáticas induzidas por alguns xenobióticos [Dorman *et al*., 2005].

O mecanismo básico de fisiopatologia mediada por neutrófilos no fígado requer a acumulação de neutrófilos ativados e pré-ativados na vasculatura hepática, extravasamento para o parênquima e a citotoxicidade contra hepatócitos [Jaeschke e Smith, 1997]. Esse dano a células parênquimais mediado por neutrófilos no fígado é iniciado pela ativação e subseqüente acumulação de neutrófilos na vasculatura hepática, em particular nos sinusóides hepáticos (Figura 4) [Jaeschke e Hasegawa, 2006].

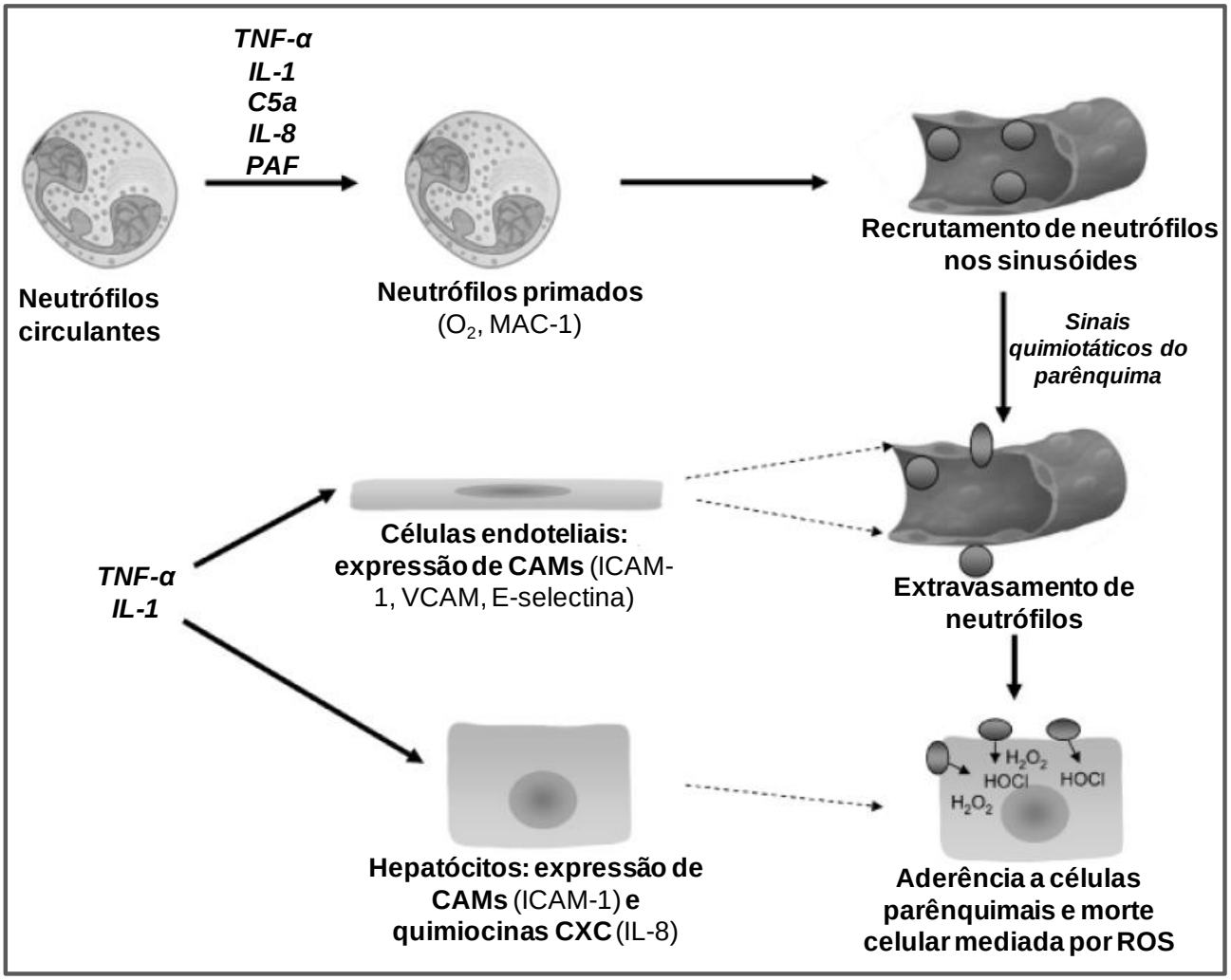


Figura 4. Mecanismos propostos de dano hepático mediado por neutrófilos. Adaptada de Jaeschke e Hasegawa [2006]. Para maiores detalhes veja o texto.

O acúmulo de neutrófilos pode ocorrer na veia porta, sinusóides e vênulas pós-sinusoidais, e extravasar de todos estes locais [Wong *et al*., 1997]. No entanto, a migração de neutrófilos a partir dos sinusóides é a mais crítica para lesão hepática [Chosay *et al*., 1997]. O passo inicial é mediado por mediadores inflamatórios, como TNF-α, IL-1α ou IL-1β, quimiocinas CXC [por exemplo, IL-8, citocinas, proteína inflamatória de macrófago-2 (MIP-2), citocina quimioatraente induzida de neutrófilos (CINC)], fatores de complemento ativados (por exemplo, C5a) e fatores de ativação de plaquetas (PAF). Se os neutrófilos receberem um desses sinais quimiotáticos do parênquima, as células serão extravasadas. Esse processo é dependente de β2-integrinas nos neutrófilos e de moléculas de adesão celular (ICAM-1 e VCAM-1) nas células do endotélio. Durante o processo de extravasamento e subseqüente adesão aos hepatócitos, os neutrófilos serão totalmente ativados e formarão ROS [Jaeschke *et al*., 2002].

A aderência de neutrófilos às células alvo via Mac-1 (CD11b/CD18) desencadeia a formação prolongada de ROS pela NADPH oxidase e desgranulação com liberação de mieloperoxidase (MPO) e proteases (Figura 5) [Jaeschke e Hasegawa, 2006]. Enquanto as proteases parecem estar mais envolvidas com a promoção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, o peróxido de hidrogênio e o ácido hipocloroso (HOCl) derivado da MPO induz um estresse oxidativo intracelular em hepatócitos [Jaeschke *et al*., 2002].

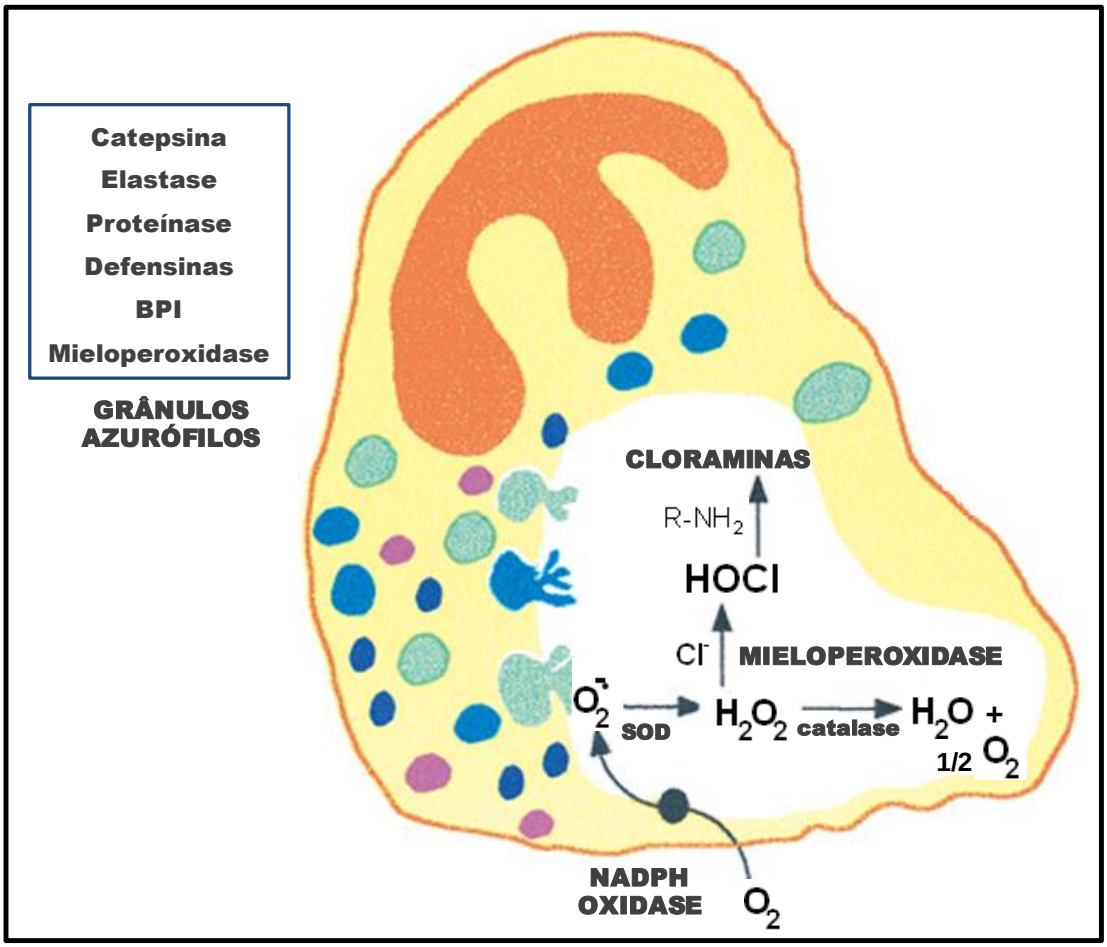


Figura 5. Esquema da formação de ânions superóxido pela NADPH oxidase e da desgranulação com liberação de mieloperoxidase e proteases (Adaptado de Witko-Sarsat *et al.,* 2000). Para maiores detalhes veja o texto.

Esse estresse oxidativo é iniciado com a formação de ânions superóxido, os quais a enzima superóxido dismutase (SOD) espontaneamente dismuta para oxigênio e peróxido de hidrogênio que é então usado pela MPO derivada de neutrófilos, para gerar HOCl, um potente oxidante, o qual também pode reagir com grupos de aminoácidos e formar cloraminas tóxicas. Por outro lado, os grânulos azurófilicos contêm um grande número de enzimas proteolíticas (por exemplo, elastase, catepsinas e protease-3), e peptídeos microbicidas (defensinas, proteínas que aumentam a permeabilidade de bactericidas (BPI), metaloproteinases da matriz e lisosimas) [Faurschou e Borregaard, 2003]. Esse processo requer menos de uma hora após a transmigração e ataque dos neutrófilos [Jaeschke *et al*., 1999] e pode induzir disfunção mitocondrial em hepatócitos, os quais podem desencadear um

estresse oxidativo mitocondrial adicional. Isso pode eventualmente desencadear a abertura de poro de transição de permeabilidade mitocondrial e o colapso do potencial de membrana mitocondrial em necroses oncóticas [Jaeschke e Hasegawa, 2006].

2.3.3 Influência de neutrófilos na toxicidade de microcistinas.

Os estudos histopatológicos dos tecidos hepáticos obtidos da necrópsia das vítimas da "Síndrome de Caruaru" apresentaram quadro de hepatite tóxica aguda, sendo observada infiltração leucocitária, com predominância de neutrófilos [Jochimsen *et al*., 1998; Pouria *et al*., 1998]. Esse recrutamento de neutrófilos deve-se principalmente ao dano inflamatório hepático, mas há trabalhos que sugerem que as MCs também possuem capacidade quimiotáxica para esses leucócitos [Hernández *et al.,* 2000; Kujbida *et al.,* 2006].

Em 2006 foi sugerido que há a possibilidade de os neutrófilos mediarem alguns dos efeitos tóxicos das MCs [US EPA, 2006], pelos resultados obtidos na avaliação de alguns efeitos das MC-LR e [Asp^3]-MC-LR em neutrófilos humanos *in vitro* [Kujbida *et al*., 2006]. Observou-se que esses compostos causaram migração de neutrófilos numa câmara de quimiotaxia, o que sugere que neutrófilos podem migrar da corrente sangüínea para órgãos que concentram MCs, como o fígado [US EPA, 2006]. Esse aumento de migração observado complementa os resultados publicados anteriormente por Hernández *et al*. [2000], os quais relatam a intensificação de aderência espontânea de neutrófilos humanos em presença de MC-LR. Foi revelado ainda que, concentrações, menores que a recomendada pela Organização Mundial da Saúde para a presença de MCs em água para consumo humano, tem capacidade de modular aderência celular.

Foi observado também que a MC-LR e [Asp^3]-MC-LR aumentaram a produção de ROS avaliada por quimiluminescência (amplificada pelo luminol) de produtos de desgranulação de neutrófilos e a fagocitose de *Candida albicans* por essas células. Mas somente a MC-LR aumentou a morte intracelular desse fungo [Kujbida *et al*., 2006].

Yoshida *et al.*[2001] observaram a presença de neutrófilos no foco necrótico hepático de camundongos expostos a MC-LR (injeção única por via i.p. de 60 µg/kg de p.c.), e também sugeriu que esse dano hepatocelular pode ocorrer em

associação com a expressão de TNF-α. Essa citocina induz diretamente danos a células endoteliais e a células parênquimais vizinhas, induzindo uma resposta que pode estar ligada a produção de ROS por mitocôndrias. TNF-α pode também induzir danos indiretamente, mediados pelo recrutamento de neutrófilos ativados, os quais também podem liberar ROS em grande quantidade no foco inflamatório [Luster *et al*., 1999], liberação essa que também foi comprovada por neutrófilos tratados com MCs [Kujbida *et al*., 2006].

Além do fígado, foi observado infiltrado de neutrófilos em pulmões de animais tratados com MC-LR. Em um estudo realizado para avaliar a toxicidade da MC-LR (260 - 265 µg de MC-LC/m^3) inalada por camundongos durante 7 dias, observou-se além de degeneração e necrose, concentração de neutrófilos no epitélio respiratório [Benson *et al*., 2005]. Outro estudo mostrou infiltração de neutrófilos no parênquima pulmonar em camundongos expostos a MC-LR (4 µg/kg de peso corpóreo) por via i.p. [Soares *et al.*, 2007].

Aqui foram expandidos nossos estudos prévios e investigados os efeitos das MC-LA, MC-YR e MC-LR em algumas funções de neutrófilos, com ensaios *in vitro, in vivo* e *in sito*.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral desse projeto foi estudar a ação das MC-LA, MC-YR e MC-LR sobre as funções de neutrófilos humanos e de ratos.

3.1 Objetivos específicos

- ✓ Estudar os efeitos das MC-LA, MC-YR e MC-LR na migração de neutrófilos de ratos pelas técnicas:
  - *in vivo*: avaliação do influxo de leucócitos durante uma resposta inflamatória pelo modelo da bolsa de ar e liberação das citocinas CINC-2αβ, IL-1β, TNF-α, VEGF-α e MIP-2;
  - *in sito*: avaliação do rolamento e adesão de neutrófilos na microcirculação;
  - *in vitro*: avaliação da síntese de RNAm e expressão das moléculas de adesão L-selectina e β_2-integrina;
  - *in vitro*: avaliação da migração de neutrófilos.

- ✓ Estudar os efeitos das MC-LA, MC-YR e MC-LR na viabilidade celular e ativação de neutrófilos humanos e de ratos (ensaios *in vitro*):
  - Avaliação da integridade de membrana celular;
  - Avaliação da fragmentação de DNA;
  - Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial;
  - Avaliação da produção de ROS;
  - Avaliação da produção das citocinas IL-8, TNF-α por neutrófilos humanos e CINC -2αβ, TNF-α por neutrófilos de ratos.

- ✓ Avaliar os efeitos das MC-LA, MC-YR e MC-LR no influxo de cálcio intracelular em neutrófilos de ratos;

- ✓ Avaliar os efeitos das MC-LA, MC-YR e MC-LR na produção de quimiocinas por células de Kupffer e hepatócitos isolados de ratos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza. Agentes utilizados na anestesia: pentabarbital sódico (Cristália, SP, Brasil), cloridrato de xilazina 2% - Calmiun® (Agener União, Embu-Guaçu, Brasil) e cloridrato de cetamina 0,116 g/mL - Dopalen® (Vetbrands, Jacareí, Brasil). Heparina foi adquirida da Roche (Basiléia, Suíça). Anticorpos monoclonais: FITC anti-rato CD18 (β_2-integrina) e anti-rato CD62L (L-selectina) da Pharmingen BD. Trizol, RPMI 1640, soro fetal bovino (SFB), colágeno bovino tipo I, penicilina/estreptomicina, Fluo-3AM, hidrocortisona e fosfoetalonamina (P/E) foram adquiridos da Invitrogen (Grand Island, NY, Estados Unidos). Os primers de Oligo(dT)15, de L-selectina e de β_2-integrina, o inibidor de ribonuclease, a transcriptase reversa do vírus da leucemia murina de Moloney, a Taq DNA polimerase e a mistura de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP) foram adquiridos da Promega (Madison, WI, Estados Unidos). Os kits de ELISA para análise de CINC-2αβ, TNF-α (Fator de necrose tumoral-α), MIP-2 (proteína inflamatória de macrófagos-2), VEGF-α (fator de crescimento endotelial vascular), IL-1β (interleucina-1β) e IL-8 foram adquiridas da R&D System (Minneapolis, MN, USA). O meio de cultura PFMR-4 com pouco cálcio foi adquirido da Culitlab (Campinas, SP, Brasil). O ácido retinóico foi adquirido da MP Biomedicals (Solon, OH, Estados Unidos). Ácido sulfúrico, lítio, butanol, xilol, fosfato de potássio monobásico, sulfato de magnésio, clorofórmio, etanol, isopropanol, cloreto de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, bicarbonato de sódio, cloreto de cálcio di-hidratado foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Dextran, histopaque® (d = 1,077), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), glicose, acetato de forbol miristato (PMA), lucigenina (nitrato de bis-N-metilacridino), MC-LR, MC-YR, MC-LA, HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico), estreptomocina, penicilina, iodeto de propídeo (IP), citrato de sódio, triton X-100, hidroetidina, rodamina 123, tween 20, azida sódica, glicogênio de ostra, fMLP, lipopolissacarídeo (LPS), L-glutamina, hematoxicilina, ionomicina A23187, transferrina, extrato de pituitária bovina, insulina, triidotirosina (T3), fator de crescimento endotelial, L-glutamina, fibronectina foram obtidos do Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos).

4.1.2 Equipamentos

Autoclave vertical (mod. 103, FABBE-PRIMA®); balança analítica (mod. AG204, Mettler Toledo®); centrífuga de bancada (mod. IV, rotor swing, Incibrás); centrífuga refrigerada (Himac CR 20B2 Hitachi®, rotor RPR 20-2); estufa de CO_2 com controle de temperatura e pressão (mod. CNW300a, Harris); leitor de Elisa (mod. SLT, Spectra®); luminômetro (mod. LB 96V, EG&G Berthorld®, para microplaca); microscópio óptico (mod. 81186, Nikon); pHmetro (Micronal® B374); FACS Calibur (Becton Dickinson® (BD)); vortex Genie 2 (Mod. G560, Scientific Industries, NY, USA); termociclador (Eppendorf); banho-maria (mod. TE-054 MAG, Tecnal, Brasil); câmara de fluxo laminar, microscópio óptico para microscopia intravital (Carl-Zeiss, AxioskopII); câmera de projeção de imagem (ZVS, 3C75DE, Carl-Zeiss), monitor de imagens (KS 300, Kontron); programa de análise de imagem (KS300, Carl-Zeiss); microscópio confocal de escaneamento a laser (LSM 410, Carl Zeiss, Jena, Alemanha); câmara de Neubauer (Optic Labor); agulhas vacutainer (BD); adaptador para tubo de coleta de sangue a vácuo (BD); tubo para coleta de sangue a vácuo sem anticoagulante (BD); microplacas para luminômetro; microplacas de 24 e 96 poços estéreis para cultura celular; filtros fluoropore 0,22 µm e de celulose 8 µm (Millipore), seringas de plástico de 1 e 10 mL (BD), tubos de plástico de 15 e 50 mL tipo Falcon; placas de imunodifusão; cuba de vidro com tampa; lâminas; lamínulas.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Casuística.

Foram realizados ensaios com três MCs: MC-LA, MC-YR e MC-LR (1 – 1000 nM).

Para a realização dos ensaios foram isolados neutrófilos humanos de doadores voluntários saudáveis após aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade de São Paulo (USP) (Ofício CEP: 135/2004 – anexo I), e consentimento dos doadores (ficha-modelo no anexo II). Foram incluídos neste estudo doadores de sangue periférico que não tinham administrado nenhum tipo de medicamento antiinflamatório, e nem estavam com qualquer sintoma de doença, até 24 horas antes da coleta. O volume coletado foi de 10 mL de cada doador. As coletas foram realizadas no Setor de Bioquímica do Laboratório de Análises Clínicas da FCF/USP.

Nos ensaios com animais, foram utilizados ratos Wistar machos adultos, de aproximadamente 2 meses de idade (180 ± 20 g), saudáveis, provenientes do Biotério de Produção e Experimentação da FCF e Instituto de Química da USP (Protocolo de aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP, nº 24/2007 – anexo III). Os ratos foram mantidos a 23 ºC em ciclo de luz claro:escuro (12:12h). Comida e água foram dadas *ad libitum*. Em procedimentos que possam causar dor, os ratos foram anestesiados por injeção i.p. de pentobarbital sódico (65 mg/kg) ou 200 – 250 µL de uma solução de cloridrato de cetamina:cloridrato de xilazina (2:1). Os procedimentos referentes ao tratamento dos animais seguem as regras da Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP.

Os ensaios com neutrófilos foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky, a Profa. Dra. Ana Campa (ambas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – FCF/USP) e o Prof. Rui Curi (Departamento de Fisiologia e Biofísica - ICB/USP). Já os isolamentos de hepatócitos e células de Kupffer foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Ligia Ferreira Gomes (Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – FCF/USP).

4.2.2 Isolamento de neutrófilos de ratos.

Dois métodos de separação de neutrófilos de ratos foram utilizados, dependendo do ensaio a ser realizado.

Método I: Os neutrófilos foram obtidos após 4 h da injeção i.p. de 10 mL de solução de glicogênio de ostra (1 %) em solução tampão fosfato salina (PBS) estéril. Os animais foram anestesiados com uma injeção i.p. de 200-250 µL de uma solução 2:1 de cloridrato de cetamina (0,116 g/mL):cloridrato de xilazina (2%). As células foram coletadas por lavagem da cavidade abdominal com 40 mL de PBS estéril [Lagranha *et al.,* 2005] após 4 horas da indução com glicogênio de ostra. A suspensão celular foi centrifugada a 4 ºC (500 g durante 10 minutos) em 50 mL de PBS. O sobrenadante foi ressuspendido com solução de lise (solução de cloreto de amônio (0,13 M)) e centrifugado a 4 ºC (500 g durante 10 minutos). O número de células viáveis (> 98 %) foi contado com auxílio de câmara de Neubauer, corante Trypan Blue e microscópio óptico.

Método II: Após os ratos serem anestesiados com uma injeção i.p. de 200-250 µL de uma solução 2:1 de cloridrato de cetamina (0,116 g/mL):cloridrato de xilazina (2%), foi realizado uma punção cardíaca do sangue total em seringa heparinizada (5000 U/mL). A suspensão celular foi centrifugada a 4 ºC (500 g durante 10 minutos) em 50 mL de PBS. O precipitado foi ressuspendido com solução de lise (solução de cloreto de amônio (0,13 M)) e centrifugado a 4 ºC (500 g, 10 minutos). Após o precipitado ser ressuspendido com meio RPMI suplementado com 10% de SFB, o número de células viáveis (> 98 %) foi contado com auxílio de câmara de Neubauer, corante Trypan Blue e microscópio óptico.

4.2.3 Isolamento de neutrófilos humanos.

O sangue periférico (10 mL) de doadores voluntários saudáveis, foram coletados a vácuo pelo sistema de Vacutainer® (Beckton Dickinson) com tubo com anticoagulante EDTA. Os neutrófilos foram isolados como descrito previamente por Boyum [Boyum, 1968], usando um gradiente comercial Ficoll-Hypaque® (histopaque). Após a adição cuidadosa do sangue num tubo contendo 10 mL de histopaque, o tubo foi centrifugado a 2500 rpm a temperatura ambiente por 20 minutos. O sobrenadante, rico em células mononucleares foi descartado, e 10 mL de dextran 5 % em PBS foram adicionados ao precipitado. O tubo foi homogeneizado e mantido por 30 minutos a temperatura ambiente para permitir a sedimentação de eritrócitos. O sobrenadante resultante, rico em granulócitos, foi recuperado, lavado com PBS e novamente centrifugado a 2500 rpm, a temperatura ambiente por 5 minutos. Após, o precipitado foi submetido a tratamento hipotônico com 10 mL de água destilada gelada para promover a lise de eritrócitos contaminantes. Após 1 minuto, a isotonicidade foi reestabelecida pela adição de 5 mL de NaCl 2,7% e 15 mL de PBS para a nova centrifugação a 2500 rpm a temperatura ambiente por 5 minutos. O precipitado celular foi ressuspenso em meio de cultura. O número de células viáveis (> 98 %) foi contado com auxílio de câmara de Neubauer, corante Trypan Blue e microscópio óptico.

4.2.4 Avaliação da migração de leucócitos pelo modelo de bolsa de ar.

Para avaliar a inflamação, o modelo de cavidade de bolsa de ar induzida no tecido subcutâneo dorsal de roedores, via coleta de exsudatos, tem sido empregado [Freire

et al., 2003; Carvalho *et al*., 2005; Costa *et al*., 2008]. A cavidade da bolsa é caracterizada pela neovascularização e infiltração de células residentes, muito semelhantes à sinoviais [Sin *et al*., 1986; Sedgwick e Lees, 1986 a;b]. Foi preparada uma bolsa de ar na pele do rato como descrito em Farsky *et al.* [1997]. Para isso, foi insuflado um volume de 20 mL de ar estéril (usando filtros fluoropore, 0,22 μm) no tecido subcutâneo do tronco dorsal dos ratos anestesiados por injeção i.p. de pentobarbital sódico (65 mg/kg). Após 7 dias um volume adicional de 10 mL de ar estéril foi insuflado no mesmo local, e no oitavo dia, 1 mL de soluções de MC (1 e 1000 nM) em PBS estéril foram injetados na bolsa de ar, em condições assépticas e no rato anestesiado, como descrito acima. Animais de controle negativo receberam 1 mL de PBS estéril (veículo das soluções de toxinas e de controle positivo), e os de controle positivo receberam fMLP (10 nM) através da mesma via.

Após 4 horas da injeção de MC, os animais foram mortos por decapitação e o exsudato inflamatório foi coletado após lavagem da cavidade da bolsa de ar com 10 mL de PBS estéril. A suspensão foi centrifugada à 500 g por 10 minutos a - 4 ºC. Após isto, as células foram ressuspendidas em 1 mL de PBS. O número de células foi determinado usando câmara de Neubauer e microscópio óptico.

4.2.5 Avaliação de citocinas (CINC-2αβ, IL-1β, TNF-α, VEGF-α e MIP-2) presentes nos exsudatos obtidos nos ensaios da bolsa de ar.

Os exsudatos inflamatórios foram coletados e centrifugados no final dos ensaios de migração pelo modelo de bolsa de ar. Os sobrenadantes foram congelados à -80 ºC.

A produção de citocinas foi avaliada por ELISA. As determinações de CINC-2αβ, IL-1β, TNF-α, VEGF-α e MIP-2 foram realizadas através de kits de ELISA, como descrito a seguir.

Preparo da Placa:

1. O anticorpo de captura foi diluído em PBS, na concentração final desejada. Foram colocados 100 μL do anticorpo diluído por poço, a placa foi coberta e incubada por 20 horas a temperatura ambiente.

2. No dia seguinte, os poços foram aspirados e lavados com tampão de lavagem (0,05 % Tween 20 em PBS, pH 7,4) três vezes seguidas. Cada lavagem contendo 400 μL do tampão. Todo o tampão foi removido após a última lavagem.
3. As placas foram bloqueadas adicionando 300 μL de tampão bloqueador (1 % de BSA, 5 % de sucrose em PBS com 0,05 % de azida sódica), sendo incubadas a temperatura ambiente por 1 hora.
4. As lavagens e aspirações foram repetidas e as placas foram secas à vácuo.

Procedimento de dosagem:

1. Quando necessário, a diluição de amostras ou padrões foram preparadas com o reagente diluente (0,1 % de BSA, 0,05% Tween 20 em tampão Tris-salina, pH 7,4), por poço, finalizando 100 μL de amostra. As placas foram cobertas com fita adesiva e incubada por 2 horas a temperatura ambiente.
2. As aspirações e lavagens do passo dois do preparo das placas foram repetidas.
3. 100 μL do anticorpo de detecção diluído no reagente diluente foi adicionado. A placa foi coberta novamente com fita adesiva e incubada por duas horas a temperatura ambiente.
4. As aspirações e lavagens do passo 2 do preparo das placas foram repetidas.
5. 100 μL de estreptavidina-HRP (diluída 1:200 no reagente diluente) foi adicionado e a placa foi incubada 20 minutos a temperatura ambiente evitando luz direta.
6. As aspirações e lavagens do passo 2 do preparo das placas foram repetidas.
7. 100 μL da solução substrato em cada poço foi adicionado e incubado durante 20 minutos a temperatura ambiente evitando luz direta. A solução substrato foi preparada diluindo-se o reagente colorido A (peróxido de hidrogênio) e o reagente colorido B (tetrametilbenzidina) na proporção 1:1.
8. 50 μL da solução “stop” (ácido sulfúrico, 2 N) foi adicionado em cada poço, homogeneizando.
9. A densidade óptica das placas foram determinada imediatamente a 450/550 nm.
10. Os resultados foram expressos através da construção de uma curva padrão linear com oito pontos, de concentrações conhecidas, conforme orientações do fabricante.

4.2.6 Avaliação do comportamento de rolamento e aderência de leucócitos pela técnica de microscopia intravital.

O ensaio de microscopia intravital foi realizado como descrito por Farsky *et al*. [1995]. Ratos anestesiados por injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (65 mg/kg), tiveram o mesentério exteriorizado. Após cirurgia, os animais foram mantidos numa tábua especial com temperatura controlada (37 ºC), que inclui uma plataforma transparente na qual o tecido a ser trans-iluminado foi posicionado. A preparação foi mantida úmida e aquecida por irrigação do tecido com uma solução aquecida a 37 ºC de Ringer-Locke (pH 7,2-7,4; cloreto de sódio (154 mM); cloreto de potássio (5,6 mM); cloreto de cálcio di-hidratado (2 mM); bicarbonato de sódio (6 mM), glicose (5 mM) e gelatina (1 %)). A razão de fluxo da solução no tecido em exposição foi controlada para manter a preparação em contato contínuo com um filme de líquido. Vênulas pós-capilares foram expostas topicamente a MC-LA, MC-YR e MC-LR (1 nM) por 10 minutos antes da avaliação. Imagens trans-iluminadas foram obtidas por microscopia óptica. As imagens foram capturadas por uma câmera e foram transmitidas simultaneamente em um monitor de TV e um computador.

A interação entre leucócitos e parede dos vasos foi avaliada pela determinação do número de leucócitos que rolaram e aderiram na parede da veia capilar (20-30 µm de diâmetro, 200 µm de comprimento) do mesentério em intervalos de 10 minutos. Três campos foram avaliados em cada animal após a aplicação de 20 µL de MCs (1 nM) sobre os vasos com auxilio de uma pipeta. Os leucócitos que se movimentaram na corrente axial periférica, em contato com o endotélio, foram considerados “rollers”. Esses leucócitos moveram-se suficientemente lentos para serem visivelmente individualizados e contados quando eles passaram rolando por um ponto selecionado num dos lados da veia durante 10 minutos após o tratamento com MC. O número de leucócitos que aderiram ao endotélio (pararam na parede da veia) foi determinado no mesmo segmento vascular após 10 minutos da adição de cada MC.

4.2.7 Avaliação da síntese de mRNA de moléculas de adesão pelo ensaio de PCR-RT.

Os neutrófilos foram isolados de sangue da aorta abdominal como descrito no método II de isolamento de neutrófilos de ratos. As células (2,5 x 10^7) foram incubadas com MC-LA, MC-YR, MC-LR (1000 nM), Hanks ou fMLP (10 nM) por 4

horas (37 ºC; 5% de CO_2) em placa de 24 poços. Após incubação, as amostras foram transferidas para eppendorfs e centrifugadas por 15 minutos (94 ºC, 0,6 g).

Extração de RNA. Para extração do RNA total, foi realizada a seguinte sequência de procedimentos:

- Lise do precipitado com 1 mL de trizol e incubação por 5 minutos (15 - 30 ºC);
- Adição de 200 µL de clorofórmio, agitação por 15 segundos, em vortex e incubação da amostra por 3 minutos (15 - 30 ºC);
- Centrifugação da amostra 12000 *g* por 15 minutos (2 - 8 ºC);
- Adição de 500 µL de isopropanol, agitação por 15 segundos, em vortex, e incubação por 10 minutos (15 - 30 ºC);
- Centrifugação a 12000 *g* por 10 minutos (2 - 8 ºC);
- Remoção do sobrenadante e lavar o pellet com 1 mL de etanol 75º GL;
- Após agitação em vortex, centrifugação a 7500 *g* por 5 minutos (2 - 8 ºC);
- O sobrenadante foi desprezado por inversão do tubo e o mesmo permaneceu em repouso até secagem do precipitado;
- O precipitado seco foi dissolvido em 30 µL de água DEPC (livre de RNAse).
- A extração de RNA foi realizada em ambiente sem RNAse. O RNA foi quantificado pela leitura da absobância da solução de RNA à 260 nm.

PCR-RT. Os cDNAs foram sintetizados de 1 µg de RNA total usando um “primer” oligo(dT)15 (20 mg/mL) após incubação à 70 °C por 15 minutos no termociclador.

A reação de transcrição reversa foi realizada pela incubação de 2 mM de uma mistura de dNTP, inibidor de ribonuclease (20 U) e transcriptase reversa do vírus da leucemia murina de Moloney (M-MLV-RT) (200 U) num volume final de 25 µL em tampão de M-MLV-RT à 42 °C por 60 minutos no termociclador.

Para PCR, o cDNA obtido foi incubado com 2,5 U de Taq DNA polimerase, 0,4 mM de “primers” específicos e 200 mM de mistura de dNTP em tampão termofílico de DNA polimerase, contendo 1,5 mM de cloreto de magnésio. As seqüências de “primer” usadas foram GAPDH, 5’-TATGAT GACATCAAGAAGGTGG-3’ (“forward”) e 5’-CACCACCCTGTTGCTGTA-3’ (reverso); L-selectina, 5’-AACGAGACTCTGGGAAGT-3’ (“forward”) e 5’-CAAAGGCTCACATTGGAT-3’ (reverso); β_2-integrina, 5’-

TGCGCCCCTCACTGCTGCTTG-3' ("forward") e 5'-GAGATCCATGAGGTAGTACAGATC-3' (reverso).

As reações de PCR ocorreram em 30 ciclos de desnaturação das cadeias de DNA (94 ºC por 2,5 minutos), anelamento dos "primers" ao DNA alvo (54ºC para β_2-integrina e GAPDH e 51 ºC para L-selectina por 45 segundos) e extensão dos "primers" (72º C por 4 minutos).

A eletroforese em gel de agarose do fragmento de DNA amplificado por PCR foi preparado com 2 g de agarose e 100 mL de TAE 1 % (Tris, ácido acético glacial, EDTA 0,5 M e água) em aquecimento brando. Após a polimerização, o gel foi transferido para a cuba e foi adicionado tampão de corrida (TAE 1 %) e aplicados 16 µL de cada amostra em cada poço. A corrida eletroforética ocorreu com voltagem de 100 V.

Após o término da corrida, o gel foi corado com brometo de etídio por 15 minutos, fotografado em uma cabine multimage TM light. A imagem das bandas foram analisadas com o programa Scion Image pela expressão relativa de intensidade das bandas das moléculas de adesão analisadas com as de GAPDH correspondente.

4.2.8 Avaliação de expressão de moléculas de adesão na membrana plasmática de neutrófilos pela técnica de citometria de fluxo.

O ensaio de citometria de fluxo para avaliação de expressão das moléculas de adesão L-selectina e β_2-integrina foi realizado como descrito por Farsky *et al*. [1997]. Para esse experimento, os neutrófilos de ratos foram obtidos pelo método II de isolamento. Placas de 6 poços (o volume final em cada poço foi de 1 mL) foram preparadas em fluxo laminar para incubação dos neutrófilos (1,5 x 10^6 células/mL) com as toxinas MC-LA, MC-YR e MC-LR (1000 nM) ou fMLP (0,01 nM). Após incubação por 4 horas em estufa (37 ºC; 5% de CO_2) a suspensão celular de cada poço foi ressuspendida, e 500 µL de cada amostra foram transferidos para tubos específicos para análise em FACS (seleção de células ativadas pela fluorescência). Para análise de expressão de β_2-integrina foram acrescentados nos tubos 10 µL de fMLP, e incubados em banho-maria a 37 ºC por 30 minutos. Para análise de expressão de L-selectina foram acrescentados nos tubos 10 µL de fMLP (mas esses tubos foram incubados por apenas 15 minutos). Após o tempo de incubação, os

tubos foram centrifugados (4 ºC; 1500 rpm; 10 minutos), e os sobrenadantes foram descartados. Os precipitados foram lavados com 1 mL de PBS (suplementado com 10 % de glicose e 10% de cloreto de magnésio) e após nova centrifugação, os precipitados foram ressuspendidos com 90 µL de fMLP e 10 µL de anticorpo monoclonal contra L-selecina ou β_2-integrina (50 µg/mL) e homogeneizados suavemente. Os tubos foram encapados com papel alumínio e guardados em geladeira por 20 minutos. Imediatamente após a incubação, as células foram analisadas em um citômetro de fluxo FACS Calibur. Os dados de dez mil células foram obtidos e somente neutrófilos viáveis morfologicamente foram considerados para análise.

4.2.9 Avaliação de migração *in vitro* pelo ensaio com câmara de quimiotaxia de Boyden.

O ensaio de migração foi realizado usando câmara de quimiotaxia com vários poços como descrito previamente por Boyden [1962].

As células foram obtidas como descrito no método I de isolamento de neutrófilos de ratos. Para avaliar a capacidade da MC-LA, MC-YR ou MC-LR induzir migração de neutrófilos, alíquotas de suspensão celular contendo 1,5 x 10^6 neutrófilos (em solução salina balanciada de Hanks (HBSS) (contendo 0,01% de albumina) foram adicionadas no compartimento superior da câmara em um filtro de celulose de poros com tamanho de 8 µm (Millipore). Os compartimentos inferiores foram preparados como a seguir: HBSS contendo o agente quimiotático fMLP (10 nM) nos poços que representam os controles positivos, somente HBSS nos poços que representam os controles negativos e soluções de MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1, 100 e 1000 nM em HBSS) nos poços testes.

As células foram incubadas por 60 minutos (ar umidificado, 37 ºC, 5% CO_2), e em seguida os filtros foram removidos para fixação e coração das células. Para realização de coloração dos filtros, pela técnica de Hematoxicilina de Harris, os filtros foram tranferidos para placas de imunodifusão, e com auxílio de uma pipeta Pasteur foram acrescentados (minutos de reação): etanol absoluto (5 min.); água destilada (2 min.); hematoxicilina (60 seg.); água destilada (2 min.); “Tap Water” {solução saturada de lítio (1 mL do sobrenadante) para 100 mL de água destilada} (10 min.);

etanol 70% (10 min.); etanol 95% (10 min.); butanol + etanol {80 mL de álcool butílico + 20 mL de álcool etílico} (10 min.).

Após coloração, cada par de filtro foi transferido para um béquer com xilol (dentro de uma cuba de vidro tampada), onde permaneceu por toda a noite. Para fixar os filtros, eles foram transferidos para lâminas de vidro de microscopia; foi adicionada uma gota de bálsamo do Canadá sobre cada filtro e lâminula.

A migração de neutrófilos nos filtros foi determinada por microscopia como descrito por Zigmound e Hirsch (1973). A distância percorrida pelos neutrófilos foi avaliada do topo do filtro para o plano mais afastado que continham duas células, com uma objetiva de aumento de 40x. Para cada substância avaliada foram utilizados dois poços, e cinco campos foram contados em cada filtro. No total foram realizados cinco ensaios para cada substância, portanto vinte e cinco campos foram avaliados para cada teste e controles.

Para investigar a influência das MC-LA, MC-YR ou MC-LR na migração de neutrófilos induzida pelo fMLP, alíquotas de suspensão celular contendo 1,5 x 10^6 neutrófilos foram adicionados ao compartimento superior da câmara após incubação por 60 minutos (37 ºC, 5% CO_2) com MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1, 100 e 1000 nM). Após esse período de incubação, as células foram lavadas e ressuspendidas com HBSS contendo 0,01% de albumina para serem empregadas no ensaio de quimiotaxia. O agente quimiotático fMLP (10 nM) foi adicionado no compartimento inferior em cada poço da placa, exceto nos poços de controle negativo (somente HBSS). As células foram incubadas por 60 minutos (ar umidificado, 37 ºC, 5% CO_2), em seguida os filtros foram removidos e os mesmos métodos de fixação, coloração e avaliação de migração celular foram usados como descrito anteriormente.

4.2.10 Avaliação da integridade de membrana celular de neutrófilos pela técnica de citometria de fluxo.

A integridade de membrana celular de neutrófilos tratados com MCs foi avaliada por citometria de fluxo. Nesse método (descrito por Cury-Boaventura *et al*. [2006]) as células com membrana íntegra não permitem a entrada do IP, portanto apresentam baixa fluorescência. Já células cuja membrana esteja rompida permitem a entrada do IP, que se liga ao DNA, emitindo alta fluorescência quando excitadas pelo laser.

Neutrófilos (2,5 10^6 células/mL) de ratos (isolados pelo método I) e humanos ressuspendidos em RPMI 1640 (suplementado com glutamina (0,3 g/L), Hepes (2,32 g/L), bicarbonato de sódio (2 g/L), estreptomicina (100 µg/mL), penicinina (100 UI/mL) e SFB (10%)) foram cultivados com MC-LA, MC-YR e MC-LR (1 e 1000 nM), à 37°C e 5 % de CO_2. Após 24 h, as células foram centrifugadas a 1000 g por 15 minutos a 4ºC e o precipitado obtido foi ressuspendido em 50 µL de PBS. Depois, 50 µL de solução de IP (50 mg/mL em PBS) foram adicionados. Os neutrófilos foram analisados por um citômetro de fluxo FACS Calibur, que é um separador de células ativado por fluorescência, o qual mede a intensidade de fluorescência de cada célula. Dez mil eventos foram analisados por experimento. As células com IP fluorescentes foram avaliadas pelo programa "Cell Quest". O IP é excitável por laser de argônio (480 nm) e emite fluorescência na faixa de 560-580 nm.

