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

Microcistinas produzidas pela cianobactéria *Microcystis*
panniformis e alguns efeitos sobre funções de neutrófilos
humanos

Paula da Silva Kujbida

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Ernani Pinto

São Paulo
2005

18196

DEDALUS - Acervo - CQ

30100010962

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

K96m Kujbida, Paula da Silva
Microcistinas produzidas pela cianobactéria *Microcystis*
panniformis e alguns efeitos sobre funções de neutrófilos
humanos / Paula da Silva Kujbida. -- São Paulo, 2005.
89p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Pinto, Ernani

1. Toxicologia ambiental 2. Cromatografia líquida de alta
eficiência : Análise : Toxicologia 3. Imunotoxicologia I. T.
II. Pinto, Ernani, orientador.

615.9 CDD

Paula da Silva Kujbida

Microcistinas produzidas pela cianobactéria *Microcystis panniformis* e alguns efeitos sobre funções de neutrófilos humanos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Ernani Pinto
orientador/presidente

Marcelo Paes de Barros
1º. examinador

Anna Paula de Melo Loreiro
2º. examinador

São Paulo, 02 agosto de 2005.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Relatório de Defesa

Relatório de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Paula da Silva Kujbida no Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 2 dias do mês de agosto de 2005, no(a) Auditório - Bloco 13A realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Paula da Silva Kujbida, apresentada para a obtenção do título de Mestre em Toxicologia e Análises Toxicológicas, intitulada:

"Microcistinas produzidas pela cianobactéria 'Microcystis panniformis' e alguns efeitos sobre funções de neutrófilos humanos"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Emani Pinto Junior	Presidente	FCF	APROVADA
Ana Paula de Melo Loureiro	Titular	FCF	APROVADA
Marcelo Paes de Barros	Titular	Docente Externo	APROVADA
Resultado Final: <i>APROVADA</i>			
Parecer da Comissão Julgadora			

Eu, Maria Jose da Silva _____, Técnico Acadêmico, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 2 dias do mês de agosto de 2005.

Ana Paula de Melo Loureiro

Marcelo Paes de Barros

Emani Pinto Junior
Orientador(a)

Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Nos termos do artigo 110, do RG-USP, encaminhe-se o presente relatório à CPG, para homologação.

Impresso em: 02/08/2005

“...Depois de algum tempo você aprende a diferença, a sutil diferença entre dar a mão e acorrentar a alma. E começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança. Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. Descobre que as pessoas com quem mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa, por isso sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas, pode ser a última vez que as vejamos. Descobre que se leva muito tempo para tornar-se a pessoa que se quer ser, e que o tempo é curto. Aprende que não importa aonde já chegou, mas onde está indo. Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as consequências. Aprende que paciência requer muita prática. Descobre que algumas vezes a pessoa que você espera que o chute quando você cai é uma das poucas que o ajuda a levantar-se. Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas, do que com quantos anos você já celebrou. Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha. Aprende que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens. Aprende que o mundo não pára para que você o conserte. Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás. Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar...Que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode não se pode mais. E que realmente a vida tem valor. E que você tem valor diante da vida...”

William Shakespeare

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Francisco e Edite,
por deles ter recebido o Dom mais precioso do universo: a vida.*

Já por isso, seria infinitamente grata, mas eles não se contentaram em apresentar-me apenas com ela. Revestiram minha existência de amor, carinho e dedicação. Cultivaram na criança todos os valores que a transformaram num adulto responsável e consciente. Abriram as portas do meu futuro, iluminando meu caminho com a luz mais brilhante que puderam encontrar: o estudo. Trabalharam dobrado, sacrificando seus sonhos em favor dos meus; não foram apenas meus pais, mas amigos e companheiros, mesmo nas horas em que meus ideais pareciam distantes e inatingíveis e o estudo um fardo pesado demais...

*Procurei sofregamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar, que palavras
difícilmente traduziriam, e só encontrei quem permitiu mais esta vitória em minha vida:*

DEUS.

*Dedico também ao Cláudio,
meu eterno namorado,
uma pessoa muito especial, um presente do Senhor pra minha vida,
por todo o amor, apoio e companheirismo em todos os momentos,
me incentivando sempre, e com muito carinho.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de dividir o que conquistei com pessoas muito especiais que confiaram, investiram e acreditaram em mim. Deram-me esperança e asas para voar. E assim agradecer imensamente todos que tive o privilégio de conviver durante este período...

*Ao meu orientador **Ernani Pinto**, responsável pelo meu crescimento profissional e pelas minhas conquistas. Agradeço a confiança, o apoio, as oportunidades proporcionadas e a amizade. Nesta convivência muitas sementes foram espalhadas e muitos frutos ainda serão colhidos. Ser sua primeira aluna foi gratificante.*

Obrigada por tudo!!!

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Ao professor **Pio Colepicolo**, exemplo de luta e generosidade, pelo constante incentivo, apoio e amizade. Agradeço por ter me acolhido em seu laboratório, dando-me possibilidade de realizar grande parte desse trabalho. Além do uso de aparelhos, reagentes e materiais em geral, tive a oportunidade de conviver com sua bela equipe: Sarinha, Ká, Van, Aninha, Tereza, Dri, Maísa, Sandrinha, Ed, Thaís, Angela, Anderson, Moacir, Marcelo e suas alunas (Camila, Chrislaine e Aline). Toda esta turminha esteve muito presente durante esses quase 2 anos, seja na colaboração para realização de experimentos, no Congresso em Salvador, na troca de experiências, nos seminários quinzenais do grupo (e nos deliciosos almoços também...) e, é claro, nas festas do Pio. Em especial, agradeço à Karina que com muita paciência me ajudou na utilização de vários aparelhos, principalmente do HPLC.

À professora **Ana Campa**, exemplo de dedicação ao ensino e pesquisa, por tudo aquilo que tem me ensinado, pela confiança e pelas oportunidades que me proporcionou. Agradeço também a alegre convivência e amizade de suas alunas: Elaine, Flávia, Silvana, Sueli, Rita, Sabrina, Cristiane, Flavinha e Alziana. Em especial, agradeço à Elaine, pela quase co-orientação e ajuda nos momentos difíceis, regada sempre pela amizade.

À professora **Primavera Borelli**, pela disponibilização de seu laboratório para realização de alguns ensaios, e principalmente, pelos seus ensinamentos constantes, que muito contribuíram.

À professora **Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira**, por ter doado as amostras de cianobactérias, imprescindíveis para realização deste trabalho, além de ter me acolhido, com carinho e confiança no seu laboratório na ESALQ, em Piracicaba. Agradeço também à suas alunas Ariadne, Bruna, Talita e Selma por toda a ajuda e amizade.

À professora **Ohara**, por ter permitido que eu “estreiasse” o seu analisador de NO. Agradeço também aos componentes do seu grupo de pesquisa, especialmente à Edlaine, pela contribuição, amizade e carinho.

À **CETESB**, pela valiosa experiência que a mim proporcionou, ao ter me dado a oportunidade de participar de uma coleta de cianobactérias na Represa Billings.

Aos **secretários** Jorge, Sueli, Márcia, Dora, Ana e Elaine pela ajuda inestimável, pois as dúvidas burocráticas eram muitas, e eles estavam sempre prontos a ajudar.

Aos companheiros do **Departamento de Toxicologia**: às professoras Regina Lúcia, Elizabeth Nascimento, Sandra Farsky, Sílvia Berlanga e Ana Paula Loureiro; aos *funcionários* Karla, Dalva, Luzia, Roseli, Ângelo e Helena; aos *coleguinhas*: Renata, Danizinha, Dani, Zé, Fabriciano, Virgínia, Thiago, Cristina, Patrícia, Sandrinha, Emerson, Alexandre, Higor, Carol, Marise, Luciane, Ana Paula e Cláudia Esteban; à *turminha do LAT*: Carmen, Maurício, Daniela e Mônica; e também aos *outros “púilos” do professor Ernani*: Humberto, Vania, Meron, Fabiana, Danielle e Sydnei; pelos inúmeros auxílios prestados e companheirismo. Haverá sempre uma doce lembrança das dificuldades, lutas, bons e alegres momentos que passamos juntos.

Às amigas de república **Amandinha**, **Maísa** e **Sarinha**, irmãs “mineirinhas” que a vida me deu, e por isso tão valiosas... Obrigada pela amizade fiel e companhia em todos os momentos.

Também ao meu **irmãozinho Juninho**, companheiro e amigo, por sempre vibrar com as minhas vitórias.

E à **toda minha família**, tias, tios, primas e primos pelas orações, apoio, amizade e doce convívio.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 CIANOBACTÉRIAS.....	1
1.2 EUTROFIZAÇÃO E CIANOTOXINAS.....	1
1.3 MICROCISTINAS.....	4
1.3.1 Estrutura química.....	4
1.3.2 Métodos de análise.....	5
1.3.3 Toxicocinética.....	7
1.3.4 Toxicodinâmica.....	8
1.3.5 Toxicidade.....	9
1.3.6 Riscos à saúde pública.....	10
1.3.7 Diretrizes para MC-LR.....	12
1.3.8 Processos de remoção e eliminação.....	13
1.4 NEUTRÓFILOS E INFLAMAÇÃO.....	14
1.4.1 Migração.....	17
1.4.2 "Burst" oxidativo.....	18
1.4.3 Fagocitose e atividade microbica.....	22
1.5 INFLUÊNCIA DAS MICROCISTINAS NO SISTEMA IMUNE.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 MATERIAL.....	26
3.1.1 Reagentes.....	26
3.1.1 Equipamentos.....	26
3.2 MÉTODOS.....	27
3.2.1 Coleta e cultivo das microalgas.....	27
3.2.2 Caracterização química das toxinas.....	27
3.2.3 Estudo da produção de microcistinas.....	28
3.2.4 Isolamento de neutrófilos.....	30
3.2.5 Teste de viabilidade celular.....	31
3.2.6 Estudo do efeito da MC-LR e [Asp ³]-MC-LR na migração de neutrófilos humanos.....	32
3.2.7 Estudo do efeito da MC-LR e [Asp ³]-MC-LR sobre o "burst" respiratório de neutrófilos humanos.....	32
3.2.7.1 Ensaio de quimioluminescência.....	32
3.2.7.2 Redução do citocromo C.....	33
3.2.7.3 Determinação de óxido nítrico.....	34
3.2.7.3.1 Cultura de neutrófilos.....	34
3.2.7.3.2 Quantificação de óxido nítrico.....	34
3.2.8 Estudo do efeito da MC-LR e [Asp ³]-MC-LR sobre a fagocitose e a atividade microbica de neutrófilos humanos.....	35
3.2.8.1 Avaliação da fagocitose.....	36
3.2.8.2 Avaliação da atividade microbica.....	36
3.2.9 Análise estatística dos dados.....	37

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MC POR ESI - EM/EM.....	38
4.2 AVALIAÇÃO DOS PERÍODOS DO DIA DE MAIOR PRODUÇÃO DAS MC.....	43
4.3 EFEITO DA MC-LR E [ASP ³]-MC-LR NA VIABILIDADE CELULAR DE NEUTRÓFILOS HUMANOS.....	45
4.4 EFEITO DA MC-LR E [ASP ³]-MC-LR NA QUIMIOTAXIA, NO "BURST" RESPIRATÓRIO, NA FAGOCITOSE E NA ATIVIDADE MICROBICIDA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS.....	46
4.4.1 Resultados do efeito da MC-LR e [ASP ³]-MC-LR na quimiotaxia de neutrófilos humanos.....	46
4.4.2 Resultados do efeito da MC-LR e [ASP ³]-MC-LR no "burst" respiratório de neutrófilos humanos.....	48
4.4.3 Resultados do efeito da MC-LR e [ASP ³]-MC-LR na fagocitose e na atividade microbida de neutrófilos humanos.....	50
4.4.4 Discussão.....	52
5. CONCLUSÃO.....	58
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ANEXOS.....	78
ANEXO I: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA FCF-USP.....	78
ANEXO II: TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS INFORMAÇÃO.....	79
ANEXO III: TRABALHO PUBLICADO NO PERÍODO.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN: acetonitrila

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

C:C: claro:claro

C:E: claro:escuro

CI₅₀: concentração necessária para 50% de inibição

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CMA: concentração máxima aceitável

DAD: detector de arranjo de diodos

DL: dose letal

DMSO: dimetil sulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EM: espectrometria de massas

ERO: espécies reativas do oxigênio

ERN: espécies reativas de nitrogênio

ESI: ionização por electrospray

ETA: estação de tratamento de água (s)

fMLP: N-formilo-metionilo-leucilo de fenilalanina

G-CSF: fator estimulador de colônia de granulócitos

GM-CSF: fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos

HRP: peroxidase de raiz forte

IDT: ingestão diária tolerável

IL-1: interleucina 1

IL-1 β : interleucina 1 beta

IL-8: interleucina 8

INF- γ : interferon gama

iNOS: óxido nítrico sintase induzida

i.p.: intra-peritoneal

IP₃: inositol trifosfato

i.v.: intra-venoso

LPS: lipopolissacarídeo

Luminol: 5- amino- 2,3- dihidro- 1,4- ftalazina

MC: microcistina (s)

MeOH: metanol

MS: Ministério da Saúde

MTT: 3-(4,5-dimetiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromida

NaCl: cloreto de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

NO: óxido nítrico

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: tampão fosfato salina

PBMC: células mononucleares periféricas sangüíneas

p.c.: peso corpóreo

PKC: proteína quinase C

PMA: acetato de forbol miristato

PMN: polimorfonuclear (es)

PP1: proteína fosfatase 1

PP2A: proteína fosfatase 2A

SHM: “Shunt” hexose monofosfato

SOD: superóxido dismutase

T_h: T helper

TNF: fator de necrose tumoral

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

TNF- β : fator de necrose tumoral beta

URL: unidade relativa de luz

v.o.: via oral

RESUMO

A proliferação acelerada de cianobactérias do gênero *Microcystis* em mananciais e reservatórios tem causado sérios danos ecológicos e à saúde pública, e é um problema que desafia as instituições responsáveis pelo fornecimento de água para a população. Essas cianobactérias produzem microcistinas (MC), heptapeptídeos cíclicos hepatotóxicos e que podem causar câncer. Neste trabalho, isolamos (CLAE preparativa) e identificamos (ESI-EM/EM) as microcistinas MC-LR e [Asp³]-MC-LR produzidas pela cianobactéria *Microcystis panniformis*. As concentrações dessas substâncias foram determinadas por CLAE e variaram de 0,25 a 2,75 (MC-LR) e 0,08 a 0,75 ([Asp³]-MC-LR) fmol. célula⁻¹. Analisamos as concentrações destes compostos em tempos diferentes durante o ciclo claro:escuro (C:E) e foi encontrado que a quantidade de MC por célula é pelo menos três vezes mais alta durante a fase clara do que a fase escura. Isto pode ser associado ao relógio biológico, pois as cianobactérias expressam um robusto ritmo circadiano no controle do mecanismo de tempo que é independente do ciclo de divisão celular. O mesmo ocorreu no ciclo claro:claro (C:C).