4.2.11 Avaliação da fragmentação de DNA de neutrófilos pela técnica de citometria de fluxo.

A fragmentação de DNA foi avaliada por citometria de fluxo de acordo com o método descrito por Nicoletti *et al*. [1991]. Após o rompimento celular pelo tampão de lise, os núcleos são expostos e o IP se liga ao DNA. As células contendo núcleos íntegros emitem alta fluorescência, enquanto a condensação da cromatina e da fragmentação de DNA pode ser observada pela ocorrência de eventos com baixa fluorescência. Isto se deve a menor marcação do DNA com o IP devido à condensação da cromatina. Além disso, pedaços menores de DNA captam menos IP, emitindo menor fluorescência [van Engeland *et al*., 1998].

Neutrófilos (2,5 10^6 células/mL) de ratos (isolados pelo método I) e humanos ressuspendidos em RPMI 1640 (suplementado com glutamina (0,3 g/L), Hepes (2,32 g/L), bicarbonato de sódio (2 g/L), estreptomicina (100 µg/mL), penicinina (100 UI/mL) e SFB (10%)) foram cultivados com MC-LA, MC-YR e MC-LR (1 e 1000 nM), com ou sem LPS (5 µg/mL), à 37°C e 5 % de CO_2. Após 24 h, as células foram centrifugadas a 1000 g por 15 minutos a 4ºC. O precipitado obtido foi delicadamente ressuspendido em 300 µL do tampão de lise (contendo citrato de sódio (0,1 %), Triton X-100 (0,1 %) e IP (5 µg/mL)) e as células foram incubadas por 2 h a 4 ºC.

Após o tempo de incubação, os neutrófilos foram analisados por FACS. Dez mil eventos foram analisados por experimento. As células com IP fluorescentes foram

avaliadas pelo programa “Cell Quest”. O IP é excitável por laser de argônio (480 nm) e emite fluorescência na faixa de 560-580 nm.

4.2.12 Avaliação de potencial transmembrânico mitocondrial (MTP) de neutrófilos pela técnica de citometria de fluxo.

O potencial transmembrânico da mitocôndria foi avaliado por citometria de fluxo. Nesse método a rodamina 123 é um corante fluorescente catiônico permeável a membrana celular, e é rapidamente seqüestrado por mitocôndrias ativas sem induzir efeitos tóxicos. Esse corante é excitável por laser de argônio (480 nm) e emite fluorescência na faixa de 515-530 nm. Células com potencial transmembrânico inalterado captam a rodamina e emitem alta fluorescência quando atingidas pelo laser. Alterações no potencial mitocondrial transmembrânico levam ao efluxo da rodamina de dentro da mitocôndria, gerando eventos que emitirão menor fluorescência [Kroemer *et al*., 1998].

Os neutrófilos de ratos (isolados pelo método I) e humanos foram tratados com 1 µL de solução de rodamina 123 (5 mg/mL diluída em etanol). Essas células (2,5 10^6 células/mL) foram incubadas com MC-LA, MC-YR ou MC-LR por 15 minutos a 37 ºC, em ambiente escuro. Após o período de incubação, as células foram lavadas duas vezes com 0,5 mL de PBS e incubadas por 30 minutos a 30 ºC, em ambiente escuro. A fluorescência de dez mil eventos foi determinada por citometria (fluorescência no λ= 515-530 nm – FL1).

4.2.13 Avaliação da produção das citocinas: IL-8 (por neutrófilos humanos), CINC-2αβ (por neutrófilos de ratos) e TNF-α (por neutrófilos humanos e de ratos).

Neutrófilos (2,5 10^6 células/mL) de ratos (isolados pelo método I) e humanos ressuspendidos em RPMI 1640 (suplementado com glutamina (0,3 g/L), Hepes (2,32 g/L), bicarbonato de sódio (2 g/L), estreptomicina (100 µg/mL), penicinina (100 UI/mL) e soro fetal (10%)) foram cultivados com MC-LA, MC-YR e MC-LR (1 e 1000 nM) à 37 °C e 5 % de CO_2. Após 24 h, os sobrenadantes foram coletados e congelados à -80 ºC até o momento em que as citocinas foram determinadas por kits de ELISA, como descrito no ítem 4.2.5. Os resultados foram

expressos através da construção de uma curva padrão linear com oito pontos, de concentrações conhecidas, conforme orientações do fabricante.

4.2.14 Avaliação de produção de ROS por neutrófilos pela técnica de quimiluminescência amplificada por lucigenina.

Uma das técnicas utilizadas para avaliar a liberação de ânions superóxido foi a de quimiluminescência amplificada por lucigenina, realizado de acordo com o método descrito por Hatanaka *et al.* [2006]. Após ser excitada pelo ânion superóxido, a lucigenina libera energia em forma de luz [Stevens e Hong, 1984].

Neutrófilos de ratos (isolados pelo método I) e humanos foram ressuspendidos em PBS (suplementado com cloreto de cálcio (1mM), cloreto de magnésio (1,5 mM) e glicose (10 mM), à 37 ºC, no volume final de 0,3 mL. Neutrófilos (2,5 10^6 células/mL) foram tratados com MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1 e 1000 nM), e imediatamente após adicionado o reagente lucigenina (1 nM). Após 20 minutos, o PMA (16 ng/mL) foi adicionado e a monitorização da produção de ROS foi reiniciada. A leitura foi realizada em luminômetro.

4.2.15 Avaliação de produção de ROS por neutrófilos pela técnica de citometria de fluxo.

Outra técnica utilizada para medir a liberação de ROS foi a citometria de fluxo, realizada de acordo com o método descrito por Hatanaka *et al*. [2006]. A hidroetidina, um derivado de brometo de etídeo reduzido, é usada para medida de produção de ROS intracelular. Esse reagente penetra facilmente nas células e mostra picos de fluorescência quando excitada por luz no comprimento de onda de 480 nm. Na reação, a hidroetidina é oxidada intracelularmente por radicais livres, sendo convertida em brometo de etídeo, o qual se liga firmemente ao DNA e mostra uma forte fluorescência vermelha [Rothe e Valet, 1990].

Os neutrófilos (2,5 10^6 células/mL) de ratos (isolados pelo método I) foram tratados com MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1 e 1000 nM), hidroetidina (1 µM), PMA (16 ng/mL) e PBS (suplementado com cloreto de cálcio (1 mM), cloreto de magnésio (1,5 mM) e glicose (10 mM)), à 37 ºC, no volume final de 0,3 mL. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, no escuro, a fluorescência foi medida usando o

canal FL3 num citômetro de fluxo FACS Calibur®. Dez mil eventos foram analisados por experimento.

4.2.16 Avaliação do influxo de cálcio intracelular em neutrófilos pela técnica de microscopia confocal.

A concentração intracelular de íons cálcio ($[Ca^{2+}]_i$) em neutrófilos em contato com as MCs foi analisada por microscopia confocal pelos procedimentos descritos por Lotufo [2003]. Os neutrófilos foram obtidos como descrito no método I de isolamento de neutrófilos de ratos. As células foram coletadas por lavagem da cavidade abdominal com 40 mL de tampão Krebs-HEPES estéril (cloreto de sódio (120 mM), cloreto de potássio (4,8 mM), fosfato de potássio monobásico (1,2 mM), sulfato de magnésio (1,2 mM), cloreto de cálcio (1,3 mM), HEPES (25 mM), BSA (0,1 %), pH 7.3), e incubadas com o indicador de cálcio Fluo-3AM (1 mM) por 45 minutos, à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, os neutrófilos foram lavados e ressuspendidos a 4 x 10^6 cells/mL em tampão Krebs-HEPES. Para cada experimento, 35 µL de suspensão celular foram adicionados a um disco de cultura com centro de vidro. Após 10 minutos de repouso, para aderência celular, o disco foi instalado no microscópio confocal. As células foram focalizadas no microscópio confocal usando uma objetiva de 63x. Após as primeiras imagens serem adquiridas, a MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1000 nM) foram suavemente adicionadas aos discos. Imediatamente após estimulação com as MCs, a $[Ca^{2+}]_i$ foi analisada pelo microscópio confocal. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 506/526 nm, respectivamente. As amostras foram escaneadas a cada segundo por 200 segundos. A $[Ca^{2+}]_i$ a cada ponto escaneado foi analisado e integrado por 95 segundos. A fluorescência emitida por célula foi avaliada através do programa LSM 510 (Zeiss). Cada placa foi utilizada para apenas um experimento. Os valores de 5 células por grupo experimental foram obtidos e a média ± SE da intensidade de fluorescência dessas células foram então calculadas. Ao final de todos os experimentos foi adicionado o ionóforo para íons cálcio (A23187, 100 µM) seguido de um agente quelante para cálcio (EDTA, 4 mM). Desta forma os níveis máximos e mínimos de $[Ca^{2+}]i$ foram estabelecidos para cada experimento.

4.2.17 Isolamento de hepatócitos e células de Kupffer de ratos

Todos os procedimentos foram realizados em fluxo laminar e com soluções e materias autoclavados, conforme descrito por Giavarotti [2001]. Um circuito de perfusão foi preparado circulando álcool 75 %, seguido de PBS, para limpar o sistema de perfusão. Após o animal ser anestesiado com 200 – 250 µL de uma solução de cloridrato de cetamina:cloridrato de xilazina (2:1), a cavidade peritoneal foi aberta e o intestino colocado de lado, expondo o fígado e as veias cava e porta. A perfusão foi iniciada com fluxo de 14 mL/min de PBS. Após feito um pequeno orifício na veia porta para a introdução de uma cânula; e em seguida fez-se uma incisão na veia cava, permitindo a saída do líquido após a perfusão pelo fígado. O fluxo foi então aumentado para 34 mL/min, até ¾ do tampão de perfusão ser utilizado (volume final de 200 mL). Após esse procedimento, 50 mL do tampão com colagenase (334 U/mL) foi perfundido no fígado. Durante a perfusão com albumina e antes da perfusão com colagenase, o fígado do animal foi separado e colocado em cima de uma cuba de perfusão. Após a digestão do fígado, o mesmo foi removido do corpo e colocado numa placa de Petri com tampão com colagenase. O fígado foi passado por uma malha de alumínio esterizada, e o filtrado celular permaneceu em repouso por 10 minutos para separação celular (células de Kupffer no sobrenadante, e hepatócitos no precipitado) em meio de cultura PFMR-4 com pouco cálcio, suplementado com 10 µg/mL de transferrina; 0,33 nM de ácido retinóico; 7,5 µg/ml de extrato de pituitária bovina; 1,75 µM de insulina; 0,2 µM de hidrocortisona; 50 nM de T3 (triidotirosina); 50 nM de P/E; 1% de penicilina; 5 ng/ml de fator de crescimento endotelial; 2 mM de L-glutamina; 10% de soro fetal bovino.

4.2.18 Avaliação da produção das citocinas: CINC-2αβ (por hepatócitos e células de Kupffer de ratos), TNF-α e IL-1β (por células de Kupffer de ratos).

Hepatócitos e células de Kupffer de ratos (1,0 x 10^5 células/mL) foram aderidas em placas de cultura celular de 96 poços sobre um filme de colágeno (20 µL/poço) formado por uma mistura de 0,01 mg/mL de albumina; 0,01 mg/mL de fibronectina e 0,03 mg/mL de colágeno I. O filme foi preparado em meio PFMR-4 com suplementos e requeriu solidificação prévia a 37°C, por 3 horas. Todos os procedimentos foram realizados em fluxo laminar com materias autoclavados e os reagentes esterilizados com filtro 0,22 µm.

As células foram incubadas com veículo (meio de cultura PFMR-4), MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1, 100 e 1000 nM) na presença ou ausência de LPS (1 µg/mL) à 37 °C e 5 % de CO_2, durante 24 h. Após esse período, as placas foram centrifugadas (4 °C; 2500 rpm, 10 minutos) e os sobrenadantes foram coletados e congelados à -80 ºC até o momento em que as citocinas foram determinadas por kits de ELISA, como descrito no ítem 4.2.5. Os resultados foram expressos através da construção de uma curva padrão linear com oito pontos, de concentrações conhecidas, conforme orientações do fabricante.

4.2.19 Análise estatística

Os resultados numéricos foram expressos como média ± desvio do erro das médias e as diferenças significativas foram analisadas com ANOVA, seguido pelo teste de Comparação Múltipla Student-Neuman-Keuls.

5. RESULTADOS

5.1 RECRUTAMENTO DE LEUCÓCITOS DURANTE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA.

O influxo de leucócitos para o tecido subcutâneo inflado foi quantificado 4 horas após injeção de fMLP (10^{-8} M), MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1000 nM) na a bolsa de ar. A figura 6 mostra que a migração de leucócitos para o sítio de lesão em ratos que foram expostos às MC-LA, MC-YR e MC-LR, por injeção das toxinas na bolsa de ar, foi maior do que a migração para a cavidade de animais que receberam apenas o veículo na bolsa de ar.

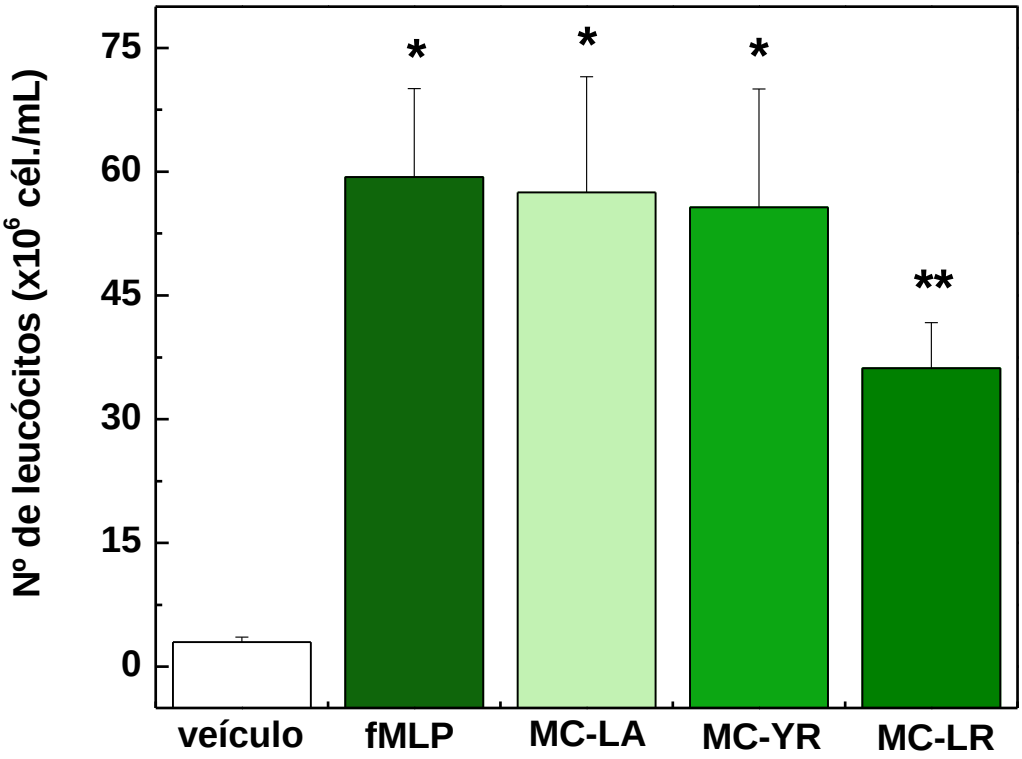


Figura 6. Influxo de neutrófilos em cavidade de bolsa de ar de ratos, 4 horas após injeção de veículo, fMLP (10 nM), MC-LA, MC-YR or MC-LR (1000 nM). Os valores estão expressos em média ± SE de cinco animais de cada grupo. *p<0,001 e **p<0,05 pela comparação entre veículo e MC-LA, MC-YR ou MC-LR como indicado por ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls.

5.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRESENTES NO EXSUDATO DA BOLSA DE AR: CINC-2αβ, IL-1β, TNF-α, VEGF-α E MIP-2.

Os exsudatos das bolsas de ar dos animais utilizados nos ensaios realizados para avaliar o recrutamento de leucócitos durante a resposta inflamatória (bolsa de ar) foram coletados para análise de produção das citocinas CINC-2αβ, IL-1β, TNF-α, VEGF-α e MIP-2 por essas células.

A tabela 3 mostra que não houve diferença significativa entre a produção de IL-1β, TNF-α e VEGF-α nos exsudatos obtidos de animais tratados com MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1000 nM) em relação ao veículo. A figura 7 mostra as concentrações de CINC-2αβ e MIP-2 obtidas dos exsudatos inflamatórios de ratos 4 horas após injeção de veículo, MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1000 nM). Observa-se que a produção de CINC-2αβ por leucócitos expostos às MC-LA e MC-LR, foi maior do que a produção por animais que receberam apenas o veículo (PBS) na bolsa de ar. No entanto, somente foram observadas concentrações maiores de MIP-2 nos exsudatos dos animais expostos a MC-LR.

Tabela 3. Produção de IL-1β, TNF-α e VEGF-α (em pg/mL ± SE) nos exsudatos de bolsa de ar obtidos de ratos tratados com MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1000 nM).

	TNF-α	**VEGF-α**	**IL-1β**
Veículo	221,0 ± 15,1	84,9 ± 4,5	263,6 ± 72,1
MC-LA	185,3 ± 9,2	108,9 ± 9,6	385,7 ± 112,6
MC-YR	193,4 ± 4,8	103,4 ± 13,8	203,9 ± 38,5
MC-LR	194,2 ± 8,4	131,0 ± 17,5	284,3 ± 127,5

Os valores estão apresentados como média ± SE de cinco animais por grupo. P>0,05, como indicado por ANOVA.

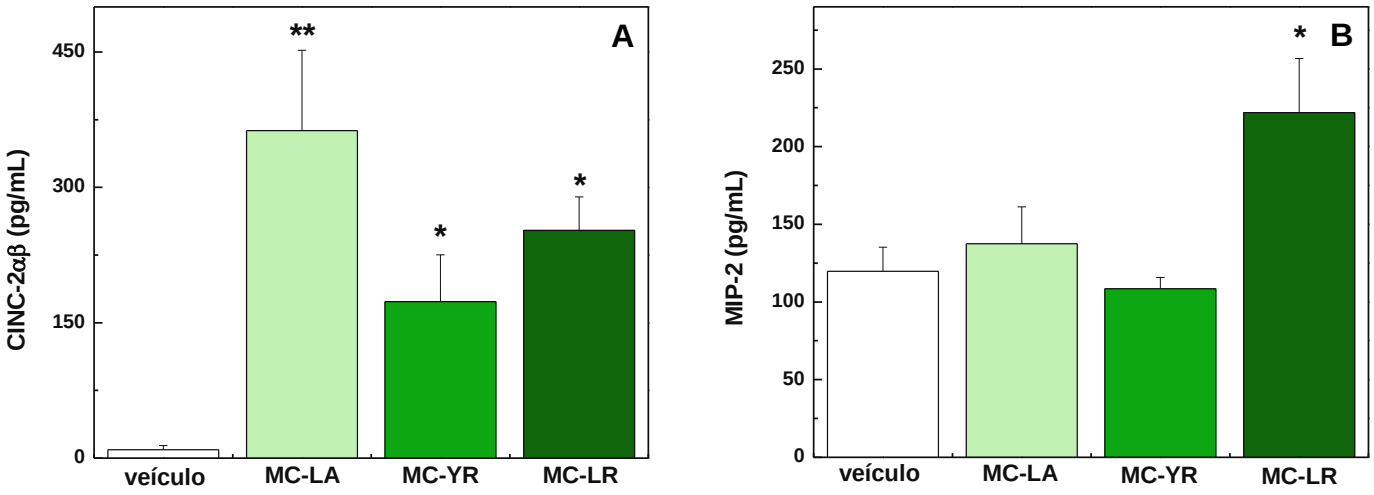


Figura 7. Concentrações determinadas por ELISA de **(A)** CINC-2αβ e **(B)** MIP-2 liberadas na cavidade de bolsa de ar de ratos, 4 horas após injeção de veículo, MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1000 nM). Os valores estão expressos em média ± erro padrão de cinco animais de cada grupo. *p<0,05 e **p<0,01 pela comparação entre veículo e MC-LA, MC-YR ou MC-LR como indicado por ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls.

5.3 EFEITOS DA APLICAÇÃO TÓPICA DAS MCS SOBRE A REDE MICROCIRCULATÓRIA DE MESENTÉRIO DE RATO.

O comportamento de leucócitos no sangue periférico foi avaliado por observação direta da rede microcirculatória (Figura 8). Como mostra a figura 9A, apenas a exposição a MC-LR (1 nM) aumentou o contato inicial entre as células brancas e as membranas do endotélio, das vênulas pós-capilares do mesentério; o número de células aderidas ao endotélio foi também maior do que no grupo veículo (Figura 9B). A exposição às MC-LA e MC-YR não alteraram nem o número de células “rollers”, nem o de células aderidas.

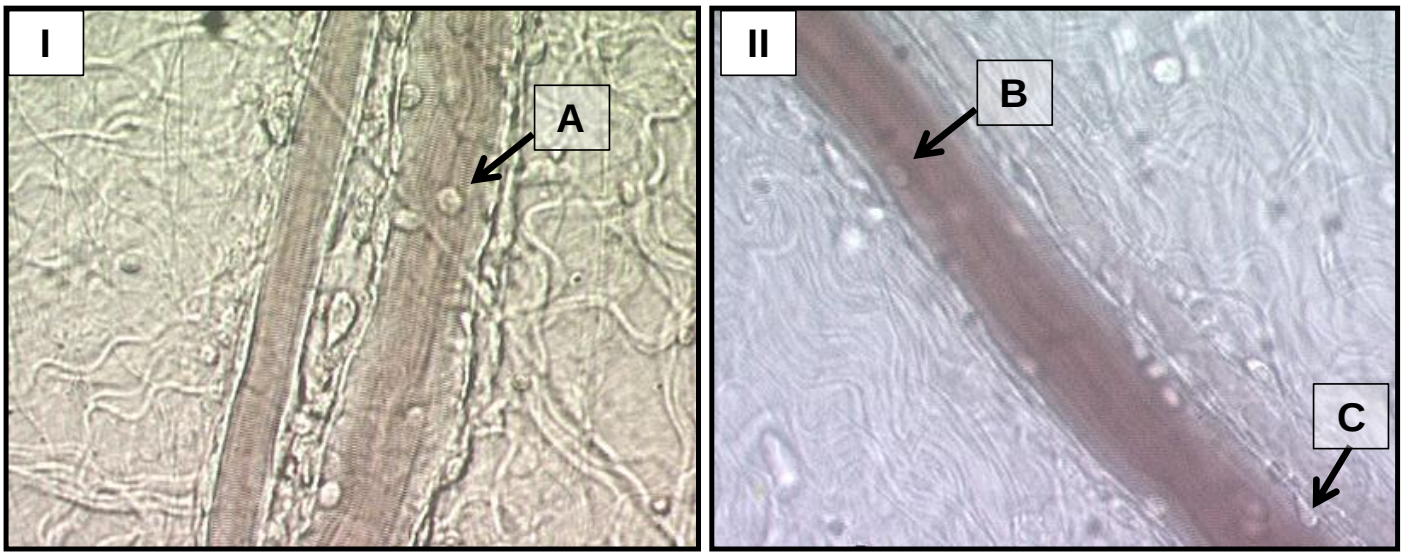


Figura 8. Leucócitos na microcirculação de mesentério de ratos observados antes (I) (basal) e após (II) exposição a MC-LR (1 nM) obtidos por microscopia intravital. **A:** circulação de leucócito no centro do vaso; **B:** rolamento na parede do vaso; **C:** adesão na parede do vaso.

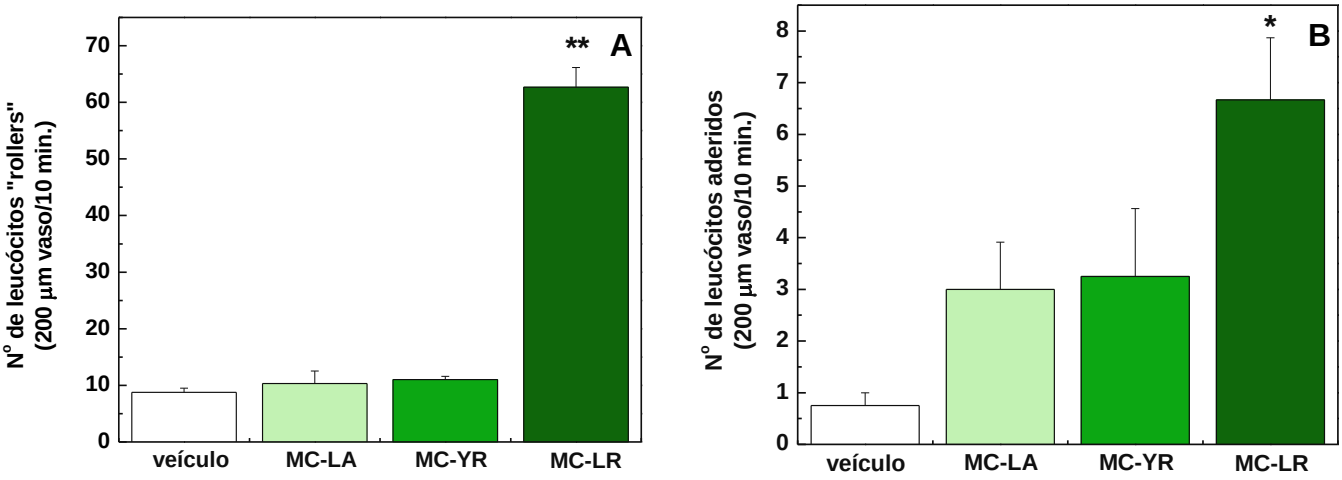


Figura 9. Número de neutrófilos em **(A)** rolamento e **(B)** aderidos em vênulas pós-capilares (20-30 µm de diâmetro) do mesentério de ratos expostos ao veículo (PBS), MC-LA, MC-YR e MC-LR (1 nM). Os resultados foram obtidos por microscopia intravital 10 minutos após a aplicação local da toxina ou veículo. Os dados estão expressos em média ± erro padrão de quatro animais de cada grupo. *$p<0,05$ e **$p<0,001$ pela comparação entre veículo e MC-LA, MC-YR ou MC-LR como indicado por ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls.

5.4 AVALIAÇÕES DA SÍNTESE DE RNAm E DA EXPRESSÃO EM MEMBRANA CELULAR DE L-SELECTINA E β_2-INTEGRINA EM NEUTRÓFILOS.

A síntese RNAm de *L*-selectina e *β2*-integrina foi investigada em neutrófilos tratados com veículo (PBS), fMLP (10 nM), MC-LA, MC-YR ou MC-LR. Para isso, quantidades de mRNA foram isoladas e ensaios de PCR-RT foram realizados. As quantidades de mRNA de *L*-selectina e *β2*-integrina foram aumentadas significantemente em neutrófilos tratados com MC-LR quando comparados com as células expostas a MC-LA, MC-YR ou veículo (Figuras 10A e 10B). As células estimuladas com fMLP foram usadas como controle positivo dos ensaios, e os resultados mostram que essas células apresentam expressões elevadas dessas duas moléculas testadas (Figuras 10A e 10B).

A expressão de *L*-selectina e *β2*-integrina na membrana também foram avaliadas em neutrófilos usando a técnica de citometria de fluxo com anticorpos específicos. Os resultados mostraram que a expressão de ambas as moléculas *in vitro* em neutrófilos expostos a MC-LR (1000 nM), por 4 horas, foi maior do que a encontrada em células expostas ao veículo, MC-LA ou MC-YR ($p<0,05$) (Figuras 11A e 11B). Expressões similares de L-selectina e β2-integrina foram observadas em células expostas a MC-LA, MC-YR ou veículo. Como no ensaio de PCR-RT, as células estimuladas por fMLP foram usadas como controle positivo e as expressões de L-selectina e β2-integrina foram também aumentadas nas membranas dessas células (Figuras 11A e 11B).

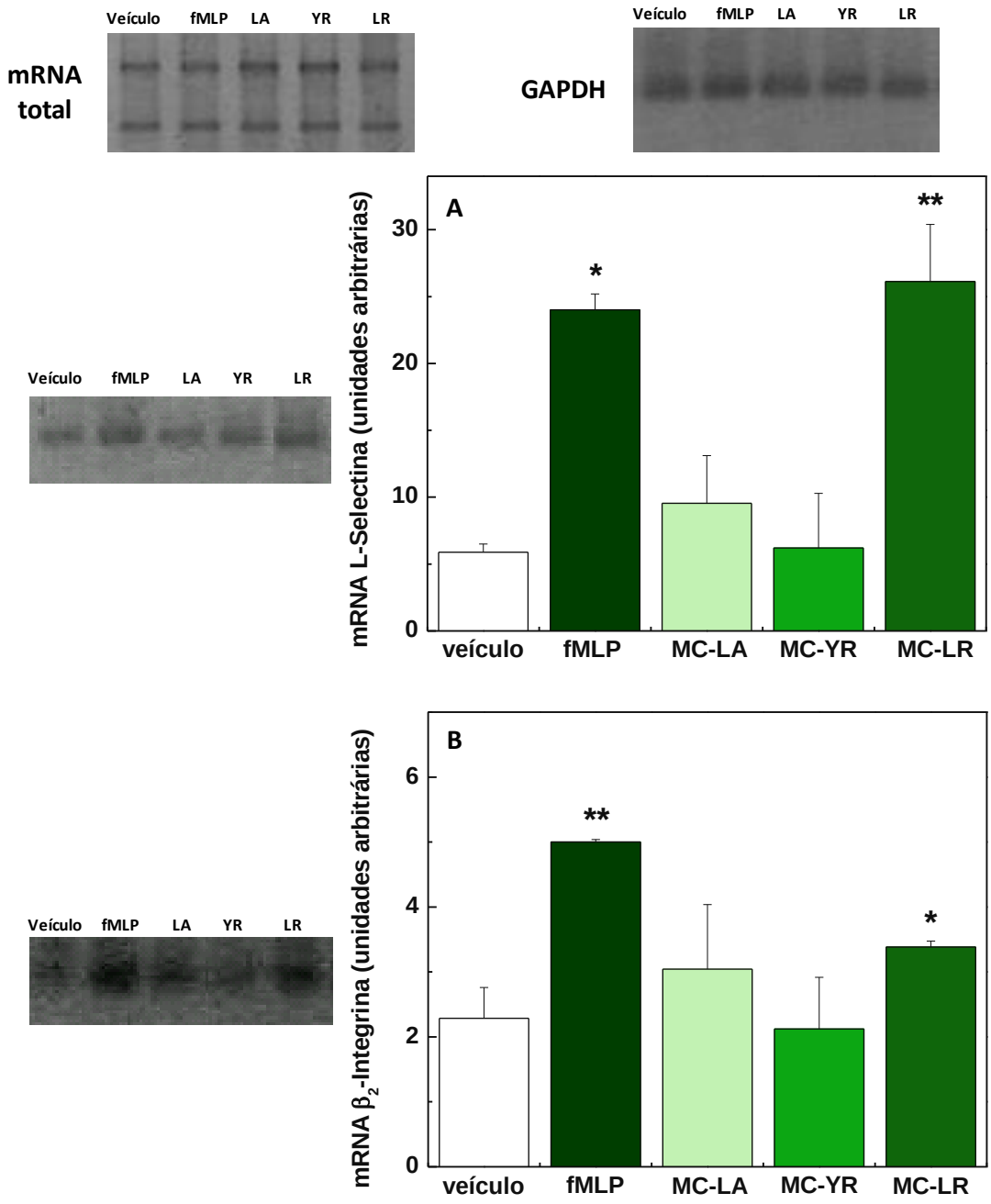


Figura 10. Efeitos dos tratamentos com MC-LA, MC-YR ou MC-LR na expressão gênica de moléculas de adesão. PCR-RT foi realizado em leucócitos total da artéria aorta de ratos. Os neutrófilos (1,0 x 10^6 células/mL) foram incubados com MC-LA, MC-YR, MC-LR (1000 nM) ou fMLP (10 nM) por 4 horas. As imagens representam géis de agarose de eletroforese de mRNA total, GAPDH, L-selectina **(A)** e β2-integrina **(B)**. Os valores estão apresentados em média ± SE de quatro animais por grupo *P< 0,05 e **P<0,01 pela comparação entre os tratamentos com veículo e fMLP, MC-LA, MC-YR ou MC-LR, como indicado por ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls.

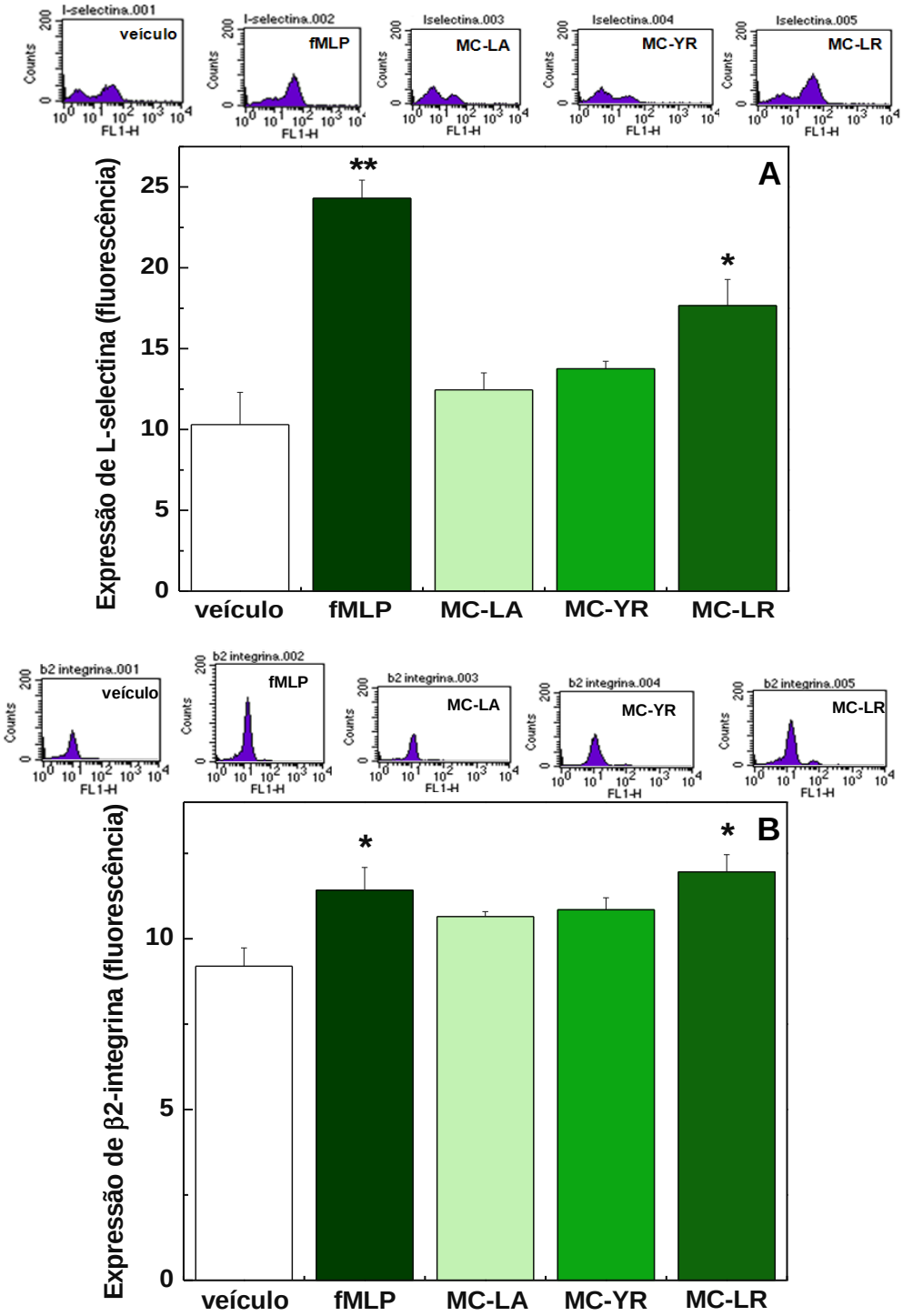


Figura 11. Expressão de moléculas de adesão em neutrófilos incubados com MCs por 4 horas. Os leucócitos foram obtidos de amostras de sangue coletadas da artéria aorta abdominal. A expressão de **(A)** *L*-selectina ou **(B)** β_2-integrina foi quantificada em neutrófilos quiescentes (condições basais) ou após estimulação por fMLP (10^{-8}) por citometria de fluxo (histogramas típicos obtidos nos ensaios estão expostos a esquerda das figuras). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão de cinco animais de cada grupo. *p<0,05 e **p<0,001 pela comparação entre os tratamentos com veículo e fMLP, MC-LA, MC-YR ou MC-LR, como indicado por ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls.

5.5 EFEITOS DAS MCs NA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS *in vitro.*

Os resultados mostraram que a migração de neutrófilos foi aumentada em resposta a MC-LA, MC-YR e MC-LR, e portanto, foi demonstrado que essas toxinas induzem quimiotaxia *per se*. Os valores obtidos foram maiores do que os observados em resposta ao veículo (HBSS) e equivalentes a migração induzida pelo fMLP, o qual foi usado como controle positivo do ensaio (Figura 12A, 12B e 12C). Entretanto, a potência das toxinas foi diferente. Respostas elevadas foram detectadas com 1 e 100 nM de MC-LA ($p<0,001$; Figura 12A); 1 nM de MC-YR ($p<0,01$; Figura 12B) e 1, 100 e 1000 nM de MC-LR ($p<0,001$; Figura 12C).

O segundo ensaio foi realizado para avaliar a capacidade das MCs em alterar a quimiotaxia em resposta ao fMLP. Portanto, as células foram previamente incubadas com diferentes concentrações de MC-LA, MC-YR, MC-LR ou HBSS, e a migração resultante no filtro foi avaliada em resposta ao fMLP. Os resultados apresentados na Tabela 4 mostraram que, em todas as concentrações estudadas, as três MCs exerceram maior migração em resposta ao fMLP do que as células incubadas somente com HBSS ($p<0,01$ ou $p<0,001$).

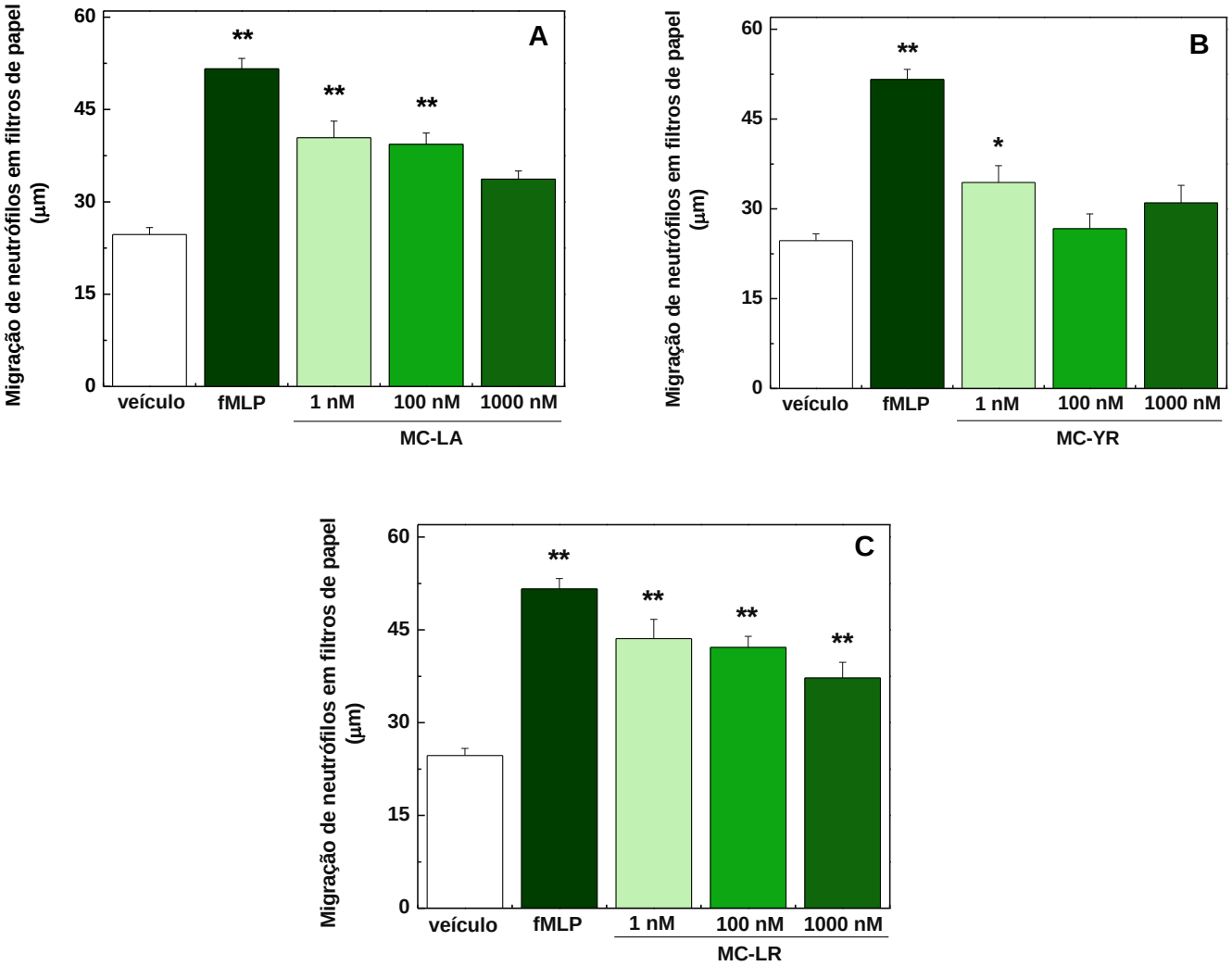


Figura 12. Respostas quimiotáticas de neutrófilos (sistema de filtros de papel) ao veículo (HBSS), fMLP (10 nM), MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1, 100 e 1000 nM). Câmaras de quimiotaxia com suspensão de neutrófilos (1,5 x 10^6 células/mL) nos compartimentos superiores e MCs, veículo ou fMLP na parte inferior foram incubadas por 60 minutos, com filtros de papel na interface de cada compartimento. Os valores estão apresentados como média ± SE de oito animais por grupo *P<0,01, **P<0,001 pela comparação entre **(A)** MC-LA, **(B)** MC-YR ou **(C)** MC-LR e veículo como indicado por ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls.

Tabela 4. Respostas quimiotáticas de neutrófilos tratados com veículo (HBSS), MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1, 100 e 1000 nM) em resposta ao fMLP (10 nM) obtidas nos ensaios em câmara de Boyden.

Grupos	Concentração de MC (nM)	Migração de neutrófilos em filtros de papel (µm) em resposta ao fMLP (média ± SE)
HBSS	0	51,6 ± 1,7**
MC-LA	1	64,3 ± 4,5 *
	100	77,5 ± 4,7**
	1000	68,3 ± 4,1 *
MC-YR	1	68,0 ± 3,0 *
	100	80,3 ± 4,7**
	1000	74,0 ± 6,3**
MC-LR	1	76,8 ± 4,5**
	100	84,8 ± 4,6**
	1000	79,8 ± 2,8**

Os valores estão apresentados como média ± SE de oito animais por grupo. *P<0,01, **P<0,001 pela comparação entre os tratamentos com o veículo (HBSS) e MC-LA, MC-YR ou MC-LR em resposta ao fMLP, como indicado por ANOVA, seguido por teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls.

5.6 EFEITOS DAS MCs NA INTEGRIDADE DE MEMBRANA, FRAGMENTAÇÃO DE DNA E POTENCIAL TRANSMEMBRÂNICO MITOCONDRIAL DE NEUTRÓFILOS HUMANOS E DE RATOS.

Para verificar a influência das MCs na viabilidade de neutrófilos, análises de citometria de fluxo foram realizadas visando determinar a integridade de membrana celular, fragmentação de DNA e potencial transmembrânico de mitocôndria de neutrófilos humanos e de ratos tratados com MC-LA, MC-YR e MC-LR (1 e 1000 nM), por 24 h.

Foi observado que a viabilidade de neutrófilos humanos após o tratamento dessas células com MC-LA ou MC-LR (1 e 1000 nM) foi melhor preservada. Mas a viabilidade de neutrófilos humanos não foi alterada pelo tratamento com MC-YR (Tabela 5).

A integridade de membrana de neutrófilos de ratos tratados com as três MCs não foi alterado quando comparadas com aquela do grupo veículo (Figura 13; Tabela 5).

Os neutrófilos de ratos tratados com MC-LA (1 nM e 1000 nM) e MC-YR (1000 nM) após 24 horas mostraram um aumento da porcentagem de células com o DNA fragmentado, quando comparado com o grupo controle (Figura 14 e Tabela 5). Somente os neutrófilos humanos incubados com MC-LR (1000 nM) resultou em uma diminuição da porcentagem de células com DNA fragmentado comparado com condições controle (Tabela 7).

Nenhum efeito significante dessas variantes de MC foi observado na despolarização de mitocôndria de neutrófilos humanos ou de ratos (controle= 99,2% vs. MC= 99,3% [com 1 nM de MC] e 99,4% [com 1000 nM de MC] por neutrófilos de ratos, e controle= 99,5% vs. MC= 99,4% [com 1 nM de MC] e 99,6% [com 1000 nM de MC] por neutrófilos humanos (média)).

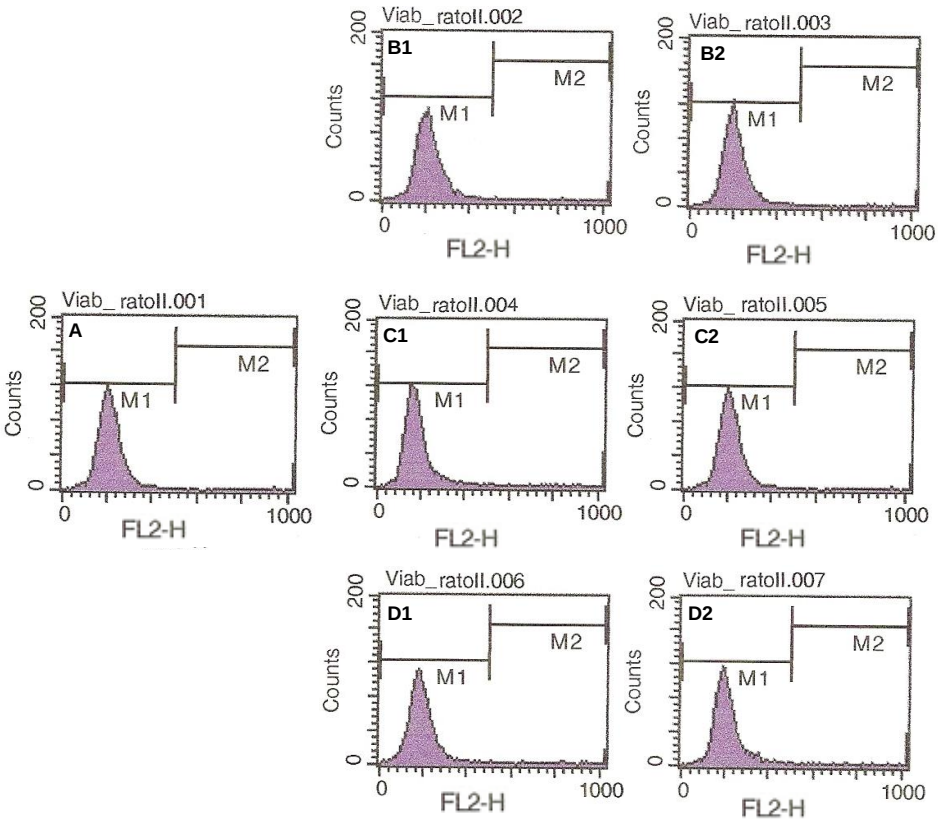


Figura 13. Histogramas da intensidade de fluorescência emitida no comprimento de onda 560-580 nm (FL2) obtidos no ensaio de determinação de integridade de membrana por citometria de fluxo. Após incubação de neutrófilos de ratos com o veículo **(A)**; MC-LA 1000 nM **(B1)** e 1nM **(B2)**; MC-YR 1000 nM **(C1)** e 1nM **(C2)**; MC-LR 1000 nM **(D1)** e 1nM **(D2)** por 24 horas, as células íntegras não permitiram a passagem de IP pela membrana (M1). Caso houvessem células que apresentassem membranas rompidas, haveria a entrada do IP, que se ligaria ao DNA, emitindo fluorescência quando excitadas pelo laser (M2).

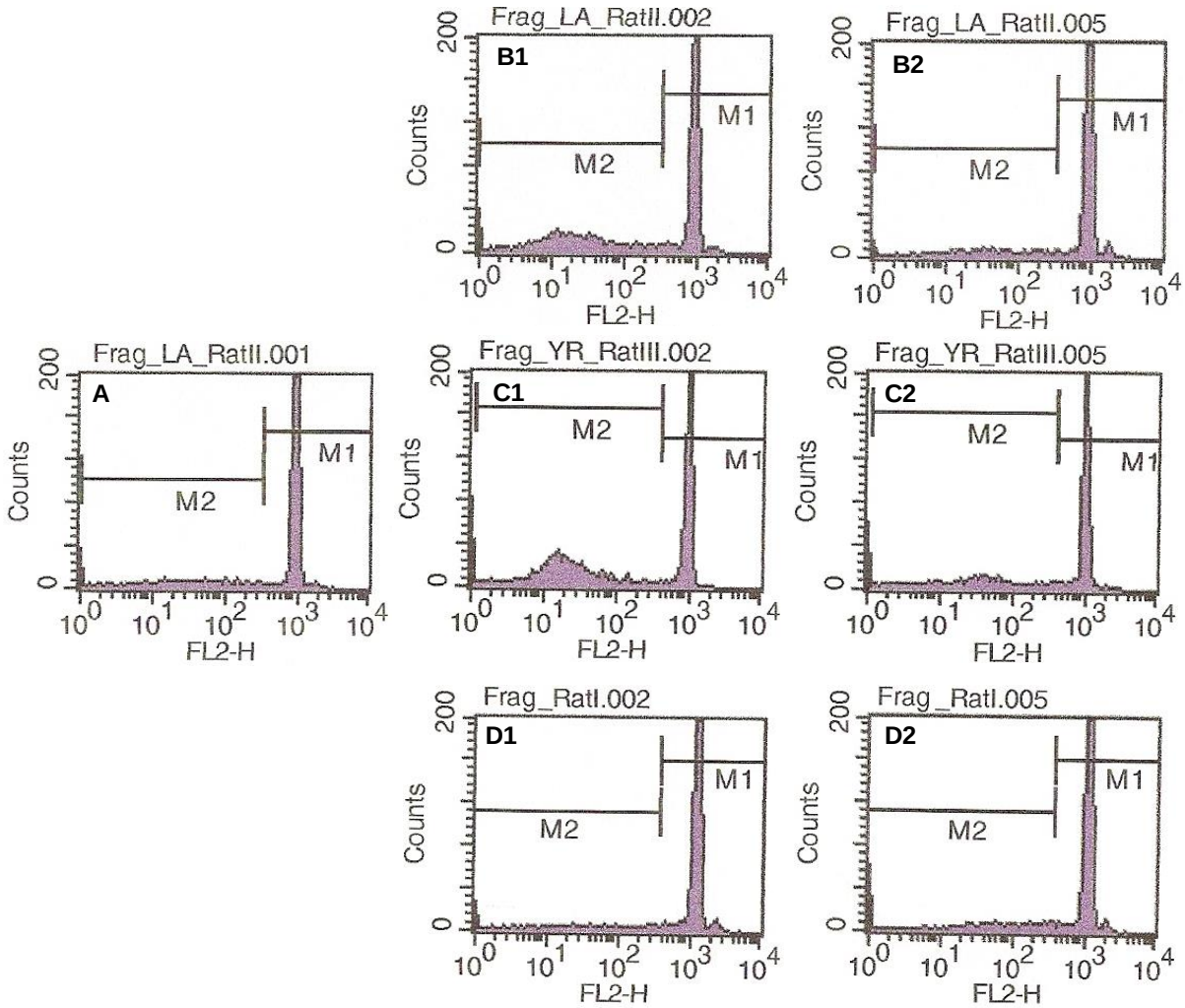


Figura 14. Histogramas da intensidade de fluorescência emitida no comprimento de onda 560-580 nm obtidos no ensaio de determinação de fragmentação de DNA por citometria de fluxo. Após incubação de neutrófilos de rato com o veículo **(A)**; MC-LA 1000 nM **(B1)** e 1nM **(B2)**; MC-YR 1000 nM **(C1)** e 1nM **(C2)**; MC-LR 1000 nM **(D1)** e 1nM **(D2)** por 24 horas, as células foram rompidas pelo tampão de lise expondo os núcleos. Nesse ensaio, o IP se liga ao DNA e as células contendo núcleos íntegros emitirão alta fluorescência (M1). A condensação da cromatina e fragmentação do DNA pode ser observada devido à menor marcação do DNA com o IP e, portanto baixa fluorescência (M2).

Tabela 5. Porcentagem de integridade de membrana celular e fragmentação de DNA de neutrófilos humanos e de ratos tratados com MC-LA, MC-YR e MC-LR (1 e 1000 nM).

Toxina	Concentração (nM)	*Neutrófilos de ratos*		*Neutrófilos humanos*	
		Viabilidade de membrana (%)	Fragmentação de DNA (%)	Viabilidade de membrana (%)	Fragmentação de DNA (%)
Controle	0	96,3 ± 0,4	3,9 ± 0,4	87,2 ± 0,2	13,3 ± 0,6
MC-LA	1	98,6 ± 1,0	14,3 ± 0,5*	89,6 ± 0,5***	14,2 ± 1,5
	1000	98,2 ± 0,6	23,5 ± 4,6**	89,7 ± 0,2***	11,4 ± 0,7
MC-YR	1	98,1 ± 0,9	10.1 ± 4,5	88,4 ± 0,3	17,8 ± 1,3
	1000	97,3 ± 1,3	22,9 ± 4,4**	87,1 ± 0,1	16,5 ± 2,3
MC-LR	1	96,3 ± 0,3	4,0 ± 0,7	89,6 ± 0,5***	10,7 ± 1,4
	1000	96,8 ± 0,9	4,2 ± 0,5	89,2 ± 0,2***	10,8 ± 1,4***

Os dados estão expressos em porcentagem (média ± SE).
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 pela comparação entre os tratamentos com veículo e MC-LA, MC-YR ou MC-LR, como indicado por ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls.

5.7 PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR NEUTRÓFILOS HUMANOS E DE RATOS.

Os efeitos de MC-LA, MC-YR e MC-LR na produção de IL-8, CINC-2αβ e TNF-α por neutrófilos foram determinados em sobrenadantes de células tratadas em culturas. Os neutrófilos humanos foram incubados com essas MCs (1 e 1000 nM) por 24 h, o que resultou em um aumento da produção de IL-8 (Figura 15A). No entanto, os neutrófilos de ratos liberaram maiores quantidades de CINC-2αβ somente após incubação com MC-LR (1000 nM) (Figura 15B). Nenhum efeito significante da MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1 e 1000 nM) na produção de TNF-α por neutrófilos humanos (controle= 1502,7 pg/mL ± 55,3 vs. MC= 1844,1 pg/mL ± 433 [com 1 nM de MC] e 1727,9 pg/mL ± 369,5 [com 1000 nM de MC]) ou de ratos (controle= 472,1 pg/mL ± 45,8 vs. MC= 575,9 pg/mL ± 73,2 [com 1 nM de MC] e 783,1 pg/mL ± 95,3 [com 1000 nM de MC]) foi observado (média ± SE)).

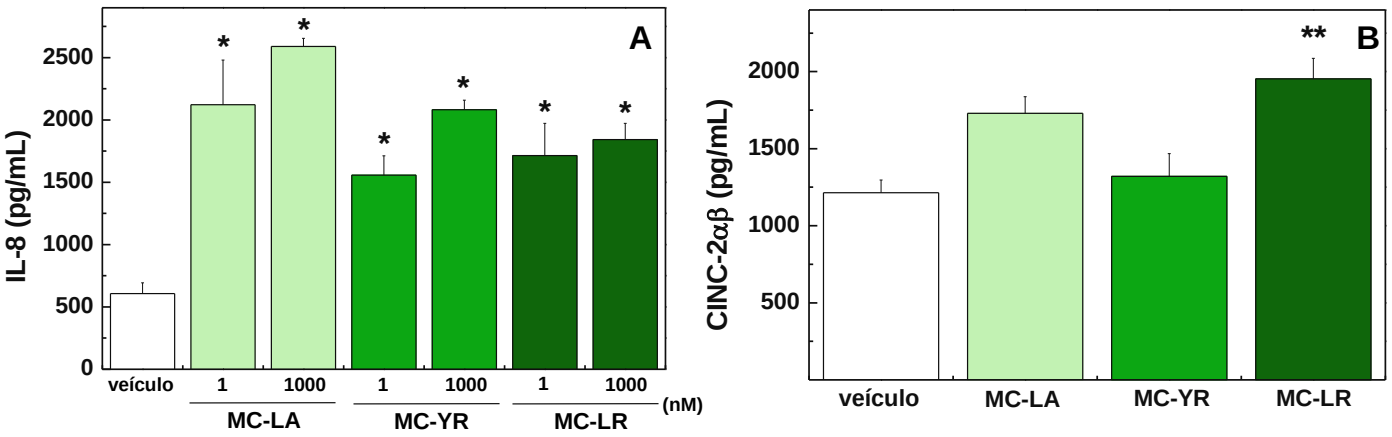


Figura 15. Concentrações de **(A)** IL-8 determinadas no sobrenadante de culturas de neutrófilos humanos (2,5 x 10^6 células/mL) e de **(B)** CINC-2αβ por neutrófilos de ratos, incubadas com MC-LA, MC-YR e MC-LR (1 e 1000 nM) por 24 h, quantificadas por ELISA. Os dados representam a média ± SE de no mínimo quatro experimentos. *P<0,001, **P<0,05 pela comparação entre os tratamentos com veículo e MC-LA, MC-YR ou MC-LR, como indicado por ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls.

5.8 PRODUÇÃO DE ROS POR NEUTRÓFILOS HUMANOS E DE RATOS.

Para avaliar a geração de ROS por neutrófilos em presença de MCs, foi examinada a produção de ROS intracelular e extracelular por neutrófilos humanos e de ratos. Nesse estudo, a determinação de ROS intracelular por citometria de fluxo usando hidroetidina indicou que o tratamento de neutrófilos de ratos com MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1 e 1000 nM) não causou mudança significante na fluorescência emitida (controle= 17,7 ± 0,9 vs. MC= 17,5 ± 0,8 [com 1 nM de MC] e 18,2 ± 0,4 [com 1000 nM de MC] (média ± SE). Entretanto, o ensaio de quimiluminescência amplificada por lucigenina indicou que neutrófilos humanos incubados com MC-LA (1000nM), MC-YR (1000 nM) e MC-LR (1 e 1000 nM) por 20 minutos apresentou aumento na produção de ROS extracelular (Figura 16A). Esse resultado foi observado em neutrófilos de ratos somente quando PMA foi adicionado ao meio de ensaio (Figura 16B).

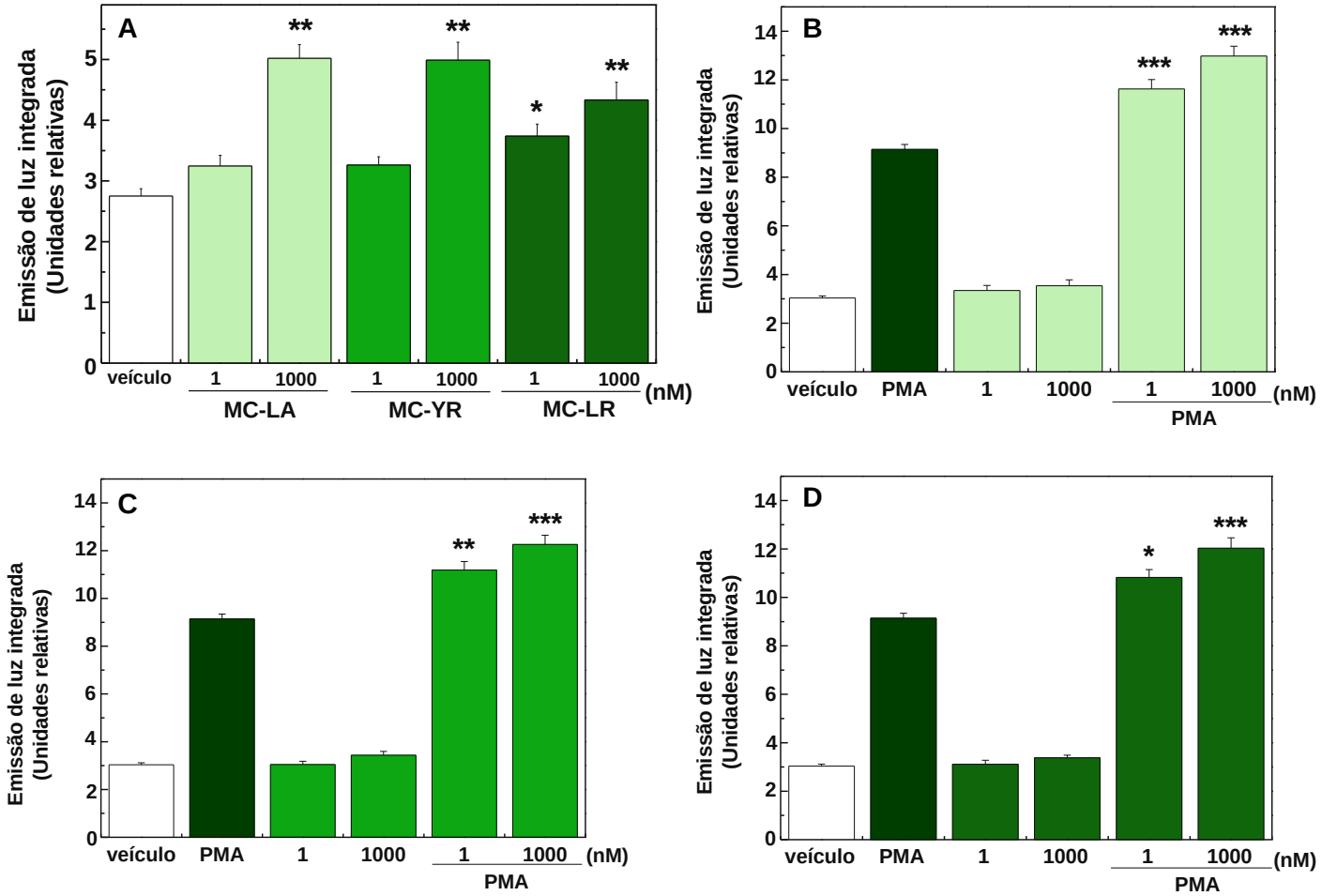


Figura 16. Produção de ânions superóxido por neutrófilos humanos e de ratos (2,5 x 10^6 células/mL) determinada pelo método de quimiluminescência amplificada por lucigenina, na presença e ausência de MC-LA, MC-YR e MC-LR (1 e 1000 nM). **(A)** Representa a emissão integrada de luz (unidade relativa de luz (URL)) medida após adição de MCs ao meio com neutrófilos humanos. **(B, C e D)** Representam a emissão integrada de luz (URL) medida após adição de MC-LA **(B)**, MC-YR **(C)** e MC-LR **(D)** e PMA (16 ng/mL) ao meio com neutrófilos de ratos. Os valores estão apresentados como a média ± SE de no mínimo oito experimentos em duplicata. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 pela comparação entre veículo **(A)** ou PMA **(B, C e D)** e MC-LA, MC-YR ou MC-LR como indicado por ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls.

5.9 EFEITOS DAS MCs NA MOBILIZAÇÃO DE Ca^{2+} INTRACELULAR EM NEUTRÓFILOS.

A produção de Ca^{2+} intracelular por neutrófilos foi avaliada por 95 segundos após a exposição a MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1000 nM), veículo (basal), ionóforo (100 µM) e EDTA (4 nM) (Figura 17). A média ± SE da fluorescência relativa integrada de cinco células por grupo estimuladas pelas MCs demonstrou que essas toxinas aumentam $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 18). Foi observado que a $[Ca^{2+}]_i$ aumentou imediatamente após a adição de MC-LA, MC-YR e MC-LR, e alcançou a concentração máxima em 20, 27 e 40 segundos, respectivamente. Embora todas que as MCs foram capazes de liberar influxo de cálcio em neutrófilos, a incubação com MC-LR manteve a $[Ca^{2+}]_i$ elevada por todo o período de investigação (Figura 18). Valores da fluorescência relativa integrada, como mostrado na figura menor inserida, representam um aumento de $[Ca^{2+}]_i$ em neutrófilos expostos a MC-LA ($p<0,05$), MC-YR ($p<0,01$) e MC-LR ($p<0,01$) em comparação às células expostas somente ao veículo.

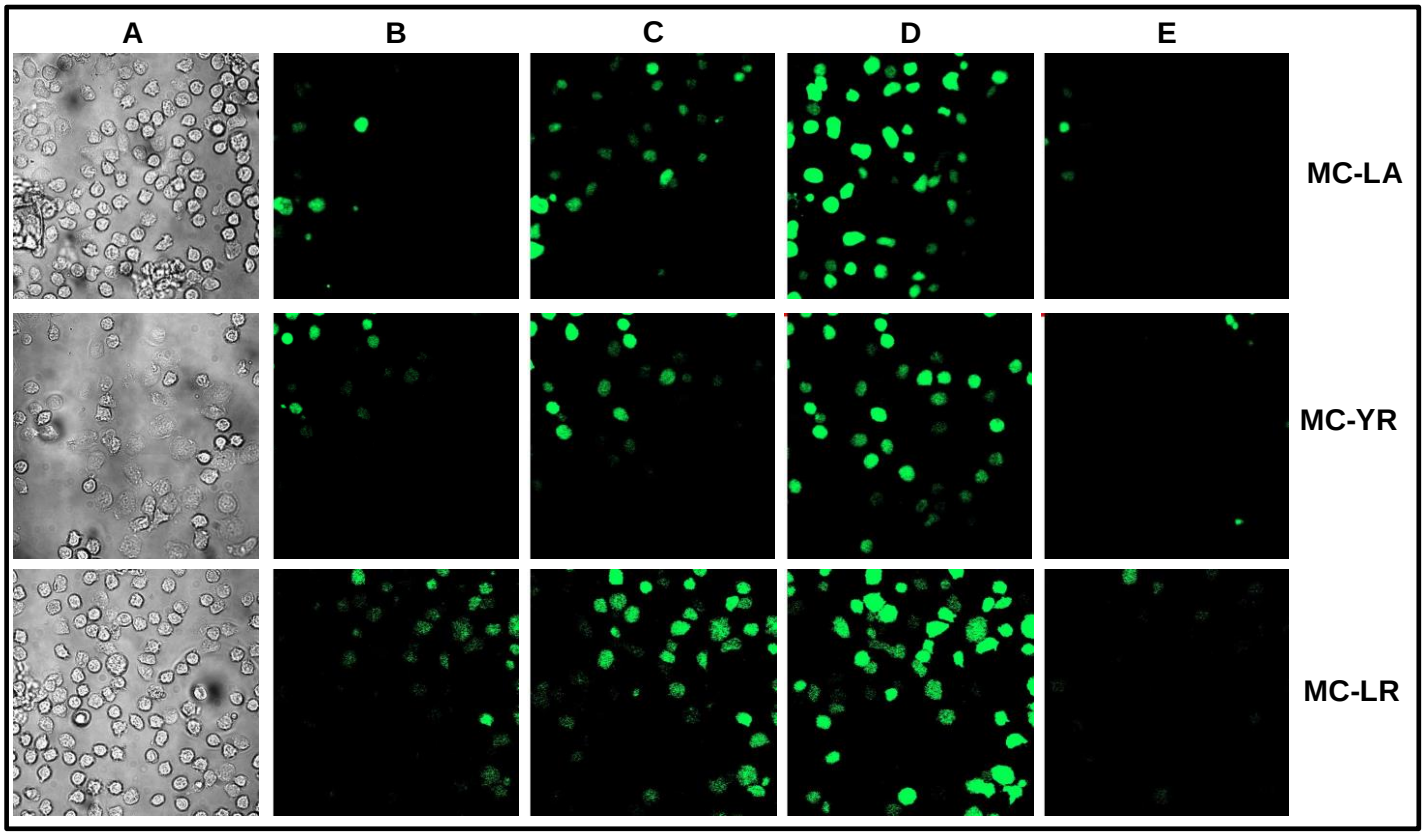


Figura17. Imagens obtidas por microscopia confocal mostrando o efeito da MC-LA, MC-YR ou MC-LR sobre a $[Ca^{2+}]i$ em neutrófilos de rato. **A:** contraste de fase; **B:** fluorescência basal das células; **C:** fluorescência após aproximadamente 5 segundos da adição das MCs (1000 nM), **D:** fluorescência após a adição do ionóforo (100 µM); **E:** fluorescência a adição de EDTA (4 nM).

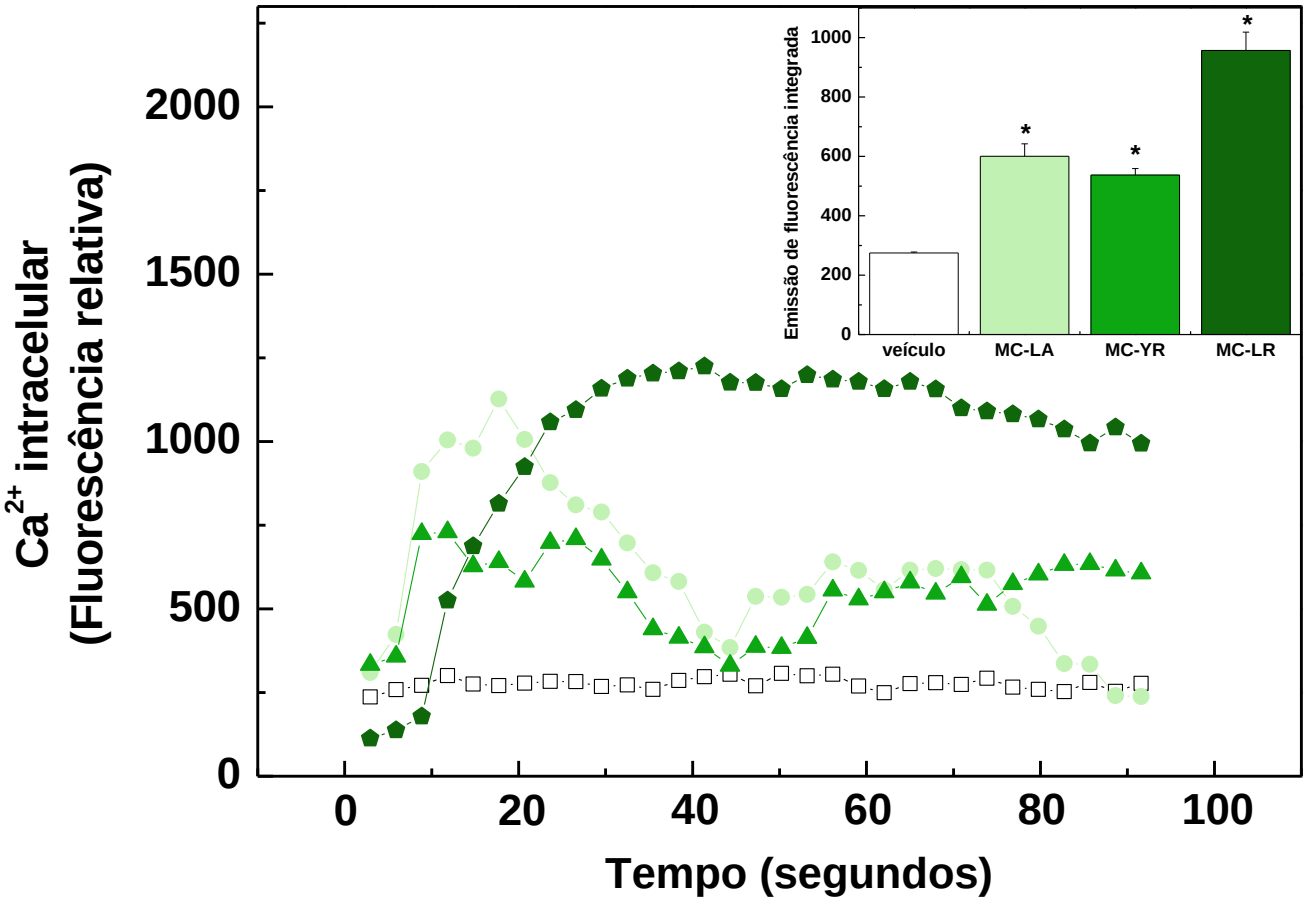


Figura 18. Indução do aumento de Ca^{2+} intracelular após a exposição de neutrófilos ao veículo (—□—), MC-LA (—●—), MC-YR (—▲—) ou MC-LR (—⬟—). Os neutrófilos foram incubados com 1 mM de Fluo 3AM por 45 minutos a temperatura ambiente. As células foram lavadas e ressuspendidas a 4 x 10^6 células/mL em tampão Krebs-HEPES. O influxo de Ca^{2+} intracelular foi analisado por microscopia confocal (em 506/536 nm). A figura menor mostra a média ± SE da fluorescência relativa integrada emitida por neutrófilos em presença de MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1000 nM). *P<0,001 pela comparação entre veículo e MC-LA, MC-YR ou MC-LR como indicado por ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls.

5.10 PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR HEPATÓCITOS E CÉLULAS DE KUPFFER DE RATOS.

Os efeitos de MC-LA, MC-YR e MC-LR na produção de CINC-2αβ, IL-1β e TNF-α por células de Kupffer isoladas de rato e CINC-2αβ por hepatócitos isolados de rato foram determinados em sobrenadantes de células tratadas em cultura. Essas células foram incubadas com veículo (meio de cultura PFMR-4 com suplementos), LPS (1 µg/mL) ou MCs (1, 100 e 1000 nM) com ou sem LPS por 24 h.

Os resultados mostraram aumento da produção de CINC-2αβ por células de Kupffer tratadas com LPS em conjunto com MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1000 nM) em comparação com as células tratadas somente com LPS (Figura 19A). Por outro lado, nenhuma alteração foi observada nas células tratadas somente com as MCs em relação às tratadas somente com o veículo (Tabela 6).

A produção de TNF-α não foi alterada em cultura de células de Kupffer com as MCs (Tabela 6). Contudo, observou-se aumento da produção de TNF-α em células tratadas LPS e MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1000 nM), em comparação da liberação dessa citocina pelas células tratadas somente com LPS (Figura 19B). Não foram observadas mudanças na produção de TNF-α pelas células tratadas somente com as LPS em relação às tratadas somente com o veículo (Figura 19B).

Em culturas de hepatócitos não foram observadas alterações na produção de CINC-2αβ tanto na presença como ausência de LPS (Tabela 6). Por outro lado, maior liberação de CINC-2αβ foi observada em hepatócitos tratados com LPS e MC-LA ou MC-YR (1000 nM) quando comparado com células tratadas somente com LPS (Figura 19C).

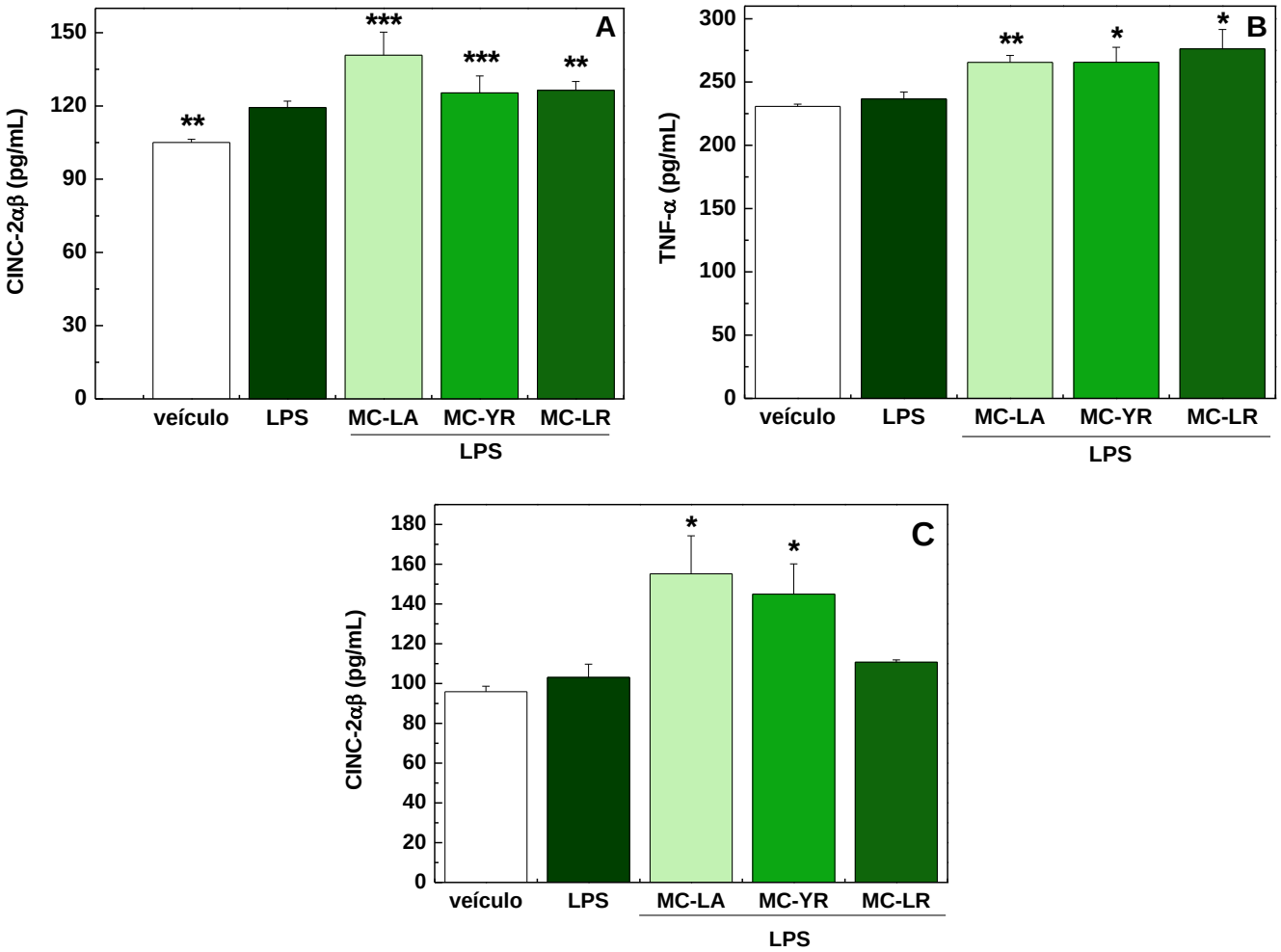


Figura 19. (A) Citocina quimioatraente induzida (CINC-2αβ) e **(B)** fator de necrose tumoral (TNF-α) determinadas no sobrenadante de culturas de células de Kupffer isoladas de ratos (1,0 x 10^5 células/mL) e **(C)** CINC-2αβ determinadas no sobrenadante de culturas de hepatócitos isolados de ratos (1,0 x 10^5 células/mL). Ambas as células hepáticas foram incubadas com veículo (meio de cultura PFMR-4 com suplementos), LPS (1 µg/mL), MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1000 nM) por 24 h. Os dados representam a média ± SE de quatruplicata. *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001 pela comparação entre o LPS e MC-LA, MC-YR ou MC-LR como indicado por ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls.

Tabela 6. Produção de CINC-2αβ, TNF-α e IL-1β ((pg/mL) ± SE), por células de Kupffer e CINC-2αβ por hepatócitos isolados de rato (1,0 x 10^5 células/mL) tratados com veículo, MC-LA, MC-YR ou MC-LR (1, 100 ou1000 nM).

		[MC] (nM)	CINC-2αβ	TNF-α	IL-1β
CÉLULAS DE KUPFFER	Veículo		105,1 ± 1,3	230,8 ± 1,8	590,9 ± 17,7
	MC-LA	1	94,7 ± 3,4	215,0 ± 3,7	626,4 ± 6,9
		100	95,9 ± 3,3	216,3 ± 5,6	578,5 ± 3,2
		1000	102,3 ± 3,9	222,8 ± 12,6	587,7± 20,5
	MC-YR	1	95,2 ± 1,3	235,4 ± 4,9	647,8 ± 12,1
		100	97,2 ± 2,1	233,7 ± 1,9	576,5 ± 24,5
		1000	103,9 ± 4,6	217,8 ± 8,2	613,3 ± 16,6
	MC-LR	1	111,2 ± 4,6	254,5 ± 3,9	637,5 ± 21,2
		100	104,2 ± 5,9	255,5 ± 8,9	604,1 ± 13,2
		1000	107,8 ± 0,9	239,9 ± 2,6	606,4 ± 13,9
HEPATÓCITOS	Veículo		95,9 ± 2,7	-	-
	MC-LA	1	88,3 ± 3,9	-	-
		100	104,1 ± 13,9	-	-
		1000	85,4 ± 5,2	-	-
	MC-YR	1	87,2 ± 1,8	-	-
		100	98,1 ± 2,2	-	-
		1000	88,5 ± 1,7	-	-
	MC-LR	1	90,8 ± 2,5	-	-
		100	86,2 ± 5,0	-	-
		1000	82,5 ± 2,9	-	-

Os valores estão apresentados como média ± SE de quatruplicata. Os dados obtidos pelo tratamentos das células com MC-LA, MC-YR ou MC-LR não foram significativamente diferentes dos dados do tratamento com somente o veículo (meio de cultura PFMR-4 com suplementos), como indicado por ANOVA com $p>0,05$.

6. DISCUSSÃO

Alguns trabalhos mostram a infiltração de neutrófilos ao redor do foco inflamatório em seres humanos e animais de laboratório após exposição a MCs [Jochimsen *et al.*, 1998; Pouria *et al*., 1998; Codd *et al.*, 1999; Azevedo *et al.*, 2002; Benson *et al*., 2005; Soares *et al*., 2007]. No entanto, a função dos neutrófilos na patogênese da toxicidade do órgão inflamado ainda não foi estabelecida. Nesse estudo, foi avaliada a capacidade das MC-LA, MC-YR e MC-LR para promover a ativação e a migração de neutrófilos ao foco de toxicidade das MCs e induzir a secreção de quimiocinas e de ânions superóxido.

O recrutamento de neutrófilos em tecidos inflamados é inicialmente dependente da interação desses leucócitos com a parede do endotélio da rede microcirculatória, posterior transmigração em espaço extravascular e locomoção direta ao sítio da inflamação [Kelly *et al*., 2007]. Os mediadores pró-inflamatórios liberados por hepatócitos e células de Kupffer em inflamações agudas, como algumas citocinas, podem desencadear a acumulação de neutrófilos nos sinusóides [Jaeschke *et al.*, 2002], o que antecede ao extravasamento destes leucócitos ao parênquima, que é necessário para causar o dano tecidual [Chosay *et al*., 1997].

A exposição de hepatócitos e células de Kupffer isolados de ratos às MC-LA, MC-YR e MC-LR mostrou que essas MCs não exerceram ação direta na produção de citocinas por essas células, visto que não houve alteração na liberação de CINC-2αβ, TNF-α e IL-1β pelas células de Kupffer e nem de CINC-2αβ pelos hepatócitos.

Por outro lado, os resultados mostraram que após essas células hepáticas serem ativadas pelo LPS, foi observado um aumento tanto da liberação de CINC-2αβ e TNF-α pelas células de Kupffer expostas às três MCs, como de CINC-2αβ pelos hepatócitos expostos a MC-LA e MC-YR, em comparação a liberação por células expostas somente ao LPS. Portanto, essas MCs podem ter pré-ativado (“primed”) hepatócitos e células de Kupffer, e quando essas células hepáticas foram expostas a um segundo estímulo, o LPS, as células foram mais susceptíveis a ativação, o que resultou uma resposta maior do que a induzida somente pelo estímulo em células em repouso. Curiosamente não houve aumento da produção de CINC-2αβ pelos hepatócitos incubados com MC-LR, sugerindo a necessidade de mais estudos para explicar esse fato.

Os nossos resultados coincidiram com o da literatura [Ohkubo et al., 1998] quanto a estimulação das células de Kupffer e de hepatócitos com o LPS, já que somente as células de Kupffer aumentaram a produção de CINC-2αβ por estímulo de LPS. Mas a justificativa dessa afinidade do LPS por diferentes populações de células do fígado ainda não é conhecida. Sabe-se somente que enquanto o LPS preferencialmente estimula as células de Kupffer a secretar CINC, o TNF-α causa aumento da secreção dessa quimiocina por hepatócitos [Ohkubo et al., 1998].

Nossas observações dão suporte à hipótese de que as MCs tornam a ativação celular mais susceptível a liberação de quimiocinas e assim contribuem para o aumento de sua liberação por hepatócitos e células de Kupffer. Esses mediadores liberados por essas células hepáticas podem contribuir com o aumento da liberação de quimiocinas entre si, tanto por hepatócitos, como por células de Kupffer pelo fato de estarem em contato, ou ativarem neutrófilos presentes no foco inflamatório.

A infiltração de neutrófilos num órgão inflamado, depende da capacidade de serem atraídos em veias capilares e pós-capilares. Nossos resultados sugerem que as MCs ativam mecanismos que direcionam os leucócitos ao foco inflamatório *in vivo*. Foi observado que a injeção de MC-LA, MC-YR ou MC-LR induziu migração de células nas bolsas em números equivalentes e similares a quantidade recrutada pelo fMLP, um N-formilado peptídeo sintetizado por bactérias e usado classicamente como um estímulo inflamatório [Prossnitz e Ye, 1997].