Também estudamos os efeitos da MC-LR e [Asp³]-MC-LR sobre as funções de neutrófilos humanos *in vitro*. Essas substâncias têm capacidade quimiotática, uma vez que observamos um aumento de migração de neutrófilos, além de ativarem a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a fagocitose. Já a atividade microbicida é ativada somente pela MC-LR. Nossos resultados indicam que concentrações menores do que o limite máximo de exposição a MC-LR (1 µg.L⁻¹), sugerido pela OMS, exercem efeito sobre funções de neutrófilos humanos *in vitro*, podendo contribuir com a toxicidade dessas MC.

ABSTRACT.

Cyanobacterial blooms of the genus *Microcystis* in water reservoirs have caused serious ecological and public health concern due to their ability to produce toxins. *Microcystis* and some other cyanobacterial species biosynthesize microcystins (MC). These cyanotoxins are hepatotoxic cyclic heptapeptides which can induce tumor promotion. In this study, MC-LR and [Asp³]-MC-LR were isolated (by preparative HPLC) and identified (by ESI-MS/MS) in the strain *Microcystis panniformis* BCCUSP100. Their levels were determined by HPLC and ranged from 0.25-2.75 and 0.08-0.75 fmols. cell⁻¹, respectively. The levels of MC-LR and [Asp³]-MC-LR were analyzed at different times during the light:dark (L:D) and light:light (L:L) cycles. It was found that the levels of MC per cell were at least three-fold as high during the day-phase than during the night-phase (L:D experiment). This may be associated to the biological clock since prokaryotic cyanobacteria express robust circadian (daily) rhythms under the control of a timing mechanism that is independent of the cell division cycle. Our findings also showed the same pattern under L:L cycle.

The effects of MC-LR and [Asp³]-MC-LR in some human neutrophil functions were also studied by *in vitro* assays. We observed that MC have chemotactic capacity as well as can generate reactive oxygen species and increase phagocytosis activity. The killing activity was activated only by MC-LR. Our results indicated that lower concentrations of MC-LR than the one recommended by World Health Organization (1 µg.L⁻¹) may affect human neutrophil functions *in vitro*. These findings can contribute to the elucidation of MC toxicity as well as its effects in human neutrophils.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias são microrganismos procariotos, de origem extremamente remota. São tradicionalmente chamadas de “algas azuis”, por serem organismos fotossintetizantes, aquáticos e possuírem um pigmento azulado (ficocianina). Apesar da distante relação filogenética com outros grupos de plantas aquáticas, são denominadas de “algas”. Acredita-se que as cianobactérias foram as responsáveis pelo início da formação da atmosfera atual, rica em oxigênio, e pela evolução de todos os organismos fotossintetizantes, visto que formas relacionadas às atuais cianobactérias, provavelmente, originaram os cloroplastos através de eventos endossimbióticos. As cianobactérias são predominantes no fitoplâncton de águas continentais, alcançando uma ampla diversidade de formas, em razão das adaptações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas adquiridas durante sua longa história evolutiva. Algumas cianobactérias produzem toxinas que podem prejudicar a saúde ou matar os organismos que as ingerem. Esta provavelmente foi a razão da seleção evolutiva dessas algas (LEE, 1991).

1.2 EUTROFIZAÇÃO E CIANOTOXINAS

A poluição presente nas bacias hidrográficas, decorrente de fontes antropogênicas, tem restringido a qualidade e, conseqüentemente, a utilização das águas para o abastecimento das populações humanas, ocasionando sérios problemas à saúde pública e ao meio ambiente. Um dos eventos ocorrentes nos ecossistemas aquáticos é a floração de cianobactérias, que é um processo mais comumente associado a cargas poluidoras, principalmente formadas por compostos polifosfatados e nitrogenados (WETZEL, 1993).

A eutrofização de cursos d'água (rios, lagos ou represas) é o processo que resulta num aumento de nutrientes essenciais para o fitoplâncton (algas) e plantas aquáticas superiores, principalmente nitrogênio, fósforo, potássio,

carbono e ferro. Como desencadeadores da eutrofização natural podem-se citar os nutrientes trazidos pelas chuvas e águas superficiais, que erodem e lavam a superfície terrestre. No entanto, a atividade antropogênica promove a chamada eutrofização artificial, também chamada de eutrofização acelerada ou antrópica. À medida que o tempo passa, esses nutrientes se acumulam dentro da bacia hidrográfica, e então há um desenvolvimento cada vez maior das populações de fitoplâncton, observando-se com frequência o aparecimento de florações algais ("blooms") (CARVALHO, 2004).

As florações de cianobactérias podem causar gosto e odor desagradáveis na água, além de alterar o equilíbrio ecológico do ecossistema aquático. Outro problema, entretanto, está no fato de algumas cianofíceas serem produtoras de toxinas (cianotoxinas) extremamente potentes, atingindo um conjunto de organismos muito além daqueles presentes nas comunidades aquáticas. As cianotoxinas podem ser acumuladas na rede trófica, ocasionando diferentes sintomas de intoxicação e efeitos crônicos, muitas vezes difíceis de serem diagnosticados. Mortandade de peixes e animais silvestres e domésticos já foi registrada em diversas partes do mundo (ZAGATO *et al.*, 1997).

Os gêneros *Microcystis*, *Cylindrospermopsis*, *Anabaena*, *Alphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Nodularina* e *Planktothrix* são alguns exemplos de cianobactérias que formam florações onde há a liberação de toxina através da lise celular. As características gerais das toxinas produzidas por essas cianobactérias estão mencionadas na tabela 1 (Codd *et al.*, 1995; BOUAÏCHA *et al.*, 1998; CHORUS *et al.*, 2003).

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

Toxinas	Estrutura molecular	Nº de variantes	Fontes	Modo de toxicidade	LD ₅₀ (µg. kg ⁻¹ p.c.) via i.p. (camundongo)
Anatoxina-a	Alcalóide com amina secundária	1	<i>Anabaena</i>	Neurotóxica, despolizador, bloqueador de junção neuromuscular	375
Anatoxina-a (s)	Éster-metil-fosfato de guanidina	1	<i>Anabaena</i>	Neurotóxico, inibidor de colinesterase	20
Cilindroespermopsina	Alcalóides	2	<i>Alphanizomenon</i> <i>Cylindrospermopsis</i>	Hepatotóxico, Inibidor de síntese proteica	2.10 ⁻³
LPS	lipopolissacarídeos	>3	<i>Microcystis</i> , <i>Oscillatoria</i>	Choque tóxico, gastroenterites, inflamação	Não definida
Microcistina	Heptapeptídeo cíclico	>65	<i>Microcystis</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Oscillatoria</i>	Hepatotóxico, promotor de tumor, inibidor de fosfatases	50
Nodularina	Pentapeptídeo cíclico	5	<i>Nodularia</i>	Hepatotóxico, promotor de tumor, inibidor de fosfatases	50
Saxitoxina	Alcalóide	Cerca de 6	<i>Aphanizomenon</i>	Neurotóxico, bloqueador de canais de sódio	10

As cianotoxinas possuem estruturas químicas e toxicidades diferentes, e são usualmente classificadas, de acordo com seus efeitos tóxicos em animais, como: dermatotoxinas (lipopolissacarídeos), neurotoxinas (anatoxina-a, anatoxina-a(s), homo-anatoxina-a e saxitoxinas) e hepatotoxinas (microcistina (MC), nodularina e cilindroespermopsina) (Codd *et al.*, 1995).

Embora exista a hipótese de que esses peptídeos e alcalóides sejam produzidos pelas cianobactérias com função biológica de defesa (da sua predação por outros organismos), esses compostos são considerados metabólitos secundários. (CHORUS *et al.*, 2003).

1.3 MICROCISTINAS

1.3.1 Estrutura química

As microcistinas foram isoladas pela primeira vez da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria); são heptapeptídeos cíclicos (figura 1), de peso molecular em torno de 1000 Da e a seguinte estrutura geral: Ciclo (D-alanina¹ – X² – D-MeAsp³ – Z⁴ – Adda⁵ – D-glutamato⁶ – Mdha⁷), onde X e Z são L-aminoácidos variáveis, D-MeAsp é o eritro-β-metil ácido aspártico e Mdha é a N-metil-deidroalanina. O ácido Adda (3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-feril-4,6-ácido decadienóico), é a estrutura comum a todos os peptídeos cíclicos de cianobactérias (DAWSON *et al.*, 1995).

As variações na estrutura química das MC são muito comuns, sendo que cerca de 65 variantes diferentes já foram caracterizadas partindo de amostras de florações e cepas isoladas de cianobactérias. As variações são detectadas nos sete aminoácidos, mais frequentemente com a substituição dos L-aminoácidos das posições 2 e 4, e a desmetilação dos aminoácidos das posições 3 e/ou 7 (CODD *et al.*, 1995). Existe uma variação de toxicidade entre as MC, de altamente tóxica para não-tóxica, dependendo da estrutura química específica. Resultados de uma avaliação comparativa de toxicidade, entre as três mais predominantes MC em ambientes eutrofizados, mostram que a MC-LR causa mais toxicidade do que a MC-RR e MC YR (GUPTA *et al.*, 2003).

Figura 1. Estrutura química da MC-LR e massa molecular de cada peptídeo.

As MC são encontradas em vários locais do mundo, como Espanha (MORENO *et al*, 2005), Austrália (HOEGER *et al*, 2004), Japão (YOSHIDA *et al*, 2005), Finlândia (LINDHOLM *et al*, 2003), Estados Unidos (HOTTO *et al*, 2005), Brasil (Bittencourt-Oliveira, 2003), Turquia (ALBAY *et al*, 2005), Suíça (BRAUN *et al*, 2004), China (CHEN *et al*, 2005), Polônia (PAWLIK-SKOWRONSKA *et al*, 2004) e Argentina (AME *et al*, 2003). Esses compostos são produzidos principalmente pelos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Anabaenopsis* e *Hapalosiphon*. A MC-LR é mencionada como a mais freqüente em ambientes lacustres, outras MC relativamente comuns são as variantes YR, RR e LA (CHORUS *et al.*, 1995).

1.3.2 Métodos de análise

A monitorização da presença de MC em água potável é importante para a avaliação de risco à saúde e ao meio ambiente. Portanto, o desenvolvimento de métodos analíticos que promovam, simultaneamente, detecção e

identificação efetiva de diferentes cianotoxinas é altamente desejável (DELL'AVERSANO *et al.*, 2004).

Vários métodos bioquímicos e físico-químicos para determinação de MC têm sido desenvolvidos. CLAE acoplado ao detector ultravioleta ou de arranjo de diodos (DAD) é a técnica analítica mais utilizada para este fim. Porém o uso de CLAE acoplado ao espectrômetro de massas está sendo mais freqüente. Já os principais métodos bioquímicos empregados são ELISA e ensaio de inibição de proteínas fosfatases (FASTNER *et al.*, 2002).

A extração de MC com ultrassom é muito utilizada, e usualmente com diferentes solventes, por exemplo: água/ácido acético 5% (v/v); diferentes misturas de água e metanol (MeOH) ou MeOH puro (LAWTON *et al.*, 2001). Um estudo comparativo utilizando os solventes acima citados revelou que a extração de MC mais eficiente foi a realizada com MeOH 75% (FASTNER *et al.*, 1998).

Outro fato importante é que as cianobactérias são consideradas ricas em proteínas, as quais em alta concentração são um problema para análises em CLAE, porque desnaturam facilmente, inutilizando colunas cromatográficas. Assim, a extração e a purificação devem eliminar as proteínas do material a ser cromatografado (MERILUOTO, 1997). O uso de cartuchos de extração em fase sólida C₁₈, não somente concentra as amostras de MC, mas também contribui para esta desproteinização do extrato (SAITO *et al.*, 2001).

Em análises por CLAE preparativa o uso prévio de cromatografia em coluna é utilizado quando a quantidade de material algal contendo as MC é grande. Neste tipo de cromatografia, colunas de vidro são empacotadas com sílica ou C₁₈ e a corrida é realizada pela gravidade ou pressão positiva. A sílica mais amplamente utilizada é a Kieselgel 60, para separação grosseira de MC, na ordem de µg a g. Este método é pouco prático para se calcular o rendimento da extração (LAWTON *et al.*, 2001).

CLAE - fase reversa em C₁₈, é a escolha típica para separação de vários tipos de peptídeos pequenos, freqüentemente envolvendo o uso de acetonitrila

(ACN) em água como fase móvel (MERILUOTO, 1997). As fases móveis utilizadas em separações de MC seguem três categorias: eluentes com acetato de amônio (NH_4Ac) e ACN, eluentes contendo MeOH com diferentes tampões, e eluentes ácidos com misturas de ácido trifluoroacético (TFA) e ACN (SPOOF *et al.*, 2001). Sistemas de fase móvel acidificada são geralmente considerados capazes de separar mais variantes de MC do que fases móveis neutras (MERILUOTO, 1997). Foi encontrada mudança de seletividade, para separação de MC, se o eluente contendo ACN/ NH_4Ac for usado em um período de dois dias. Isto porque esta solução suporta crescimento de microrganismos, além de o $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ ser volátil (SPOOF *et al.*, 2001).

É importante garantir que as MC separadas estejam com grau de pureza elevado. Utilizando CLAE – DAD, pode-se monitorar a análise observando os espectros de absorção na faixa de comprimento de onda de 200 a 360 nm, sendo que o dieno conjugado no resíduo do Adda absorve em 238 nm, e é o principal cromóforo das MC. No entanto é aconselhável confirmar a pureza da toxina isolada utilizando mais de um método (MERILUOTO, 1997).

CLAE acoplado com EM em tandem com ionização por electrospray (ESI) é uma poderosa ferramenta nas análises de toxinas em concentrações traços (DELL'AVERSANO *et al.*, 2004). Esta técnica também promove a identificação da estrutura química da MC analisada (ORTEA *et al.*, 2004). O padrão de fragmentação para MC inclui $m/z = 135$ (produto da α -clivagem do grupo metóxido Adda) e íons "immonium" ($\text{H}_2\text{N}^+=\text{CH-R}$) dos aminoácidos constituintes, exemplo: $m/z_{\text{Ala}} = 44$, $m/z_{\text{Leu}} = 86$, $m/z_{\text{Asp}} = 88$, $m/z_{\text{Glu}} = 102$, $m/z_{\beta\text{-metilAsp}} = 102$, $m/z_{\text{Arg}} = 129$ e $m/z_{\text{Tyr}} = 136$ (MERILUOTO, 1997).

1.3.3 Toxicocinética

A exposição humana a MC pode ocorrer pelas vias: dérmica, inalatória, oral e intra-venosa (i.v). As MC têm dificuldade de atravessar membranas celulares. Após serem ingeridas, pela água ou alimentos contaminados, a MC é transportada através do íleo até a corrente sanguínea por um transportador de

ácido biliar (um sistema multi-específico de transporte de íon orgânico) presente em hepatócitos e células da parede do intestino delgado. As MC são concentradas no fígado como consequência da sua absorção nos hepatócitos (CODD *et al.*, 1999).