Além disso, nossos dados indicaram também que as MCs agem em diferentes aspectos do processo de migração de leucócitos. Quantidades mais altas de CINC-2αβ foram encontradas nos exsudatos de bolsas induzidas pela injeção das três MCs, enquanto concentrações elevadas de MIP-2 foram observadas somente nos exsudatos das bolsas em que a MC-LR foi injetada. Esses dois mediadores de inflamação são classificados como quimiocinas por serem citocinas quimioatraentes, as quais desempenham uma função fundamental na inflamação, compartilhando a capacidade de induzir migração e de ativar subgrupos específicos de leucócitos, incluindo os neutrófilos [Kobayashi, 2008].

A quimiocina CINC é sintetizada e liberada por leucócitos e células epiteliais e desempenha uma função quimiotática importante em ratos [Watanabe *et al*., 1989; Alonso *et al*., 1996; Yoshida *et al*., 2001; Wuyts *et al*., 1998; Shibata *et al*., 2000;

Shibata *et al*., 1995], enquanto que em seres humanos, a IL-8 tem a mesma atividade [Cassatella *et al*., 1992; Baggliolini e Clark-lewis, 1992]. Outra quimiocina é a MIP, a qual é secretada por macrófagos, linfócitos B, neutrófilos, células dendríticas, mastócitos e células NK [Maurer e von Stebut, 2004]. Portanto, concentrações elevadas de quimiocinas nas bolsas sugerem um efeito das MCs em células residentes, tais como mastócitos, macrófagos ou em neutrófilos recrutados.

Foi demonstrado também que incubações diretas de MC-LA, MC-YR ou MC-LR com neutrófilos humanos induzem secreção de IL-8. E ainda foi observado aumento da secreção de CINC-2αβ por incubação de MC-LR com neutrófilos recrutados no peritônio de ratos. Esses dados sugerem a hipótese de que as MCs podem inicialmente atrair neutrófilos pela atividade inflamatória tecidual que essa toxina exerce, como também aumentar a migração de neutrófilos pela indução da produção de quantidades adicionais de quimiocinas pelos neutrófilos.

Um outro mediador que pode iniciar acúmulo de neutrófilos no fígado é o TNF-α, o qual induz a produção e liberação de grandes quantidades de IL-8 (em seres humanos) e CINC (em ratos) por hepatócitos [Jaeschke *et al.,* 1996], mas não foram observadas mudanças na liberação desta citocina por neutrófilos nos ensaios realizados.

Os leucócitos exercem o comportamento de rolamento durante a acumulação de neutrófilos nas vênulas, causada pelo gradiente quimiotático [Witko-Sarsat *et al*., 2000]. Nos nossos ensaios, a aplicação tópica de MC-LR induziu rolamento de neutrófilos em vênulas pós-capilares do mesentério de ratos, e essas células foram capazes de aderir à parede do vaso. Anteriormente, Hernández *et al*. [2000] mostraram que a MC-LR ativa e induz a aderência de neutrófilos humanos numa membrana inerte. Juntos, esses resultados sugerem que a MC-LR induz interações neutrófilo-endotélio, as quais promovem, pelo menos em parte, a expressão de moléculas de adesão de neutrófilos. As moléculas de adesão *L*-selectina e *β2*-integrina são expressas em membranas de leucócitos durante os comportamentos de rolamento e aderência, respectivamente [Mayadas e Cullere, 2005; Patel *et al*., 2002]. De fato, a incubação de MC-LR com neutrófilos resultou na síntese de RNAm e expressão em membrana celular de *L*-selectina e *β2*-integrinas. Esses efeitos não foram observados com o tratamento com as toxinas MC-LA ou MC-YR.

A capacidade das MCs de desencadear a secreção de quimiocinas e da MC-LR de induzir a síntese de moléculas de adesão, sugerem efeitos potenciais das MCs na transcrição de mRNA de proteínas relacionadas à eventos inflamatórios. O efeito das MCs na ativação do fator nuclear-kappaB (NF-kappaB) e do AP-1 podem ser áreas importantes para uma investigação mais aprofundada, uma vez que esses fatores transcricionais medeiam a síntese de quimiocinas e moléculas de adesão [Nanji *et al*., 1999; Tergaonkar, 2006]. De fato, foi revelado recentemente que a MC-LR induz um aumento na atividade de AP-1 dependente de tempo no fígado de ratos, via proteína quinase c-Jun N-terminal [Wei *et al*., 2008].

A ação direta das MCs na locomoção de neutrófilos também foi estudada em ensaios *in vitro*. Sabe-se que na quimiotaxia, movimento orientado das células em resposta a um agente quimiotático em gradiente, os fatores quimioatraentes se ligam aos receptores de membrana de sete domínios e ativam proteínas-G-heterotrimétricas, as quais ativam uma complexa rede de sinalização organizada, o que induz a polimerização reversível de actina, desenvolvimento de polaridade, aderência reversível e migração [Niggli 2003; Kay *et al*., 2008]. Contudo, a via intracelular de quimiotaxia não está completamente entendida e varia conforme o fator quimiotático [Niggli, 2003].

Utilizando o modelo de Câmara de Boyden, foi demonstrado que as MCs são quimioatraentes para neutrófilos e que a prévia incubação de neutrófilos com as MCs reforça a migração direta de neutrófilos na resposta a um agente inflamatório. Portanto, é evidente que as MCs *per se* ativam mecanismos intracelulares responsáveis pela locomoção orientada e “priming” de neutrófilos em resposta a outro agente quimiotático.

Considerando os dados apresentados nesse trabalho, as ações na quimiotaxia de neutrófilos sugerem que as MCs interagem com componentes de membrana ou penetram em uma célula, ativando-a, e em ambos os casos, devem ativar rotas intracelulares responsáveis por ações pró-inflamatórias. Como as MCs entram na célula ou acionam as vias intracelulares de ativação ainda não está bem estabelecido. Contudo, sabe-se que a MC-LR entra em hepatócitos e atravessa a barreira hematoencefálica através de OATPs [Fischer *et al*., 2005, Lu *et al*., 2008]. Na literatura não há demonstração da expressão desses transportadores pelos

neutrófilos, e só recentemente a expressão de mRNA de OATP foi evidenciado em leucócitos humanos de sangue periférico [Huber *et al*., 2007].

Dois modelos da atividade intracelular da MC-LR em hepatócitos foram propostos. O primeiro está relacionado à inibição específica das proteína fosfatases serina/treonina (PP1 e PP2A), o que resulta na interrupção de muitos processos celulares e alteração de estruturas do citoesqueleto [Mackintosh *et al*., 1990, Ding *et al*., 2001; Toivola e Eriksson, 1999], após a entrada das MCs nos hepatócitos pela via de transporte OATP [Erikkson *et al*., 1990]. O segundo mecanismo propõe que a capacidade das MCs para produzir grandes quantidades de ROS no fígado provoca estresse oxidativo, o qual contribui para a apoptose dos hepatócitos ou promoção de tumor, e conseqüentemente, para o dano hepático [Bouaïcha e Maatouk, 2004; Ding *et al*., 2001, Weng *et al*., 2007, Zegura *et al*., 2006]. Essa lesão hepática pode ser agravada com a diminuição das concentrações de glutationa reduzida pelas MCs, que pode provocar grande desequílibrio no balanço redox celular. Nessas condições, com a produção de ROS aumentada, pode haver a ruptura da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, levando à transição de permeabilidade de membrana e indução ao processo apoptótico [Ding e Ong, 2003]. Além da MC-LR induzir apoptose de hepatócitos, essa toxina tem capacidade para agir como um iniciador de tumor pela indução de dano ao DNA, ou por interação direta com o DNA ou indireta, tal como pela indução de ROS, as quais podem induzir dano oxidativo ao DNA [Wei *et al*., 2008].

Em condições normais, as células são capazes de detoxificar os radicais mas quando as ROS se acumulam, várias mudanças ocorrem em macromoléculas e células, as quais podem levar ao acúmulo de mutações e assim contribuir à promoção de tumor [Matés *et al*., 2000]. Os nossos resultados sugerem que as MC-LA, MC-YR e MC-LR aumentam a produção de ROS extracelular por neutrófilos humanos e de ratos e têm correlação com nossas observações prévias nas quais MC-LR e [Asp^3]-MC-LR causaram um aumento na produção de ROS por neutrófilos humanos pelo uso da técnica de quimiluminescência amplificada por luminol, a qual mede concentrações de ROS intra e extracelular [Kujbida *et al*., 2006].

Os resultados até aqui apresentados reforçam a hipótese de que o recrutamento de neutrófilos pode representar uma fonte adicional de toxicidade das MCs (Figura 21). O processo apoptótico de hepatócitos induzidos por essas toxinas

pode desencadear esse recrutamento, pois quando as células mortas ou danificadas sofrem apoptose pode haver geração de quimiocinas [Faouzi *et al.,* 2001], e esses neutrófilos *per se* aumentam a liberação de ROS, o que pode agravar esse processo ou gerar a promoção de tumores.

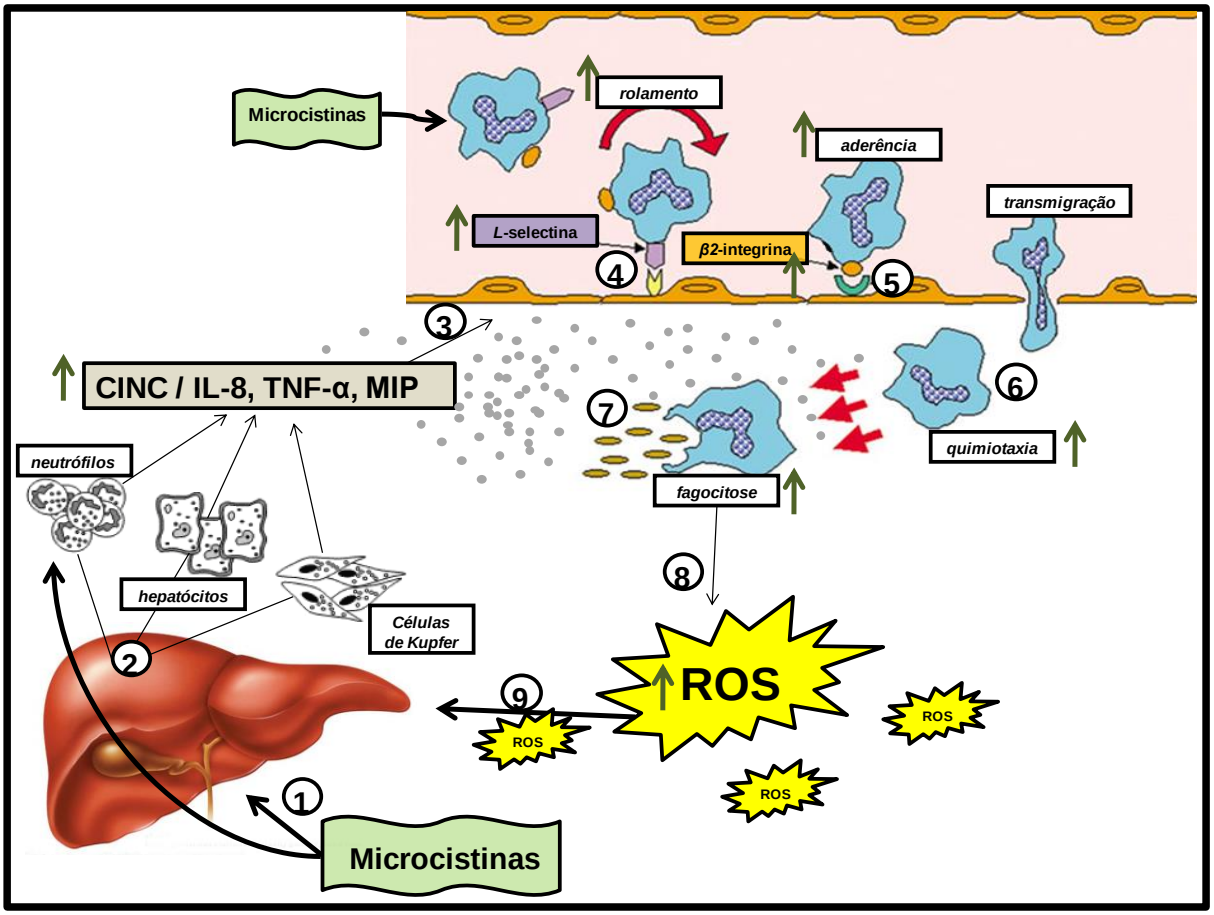


Figura 20. Esquema dos prováveis efeitos das microcistinas (MCs) em funções de neutrófilos. (1) As MCs pré-ativam (2) os hepatócitos e as células de Kupffer a liberarem (3) CINC/IL-8, TNF-α e MIP. Estas quimiocinas pré-ativam os neutrófilos na corrente sanguínea, os quais aumentam os seus comportamentos de rolamento e de aderência, pela maior expressão de (4) L-selectinas e (5) β_2-integrinas, respectivamente, nas suas membranas. Após transmigração, os neutrófilos (6) migram em direção ao foco inflamatório para (7) fagocitarem as células mortas e debilitadas pela toxicidade aguda das MCs [Kujbida *et al.*, 2006], mas por estarem muito ativados, os neutrófilos (8) liberam ROS, causando assim (9) estresse oxidativo adicional no tecido hepático e agravamento dos danos celulares causados pelas MCs.

A figura 20 ilustra os eventos aqui estudados. Nesse trabalho foi observado que a MC-LR aumenta os comportamentos de rolamento e de aderência de leucócitos, e provavelmente isso ocorra por essa MC aumentar a síntese de RNAm e expressão nas suas membranas de L-selectinas e β_2-integrinas, respectivamente. Foi observado também que as MC-LA, MC-YR e MC-LR aumentam a migração de neutrófilos, tanto *in vitro* como *in vivo* per se. E isso pode ter acontecido por essas MCs aumentarem a liberação de quimiocinas tanto por neutrófilos (efeito direto) como por hepatócitos e células de Kupffer (efeito indireto). Assim, os neutrófilos podem estar envolvidos na toxicidade das MCs, por aumentarem a liberação de ROS no foco inflamatório, e por tanto o estresse oxidativo.

Nossos resultados sugerem também que o Ca_i^{2+} pode ser um mecanismo pelo qual a atividade de neutrófilos pode ser modulada pelas MCs. As três toxinas estudadas aumentaram a concentração de Ca_i^{2+} com perfis cinéticos diferentes, indicando que as MCs agem por caminhos distintos de ativação de neutrófilos. O início da resposta de aumento de Ca_i^{2+} pela MC-LR foi mais demorado, mas foi mais intensa e sustentada em comparação com as respostas induzidas pelas MC-YR e MC-LA. Em concordância com esses dados, a função do Ca_i^{2+} na toxicidade da MC-LR já foi demonstrado. O Ca_i^{2+} liberado da mitocôndria após estresse oxidativo induzido pela MC-LR e a ativação de proteína quinase II dependente de calmodulina/íons cálcio foram implicados na apoptose de hepatócitos induzida por MCs [Fladmark *et al*., 1999; Ding e Ong, 2003]. A fonte de Ca_i^{2+} e sua real participação nos processos de migração de neutrófilos requerem uma investigação mais aprofundada. No entanto, sugerimos que a abertura de canais de Ca^{2+} não ocorra pelo acoplamento direto, e sim a geração de um segundo mensageiro, o qual abre os canais de Ca^{2+}, já que as MCs parece não penetrar em neutrófilos. A sinalização de Ca_i^{2+} em neutrófilos é importante para o desencadeiamento e a coordenação do comportamento de neutrófilos. Mudança rápida no formato celulare rearranjo de organelas internas, quimiotaxia, fagocitose, liberação de ROS e apoptose estão relacionados a mudanças da concentração de Ca_i^{2+} livre no citosol [Dewitt e Hallett, 2007].

Outro fato também relevante foi a preservação da viabilidade de neutrófilos humanos observada após o tratamento dessas células com MC-LA e MC-LR (1 e 1000 nM). As razões de sobrevida aumentada são observadas em condições

inflamatórias. É descrito que citocinas e produtos de bactérias podem prolongar a sobrevida de neutrófilos por interferirem com o processo fisiológico de apoptose. Esse processo pode ser importante para a regulação de resistência e de inflamação do hospedeiro, e pode representar um passo essencial de permissão para que certas citocinas e produtos microbiais ativem funções em neutrófilos [Collota *et al.,* 1992]. Já os nossos resultados dos ensaios de fragmentação de DNA sugerem que MC-LA e MC-LR são mais tóxicas do que MC-YR a neutrófilos humanos. Um padrão de toxicidade comparativo similar foi observado em mudanças patológicas induzidas por MC-LR em nefrotoxicidade [Milutinovic *et al.,* 2003] e hepatotoxicidade [Gupta *et al.,* 2003]. Em ambos exemplos a MC-LR foi mais tóxica do que a MC-YR.

Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que a MC-LA, a MC-YR e a MC-LR induzem inflamação e atuam como agentes quimiotáticos de neutrófilos. Esses mecanismos podem potencializar a toxicidade das MCs já que o recrutamento e a ativação desregulados de neutrófilos resultam em danos severos a tecidos sadios adjacentes pela liberação exarcebada de ROS e proteinases. Portanto, uma melhor compreensão dos mecanismos pelos quais as MCs afetam neutrófilos pode fornecer novas abordagens terapêuticas para a intervenção em resposta a grave toxicidade aguda induzida por MCs.

7. CONCLUSÕES

As MCs têm efeito sobre algumas funções de neutrófilos, como a migração, a liberação de citocinas e de ROS e a mobilização de cálcio intracelular. Nesse sentido observou-se que:

(I) As MCs são capazes de alterar a liberação de citocinas quimioatraentes de neutrófilos, sendo que em:

- Células de Kupffer expostas a MC-LA, MC-YR ou MC-LR há aumento da liberação de CINC-2αβ e TNF-α;
- Hepatócitos expostos a MC-LA ou MC-YR há aumento da liberação de CINC-2αβ (ao receber um segundo estímulo);
- Neutrófilos humanos e de ratos expostos a MC-LA, MC-YR ou MC-LR há aumento da liberação de IL-8 e CINC-2αβ, respectivamente;
- Células presentes no foco inflamatório expostas a MC-LA, MC-YR ou MC-LR há aumento da liberação de CINC-2αβ e MIP-2.

(II) O recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório pode ser aumentado pelas MC-LA, MC-YR e MC-LR.

(III) MC-LA, MC-YR e MC-LR têm ação direta na locomoção de neutrófilos e são capazes também de pré-ativar essas células tornando-as mais responsivas a migração.

(IV) Os eventos de migração de leucócitos podem ser alterados por ação da MC-LR devido ao aumento das funções de rolamento, de adesão e de síntese de RNAm e de expressão das moléculas de adesão L-selectina e β_2-integrina dessas células.

(V) MC-LA, MC-YR e MC-LR são capazes de ativarem neutrófilos a produzirem e liberarem ROS.

(VI) aumento do influxo de cálcio intracelular em neutrófilos em presença de MC-LA, MC-YR e MC-LR.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADAMS, D.H.; LLOYD, A.R. Chemokines: Leukocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet*, v. 349, p. 490-495, 1997.

ALONSO, A.; BAYON, Y.; CRESPO, M.S. The expression of cytokineinduced neutrophil chemoattractants (CINC-1 and CINC-2) in rat peritoneal macrophages is triggered by Fc gamma receptor activation: study of the signaling mechanism. *Eur. J. Immunol.*, v. 26, n. 9, p. 2165-2171, 1996.

ARBONES, M.L.; ORD, D.C.; LEY, K.; RATECH, H.; MAYNARD-CURRY, C.; OTTEN, G.; CAPON, D.J.; TEDDER, T.F. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin– deficient mice. *Immunity*, v. 1, p. 247-260, 1994.

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

BAGGLIOLINI, M.; CLARK-LEWIS, I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FESBS*, 307, p. 97-101, 1992.

BATALHA, B.L. Controle da qualidade da água para consumo humano: bases conceituais e operacionais. São Paulo: CETESB, 1998

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, p. 691-698, 2005.

BEVILACQUA, M.P.; NELSON, R.M. Selectins. *J. Clin. Invest.*, v. 91, p.379-387, 1993.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; KUJBIDA, P.; CARDOZO, K.H.M.; CARVALHO, V.M.; MOURA, A.N.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. A novel rhythm of microcystin biosynthesis is described in the cyanobacterium *Microcystis panniformis* Komárek *et al*. *Biochem. Bioph. Res. Comm.*, v. 326, p. 687-694, 2005.

**As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).*

BITTENCOUT-OLIVEIRA, M.C.; MOLICA, R. Cianobactéria invasora: aspectos moleculares e toxicológicos de Cylindrospermopsis raciborskii no Brasil. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n. 30, p. 82-90, 2003.

BOTANA, L.M., ed. *Phycotoxins: Chemistry and biochemistry.* Oxford: Blackwelll Publishing, 2007. 345p.

BOUAÏCHA, N.; MAATOUK, I. Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes, *Toxicol. Lett*., v. 148, p. 53-63, 2004.

BOYDEN, S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.*, v. 15, p. 453-466, 1962.

BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest*., v. 21, p. 77-89, 1968.

BULLARD, D.C.; KUNKEL, E.J.; KUBO, H.; HICKS, M.J.; LORENZO, I.; DOYLE, N.A.; DOERSCHUK, C.M.; LEY, K., BEAUDET, A.L. Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *J. Exp. Med.*, v.183, p. 2329-2336, 1996.

BULLARD, D.C.; QIN, L.; LORENZO, I.; QUINLIN, W.M.; DOYLE, N.A.; BOSSE, R.; VESTWEBER, D.; DOERSCHUK, C.M.; BEAUDET, A.L. P-selectin/ICAM-1 double mutant mice: acute emigration of neutrophils into the peritoneum is completely absent but is normal into pulmonary alveoli. *J. Clin. Invest.*, v. 95, p. 1782-1788, 1995.

CARDOZO, K.H.M.; GUARATINI, T.; BARROS, M.P.; FALCÃO, V.R.; Tonon, A.P.; LOPES, N.P.; CAMPOS, S.C.G.; TORRES, M.A.; SOUZA, A.O. ; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology. C*, Toxicology & Pharmacology, v. 146, p. 60-78, 2007.

CARMICHAEL, W.W. A world overview -One-hundred-twenty-seven years of research on toxic cyanobacteria: Where do we go from here? *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 619, p. 105-120, 2008.

CARMICHAEL, W.W. Cyanobacterial secundary metabolites - the cyanotoxins. *J. App. Bacteriol.*, v. 72, p. 445-459, 1992.

CARMICHAEL, W.W.; AZEVEDO, S.M.F.O.; AN, J.S.; MOLICA, R.J.R.; JOCHIMSEN, E.M.; LAU, S.; RINEHART, K.L.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human Fatalities from Cyanobacteria: Chemical and Biological Evidence for Cyanotoxins. *Environ. Health Persp.*, v. 109, p. 663–668, 2001.

CARVALHO, M.; BENJAMIM, C.; SANTOS, F.; FERREIRA, S.; CUNHA, F. Effect of mast cells depletion on the failure of neutrophil migration during sepsis. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 525, iss. 1-3, p. 161-169, 2005.

CASSATELLA, M.A., BAZZONI, F., MIROSLAV, C., FERRO, I., BAGGLIOLINI, M., BERTON, G. IL-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. The chemoattractant formyl-methionil-leucil-phenylalanine induces the gene expression and release of IL-8 through a Pertussis toxin-sensitive pathway. *J. Immunol.*, v. 148, p. 3216-3229, 1992.

CHEN, Y.M.; LEE, T.H.; LEE, S.J.; HUANG, H.B.; HUANG, R.; CHOU, H.N. Comparison of protein phosphatase inhibition activities and mouse toxicities of microcystins. *Toxicon*, v. 47, p. 742-746, 2006.

CHORUS, I.; BARTRAM, J., eds. *Toxic Cyanobacteria in Water – A guide to their public health consequences, monitoring and management.* London: Spon Press, 2003. 416 p.

CHOSAY, J.G.; ESSANI, N.A.; DUNN, C.J.; JAESCHKE, H. Neutrophil margination and extravasation in sinusoids and venules of liver during endotoxin-induced injury. *Am. J. Physiol.*, v. 272, p. 1195-1200, 1997.

CODD, G.A. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality and the prioritization of eutrophication control. *Ecol. Eng.*, v. 16, p. 51-60, 2000.

CODD, G.A.; BELL, S.G.; KAYA, K.; WARD, C.J.; BEATTIE, K.A.; METCALF, J.S. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *Eur. J. Phycol.*, v. 34, p.405-415, 1999.

CODD, G.A.; MORRISON, L.F.; METCALF, J.S. Cyanobacterial toxins: management for health protection. *Toxicol. App. Pharm.*, v. 203, p. 264-272, 2005.

COLLOTA, F.; RE, F.; POLENTARUTTI, N.; SOZZANI, S.; ANTOVANI, A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*, v. 80, p. 2012-2020, 1992.

COPPLE, B.L.; GANEY, P.E.; ROTH, R.A. Liver inflammation during monocrotaline hepatotoxicity. *Toxicology*, v. 190, p. 155-169, 2003.

COSTA, M.M.T.M.; OLIVEIRA, S.H.P.; GOMES-FILHO, J.E. Mechanism of calcium hydroxide–induced neutrophil migration into air-pouch cavity. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v. 105, p. 814-821, 2008.

COX, P.A.; BANACK, S.A.; MURCH, S.J.; RASMUSSEN, U.; TIEN, G.; BIDIGARE, R.R.; METCALF, J.S.; MORRISON, L.F.; CODD, G.A.; BERGMAN, B. Diverse Taxa of Cyanobacteria Produce beta-n-methylamino-l-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 102, p. 5074-5078, 2005.

CROCKETT-TORABI, E. Selectins and mechanisms of signal transduction. *J. Leukocyte Biol.*, v. 63, p. 1-14, 1998.

CURY-BOAVENTURA, M.F.; GORJÃO, R.; DE LIMA, T.M.; NEWSHOLME, P.; CURI, R. Comparative toxicity of oleic and linoleic acid on human lymphocytes. *Life Sci*., v. 78, p. 1448-1456, 2006.

DAHM, L.J.; SCHULTZE, A.E.; ROTH, R.A. An antibody to neutrophils attenuates alpha-naphthylisothiocyanate-induced liver injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 256, p. 412-420, 1991.

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

DE MAGALHAES, V.F.; SOARES, R.M.; AZEVEDO, S.M.F.O. Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon*, v. 39, n. 7, p. 1077-1085, 2001.

DEWITT, S.; HALLETT, M. Leukocyte membrane “expansion”: a central mechanism for leukocyte extravasation. *J. Leukoc. Biol.*, v. 81, p. 1160-1164, 2007.

DIETRICH, D.R.; HOEGER, S.J. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue–green algal supplements): a reasonable or misguided approach? *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 203, p. 273-289, 2005.

DING, W.X.; ONG, C.N. Role of oxidative sdtress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 220, p. 1-7, 2003.

DING, W.X.; SHEN, H.M.; ONG, C.N. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology,* v. 32, p. 547-555, 2000.

DING, W.X.; SHEN, H.M.; ONG, C.N. Critical role of reactive oxygen species formation in microcystin-induced cytoskeleton disruption in primary cultured hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health A*, v. 64, p. 321-331, 2001.

DITTMANN, E.; WIEGAND, C. Cyanobacterial toxins – occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Mol. Nutr. Food Res*., v. 50, p. 7-17, 2006.

DORMAN, R.B.; GUJRAL, J.S.; BAJT, M.L.; FARHOOD, A.; JAESCHKE, H. Generation and functional significance of CXC chemokines for neutrophil-induced liver injury during endotoxemia. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.*, v. 288, p. 880-886, 2005.

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

ERIKSSON, J.E.; TOIVOLA, D.T.; MERILUOTO, J.A.O.; HAN, Y-H.; KARAKI, H.; HARTSHORNE, D. Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial hepatotoxins reflects inhibition of protein phosphatases. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., v. 173, p. 1347-1353, 1990.

EVERS, R.; CHU, X. Role of the Murine Organic Anion-Transporting Polypeptide 1b2 (Oatp1b2) in Drug Disposition and Hepatotoxicity. *Mol. Pharmacol.*, v. 74, p. 309-311, 2008.

FAOUZI, S.; BURCKHARDT, B.E.; HANSON, J.C.; CAMPE, C.B.; SCHRUM, L.W.; RIPPE, R.A.; MAHER, J.J. Anti-Fas induces hepatic chemokines and promotes inflammation by an NF-B-independent, caspase-3-dependent pathway. *J. Biol. Chem*., v. 276, p. 49077–49082, 2001.

FARSKY, S.H.; WALBER, J.; COSTA-CRUZ, M.; CURY, Y.; TEIXEIRA, C.F. Leukocyte response induced by Bothrops jararaca crude venom: *in vivo* and *in vitro* studies. *Toxicon*, v. 2, p. 185-193, 1997.

FARSKY, S.P.; SANNOMIYA, P.; GARCIA-LEME, J. Secreted glucocorticoids regulate leukocyte-endotelial interationnns in inflammation. A direct vital microscopic study. *J. Leukoc.Biol.*, v. 57, p. 379 – 386, 1995.

FAURSCHOU, M., BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.*, v. 5, p. 1317-1327, 2003.

FISCHER, W.J.; ALTHEIMER, S.; CATTORI, V.; MEIER, P.J.; DIETRICH, D.R.; HAGENBUCH, B. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 205, v. 257-265, 2005.

FISCHER, W.J.; TENCALLA, F.; HITZFELD, B.C.; MIKHAILOV, A.; ERIKSSON, J.E.; DIETRICH, D.R. Microcystin-LR toxicodynamics, induced pathology, and immunohistochemical localization in livers of blue-green algae exposed rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Toxicol. Sci*., v. 54, p. 365-373, 2000.

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

FLEMING L.E.; RIVERO C.; BURNS J.; WILLIAMS, CH.; BEAN J.A.; SHEA K.A.; STINN, J. Blue green algal (cyanobacterial) toxins, surface drinking water, and liver cancer in Florida*. Harmful Algae*, v. 1, p. 157–168, 2002.

FREIRE, M.G.M.; DESOUZA, I.A.; SILVA, A.C.M.; MACEDO, M.L.R.; LIMA, M.S.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; ANTUNES, E.; MARANGONI, S. Inflammatory responses induced in mice by lectin from Talisia esculenta seeds. *Toxicon*, v. 42, p. 275-280, 2003.

FU, W.Y.; CHEN, J.P.; WANG, X.M.; XU, L.H. Altered expression of p53, Bcl-2 and Bax induced by microcystin-LR in vivo and in vitro. *Toxicon*, v. 46, p. 171-177, 2005.

GANGUR, V.; BIRMINGHAM, N.P.; THANESVORAKUL, S. *Veterinary Immunol. Immunopathol.*, v. 86, 127-136, 2002.

GEHRINGER, M.M. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. *FEBS Lett*., v. 557, p. 1-8, 2004.

GIAVAROTTI, K.A.S. *Estudo do Estresse Oxidativo Hepático Induzido por Lindano em um Modelo de Hipertireoidismo Experimental.* São Paulo, 2001. 159p. Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.

GRANGER, D.N.; KUBES, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J. Leukocyte Biol.*, v. 55, p. 662-675, 1994.

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, p. 285-296, 2003.

GUZMAN, E.R.; SOLTER, P.F. Hepatic oxidative stress follwing prolonged sublethal microcystin-LR exposure. *Toxicol. Patol*. , v. 27, p. 582-588, 1999.

HARADA, K.; MURATA, H.; QIANG, Z.; SUZUKI, M.; KONDO, F. Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria. *Toxicon*, v. 34, p. 701-710, 1996.

HATANAKA, E.; LEVADA-PIRES, A.C.; PITHON-CURI, T.C.; CURI, R. Systematic study on ROS production induced by oleic, linoleic, and γ-linolenic acids in human and rat neutrophils. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 41, p. 1124-1132, 2006.

HERMANSKY, S.J.; STOHS, S.J.; ELDEEN, Z.M.; ROCHE, V.F.; MEREISH, K.A. Evaluation of potencial chemoprotectants against microcystin-LR hepatotoxicity in mice. *J. Appl. Toxicol*., v. 11, p. 65-73, 1991.

HERMANSKY, S.J.; STOHS, S.J.; MARKIN, R.S.; MURRAY, W.J. Hepatic lipid peroxidation, sulfhydryl status, and toxicity of the blue-green algal toxin Microcystin-LR in mice. *J. Toxicol. Environ. Health*, v. 31, p. 71-91, 1990.

HERNÁNDEZ, M.; MACIA, M.; PADILHA, C.; CAMPO, F.F.D. Modulation of human polymorphonuclear leukocyte adherence by cyanopeptide toxins. *Environ. Res.,* v. 84, p. 64-68, 2000.

HONKANEN, R.E.; ZWILLER, J.; MOORE, R.E.; DAILY, S.L.; KHATRA, B.S.; DUKELOW, M.; BOYNTON, A.L. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *J. Biol. Chem.,* v. 265, n. 32, p. 19401-19404, 1990.

HUBER, R.D.; GAO, B.; PFÄNDLER, M.-A.S.; ZHANG-FU, W.; LEUTHOLD, S.; HAGENBUCH, B.; FOLKERS, G.; MEIER, P.J.; STIEGER, B. Characterization of two splice variants of human organic anion transporting polypeptide 3A1 isolated from human brain. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.,* v. 292, p. 795-806, 2007.

HUMPAGE, A. Toxin types, toxicokinetics and toxicodynamics. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 619, p. 383-415, 2008.

IBELINGS, B.W.; CHORUS; I. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater ‘‘seafood’’ and its consequences for public health: A review. *Environ. Pollut.*, v. 150, p. 177-192, 2007.

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

JAESCHKE, H.; HO, Y.S.; FISHER, M.A.; LAWSON, J. A.; FARHOOD, A. Glutathione peroxidase-deficient mice are more susceptible to neutrophil-mediated hepatic parenchymal cell injury during endotoxemia: importance of an intracellular oxidant stress. *Hepatology*, v. 29, p. 443-450, 1999.

JAESCHKE, H.; SMITH, C. W. Cell Adhesion and Migration III. Leukocyte adhesion and transmigration in the liver vasculature. *Am. J. Physiol.*, v. 273 (Gastrointest. Liver Physiol. 36), p. 1169 - 1173, 1997.

JAESCHKE, H.; HASEGAWA, T. Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. *Liver Int.*, v. 26, p. 912-919, 2006.

JAESCHKE, H.; ORES, G.J.; CEDERBAUM, A.I.; HINSON, J.A.; PESSAYRE, D.; LEMASTERS, J.J. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.*, v. 65, p. 166-176, 2002.

JAESCHKE, H.; SMITH, C.W.; CLEMENS, M.G.; GANEY, P.E.; ROTH, R. Mechanisms of inflamation liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils. *Toxicol. Appl. Pharm.*, v. 139, p. 213-226, 1996.

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

JOHNSON, R.C.; MAYADAS, T.N.; FRENETTE, P.S.; MEBIUS, R.E.; SUBRAMANIAM, M.; LACASCE, A.; HYNES, R.O.; WAGNER, D.D. Blood cell dynamics in P-selectin– deficient mice. *Blood*, v. 86, p. 1106-1114, 1995.

KAY, R.R.; LANGRIDGE, P.; TRAYNOR, D.; HOELLER, O. Changing directions in the study of chemotaxis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v. 9, p. 455-463, 2008.

KELLY, M., HWANG, J.M., KUBES, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 120, p. 3-10, 2007.

KOBAYASHI, Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front. Biosci.*, v. 13, p. 2400-2407, 2008.

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

KROEMER, G.; DALLAPORTA, B.; RESCHE-RIGON, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.,* v. 60, p. 619-642, 1998.

KUJBIDA, P.; HATANAKA, E.; CAMPA, A.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Effects of microcystins on human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. Bioph. Res. Comm.*, v. 341, p. 273-277, 2006.

LAGRANHA, C.J.; DE LIMA, T.M.; SENNA, S.M.; DÓI, S.Q.; CURI, R.; PITHON-CURI, T.C. The effect of glutamine supplementation on the function of neutrophils from exercised rats. *Cell. Biochem. Funct*., v. 23, p. 101-107, 2005.

LEE, R.E. *Phycology*, Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 44-5.

LOTUFO, C.M.C. *Efeito da melatonina sobre as alterações vasculares que caracterizam a inflamação aguda.* São Paulo, 2003. 89p. Tese de Doutorado - Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo.

LU, H.; CHOUDHURI, S.; OGURA, K.; CSANAKY, I.L.; LEI, X.; CHENG, X.; SONG, P.; KLAASSEN, C.D. Characterization of organic anion transporting polypeptide 1b2-null mice: essential role in hepatic uptake/toxicity of phalloidin and microcystin-LR. *Toxicol. Sci.*, v. 103, n. 1, p. 35-45, 2008.

LUSTER, M.I.; SIMEONOVA, P.P.; GALLUCCI R.P.; MATHESON, J.P. Tumor Necrosis Factor α and Toxicology, *Crit. Ver. Toxicol.*, v. 29, ISS. 5, p. 491-511, 1999.

MAATOUK, I.; BOUAÏCHA, I. N.; PLESSISAND, M.J.; PERIN, F.Ç. Detection by 32P-postlabelling of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in DNA as biomarker of microcystin-LR-and nodularin-induced DNA damage in vitro in primary cultured rat hepatocytes and in vivo in rat liver. *Mutat. Res*., v. 564, p. 9-20, 2004.

MACKINTOSH, C.; BEATTIE, K.A.; KLMPP, 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. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.*, v. 264, n. 2, p. 187-192, 1990.

MATÉS, J.M.; SEGURA, J.A.; MÁRQUEZ, F.J.A.J. Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis *Arch. Toxicol*., v. 82, p. 273-299, 2008.

MAURER, M.; VON STEBUT, E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 36, p. 1882-1886, 2004.

MAYADAS, T.N.; CULLERE, X. Neutrophil β2-integrins: moderators of life or death decisions. *TRENDS Immunol.*, v. 26, n. 7, p. 388-395, 2005.

MEREISH, K.A.; BUNNER, D.L.; RAGLAND, D.R.; CREASIA, D.A. Protection Against Microcystin-LR-induced hepatotoxicity by silymarin: biochemistry, histopathology, and lethality. *Farm. Res*., v. 8, n. 2, p. 273-277, 1991.

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

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria n. 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, dá outras providências.

MURPHY, P.M.; BAGGIOLINI, M.; CHARO, I.F.; HEBERT, C.A.; HORUK, R.; MATSUSHIMA, K. International union of pharmacology: XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.*, v. 52, n. 1, p. 145-176, 2000.

NANJI, A.A.; JOKELAINEN, K.; RAHEMTULLA, A.; MIAO, L.; FOGT, F.; MATSUMOTO, H.; TAHAN, S.R.; SU. G.L. Activation of nuclear factor kappa B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology*, v. 30, p. 934-943, 1999.

NICOLETTI, I., MIGLIORATI, G., PAGLIACCI, M.C., GRIGNANI, F., RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J. Immunol. Methods, v. 139, n. 2, p. 271– 279, 1991.

NIGGLI, V. Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 35, p. 1619-1638, 2003.

OHKUBO, K.; MASUMOTO, T.; HORIIKE, N.; ONJI, M. Induction of CINC (interleukin-8) production in rat liver by non-parenchymal cells. *J. Gastroenterol. Hepatol*., v. 13, n. 7, p. 696-702, 1998.

OSBORNE, N.J.T.; WEBB, P.M.; SHAW, G.R. The toxins of Lyngbya majuscula and their human and ecological health effects. *Environ. Int.*, v. 27, p. 381-392, 2001.

OSSWALD; J.; RELLÁN, S.; GAGO, A.; VASCONCELOS, V. Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environ. Int.*, v. 33, p. 1070-1089, 2007.

PACE, J.G.; ROBINSON, N.A.; MIUAI, G.A.; MATSON, C.F.; GEISBERT, T.W.; WHITE, J.D. Toxicity and kinetics of [3HlMicrocystin-LR in isolated perfused liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol*., v. 107, p. 391-401, 1991.

PATEL, K.D.; CUVELIER, S.L.; WIEHLER, S. Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. Semin. Immunol. 14, 73-81. , 2002.

POURIA, S.; DE 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. *Lancet*, v. 352, n. 9121, p. 21-26, 1998.

PROSSNITZ, E.R., YE, R.D., 1997. The N-formyl peptide receptor: a model for the study of chemoattractant receptor structure and function. Pharmacol. Ther. 74 (1), 73-102.

QUILLIAM, M. A. Phycotoxins*. J. AOAC Int*., v. 82, n. 3, p. 773-781, 1999.

RAO, P.V.L.; BHATTACHARAYA, R. The cyanobacteria toxin microcystin-LR induced DNA damage in mouse liver in vivo. *Toxicology*, v. 114, p. 29-36, 1996.

RAO, P.V.L.; BRATTACHARAYA, R.; PANT, S.C.; BHASKAR, A.S. Toxicity evaluation of in vitro cultures of freshwater cyanobacterium Microcystis aeruginosa. I. Hepatotoxic histopatological effects in rats. *Biomed. Environ. Sci*., v. 8, p. 254-264, 1995.

ROTHE, G.; VALET, G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2′,7′-dichlorofluorescin. *J. Leukocyte Biol.*, v. 47, p. 440-448, 1990.

RUNNEGAR, M.; BERNDT, N.; KONG, S.M.; LEE, E.Y.; ZHANG, L. In vivo and *in vitro* binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 216, p. 162-169, 1995.

SEDGWICK, A.D.; LEES, P. (a). Comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. *Agents Actions*, v. 18, n. 3-4, p. 439-446, 1986.

SEDGWICK, A.D.; LEES, P. (b). Studies of eicosanoid production in the air pouch model of synovial inflammation. *Agents Actions*, v. 18, p. 429-438, 1986.

SHIBATA, F.; KONISHI, K.; NAKAGAWA, H. Identification of a common receptor for three types of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINCs). *Cytokine*, v. 12, n. 9, p. 1368-1373, 2000.

SHIBATA, F.; KONISHI, K.; KATO, H.; KOMORITA, N.; AL-MOKDAD, M.; FUJIOKA. M.; NAKAGAWA, H. Recombinant production and biological properties of rat cytokines-induced neutrophil chemoattractants, GRO/CINC-2α, CINC-2β and CINC-3. *Eur. J. Biochem.*, v. 231, p. 306-311, 1995.

SICINSKA, P.; BUKOWSKA, B.; MICHALOWICZ, J.; DUDA, W. Damage of cell membrane and antioxidative system in human erythrocytes incubated with microcystin-LR in vitro. *Toxicon*, v. 47, p. 387-397, 2006.

SIN,Y.M.; SEDGWICK, A.D.; CHEA, E.P.; WILLOUGHBY, D.A. Mast cells in newly formed lining tissue during acute inflammation: a six day air pouch model in the mouse. *Ann. Rheum. Dis.*, v. 45, n. 10, p. 873-877, 1986.

SINCLAIR, J.L.; HALL, S.; BERKMAN, J.A.H.; BOYER, G.; BURKHOLDER; J.; BURNS, J.; CARMICHAEL, W.; DUFOUR, A.; FRAZIER, W.; MORTON S.L.; O'Brien, E.; Walker, S. Occurrence of cyanobacterial harmful algal blooms workgroup report. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 619, p.45-103, 2008.

SKULBERG, O.M. Microalgae as a source of bioactive molecules – experience from cyanophyte research. *J. Appl. Phicol.*, v. 12, n. 3-5, p. 341-348, 2000.

SOARES, R.M.; CAGIDO, V.R.; FERRARO, R.B.; MEYER-FERNANDES, J.R.; ROCCO, P.R.M.; ZIN, W.A.; AZEVEDO, S.M.F.O. Effects of microcystin-LR on mouse lungs. *Toxicon*, v. 50, p.330-338, 2007.

STEVENS, P.; HONG, D.P. The role of myeloperoxidase and superoxide anion in the luminol-dependent and lucigenin-dependent chemiluminescence of human-neutrophils, *Microchem. J.*, v. 30, p. 135-146, 1984 *apud* MEDLINE. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed . Acesso em: 17 outubro 2008.

SVERCK, C.; SMITH, D.W. Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. *J. Environ. Eng. Sci.*,v. 3, p. 155, 2004.

TEDDER, T.F.; STEEBER, D.A.; PIZCUETA, P. L-selectin– deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *J. Exp. Med.*, v. 181, p. 2259-2264, 1995.

TEIXEIRA, M.G.L.C.; COSTA, M.C.N.; CARVALHO, V.L.P.; PEREIRA, M.S.; HAGE, E. Epidemia de gastroenterite na área de barragem de Itaparica, Bahia. *Boletim of Sanitary Panamerican*, v. 114, p. 502-512, 1993.

TERGAONKAR, V. NFkappaB pathway: A good signaling paradigm and therapeutic target. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 38, p. 1647-1653, 2006.

TERHEGGEN-LAGRO, S.W.J.; RIJKERS, G.T.; VAN DER ENT, C.K. The role of airway epithelium and blood neutrophils in the inflammatory response in cystic fibrosis. *J. Cystic Fibrosis*, v. 4, p. 15-23, 2005.

THOMPSON, W.L.; PAGE, J.G. Substances that protect cultured hepatocytes from the toxic effects of microcystin-LR. *Toxicol. in vitro*, v. 6, p. 579-587, 1992.

TOIVOLA, D.M.; ERIKSSON, J.E. Toxins affecting cell signaling and alteration of cytoskeletal structure. *Toxicol. in vitro*, v. 13, p. 521-530, 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, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis*, v. 17, n. 6, p. 1317-1321, 1996.

US EPA. Toxicological Reviews of Cyanobacterial Toxins: Microcystins LR, RR, YR and LA (External Review Draft). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/600/R-06/139, 2006.

VAN APELDOORN, M.E.; VAN EDMOND, H.P.; SPEIJERS, G.J.A.; BAKKER, G.J.I. Toxins of cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food Res*., v. 51, p. 7-60, 2007.

VAN ENGELAND, M.; NIELAND, L.J.W.; RAMAEKERS, F.C.S.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C.P.M. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, v. 31, p. 1-9, 1998.

VASCONCELOS, V.M. Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. *Braz. J. Med. Biol. Res*., v. 32, p. 249-254, 1999.

VESTWEBER, D.; BLANKS, J.E. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol. Rev.*, v. 79, p. 181-213, 1999.

WATANABE, K.; KONISH, K.; FUJIOKA, M.; KINOSHITA, S.; NAKAGAWA, H. The neutrophil chemoattractant produced by the rat kidney epithelioid cell line NRK-52E is a protein related to the KC/gro protein. *J. Biol. Chem.*, v. 264, p. 19559-19563, 1989.

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

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

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

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

WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 203, p. 201-218, 2005.

WITKO-SARSAT, V.; RIEU, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; LESAVRE, P.; HALBWACHS-MECARELLI, L. Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. *Laboratory Investigation*, v. 80, n. 5, p. 617, 2000.

WONG, J.; JOHNSTON, B.; LEE, S.S.; BULLARD, D.C.; SMITH, C.W.; BEAUDET, A.L.; KUBES, P. A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature. *J. Clin. Invest.*, v. 99, p. 2782-2790, 1997.

WUYTS, A.; PROOST, P.; LENAERTS, J.P.; BEN-BARUCH, A.; VAN DAMME, J.; WANG, J.M. Differential usage of the CXC chemokine receptors 1 and 2 by interleukin-8, granulocyte chemotactic protein-2 and epithelial-cell-derived neutrophil attractant-78. *Eur. J. Biochem.*, v. 255, n. 1, p. 67-73, 1998.

YOSHIDA, T.; TAKEDA, M.; TSUTSUMI, T.; NAGATA, S.; YOSHIDA, F.; MAITA, K.; HARADA, T.; UENO, Y. Tumor necrosis factor-α expression and kupffer cell activation in hepatotoxicity caused by microcystin-LR in mice. *J. Toxicol. Pathol.*, v. 14, p. 259-265, 2001.

ZAGATTO, P.A.; ARAGÃO, M.A.; CARVALHO, M.C.; SOUZA, R.C.R. *Manual de Orientação em Casos de Florações de Algas Tóxicas: um Problema Ambiental e de Saúde Pública*. São Paulo: CETESB, 1997. p. 9-10.

ZEGURA, B.; LAH, T.T.; FILIPIC, M. Alteration of intracellular GSH levels and its role in microcystin-LR-induced DNA damage in human hepatoma HepG2 cells. *Mutat. Res*., v. 611, p. 25-33, 2006.

ZEGURA, B.; LAH, T.T.; FILIPIC, M. The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. *Toxicology*, v. 2000, p. 59-68, 2004.

ZEGURA, B.; SEDMAK, B.; FILIPIC, M. Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicon*, v. 41, p. 41-48, 2003.

ZIGMOND, S.H.; HIRSCH, J.G. Leukocyte locomotion and chemotaxis: new method for evaluation and demonstration of cell-derived chemotactic factor. *J. Exp. Med.*, v. 137, p. 387-410, 1973.

9. ANEXOS

9.1 ANEXO I: Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 – e-mail: pgfarma@usp.br

9.2 ANEXO II: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 135/2004

São Paulo, 07 de dezembro de 2004.

Ilmo(a). Sr(a).
Paula da Silva Kujbida

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 06 de dezembro p.p., **APROVOU** o projeto "Alguns aspectos do mecanismo de ação das microcistinas sobre a função de neutrófilos humanos" (Protocolo nº 275) apresentado por Vossa Senhoria, devendo apenas ser especificado a faixa etária dos indivíduos da pesquisa, bem como informada a fonte financiadora do projeto.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Profª. Drª. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP

Orientador: Prof. Ernani Pinto Junior
FBC

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3677 - Fax (11) 3031-8986 - e-mail: cepfcf@usp.br

9.3 ANEXO III: Termo de Consentimento pós informativo

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome do Paciente:.....

Documento de Identidade Nº :..... Sexo: ( ) M ( ) F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:.....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....

CEP:.....Telefone:.....

2. Responsável Legal:.....

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):.....

Documento de Identidade Nº:.....Sexo: ( )M ( )F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº: .....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....CEP:.....Tel:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa: "Alguns aspectos do mecanismo de ação das microcistinas sobre a função de neutrófilos humanos"

2. Pesquisadora: Paula da Silva Kujbida

Cargo/Função: Aluna do curso de Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas – FCF/USP
Inscrição Conselho Regional: CRFNº: 30812
Departamento da FCF/USP: Análises Clínicas e Toxicológicas

1. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Sem Risco ( ) Risco Mínimo (X) Risco Médio ( )

Risco Baixo ( ) Risco Maior ( )

(Probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como conseqüência imediata ou tardia do estudo. Nos projetos com coleta de sangue, incluir detalhadamente, como observação as possíveis reações decorrentes desse procedimento.)

Duração da Pesquisa: 03 anos

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa: Um dos problemas que atualmente desafiam as instituições responsáveis pelo fornecimento de água para a população é a contaminação por toxinas de cianobactérias (algas azuís), que podem causar indução de tumor e danos ao fígado. Poucas são as reportagens sobre os efeitos destas toxinas no sistema imune humano. Devido a esta falta de evidência experimental, este projeto tem o objetivo de elucidar alguns aspectos do mecanismo de ação das microcistinas sobre a função de neutrófilos humanos.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos**: Serão incluídos neste estudo 20 doadores de sangue periférico que não tenham administrado nenhum tipo de medicamento anti-inflamatório, e nem estarem com qualquer sintoma de doença, até 24 horas antes da coleta. O volume coletado será de 10 mL de cada doador. As coletas serão realizadas no Setor de Bioquímica do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Após a realização das coletas de sangue dos doadores serão separados os neutrófilos das amostras para execução de ensaios imunotoxicológicos no Departamento de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.**

3. Desconfortos e riscos**: Os materiais de coleta não oferecem nenhum risco de contaminação aos doadores, uma vez que todo o material utilizado é estéril e de uso único.**

4. Benefícios**: A contribuição do voluntário trará benefício ao próprio indivíduo e à população em geral, visto que todos podem estar expostos à água contaminada por microcistinas. A realização dos ensaios é importante para entender o mecanismo de ação destas toxinas durante a intoxicação.**

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

A participação neste estudo é voluntária, tendo o doador liberdade para recusar ou retirar seu consentimento para fazer parte da mesma no momento que desejar, sem que haja prejuízo ao seu atendimento.

Os doadores que participarem deste projeto, em hipótese alguma terão sua identidade divulgada para outras pessoas que não façam parte da pesquisa. Também serão mantidas em sigilo todas as informações obtidas e que estejam relacionadas com a privacidade dos doadores.

Os pesquisadores e a Comissão de Ética que aprovou este estudo, comprometem-se a fornecer todas as informações que venham a obter durante a pesquisa.

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Orientadora da Pesquisa: Prof. Dr. Ernani Pinto Júnior – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP – Fone: (11) 3091-2192.

Autora da Pesquisa: Discente de Pós-Graduação de Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas – FCF/USP - Paula da Silva Kujbida – Fone: (11) 6255-0789.

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

Caro colaborador,

A formulação deste documento foi realizada para informá-lo sobre os procedimentos necessários para alcançar o objetivo desse estudo. Caso concorde com a sua participação durante o desenvolvimento do estudo, vale ressaltar que todos os procedimentos adotados estão de acordo com a Declaração de Helsinque, capítulo 50, que trata da proteção dos participantes, parágrafo 50.20/27, que orienta procedimentos referentes às pesquisas que necessitam experiências com humanos.

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

_____ _____

Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

Assinatura da pesquisadora
Paula da Silva Kujbida

9.4 ANEXO IV: Aprovação do Comitê de ética em Experimentação Animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

CEEA nº 24 /2007

CERTIFICADO

*Certificamos que o Projeto "**Alguns aspectos do mecanismo de ação das microcistinas sobre funções de neutrófilos de ratos**" (Protocolo CEEA nº146), sob a responsabilidade da Sra. **Paula da Silva Kujbida** e do orientador Prof. Ernani Pinto, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 09/04/2007.*

São Paulo, 10 de abril de 2007.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3677 / Fax: (11) 3813-5093 - e-mail: rtrigo@usp.br

9.5 ANEXO V: Curriculum vitae

Formação acadêmica/Titulação

2005 Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
com período sanduíche em Friedrich-Shiller-Universität Jena (Orientador:Bernd Luckas).
Título: Alguns aspectos do mecanismo de ação das microcistinas sobre a função de neutrófilos humanos, *Orientador:* Ernani Pinto.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
Palavras-chave: microcistinas; migração; neutrófilos; espécies reativas de oxigênio; cultivo celular; amostras ambientais.

2003 - 2005 Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Microcistinas produzidas pela cianobactéria Microcystis panniformis e alguns efeitos sobre funções de neutrófilos, *Ano de Obtenção:* 2005.
Orientador: Ernani Pinto.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

1998 - 2002 Graduação em Farmácia - Bioquímica. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Brasil.

Formação complementar

2008 - 2008 PCR em Tempo Real. (Carga horária: 20h).
LGC Biotecnologia, LGC, Brasil.

Projetos de Pesquisa (como integrante)

2006 - Atual Convênio Internacional entre a Universidade de Jena - Alemanha e a Universidade de São Paulo, visando a cooperação acadêmica na área de Toxicologia Analítica e Monitoramento de Cianotoxinas

.

2005 - 2008 04/14264-0 - Avaliação dos possíveis mecanismos de ação das microcistinas sobre a função de neutrófilos humanos

2005 - Atual 475607/2004-0 - Padronização de métodos para o isolamento e quantificação de hepatotoxinas presentes em reservatórios na Zona da Mata/Pernambuco

2004 - Atual 03/06443-0 - Algas presentes em florações: Isolamento e padronização de métodos analíticos para a quantificação de toxinas

Prêmios e títulos

2007 (1º lugar) Bolsa de Auxílio à Pesquisa/Prêmio MAPFRE-USP 2007, Fundação MAPFRE - Espanha e a USP.

Produção em C,T & A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. KUJBIDA, P. ; HATANAKA, E ; CAMPA, A ; CURI, R ; POLISELLIFARSKY, S ; PINTO, E . Analysis of chemokines and reactive oxygen species formation by rat and human neutrophils induced by microcystin-LA, -YR and -LR?. Toxicon, v. 51, p. 1274-1280, 2008.

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

3. BITTENCOURTOLIVEIRA, M ; KUJBIDA, P. ; CARDOZO, K ; CARVALHO, V ; MOURA, A ; COLEPICOLO, P ; PINTO, E . A novel rhythm of microcystin biosynthesis is described in the cyanobacterium Microcystis panniformis Komárek et al.. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 326, p. 687-694, 2005.

Capítulos de livros publicados

1. KUJBIDA, P. ; Rodriguez, V.C. ; PINTO, E. . Cianobactérias e Microalgas Tóxicas em Ambientes Aquáticos. In: Seizi Oga; Márcia Maria de Almeida Camargo; José Antônio de Oliveira Batistuzzo. (Org.). Fundamentos de Toxicologia. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2008, v. , p. 225-240.

Textos em jornais de notícias/revistas

1. Silva, LC ; Húngaro, MP ; KUJBIDA, P. . Benchmarking aplicado ao controle do uso de antimicrobianos no Hospital de Aeronáutica de São Paulo. Revista Medica da Aeronautica do Brasil, Rio de Janeiro, p. 41 - 45, 01 dez. 2002.

Resumos publicados em anais de congressos

1. KUJBIDA, P. ; HATANAKA, E. ; Vinolo, M. ; Wiaisman, K. ; FARSKY, S.H.P. ; CURI, R. ; PINTO, E. . Effects of Microcystins LA, -YR and LR on neutrophil mobilization into inflammatory focus. In: 5th Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) World Congress, 2008, Sydney. Congress Abstract "Protecting our Global Environment", 2008.

2. KUJBIDA, P. ; HATANAKA, E. ; CAMPA, A. ; CURI, R. ; PINTO, E. . Immunotoxic effects of microcystin-LR, -YR and -LA in human neutrophils. In: XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2007, Salvador-BA. CD-ROM da XXXVI Annual Meeting of the SBBq and 10th IUBMB Conference. São Paulo, 2007.

3 BRAGA, R.C. ; dos ANJOS, F. M. ; KUJBIDA, P. ; SILVA, D.O. ; SILVA, P.N. ; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. ; COLEPICOLO, P. ; PINTO, E. . Characterization of microcystins from eleven Brazilian strains of Microcystis by ESI-MS/MS. In: XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2007, Salvador - BA. CD-ROM da XXXVI Annual Meeting of the SBBq and 10th IUBMB Conference. São Paulo, 2007.

4 BRAGA, R.C. ; dos ANJOS, F. M. ; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. ; KUJBIDA, P. ; SILVA, D.O. ; COLEPICOLO, P. ; PINTO, E. . Caracterização de microcistinas de cepas brasileiras de Microcystis por ESI-MS/MS.. In: 30 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia. Anais da 30º Reunião Anual da SBq, 2007.

5. KUJBIDA, P. ; HATANAKA, E. ; CAMPA, A. ; CURI, R. ; PINTO, E. . Neutrophils: a possible link between microcystin toxic effects.. In: VII International Conference on Toxic Cyanobacteria, 2007, Rio das Pedras - RJ. Abstraxt book of VII national Conference on Toxic Cyanobacteria. Rio de Janeiro, 2007. p. 121-121.

6 KUJBIDA, P. ; HATANAKA, E. ; CAMPA, A. ; CURI, R. ; PINTO, E. . Microcistinas como ativadoras de neutrófilos. In: XII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia - USP, 2007, São Paulo. CD Room da XII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. São Paulo, 2007.

7 KUJBIDA, P. ; HATANAKA, E. ; CAMPA, A. ; COLEPICOLO, P. ; PINTO, E. . Efeitos das microcistinas em neutrófilos humanos. In: XI Congresso Brasileiro de Ficologia, 2006, Itajaí - SC. Anais do XI Congresso Brasileiro de Ficologia & Simpósio Latino-Americano sobre algas nocivas, 2006.

8 KUJBIDA, P. ; HATANAKA, E. ; CAMPA, A. ; COLEPICOLO, P. ; PINTO, E. . Avaliação imunotoxicológica de MC-LR e [Asp3]-MC-LR em neutrófilos humanos. In: XI Semana farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2006, São Paulo-SP. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, 2006. v. 42. p. 6-6.

9. dos ANJOS, F. M. ; KUJBIDA, P. ; COSTA, I.A.S. ; PINTO, E. . Determinação de toxinas de cianobactérias em reservatório de Rio Grande do Norte. In: XI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP, 2006, São Paulo-SP. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. são Paulo, 2006. v. 42. p. 89-89.

10. KUJBIDA, P. ; CAMPA, A. ; COLEPICOLO, P. ; PINTO, E. ; HATANAKA, E. . Effects of microcystin on polymorphonuclear leukocytes. In: 12th International Conference on Harmful Algae, 2006, Copenhagen - Denmark. International Society for the Study of Harmful Algae, 2006. p. 210-211.

11. KUJBIDA, P. ; CARDOZO, K. H. M. ; BARROS, M. P. ; COLEPICOLO, P. ; PINTO, E. . Identificação das as produzidas pela cianobactéria Microcystis panniformis. In: XIV Congresso Paulista de Farmacêuticos, , São Paulo. Revista Científica, 2005.

12. BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. ; Moura, A.N. ; KUJBIDA, P. ; COLEPICOLO, P. ; PINTO, E. . Ritmo endógeno na biossíntese de microcistina. Isso pode interferir no resultado da sua pesquisa?. In: VII Congreso de Ficologia de Latinoamerica y el Caribe, 2005, La Habana, Cuba. Resumenes, 2005. p. 121-121.

13. KUJBIDA, P. ; HATANAKA, E. ; CAMPA, A. ; COLEPICOLO, P. ; PINTO, E. . Efeitos das microcistinas em funções de neutrófilos humanos. In: XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2005, Recife - Pernambuco. Revista Brasileira de Toxicologia. São Paulo, 2005. v. 18. p. 210.

14. BARROS, S.G. ; BUNCH, B. ; Maristela Case Costa Cunha ; MOLICA, R. ; Moura, A.N. ; PINTO, E. ; KUJBIDA, P. ; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. . Ecologia Molecular de Cylindrospermopsis raciborskii (Cyanobacteria): toxinas X distribuição geográfica X morfologia. In: X Reunião da Sociedade Brasileira de Ficologia, 2004, Salvador. CD-ROM da X Reunião da Sociedade Brasileira de Ficologia, 2004.

15. KUJBIDA, P. ; Ernani Pinto ; PINTO, E. ; CAMPOS, S. C. G. ; QUINA, F. H. ; NASCIMENTO, C. A. O. ; COLEPICOLO, P. . Fenol: Toxicidade e Biodegradação pela Microalga Minutocellus polymorphus. In: Fenol: Toxicidade e Biodegradação pela Microalga Minutocellus polymorphus, 2004, Salvador. CD-ROM da X Reunião da Sociedade Brasileira de Ficologia, 2004.

16. KUJBIDA, P. ; CARDOZO, K. H. M. ; BARROS, M. P. ; Ariadne do Nascimento Moura ; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. ; BRIGAGAO, M. R. P. L. ; COLEPICOLO, P. ; PINTO, E. . Ritmicidade biológica da produção de toxinas, pigmentos e dienos conjugados pela cianobactéria Microcystis panniformis. In: XIX Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2004, Águas de Lindóia. XIX Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2004.

17. KUJBIDA, P. ; HATANAKA, E. ; BRIGAGAO, M. R. P. L. ; CAMPA, A. ; COLEPICOLO, P. ; PINTO, E. . Influência das microcistinas produzidas pela cianobactéria Microcystis panniformis no burst oxidativo de neutrófilos humanos. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 2004, Florianópolis. VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 2004.

18. PINTO, E. ; KUJBIDA, P. ; Moura, A.N. ; COLEPICOLO, P. ; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. . First report of microcystins in the tropical cyanobacteria Microcystis panniformis Komárek et al. isolated from Brazil. In: XI Conference on Harmful Algal Blooms, 2004, Cape Town, South Africa. Programme and Abstracts - XI Conference on Harmful Algal Blooms, 2004. p. 211-211.

19. Silva, LC ; Húngaro, MP ; KUJBIDA, P. . Benchmarking aplicado ao controle do uso de antimicrobianos no HASP. In: XIII Congresso Paulista de Farmacêuticos, 2003, São Paulo. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2003. v. 39. p. 24-24.

20. Silveira, GG ; KUJBIDA, P. ; Siqueira,MEPB . Fatores individuais na excreção urinária de metanol em humanos. In: 53a Reunião Anual da SBPC, 2001, Salvador. CD-ROM da 53a Reunião Anual da SBPC, 2001.

21. KUJBIDA, P. ; Silveira, GG ; Siqueira,MEPB . Metanol em urina de uma população não exposta ocupacionalmente. In: XII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2001, Porto Alegre. Revista Brasileira de Toxicologia. Araraquara : UNESP, 2001. v. 14. p. 52-52.

22. KUJBIDA, P. ; Silveira, GG ; Siqueira,MEPB . Valores de referência de metanol urinário. In: XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FESB, 2001, Caxambú. Anais da XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FESB, 2001. p. 233.

23. KUJBIDA, P. ; Silveira, GG ; Siqueira,MEPB . Valores de referência de metanol em urina de população não exposta ocupacionalmente. In: 7a Jornada de Iniciação Científica de Alfenas, 2001, Alfenas. Anais da 7a Jornada de Iniciação Científica de Alfenas, 2001. p. 36.

Apresentações de Trabalho

1. KUJBIDA, P. ; HATANAKA, E. ; Vinolo, M. ; WIAISMAN, K. ; FARSKY, S.H.P. ; CURI, R. ; PINTO, E. . Effects of Microcistins LA, -YR and LR on neutrophil mobilization into inflammatory focus. 2008. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

2. KUJBIDA, P. ; HATANAKA, E. ; CAMPA, A. ; CURI, R. ; PINTO, E. . Immunotoxic effects of microcystin-LR, -YR and -LA in human neutrophils.. 2007. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

3. KUJBIDA, P. ; HATANAKA, E ; CAMPA, A. ; CURI, R. ; PINTO, E. . Neutrophils: a possible link between microcystin and toxic effects.. 2007. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

4. KUJBIDA, P. ; HATANAKA, E. ; CAMPA, A. ; COLEPICOLO, P. ; PINTO, E. . Efeitos das microcistinas em neutrófilos humanos.. 2006. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

5. KUJBIDA, P. ; HATANAKA, E. ; CAMPA, A. ; COLEPICOLO, P. ; PINTO, E. . Avaliação imunotoxicológica de MC-LR e [Asp3]-MC-LR em neutrófilos humanos. 2006. (Apresentação de Trabalho/Outra).

6. KUJBIDA, P. ; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. ; CARDOZO, K. H. M. ; MELECHO, V. ; Moura, A.N. ; BARROS, M. P. ; COLEPICOLO, P. . Identificação das toxinas produzidas pela cianobactéria Microcystis panniformis.. 2005. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

7. KUJBIDA, P. ; CAMPOS, S. C. G. ; QUINA, F. H. ; NASCIMENTO, C. A. O. ; COLEPICOLO, P. ; PINTO, E. . Fenol: Toxicidade e Biodegradação pela Microalga Minutocellus polymorphus.. 2004. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

8. KUJBIDA, P. ; CARDOZO, K. H. M. ; BARROS, M. P. ; Moura, A.N. ; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. ; BRIGAGAO, M. R. P. L. ; COLEPICOLO, P. ; PINTO, E. . Ritmicidade biológica da produção de toxinas, pigmentos e dienos conjugados pela cianobactéria Microcystis panniformis.. 2004. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

9. KUJBIDA, P. ; HATANAKA, E. ; BRIGAGAO, M. R. P. L. ; CAMPA, A. ; COLEPICOLO, P. ; PINTO, E. . Influência das microcistinas produzidas pela cianobactéria Microcystis panniformis no burst oxidativo de neutrófilos humanos.. 2004. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

10. Silva, LC ; Húngaro, MP ; KUJBIDA, P. . Benchmarking aplicado ao controle do uso de antimicrobianos no HASP.. 2003. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

11. KUJBIDA, P. ; Silveira, GG ; Siqueira,MEPB . Metanol em urina de uma população não exposta ocupacionalmente.. 2001. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

12. KUJBIDA, P. ; Silveira, GG ; Siqueira,MEPB . Valores de referência de metanol urinário.. 2001. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

13. KUJBIDA, P. ; Silveira, GG ; Siqueira,MEPB . Valores de referência de metanol em urina de população não exposta ocupacionalmente. 2001. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Eventos

Participação em eventos

1. 5th Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) World Congress.Effects of Microcystins LA, -YR and LR on neutrophil mobilization into inflammatory focus. 2008. (Participações em eventos/Congresso).

2. XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq.Immunotoxic effects of microcystin-LR, -YR and -LA in human neutrophils. 2007. (Participações em eventos/Congresso).

3. VII International Conference on Toxic Cyanobacteria.Neutrophils: a possible link between microcystin and toxic effects.. 2007. (Participações em eventos/Congresso).

4. Biomarcadores de Processos Oxidativos (curso). 2007. (Participações em eventos/Outra).

5. Workshop Photosynthetic organisms: Biotechnology, Environment and Bio Energy. 2007. (Participações em eventos/Outra).

6. XI Congresso Brasileiro de Ficologia.Efeitos das microcistinas em neutrófilos humanos. 2006. (Participações em eventos/Simpósio).

7. Simpósio Latino-Americano sobre Algas Nocivas. 2006. (Participações em eventos/Simpósio).

8. XIV Congresso Paulista de Farmacêuticos.Identificação das toxinas produzidas pela cianobactéria Microcystis panniformis. 2005. (Participações em eventos/Congresso).

Anexos

9. VI Seminário Internacional de Farmacêuticos. 2005. (Participações em eventos/Seminário).

10. X Reunião da Sociedade Brasileira de Ficologia.Fenol: toxicidade e biodegradação pela microalga Minutocellus polymorphus. 2004. (Participações em eventos/Congresso).

11. VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia.influência das microcistinas produzidas pela cianobactéria Microcistis panniformis no. 2004. (Participações em eventos/Congresso).

12. XIX Federação de Sociedades de Biologia Experimental.Ritmicidade biológica da produção de toxinas, pigmentos e dienos conjugados pela cianobactéria Microcystis panniformis. 2004. (Participações em eventos/Congresso).

13. Colunas de GC: Aplicações em Meio Ambiente / Indústria Química.Colunas de GC: Aplicações em Meio Ambiente / Indústria Química. 2004. (Participações em eventos/Seminário).

14. Colunas de HPLC: Aplicações na Indústria Farmacêutica.Colunas de HPLC: Aplicações na Indústria Farmacêutica. 2004. (Participações em eventos/Seminário).

15. Simpósio Sul-Americano de Biologia Molecular do Sono e dos Ritmos Biológicos.Simpósio Sul-Americano de Biologia Molecular do Sono e dos Ritmos Biológicos. 2004. (Participações em eventos/Simpósio).

16. Radicais Livres: Aspectos Químicos e Biológicos (curso). 2004. (Participações em eventos/Outra).

17. Fundamentos teóricos dos métodos de biologia molecular aplicados para detecção e identificação de cianobactérias tóxicas (curso).Fundamentos teóricos dos métodos de biologia molecular aplicados para detecção e identificação de cianobactérias tóxicas (curso). 2004. (Participações em eventos/Outra).

18. Introdução a Ecotoxicologia Aquática (curso). 2004. (Participações em eventos/Outra).

19. "Importância biomédica de substâncias de origem em organismos marinhos" - CURSO. 2004. (Participações em eventos/Outra).

20. XIII Congresso Paulista de Farmacêuticos. 2003. (Participações em eventos/Congresso).

21. V Seminário Internacional de Farmacêuticos.V Seminário Internacional de Farmacêuticos. 2003. (Participações em eventos/Seminário).

22. Preparação Pedagógica: Seminários sobre o Ensino Superior.Preparação Pedagógica: Seminários sobre o Ensino Superior. 2003. (Participações em eventos/Seminário).

23. CURSO: "Interações Medicamentosas Potencialmente Fatais". 2003. (Participações em eventos/Outra).

24. XVI Jornada Científica do HASP.XVI Jornada Científica do HASP. 2002. (Participações em eventos/Outra).

25. XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia.Valores de referência para metanol urinário. 2001. (Participações em eventos/Congresso).

26. XII Congresso Brasileiro de Toxicologia.Metanol em urina de uma população não exposta ocupacionalmente. 2001. (Participações em eventos/Congresso).

27. Seminário sobre Purificação de Água para Laboratório.Seminário sobre Purificação de Água para Laboratório. 2001. (Participações em eventos/Seminário).

28. Seminário sobre Aplicações de filtração para Laboratório Químico e.Seminário sobre Aplicações de filtração para Laboratório Químico e. 2001. (Participações em eventos/Seminário).

29. Palestra sobre Assistência Farmacêutica.Palestra sobre Assistência Farmacêutica. 2001. (Participações em eventos/Outra).

30. I Semana de Estudos Farmacêuticos.I Semana de Estudos Farmacêuticos. 2001. (Participações em eventos/Outra).

31. 7a Jornada de Iniciação Científica de Alfenas.7a Jornada de Iniciação Científica de Alfenas. 2001. (Participações em eventos/Outra).

32. CURSO: "Abuso de drogas: as bases da prevenção e tratamento". 2001. (Participações em eventos/Outra).

33. XV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia.XV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia. 2000. (Participações em eventos/Congresso).

34. 36a Semana Farmacêutica.36a Semana Farmacêutica. 2000. (Participações em eventos/Outra).

35. Métodos Experimentais em Bioquímica.Curso de Verão do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP. 2000. (Participações em eventos/Outra).

36. I Congresso Científico da EFOA.I Congresso Científico da EFOA-CEUFE. 1999. (Participações em eventos/Congresso).

37. III Simpósio Brasileiro sobre Tripanosomatídeos.III Simpósio Brasileiro sobre Tripanosomatídeos. 1999. (Participações em eventos/Simpósio).

38. Palestra sobre Radicais Livres e Antioxidades.Palestra sobre Radicais Livres e Antioxidades. 1999. (Participações em eventos/Outra).

39. II Mostra e Seminário de Extensão.II Mostra e Seminário de Extensão. 1999. (Participações em eventos/Outra).

40. IV Seminário de Plantas medicinais.IV Seminário de Plantas medicinais. 1998. (Participações em eventos/Seminário).

41. Mesa-Redonda Universidade Pública: perspectivas.Mesa-Redonda Universidade Pública: perspectivas. 1998. (Participações em eventos/Outra).

42. Campanha do Dia Mundial de Luta Contra a AIDS.Campanha do Dia Mundial de Luta Contra a AIDS. 1998. (Participações em eventos/Outra).

43. XXXIV Jornada Científica de Alfenas.XXXIV Jornada Científica de Alfenas. 1998. (Participações em eventos/Outra).

Outras informações relevantes

-Monitoria remunerada na disciplina de Toxicologia I - FCF/USP. (1º semestre de 2004).
-Monitoria remunerada na disciplina de Toxicologia II - FCF/USP. (2º semestre de 2004).
-Estágio supervisionado no Hospital de Aeronáutica de São Paulo (Laboratório de Análises Clínicas - / 2º semestre de 2002).
-Estágios supervisionados no Hospital das Clínicas da FMUSP (setores de produção de medicamentos e controle de qualidade, janeiro e julho/2000).
-Monitoria voluntária na disciplina de Farmacobotânica - EFOA/UNIFAL (Universidade Federal de Alfenas, 1º semestre de 2000).
-Iniciação Científica (FAPEMIG): Metanol em urina de população não-exposta ocupacionalmente: valores de referência para a região do sul de Minas Gerais, sob orientação da Profa. Dra. Maria Elisa Bastos de Siqueira, na Universidade Federal de Alfenas (08/2000 a 12/2001).

9.6 ANEXO VI: Trabalhos originados no período

- KUJBIDA, P.; HATANAKA, E.; CAMPA, A.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Effects of microcystins on human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. Bioph. Res. Comm.*, v. 341, p. 273-277, 2006.

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

- KUJBIDA, P.; HATANAKA, E.; VINOLO, M.A.; WAISMAM, K.; CAVALCANTI, D.;CURI, R.; FARSKY, S.H.P.; PINTO, E. The role of microcystins -LA, -YR, and -LR on neutrophil migration (Submetido na *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, TAAP-S-08-01013*)*.

- TOXCON-S-09-00027

- GALVÃO, J.A.; OETTERER, M.; HILLER, S.; ERLER, K.; LUCKAS, B.; PINTO, E.; KUJBIDA, P. Saxitoxins accumulation in freshwater fish (*Oreochromis niloticus*) for human consumption. (submetido na Toxicon;).

Capitulo de livro publicado:

- KUJBIDA, P. ; RODRIGUEZ, V.C. ; PINTO, E. . Cianobactérias e Microalgas Tóxicas em Ambientes Aquáticos. In: Seizi Oga; Márcia Maria de Almeida Camargo; José Antônio de Oliveira Batistuzzo. (Org.). Fundamentos de Toxicologia. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2008, p. 225-240.

Effects of microcystins on human polymorphonuclear leukocytes.

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
ELSEVIER
Biochemical and Biophysical Research Communications 341 (2006) 273–277
BBRC
www.elsevier.com/locate/ybbrc

Effects of microcystins on human polymorphonuclear leukocytes

Paula Kujbida [a], Elaine Hatanaka [a], Ana Campa [a], Pio Colepicolo [b], Ernani Pinto [a,*]

[a] *Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, CEP 05508-900, Universidade de São Paulo, SP, Brazil*
[b] *Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil*

Received 1 December 2005

Abstract

Microcystins (MCs) are cyclic heptapeptides produced by cyanobacteria present in water contaminated reservoirs. Reported toxic effects for microcystins are liver injury and tumour promotion. In this study, we evaluated the effects of two MCs, MC-LR and [Asp^3]-MC-LR, on human neutrophil (PMN). We observed that even at concentrations lower than that recommended by World Health Organization for chronic exposure (0.1 nM), MCs affect human PMN. Both MCs have chemotactic activity, induce the production of reactive oxygen species, and increase phagocytosis of *Candida albicans*. MC-LR also increased *C. albicans* killing. The effect of MCs on PMN provides support for a damage process mediated by PMN and oxidative stress, and may explain liver injury and tumour promotion associated to long-term MCs exposures.
© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Microcystin; Cyanobacteria; Neutrophil; Reactive oxygen species; Polymorphonuclear leukocytes; Phagocytosis

Cyanobacterial blooms of the genus *Microcystis* in water reservoirs have caused serious ecological and public health concern due to their ability to produce cyanotoxins named microcystins (MCs, Fig. 1) [1–3]. MCs are cyclic heptapeptides, which mainly cause morphological and functional changes in hepatocytes [4] inhibiting the activity of phosphatases, especially types 1 and 2A (PP1 and PP2A, respectively), both in vivo [5] and in vitro [6], resulting in cell proliferation and cancer or an apoptotic process and cell death [7].

The first described epidemic of fatal MCs toxicity in a haemodialysis population was called "Caruaru Syndrome" [8]. In this dramatic acute exposure event, the liver-biopsy specimens and necropsy revealed a very uniform pathological picture, with disruption of liver plates and cell deformity, extensive necrosis, apoptosis, apart from a dense mixed inflammatory infiltrate consisting predominantly of polymorphonuclear leukocytes (PMN) in the portal tracts [9,10].

We hypothesized here that, MCs affect PMN functions. The migration of PMN to the liver may represent a mechanism to increment MCs toxicity. PMN and other phagocytic cells are able to release high amounts of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) through the enzymatic complex NADPH oxidase in a process known as oxidative burst. Superoxide anion originates secondary high reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide, hypochlorous acid, and singlet oxygen [11]. Although the oxidative burst represents a host defence response to pathogens, acute or prolonged inflammatory processes may increase host tissue destruction [12]. The effects of two microcystin on human PMN recruitment, ROS production, phagocytosis, and killing activities were investigated herein.

Materials and methods

Cell culture. The cyanobacterium *Microcystis panniformis* strain BCCUSP 100 was grown in laboratory as described in [13].

Microcystin isolation and identification. The toxins MC-LR and [Asp^3]-MC-LR were isolated and identified following the modified method from Bittencourt-Oliveira et al. [14]. Briefly, MCs were extracted with 200 mL MeOH/H_2O (73:27, v/v) from filtered cells (50 g) and submitted to a sonic disruption for 10 min. The extract was centrifuged (10,000 rpm, 15 min)

* Corresponding author. Fax: +55 11 3815 6593.
E-mail address: ernani@usp.br (E. Pinto).

0006-291X/$ - see front matter © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bbrc.2005.12.177

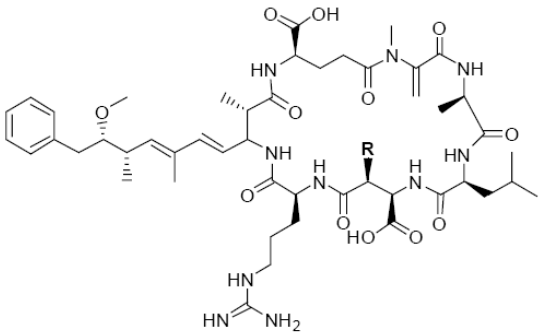


Fig. 1. Molecular structure of microcystin-LR (where $R = CH_3$) or [Asp^3]-microcystin-LR (where R = H) used in this study, isolated from *M. panniformis* strain BCCUSP 100.

and the supernatant was collected as dried in a rotoevaporator (bath at 40 °C) and dissolved in 3 mL of ethyl acetate. Samples were submitted to pre-equilibrated ethyl acetate silica column (20 × 5 cm, Silica Gel Keiselgel 60, Merck) and eluted as follows: 30 mL ethyl acetate, 30 mL ethyl acetate:MeOH (1:1, v/v), 60 mL MeOH, and 120 mL MeOH:H_2O (1:1, v/v). The fraction containing MCs (last elution step) was dried and suspended with 1 mL MeOH:H_2O (1:1, v/v) and then repurified in a HPLC system equipped with a pump LC-10AD, a PDA detector (SPD10AV), and a SCL-10Avp System Controller (Shimadzu, Kyoto, Japan). Samples were injected in the system and chromatographed in a semi-preparative HPLC column (Phenomenex, Luna C18, 5 μm, 250 × 10 mm) eluted with a mixture of acetonitrile (ACN) and 20 mM $NH_4CH_3COO^-$ (27:73), pH 5, at a flow rate of 4.7 mL min^{-1}(detected at 238 nm). The two peaks collected were analysed in a Quattro Micro tandem mass spectrometer (Waters Micromass, Manchester, UK). The identification of MC-LR and [Asp^3]-MC-LR was carried out according to Bittencourt-Oliveira et al. [14].

PMN preparation. PMN were obtained from the peripheral blood of healthy donors under endotoxin-free conditions and isolated as previously described by Boyum [15], using a commercial gradient of Ficoll–Hypaque (Histopaque). After purification, PMN were suspended in phosphate-buffered saline (PBS) buffer, pH 7.4, enriched with 1 mg mL^{-1} glucose, 1 mM $CaCl_2$, and 0.5 mM $MgCl_2$, counted in a Neubauer chamber and purity was estimated to be higher than 98%.

Cell viability assay. The MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) colorimetric assay (reduction of tetrazolium salt to formazan) was applied to evaluate the PMN viability in the presence of the microcystins (0.01–1000 nM) [16]. Cells (1×10^6 PMN mL^{-1}) were pre-incubated with MC-LR or [Asp^3]-MC-LR in PBS buffer (37 °C, 5% CO_2). After 60 min, (0.5 mg mL^{-1}) MTT was added and plates were incubated for 60 min. Supernatant was discarded and 50 μL of DMSO was added each to all well microplates to dissolve the dark blue crystals. The plates were read on a MicroElisa reader (Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, MN) at 540 nm. PMN viability was not significantly affected by MCs. After an incubation time up to 60 min, there was only a reduction of 15% in cell viability, even at concentrations of MCs as high as 1 μM.

Migration assay. PMN migration was determined using the 96-well chemotaxis chamber (Neuro Probe). Both MCs (range from 0.01 to 1000 nM) and 57 nM fMLP were added to the bottom wells of the well plate. PMN (2.5×10^6 cells mL^{-1}) were added to the top wells, incubated for 60 min (37 °C, 5% CO_2) and the non-migrating on the origin side (top) of the filter were removed by gentle scraping. After incubation, the cells that migrated were counted in a Neubauer chamber.

Oxidative burst. The effect of MC-LR and [Asp^3]-MC-LR (10 and 100 nM) on the PMN oxidative burst was evaluated by the luminol-enhanced chemiluminescence assay. PMN (1×10^6 cells mL^{-1}) were pre-incubated (in PBS buffer) with MCs for 5 min in the presence of luminol (1 nM). The reaction was run in PBS buffer at 37 °C in a final volume of 0.3 mL. Chemiluminescence was measured in an EG&G Berthold LB96V microplate luminometer.

Phagocytosis and killing assays. These assays were performed using a method modified from Hampton [17]. *Candida albicans* strain ATCC 5374 was plated on Sabouraud's dextrose agar (Oxoid, Wesel, Germany) and incubated at 37 °C for 18 h. Colonies were added in human serum (0.3 mL) and incubated for 30 min (37 °C). After opsonization, 2.7 mL of PBS buffer was added. PMN (1×10^6 cells mL^{-1}) were incubated with *C. albicans* suspension (5×10^6 cells mL^{-1}) and MC-LR or [Asp^3]-MC-LR (1 and 1000 nM) for 10 and 15 min. The samples (100 μL) were concentrated in a cytocentrifuge and fixed with Rosenfeld stain. This dye does not stain dead fungi. The percentage of neutrophils that have phagocytized *C. albicans* and the percentage of killing [(number of died *C. albicans* ingested/number of total *C. albicans* ingested) × 100] were calculated.