Após a injeção i.v. ou intra-peritonal (i.p.) de doses sub-letais de diversas MC marcadas com ^3H em camundongos e ratos, aproximadamente 70% da dose administrada foram rapidamente localizadas no fígado. A meia vida plasmática da MC-LR, após administração i.v., foi de 0,8 e 6,9 minutos para a primeira e segunda fase de eliminação, respectivamente (CHORUS *et al.*, 1995). Nesse estudo aproximadamente 9% da dose foi excretada por via urinária, e o restante foi excretado gradualmente (1% ao dia) por via fecal. Baseado no efeito protetor dos indutores de enzimas microssomais, é evidente que o fígado tem um papel importante na detoxificação das MC (CHORUS *et al.*, 1995). Os três produtos metabólicos mais encontrados em urina, fezes e frações do citosol do fígado foram: conjugados de glutathione, cisteína e um conjugado com o aminoácido Adda oxidado (KONDO *et al.*, 1996).

1.3.4 Toxicodinâmica

A MC-LR é um inibidor das proteínas fosfatases (PP) 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 PP têm um importante papel na manutenção da homeostase celular. A inibição da atividade destas enzimas é resultado de uma interação não-covalente inicial, mediada pelo Adda hidrofóbico da MC com o grupo carboxil de uma Glu_x da enzima. Uma adicional interação é a ligação covalente do α,β -carbonil insaturado do resíduo de metildeidroalanina da MC com o grupamento tiol da cisteína-273 da PP1 (Cys-266 na PP2A) por adição de Michael (DAWSON, 1998). A inibição dessas proteínas resulta em um aumento da fosforilação de proteínas-alvo, tais como proteínas supressoras de tumor, podendo conduzir para proliferação celular e processos carcinogênicos. MC são

consideradas hepatotoxinas, causando dano funcional e estrutural a hepatócitos, por hiperfosforilarem os filamentos intermediários do citoesqueleto, levando à retração e ao desarranjo dos microfilamentos de actina destas células. A disfunção celular é tão exarcebada que a estrutura de organização dos hepatócitos é rompida e sangramentos internos podem causar a morte (CHORUS *et al.*, 2003).

1.3.5 Toxicidade

Há evidências de que as MC são tóxicas agudamente para animais e humanos (AZEVEDO *et al.*, 2002; POURIA *et al.*, 1998; TAKANARA *et al.*, 1999 e BOTHA *et al.*, 2004), com DL₅₀ entre 50 (MC-LR) e 600 (MC-RR) $\mu\text{g. kg}^{-1}$ de peso corpóreo (p.c.), após injeção i.p. em camundongo (GUPTA *et al.*, 2003).

A DL₅₀, obtida por via oral (v.o.) em camundongo, administrada por gavage (5000 $\mu\text{g. kg}^{-1}$ de p.c.), é aproximadamente 100 vezes superior do que a DL₅₀ por via i.p.. Não há evidência de hidrólise de MC por peptidases estomacais, e é evidente a quantidade significativa dessas toxinas que atravessam a barreira intestinal e são absorvidas. Similarmente a DL₅₀ por v.o. de extratos de *Microcystis* em camundongo foi de 50 a 170 vezes maior que a i.p. dos mesmos extratos (CHORUS *et al.*, 2003).

Em um dos trabalhos que focava o estudo da toxicidade crônica, a MC-LR foi administrada oralmente por gavage a grupos de camundongos, sendo 15 fêmeas e 15 machos em doses de 0, 40, 200 ou 1000 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ de p.c. por dia, durante 13 semanas. A NOEL (concentração em que o efeito adverso não é observado) para toxicidade do fígado foi de 40 $\mu\text{g. kg}^{-1}$ de p.c. por dia. Na dose moderada, patologias hepáticas leves foram notadas em 1 macho e 2 fêmeas. Já na dose mais alta, todos os camundongos apresentaram alterações hepáticas, como inflamação crônica e degeneração de hepatócitos (FAWELL *et al.*, 1999).

Para avaliar a carcinogenicidade, a MC-LR foi administrada por via i.p. em camundongos, e analisou-se a indução de nódulos hepáticos. Os animais

receberam 20 $\mu\text{g. kg}^{-1}$ de p.c., 5 vezes por semana, durante 28 semanas. Na autopsia, nódulos de 5 mm de diâmetro foram observados no fígado dos camundongos expostos (ITO *et al.*, 1997). No mesmo estudo, administrações orais de MC-LR, em dose de 80 $\mu\text{g. kg}^{-1}$ de p.c., 5 vezes por semana, durante 28 semanas, não apresentaram evidência de formação de nódulos ou injúria hepática.

Embora vários estudos confirmem que a MC-LR causa hepatotoxicidade severa em mamíferos (DAWSON, 1998; CHORUS *et al.*, 2003), os seus mecanismos de genotoxicidade ainda não estão claros (ZHAN *et al.*, 2004). Extrato de cianobactérias produtoras de MC (12,5 e 125 μg células de algas liofilizadas. mL^{-1}) induziu mutações significativas, vistas pelo ensaio de Ames, embora resultados negativos tenham sido obtidos com a MC-LR pura (2,5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) (DING *et al.*, 1999 e Tsuji *et al.*, 1995 e 1997). Por outro lado, a MC-LR tem alguns efeitos genotóxicos em células de mamíferos (ZHAN *et al.*, 2004). Foi observado dano no DNA de hepatócitos de ratos *in vitro* pelo ensaio cometa (DING *et al.*, 1999) e mostrado que, *in vivo*, esta toxina pode induzir fragmentação do DNA em fígado de camundongo (RAO *et al.*, 1996), além de promover geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e subseqüentemente levar ao dano oxidativo do DNA (ZEGURA *et al.*, 2004).

1.3.6 Riscos à saúde pública

A exposição humana a MC pode ocorrer por via direta, como ingestão de água, práticas esportivas aquáticas, sessões de hemodiálise; ou por via indireta, tal como ingestão de alimentos (Codd *et al.*, 1999). O conhecimento sobre os efeitos das MC em humanos é baseado em dados epidemiológicos, mas há também relatos de intoxicações e avaliação de toxicidade realizadas em animais de laboratório, os quais apresentam sintomas similares aos descritos por humanos. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que MC causam efeitos agudos e crônicos (CHORUS *et al.*, 2003) aos humanos e até morte (JOCHIMSEN *et al.*, 1998).

Intoxicações agudas por MC ocorrem freqüentemente pela lise celular de formações de florações algais (por envelhecimento natural ou processos de tratamento de água) e conseqüentemente liberação das toxinas para a água. A inalação de células de cianobactérias secas ou água contaminada é mais perigosa do que a ingestão de água contaminada, indicando o perigo de práticas esportivas aquáticas em águas recreacionais afetadas por floração algal com produção de MC (CHORUS *et al.*, 2003).

O caso mais grave de intoxicação aguda por MC envolvendo a população humana foi a chamada “Síndrome de Caruaru”, ocorrida na cidade de Caruaru, no estado de Pernambuco, em 1996, quando 76 pacientes de uma clínica de hemodiálise foram a óbito (JOCHIMSEN *et al.*, 1998; CARMICHAEL *et al.*, 2001). Dos 131 pacientes da clínica, 116 apresentaram sintomas de intoxicação. Destes, 100 desenvolveram problemas hepáticos e 76 faleceram ao longo do estudo, que durou até outubro de 1997. Destes 76, foram analisadas 52 amostras de fígado de 39 pacientes, e todas positivas para MC (CARMICHAEL *et al.*, 2001). Este incidente aconteceu após um período de seca, o qual deixou muitas residências e instituições públicas sem água corrente tratada. Neste período, o Instituto de Doenças Renais daquela cidade recebeu e usou água de um lago com crescimento maciço de cianobactérias no preparo da solução utilizada na diálise (JOCHIMSEN *et al.*, 1998).

Embora a toxicidade aguda seja o problema mais óbvio em envenenamentos por cianobactérias, o risco a longo prazo por exposições crônicas também deve ser considerado. Como reportado anteriormente, MC-LR é um potente promotor de tumor em animais de laboratório. Desse modo, a exposição crônica a baixas doses de MC em água potável pode ser um sério problema para a saúde pública, e pode contribuir para a promoção de câncer em humanos. Alguns estudos epidemiológicos relacionam a presença de MC em água potável com um aumento de câncer primário de fígado na China (CHORUS *et al.*, 2003). A terapia para o tratamento a exposição às MC e aos danos que essas substâncias causam ao fígado é difícil e a profilaxia é

complexa. Há vários estudos experimentais sobre a atenuação de intoxicação de animais e humanos por MC. Alguns são baseados em anticorpos monoclonais contra MC-LR (MITTENBÜHLER *et al.*, 1997) e outros em bloqueadores de absorção hepática, tais como Ciclosporina A e o antibiótico rifampicina (DAWSON, 1998). Estudos mais recentes mostram que a vitamina E, um potente antioxidante lipossolúvel e utilizado como suplemento diário, pode proteger contra a toxicidade da MC-LR por exposição crônica (GEHRINGER *et al.*, 2003).

1.3.7 Diretrizes para MC-LR

O perigo da promoção de tumor por exposição crônica a MC em água potável foi a causa principal para a definição de diretrizes pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para essas toxinas. A concentração máxima permitida para consumo foi estabelecida em $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ para MC-LR, e foi baseada nos estudos feitos com animais, por administração v.o. em porcos e camundongos (CHORUS *et al.*, 2003). Para águas recreativas com florações de cianobactérias, a OMS tem estabelecido três níveis de alerta de perigo à saúde baseados na densidade de cianobactérias. Para suplementos alimentares de cianobactéria, a concentração máxima permitida é de $10 \mu\text{g. g}^{-1}$ de MC-LR (SCHAEFFER *et al.*, 1999).

No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da portaria nº 1469/00 de janeiro de 2001, passou a exigir dos órgãos competentes e responsáveis pelo tratamento e fornecimento de água, o controle de toxinas de algas (MC, cilindroespermopsinas e saxitoxinas) (ANVISA, 2001). E em 2004, o Ministério da Saúde (MS), através da portaria nº 518 de 25 de março deste ano, reformulou e revogou a portaria nº 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 potabilidade, obrigando o monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas (MS, 2004).

1.3.8 Processos de remoção e eliminação

A remoção de células de cianobactéria por métodos de filtração ou floculação é efetiva para reduzir concentrações de toxinas na água, mas somente se não houver lise celular e liberação de MC. Se as toxinas forem liberadas, outros métodos como adsorção por carvão ativo ou ozonização são necessários para eliminar efetivamente as MC dissolvidas em água potável. Por isto, métodos que levam à lise celular são desaconselháveis, e devem ser evitados em estações de tratamento de água potável. A floculação por cloreto férrico parece não causar lise de cianobactérias nem um aumento da concentração de MC dissolvidas (CHOW *et al.*, 1998).

Em ambientes naturais, as MC podem ser instáveis pela biodegradação e fotodegradação indireta. Algumas bactérias Gram-negativas, que apresentam oxidases e que possuem baixa atividade da enzima catalase, podem ser utilizadas para a eliminação e degradação de MC dissolvida (ISCHII *et al.*, 2004). Por exemplo, a bactéria *Sphingomonas sp.* pode degradar a MC-LR por meio de uma enzima denominada microcistinase. Essa enzima foi caracterizada e pertence a classe das metaloproteínas. Além disso, nessa cepa de *Sphingomonas sp.*, a microcistinase é produzida mesmo na ausência da MC-LR, o que, segundo o autor, sugere uma atividade hidrolítica em outros peptídeos (SAITO *et al.*, 2003).

As MC são facilmente decompostas pela luz UV em comprimentos de onda por volta da absorção máxima destas toxinas (238-254 nm), e esta decomposição também depende da intensidade da luz (TSUJI *et al.*, 1995). Atualmente a maioria das estações de tratamento de água (ETA) usa métodos de ozonização, filtração com carvão ativo e cloração que permitem a remoção da maioria das MC em águas superficiais (TSUJI *et al.*, 1997). A eficácia da ozonização na eliminação de MC é reduzida, pois este método aumenta a concentração de carbono orgânico total e provoca lise celular, aumentando a concentração de toxinas dissolvidas (HOEGER *et al.*, 2002). Já a filtração com carvão ativado (PENDLETON *et al.*, 2001) ou partículas naturais de argila

(MORRIS *et al.*, 2000), são eficientes na adsorção de MC em soluções aquosas.

1.4 NEUTRÓFILOS E INFLAMAÇÃO

Inflamação é definida como uma reação complexa no tecido conjuntivo vascularizado, que envolve o plasma e as células circundantes tanto nos vasos sanguíneos como as dos componentes extravasculares do tecido conjuntivo. A inflamação é dividida normalmente em dois padrões: agudo e crônico. O padrão agudo tem uma duração relativamente curta, de minutos a alguns dias, e suas principais características são a exudação de líquidos e proteínas plasmáticas e a migração de fagócitos (neutrófilos e monócitos), predominando leucócitos polimorfonucleares. A inflamação crônica, por outro lado, tem duração maior e associa-se com a presença de linfócitos e macrófagos e com a proliferação dos vasos sanguíneos e do tecido conjuntivo (COTRAN *et al.*, 1996).

Os leucócitos são responsáveis pela defesa do organismo contra infecções e são subdivididos em neutrófilos (3700 células/mm³), linfócitos (2500 células/mm³), monócitos (400 células/mm³), eosinófilos (150 células/mm³) e basófilos (30 células/mm³). As diferentes classes de linfócitos produzem anticorpos em resposta a infecções e servem como sistema imune de memória, enquanto os neutrófilos, monócitos e eosinófilos participam na resposta imune celular por engolfamento, morte e digestão dos organismos invasores. PMN e monócitos são bactericidas, enquanto os eosinófilos lidam com parasitas (HENDERSON *et al.*, 1996).

Neutrófilos e células mononucleares são produzidos na medula óssea pela hematopoiese. Os monócitos circulam no sangue periférico por aproximadamente 8 horas, migram para os tecidos e se diferenciam em macrófagos teciduais. Algumas células passam a residir em tecidos específicos, tornando-se macrófagos fixos, e outras permanecem móveis e são denominadas de macrófagos livres. Durante a resposta imune, estas células podem ser ativadas por uma variedade de estímulos e a atividade fagocítica

dessas células pode ser aumentada pela secreção de citocinas por células T_h (T helper) ativadas, pelos mediadores da resposta inflamatória e componente da parede celular bacteriana. Um dos ativadores mais potentes é o interferon-gama ($IFN-\gamma$) secretado por células T_h ativadas (GOLDSBY *et al.*, 2000).

Os eventos que levam a uma resposta inflamatória são caracterizados pelo reconhecimento do sítio de injúria por células inflamatórias, o recrutamento específico de subpopulações de leucócitos ao dano com a finalidade de tentar restabelecer a relação normal entre as matrizes parenquimal, estromal e extracelular. A regulação molecular deste complexo sistema fisiológico envolve a interação entre células da superfície, da matriz extracelular e mediadores solúveis como as quimiocinas (KEANE *et al.*, 2000).

Neutrófilos representam aproximadamente de 50 a 60% do total de leucócitos circulantes e constituem a “primeira linha de defesa” contra agentes infecciosos que penetram as barreiras físicas do corpo. Uma vez iniciada a resposta inflamatória, neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para o sítio de infecção ou injúria (SCHELEIME *et al.*, 1989). Neutrófilos são capazes de fagocitar e matar microorganismos invasores e assim exercem um papel importante na defesa do hospedeiro contra todas as classes de agentes infecciosos. Sua atividade microbicida origina-se de processos oxidativos e não-oxidativos, os quais são ativados simultaneamente após a fagocitose. Embora a destruição de agentes infecciosos ocorra no espaço intracelular há também a liberação de moléculas citotóxicas no meio extracelular e estas podem causar dano aos tecidos (HUIZINGA *et al.*, 1991 e BORREGAARD *et al.*, 1993).

Cerca de 10^{11} neutrófilos são produzidos por dia em um adulto normal, e após circularem por 7-10 horas, migram para os tecidos onde perecem em poucos dias (MOLLÍNEDO *et al.*, 1991). A sobrevivência dos neutrófilos pode ser aumentada após exposição a LPS (lipopolissacarídeos), estreptococos inativados, $IL-1\beta$ (interleucina 1 beta), $TNF-\alpha$ (fator de necrose tumoral alfa), $IL-6$ (interleucina 6), $INF-\gamma$ (interferon gama), G-CSF (fator de estimulação de colônias de granulócitos) e GM-CSF (fator estimulador de colônias de

granulócitos e macrófagos)(COLLOTA *et al.* e BRACH *et al.*, 1992). Na circulação sangüínea os neutrófilos formam uma população heterogênea, existindo subpopulações de neutrófilos em diferentes estágios de ativação, de dormentes até muito ativados. “Priming” é o mecanismo pelo qual neutrófilos dormentes adquirem um estado de pré-ativação, o qual permite uma resposta mais intensa quando em contato com um estímulo (GUTHRIE *et al.*, 1984 e ZHANG *et al.*, 1992).

Fisiologicamente, os neutrófilos podem ser encontrados em sítios extravasculares, como por exemplo, em cavidades e líquidos corporais, embora estas células possam ser recrutadas da circulação para sítios de inflamação. O evento inicial deste recrutamento é o aumento na aderência de neutrófilos ao endotélio vascular em decorrência das alterações hemodinâmicas que conduzem a migração transendotelial e hemoconcentração local. Estes eventos acontecem na dependência de estímulos lesivos, de IL-1, TNF- α e outros mediadores inflamatórios. Após estímulo, neutrófilos produzem espécies reativas de oxigênio, que são de vital importância na atividade microbicida, tumoricida, e inflamatória destas células. A atividade microbicida dos neutrófilos é dependente da ativação do sistema NADPH oxidase, que envolve a geração de espécies reativas de oxigênio e mobilização de cátions no fagossomo. Durante um processo inflamatório, citocinas interagem com receptores na superfície dos neutrófilos, interferindo na sua atividade funcional e na evolução da resposta inflamatória (MALECH *et al.*, 1987).

Após associação com receptores de membrana, partículas opsonizadas e o peptídeo sintético fMLP (N-formilo-metionilo-leucilo de fenilalanina) ativam a via de produção de ERO (ativação da proteína quinase C (PKC)). Ésteres de forbol como, por exemplo, o PMA (acetato de forbol miristato), que não atua via receptor ativa diretamente a PKC. A PKC ativada é capaz de levar ao arranjo do sistema multienzimático NADPH oxidase, através da fosforilação de seus componentes citossólicos p47^{phox} e p67^{phox} (BABIOR, 1978 e 1988).

1.4.1 Migração

Os polimorfonucleares são atraídos aos locais de inflamação por ação de fatores quimiotáticos produzidos (HIEMSTRA, 1993), acumulando-se em grande número nesses locais (COCHRANE, 1984). Os principais fatores quimiotáticos são: certos produtos bacterianos, cujo exemplo é o fMLP, um sintético análogo; C5a produzido após ativação do sistema do complemento; mediadores lipídicos como o leucotrieno B₄ e o PAF (fator ativador das plaquetas); citocinas quimiotáticas denominadas quimiocinas como as interleucinas 1 e 8 (IL 1; IL 8) (HIEMSTRA, 1993). A difusão destes fatores cria um gradiente químico, orientando a migração dos neutrófilos por um processo designado por quimiotaxia (BAGGIOLINI *et al.*, 1993).

Durante a locomoção, os neutrófilos adquirem uma forma característica assimétrica característica (SUZAKI *et al.*, 1998). A interação dos leucócitos circulantes com o endotélio vascular é o passo fundamental para o recrutamento de leucócitos para o foco de lesão. Somente na década passada, com a identificação de glicoproteínas específicas de adesão (expressas nas membranas dos leucócitos circulantes e da célula endotelial) foi possível compreender os mecanismos moleculares dos fenômenos de interação leucócito-endotélio (FARSKY *et al.*, 1995).

Figura 2: Esquema da migração de neutrófilo através do endotélio (Adaptado de FLIER *et al.*, 2002).

A expressão de moléculas de adesão é estimulada por mediadores químicos (TONNESEN, 1989). Por ser distinta nas diferentes etapas do desenvolvimento da resposta inflamatória, é responsável, pelo menos em parte, pela seletividade e cinética de migração leucocitária para o foco de lesão (CARLOS *et al.*, 1990; POBER *et al.*, 1990).

Os neutrófilos mantêm as suas funções por um período de tempo determinado, morrendo posteriormente. A sua morte pode ocorrer por um processo designado por apoptose (morte celular programada), permitindo o seu reconhecimento e a sua conseqüente retirada pelos macrófagos teciduais. É evitada, deste modo, a libertação de produtos indesejáveis potencialmente tóxicos a partir dos grânulos para o líquido extracelular (HIEMSTRA, 1993).

1.4.2 “Burst” oxidativo

A destruição de partículas fagocitadas ocorre por dois mecanismos distintos. O antígeno é destruído por agentes oxidantes liberados no processo conhecido como “burst” respiratório, e digerido por enzimas presentes nos lisossomas. As células fagocitárias possuem apenas uma enzima de membrana, NADPH oxidase, capaz de reduzir o O_2 em um ânion radical

superóxido ($O_2^{\bullet-}$) durante o "burst" respiratório. Os equivalentes redutores são fornecidos pelo NADPH (gerado através da via das pentoses-fosfato). Após estimulação membranária, como ocorre quando uma partícula adere ao fagócito, verifica-se a ativação do "burst" respiratório e da via SHM ("shunt" hexose monofosfato) como dois processos associados. (LOMGOBARDO *et al.*, 2001).

O complexo enzimático NADPH oxidase é formado por componentes que se encontram dissociados na célula em repouso. Estes componentes são a $p40^{phox}$, a $p47^{phox}$ e a $p67^{phox}$, agrupados em um complexo protéico citoplasmático de 240 kDa. Também há participação do citocromo b_{558} , composto pelas proteínas $p22^{phox}$ e $gp91^{phox}$, localizadas nas membranas das vesículas secretórias e dos grânulos específicos citoplasmáticos. Participam ainda do complexo outras duas proteínas de baixo peso molecular ligantes de nucleotídeo guanina: a Rac 2, e a Rap1a (BABIOR, 1999).

No neutrófilo ativado, ocorre a fosforilação do componente citosólico $p47^{phox}$, resultando na migração de todo o complexo para a membrana plasmática. Uma vez na membrana, o complexo associa-se ao citocromo b_{558} que migrou para a mesma através da fusão das vesículas secretórias e dos grânulos específicos. A Rac1 liga-se simultaneamente ao trifosfato de guanina (GTP) e migra para a membrana juntamente com o complexo citosólico, desencadeando assim, a ativação dos neutrófilos (Figura 3) (DAHLGREN *et al.*, 1999).

Figura 3. Acoplamento dos componentes do sistema NADPH oxidase após ativação dos neutrófilos (adaptado de DAHLGREN *et al.*, 1999).

Além do ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) produzido inicialmente, outras ERO mais reativas são geradas a partir desse precursor (Figura 4). Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é formado a partir de ânion superóxido por dismutação espontânea e/ou ação catalítica da superóxido dismutase (SOD). Ácido hipocloroso (HOCl) pode ser formado pela reação de H_2O_2 com íons cloreto (Cl^-) na presença de MPO (mieloperoxidase). Cloraminas secundárias podem ser geradas pela reação de HOCl com compostos contendo nitrogênio. Existem dois mecanismos possíveis para a produção de radical hidroxila ($^{\bullet}OH$) por neutrófilos: reação de Fenton, onde H_2O_2 reage com íons metálicos, como íons ferrosos (Fe^{2+}) ou através de reação de ácido hipocloroso (HOCl) com ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (HAMPTON *et al.*, 1998).

O oxigênio singlete (1O_2) pode ser produzido pela reação de H_2O_2 com o HOCl. A enzima óxido nítrico sintase oxida L-arginina formando L-citrulina e

óxido nítrico. O ânion superóxido reage com óxido nítrico formando peroxinitrito (ONOO^-) (BABIOR, 2000).

Figura 4. Espécies reativas produzidas por neutrófilos humanos após ativação do sistema NADPH oxidase (adaptado de HAMPTON *et al.*, 1998).

Múltiplos processos de transdução de sinal estão envolvidos no “priming”, no “burst” oxidativo de neutrófilos e na liberação de citocinas pelos mesmos. “Priming” e ativação apresentam-se como processos bioquímicos inseparáveis. Por exemplo, a atividade de neutrófilos “primados” pode ser resultado de alteração de um ou mais componentes do sistema de transdução. Isto pode incluir fluxo de cátions livres (Na^+ , K^+ e Ca^{+2}), mudanças no potencial de membrana, ativação de proteases intracelulares, mudanças no ácido araquidônico e metabolismo fosfolipídico ou fosforilação de proteínas específicas e mudanças na concentração intracelular de nucleotídeos

citossólicos. Pequenas mudanças podem iniciar o “priming” e grandes levam a ativação do “burst” oxidativo, incluindo degranulação (MCPHAIL *et al.*, 1985, THELEN *et al.*, 1993, DEWARD *et al.*, 1998).

São conhecidos dois caminhos distintos de ativação da NADPH oxidase, um Ca^{+2} dependente que leva a ativação da PKC dependente de Ca^{+2} , e o outro Ca^{+2} independente e não envolve a fosfolipase C ou proteína kinase C, ambas as vias parecem ser funcionais na ativação do “burst” oxidativo (THELEN *et al.*, 1993).

1.4.3 Fagocitose e atividade microbicida

Fagocitose é um processo que leva à ingestão de uma partícula. Este processo envolve tanto ligações de receptores quanto o subsequente engolfamento (ABRAMSON *et al.*, 1993). Os neutrófilos envolvem microrganismos opsonizados em um fagossomo que se mistura com grânulos secretórios (lisossomas) para formar fagolisossomos, onde acontecem a morte e digestão destes microrganismos. Portanto, eventos tóxicos contra o agente invasor fagocitado podem ocorrer somente quando os grânulos dos neutrófilos se fundem com o fagossomo (THOMAS *et al.*, 1988).

A fagocitose reinicia com a ligação de receptores entre o micróbio e o neutrófilo, ativando assim, na fase de ingestão, actina, miosina e proteínas ligadas à actina. Os filamentos de actina na porção do citoplasma, o qual enfatiza o sítio de envolvimento de partícula, sofre polimerização, a qual leva à deformação da membrana plasmática no sítio de contato, formando pseudópodes. Estes cercam a partícula, e um vacúolo fagocítico (fagossomo) é formado (SAWYER *et al.*, 1989). Durante esse processo, grânulos no citoplasma fundem-se com a membrana do fagossomo, e um novo fagolisossomo é produzido (ABRAMSON *et al.*, 1993).

1.5 INFLUÊNCIA DAS MICROCISTINAS NO SISTEMA IMUNE

O sistema imune possui alta probabilidade de exposição e sensibilidade a agentes tóxicos. Porém, pouco se conhece sobre o efeito direto das MC sobre respostas do sistema imune.

O efeito de um extrato de cianobactérias contendo MC sobre alguns parâmetros da função imune de camundongos foi o primeiro estudo de imunotoxicidade dessas toxinas *in vivo*, onde foi mostrada a inibição da linfoproliferação induzida por LPS e diminuição do número de células formadoras de anticorpos (SHEN *et al.*, 2003). Os mesmos pesquisadores, com o propósito de investigar o distúrbio causado pela MC-LR no sistema fagocítico, determinaram os efeitos desta toxina na geração de NO e de algumas citocinas por macrófagos de camundongos *in vitro*. Os resultados ilustraram o envolvimento de NO, iNOS (óxido nítrico sintase induzida) e de algumas citocinas, no choque causado por MC (CHEN *et al.*, 2004). Também foi investigada a produção de citocinas e apoptose em linfócitos de sangue periférico humano, os quais responderam à estimulação com MC-LR, aumentando a produção de IL-6 (LANKOFF *et al.*, 2004), que é uma citocina pró-inflamatória e responsável por efeitos alérgicos em humanos e animais (ABBAS, *et al.*, 1998).

Estudos patológicos de tecidos hepáticos, obtidos da autópsia de 16 pacientes vítimas da “Síndrome de Caruaru”, apresentaram quadro de hepatite tóxica aguda, sendo observada infiltração leucocitária, consistido predominantemente de neutrófilos (JOCHIMSEN *et al.*, 1998; POURIA *et al.*, 1998). *In vitro*, foi demonstrado que a MC-LR é capaz de aumentar significativamente a aderência inicial de PMN humanos. Foi revelado ainda que concentrações menores que a recomendada pela OMS têm capacidade de modular esta aderência celular (HERNÁNDEZ *et al.*, 2000). Aderência é um rápido e específico processo, assim como, o primeiro passo na cascata fagocítica inflamatória, e PMN é um dos principais tipos celulares envolvidos neste processo. Os três passos seqüenciais envolvidos nesta cascata são:

aderência de células fagocíticas (macrófagos e PMN) ao substrato, extravasação transendotelial dessas células, quimiotaxia em direção ao alvo, morte ou ingestão de materiais, e digestão intracelular (ABBAS *et al.*, 1998). Portanto, uma mudança no início do processo de aderência afeta os passos seguintes e, assim, o final da resposta imune.

Felizmente os efeitos agudos em humanos, causados por toxinas de cianobactérias, parecem ser raros. No entanto, muito pouco é conhecido da escala e natureza destes efeitos em longo prazo, como a indução de tumor e danos ao fígado (CHORUS *et al.*, 2003). Neste trabalho, ensaios imunotoxicológicos foram realizados com o intuito de avaliar a influência das MC sobre o sistema imune, escolhendo como célula-alvo neutrófilos humanos. Foi avaliada a toxicidade das MC, produzidas pela cianobactéria *Microcystis panniformis* Komárek *et al.* cepa BBCUSP100 (MC-LR e Asp³-MC-LR), para o sistema imune humano, estudando os efeitos destas toxinas sobre algumas funções de neutrófilos humanos *in vitro*, tais como: migração, formação de ERO, fagocitose e atividade microbicida.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é isolar e identificar as MC produzidas pela cianobactéria *Microcystis panniformis* cepa BCCUSP100, e investigar se há variação fotodependente da produção de cianotoxinas, para determinar o período de maior produção. Além disso, estudar os efeitos destas cianotoxinas sobre funções de neutrófilos humanos *in vitro*.