Statistical analysis. The statistical analysis was carried out comparing the average ± SD of the group samples. It consisted of the one-way analysis of variance (ANOVA) with the Student–Newman–Keuls multiple comparisons test.

Results and discussion

Effect of MCs on PMN migration

Both MCs substantially enhanced neutrophil migration (Figs. 2A and B). For [Asp^3]-MC-LR a dose-dependent

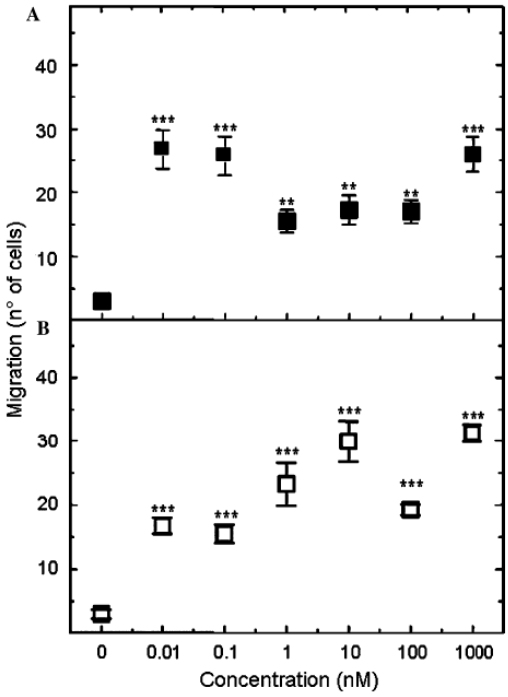


Fig. 2. Effect of MC-LR (A) and [Asp^3]-MC-LR (B) concentration on PMN migration. Migration was measured in a 96-well chemotaxis plate. The number of migrated cells was quantified in a Neubauer chamber. Cells (2.5×10^6 cells mL^{-1}) were incubated with MC-LR, [Asp^3]-MC-LR (0.01–1000 nM) for 60 min (37 °C and 5% CO_2). Results for each procedure are means from triplicate determinations from three experiments. Asterisk denotes a response that is significantly different from the positive control (**$P < 0.01$, ***$P < 0.001$).

effect was more evident. The increased migration observed here complements the previously reported enhancement of PMN spontaneous adherence in the presence of MC-LR [18] once these processes, adherence and migration, are important steps in inflammation [19].

These findings support the idea that, in cases of MCs intoxication, there is a movement of PMN from the bloodstream toward areas that concentrate the toxin, for instance the liver [20]. This chemotactic effect of MCs may cause an increment in the inflammatory cell influx that is a condition that already accompanies MCs intoxication. The inflammatory cell influx occurs in response to the direct effect of MCs on hepatocytes causing cytoplasm damage, necrosis, and liver haemorrhage and fibrosis [8,20,21]. Thus, liver damage, by itself, is a factor that promotes leukocyte migration and this event may be amplified by the chemotactic activity of the MCs. The extravasation of PMN is a pre-state for the production of reactive oxygen species (ROS), followed by the establishment of an oxidative stress condition that culminates with the development of tissue injury [22].

Effect of MCs on the production of ROS by PMN

Under appropriated stimuli PMN generate ROS for a large period of time [11]. PMN activation mediated by membrane receptors occurs, for instance, for bacterial products and particulate material, and soluble substances able to directly activate protein kinase C. The process of ROS production by PMN is known as oxidative burst and depends on a complex signalling involving a fine balance of protein phosphorylation and dephosphorylation. Besides ROS production, PMN activation also includes cytoskeletum organization and degranulation processes. For PMN, a cell rich in azurophil granules, the production of ROS is accompanied by degranulation of the enzyme myeloperoxidase. Although the luminol-enhanced chemiluminescence assay is not selective, it is safely used as a tool to evaluate the resultant of the events of production of ROS and degranulation [23]. The simultaneous presence of ROS and MPO activity are able to catalyse oxidative reactions in lipids and proteins, and are associated with cellular damage and disease.

MC-LR or [Asp^3]-MC-LR was able to trigger the luminol-enhanced chemiluminescence by human PMN, in a dose–response manner and over to 20 min (Fig. 3). The kinetics of light emission is very similar to those triggered by recognized activators, such as phorbol esters. Thus, it is reasonable to conclude that a direct action of PMN might be involved in the toxicity of MCs. In hepatocytes, it is known that ROS generated by PMN induce an oxidative stress able to cause a necrotic injury in less than one hour. In this case, the mechanism of injury does not involve gross lipid peroxidation [24] but may be caused by the opening of the membrane permeability transition pore and the collapse of the mitochondrial membrane potential [25]. Some recent studies strongly suggest that the

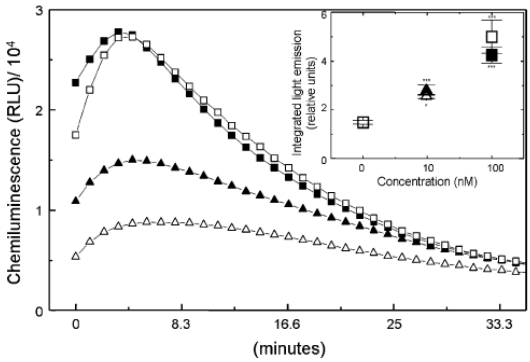


Fig. 3. Effect of MC-LR and [Asp^3]-MC-LR concentration on ROS production by human PMN. Luminol (1 nM)-enhanced chemiluminescence induced in PMN (1×10^6 cells mL^{-1}) by (▲) 10 nM, (■) 100 nM MC-LR and (Δ) 10 nM, (□) 100 nM [Asp^3]-MC-LR. The inset represents the integrated light emission (relative light units) in the presence and absence of these MCs. Asterisk denotes a response that is significantly different from the control (*$P < 0.05$, ***$P < 0.001$).

induction of ROS formation and mitochondrial alterations are the two major events found in MC-treated culture of rat hepatocytes [26]. In addition to cell injury, ROS promote inflammation by the activation of the transcription factor NF-κB (nuclear factor-κB), which controls the formation of cytokines, chemokines, and adhesion molecules [22]. Additionally, increased lipid peroxidation and oxidative stress conditions were shown in studies with cells and animals exposed to MCs [25–30].

Effect of MCs on phagocytosis and killing

Using the Rosenfeld stain, we measured simultaneously the effect of MCs on the ingestion (phagocytosis) and intracellular killing (killing activity) of *C. albicans*. Both MCs increased phagocytosis (Figs. 4A and B); in the presence of 1 nM of MCs, there was an increment of approximately 70% of phagocytosis. Higher concentration of MCs (1000 nM) did not cause further increment in phagocytosis. In respect to the intracellular microbial activity only the MC-LR affected this activity (Figs. 4C and D). The incubation of PMN with MC-LR at 1000 nM caused an increment in killing activity, especially evident at 10 min.

Although at this moment it is not possible to explain how MCs affect phagocytosis, it is clear that MCs interfere with phosphorylation/dephosphorylation processes. On one hand, independently of the mechanism by which MCs act on phagocytosis and killing, MCs do not compromise the microbicidal activity of PMN. On the other hand, they increase the killing efficiency of PMN.

Conclusion

These findings that MC-LR and [Asp^3]-MC-LR have a direct chemotactic activity towards PMN and are inducers of the oxidative burst in these cells provide support for a

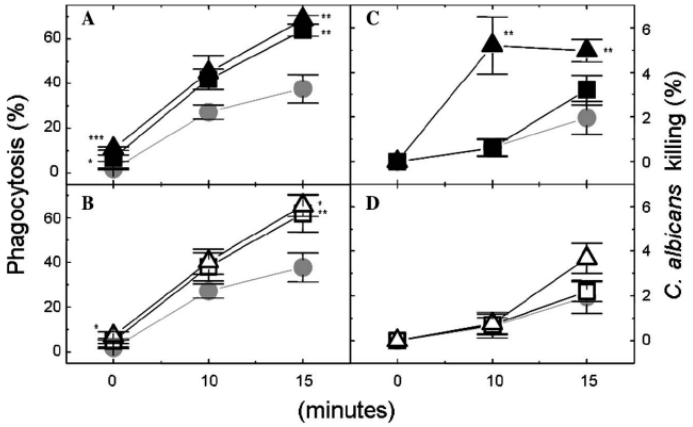


Fig. 4. Effect of MC-LR and [Asp^3]-MC-LR concentration on phagocytosis (A,B) and killing activity (C,D). Cells (1×10^6 cells mL^{-1}) were incubated with (▲) 1 nM, (■) 1000 nM MC-LR and (Δ) 1 nM, (□) 1000 nM [Asp^3]-MC-LR for 10 and 15 min (37 °C). In the control (●), no toxin was added. Asterisk denotes a response that is significantly different from the positive control (*$P < 0.05$, **$P < 0.01$, and ***$P < 0.001$).

central role of PMN in the damage process associated to short and long term MC exposure. Despite the fact that the mechanism of MC action on PMN has not yet been demonstrated, MCs may represent an additional class of chemotactic agents and oxidative burst inducers. This could be suggestive for further research about the mechanism operating in the effects triggered by MCs on PMN, especially at chronic exposure to low levels. The recommendations regarding safe algal toxin levels in drinking water as proposed by WHO (0.1 nM) [31] and other countries like Brazil [32] can still offer a significant health risk. Potential tumour promotion is a primary concern. Part of these effects may be associated to the activity of MCs on phosphatases that may cause alterations in signalling processes.

Acknowledgments

The authors thank Prof. Dr. Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira (ESALQ, Universidade de São Paulo) for the cyanobacterial material and Prof. Primavera Borelli (FCF/FBC, Universidade de São Paulo) for the kind support and comments on phagocytosis and killing assays. This research was supported by Grants from FAPESP, CNPq, "Fundo Bunka de Pesquisa – Banco Sumitomo Mitsui/2005," and PK fellowship from CAPES.

References

[1] G.A. Codd, S.G. Bell, K. Kaya, C.J. Ward, K.A. Beattie, J.S. Metcalf, Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health, Eur. J. Phycol. 34 (1999) 405–415.
[2] B.C. Hitzfeld, S.J. Hoger, D.R. Dietrich, Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment, Environ. Health Perspect. 108 (2000) 113–122.
[3] C. Hummert, M. Reichelt, J. Weiss, H.P. Liebert, B. Luckas, Identification of microcystins in cyanobacteria from the Bleiloch former drinking-water reservoir (Thuringia, Germany), Chemosphere 44 (2001) 1581–1588.
[4] A.R. Humpage, I.R. Falconer, Microcystin-LR and liver tumor promotion: effects on cytokinesis, ploidy, and apoptosis in cultured hepatocytes, Environ. Toxicol. 14 (1999) 61–75.
[5] M.M. Gehringer, Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response, FEBS Lett. 557 (2004) 1–8.
[6] M. Runnegar, N. Berndt, S.M. Kong, E.Y.C. Lee, L.F. Zhang, In-vivo and in-vitro binding of microcystin to protein phosphatase-1 and phosphatase-2A, Biochem. Biophys. Res. Commun. 216 (1995) 162–169.
[7] T. Chen, Q.S. Wang, J. Cui, W. Yang, Q. Shi, Z.C. Hua, J.G. Ji, P.P. Shen, Induction of apoptosis in mouse liver by microcystin-LR—A combined transcriptomic, proteomic, and simulation strategy, Mol. Cell. Proteomics 4 (2005) 958–974.
[8] I. Chorus, J. Bartram, Toxic Cyanobacteria in Water—A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management, Spon Press, London, 2003.
[9] S. Pouria, A. de Andrade, J. Barbosa, R.L. Cavalcanti, V.T.S. Barreto, C.J. Ward, W. Preiser, G.K. Poon, G.H. Neild, G.A. Codd, Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brasil, Lancet 352 (1998) 21–26.
[10] E.M. Jochimsen, W.W. Carmichael, J.S. An, D.M. Cardo, S.T. Cookson, C.E.M. Holmes, M.B. de C Antunes, D.A. de Melo Filho, T.M. Lyra, V.S.T. Barreto, S.M.F.O. Azevedo, W.R. Jarvis, Liver failure and death after exposure to microcystins at a haemodialysis center in Brazil, N. Engl. J. Med. 338 (1998) 873–878.
[11] T.E DeCoursey, E. Ligeti, Regulation and termination of NADPH oxidase activity, Cell. Mol. Life Sci. 62 (2005) 2173–2193.
[12] C.C. Winterbourn, A.J. Kettle, Radical–radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity, Biochem. Biophys. Res. Commun. 305 (2003) 729–736.
[13] M.C. Bittencourt-Oliveira, Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a *mcy*B molecular marker, Harmful Algae 2 (2003) 51–60.
[14] M.C. Bittencourt-Oliveira, P. Kujbida, K.H.M. Cardozo, V.M. Carvalho, A.N. Moura, P. Colepicolo, E. Pinto, A novel rhythm of microcystin biosynthesis is described in the cyanobacterium *Microcystis panniformis* Komárek et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 326 (2005) 687–694.
[15] A. Boyum, Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (1968) 77–89.

[16] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65 (1983) 55–63.
[17] M.B. Hampton, C.C. Winterbour, Methods of quantifying phagocytosis and bacterial killing by human neutrophils, J. Immunol. Methods 232 (1999) 15–22.
[18] M. Hernández, M. Macia, C. Padilha, F.F.D. Campo, Modulation of human polymorphonuclear leukocyte adherence by cyanopeptide toxins, Environ. Res. (2000) 64–68.
[19] S.I. Simon, C.E. Green, Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation, Annu. Rev. Biomed. Eng. 7 (2005) 151–185.
[20] I.R. Falconer, D.S.K. Yeung, Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by *Microcystis* toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell-proteins, Chem. Biol. Interact. 81 (1992) 181–196.
[21] R.M. Dawson, The toxicology of microcystins, Toxicon 36 (1998) 953–962.
[22] H. Jaeschke, Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury, J. Gastroenterol. Hepatol. 15 (2000) 718–724.
[23] I.M.M. Rebecchi, N.F.Y. Juliano, A. Campa, Oxidative metabolism and release of myeloperoxidase from polymorphonuclear leukocytes obtained from blood sedimentation in a Ficoll-Hypaque gradient, Cell Biochem. Funct. 18 (2000) 127–132.
[24] H. Jaeschke, Y.-S. Ho, M.A. Fisher, J.A. Lawson, A. Farhood, Glutathione peroxidase-deficient mice are susceptible to neutrophil-mediated hepatic parenchymal cell injury during endotoxemia: importance of an intracellular oxidant stress, Hepatology 29 (1999) 443–450.
[25] W.X. Ding, H.M. Shen, C.N. Ong, Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes, Hepatology 32 (2000) 547–555.
[26] W.X. Ding, C.N. Ong, Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity, FEMS Microbiol. Lett. 220 (2003) 1–7.
[27] R.E. Guzman, P.F. Solter, Hepatic oxidative stress following prolonged sublethal microcystin LR exposure, Toxicol. Pathol. 27 (1999) 582–588.
[28] X.Y. Li, Y.D. Liu, L.R. Song, J.T. Liu, Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR, Toxicon 42 (2003) 85–89.
[29] N. Botha, M.V. Venter, T.G. Downing, E.G. Shephard, M.M. Gehringerc, The effect of intraperitoneally administered microcystin-LR on the gastrointestinal tract of Balb/c mice, Toxicon 43 (2004) 251–254.
[30] N. Bouaicha, I. Maatouk, Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes, Toxicol. Lett. 148 (2004) 53–63.
[31] WHO, Guidelines for Drinking Water Quality, second ed., Addendum to Vol. 2, Health Criteria and Other Supporting Information, World Health Organization, Geneva, 1998.
[32] Regulation MS N. 518/2004: Guidelines for Drinking Water Quality, Official Law Reports', 26/March/2004, section I, 266.

Analysis of chemokines and reactive oxygen species formation by rat and human neutrophils induced by microcystin-LA, -YR and -LR.

Toxicon 51 (2008) 1274– 1280

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

Analysis of chemokines and reactive oxygen species formation by rat and human neutrophils induced by microcystin-LA, -YR and -LR☆

Paula Kujbida[a], Elaine Hatanaka[b,c], Ana Campa[a], Rui Curi[b], Sandra Helena Poliselli Farsky[a], Ernani Pinto[a,*]

[a] Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, CEP 05508-900, SP, Brasil
[b] Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, CEP 05508-900, SP, Brasil
[c] Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Cruzeiro do Sul, CEP 01506-000, Brasil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 8 October 2007
Received in revised form
15 February 2008
Accepted 20 February 2008
Available online 29 February 2008

Keywords:
Microcystin
Neutrophil
ROS
Cell viability
IL-8
CINC

ABSTRACT

Microcystins (MC), a family of heptapeptide toxins produced by some genera of Cyanobacteria, have potent hepatotoxicity and tumor-promoting activity. Leukocyte infiltration in the liver was observed in MC-induced acute intoxication. Although the mechanisms of hepatotoxicity are still unclear, neutrophil infiltration in the liver may play an important role in triggering toxic injury and tumor development. The present study reports the effects of MC-LA, MC-YR and MC-LR (1 and 1000 nM) on human and rat neutrophils functions *in vitro*. Cell viability, DNA fragmentation, mitochondrial membrane depolarization and intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were measured by flow cytometry. Extracellular ROS content was measured by lucigenin-amplified chemiluminescence, and cytokines were determined by ELISA. We found that these MC increased interleukin-8 (IL-8), cytokine-induced neutrophil chemoattractant-2$\alpha\beta$ (CINC-2$\alpha\beta$) and extracellular ROS levels in human and rat neutrophils. Apart from neutrophil presence during the inflammatory process of MC-induced injury, our results suggest that hepatic neutrophil accumulation is further increased by MC-induced neutrophil-derived chemokine.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

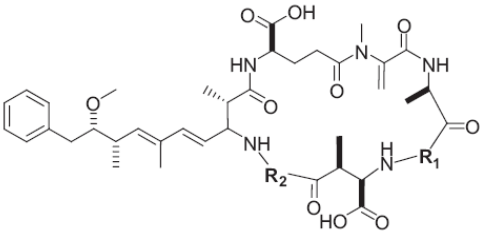
1. Introduction

Microcystins (MC) comprise a group of at least 80 naturally occurring hepatotoxins produced by freshwater cyanobacteria (US EPA, 2006). Their general structure is a monocyclic heptapeptide: [-D-Ala[1]-L-X[2]-MeAsp[3]-L-Z[4]-Adda[5]-D-Glu[6]-N-Mdha[7]], where X and Z represent two variable L-amino acids (Fig. 1) (Sivonen and Jones, 2003). It has been demonstrated that MC are highly hepatotoxic for mammals and fish (Dawson, 1998; Fischer et al., 2000). One of the mechanisms of toxicity is their inhibition of serine and threonine protein phosphatases 1 and 2A, resulting in unusual cellular protein phosphorylation, which is directly related to their cytotoxicity (cytoskeletal and apoptosis) and tumor-promoting activity (Dawson, 1998; Solter et al., 1998). Recent evidence suggests that oxidative stress also plays a role in the MC-induced hepatotoxicity for two pathways: depletion of glutathione and increase in the production of reactive oxygen species (ROS) by disruption of the mitochondrial electron transport chain (Weng et al., 2007; Zegura et al., 2006). Chronic exposure to MC is associated with cell proliferation and cancer development (Humpage and Falconer, 1999). The most severe human accident attributed to cyanobacteria in drinking water occurred in 1996 in Brazil, where 60 dialysis patients died of acute liver failure resulting from MC (MC-LR, -YR and -AR) contamination of water used for hemodialysis. In the hepatic histological analyses,

☆ *Ethical statement*: The Animal Care Committee of the Faculty of Pharmaceutical Sciences approved the experimental procedure employed in this study (Protocol no. 275).

* Corresponding author. Av. Prof. Lineu Prestes, 580 bloco 13B CEP 05508-900, São Paulo/SP, Brasil. Tel.: +55 11 3091 1505; fax: +55 11 3031 9055.
E-mail address: ernani@usp.br (E. Pinto).

0041-0101/$ - see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.toxicon.2008.02.013



Toxin	R_1	R_2
MC-LR	Leucine	Arginine
MC-YR	Tyrosine	Arginine
MC-LA	Leucine	Alanine

Fig. 1. General molecular structure of microcystins. Specific amino acid residues (R_1 and R_2) determine different microcystin variants: LA, YR and LR studied herein.

obtained from liver necropsy of these victims, a dense mixed inflammatory infiltrate consisting predominantly of neutrophils and some lymphocytes in the portal tract was observed (Pouria et al., 1998).

Previous toxicological studies have shown that neutrophils can contribute significantly to the pathogenesis of liver injury for various chemicals (Jaeschke et al., 2002). Neutrophils are well known for their role in inflammatory responses and specifically in phagocytosing and killing of pathogenic organisms. To investigate these functions, a number of mediators that promote inflammation and bacterial killing have been tested. In recent years, it has become clear that the neutrophils, probably through some of these mediators, can injure host tissue, including parenchymal cells of the liver (Jaeschke et al., 1996). Inflammation-mediated tissue injury requires a complex series of events that include adherence of blood neutrophils to endothelium of microvasculature, their migration toward target parenchymal cells, and cell activation and release of cytotoxic constituents (Jaeschke and Hasegawa, 2006).

Neutrophils also play an important role as regulators of cancer development and spontaneous tumorigenesis (De Visser et al., 2006). Recently, neutrophils have been implicated in the MC-induced injury of the liver (US EPA, 2006). In previous studies, we have shown that MC-LR and [Asp^3]-MC-LR increase human neutrophils migration, formation of ROS and killing capacity (Kujbida et al., 2006). ROS released by activated neutrophils play a central role in host defense and the removal of cell debris; however, they can also cause tissue damage and injury (Jaeschke et al., 2002).

Herein, we expanded our previous study (Kujbida et al., 2006) and investigated the effect of MC-LA, MC-YR and MC-LR on cell viability, DNA fragmentation, mitochondrial membrane depolarization, ROS levels and interleukin-8 (IL-8), cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-2$\alpha\beta$ and tumor necrosis factor-α (TNF-α) released by rat and human neutrophils *in vitro*. The aim of the present study was to evaluate the chemokines and ROS formation by rat and human neutrophils induced by MC-LA, -YR and -LR.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Bovine fetal serum, Ficoll–Hypaque, Hepes, penicillin, RPMI-1640 medium supplemented with L-glutamine, sodium bicarbonate and oyster glycogen were supplied by Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Peptide toxins MC-LR, MC-LA and MC-YR were obtained from Sigma Chemical Co. All reagents were obtained as ultra pure grade.

2.2. Rat neutrophils preparation

Male Wistar rats weighing 180 ± 20 g were obtained from the Department of Clinical Chemistry of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil. The rats were maintained at 23 °C under a light:dark cycle of 12:12 h. Food and water were given *ad libitum*. The Animal Care Committee of the Faculty of Pharmaceutical Sciences approved the experimental procedure employed in this study (Protocol no. 275). Rats were killed by decapitation without anesthesia. Neutrophils were obtained by intraperitoneal (ip) lavage using 40 mL sterile phosphate-buffered saline (PBS), 4 h after the ip injection of 10 mL sterile oyster glycogen solution (Sigma; Type II) at 1% in PBS. The number of viable cells (>98%) was counted in a Neubauer chamber using a light microscope (Nikkon, Japan).

2.3. Human neutrophils preparation

Human neutrophils were isolated from the blood of healthy volunteers, as described previously by Boyum (1968), using a commercial gradient of Ficoll–Hypaque (Histopaque). The Ethical Committee of the Faculty of Pharmaceutical Sciences approved the experimental procedure of this study (Protocol no. 146).

2.4. Cell viability assay

This assay was performed by flow cytometry according to the method described by Cury-Boaventura et al. (2006), with few modifications. Briefly, human and rat neutrophils (2.5×10^6 cells/mL) were cultured in RPMI-1640 medium (supplemented with 0.3 g/L glutamine, 2.32 g/L Hepes, 2 g/L sodium bicarbonate, 10 μg/mL streptomycin, 100 UI/mL penicillin and 10% low endotoxin fetal serum) in the presence of MC variants LA, YR and LR at 1 and 1000 nM, at 37 °C, and 5% CO_2. After 24 h, the cells were centrifuged at 1000*g* for 15 min at 4 °C, and the pellet obtained was resuspended in 500 μL PBS. Subsequently, 50 μL of propidium iodide (PI) solution (50 mg/mL in PBS) was added and the cells were analyzed using a FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Juan, CA, USA). Ten thousand events were analyzed per experiment. Cells with PI fluorescence were then evaluated by using the Cell Quest software (Becton Dickinson).

2.5. DNA fragmentation assay

After DNA staining with PI, DNA fragmentation was analyzed by flow cytometry according to the method described by Nicoletti et al. (1991), with few modifications. Briefly, human and rat neutrophils (2.5×10^6 cells/mL) were cultured as described above in the presence of MC variants LA, YR and LR (1 and 1000 nM), with or without lipopolysaccharide of *Escherichia coli* 026:B6 (5 μg/mL), at 37 °C and 5% CO_2. After 24 h, the cells were centrifuged at 1000*g*, for 15 min, at 4 °C. The pellet was gently resuspended in 300 μL hypotonic solution containing 50 μg/mL PI, 0.1% sodium citrate and 0.1% Triton X-100. The cells were then incubated for 2 h at 4 °C. Fluorescence was measured and analyzed as described above.

2.6. Lucigenin-enhanced chemiluminescence assay

ROS release was measured by lucigenin (bis-*N*-methylacridiniumnitrate)-enhanced chemiluminescence assay according to the method described by Hatanaka et al. (2006), with few modifications. The assays were run in PBS buffer supplemented with $CaCl_2$ (1 mM), $MgCl_2$ (1.5 mM) and glucose (10 mM), at 37 °C, in a final volume of 0.3 mL. Lucigenin (1 nM) was added to human or rat neutrophils (2.5×10^6 cells/mL) incubation medium when required. Immediately, cells were treated with MC variants LA, YR and LR (1 and 1000 nM), and ROS release was monitored. After 20 min, phorbol myristate acetate (PMA) (16 ng/mL) was added and ROS release was determined again. Chemiluminescence was measured in an EG&G Berthold LB96V microplate luminometer.

2.7. Flow-cytometric measurement of reactive oxygen metabolites using hydroethidine

ROS was measured by flow cytometry assay according to the method described by Hatanaka et al. (2006), with few modifications. Neutrophils were treated with MC variants LA, YR and LR (1 and 1000 nM), hydroethidine (1 μM) and PMA (16 ng/mL) in PBS buffer supplemented with $CaCl_2$ (1 mM), $MgCl_2$ (1.5 mM) and glucose (10 mM), in a final volume of 0.3 mL, for 30 min, in the dark. After this period of time, fluorescence was measured using the FL3 channel in a FACS Calibur flow cytometer (Becton–Dickinson, San Jose, CA, USA). Ten thousand events were analyzed per experiment.

2.8. Mitochondrial transmembrane potential (MTP)

This assay was performed by flow cytometry according to the method described by Cury-Boaventura et al. (2006), with few modifications. Cells were centrifuged at 1000*g* for 15 min at 4 °C, and the pellet was resuspended in 1000 μL PBS. Rhodamine 123 is a cell-permeable, cationic fluorescent dye that is readily sequestered by active mitochondria without inducing toxic effects. Rhodamine 123 (5 μM) was added and the cells were then incubated for 15 min at 37 °C in the dark. Cells were washed twice with cold PBS and incubated for 30 min, at 30 °C, in the dark. Fluorescence of 10,000 events was determined by flow cytometry using the FL1 channel (green fluorescence: 530/30 nm).

2.9. Cytokine assays: IL-8 (human), CINC-2αβ (rat) and TNF-α (tumor necrosis factor-α) (human and rat)

Briefly, human and rat neutrophils (2.5×10^6 cells/mL) were cultured as described above (on item 2.4) in the presence of MC variants LA, YR and LR (1 and 1000 nM). After 24 h, the supernatants were collected and frozen at −80 °C until determination of the cytokines by ELISA (Quantikine, R&D System, Minneapolis, MN, USA), employing the method described by Hatanaka et al. (2004).

2.10. Statistical analysis

The statistical analysis was carried out by comparing the average ± SE of the group samples. The statistical analysis consisted of the one-way analysis of variance and the Student–Newman–Keuls multiple comparison test.

3. Results

3.1. Effect of MC-LA, -YR and -LR on neutrophil viability: cell membrane integrity, DNA fragmentation and MTP

In order to verify the influence of MC on neutrophil viability, flow cytometric analysis was used to determine cell membrane integrity, DNA fragmentation and mitochondrial membrane depolarization of human and rat neutrophils treated with MC-LA, MC-YR and MC-LR (1 and 1000 nM) for 24 h. No significant effect of these MC variants on mitochondrial depolarization of human or rat neutrophils were found (control = 99.2% vs. MC = 99.3% [with 1 nM of MC] and 99.4% [with 1000 nM of MC] by rat neutrophil, and control = 99.5% vs. MC = 99.4% [with 1 nM of MC] and 99.6% [with 1000 nM of MC] by human neutrophil (mean)). However, on rat neutrophil membrane integrity losses were found (Table 1). In contrast, an increase in the human neutrophils viability (2.8%) was observed after treatment of neutrophils with MC-LA and MC-LR (1 and 1000 nM). Human neutrophils viability was not altered by MC-YR treatment.

Rat neutrophils treated with MC-LA (1 and 1000 nM) and MC-YR (1000 nM) showed an increased percentage of cells with fragmented DNA compared with the control group after 24 h of treatment (Table 1). Only human neutrophils incubated with MC-LR (1000 nM) resulted in a decreased percentage of cells with fragmented DNA compared with control conditions (Table 1).

3.2. Effect of MC-LA, -YR and -LR on cytokine generation by neutrophils

The effect of MC-LA, MC-YR and MC-LR on IL-8, CINC-2αβ and TNF-α production by neutrophils was determined in cell-free supernatants. Incubation of human neutrophils with these MC (1 and 1000 nM) for 24 h resulted in an increase of IL-8 production (Fig. 2A). Nevertheless, rat

Table 1
Percentage of cell viability and DNA fragmentation of human and rat neutrophils treated with MC-LA, MC-YR and MC-LR (1 and 1000 nM)

Toxin	Concentration (nM)	Rat neutrophils		Human neutrophils	
		Membrane viability (%)	DNA fragmentation (%)	Membrane viability (%)	DNA fragmentation (%)
Control	0	96.3 ± 0.4	3.9 ± 0.4	87.2 ± 0.2	13.3 ± 0.6
MC-LA	1	98.6 ± 1.0	14.3 ± 0.5*	89.6 ± 0.5***	14.2 ± 1.5
	1000	98.2 ± 0.6	23.5 ± 4.6**	89.7 ± 0.2***	11.4 ± 0.7
MC-YR	1	98.1 ± 0.9	10.1 ± 4.5	88.4 ± 0.3	17.8 ± 1.3
	1000	97.3 ± 1.3	22.9 ± 4.4**	87.1 ± 0.1	16.5 ± 2.3
MC-LR	1	96.3 ± 0.3	4.0 ± 0.7	89.6 ± 0.5***	10.7 ± 1.4
	1000	96.8 ± 0.9	4.2 ± 0.5	89.2 ± 0.2***	10.8 ± 1.4***

Data are expressed as percentage (mean ± SEM).
Asteriks Indicate a significant difference from the control group (*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$).

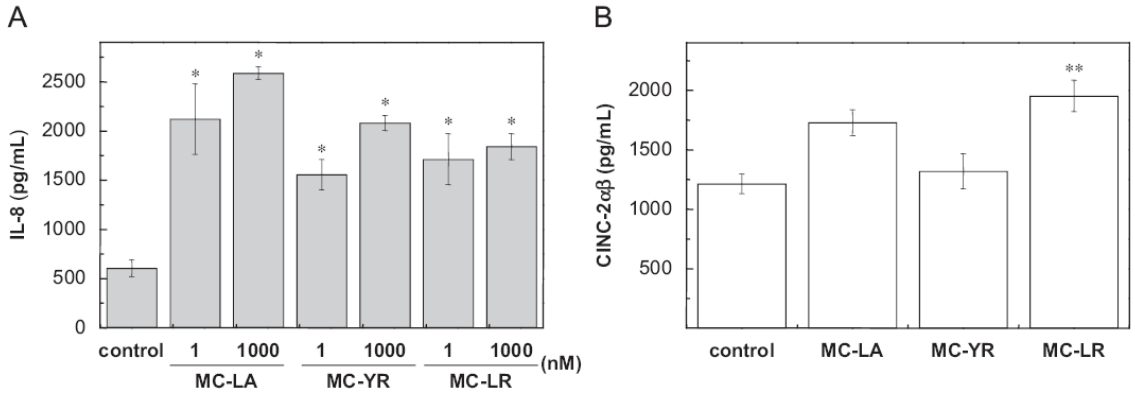


Fig. 2. (A) IL-8 levels determined in the supernatants of 24 h cultured human neutrophils (2.5×10^6 cells/mL) treated with microcystin LA, YR and LR (1 and 1000 nM). (B) CINC-2$\alpha\beta$ levels determined in the supernatants of 24 h cultured rat neutrophils (2.5×10^6 cells/mL) incubated with microcystin LA, YR and LR (1000 nM). The data represent the average ± standard error of at least four experiments. The asterisk denotes a response that is significantly different from the control (*$P<0.001$, **$P<0.05$).

neutrophils released significantly greater amounts of CINC-2$\alpha\beta$ only after incubation with MC-LR (1000 nM) (Fig. 2B). No significant effect of MC-LA, MC-YR and MC-LR (1 and 1000 nM) on TNF-α production by rat (control = 472.1 pg/mL ± 45.8 vs. MC = 575.9 pg/mL ± 73.2 [with 1 nM MC] and 783.1 pg/mL ± 95.3 [with 1000 nM MC]) and human (control = 1502.7 pg/mL ± 55.3 vs. MC = 1844.1 pg/mL ± 433 [with 1 nM MC] and 1727.9 pg/mL ± 369.5 [with 1000 nM MC]) neutrophils was observed (mean ± SEM)).

3.3. *Effect of MC-LA, -YR and -LR on ROS generation by neutrophils*

To evaluate the ROS generation by neutrophils in the presence of MC, we examined the intracellular and extracellular ROS generation by human and rat neutrophils. In this study, the flow-cytometric measurement of reactive oxygen metabolites using hydroethidine indicated that treatment of rat neutrophils with MC-LA, MC-YR and MC-LR (1 and 1000 nM) did not cause significant changes in intracellular ROS levels (control = 17.7 ± 0.977 vs. MC = 17.5 ± 0.756 [with 1 nM of MC] and 18.2 ± 0.379 [with 1000 nM of MC] by rat neutrophil (mean of fluorescence ± SEM). However, the lucigenin-enhanced chemiluminescence assay showed that human neutrophils incubated with MC-LA (1000 nM), MC-YR (1000 nM) and MC-LR (1 and 1000 nM) presented increased extracellular ROS levels (Fig. 3A). This phenomenon was only observed in rat neutrophils when PMA was added to the assay medium (Fig. 3B).

4. Discussion

Although some studies have evaluated the *in vitro* effects of MC on isolated cells such as hepatocytes (Ding et al., 2000), macrophages (Chen et al., 2004) and lymphocytes (Lankoff et al., 2004), the biological effects of these toxins are far from being completely understood. MC-LR acts as a modulator of IL-2 and IL-6 production and down-regulates human and chicken lymphocyte functions by induction of apoptosis and necrosis (Lankoff et al., 2004). MC-LR was cytotoxic to mouse splenocytes, causing apoptosis of B-cells, but it had no effect on T-cells (Teneva

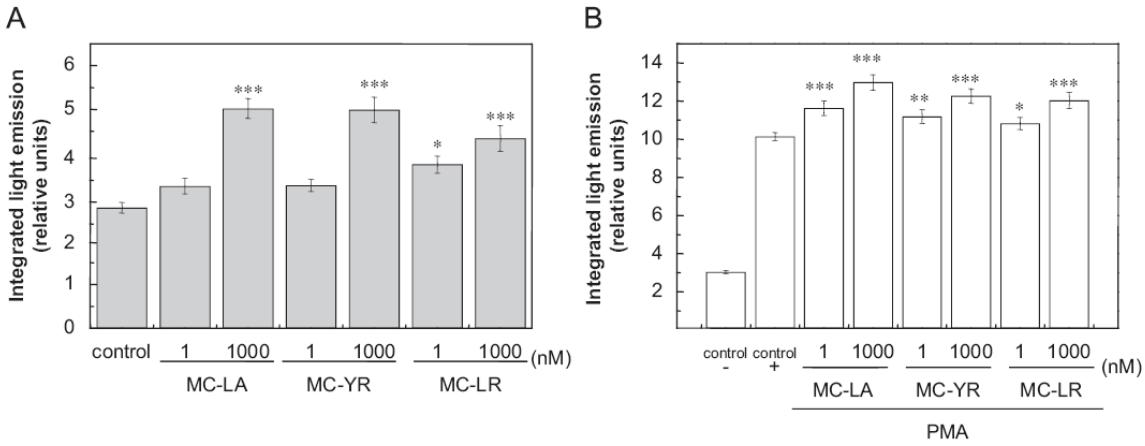


Fig. 3. Extracellular ROS levels in human and rat neutrophils (2.5×10^6 cells/mL) as measured by the lucigenin-amplified chemiluminescence method, in the absence and in the presence of microcystin variants LA, YR and LR (1 and 1000 nM). (A) Represents the integrated light emission (relative light units) measured after addition of microcystins to the medium with human neutrophils. (B) Represents the integrated light emission (relative light units) measured after addition of microcystins and PMA (16 ng/mL) to the medium with rat neutrophils. Results are presented as the mean ± standard error of at least eight experiments carried out in duplicate. The asterisks denote a response that is significantly different from the control+(cells and PMA) ($^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$).

et al., 2005). Furthermore, MC-LR down-regulated NO production and m-RNA levels of iNOS, IL-1β and TNF-α in mice peritoneal macrophages (Chen et al., 2004). In a previous study (Kujbida et al., 2006), MC-LR and [Asp^3]-MC-LR (even at very low concentration) affected human neutrophil chemotaxis, phagocytosis and ROS production. Both MC induced chemotactic effects, suggesting that neutrophils may migrate from the blood stream to organs that concentrate MC, such as the liver and lung. MC-LR and [Asp^3]-MC-LR induced ROS production and increased phagocytosis and killing of *Candida albicans*. Previous studies and our results presented here suggest a possible link between neutrophils and MC-induced toxicity.

After treatment of neutrophils with MC-LA and MC-LR, an increase in human neutrophil viability was observed. Increased survival ratio of these cells is observed under inflammatory conditions. Cytokines and bacterial products can prolong neutrophils survival by interfering with the physiological process of apoptosis (Suzuki et al., 2006). Prolongation of survival may be important for the regulation of host resistance and inflammation, and may represent a critical permissive step for certain cytokines and microbial products that activate gene expression in neutrophils (Collota et al., 1992).

There are few studies on the toxicological properties of MC variants. MC-LR is the most frequently examined variant in order to elucidate the toxicological mechanisms of action of these important cyanobacterial toxins (US EPA, 2006). Accordingly, MC-LR has been reported to cause apoptosis of a variety of mammalian cells (mice, rat and human hepatocytes, human endothelial cells, human skin fibroblasts, human epithelial cells, human and chicken lymphocytes, mouse splenocytes and rat promyelocytes) (McDermott et al., 1998; Lankoff et al., 2004; Teneva et al., 2005). Mild to marked changes in MC toxicity have been found by modifications at different sites of these toxin molecules. Toxicokinetics and bioaccumulation of MC can be changed by differences in the hydrophobicity of the MC (Pia et al., 2003). MC variants could differ in their way of action (Chen et al., 2006). Based on biochemical and histological studies, the pathological changes in nephrotoxicity (Milutinovic et al., 2003) and hepatotoxicity (Gupta et al., 2003) induced by MC-LR appeared to be more severe than those induced by MC-YR and MC-RR.

Recent mechanistic studies, in combination with a vast amount of clinical literature, support the contention that cancer development is directly involved with regulation of immune cell function (De Visser et al., 2006; Tan and Coussens, 2007). Innate immune cells (neutrophils, mast cell and resident macrophages) contribute to cancer development through direct and indirect mechanisms. The direct mechanisms involve the induction of DNA damage by the generation of free radicals and paracrine regulation of intracellular pathways (through nuclear factor κB). The indirect mechanisms are related to promotion of angiogenesis and tissue remodelling by the production of growth factors, cytokines, chemokines and matrix metalloproteinases, cyclooxygenase-2 upregulation and suppression of antitumor adaptive immune responses (De Visser et al., 2006).

MC-LA, MC-YR and MC-LR increased IL-8 (all MC) and CINC-2$\alpha\beta$ (only MC-LR) production by human and rat neutrophils, respectively. It seems there are events involved in liver injuries caused by MC exposure than simply the presence of neutrophils in the inflammatory process. According to our findings, we suggest that MC can initially attract neutrophil as well as enhance neutrophil migration by inducing these cells to produce additional amounts of chemokine. In addition, our current observations corroborate with previous results that suggested

that MC have a chemotactic effect (Hernández et al., 2000; Kujbida et al., 2006).

Apoptotic hepatocytes induce a neutrophil attack mainly because under such a condition they can generate CXC chemokines, which are powerful mediators of neutrophil recruitment (Faouzi et al., 2001). A representative member of these CXC chemokines is IL-8, a major chemoattractant agent for human neutrophils (Oppenheim et al., 1991; Luster, 1998). Four CXC chemokines, including CINC, have been identified in rats (Nakagawa et al., 1994; Driscoll et al., 1995; Shibata et al., 1995). They are structurally related to each another and share many functions. These chemokines have the ability to attract neutrophils, apart from their effects on other functions of these cells, including adhesion-molecule expression and intracellular calcium influx. Another mediator that could trigger neutrophil accumulation in the liver is TNF-α, which induces production and release of large quantities of IL-8 (in human) and CINC (in rat) by hepatocytes (Jaeschke et al., 1996).

ROS are capable of damaging DNA and other biomolecules. Increased formation of ROS can promote the development of malignancy, and increased rates of ROS generation may account for the increased risk of cancer development. A variety of studies have demonstrated that oxidative stress is an important mechanism by which MC induce hepatocyte apoptosis and liver injury (Ding and Ong, 2003; Bouaïcha and Maatouk, 2004; Zegura et al., 2006; Weng et al., 2007). There is evidence that these toxins may deplete glutathione, leading to oxidative damage and cell death, and/or may increase ROS production by disrupting the mitochondrial electron transport chain, leading to mitochondrial permeability and apoptosis (Ding and Ong, 2003). An increase of lipid peroxidation in MC-LR-induced liver toxicity was also reported (Towner et al., 2002; Bouaïcha and Maatouk, 2004; Gehringer, 2004).