Objetivos específicos

- ❖ Realizar isolamento e caracterização estrutural das MC presentes em extratos brutos de *M. panniformis*;
- ❖ Avaliar os períodos do dia de maior produção de MC por esta cianobactéria;
- ❖ Avaliar a influência destas MC na quimiotaxia de neutrófilos humanos *in vitro*;
- ❖ Avaliar o efeito destas MC sobre o “burst” respiratório de neutrófilos humanos *in vitro*;
- ❖ Avaliar o efeito destas MC sobre a fagocitose e atividade microbica de neutrófilos humanos *in vitro*.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Reagentes

Solventes de grau analítico foram utilizados nos processos de extração e fracionamento em cromatografia. Para análises em HPLC, foram empregados solventes de grau cromatográfico. Todos os reagentes necessários para os ensaios foram de alto grau de pureza. Para o teste de viabilidade celular foi utilizado o kit de ensaio de viabilidade celular Vybrant[®] MTT (3-(4,5-dimetiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromida) da Molecular Probes. Os reagentes dextran, lugol, Histopaque[®] (d = 1,077 g. mL⁻¹), soro fetal bovino, EDTA, glicose, PMA, luminol (5- amino- 2,3- dihidro- 1,4- ftalazina) e MC-LR foram obtidos do Sigma Chemical Co. Da empresa Merck (Alemanha) foi usado dimetilsulfóxido (DMSO), NH₄Ac e sílica Gel Keisegel 60. Heparina foi adquirida da Roche (Suíça).

3.1.1 Equipamentos

Sistema de CLAE equipado com bombas LC-10AD, DAD SPD 10AV e controlador de sistema SCL-10Avp (Shimadzu); coluna semi-preparativa C₁₈, tipo Luna, 5 µm, 250 x 10 mm (Phenomenex); coluna analítica C₁₈, tipo Luna, 5 µm, 250 x 4,6 mm (Phenomenex); Espectrômetro de massas equipado com ionização por electrospray (Quattro Micro Waters/Micromass); SpeedVac[®] (Savant); cartucho Sep-Pak C18 (Waters); Espectrofotômetro (mod. U-2000, Hitachi) com controlador de temperatura (mod RM6, Lauda Brinkmann); fotômetro de quantum esférico (mod. LI-COR LI-250, Lincoln); vaporador rotativo (mod. 803/803^A, Fisatom); autoclave vertical (mod. 103, FABBE-PRIMA); balança analítica (mod. AG204, Mettler Toledo); banho aquecedor 37 °C com agitador orbital (mod. 102/109.089, FANEN); centrífuga de bancada (mod. IV, rotor swing, Incibrás); centrífuga refrigerada (Himac CR 20B2 Hitachi,

rotor RPR 20-2); estufa de CO₂ com controle de temperatura e pressão (mod. CNW300a, Harris); leitor de Elisa (mod. SLT, Spectra); luminômetro (mod. LB 96V, EG&G BerthorId, microplaca); microscópio óptico (mod. 81186, Nikon); pHmetro (Micronal B374); Analisador de óxido nítrico (NOA) (mod. 280, Sievers Instruments); citocentrífuga (Incibrás).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 *Coleta e cultivo das microalgas*

As espécies de cianobactérias foram doadas pela Profa. Dra. Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira, a qual mantém em seu laboratório (Laboratório de Cianobactérias – ESALQ/USP) culturas axênicas dessas classes de algas. Estas culturas são preferencialmente cultivadas em larga escala e mantidas no laboratório em temperatura ajustada para 23 ± 1 °C e a intensidade luminosa de 30 μmol fótons. m^{-2} . s^{-1} contínua, calibrada por um fotômetro de quantum. As microalgas são coletadas durante a fase exponencial de crescimento.

3.2.2 *Caracterização química das toxinas*

Uma quantidade grande de células foi cultivada a fim de se obter um rendimento adequado para a extração. Após centrifugação das culturas, na fase exponencial, as amostras foram congeladas. As MC foram extraídas (aproximadamente 3 g de amostra) com MeOH/H₂O (75:25; v,v) e submetidas ao banho de ultrassom por 30 minutos. O extrato foi centrifugado (10000 rpm, 15 min) e o sobrenadante coletado. O precipitado obtido foi re-extraído de acordo com o procedimento descrito acima. Os sobrenadantes foram misturados e concentrados em evaporador rotativo (banho a 40 °C). O material seco foi ressuspenso em 3 mL de acetato de etila e aplicado em uma coluna de sílica-gel malha 60 (20 x 5 cm). A coluna foi equilibrada com acetato de etila e a sequência de eluição foi: 30 mL de acetato de etila, 30 mL de acetato de etila /MeOH, 60 mL de MeOH e 120 mL de MeOH:H₂O (1:1; v,v). As frações foram

concentradas em evaporador rotativo (como descrito acima) e ressuspensas em 1 mL da fase móvel. As toxinas foram encontradas na última eluição. Foram realizadas várias injeções de 500 μ L desta amostra no sistema de CLAE-DAD, em coluna semi-preparativa, utilizando como fase móvel acetato de amônio 20 mM pH= 5/ACN (75:25; v,v), com razão de fluxo de 4,7 mL. min⁻¹. A detecção foi a 238 nm. A identificação dos picos de MC foi feita por comparação dos espectros de absorção obtidos com o de um padrão de MC-LR publicado em (VIEIRA *et al.*, 2003). Após as soluções de MC serem coletadas manualmente, foram secas totalmente em Speedvac® e transferidas para uma coluna C₁₈ (extração em fase sólida) de 1 cm para eliminação do tampão, o qual poderia gerar interferência na análise por espectrometria de massas (EM). Após o condicionamento desta coluna (com ACN 100% e H₂O 100%) foi adicionada a amostra (ressuspensa em 1 mL de H₂O). A eluição das toxinas foi conduzida na seguinte ordem: H₂O 100%, ACN/H₂O (1:1; v,v), ACN 100% e ACN/THF (1:1; v,v). Todas as frações foram secas totalmente em Speedvac®.

Estas frações foram ressuspensas em ACN/ácido-fórmico 0.1% (1:1, v/v), e foram introduzidas na fonte de íons por infusão direta (*probe Electrospray*) usando uma bomba de seringa integrada, fluxo de 2-10 μ L.min⁻¹. Os espectros de massas foram adquiridos em modo positivo, onde a fonte e os parâmetros analisados foram otimizados para o íon molecular protonado. Os espectros de EM/EM (varredura de íons filhos) foram adquiridos usando Ar como um gás de colisão (4 μ bar) em diferentes energias de colisão (5-60 eV). Os espectros característicos das MC foram encontrados após análise das frações ACN/H₂O (1:1; v,v) e ACN 100%.

3.2.3 Estudo da produção de microcistinas

Antes do início destes experimentos, uma pré-cultura de 150 mL foi cultivada, em incubadora, sob foto-período de 12:12 horas (C:E), a 23 $\pm$ 0,5 °C, com intensidade de luz de 75 $\pm$ 2 μ mol fótons. m⁻². s⁻¹, para obtenção de um inóculo em condição fisiológica apropriada. A intensidade de luz foi medida

usando um fotômetro de quantum localizado abaixo do frasco de cultura com o meio. A cultura (15 dias, fase exponencial de crescimento) foi dividida em amostras de 50 mL e inoculada em 3 frascos idênticos com 2,2 L de um novo meio sem aeração. A concentração celular inicial das culturas foi de $2,6 \cdot 10^4$ células. mL⁻¹, as quais foram mantidas como descrito acima. As amostras foram coletadas na metade da fase exponencial de crescimento (apresentando em média $1 \cdot 10^6$ células. mL⁻¹). Dois experimentos foram realizados:

- Ciclo claro:escuro (12 horas no claro e 12 horas no escuro): as amostras foram coletadas em intervalos de 2 horas, no volume de 50 mL para análise da concentração de MC e 1 mL para contagem celular;
- Ciclo claro:claro (24 horas com luz): o mesmo procedimento acima foi utilizado.

Em ambos os experimentos, as células cresceram como previamente descrito. Foram colocados em tubos Falcon® 50 mL de cultura, os quais foram centrifugados a 4000 rpm, por 15 minutos, a 23 °C. E 1 mL das amostras foram colocados em frasco de vidro âmbar contendo solução de lugol 4% para posterior contagem celular. Os precipitados celulares foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados à -86 °C até a realização das análises.

A densidade celular das amostras foi estimada, por meio de contagem celular, com o auxílio de um microscópio e câmara de Fuchs Rosenthal. Assim foi estabelecido o número mínimo de 400 células contadas para obter um erro de aproximadamente 10% para um nível de confiança de 95%.

As MC foram extraídas com 3 mL de MeOH/H₂O 3:1 de amostras congeladas, por volta de 10 mg, e submetidas ao banho de ultrassom por 10 min. O extrato foi centrifugado (10000 rpm, 15 min) e o sobrenadante foi evaporado pelo SpeedVac®. O precipitado foi ressuscitado em 1 mL de MeOH e injetado em um cartucho Sep-Pak C₁₈. Os passos de pré-condicionamento incluíram ativação e lavagem com MeOH (2 mL) e H₂O (2 mL) e os passos de eluição foram: (i) 1 mL de H₂O, (ii) 1 mL de MeOH/H₂O 1:1 e (iii) 1 mL de MeOH. As MC foram encontradas na última eluição. Esta fração foi

evaporada em SpeedVac[®], o precipitado ressuspensionado com 200 µL da fase móvel e analisado no sistema CLAE equipado com uma coluna C₁₈ (5 µm, 0,46 x 25 cm). A fase móvel foi NH₄AC 50 mM pH=3/ACN (3:1; v,v), em fluxo de 1 mL.min⁻¹. A detecção ocorreu em 238 nm em DAD. As curvas de calibração foram obtidas com as MC-LR e [Asp³]-MC-LR isoladas de *M. panniformis*.

3.2.4 Isolamento de neutrófilos

Neutrófilos (PMN) foram obtidos a partir de sangue periférico de doadores voluntários e coletado em heparina (10 UI. mL⁻¹ de sangue). Sangue (10 mL) foi diluído v/v com PBS Dulbecco 10 mM a pH 7,4 contendo 100mM CaCl₂, 50 mM MgCl₂ e glicose 1 mg. mL⁻¹ e cuidadosamente adicionado sobre 10mL de um gradiente comercial Ficoll-Hypaque (Histopaque^R; d= 1,077 g. mL⁻¹). 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% 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 ressuspensionado em meio de cultura. As células foram contadas em câmara de Neubauer para posterior cultura. Todos os procedimentos foram realizados utilizando reagentes e materiais livres de endotoxina.

3.2.5 Teste de viabilidade celular

Foi utilizado o kit de ensaio MTT (3-(4,5-dimetiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromida). O método implica na conversão do MTT, um pigmento amarelo e hidrossolúvel, em formazan, que é insolúvel e de cor roxa. Para esta conversão ocorrer é necessária a redução do MTT que ocorre pelo H^+ vindo do NADH de neutrófilos vivos. A quantificação de formazan foi obtida realizando a leitura das soluções obtidas em 540 nm, em um aparelho de ELISA, em uma placa transparente. A solução de neutrófilos estava na concentração de 1.10^6 células. mL^{-1} e em PBS 10 mM a pH 7.4 contendo 100 mM $CaCl_2$, 50 mM $MgCl_2$ e glicose 1 mg. mL^{-1} . As toxinas estavam nas concentrações (0,01), (0,1), (1), (10), (100), (1000) nM e diluídas em PBS.

Os ensaios foram realizados em triplicatas, tendo um controle positivo (em qual se tem certeza que o formazan foi formado), o controle negativo (sem células, para verificar se o PBS reduz o MTT), o controle-teste (para verificar se as toxinas reduzem o MTT) e os testes (para verificar se com as toxinas nas concentrações estipuladas, MC-LR e [Asp³]-MC-LR, separadamente, as células continuam viáveis para realização dos testes imunotoxicológicos).

A solução de células foi incubada, ou não, com as MC em estufa a 37 °C, com 5% de CO_2 . Após 1 hora foram adicionados 10 μL de MTT. Após 1,5 h de incubação, nas mesmas condições descritas acima, o sobrenadante foi desprezado, e ao precipitado foram adicionados 50 μL de DMSO. Após incubação por 10 minutos foi realizada a leitura a 540 nm. Para o controle-teste as MC foram incubadas na concentração de 1000 nM.

3.2.6 Estudo do efeito da MC-LR e [Asp³]-MC-LR na migração de neutrófilos humanos

Os ensaios de migração celular foram efetuados segundo FREVERT *et al.* (1998). Utilizamos placas de quimiotáxia, a qual possui múltiplas câmaras de duplos compartimentos. Nos compartimentos inferiores de cada câmara foram colocados 29 µL de fator quimiotático diluído em solução de PBS. As suspensões de neutrófilos ($2,5 \cdot 10^6$ células. mL⁻¹) foram colocadas nos compartimentos superiores, em volumes de 25 µL. Nos compartimentos inferiores foram colocados os estímulos quimiotáticos diluídos em solução de PBS. Como fator quimiotático clássico utilizamos fMLP (57 nM).

Após incubação das câmaras por 60 minutos, em atmosfera úmida à 37 °C, foi realizada a contagem do número de células que migraram para a câmara inferior, com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio.

3.2.7 Estudo do efeito da MC-LR e [Asp³]-MC-LR sobre o "burst" respiratório de neutrófilos humanos

3.2.7.1 Ensaio de quimiluminescência

O método se baseia na amplificação da quimiluminescência (QL) natural das ERO (oxigênio singlete, produtos de lipoperoxidação, dióxidos etanos). A amplificação é conseguida através da adição de luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazina) à suspensão celular e a medição da QL das células, é feita em um contador durante a fagocitose executada pelas células (o fenômeno de emissão de luz ou QL é medido em contagens por minuto). A QL está relacionada com o número de células, concentração do estímulo e atividade. A modificação deste ensaio por adição de luminol, que deve ser oxidado para emitir luz, aumenta a sensibilidade do ensaio. Uma vez que a resposta de QL representa os mecanismos bactericidas durante o "burst" respiratório, é utilizado para estudar a fagocitose. Muitas substâncias induzem uma resposta QL por parte do fagócito (LOMGOBARDO *et al.*, 2002).

Solução estoque de luminol (1,0 mM) foi obtida pela dissolução deste em água deionizada, e a adição de NaOH foi necessária para solubilização do mesmo. Esta solução foi armazenada a -20°C . Os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando uma placa branca com poços de 300 μL , e a leitura em um luminômetro com controle de temperatura (37°C). Cada poço continha 1.10^6 células. mL^{-1} (em PBS). Para o controle positivo foi utilizado PMA (16 ng/ensaio). Já as soluções-teste estavam nas concentrações (0,01), (0,1), (1), (10), (100), (1000) nM de MC-LR ou $[\text{Asp}^3]$ -MC-LR. A leitura foi realizada durante 40 minutos.