The results obtained herein concerning ROS release also support previous studies with MC-LR and [Asp^3]-MC-LR. These two closely related MC variants (the difference between them is only one methyl group present in the isolinked aspartic acid at the position 3) amplified ROS production as determined by the luminol technique that allows the measurement of both intra- and extracellular ROS levels. Therefore, it can be concluded that neutrophils, in the presence of MC-LR, increase the extracellular ROS content *in vitro*, only. In fact, as described by Jaeschke and Hasegawa (2006), experiments with several chemicals induced the accumulation of activated neutrophils in liver, and this process can greatly contribute to the pathogenesis of hepatic damage due to generation of ROS and hepatic lipid peroxidation. MC can be an additional inducer of ROS production as well as act on hepatocytes under such conditions and potentially increase injury processes induced by these toxins.

Acknowledgments

This research was supported by grants and fellowships from FAPESP, CNPq and CAPES PROBRAL.

References

Bouaïcha, N., Maatouk, I., 2004. Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. Toxicol. Lett. 148, 53–63.

Boyum, A., 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21, 77–89.

Chen, T., Zhao, X., Liu, Y., Shi, Q., Hua, Z., Shen, P., 2004. Analysis of immunomodulating nitric oxide, iNOS and cytokines mRNA in mouse macrophages induced by microcystin-LR. Toxicology 197, 67–77.

Chen, Y.M., Lee, T.H., Lee, S.J., Huang, H.B., Huang, R., Chou, H.N., 2006. Comparison of protein phosphatase inhibition activities and mouse toxicities of microcystins. Toxicon 47, 742–746.

Collota, F., Re, F., Polentarutti, N., Sozzani, S., Antovani, A., 1992. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. Blood 80, 2012–2020.

Cury-Boaventura, M.F., Gorjão, R., de Lima, T.M., Newsholme, P., Curi, R., 2006. Comparative toxicity of oleic and linoleic acid on human lymphocytes. Life Sci. 78, 1448–1456.

Dawson, R.M., 1998. The toxicology of microcystins. Toxicon 36, 953–962.

De Visser, K.E., Eichten, A., Coussen, L.M., 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. Nat. Rev. Cancer 6, 24–40.

Ding, W.X., Ong, C.N., 2003. Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. FEMS Microbiol. Lett. 220, 1–7.

Ding, W.X., Shen, H.M., Ong, C.N., 2000. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes. Hepatology 32, 547–555.

Driscoll, K.E., Hassenbein, D.G., Howard, B.W., Isfort, R.J., Cody, D., Tindal, M.H., Suchanek, M., Carter, J.M., 1995. Cloning, expression, and functional characterization of rat MIP-2: a neutrophil chemoattractant and epithelial cell mitogen. J. Leukocyte Biol. 58, 359–364.

Faouzi, S., Burckhardt, B.E., Hanson, J.C., Campe, C.B., Schrum, L.W., Rippe, R.A., Maher, J.J., 2001. Anti-Fas induces hepatic chemokines and promotes inflammation by an NF-B-independent, caspase-3-dependent pathway. J. Biol. Chem. 276, 49077–49082.

Fischer, W.J., Hitzfeld, B.C., Tencalla, F., Eriksson, J.E., Mikhailov, A., Dietrich, D.R., 2000. Microcystin-LR toxicodynamics, induced pathology, and immunohistochemical localization in livers of blue-green algae exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Toxicol. Sci. 54, 365–373.

Gehringer, M.M., 2004. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. FEBS Lett. 557, 1–8.

Gupta, N., Pant, S.C., Vijayaraghavan, R., Rao, P.V.L., 2003. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. Toxicology 188, 285–296.

Hatanaka, E., Furlaneto, C.J., Ribeiro, F.P., Souza, G.M., Campa, A., 2004. Serum amyloid A-induced mRNA expression and release of tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) in human neutrophils. Immunol. Lett. 91, 33–37.

Hatanaka, E., Levada-Pires, A.C., Pithon-Curi, T.C., Curi, R., 2006. Systematic study on ROS production induced by oleic, linoleic, and γ-linolenic acids in human and rat neutrophils. Free Radical Biol. Med. 41, 1124–1132.

Hernández, M., Macia, M., Padilla, C., Del Campo, F.F., 2000. Modulation of human polymorphonuclear leukocyte adherence by cyanopeptide toxins. Environ. Res. 84, 64–68.

Humpage, A.R., Falconer, I.R., 1999. Microcystin-LR and liver tumor promotion: effects on cytokinesis, ploidy, and apoptosis in cultured hepatocytes. Environ. Toxicol. 14, 61–75.

Jaeschke, H., Hasegawa, T., 2006. Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. Liver Int. 26, 912–919.

Jaeschke, H., Smith, C.W., Clemens, M.G., Ganey, P.E., Roth, R., 1996. Mechanisms of inflammation liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils. Toxicol. Appl. Pharmacol. 139, 213–226.

Jaeschke, H., Gores, G.I., Cederbaum, A.I., Hinson, J.A., Pessayre, D., Lemasters, J.J., 2002. Mechanisms of hepatotoxicity. Toxicol. Sci. 65, 166–176.

Kujbida, P., Hatanaka, E., Campa, A., Colepicolo, P., Pinto, E., 2006. Effects of microcystins on human polymorphonuclear leukocytes. Biochem. Bioph. Res. Commun. 341, 273–277.

Lankoff, A., Carmichael, W.W., Grasman, K.A., Yuan, M., 2004. The uptake kinetics and immunotoxic effects of microcystin-LR in human and chicken peripheral blood lymphocytes in vitro. Toxicology 204, 23–40.

Luster, A.D., 1998. Chemokines–chemotactic cytokines that mediate inflammation. Engl. J. Med. 338, 436–445.
McDermott, C.M., Nho, C.W., Howard, W., Holton, B., 1998. The cyanobacterial toxin, microcystin-LR, can induce apoptosis in a variety of cell types. Toxicon 36, 1981–1996.
Milutinovic, A., Zivin, M., Zorc-Pleskovic, R., Sedmak, B., Suput, D., 2003. Nephrotoxic effects of chronic administration of microcystins-LR and -YR. Toxicon 42, 281–288.
Nakagawa, H., Komorita, N., Shibata, F., Ikesue, A., Konishi, K., Fujioka, M., Kato, H., 1994. Identification of cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINC), rat GRO/CINC-2x and CINC-2f1, produced by granulation tissue in culture: purification, complete amino acid sequences and characterization. Biochem. J. 301, 545–550.
Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F., Riccardi, C., 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J. Immunol. Methods 139, 271–279.
Oppenheim, J.J., Zachariae, C.O.C., Mukaida, N., Matsushima, K., 1991. Properties of the novel proinflammatory supergene 'intercrine' cytokine family. Annu. Rev. Immunol. 9, 617–648.
Pia, S.M., Jussi, V., Meriluoto, A.O., 2003. Interaction between microcystins of different hydrophobicities and lipid monolayers. Toxicon 41, 349–355.
Pouria, S., de 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., 1998. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brasil. Lancet 352, 21–26.
Shibata, F., Konishi, K., Kato, H., Komorita, N., Al-Mokdad, M., Fujioka, M., Nakagawa, H., 1995. Recombinant production and biological properties of rat cytokines-induced neutrophil chemoattractants, GRO/CINC-2α, CINC-2β and CINC-3. Eur. J. Biochem. 231, 306–311.
Sivonen, K., Jones, G., 2003. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), Toxic Cyanobacteria in Water—A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. Spon Press, London, pp. 41–111.
Solter, P.F., Wollenberg, G.K., Huang, X., Chu, F.S., Runnegar, M.T., 1998. Prolonged sublethal exposure to the protein phosphatase inhibitor microcystin-LR results in multiple dose-dependent hepatotoxic effects. Toxicol. Sci. 44, 87–96.
Suzuki, R., Iwase, M., Miyaoka, K., Kondo, G., Watanabe, H., Ohashi, M., Nagumo, M., 2006. Modulation of neutrophil apoptosis in plasma of patients after orthognathic surgery. J. Surg. Res. 130, 110–118.
Tan, T.T., Coussens, L.M., 2007. Humoral immunity, inflammation and cancer. Curr. Opin. Immunol. 19, 209–216.
Teneva, I., MLadenov, R., Popov, N., Dzhambazov, B., 2005. Cytotoxicity and apoptotic effects of microcystin-LR and anatoxin-a in mouse lymphocytes. Folia Biol. (Praha) 51, 62–67.
Towner, R.A., Sturgeon, S.A., Hore, K.E., 2002. Assessment of in vivo oxidative lipid metabolism following acute microcystin-LR-induced hepatotoxicity in rats. Free Radical Res. 36, 63–71.
US EPA, 2006. Toxicological Reviews of Cyanobacterial Toxins: Microcystins LR, RR, YR and LA (External Review Draft). US Environmental Protection Agency, Washington, DC EPA/600/R-06/139.
Weng, D., Lu, Y., Wei, Y., Liu, Y., Shen, P., 2007. The role of ROS in microcystin-LR-induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice. Toxicology 232, 15–23.
Zegura, B., Lah, T.T., Filipic, M., 2006. Alteration of intracellular GSH levels and its role in microcystin-LR-induced DNA damage in human hepatoma HepG2 cells. Mutat. Res. 611, 25–33.

The role of microcystins -LA, -YR, and -LR on neutrophil migration.

Elsevier Editorial System(tm) for Toxicology and Applied Pharmacology

Manuscript Draft

Manuscript Number: TAAP-S-08-01013

Title: The role of microcystins -LA, -YR, and -LR on neutrophil migration

Article Type: Regular Articles

Keywords: microcystin, neutrophils, migration, rolling, adherence, adhesion molecules, calcium influx

Corresponding Author: Prof. Dr. Ernani Pinto,

Corresponding Author's Institution: University of São Paulo

First Author: Paula Kujbida

Order of Authors: Paula Kujbida; Elaine Hatanaka; Marco A Vinolo ; Kaline Waismam; Danielle Cavalcanti ; Rui Curi; Sandra Farsky; Ernani Pinto

Abstract: Microcystins (MCs) produced by some freshwater cyanobacterial species possess potent liver toxicity, as evidenced by acute neutrophil infiltration. We have recently demonstrated that MCs exert a direct effect on reactive oxygen species (ROS) and pro-inflammatory cytokine release by neutrophils. Here, we investigate the ability of three structurally distinct toxins (MC-LA, MC-LR, and MC-YR) to evoke neutrophil recruitment per se and their effects on migration pathways. MC-LA, MC-LR, and MC-YR similarly induced in vivo migration of neutrophils into the subcutaneous tissue of rats and differentially evoked secretion of chemoattractant cytokines. Elevated concentrations of CINC-2α were found in the inflamed exudates from animals injected with MC-LA, MC-LR or MC-YR, although MIP-2 was detected only in the exudates from animals injected with MC-LR. Intravital microscopic studies showed that topical application of only MC-LR enhanced the numbers of rolling and adhered leukocytes in the endothelium of postcapillary mesenteric venules. The latter effects may be dependent upon induction of the synthesis and expression of L-selectin and β2-integrin in neutrophils, as assessed by flow cytometry and RT-PCR, respectively. Conversely, the three toxins promoted direct locomotion of neutrophils and enhanced their migration in response to fMLP, as measured by Boyden chamber assays, and increased intracellular calcium, a messenger in the chemotaxic process. In conclusion, our results show that MCs act on specific pathways of neutrophil recruitment, indicating their potential effect on neutrophils activation.

*** Manuscript Text**

The role of microcystins -LA, -YR, and -LR on neutrophil migration

Paula Kujbida [a], Elaine Hatanaka [b,c], Marco Aurélio Ramirez Vinolo [c], Kaline Waismam [a], Danielle Maia de Hollanda Cavalcanti [a], Rui Curi [c], Sandra Helena Poliselli Farsky [a,*] and Ernani Pinto [a,*]

[a] Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.
[b] Post-Graduate Program in Human Movement Science, Biological Sciences and Health Center, Cruzeiro do Sul University, São Paulo, SP, Brazil.
[c] Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

Key words: microcystin, neutrophils, migration, rolling, adherence, adhesion molecules, calcium influx

*Corresponding authors: Ernani Pinto (e-mail: ernani@usp.br)
Phone (55-11) 3091 1505 / FAX (55-11) 3091 9055

Sandra Helena Poliselli Farsky (e-mail: sfarsky@usp.br)
Phone (55-11) 3091 2197 / FAX (55-11) 3815 6593

Corresponding authors addresses: Avenida Prof. Lineu Prestes, 580 BI 13 B,
05508-900, Butantã, São Paulo, SP, Brasil.

Abstract

Microcystins (MCs) produced by some freshwater cyanobacterial species possess potent liver toxicity, as evidenced by acute neutrophil infiltration. We have recently demonstrated that MCs exert a direct effect on reactive oxygen species (ROS) and pro-inflammatory cytokine release by neutrophils. Here, we investigate the ability of three structurally distinct toxins (MC-LA, MC-LR, and MC-YR) to evoke neutrophil recruitment *per se* and their effects on migration pathways. MC-LA, MC-LR, and MC-YR similarly induced *in vivo* migration of neutrophils into the subcutaneous tissue of rats and differentially evoked secretion of chemoattractant cytokines. Elevated concentrations of CINC-2αβ were found in the inflamed exudates from animals injected with MC-LA, MC-LR or MC-YR, although MIP-2 was detected only in the exudates from animals injected with MC-LR. Intravital microscopic studies showed that topical application of only MC-LR enhanced the numbers of rolling and adhered leukocytes in the endothelium of postcapillary mesenteric venules. The latter effects may be dependent upon induction of the synthesis and expression of L-selectin and β2-integrin in neutrophils, as assessed by flow cytometry and RT-PCR, respectively. Conversely, the three toxins promoted direct locomotion of neutrophils and enhanced their migration in response to fMLP, as measured by Boyden chamber assays, and increased intracellular calcium, a messenger in the chemotaxic process. In conclusion, our results show that MCs act on specific pathways of neutrophil recruitment, indicating their potential effect on neutrophils activation.

Introduction

Toxic cyanobacterial blooms in freshwater supplies pose a risk to the environment and human health (Van Apeldoorn et al., 2007). Microcystins (MCs), known potent hepatotoxins, are produced by various species of cyanobacteria (Dawson, 1998; Carmichael, 2001), which can form water blooms under eutrophic conditions in lakes, ponds, and water reservoirs (Chorus et al., 2003).

Structurally, MCs are monocyclic heptapeptides consisting of: D-alanine (D-Ala); two variable amino acids (at positions X and Z in Figure 1); D-β-methylaspartic acid (MeAsp); (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid (Adda); iso-linked D-glutamic acid (D-Glu) and *N*-methyl dehydroalanine (MDha). Structural variations can occur in all seven amino acids, and are most frequent in the L-amino acids at positions X and Z. The most common L-amino acids at position X are leucine (L), arginine (R) and tyrosine (Y), whereas those at position Z are arginine (R) and alanine (A). The variants are named according to the L-amino acids in these positions. In this context, the MC variant with leucine in position X and arginine in position Z comprises MC-L, the most studied MC regarding toxicological activity (US EPA, 2006).

Human exposure to MCs occurs through dermal (via recreational use of lakes and rivers), oral (via drinking water or consumption of algal health food tablets), inhalation (use of showers), or intravenous routes (contaminated water used as a medicinal vehicle) (Van Apeldoorn et al., 2007; Joshimsen et al., 1998; Pouria et al., 1998; Carmichael et al., 2001; Azevedo et al., 2002). The main target organ of MC-LR is the liver as observed in chronicle and acute intoxications. Chronic intake of MC-LR with drinking water has been associated with a high occurrence of primary liver cancer in humans (Ueno et al., 1996). Acute exposure to the toxin leads to severe liver damage, including massive intra-hepatic hemorrhage, liver swelling, and animal death (Chorus et al., 2003). In addition, clinical experimental studies with MC-LR have demonstrated that acute inflammation occurs in the lungs after systemic intoxication (Soares et al., 2007).

A severe accident in Brazil during 1996, called "Caruaru Syndrome," illustrates the high human toxicity of MCs. In this fatal accident, untreated water from a reservoir with a cyanobacterial bloom was used at a haemodialysis center located in Caruaru. Levels of MC-LR, MC-YR, and MC-AR were found in the tissues and blood of these patients and were related to nausea, vomiting, acute liver damage, and, in some cases, death. Biopsy and autopsy of these livers demonstrated substantial neutrophil infiltration (Joshimsen et al., 1998; Pouria et al., 1998; Carmichael et al., 2001; Azevedo et al., 2002). It has not yet been elucidated as to whether neutrophils are recruited by the activity of the toxin or after hepatic damage, playing a role in liver failure. Although leukocyte recruitment to the focus of a lesion provides the first line of host defense, exacerbated activity of these cells can induce tissue injury and microvascular dysfunction. The deleterious and undesirable effects in the host are due to the ability of neutrophils to release proteolytic enzymes and reactive oxygen and nitrogen metabolites that cause tissue damage (Babior, 2000). We have previously shown that MCs activate human and rat neutrophils *in vitro*, generating ROS and cytokine release (Kujbida et al., 2006 and 2008).

During the process of migration, circulating leukocytes initially roll and adhere to the endothelium of microcirculatory vessel walls, and subsequently transmigrate into the extravascular space, moving directly to site of injury. A coordinated interplay involving a spectrum of adhesion molecules successively expressed on cellular membranes mediates the interactions in the microvasculature and the extravascular tissue. The initial contact between neutrophils and the endothelium is mediated by selectins and their ligands, resulting in neutrophil tethering and rolling along the vessel wall (Granger and Kubes, 1994; Nigli, 2003). These phenomena are a prerequisite for subsequent firm adhesion and transmigration, which are mediated by the expression and activation of members of the integrin family, *e.g.* β2-integrins (Lawson et al., 2000), that covalently bind adhesion molecule immunoglobulin family proteins expressed on the endothelium (mainly represented by intracellular adhesion molecules 1 and 2 (ICAM-1 and 2), vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1), and platelet-

endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)) (Granger and Kubes, 1994; Steeber and Tedder, 2000; Bochner, 2004; Steeber et al., 2005).

In the surrounding microvascular tissue, neutrophils move directly to the focus of a lesion, guided by chemoattractants secreted by competent cells or generated by activation of plasma proteins (Nigli, 2003). Chemoattractant factors bind to seven membrane domain receptors and activate heterotrimetric-G-proteins. Downstream of these proteins, a complex signaling network is activated that induces reversible actin polymerization, development of polarity, reversible adhesion, and migration (Niggli, 2003; Kay et al., 2008). Neutrophils move by projecting pseudopodia directly into the chemoattractant gradient. The intracellular pathway of chemotaxis is not completely understood, and varies according to the chemoattractant (Niggli, 2003). In general, chemoattractant receptor activation has been shown to lead to the generation of Ca^{2+} signaling via a series of events, including G-protein interactions, inositol 1,4,5-triphosphate production, and Ca^{2+}-channel opening and release of intracellular Ca^{+2} stores to the plasma membrane. The increased Ca_i^{2+} concentration mediates the expression of adhesion molecules responsible for cell to cell contact in the extravascular matrix and regulates myosin function via Ca^{2+}/calmodulin-dependent myosin light chain kinases (Niggli, 2003).

Taking into account that MC toxicity is characterized by neutrophil influx into target tissues, we herein investigated the ability of three structurally distinct toxins, MC-LA, MC-YR and, MC-LR, to induce leukocyte recruitment *in vivo* and their specific effects on pathways of cellular movement. The results clearly demonstrate the *in vivo* inflammatory properties of MC-LA, MC-YR and MC-LR, quantified by the local influx of leukocytes and by secretion of chemoattractants, and their individual actions on leukocyte-endothelial interactions, leukocyte adhesion molecule expression, neutrophil chemotaxis, and Ca^{2+} mobilization.

Materials and methods

Reagents

MC-LA, MC-YR, MC-LR, bovine fetal serum (BSA), penicillin, RPMI-1640 medium supplemented with L-glutamine, N-formyl-methionyl-leucyl-phenilalanine (fMLP), May Grumwald–Giemsa, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), ionomycin A23187, Fluo-3 AM, and oyster glycogen were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). L-Selectin monoclonal antibodies conjugated to FITC (anti-rat CD62L) and β2-integrin monoclonal antibodies conjugated to FITC (anti-rat CD18) were purchased from BD PharMingen Technical (San Diego, CA, USA). Sodium pentobarbital was purchased from Cristália (São Paulo, SP, Brazil). Trizol reagent was purchased from Invitrogen (Grand Island, NY, USA). Oligo(dT)15 primer, ribonuclease inhibitor, reverse transcriptase, Taq DNA polymerase, and dNTP mix were purchased from Promega (Madison, WI, USA). CINC-2αβ, TNF-α (tumor necrosis factor-α), MIP-2 (macrophage inflammatory protein 2), VEGF-α (vascular endothelial growth factor α), and IL-1β (interleukin 1 β) were purchased from R&D System (Minneapolis, MN, USA).

Animals

Male Wistar rats weighing 180 ± 20g were obtained from the Department of Clinical Chemistry of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil. The rats were maintained at 23ºC under a light: dark cycle of 12:12 hours. Food and water were provided *ad libitum*. The Animal Care Committee of the Faculty of Pharmaceutical Sciences approved of the experimental procedures employed in this study (Protocol nº. 275).

In vivo inflammation: air pouch model

Rat skin air pouches were prepared according to Sedgwick and Lees (1986-b). A volume of 20 mL of sterile air (using fluoropore filters, 0.22 μm) was insufflated into the subcutaneous tissue on the posterior trunk of rats under

anesthesia. Seven days later, an additional volume of 10 mL of sterile air was insufflated and, on day 8, 1 mL of a solution of MC-LA, MC-YR, or MC-LR (1000 nM) in sterile phosphate-buffered saline (PBS) was injected into the pouch of anesthetized rats under aseptic conditions. Stock solutions of MC-LA, MC-YR, and MC-LR in deionizated water were dissolved in PBS. Negative control animals received 1 mL of sterile PBS buffer, and positive controls received 1 mL of sterile PBS plus fMLP (10 nM) via the same route. Four hours after injection of the MC-LA, MC-YR or MC-LR, the animals were sacrificed by decapitation and the inflammatory exudate was collected after washing the intra-peritoneal cavity with 20 mL of sterile PBS. The suspension was centrifuged at 500 g for 10 min at -4℃, and the cells were then suspended in 1 mL of PBS. The number of cells was then determined using a Neubauer chamber and visualized by light microscopy (Nikkon, Japan).

CINC-2αβ, TNF-α, MIP-2, VEGF-α, and IL-1β determination

The exudates obtained from the air pouches were centrifuged at 500 g for 10 min at -4℃, and the supernatants were collected and frozen at -80℃ until cytokine determination by ELISA, according to the manufacturer's instructions.

Intravital microscopic assay

Rats were anesthetized by i.p. injection of pentobarbital sodium (65 mg/kg) and the mesentery was exteriorized. After surgery, the animals were maintained on a special board that was thermostatically controlled at 37ºC. This system included a transparent platform on which the tissue to be transilluminated was posicioned. The preparation was kept moist and warm by irrigating the tissue with a warmed Ringer-Locke solution (pH 7.2–7.4; 154 mM NaCl; 5.6 mM KCl; 2 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 6 mM $NaHCO_3$, and 5 mM glucose) containing 1% gelatin. The rate of solution outflow onto the exposed tissue was controlled to keep the preparation in continuous contact with a film of the liquid. Transilluminated images were obtained by optical microscopy. The images were captured with a video camera (ZVS, 3C75DE, Carl–Zeiss) and simultaneously transmitted to a TV monitor and a

computer. Digitized images were subsequently analyzed using image-analyzing software (KS 300, Kontron).

Leukocyte – endothelial cell interaction

The interaction between leukocytes and vessel walls was evaluated by determining the number of rolling and adhered leukocytes on the postcapillary venule wall (20-30 µm diameter, 200 µm length) of the mesentery at 10-min intervals, as previously described by Dahlen (1981). Three fields were evaluated per animal after application of 10 µL of MC-LA, MC-YR, or MC-LR (1 nM). Leukocytes moving peripherally to the axial stream and in contact with the endothelium were considered to be 'rollers'. These leukocytes moved sufficiently slow to be individually visible and were counted as they rolled past a designated point on one side of the vessel for a duration of 10 minutes after MC-LA, MC-YR, or MC-LR treatment (1 nM). The number of leukocytes adhered to the endothelium (stopped at the vessel wall) was determined in the same vascular segment after 10 minutes of MC-LA, MC-YR, or MC-LR application.

Blood flow cytometry

In order to quantify L-selectin or β_2-integrin expression, leukocytes were isolated from abdominal aorta blood collected in EDTA (100 mg/mL). Erythrocyte lysis was performed using an ammonium chloride solution (0.13 M), and leukocytes were recovered after washing the preparation with PBS. The cells (1.0×10^6) were incubated with MC-LA, MC-YR, MC-LR (1000 nM), or fMLP (10 nM) for 4 hours. After washing, the leukocytes were further incubated for 30 minutes at 4ºC in the dark with 10 µL of monoclonal antibody against L-selectin or β2-integrin. Immediately after incubation, the cells were analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA). Data were obtained from 10,000 cells and only morphologically viable neutrophils were considered for analysis. Leukocytes were separated based on size and granularity. As circulating leukocytes in rats are represented by lymphocytes (about 80-85%), neutrophils (about 10-15%), monocytes (about 4-5%), and eosinophils (about 1%), gates were

selected to designate mononuclear (lymphocytes and monocytes) and polymorphonuclear leukocytes (neutrophils and eosinophils). Fluorescence was determined and the results are expressed as the mean fluorescence of four assays performed in duplicate.

RT-PCR assays

RNA extraction. Neutrophils were prepared as described above. Cells (1.0×10^6) were incubated with MC-LA, MC-YR, MC-LR (1000 nM), or fMLP (10 nM) for four hours. Total RNA was extracted from cultured neutrophils using Trizol reagent according to the manufacturer's instructions. RNA extraction was carried out in an RNAse-free environment, and the isolated RNA was quantified by reading the absorbance of the RNA solution at 260 nm.

Reverse transcriptase-PCR. cDNAs were synthesized from 2 mg of total RNA using an oligo(dT)15 primer (20 mg/mL) after incubation at 70℃ for 5 min in the presence of 2 mM dNTP mix, ribonuclease inhibitor (20 U), and reverse transcriptase (200 U) in a final volume of 25 µL in reverse transcriptase buffer. The reverse transcription reaction was performed by incubation at 42℃ for 60 min. For PCR, cDNA was incubated with 2.5 U of Taq DNA polymerase, 0.4 mM 30- and 50-specific primers, and 200 mM dNTP mix with buffer-thermophilic DNA polymerase in 1.5 mM $MgCl_2$. The primer sequences used were GAPDH, 5'-TATGAT GACATCAAGAAGGTGG-3' (forward) and 5'-CACCACCCTGTTGCTGTA-3' (reverse); L-selectin, 5'-AACGAGACTCTGGGAAGT-3' (forward) and 5'-CAAAGGCTCACATTGGAT-3' (reverse); β_2-integrin, 5'-TGCGCCCCTCACTGCTGCTTG-3' (forward) and 5'-GAGATCCATGAGGTAGTACAGATC-3' (reverse).

***In vitro* neutrophil migration: Boyden chamber assays**

Neutrophils were obtained from adult rats 4 h after intraperitoneal (ip) injection of 10 mL of 1 % sterile oyster glycogen solution in phosphate-buffered saline (PBS). The animals were anesthetized with 200 µL of ketamine:xylazine

(2:1) and the cells were collected by rinsing the abdominal cavity with 40 mL of sterile PBS. The number of viable cells (98%) was counted in a Neubauer chamber using a light microscope (Nikkon, Japan). The migratory assay was performed using a multiwell chemotaxis chamber, as previously described by Boyden (1962) and Zigmond and Hirsch (1973).

To evaluate the capacity of MC-LA, MC-YR, or MC-LR to induce neutrophil migration, aliquots of cell suspensions containing 1.5 x 10^6 neutrophils (in Hanks' balanced salt solution (HBSS) containing 0.01% albumin) were added to the upper compartment of the chamber onto a cellulose filter with an average pore size of 8 µm (Millipore). The lower compartments were prepared as follows: HBSS containing the chemotactic agent fMLP (10 nM) in positive control wells, HBSS only in negative control wells, and solutions of MC-LA, MC-YR, or MC-LR (1, 100, and 1000 nM in HBSS) in test wells. The cells were incubated for 60 minutes (humidified air, 37ºC, 5% CO_2), followed by removal of the filters for fixation and staining of the cells. Neutrophil migration within the filter was determined under light microscopy, as previously described by Zigmound and Hirsch (1973). The distance was measured from the top of the filter to the farthest plane still containing two cells with an x40 objective. Duplicate wells were tested for each variable, and five fields were counted and averaged per filter.

To investigate the influence of MC-LA, MC-YR, or MC-LR on neutrophil migration induced by fMLP, aliquots of cell suspensions containing 1.5 x 10^6 neutrophils were added to the upper compartment of the chamber after incubation for 60 minutes (37ºC, 5% CO_2) with MC-LA, MC-YR, or MC-LR (1, 100, and 1000 nM). After incubation, the cells were washed and resuspended in HBSS containing 0.01% albumin for use in the chemotaxis assay. The chemotactic agent (10 nM fMLP) was added to the lower compartment of all wells, excluding negative control wells (HBSS only). The cells were incubated for 60 minutes (humidified air, 37ºC, 5% CO_2), followed by removal of the filters and evaluation of cell migration using the same methods for fixation and staining described above.

Confocal microscopy

Neutrophils were obtained from adult rats 4 h after i.p. injection of 10 mL of 1% oyster glycogen solution in PBS. The animals were anesthetized with 200 µL of ketamine:xylazine (2:1) and the cells were collected by rinsing the abdominal cavity with 40 mL of sterile Krebs-HEPES buffer (120 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4, 1.2 mM $MgSO_4$, 1.3 mM $CaCl_2$, 25 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), and 0.1% bovine serum albumin (BSA), pH 7.3). The number of viable cells (98%) was counted in a Neubauer chamber using a light microscope (Nikkon, Japan). The intracellular Ca^{2+} level ($[Ca^{2+}]_i$) was analyzed using a laser scanning confocal microscope (LSM 410, Carl Zeiss, Jena, Germany). Isolated neutrophils were incubated with 1 mM Fluo-3AM for 45 minutes at room temperature. Neutrophils were washed and suspended at 4 x 10^6 cells/mL in Krebs-HEPES buffer. For each experiment, 35 µL of the cell suspension was added to glass-bottomed culture dishes and allowed to settle. The cells were imaged with an inverted confocal microscope (MRC-Bio-Rad 600) using a 63x objective. After 10 minutes of cell addition, at which time the cells were adherent, the first images were acquired and MC-LA, MC-YR, or MC-LR (1,000 nM) was added to the dishes. Immediately after MC stimulation, $[Ca^{2+}]_i$ was analyzed using a laser scanning confocal microscope with excitation and emission wavelengths of 506/526 nm, respectively. Samples were scanned once per second for 200 sec. The $[Ca^{2+}]_i$ at each scanning point was analyzed and integrated for 95 sec. Maximal fluorescence was obtained by addition of ionomycin (A23187, 100 µM), and minimal fluorescence was obtained by addition of EDTA (4 mM). The integrated values of five cells per experimental group were obtained and the mean ± SE of the fluorescence intensity of these cells was then calculated.

Statistical analyses

Statistical analyses were carried out by comparing the average ± standard error (SE) of the groups by ANOVA, with the Student-Newman-Keuls multiple comparison test.

Results

MC-LA, MC-YR, and MC-LR induce *in vivo* leukocyte recruitment and secretion of CXC into the subcutaneous cavity

Local injections of MC-LA, MC-YR, or MC-LR into the dorsal subcutaneous cavity of rats (air pouch) induced a local influx of leukocytes. The number of leukocytes in the pouches four hours after injection of toxins was significantly higher than that observed in animals injected with sterile PBS, the vehicle used for the toxins ($p<0.05$), and equivalent to that induced by fMLP, a pro-inflammatory agent (Figure 2).

The effect of MC-LA, MC-YR, or MC-LR on CINC-2αβ, TNF-α, MIP-2, VEGF-α, and IL-1-β secretion was determined in cell-free exudates. CINC-2αβ production was increased by MC-YR, MC-LR ($p<0.05$) and MC-LA ($p<0.01$) (Figure 3A), whereas increased MIP-2 levels were only observed in response to treatment with MC-LR ($p<0.05$) (Figure 3B). Treatment with MC-LA, MC-YR, or MC-LR did not significantly affect TNF-α, VEGF-α, and IL-1-β production (data not shown).

Rolling and adherence of leukocytes is only induced by MC-LR *in vivo*

To evaluate the role of toxins on initial events involved in leukocyte recruitment, toxins were topically applied to the microvasculature of the mesentery and the numbers of rolling and adhered leukocytes were quantified by intravital microscopy. Topical application of MC-LR increased both events, as evidenced by increased numbers of rolling ($p<0.001$) and adhered ($p<0.05$) leukocytes in comparison to topical application of PBS solution, MC-LA, or MC-YR (Figure 4A and 4B).

Synthesis and expression of L-selectin and β_2-integrin on circulating leukocytes is only enhanced by MC-LR

L-selectin and β2-integrin are expressed on leukocytes during rolling and adherence, respectively (Mayadas and Cullere, 2005; Patel et al., 2002). The expression of both molecules on *in vitro* MC-LR-exposed neutrophils was higher

than that observed on MC-LA-, MC-YR-, and vehicle-exposed cells ($p<0.05$) (Figure 5A and 5B). Similar L-selectin and β2-integrin expression levels were observed in MC-LA-, MC-YR-, and vehicle-exposed cells. fMLP-stimulated cells were used as positive controls in the assays, and the data depicted herein show that these cells presented elevated expression of the two molecules tested (Figures 5A and 5B).

To evaluate if the elevated adhesion molecule expression reflected their increased synthesis, mRNA was isolated from the cells and RT-PCR assays were performed. The mRNA levels of L-selectin and β2-integrin were significantly increased in MC-LR-treated neutrophils compared to MC-LA-, MC-YR-, or vehicle-exposed cells (Figures 6A and 6B). Gene expression was also increased in fMLP-stimulated cells (Figures 6A and 6B).

MC-LA, MC-YR, and MC-LR induce neutrophil migration *in vitro*

After diapedesis, leukocytes migrate into the extravascular tissue, directly to the inflammatory focus in response to chemoattractant factors. Therefore, we used an *in vitro* assay (Boyden chambers) that permits measurement of the leukocyte response to these agents by increasing leukocyte locomotion onto a cellulose filter (Boyden, 1962; Zigmond and Hirsch, 1973).

MC-LA, MC-YR, and MC-LR induced chemotaxis *per se,* as neutrophil migration was enhanced in response to these toxins. Values obtained were higher than those observed in response to vehicle (HBSS) and equivalent to migration induced by fMLP, which was used as a positive control (Figure 7A, 7B and 7C). However, chemotactic potency differed between the toxins. Elevated responses were detected with 1 and 100 nM MC-LA ($p<0.001$; Figure 7A), 1 nM MC-YR ($p<0.01$; Figure 7B), and 1, 100 and 1000 nM MC-LR ($p<0.001$; Figure 7C).

The second assay was carried out to evaluate the ability of the toxins to alter chemotaxis in response to fMLP. To assess this, the migration of cells previously incubated with different concentrations of MC-LA, MC-YR, MC-LR, or HBSS onto the filter was assessed in response to fMLP. Cells incubated with all concentrations

of the three toxins employed presented higher migration in response to fMLP than cells incubated with HBSS ($p<0.01$ or $p<0.001$, Table 1).

MC-LA, MC-YR, and MC-LR induce intracellular calcium mobilization in neutrophils

$[Ca^{2+}]_i$ was determined by analyzing cells for 0-95 sec after MC additions. Means ± SE of the integrated values of five cells per group (MC-LA, MC-YR, or MC-LR-stimulated neutrophils) demonstrated that toxins increased the $[Ca^{2+}]_i$ (Figure 8). $[Ca^{2+}]_i$ was increased immediately after additions of MC-LA, -YR, and -LR and attained a maximum level within 20, 27, and 40 seconds, respectively. In spite of the fact that all MCs were able to trigger calcium influx in neutrophils, MC-LR incubation maintained the elevated $[Ca^{2+}]_i$ until to the end of the investigation period (Figure 8). Integrated values for the area, as shown in the minor insert of the figure, represent significantly increased $[Ca^{2+}]_i$ in neutrophils incubated with MC-LA MC-YR and MC-LR ($p<0.001$) in comparison to that in cells incubated with vehicle.

Discussion

Exacerbated influx and activation of neutrophils contribute to tissue injury in a number of disease states, including certain xenobiotic-induced liver injuries (Dahm et al., 1991). In this context, neutrophil infiltration was observed around necrotic foci in human and laboratory animals after MC-induced intoxications (Pouria et al., 1998; Benson et al., 2005). Nevertheless, the role of neutrophils in the pathogenesis of organ toxicity has not been established. In the current study, we demonstrated the ability of three structurally distinct and potentially toxic MCs to induce leukocyte migration and cytokine secretion *in vivo* and to promote activation and migration of neutrophils into the focus of MC activity.

The air pouch cavity is induced in the dorsal subcutaneous tissue of mice and has been extensively employed to evaluate inflammation via collection of exudates (Freire et al., 2003; Carvalho et al., 2005; Costa et al., 2008). The pouch cavity is characterized by neovascularization and infiltration of resident cells, closely resembling the synovium (Sin et al., 1986; Sedgwick and Lees, 1986 a,b.). We demonstrate herein that toxins activate mechanisms that drive leukocytes toward an inflammatory focus *in vivo*, as injection of MC-LA, MC-YR, or MC-LR into pouches induced equivalent migration of cells, similar to that evoked by fMLP, an N-formylated peptide synthesized by bacteria and classically used as an inflammatory stimulus (Prossnitz and Ye, 1997).

In fact, subsequent data indicate that toxins act on different aspects of the leukocyte migration process.Higher amounts of CINC-2αβ were found in the pouch exudates induced by injection of the three toxins, and elevated concentrations of MIP-2 were observed in the exudates obtained from MC-LR injected pouches. These two mediators of inflammation are classified as chemokines, as they are chemoattractant cytokines that play a pivotal role in inflammation, sharing the ability to induce migration and activation of specific subsets of leukocytes, including neutrophils (Kobayashi et al., 2008). CINC is synthesized and released by macrophages and epithelial cells and plays a key chemotactic role in rats, as these animal species do not secrete IL-8, an important chemoattractant agent (Watanabe

et al., 1989; Alonso et al., 1996; Yoshida et al., 2001; Wuyts et al., 1998; Shibata et al., 2000). MIP is secreted by macrophages, B-lymphocytes, neutrophils, dendritic cells, mast cells, and NK cells (Maurer and von Stebut, 2004). Therefore, elevated concentrations of these chemokines in the pouches suggest an effect of MCs on resident cells, such as mast cells, macrophages, or recruited neutrophils. Our previous data indicate that recruited neutrophils may represent a target cell of MCs actions. We demonstrated that direct incubations of MC-LA, MC-YR, and MC-LR with peritoneal recruited neutrophils induce secretion of CINC-2αβ (Kujbida et al., 2008).

Neutrophil recruitment into inflamed tissues is initially dependent upon its interaction with the vessel endothelium of the microcirculatory network, subsequent transmigration into the extravascular space, and direct locomotion to the site of inflammation (Kelly et al., 2007). Herein, topical application of MC-LR induced rolling of neutrophils to postcapillary venules of the mesentery, and these cells were able to adhere to the vessel wall. Hernández et al. (2000) previously suggested that MC-LR activates and induces the adherence of human neutrophils to an inert membrane. Together, these results suggest that MC-LR induces neutrophil-endothelial interactions by promoting, at least in part, expression of neutrophil adhesion molecules. In fact, incubation of MC-LR with neutrophils evoked the synthesis and expression of both L-selectin and β2-integrin. Interestingly, these effects were only induced by MC-LR toxin.

The ability of MCs to evoke secretion of chemokines and MC-LR to induce synthesis of adhesion molecules, suggest potential effects of MCs on mRNA transcription proteins related to inflammatory events. The effect of MCs on activation of NF-kappaB and activator protein 1 (AP-1) may be important areas for further investigation, as these transcriptional factor mediates the synthesis of chemokines and adhesion molecules (Nanji et al., 1999; Tergaonkar, 2006). Actually, Wei et al. (2008) have recently showed that MC-LR induces a time dependent increase in AP-1 activity in liver of mice, via c-Jun-N terminal protein kinase.

Using the Boyden chamber model, we demonstrated that toxins are chemoattractants for neutrophils and previous incubation of neutrophils with MCs enhanced their direct migration in response to an inflammatory agent. Therefore, it is clear that MCs *per se* activate intracellular mechanisms responsible for oriented locomotion and prime neutrophils to respond to another chemoattractant.

In accordance with other data presented in this paper, actions on neutrophil chemotaxis suggests that MCs interact with membrane components or penetrate into a cell, activating, in both cases, intracellular routes responsible for pro-inflammatory actions. How MCs enter the cell or trigger intracellular activation pathways is not well-established. MC-LR was shown to enter hepatocytes and cross the blood brain barrier through organic anion transporting polypeptides (OATPs) (Fischer et al., 2005, Lu et al., 2008), that comprise a family of transporters exhibiting broad distribution and a range of substrates and display an important role in drug disposition and toxicity (Evers and Chu, 2008). The expression of OATPs by neutrophils has not been demonstrated, and only recently has OATP mRNA expression been demonstrated in human peripheral blood leukocytes (Huber et al., 2007).

Two models of the intracellular activity of MC-LR in hepatocytes have been proposed. The first is related to specific inhibition of serine/threonine protein phosphatases (PP1 and PP2A), which results in disruption of many cellular processes and alteration of cytoskeletal structures (MacKintosh et al., 1990, Ding et al., 2001; Toivola and Eriksson, 1999). Via OATP transport, MC enters hepatocytes (Erikkson et al., 1990) and can bind covalently to PP1 and PP2A, inhibiting their activity. The second mechanism proposes that the ability of MCs to produce large amounts of reactive oxygen species (ROS) in the liver causes severe oxidative stress, which contributes to the apoptosis of hepatocytes and, consequently, to liver damage (Bouaicha et al., 2004; Ding et al., 2001, Weng et al., 2007, Zegura et al., 2006).

Here we show that Ca_i^{2+} may be a mechanism by which MCs modulate neutrophil activity. The three toxins studied increased intracellular Ca^{2+} levels with different kinetic profiles, indicating that MCs acts via distinct pathways of neutrophil

activation. The response evoked by MC-LR was delayed, but was more intense and sustained in comparison to that induced by MC-YR and MC-LA. In accordance with these data, the role of Ca_i^{2+} in MC toxicity has already been shown. Ca_i^{2+} released from mitochondria after oxidative stress induced by MC-LR and activation of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase has been implicated in MC-induced hepatocyte apoptosis (Fladmark et al., 1999; Ding and Ong, 2003). The source of Ca_i^{2+} and its real participation in the neutrophil migration pathways requires further investigation.