Antes de iniciar o ensaio foi conferido que as MC não reagem com o luminol, misturando: 30 μL de MC (1 μM), 30 μL de luminol (1 mM) e 270 μL de PBS (método adaptado de PUNCHARD *et al*, 1996). Como controle, ao invés de toxina foram colocados 30 μL de PBS.

3.2.7.2 Redução do citocromo C

No ensaio de redução do citocromo C, os ânions superóxido formados pela ativação celular, no meio extracelular, são detectados pela redução do citocromo C. A cinética desta redução é acompanhada por espectrofotometria, em 550 nm durante 640 segundos.

Os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando cubetas de plástico de 1 mL, e a leitura em um espectrofotômetro com controle de temperatura (37°C). Cada cubeta continha 1.10^6 células. mL^{-1} (em PBS) e citocromo C (75 μM). Para o controle positivo foi utilizado PMA (16 ng/ensaio) e para o controle negativo, nenhum ativador. Já as soluções-teste estavam nas concentrações (0,01), (0,1), (1), (10), (100), (1000) nM de MC-LR ou $[\text{Asp}^3]$ -MC-LR.

Antes de iniciar o ensaio foi conferido que estas MC não reduzem o citocromo C, misturando em uma cubeta: 100 μL de MC 1 μM , 100 μL de citocromo C (200 μM) e 800 μL de tampão fosfato (50 mM pH 7,4). Como controle, ao invés de toxina foi colocado 100 μL de PBS. Foi testado também se

as MC reagem com os ânions superóxido realizando o ensaio de xantina/xantina oxidase, misturando em uma cubeta: 870 µL da solução A (0,76 mg de xantina, 12,8 mg de citocromo C e EDTA 0,1 mM em 50 mL de tampão fosfato pH 7,4), 100 µL de MC 0,1 µM e 30 µL da solução B (35 µL de xantina oxidase e EDTA em 2,5 mL de tampão fosfato 50 mM pH 7,4). Como controle, ao invés de toxina foi colocado 100 µL de PBS. Esses métodos foram adaptados de PUNCHARD *et al*, 1996.

3.2.7.3 Determinação de óxido nítrico

3.2.7.3.1 Cultura de neutrófilos

O meio de cultura utilizado foi DME suplementado com 10% soro fetal bovino. O meio foi filtrado em 0,22 µm (Millipore-Sigma) e acondicionado em frasco de vidro previamente esterilizado. Todo o procedimento foi realizado em fluxo laminar. Neutrófilos ($2,5 \cdot 10^6$ células. mL⁻¹) foram mantidos em placas Nunc[®] de fundo chato e foram submetidos a 24 e 48 horas de cultura em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. As células foram incubadas na presença de LPS (1 µg. mL⁻¹) e MC ((0,1), (1), (10), (100), (1000) nM de MC-LR ou [Asp³]-MC-LR) ou somente com MC.

O material submetido à cultura foi recolhido e centrifugado (2500 rpm, por 10 minutos a 4 °C), e o sobrenadante livre de células, foi coletado e submetido a congelamento em tubos Eppendorfs à - 80 °C até o momento do ensaio de quantificação de NO.

3.2.7.3.2 Quantificação de óxido nítrico

O NO produzido por neutrófilos foi estimado no meio de cultura, através da quantificação dos produtos de oxidação do NO (nitrito, nitrato e nitroso composto) medidos em um analisador de NO pelo método de quimiluminescência induzida por ozônio. A amostra foi injetada na cela de purga mantida a 95° C, contendo uma solução saturada de VCl₃ em HCl 1M, a qual

converte nitrito, nitrato e nitroso composto a NO. Este NO é arrastado por um gás inerte (N₂) até a cela de análise onde reage com ozônio produzindo dióxido de nitrogênio (NO₂) em um estado eletronicamente excitado (NO₂*). Este último, quando retorna ao estado fundamental, produz quimiluminescência, quantificada em mV por uma fotomultiplicadora. A concentração (μM) de NO produzido foi obtida utilizando-se uma curva padrão construída pela injeção de concentrações-padrões de nitrato.

3.2.8 Estudo do efeito da MC-LR e [Asp³]-MC-LR sobre a fagocitose e a atividade microbicida de neutrófilos humanos

- Obtenção do soro homólogo normal

Sangue periférico de doadores saudáveis foi coletado e centrifugado (4 °C, 2500 rpm, 10 min). Foram utilizados 0,3 mL de soro (sobrenadante) para a opsonização da *Candida albicans*. O soro utilizado foi coletado no mesmo dia do experimento. Todo o procedimento foi realizado em condições assépticas, sendo o material utilizado previamente esterilizado.

- Preparo e opsonização da suspensão de *Candida albicans*

As leveduras de *C. albicans* (ATCC5374) foram obtidas após cultura de 18 horas em meio Sabouraud. Foi preparada uma suspensão de *C. albicans* (5.10⁶ células. mL⁻¹) em 2,7 mL de PBS estéril, pH 7,4. As células foram contadas em câmara de Neubauer. A seguir, foram adicionados 0,3 mL (10%) do soro previamente separado à suspensão de *C. albicans*. Essa solução foi incubada a 37 °C por 30 minutos, sob agitação.

-Ensaio

Neutrófilos humanos foram obtidos como previamente descrito, ressuspensos em meio de RPMI e mantidos em gelo até o momento do ensaio. Em tubos plásticos foram adicionados a suspensão de neutrófilos (1.10^6 células. mL^{-1}) e a suspensão de *C. albicans* (5.10^6 células. mL^{-1}), mantendo-se uma proporção de 1 neutrófilo: 5 fungos. Os tubos foram incubados a 37 °C, em sistema rotatório, a velocidade de 10 rpm, durante 10 e 15 minutos para avaliação da fagocitose e da atividade microbica. O controle da reação foi realizado com tubos contendo somente a suspensão de neutrófilos ou contendo a suspensão de *C. albicans* opsonizada. Após o término de cada incubação foi adicionado MeOH (1:1, v/v) para cessar a reação. Subseqüentemente foram preparadas lâminas, por citocentrifugação, com alíquotas de 100 μL das suspensões contendo *C. albicans* e neutrófilos. Os citocentrifugados foram imediatamente fixados e corados com May-Grunwald-Giemsa modificado por Rosenfeld (ROSENFELD, 1947). Foram realizados três ensaios em duplicatas, utilizando neutrófilos de três doadores sádios diferentes.

3.2.8.1 Avaliação da fagocitose

Para avaliação da fagocitose foram contados 200 neutrófilos, com auxílio do microscópio, sendo considerados como tendo atividade fagocítica os neutrófilos que apresentaram uma ou mais *Candida albicans* internalizadas. Os valores foram expressos em porcentagem.

3.2.8.2 Avaliação da atividade microbica

A atividade microbica foi avaliada pela técnica proposta por Herscowitz (HERSCOWITZ, 1981), modificada por Corazzini (CORAZZINI, 1993). Nessa técnica, as leveduras vivas coram-se de azul pelo corante May-Grunwald-Giemsa modificado por Rosenfeld, enquanto as leveduras mortas não se coram. A atividade microbica foi avaliada contando-se, em 200 neutrófilos, o

número de *C. albicans* fagocitadas que foram mortas. Os valores foram expressos em porcentagem, e obtidos pela fórmula abaixo:

$$\text{Atividade microbica\%} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de } C. \text{ albicans mortas} \times 100}{\text{N}^\circ \text{ de } C. \text{ albicans fagocitadas}}$$

3.2.9 Análise estatística dos dados

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão ou média $\pm$ desvio padrão, de no mínimo três experimentos. As análises foram realizadas através de comparações entre o grupo controle e os grupos que receberam os diferentes tratamentos, dependendo do ensaio. Dado que nossos resultados foram paramétricos, aplicamos o Teste de Comparação Múltipla Student-Neuman-Keus.

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MC POR ESI-EM/EM

A figura 5 mostra um cromatograma obtido na análise de um extrato de *Microcystis panniformis* espécie BCCUSP 100 por CLAE (Coluna C₁₈ Phenomenex tipo Luna, 256 x 4,6 mm, 5 µm – fase móvel NH₄Ac 20mM pH= 5/ACN (75:25; v,v), fluxo= 1 mL. min⁻¹ e λ = 238 nm). Como o detector acoplado ao sistema é o DAD, foi possível acompanhar os espectros de absorção de cada composto separado. Nesta análise foram obtidos dois compostos suspeitos (chamados picos 1 e 2), pelo perfil dos espectros de absorção gerados ser semelhante ao do padrão de MC-LR mostrado no trabalho de VIEIRA *et al.* (2003) (figura 6).

Após a coleta destes dois picos, estas MC foram caracterizadas quimicamente por ESI-EM/EM como MC-LR (pico 1) e [Asp³] MC-LR (pico 2). Os espectros de massas destes picos estão apresentados na figura 7.

Figura 5. Típico cromatograma obtido com o extrato de *Microcystis panniformis* espécie BCCUSP 100 (Coluna C₁₈ Phenomenex Luna, 256 x 4,6 mm, 5 μ m – tampão ACN/ $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ pH= 5, fluxo= 1 mL. min⁻¹ e λ = 238 nm). Pico 1: MC-LR; pico 2: [Asp³]-MC-LR.

Figura 6. Espectros de absorção de UV obtidos pelo DAD: I= padrão de MC-LR (modificado de VIEIRA *et al.*, 2003), II= pico 1 (MC-LR) e III= pico 2 ([Asp³]-MC-LR).

Figura 7. Espectros de ESI-EM/EM modo positivo: (A) pico 1 (MC-LR) e (B) pico 2 ([Asp³]-MC-LR).

Foi encontrado um método simples e muito eficiente para purificação de MC combinando extração por MeOH/H₂O [75:25], cromatografia em coluna de sílica e análise com CLAE semipreparativo. As MC foram dissolvidas em acetato de etila e eluídas em sílica gel usando MeOH/H₂O [1:1]. Foram encontrados dois compostos suspeitos, pelo perfil dos espectros de absorção gerados na análise de CLAE-DAD ser semelhante ao do padrão de MC-LR. Estes compostos foram chamados de picos 1 e 2 e foram analisados por ESI-EM; os quais produziram íons moleculares protonados em m/z 995,4 e m/z 981,4, respectivamente. Como sugerido pelos pesos moleculares e o comportamento cromatográfico, os picos poderiam ser referentes às toxinas [Asp³]-MC-LR e MC-LR. Para confirmar esta hipótese, foram analisados ambos os compostos por tandem EM.

Os espectros de íon de 995,4 e 981,4 (figuras 7A e B) mostraram fragmentos típicos de MC, tal como m/z 135 que é atribuído a um fragmento originado da clivagem alfa do grupo metil do aminoácido Adda (NAMIKOSHI *et al.*, 1992). O íon m/z 213 é designado ao dipeptídio Glu-Mdha e o íon m/z 375 foi possivelmente produzido pela perda do fragmento 135 do tetrapeptídio Adda-Glu-Mdha-Ala (NAMIKOSHI *et al.*, 1992 e EDWARDS *et al.*, 1993). O íon m/z 599 está também presente em ambos os espectros e pode ser a sequência Arg-Adda-Glu.

A identificação dos picos 1 e 2 como sendo MC-LR e [Asp³]-MC-LR, respectivamente, foi sustentada por uma série de íons que inclui MeAsp ou Asp e consequentemente representa uma diferença de 14 Da entre os espectros. Assim, foram encontrados m/z = 967 [ciclo (Ala-Leu-MeAsp-Arg-Adda-Glu-Mdha) - CO] e m/z = 953 [ciclo (Ala-Leu-Asp-Arg-Adda-Glu-Mdha) - CO]; m/z = 553 [Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Arg] e m/z = 539 [Mdha-Ala-Leu-Asp-Arg]; m/z = 470 [Ala-Leu-MeAsp-Arg] e m/z = 456 [Ala-Leu-Asp-Arg]; m/z = 397 [Mdha-Ala-Leu-MeAsp] e m/z = 383 [Mdha-Ala-Leu-Asp]; m/z = 286 [MeAsp-Arg] e m/z = 272 [Asp-Arg].

Microcystis panniformis foi classificada taxonomicamente em 1991 por Komarék et al. e foi associada à alta toxicidade pela produção de MC (KOMÁREK et al., 2002 e WHITE et al., 2003). É importante ressaltar que este é o primeiro estudo que evidencia a identificação das MC produzidas por esta espécie e que a metodologia utilizada para o isolamento proporciona a obtenção destas toxinas com alto grau de pureza. Atualmente, há muita dificuldade em se obter padrões de cianotoxinas, pois essas substâncias ainda não foram sintetizadas quimicamente. Além disso, há alguns problemas legais com relação a importação destes compostos no Brasil, já que em alguns países são considerados armas químicas. Apenas a MC-LR, MC-YR e MC-RR estão disponíveis comercialmente (Calbiochem® e Sigma-Aldrich®). Neste trabalho, as variantes MC-LR e a [Asp³]-MC-LR foram separadas em grande quantidade e utilizadas na realização dos ensaios imunotoxicológicos.

4.2 AVALIAÇÃO DOS PERÍODOS DO DIA DE MAIOR PRODUÇÃO DAS MC

Foram realizados dois experimentos, nos quais amostras de *M. panniformis* foram coletadas durante os ciclos Claro:Escuro (C:E) e Claro:Claro (C:C) e analisadas por CLAE-DAD, para a avaliação do período do dia de maior produção de MC (figura 8).

Figura 8. Concentração de toxinas (fmol. célula⁻¹) produzidas por *M. panniformis* em 24 horas (amostras coletadas a cada 2 horas). Onde: (A) – Variação de MC-LR em condição C:E, (B) – Variação de MC-LR em condição luz constante, (C) – Variações de [Asp³]-MC-LR em condições C:E e (D) – Variação de [Asp³]-MC-LR em condição C:C.

Tem sido demonstrado que a radiação ativa fotossintetizante, pH, e nutrientes (ferro, fósforo e nitrogênio) influenciam o crescimento e a biossíntese de MC produzidas pela *Microcystis sp.* No entanto, a variação circadiana das concentrações de MC em *Microcystis sp.* não havia sido reportada. Neste presente estudo, as concentrações de MC-LR e [Asp³]-MC-LR em *M. panniformis* nos ciclos de C:E e C:C mostraram um pico ao meio do dia, por volta das 12-14 horas. Também em ambos os ciclos a MC-LR é 4 vezes mais abundante por volta das 12 horas do que durante a fase escura. A [Asp³]-MC-LR, no experimento de C:E, mostrou o mesmo padrão de comportamento da MC-LR. Contudo, a quantidade de [Asp³]-MC-LR durante o ciclo C:E é duas vezes mais alta em comparação com o experimento C:C.

Estes resultados podem estar associados ao relógio biológico já que em cianobactéria, os processos de fotossíntese, fixação de nitrogênio, síntese de algumas proteínas e divisão celular estão submetidos a ritmos circadianos (JOHNSON *et al.*, 1998 e WOELFLE *et al.*, 2004).

Após a análise destes dados, foi estabelecido que as amostras desta cianobactéria seriam coletadas no período do dia de maior produção de MC (entre 12 e 14 horas), para obtenção de maior quantidade de toxinas, e aplicação nos ensaios imunotoxicológicos.

4.3 EFEITO DA MC-LR E [Asp³]-MC-LR NA VIABILIDADE CELULAR DE NEUTRÓFILOS HUMANOS

Antes de avaliar os efeitos das MC-LR e [Asp³]-MC-LR sobre funções de neutrófilos humano, foram realizados ensaios preliminares para verificar a influência destas MC na viabilidade celular nas concentrações utilizadas nos ensaios (0,01 - 1000 nM), (figura 9). Para isto, foi realizado o ensaio colorimétrico de MTT, que é uma avaliação indireta de processos oxidativos de células vivas (JANJIC *et al.*, 1992).

Nossos resultados indicam que neutrófilos expostos a MC-LR e a [Asp³]-MC-LR nas concentrações (0,01), (0,1), (1), (10), (100) e (1000) nM apresentaram viabilidade semelhante ao controle. Também não observamos mudanças morfológicas através de microscopia invertida após o período de incubação, em ambas as placas.

Figura 9. Porcentagem de células viáveis: % de MTT reduzido pelo H⁺ proveniente do NADH de neutrófilos vivos (1.10^6 células. mL⁻¹). As células foram incubadas com MC-LR ou [Asp³]-MC-LR (0,01 - 1000 nM) por 1 hora (em PBS, T= 37 °C e 5% CO₂) e depois com MTT. Para o controle positivo somente células foram incubadas. Este ensaio foi realizado utilizando PMN de três doadores diferentes e os dados representam a média $\pm$ se.

4.4 EFEITO DA MC-LR E [Asp³]-MC-LR NA QUIMIOTAXIA, NO “BURST” RESPIRATÓRIO, NA FAGOCITOSE E NA ATIVIDADE MICROBICIDA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS

4.4.1 Resultados do efeito da MC-LR e [ASP³]-MC-LR na quimiotaxia de neutrófilos humanos

O ensaio de migração de PMN foi realizado *in vitro*: suspensão de PMN ($2,5 \cdot 10^6$ células. mL^{-1}) foi incubada com o agente quimiotático fMLP (57 nM) ou MC (MC-LR e [Asp³]-MC-LR, nas concentrações 0,01 - 1000 nM), em uma microplaca de quimiotaxia, por 1 hora ($T = 37^\circ\text{C}$, 5% CO_2). As figuras 10 e 11 representam curvas dose-resposta para cada MC. A figura 12 compara o efeito da MC-LR e da [Asp³]-MC-LR (ambas em 1000 nM) na quimiotaxia de neutrófilos, com o grupo controle (concentração de MC= 0).

Figura 10. Efeito da concentração de MC-LR (0,01 – 1000 nM) na quimiotaxia de neutrófilos humanos ($2,5 \cdot 10^6$ células. mL^{-1}). Os valores expressam a média $\pm$ se de 4 ensaios (*** $P < 0,001$ e ** $p < 0,01$ em relação aos valores encontrados no controle).

Figura 11. Efeito da concentração de [Asp³]-MC-LR (0,01 – 1000 nM) na quimiotaxia de neutrófilos humanos ($2,5 \cdot 10^6$ células. mL⁻¹). Os valores expressam a média $\pm$ de de 4 ensaios (***P<0,001 em relação aos valores encontrados no controle).

Figura 12: Efeito de MC-LR e [Asp³]-MC-LR (1000 nM), e de fMLP (57 nM), na quimiotaxia de neutrófilos ($2,5 \cdot 10^6$ células. mL⁻¹). Os valores expressam a média $\pm$ se de 4 ensaios (***P<0,001 em relação aos valores encontrados no controle).

4.4.2 Resultados do efeito da MC-LR e [Asp³]-MC-LR no “burst” respiratório de neutrófilos humanos

Com o objetivo de avaliar o efeito da MC-LR e [Asp³]-MC-LR sobre o “burst” respiratório de neutrófilos humanos foram realizados os seguintes ensaios:

- Quimiluminescência amplificada pelo luminol, para determinar a possível formação de ERO;
- Redução do citocromo C, para determinar a possível formação de ânion superóxido;
- Método de quimiluminescência induzida por ozônio, para determinar a possível formação de espécies reativas de nitrogênio (ERN).

As figuras 13 e 14 mostram o efeito de MC-LR e [Asp³]-MC-LR (0,01 – 1000 nM) sobre a quimiluminescência de neutrófilos humanos (1.10^6 células. mL⁻¹), pelo perfil cinético amplificado por luminol e pelos valores relativos de área integrada obtidos a partir da cinética de emissão de luz (respectivamente).

A figura 15 mostra a cinética de redução do citocromo C (75 µM) por neutrófilos (1.10^6 células. mL⁻¹) ativados com PMA (16 ng. ensaio⁻¹) e a ausência de efeito de MC-LR e [Asp³]-MC-LR (0,01 – 1000 nM) neste ensaio.

Figura 13: Cinética de emissão de luz de neutrófilos (1.10^6 células. mL⁻¹) ativados com PMA (16 ng. ensaio⁻¹), MC-LR (I) e [Asp³]-MC-LR (II) (0,01 – 1000 nM) amplificada por luminol durante 40 minutos. (URL: unidade relativa de luz)

Figura 14: Efeito de MC-LR (I) e [Asp³]-MC-LR (II) (0,01 – 1000 nM) sobre a quimiluminescência de neutrófilos (1.10^6 células. mL⁻¹) amplificada por luminol. Os dados mostram os valores de relativos de área integrada (***P<0,001 e *p<0,05 em relação aos valores encontrados no controle).

Figura 15: Cinética de redução do citocromo C ($75 \mu\text{M}$) por neutrófilos (1.10^6 células. mL⁻¹) ativados com PMA (16 ng. ensaio⁻¹). Não houve efeito de MC-LR (I) e [Asp³]-MC-LR (II) (0,01 – 1000 nM) neste ensaio. A cinética é representativa de 2 ensaios, em triplicata.

4.4.3 Resultados do efeito da MC-LR e [Asp³]-MC-LR na fagocitose e na atividade microbicida de neutrófilos humanos

A fagocitose de neutrófilos humanos foi avaliada nos tempos zero, 10 e 15 minutos. Os PMN foram incubados com células leveduriformes de *Candida albicans* opsonizadas em uma proporção de 1:5 e MC (MC-LR ou [Asp³]-MC-LR, nas concentrações 1 e 1000 nM), em banho (T= 37 °C). Após o período de incubação foi realizado um citocentrifugado para avaliação da porcentagem de fagocitose (Figura 16) e morte de *Candida albicans* pelos neutrófilos (Figura 17).

Figura 16: Efeito da MC-LR (I) e [Asp³]-MC-LR (II) (1 e 1000 nM) sobre a capacidade de fagocitose de *Candida albicans* por neutrófilos humanos. Os PMN foram incubados com leveduras opsonizadas de *Candida albicans* opsonizadas nos intervalos de 10 e 15 minutos para avaliação da porcentagem de fagocitose. Os dados correspondem à média $\pm$ se de 3 experimentos (** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ em relação aos valores encontrados no controle).

Figura 17: Efeito da MC-LR (I) e [Asp³]-MC-LR (II) (1 e 1000 nM) sobre a capacidade microbicida de *Candida albicans* por neutrófilos humanos. Os PMN foram incubados com leveduras opsonizadas de *Candida albicans* opsonizadas nos intervalos de 10 e 15 minutos para avaliação da porcentagem de atividade microbicida. Os dados correspondem à média $\pm$ se de 3 experimentos (** $p < 0,01$ em relação aos valores encontrados no controle).

4.4.4 Discussão

É conhecido que o órgão alvo afetado pelas MC é o fígado de modo que a hepatotoxicidade destes compostos tem sido extensivamente estudada tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Entretanto, o mecanismo exato pelo qual as MC induzem hepatotoxicidade e promoção de tumor não está bem elucidado. Um dos mais bem estudados mecanismos de ação das MC envolve a significativa inibição de PP1 e PP2A, levando ao aumento da fosforilação de proteínas, o que pode resultar em duas consequências principais: (i) destruição do citoesqueleto das células hepáticas (filamentos intermediários e microfilamentos), diretamente causando os efeitos citotóxicos, e (ii) desregulação da divisão celular (proliferação), levando à atividade de promoção de tumor (CHORUS *et al.*, 2003).

Endotoxemia/sepsis, hepatite alcoólica, lesão por perfusão isquêmica e certas toxicidades hepáticas induzidas por medicamentos são caracterizadas por inflamação local e sistêmica com recrutamento de macrófagos e neutrófilos na vasculatura do fígado (JAESCHKE *et al.*, 1996). A principal função destes fagócitos é destruir microorganismos invasores e remover células mortas e detritos celulares na preparação para a regeneração do tecido. Em função da natureza dos mediadores tóxicos gerados por estes fagócitos, células sádas podem também ser afetadas, o que pode agravar a lesão hepática original. Portanto, é importante entender o mecanismo envolvido na ativação, recrutamento e citotoxicidade destes fagócitos no fígado (JAESCHKE *et al.*, 2002). Na ausência de estímulo inflamatório e sob condições de fluxo, o contato de neutrófilos com o endotélio é aleatório, e neutrófilos circulantes não aderem ao endotélio vascular. Entretanto, em um foco inflamatório, ocorre a marginação ou rolamento das células fagocíticas ao longo do endotélio, que é mediado por três membros da família das selectinas e seus respectivos ligantes. Após o rolamento, muitos neutrófilos começam a aderir firmemente ao endotélio. Eles são ativados, mudando o formato esférico para uma configuração achatada. Assim, os neutrófilos migram para o tecido (JAESCHKE *et al.*, 1996).

Jochimsen et al. (1998) observaram, em estudos patológicos de tecidos hepáticos, de pacientes expostos a MC em um centro de hemodiálise brasileiro, apresentaram infiltração leucocitária, com predomínio de neutrófilos obtidos da autópsia de pacientes que apresentaram quadro de hepatite tóxica aguda após serem submetidos à terapia de hemodiálise com solução contaminada com MC. Por esta razão, resolvemos verificar se a MC-LR e [Asp³]-MC-LR exercem efeito na quimiotaxia, produção de ERO, fagocitose e atividade microbicida de neutrófilos humanos, sendo todos os ensaios *in vitro*.

Nossos resultados demonstraram que a presença de MC-LR ou [Asp³]-MC-LR aumenta a migração de neutrófilos humanos, mas sem efeito dose-resposta. Este aumento confirmou o esperado, uma vez que a primeira evidência experimental de cianotoxinas modularem o sistema imune, foi a capacidade da MC-LR de aumentar a aderência inicial de PMN humanos, *in vitro* (HERNÁNDEZ *et al.*, 2000), a qual é um dos passos que antecede a migração em direção ao alvo na cascata fagocítica inflamatória.

Há estudos que sugerem o envolvimento de ERO e dano oxidativo nos efeitos hepatotóxicos induzidos pela cianobactéria em cultura de hepatócitos de ratos (DING *et al.*, 1998; DING *et al.*, 2003), e que um dos produtos de lipoperoxidação, o malondialdeído, foi significativamente aumentado (DING *et al.*, 1998). O estresse oxidativo pode ser definido como a exposição de uma molécula, célula ou tecido a uma concentração excessiva de oxidantes, particularmente radicais livres, e pode levar a efeitos adversos sérios em células e tecidos por causar lipoperoxidação, danos ao DNA e a proteínas. Antioxidantes ativos em membrana, tais como vitamina E e glutathiona (GSH), oferecem proteção contra a toxicidade das MC (MEREISH *et al.*, 1991).

Pelos resultados obtidos nos ensaios de quimiluminescência amplificado com luminol, foi observado que essas MC, nas concentrações estudadas, estimulam a geração de ERO por neutrófilos humanos, sendo que a MC-LR estimula de forma dependente de dose, ao contrário da [Asp³]-MC-LR. Com este ensaio não podemos afirmar quais ERO foram formadas, pois o luminol

amplifica a quimiluminescência de várias delas, apesar de os resultados dos ensaios de redução do citocromo C não mostrarem tal estimulação. Porém, o método de determinação de ERO por CL amplificada por luminol é mais sensível do que o de redução do citocromo C, portanto não se pode concluir que as MC não induzem formação de ânions superóxido.

Para verificar se a quimiluminescência formada foi em razão da formação de ERN foi realizado dosagem de $\cdot\text{NO}$ utilizando um analisador de $\cdot\text{NO}$ com método de quimiluminescência induzida por ozônio. O $\cdot\text{NO}$ está envolvido em vários processos bioquímicos e fisiológicos. Quando o $\cdot\text{NO}$ é envolvido em reações imunes, age como um agente tóxico para organismos infecciosos. Quando macrófagos de camundongos são estimulados com LPS e MC-LR, ocorre inibição da produção de $\cdot\text{NO}$, pela MC ter um efeito supressor no RNAm da óxido nítrico sintase (CHEN *et al.*, 2004). Esta inibição da produção de $\cdot\text{NO}$ por macrófagos em contato com a MC-LR sugere um efeito imunossupressor para essa toxina, causando prejuízo ao sistema de defesa do organismo. Os nossos resultados não mostraram nenhuma influência na produção de $\cdot\text{NO}$ por neutrófilos humanos. Entretanto, há a necessidade de investigar se esta MC tem ação na expressão da enzima óxido nítrico sintase para confirmar tal ausência de efeito.

A célula fagocítica é fundamental na eliminação de microrganismos. Sem um adequado número de neutrófilos ou se os neutrófilos tiverem com suas funções comprometidas, o organismo ficará mais susceptível a infecções. Os processos básicos que estão envolvidos na eliminação de microrganismos invasores são quimiotaxia, opsonização, digestão e atividade microbicida (ABRAMSON *et al.*, 1993). Quando os neutrófilos fagocitam um microrganismo, estes fagócitos consomem oxigênio rapidamente, o qual é reduzido a ânion superóxido. O superóxido é pouco tóxico ao microrganismo mas geram outras ERO que são relacionadas a atividade microbicida dos neutrófilos, como o ácido hipocloroso, o qual é formado pelo peróxido de hidrogênio e íon cloreto em uma reação catalisada pela mieloperoxidase (KETTLE *et al.*, 1997).

Para avaliarmos o efeito da MC-LR e da [Asp³]-MC-LR sobre a fagocitose e atividade microbica de neutrófilos humanos *in vitro*, foram realizados ensaios utilizando a *Candida albicans* como o microrganismo alvo para sofrer fagocitose e morte celular. Este fungo é um patógeno oportunista, o qual pode causar infecções mucocutâneas, gastrintestinais e sistêmicas, especialmente em pacientes neutropênicos e imunocomprometidos (ASHMAN *et al.*, 2004). Os neutrófilos têm um papel importante na resistência de infecções causadas por *Candida* e a enzima lisossomal mieloperoxidase e seu substrato oxidante peróxido de hidrogênio são os principais participantes na atividade fungicida do neutrófilo (ABRAMSON *et al.*, 1993).