Together, the results described herein show that the three MCs studied induce inflammation and act as chemotactic agents for neutrophils, an important mechanism associated with toxicity. Therefore, a better understanding of the mechanisms by which MCs affect neutrophils may provide novel approaches for therapeutic intervention in response to severe MC-induced acute toxicity.

Acknowledgements

This research was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

Alonso, A., Bayon, Y., Crespo, M.S., 1996. The expression of cytokineinduced neutrophil chemoattractants (CINC-1 and CINC-2) in rat peritoneal macrophages is triggered by Fc gamma receptor activation: study of the signaling mechanism. Eur. J. Immunol. 26 (9), 2165-2171.

Azevedo, S.M.F.O., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brasil. Toxicology 181, 441-446.

Babior, B.M., 2000. Phagocytes and Oxidative Stress. Am. J. Med. 109, 33-44.

Benson, J.M., Hutt, J.A., Rein, K., Boggs, S.E., Barr, E.B., Fleming, L.E., 2005. The toxicity of microcystin LR in mice following 7 days of inhalation exposure. Toxicon 45, 691-698.

Bochner, B.S., 2004. Adhesion molecules as therapeutic targets. Immunol. Allergy Clin. North Am. 24 (4), 615-630.

Bouaicha, N., Maatouk, I., 2004. Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. Toxicol. Lett. 148, 53-63.

Boyden, S., 1962. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. J. Exp. Med. 15, 453-466.

Carmichael, W.W., Azevedo, S.M.F.O., An, J.S., Molica, R.J.R., Jochimsen, E.M., Lau, S., Rinehart, K.L., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., 2001. Human Fatalities from

Cyanobacteria: Chemical and Biological Evidence for Cyanotoxins. Environ. Health Persp. 109, 663-681.

Carvalho, M., Benjamim, C., Santos, F., Ferreira, S., Cunha, F., 2005. Effect of mast cells depletion on the failure of neutrophil migration during sepsis. Eur. J. Pharmacol. 525 (issues 1-3), 161-169.

Chorus, I. and Bartram, J., 2003. Toxic Cyanobacteria in Water – A guide to their public health consequences, monitoring and management. Spon Press, London.

Costa, M.M.T.M., Oliveira, S.H.P., Gomes-Filho, J.E., 2008. Mechanism of calcium hydroxide–induced neutrophil migration into air-pouch cavity. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 105, 814-821.

Dahlen, S.E., Bjork, J., Hedqvist, P., Arfors, K.E., Hammarstrom, S., Lindgren, J.A., Samuelsson, B., 1981. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. Proc. Natl Acad. Sci. USA 78 (6), 3887-3891.

Dahm, L.J., Schultze, A.E., Roth, R.A., 1991. An antibody to neutrophils attenuates alpha-naphthylisothiocyanate-induced liver injury. J. Pharmacol. Exp. Ther. 256, 412-420.

Dawson, R.M., 1998. The toxicology of microcystins. Toxicon 36 (7), 953-962.

Ding, W., Ong, C.N., 2003. Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity FEMS Microbiol. Lett. 220, 1-7.

Ding, W., Shen, H., Ong, C., 2001. Critical role of ROS formation in microcystin-induced cytoskeletal disruption in primary cultured hepatocytes. J. Toxicol. Environ. Health 64, 507-519.

Eriksson, J.E., Gronberg, L., Nygard, S., Slotte, J.P., Meriluoto, J.A.O., 1990. Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. Biochim. Biophys. Acta 1025, 60-66.

Evers, R., Chu, X., 2008. Role of the Murine Organic Anion-Transporting Polypeptide 1b2 (Oatp1b2) in Drug Disposition and Hepatotoxicity. Mol. Pharmacol. 74, 309-311.

Fischer, W.J., Altheimer, S., Cattori, V., Meier, P.J., Dietrich, D.R., Hagenbuch, B., 2005. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. Toxicol. Appl. Pharmacol. 203, 257-263.

Fladmark, K.E., Brustugun, O.T., Hovland, R., Boe, R., Gjertsen, B.T., Zhivotovsky, B., Doskeland, S.O., 1999. Ultrarapid caspase-3 dependent apoptosis induction by serine/threonine phosphatase inhibitors. Cell Death Dier. 6, 1099-1108.

Freire, M.G.M., Desouza, I.A., Silva, A.C.M., Macedo, M.L.R., Lima, M.S., Tamashiro, W.M.S.C., Antunes, E., Marangoni, S., 2003. Inflammatory responses induced in mice by lectin from Talisia esculenta seeds. Toxicon 42, 275-280.

Granger, D.N., Kubes, P., 1994. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. J. Leukoc. Biol. 55, 662-675.

Hernández, M., Macia, M., Padilha, C., Campo, F.F.D., 2000. Modulation of human polymorphonuclear leukocyte adherence by cyanopeptide toxins. Environ. Res. 84, 64-68.

Huber, R.D., Gao, B., Pfändler, M.-A.S., Zhang-Fu, W., Leuthold, S., Hagenbuch, B., Folkers, G., Meier, P.J., Stieger, B., 2007. Characterization of two splice variants of human organic anion transporting polypeptide 3A1 isolated from human brain. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 292, 795-806.

Jochimsen, E.M., Carmichael, W.W., An, J.S., Cardo, D.M., Cookson, S.T., Holmes, C.E.M., Antunes, M.B.C., Melo-Filho, D.A., Lyra, T.M., Barreto, V.S.T., Azevedo, S.M.F.O., Jarvis, W.R., 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a haemodialysis center in Brazil. New Engl. J. Med. 33, 873–878.

Kay, R.R., Langridge, P., Traynor, D., Hoeller, O., 2008. Changing directions in the study of chemotaxis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9, 455-463.

Kelly, M., Hwang, J.M., Kubes, P., 2007. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. J. Allergy Clin. Immunol. 120, 3-10.

Kobayashi, Y., 2008. The role of chemokines in neutrophil biology. Front. Biosci. 13, 2400-2407.

Kujbida, P., Hatanaka, E., Campa, A., Colepicolo, P., Pinto, E., 2006. Effects of microcystins on human polymorphonuclear leukocytes. Biochem. Bioph. Res. Comm. 341, 273-277.

Kujbida, P., Hatanaka, E., Campa, A., Curi, R., Farsky, S.H.P., Pinto, E., 2008. Analysis of chemokines and reactive oxygen species formation by rat and human neutrophils induced by microcystin-LA, -YR and –LR. Toxicon 51 (7), 1274-1280.

Lawson, J.A., Burns, A.R., Farhood, A., Bajt, M.L., Collins, R.G., Smith, C. W., Jaeschke, H., 2000. Pathophysiologic importance of E- and L-Selectin for neutrophil-induced liver injury during endotoxemia in mice. Hepatology 32, 990-998.

Lu, H., Choudhuri, S., Ogura, K., Csanaky, I.L., Lei, X., Cheng, X., Song, P., Klaassen, C.D., 2008. Characterization of organic anion transporting polypeptide 1b2-null mice: essential role in hepatic uptake/toxicity of phalloidin and microcystin-LR. Toxicol. Sci. 103 (1), 35-45.

Mackintosh, C., Beattie, K.A., Klmpp, S., Cohen, P., Codd, G.A., 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. 264 (2), 187-192.

Maurer, M., von Stebut, E., 2004. Macrophage inflammatory protein-1. The Int. J. Biochem. Cell Biol. 36, 1882-1886.

Mayadas, T.N., Cullere, X., 2005. Neutrophil β2-integrins: moderators of life or death decisions. TRENDS Immunol. 26 (7), 388-395.

Nanji, A.A., Jokelainen, K., Rahemtulla, A., Miao, L., Fogt, F., Matsumoto, H., Tahan, S.R., Su. G.L., 1999. Activation of nuclear factor kappa B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. Hepatology 30, 934-943.

Niggli, V., 2003. Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. Int. J. Biochem. Cell Biol. 35, 1619-1638.

Patel, K.D., Cuvelier, S.L., Wiehler, S., 2002. Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. Semin. Immunol. 14, 73-81.

Pouria, S., De 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., 1998. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. Lancet 352 (9121), 21-26.

Prossnitz, E.R., Ye, R.D., 1997. The N-formyl peptide receptor: a model for the study of chemoattractant receptor structure and function. Pharmacol. Ther. 74 (1), 73-102.

Sedgwick, A.D. and Lees, P., 1986 (a). Comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. Agents Actions 18 (3-4), 439-446.

Sedgwick, A.D. and Lees, P., 1986 (b). Studies of eicosanoid production in the air pouch model of synovial inflammation. Agents Actions 18, 429-438.

Shibata, F., Konishi, K., Nakagawa, H., 2000. Identification of a common receptor for three types of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINCs). Cytokine 12 (9), 1368-1373.

Sin,Y.M., Sedgwick, A.D., Chea, E.P., Willoughby, D.A., 1986. Mast cells in newly formed lining tissue during acute inflammation: a six day air pouch model in the mouse. Ann. Rheum. Dis. 45 (10), 873-877.

Soares, R.M., Cagido, V.R., Ferraro, R.B., Meyer-Fernandes, J.R., Rocco, P.R.M., Zin, W.A., Azevedo, S.M.F.O., 2007. Effects of microcystin-LR on mouse lungs. Toxicon 50, 330-338.

Steeber, D.A., Tedder, T.F., 2000. Adhesion molecule cascades direct lymphocyte recirculation and leukocyte migration during inflammation. Immunol. Res. 22 (2–3), 299-317.

Steeber, D.A., Venturini, G.M., Tedder, T.F., 2005. A new twist to the leukocyte adhesion cascade: intimate cooperation is key. Trends Immunol. 26 (1), 9-12.

Tergaonkar, V., 2006. NFkappaB pathway: A good signaling paradigm and therapeutic target. Int. J. Biochem. Cell Biol. 38, 1647-1653.

Toivola, D.M., Eriksson, J.E., 1999. Toxins affecting cell signaling and alteration of cytoskeletal structure. Toxicol. in vitro 13, 521-530.

Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Watanabe, M.F., Park, H.D., Chen, G.C., Chen, G., Yu, S.Z., 1996. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. Carcinogenesis 17 (6), 1317-1321.

US EPA, 2006. Toxicological Reviews of Cyanobacterial Toxins: Microcystins LR, RR, YR and LA (External Review Draft). US Environmental Protection Agency, Washington, DC EPA/600/R-06/139.

Van Apeldoorn, M.E., Van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A., Bakker, G.J.I., 2007. Toxins of cyanobacteria. Mol. Nutr. Food Res. 51, 7-60.

Watanabe, K., Konish, K., Fujioka, M., Kinoshita, S., Nakagawa, H., 1989. The neutrophil chemoattractant produced by the rat kidney epithelioid cell line NRK-52E is a protein related to the KC/gro protein. J. Biol. Chem. 264, 19559-19563.

Wei, Y., Weng, D., Li, F., Zou, X., Young, D.O., Ji, J., Shen, P., 2008. Involvement of JNK regulation in oxidative stress-mediated murine liver injury by microcystin-LR. Apoptosis 13, 1031-1042.

Weng, D., Lu, Y., Wei, Y., Liu, Y., Shen, P., 2007. The role of ROS in microcystin-LR-induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice. Toxicology 232, 15-23.

Wuyts, A., Proost, P., Lenaerts, J.P., Ben-Baruch, A., Van Damme, J., Wang, J.M., 1998. Differential usage of the CXC chemokine receptors 1 and 2 by interleukin-8, granulocyte chemotactic protein-2 and epithelial-cell-derived neutrophil attractant-78. Eur. J. Biochem. 255 (1), 67-73.

Yoshida, H., Miura, S., Kishikawa, H., Hirokawa, M., Nakamizo, H., Nakatsumi, R.C., Suzuki, H., Saito, H., Ishii, H., 2001. Fatty acids enhance GRO/CINC-1 and interleukin-6 production in rat intestinal epithelial cells. J. Nutr. 131 (11), 2943-2950.

Zegura, B., Lah, T.T., Filipic M., 2006. Alteration of intracellular GSH levels and its role in microcystin-LR-induced DNA damage in human hepatoma HepG2 cells. Mutat. Res. 611, 25-33.

Zigmond, S.H., Hirsch, J.G., 1973. Leukocyte locomotion and chemotaxis: new method for evaluation and demonstration of cell-derived chemotactic factor. J. Exp. Med. 137, 387-410.

Figures legends:

Figure 1: General molecular structure of microcystins. Specific amino acid residues (R_1 and R_2) determine different microcystin variants: LA (R_1 = leucine and R_2 = alanine), YR (R_1 = tyrosine and R_2 = arginine), and LR (R_1 = leucine and R_2 = arginine).

Figure 2: Neutrophil influx into the rat air pouch cavity 4 h after injection of vehicle (PBS), fMLP (10 nM), MC-LA, MC-YR, or MC-LR (1,000 nM). Values are presented as the mean ± SE of five animals per group. * P< 0.05 between the control and MC-treatments, as indicated by ANOVA, with the Student–Newman–Keuls multiple comparison test.

Figure 3: CINC-2αβ and MIP-2 released into the rat air pouch cavity 4 h after injection of vehicle (PBS), MC-LA, MC-YR, or MC-LR (1000 nM). CINC-2αβ (A) and MIP-2 (B) were quantified by ELISA. The values are presented as the mean ± SE of five animals per group. * P< 0.05, **P<0.01 between the control and MC-treatments as indicated by ANOVA, with the Student–Newman–Keuls multiple comparison test.

Figure 4: Number of rolling (A) and adhered (B) leukocytes in postcapillary venules (20-30 µm diameter) of the mesentery of rats exposed to vehicle (PBS), MC-LA, MC-YR, or MC-LR (1000 nM). Results were obtained by intravital microscopy 10 min after topical application of MC-LA, MC-YR, or MC-LR or vehicle. Values are presented as the mean ± SE of five animals per group. * P< 0.05, **P<0.001 between the vehicle and MC-treatments as indicated by ANOVA, with the Student–Newman–Keuls multiple comparison test.

Figure 5: Effect of vehicle (PBS)-, fMLP-, MC-LA-, MC-YR-, or MC-LR-treatments on the expression of adhesion molecules in neutrophils. Expression of L-selectin (A) and β2-integrin (B) were analyzed by flow cytometry. The assays were carried

out in neutrophils isolated from the abdominal aorta blood of adult rats. Cells (1.0 x 10^6) were incubated with MC-LA, MC-YR, MC-LR (1000 nM), or fMLP (10 nM) for 4 hours. Values are presented as the mean ± SE of four animals per group. * P< 0.05, **P<0.001 between the vehicle and fMLP-, MC-LA-, MC-YR- or MC-LR-treatments, as indicated by ANOVA, with the Student–Newman–Keuls multiple comparison test.

Figure 6: Effects of vehicle (PBS)-, fMLP-, MC-LA-, MC-YR-, or MC-LR-treatments on the gene expression of adhesion molecules in neutrophils. RT-PCR was carried out using neutrophils isolated from the abdominal aorta blood of adult rats. Cells (1.0 x 10^6) were incubated with MC-LA, MC-YR, MC-LR (1000 nM), or fMLP (10 nM) for 4 hours. Images represent agarose gel electrophoresis of total mRNA, GAPDH; L-selectina (A), and β2-integrin (B). Values are presented as the mean ± SE of four animals per group. *P< 0.05, **P<0.01 between the vehicle- and fMLP-, MC-LA-, MC-YR- or MC-LR-treatments, as indicated by ANOVA, with the Student–Newman–Keuls multiple comparison test.

Figure 7: Chemotactic responses (micropore filter system) of neutrophils to vehicle (HBSS), fMLP (10 nM), MC-LA, MC-YR, or MC-LR (1, 100 and 1000 nM). Neutrophils (1.5 x 10^6 cells) were placed in the top compartment of the chamber and allowed to migrate for 60 min. Values are presented as the mean ± SE of four animals per group. *P<0.01, **P<0.001 between fMLP, (A) MC-LA, (B) MC-YR, or (C) MC-LR and vehicle as indicated by ANOVA, with the Student–Newman–Keuls multiple comparison test.

Figure 8. Vehicle- **(—□—)**, MC-LA- **(—●—)**, MC-YR- (—▲—) or MC-LR- (—⬟—) induced increases in intracellular Ca^{2+} levels. Neutrophils were incubated with 1 mM Fluo-3 AM for 45 min at room temperature. Cells were washed and suspended at 4 x 10^6 cells/mL in Krebs-HEPES buffer. The cell suspension (35 µL) was plated in glass microwell dishes, and the intracellular Ca^{2+} level was analyzed using a laser scanning confocal microscope. The change in 506/536 nm was

monitored. The inserts represent the mean ± SE of the integrated fluorescence emission of neutrophils in the presence of MC-LA, MC-YR, or MC-LR. * P<0.001, between the vehicle and MC-LA-, MC-YR- or MC-LR-treatments, as indicated by ANOVA, with the Student–Newman–Keuls multiple comparison test.

Figure 1

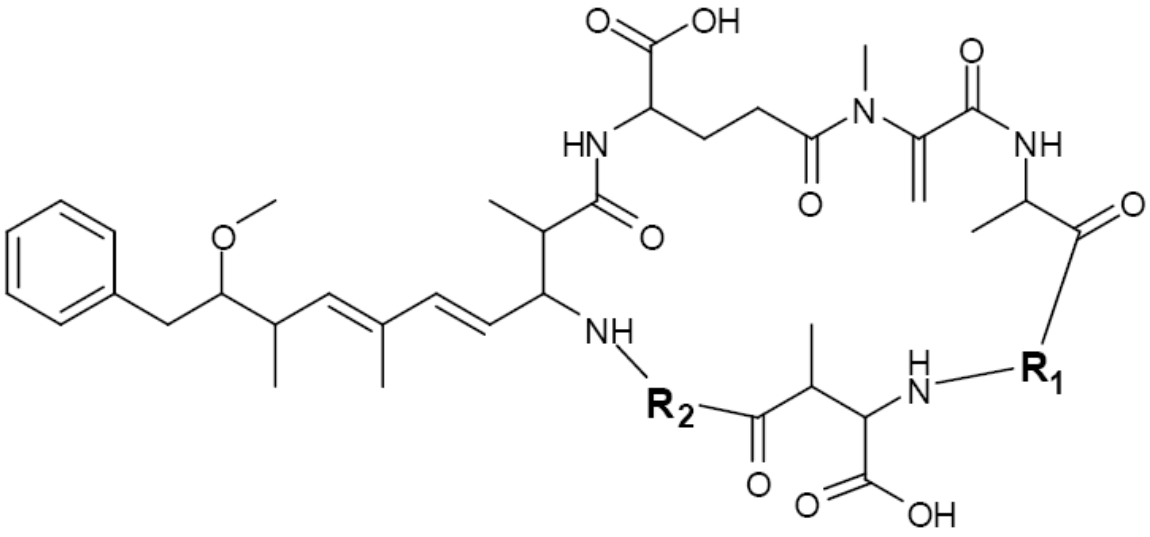


Figure 2

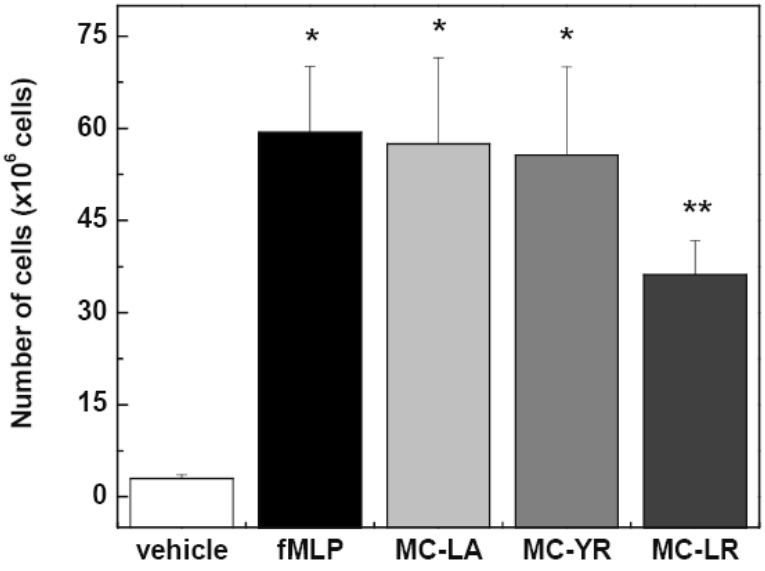


Figure 3

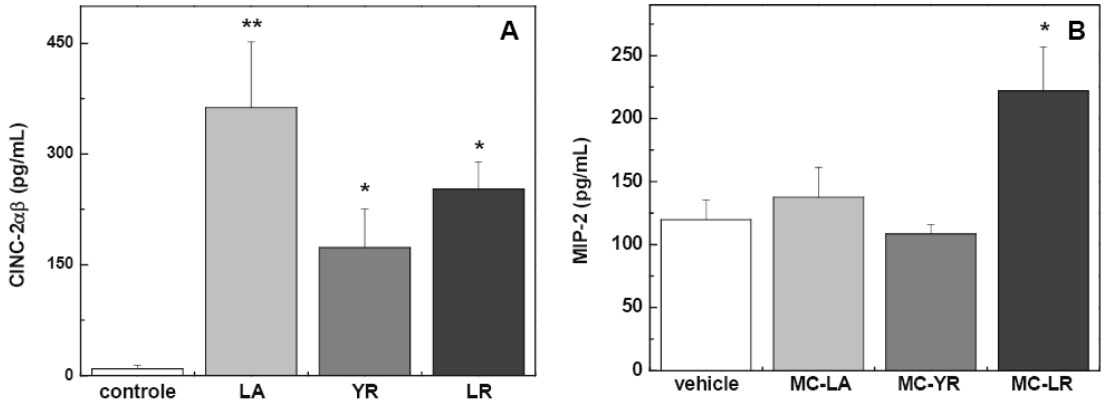


Figure 4

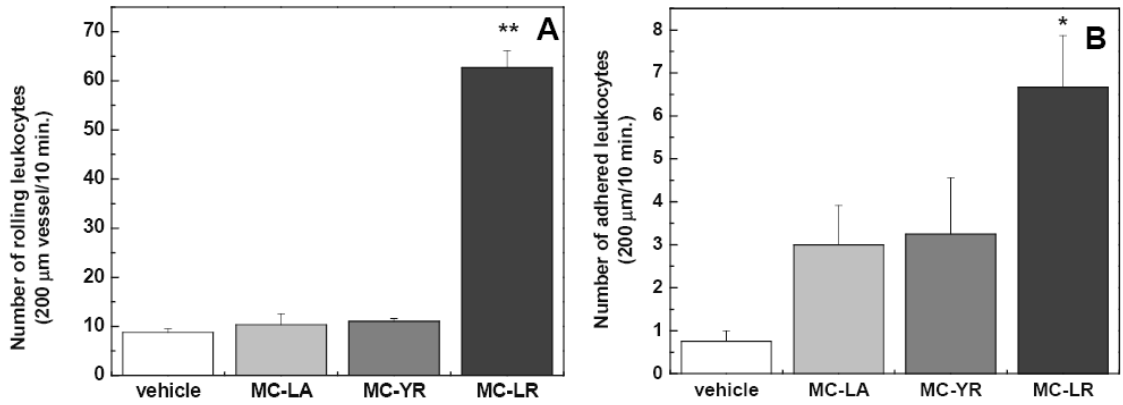


Figure 5

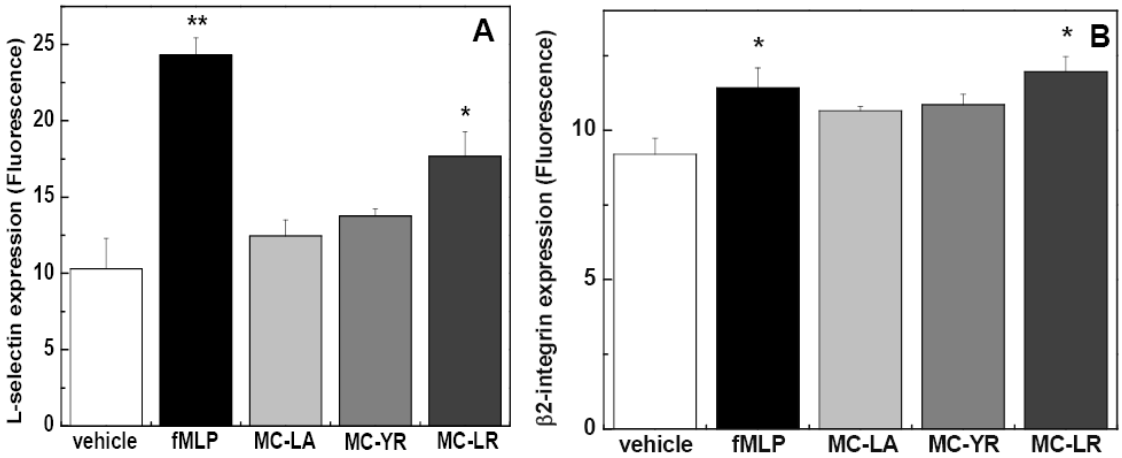


Figure 6

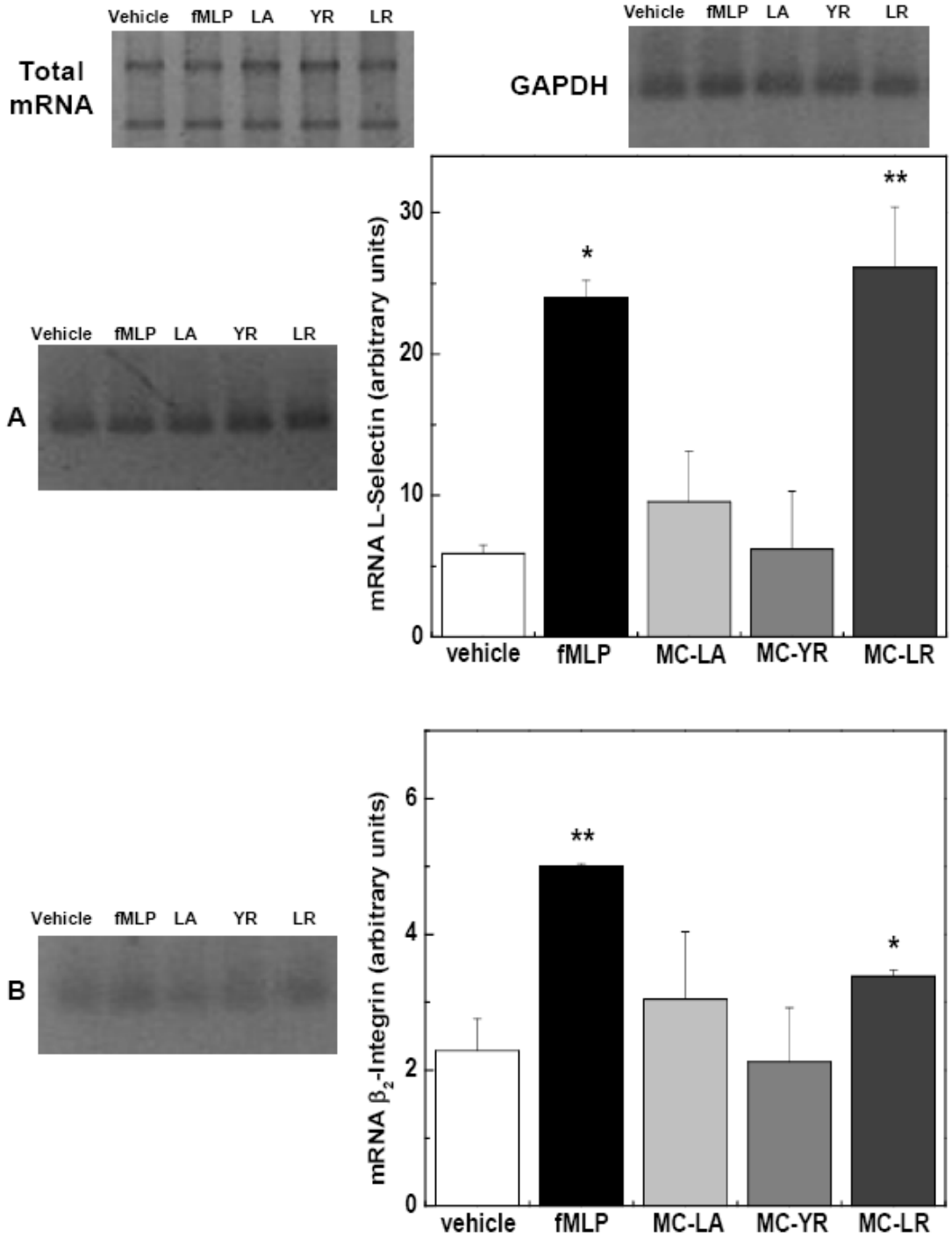

Vehicle fMLP LA YR LR
Total mRNA
Vehicle fMLP LA YR LR
GAPDH
Vehicle fMLP LA YR LR
A
mRNA L-Selectin (arbitrary units)
0
10
20
30
*
**
vehicle
fMLP
MC-LA
MC-YR
MC-LR
Vehicle fMLP LA YR LR
B
mRNA β2-Integrin (arbitrary units)
0
2
4
6
**
*
vehicle
fMLP
MC-LA
MC-YR
MC-LR

Figure 7

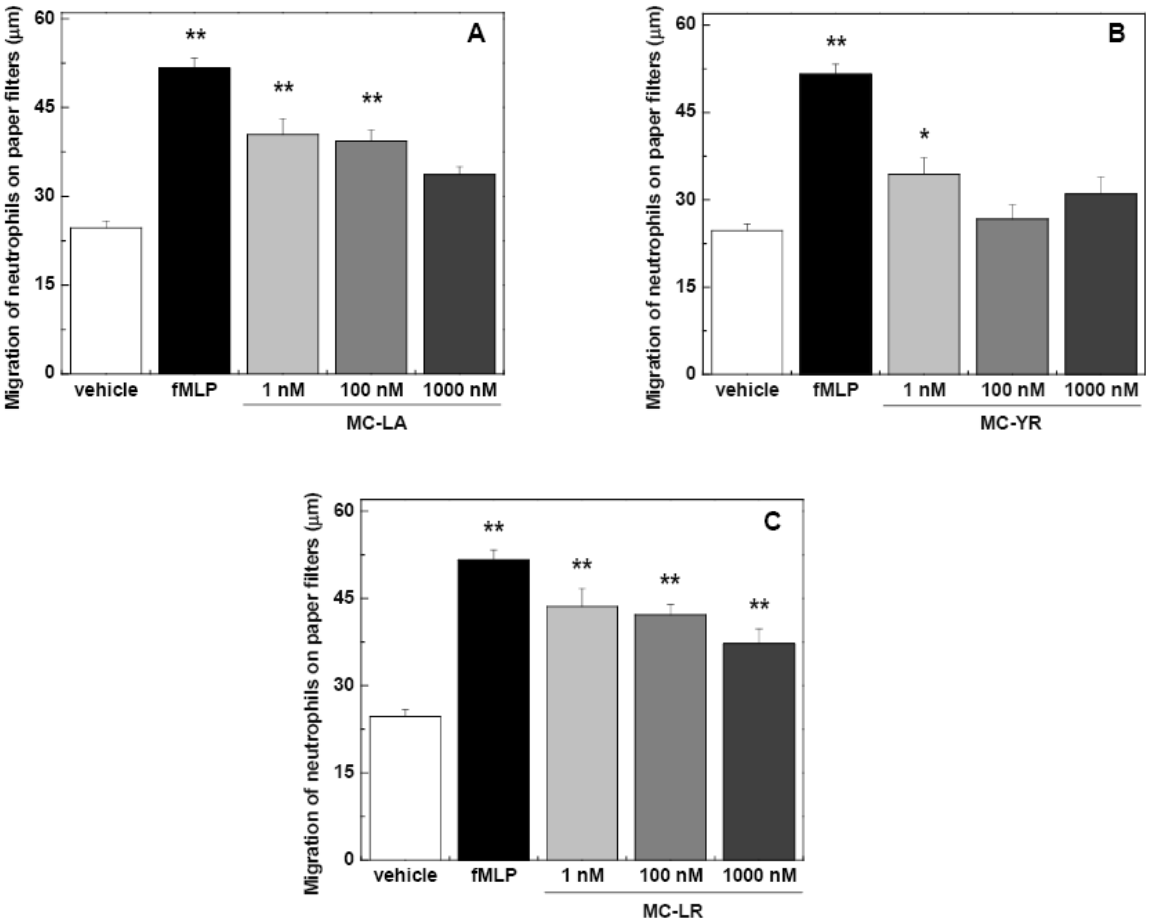

A
B
C
Migration of neutrophils on paper filters (µm)
0
15
30
45
60
vehicle
fMLP
1 nM
100 nM
1000 nM
MC-LA
MC-YR
MC-LR
**
*

Figure 8

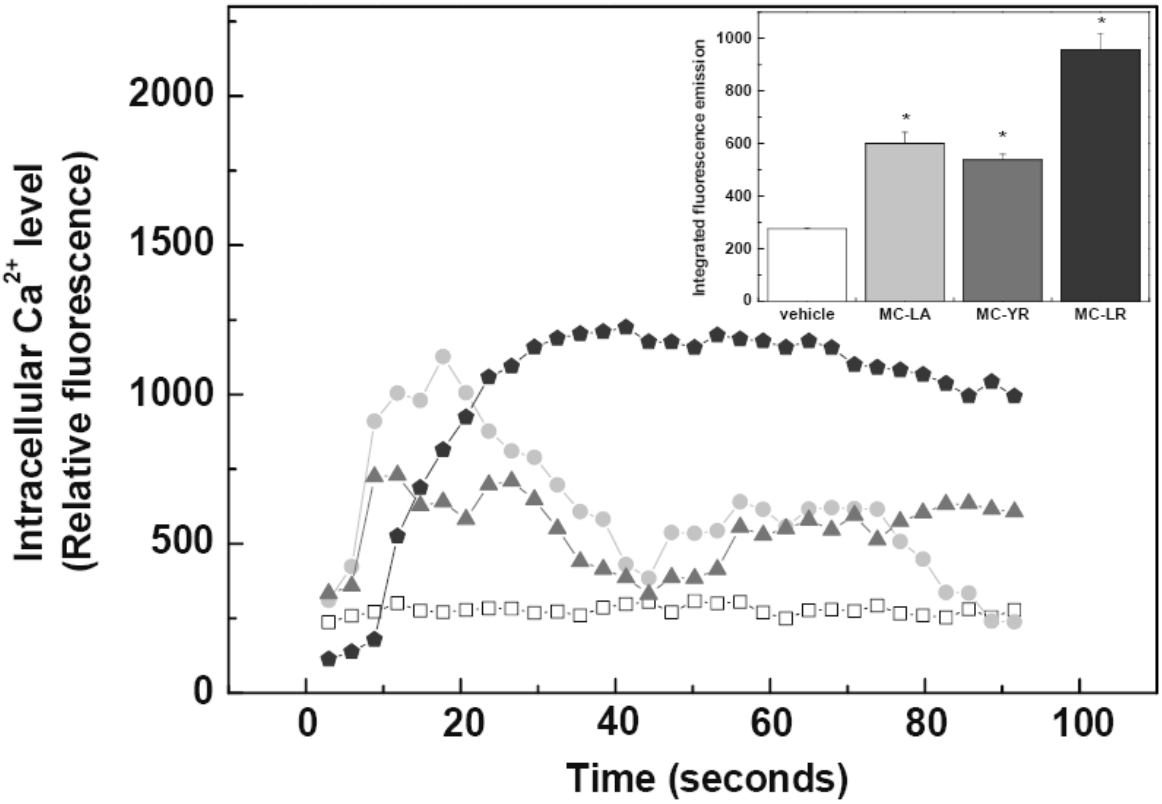

Intracellular Ca2+ level
(Relative fluorescence)
2000
1500
1000
500
0
0
20
40
60
80
100
Time (seconds)
Integrated fluorescence emission
1000
800
600
400
200
0
vehicle
MC-LA
MC-YR
MC-LR
*
*
*

Table 1

Table 1: Chemotactic responses (micropore filter system) of neutrophils to fMLP (10 nM).

Cells pre-incubated with:	Concentration of MC (nM)	Migration of neutrophil on paper filter (µm) in response fMLP (mean ± SE)
HBSS	0	51.60 ± 1.705 **
MC-LA	1	64.25 ± 4.505 *
	100	77.50 ± 4.667 **
	1000	68.25 ± 4.092 *
MC-YR	1	68.00 ± 3.022 *
	100	80.25 ± 4.666 **
	1000	74.00 ± 6.341 **
MC-LR	1	76.75 ± 4.549 **
	100	84.75 ± 4.552 **
	1000	79.75 ± 2.844 **

The values are presented as mean ± SE of four animals per group *P<0.01, **P<0.001 for comparison between vehicle (HBSS)- and MC-LA-, MC-YR- or MC-LR-treatments in response fMLP, as indicated by ANOVA with Student–Newman–Keuls multiple comparison test.

Saxitoxins accumulation in freshwater fish (*Oreochromis niloticus*) for human consumption.

Elsevier Editorial System(tm) for Toxicon
Manuscript Draft

Manuscript Number: TOXCON-S-09-00027

Title: Saxitoxins accumulation in freshwater fish (Oreochromis niloticus) for human consumption

Article Type: Short Communication

Section/Category:

Keywords: freshwater; aquaculture; saxitoxin; fish; accumulation; tilapia; LC-ESI-MS; HPLC-FD; depuration process.

Corresponding Author: Dr Paula Kujbida, Ph.D.

Corresponding Author's Institution:

First Author: Juliana A Galvão

Order of Authors: Juliana A Galvão; Marilia Oetterer; Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira; Selma Gouvêia-Barros; Susann Hiller; Katrin Erler; Bernd Luckas; Ernani Pinto; Paula Kujbida, Ph.D.

9.7 ANEXO VII: Certificado do estágio realizado na Universität Jena, Co-orientador estrangeiro: Prof. Dr. Bernd Luckas (CAPES-DAAD-PROBAL - Processo BEX 2243/07-5).

seit 1558

Friedrich-Schiller-Universität Jena

Friedrich-Schiller-Universität Jena · Postfach · D-07740 Jena

Biologisch-Pharmazeutische Fakultät

Institut für
Ernährungswissenschaften
Lehrstuhl Lebensmittelchemie

Univ.-Prof.
Dr. Bernd Luckas

Dornburger Straße 25
D-07743 Jena

Telefon: + 49 [0] 3641·94 96 50
Telefax: + 49 [0] 3641 94 96 52

E-Mail: Bernd.Luckas@uni-jena.de
www.uni-jena.de/biologie/ieu/lc

To whom
it may concern

Jena, 31st of December 2007

CERTIFICATE

Paula da Silva Kujbida, born 1976-07-24, citizen of Brazil and PhD-student at the Department of Clinics and Toxicological Analyses, FCF-USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 BI 13B 05508-900, São Paulo, Brazil, was as guest researcher at the Department of Food Chemistry of the Institute for Nutrition, Friedrich Schiller University of Jena during four months (September - December 2007). Some parts of the laboratory work she has also carried out at the Department of Nutritional Toxicology of the Institute for Nutrition.

During her stay in Germany, Paula da Silva Kujbida was involved in a research project on investigation and monitoring of cyanobacterial toxins present in German and Brazilian water supplies and lakes. This project is based on the personnel exchange programme between Brazil-Germany (Programme: CAPES/PROBRAL-Proc. BEX2243/07-5). She planned and carried out together with my PhD-student Susann Hiller laboratory experiments to investigate the occurrence of toxic compounds related to cyanobacterial blooms in water reservoirs and fish. It is essential to determine these toxic substances in order to evaluate the risk for human health.

In Germany Paula da Silva Kujbida has developed extraction, isolation and determination of microcystins, cylindrospermopsin, PSP toxins (STX, NEO, GTX1, GTX2, GTX3, GTX4, and dcSTX), and possible structural variants of those cyanobacterial toxins by application of LC-MS/MS technique in water, fish and prawn samples of German and Brazil provenience.

I was very encouraged to have Paula da Silva Kujbida in my research group. She has a positive vibrancy, was hard working and very interested in his research. She was able in a relatively short time to write an article concerning the accumulation of paralytic shellfish poisoning toxins in tilapia under freshwater aquaculture. She is very skilled and engaged in theoretical discussions as well as in field and laboratory situations.

Prof. Dr. habil. Bernd Luckas
Head of the Dept. of Food Chemistry
Director of the Institute for Nutrition

O estágio realizado foi vinculado ao projeto baseado no intercâmbio de estudantes e pesquisadores entre Brasil e Alemanha do programa CAPES/PROBRAL, que tem como título: Investigação e monitoramento de hepatotoxinas produzidas por cianobactérias em reservatórios de água e lagos na Alemanha e Brasil.

Os coordenadores envolvidos (Prof. Dr. Ernani Pinto no Brasil e Prof. Dr. Luckas na Alemanha) já desenvolvem colaboração no tema mencionado e possuem um acordo formal entre a Universidade de Jena e Universidade de São Paulo, assinado pelos reitores das instituições, para o intercâmbio de estudantes e pesquisadores.

A bolsa de doutorado da FAPESP (Processo 04/10348-5) foi interrompida e o estágio foi proporcionado finaceiramente pela CAPES-DAAD-PROBAL (Processo BEX 2243/07-5) no período de 1 de setembro a 31 de dezembro de 2007.

Considerando o plano de atividades proposto nesse projeto, foram realizados:

- estágio de 4 meses no Departamento de Química de Alimentos da Universidade de Jena, na Alemanha, para analisar amostras coletadas no Brasil com a possível presença de toxinas;
- análises das amostras (tecidos de peixes e água de reservatórios) por LC-MS/MS para detectar e quantificar microcistinas (MC-LR, -RR, -LA, -LF, -LW e -YR), nodularina (NOD), anatoxina-a (ANA), cilindrospermopsinas (CYN e doCYN) e saxitoxinas (STXs) e seus análogos (NEO, GTX1, GTX2, GTX3, GTX4, and dcSTX);
- análise dos dados para preparo de um artigo científico.

Além da infra-estrutura viável para o desenvolvimento de métodos analíticos de extração e isolamento de cianotoxinas, essa instituição tem uma ampla eficiência (comprovada na literatura) em determinação de cianotoxinas a partir de amostras ambientais, como água e tecidos de peixes. A adaptação ao novo ambiente foi muito fácil, visto que os pesquisadores e funcionários da Universidade de Jena estão acostumados em receber pesquisadores de vários países, para estágios ou simples visitas. O orientador estrangeiro também foi muito acessível quando solicitado.

Nossos resultados indicaram que tilápias podem acumular neurotoxinas, em aquacultura de dulcícola durante episódios de florações de cianobactéria. Portanto, o monitoramento de peixes de água doce deveria ser considerado uma importante questão no controle de qualidade.