Observamos que os neutrófilos humanos, em ensaios *in vitro*, tratados com MC-LR ou [Asp³]-MC-LR (1 ou 1000 nM) fagocitaram por volta de 60% das leveduras de *C. albicans* no período de 15 minutos, 30% a mais do que os neutrófilos do grupo controle. Não houve diferença significativa de fagocitose entre as concentrações estudadas, e nem entre as microcistinas (figura 16).

A capacidade microbica dos neutrófilos humanos ativados com MC-LR (1000 nM) foi superior ao do grupo controle (figura 17 – I) . Neutrófilos tratados com MC-LR mataram cerca de 4% e 5% das leveduras de *C. albicans*, no período de 10 e 15 minutos respectivamente, enquanto os neutrófilos do grupo controle mataram por volta de 2% destas leveduras. Já a [Asp³]-MC-LR (1 nM ou 1000 nM) não exerceu efeito na capacidade microbica de neutrófilos humanos (figura 17 – II).

Após o neutrófilo migrar para o tecido, seus principais objetivos são reconhecer, fagocitar e destruir o agente invasor (HELLEWELL *et al.*, 1994). Os resultados deste trabalho mostram que a MC-LR ativa a migração, a fagocitose, a formação de ERO e a capacidade microbica de neutrófilos humanos *in vitro*. Podemos sugerir que essa atividade microbica é ativada pelo aumento de ERO no fagossomo. Estes dados sugerem também que a MC-LR exerce efeito de hiperativação dessas funções dos neutrófilos e portanto podem contribuir para eliminação de patógenos, por proporcionar maior número de neutrófilos no

local inflamatório e aumento das atividades de fagocitose e microbicida, porém o aumento da presença de ERO contribui não somente para a eliminação do patógeno mas também pode comprometer o tecido próximo deste local.

Muitos estudos experimentais mostram que MC em água potável e recreacional são uma ameaça real à saúde, e os métodos de remoção por floculação, sedimentação e/ ou filtração não são eficientes para removê-las. Assim, é altamente provável que as usuais práticas de tratamento de água podem levar à exposição crônica de animais e humanos a concentrações baixas de MC. De acordo com os resultados dos trabalhos publicados sobre a imunotoxicidade das MC (SHEN *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2004; LAKOFF *et al.*, 2004 e HERNÁNDEZ *et al.*, 2000), e também do nosso projeto, as concentrações de 0,01 – 1000 nM podem ser altas o suficiente para agir no sistema imune e induzir diminuição de resistência à episódios de alergias (DAWSON, 1998), infecções, promoção de tumor (Codd, 1999) e mortalidade (POURIA *et al.*, 1998). Embora não haja relato de casos de intoxicações agudas em humanos causadas pelo consumo de toxinas de cianobactérias por ingestão de água e/ou alimentos contaminados, os efeitos agudos e crônicos causados pela exposição por v.o. necessitam ser considerados. Especialmente se há exposição frequente, por longo tempo. Há na literatura evidências de câncer primário de fígado, associado com a contaminação da superfície de reservatório de água por cianobactérias produtoras de MC (UENO *et al.*, 1996).

Consideramos nesse estudo a concentração máxima aceitável (CMA) para MC em água potável, que é de 1 $\mu\text{g. L}^{-1}$ (FALCONER *et al.*, 1994), e também o valor de ingestão diária tolerável (IDT) proposto no guia da OMS, que é de 0,04 $\mu\text{g. kg}^{-1}$ de p.c. dia^{-1} (CHORUS *et al.*, 2003). O valor de IDT é definido como a quantidade aceitável de uma substância potencialmente tóxica que pode ser consumida diariamente (DE MAGALHAES, 2001).

No caso de exposição por v.o. de MC, parte significativa é biotransformada e eliminada, ou se liga a proteínas, e a concentração plasmática de MC pode atingir valores muito baixos, da ordem de 0,1 nM

(CHORUS *et al.*, 2003). Por essa razão, a nossa faixa de estudo (0,01 – 1000 nM) foi baseada em valores citados na literatura em estudos com neutrófilos humanos e para contemplar concentrações baixas, inferiores as encontradas para exposição v.o. em humanos (HERNÁNDEZ *et al.*, 2000 e CHORUS *et al.*, 2003). A quantidade de MC-LR proposta pela OMS (de 1 µg. L⁻¹ ou 0,04 µg. kg⁻¹ de p.c. dia⁻¹) pode atingir concentrações plasmáticas próximas ou até mais altas do que os que modulam a aderência (0,01 e 0,1 nM) de neutrófilos humanos *in vitro* (HERNÁNDEZ *et al.*, 2000). Nossos resultados mostraram, que essas mesmas concentrações de MC-LR e [Asp³]-MC-LR induziram maior quimiotaxia dessas células em relação ao controle e ativaram a formação de espécies reativas de oxigênio (no ensaio de quimiluminescência).

Conclusão

5. CONCLUSÃO

- ✓ A cianobactéria *Microcystis panniformis* cepa BCCUSP 100 produz as toxinas: MC-LR e [Asp³]-MC-LR;
- ✓ Aparentemente, o relógio biológico controla a produção de MC-LR e [Asp³]-MC-LR pela *M. panniformis*;
- ✓ As MC-LR e [Asp³]-MC-LR são produzidas em maior quantidade, pela *M. panniformis*, entre 12 e 14 horas;
- ✓ Os métodos de extração, separação e purificação de MC descritos neste trabalho, podem ser utilizados para a obtenção de MC-LR e [Asp³]-MC-LR em grande quantidade, para a realização de ensaios biológicos e para serem utilizados como padrão analítico;
- ✓ Os dados obtidos neste trabalho sugerem que as hepatotoxinas MC-LR e [Asp³]-MC-LR, na faixa de concentração estudada, exercem efeitos em neutrófilos humanos *in vitro*: induziram maior quimiotaxia em relação ao controle, ativaram a formação de espécies reativas de oxigênio (no ensaio de quimiluminescência) e a fagocitose. Já a atividade microbicida foi ativada somente pela MC-LR;
- ✓ Nossos resultados indicam que concentrações menores do que o limite máximo de exposição a MC-LR, sugerido pela OMS, pode exercer efeito sobre funções de neutrófilos humanos *in vitro*.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter Ltda, 1998, p. 253-276.

ABRAMSON, J.S.; WHEELER, J.G. **The neutrophil**. Oxford: Oxford University Press, 1993, p. 65-137.

ALBAY, M.; AKCAALAN, R.; TUFEKCI, H.; METCALF, J.S.; BEATTIE, K.A.; CODD, G.A. Depth profiles of cyanobacterial hepatotoxins (microcystins) in three Turkish freshwater lakes. **Hydrobiologia**, v. 505, n. 1-3, p. 89-95, 2003.

AME, M.V.; DIAZ, M.D.; WUNDERLIN, D.A. Occurrence of toxic cyanobacterial blooms in San Roque Reservoir (Cordoba, Argentina): A field and chemometric study. **ENVIRON. TOXICOL.**, v. 18, n. 3, p. 192-201, 2003.

ANVISA. Portaria n. 1469/00, 22 de fevereiro de 2001. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1469_00.htm. Acesso em 30 ago 2003.

¹ As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), e as abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2002.

- ASHMAN, R.B.; FARAH, C.S.; WANASAENGSAKUL, S.; HU, Y.; PANG, G.; CLANCY, R.L. Innate versus adaptive immunity in *Candida albicans* infection. **Immunol. Cell Biol.**, v. 83, n. 2, p. 196-204, 2004.
- AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W.; JOCHIMSEN, E.M.; et al. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brasil. **Toxicology**, v. 181, p. 441-446, 2002.
- BABIOR, B.M. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. **New Engl. J. Med.**, v. 298, p. 659-668, 1978.
- BABIOR, B.M. Protein phosphorylation and the respiratory burst. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 264, p. 361-367, 1988.
- BABIOR, B.M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, p. 1464-1476, 1999.
- BABIOR, B.M. Phagocytes and oxidative stress. **Am. J. Med.**, v. 109, p. 33-44, 2000.
- BAGGIOLINI, M.; BOULAY, F.; BADWEY, J.A.; CURNUTTE, J.T. Activation of neutrophil leukocytes: chemoattractant receptors and respiratory burst. **FASEB J.**, v. 7, p. 1004-1010, 1993.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.D. Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a mcyB molecular marker. **Harmful Algae**, v. 2, n. 1, p. 51-60, 2003.

BOUAÏCHA, N.; VIA-ORDORIKI, L.; VANDEVELDE, T.; FAUCHON, N.; PUISEUX-DAO, S. Toxic Cyanoprokaryotes in resource waters : monitoring of their occurrence and toxin detection. OECD Workshop Molecular Methods for Safe Drinking Water, 1998. Disponível em www.eawag.ch/publications_e/proceedings/oecd/proceedings/Bouaich.pdf. Acesso em 16.set.2005.

BORREGAARD, N.; LOLLIKE, K.; KJELDSSEN, L.; SENGELOV, H.; BASTHOLM, L.; NIELSEN, M.H.; BAINTON, D.F. Human neutrophils granules and secretory vesicles. **Eur. J. Haematol.**, v. 51, p. 187-198, 1993.

BOTHA, N.; VENTER, M.V.; DOWNING, T.G.; SHEPHARD, E.G.; GEHRINGERC, M.M. The effect of intraperitoneally administered microcystin-LR on the gastrointestinal tract of Balb/c mice. **Toxicon**, v. 43, p. 251-254, 2004.

BRACH, M.A.; DE VOS, S.; GRUSS, H.J.D.; HERRMANN, F. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. **Blood**, v. 80, p. 2920-2924, 1992.

BRAUN, E.; BACHOFEN, R. Homoserine-lactones and microcystin in cyanobacterial assemblages in Swiss lakes. **Hydrobiologia**, v. 522, n. 1-3, p. 271-280, 2004.

CARLOS, T.M.; HARLAN, J.M. Membrane proteins involved in phagocyte adherence to endothelium. **Immunol. Rev.**, v. 114, p. 5-25, 1990.

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, S.L. Eutrofização artificial: um problema em rios, lagos e represas. <http://www.agr.feis.unesp.br/ctl28082004.php>. Acesso em 12. set. 2005.

CHEN, J.; XIE, P. Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* and *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. **Toxicon**, v. 45, n. 5, p. 615-625, 2005.

CHEN, T.; ZHAO, X.; LIU, Y.; SHI, Q.; HUA, Z.; SHEN, P. Analysis of immunomodulating nitric oxide, iNOS and cytokines mRNA in mouse macrophages induced by microcystin-LR. **Toxicology**, v. 197, p. 67-77, 2004.

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.

CHOW, C.W.K.; HOUSE, J.; VELZEBOER, R.M.A.; DRIKAS, M.; BURCH, M.D.; STEFFENSEN, D.A. The effect of ferric chloride flocculation on cyanobacterial cells. **Water Res.**, v. 32, n. 3, p. 808-814, 1998.

- COCHRANE, C G. Mechanisms coupling stimulation and function in leukocytes. **Fed. Proc.**, v. 43, p. 2729, 1984. *apud Rev. Facul. Med. Lisboa*, v. 4, série III, n. 2, 1999.
- CODD, G.A. Cyanobacterial Toxins: Occurrence, properties and Biological Significance. **Wat. Sci. Tech.**, v. 32, n. 4, p.149-156, 1995.
- 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.
- 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.
- CORAZZINI, R. **Avaliação morfo-fisiológica de macrófagos peritoniais de camundongos submetidos ao choque térmico**. São Paulo, 1993. 156p. Tese de Mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Patologia Estrutural e Funcional**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.45-83.
- DALGREN, C.; KARLSSON, A. Respiratory burst in human neutrophils. **J. Immunol. Methods**, v. 232, p. 3-14, 1999.

- DAWSON, R.M. The toxicology of microcystins. **Toxicon**, v. 36, n. 7, p. 953-962, 1998.
- DELL'AVERSANO, C.; EAGLESHAM, G.K.; QUILLIAM, M.A. Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography – mass spectrometry. **J. Chromatog. A**, v. 1028, n. 1, p. 155-164, 2004.
- DEWARD, B.; THELEN, M.; BAGGIOLINI, M. Two transduction sequences are necessary for neutrophils activation by receptor agonists. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 16179-16184, 1998.
- DING, W.X.; SHEN, H.M.; ZHU, H.G.; ONG, C.N. Studies on oxidative damage induced by cyanobacteria extract in primary cultured rat hepatocytes. **Environ. Res.**, v. 78, p. 12-18, 1998.
- DING, W.X.; SHEN, H.M.; ZHU, H.G.; LEE, B.L.; ONG, C.N. Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China. **Mutation Res.**, v. 442, p. 69-77, 1999.
- DING, W.X. ; ONG, C.N. Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 220, p. 1-7, 2003.
- 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.

EDWARDS, C.; LAWTON, L.A.; BEATTIE, K.A.; CODD, G.A. Analysis of microcystins from cyanobacteria by liquid chromatography with mass spectrometry using atmospheric pressure ionization. **Rapid Commun. Mass Sp.**, v. 7, p. 714-721, 1993.

FALCONER, I.R.; BURCH, M.D.; STEFFENSEN, D.A.; CHOICE, M.; COVERDALE, O.R. Toxicity of the blue-green-alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking-water to growing pigs, as an animal-model for human injury and risk assessment. **Environ. Toxicol. Water Quality**, v. 9, n. 2, p. 131-139, 1994 *apud* WEB OF SCIENCE. Disponível em: <http://isi02.isiknowledge.com/portal.cgi?DestApp=WOS&Func=Frame>. Acesso em: 10 maio 2005.

FARSKY, S.P.; MELLO, S.B.V.; Participação de moléculas de adesão no desenvolvimento da resposta inflamatória. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, v. 50, n. 1, p. 80-89, 1995.

FASTNER, J.; FLIEGER, I.; NEUMANN, U. Optimised extraction of microcystins from field samples – a comparison of different solvents and procedures. **Wat. Res.**, v. 32, n. 10, p. 3177 – 3181, 1998.

FAWELL, J.K. ,MITCHELL, R.E. ,EVERETT, D.J.; HILL, R.E. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: Microcystin-LR. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 18, p. 162-167, 1999.

FLIER, M.; GEELEN, S.P.M.; KIMPEN, J.L.L. Anti-inflammatory adjuvant agents in bacterial meningitis. **Curr. Med. Chem.**– Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents, v. 1, p. 55-62, 2002.

FREVERT, C.W.; WONG, V.A.; GOODMAN, R.B.; GOODWIN, R.; MARTIN, T.R. Rapid fluorescence-based measurement of neutrophil migration in vitro. **J. Immunol. Methods**, v. 213, p. 41-52, 1998.

GEHRINGER, M.M., GOVENDER, S., SHAH, M., DOWNING, .TG. An investigation of the role of vitamin E in the protection of mice against microcystin toxicity. **Environ. Toxicol.**, v. 18, n. 2, p. 142-148, 2003 *apud* WEB OF SCIENCE. Disponível em: <http://isi02.isiknowledge.com/portal.cgi?DestApp=WOS&Func=Frame>. Acesso em: 10 maio 2005.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORN, B.A. **Immunology**. 4. ed. New York: W.H. Freeman, 2000. p. 44-45.

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.

GUTHRIE, L.A.; MCPHAIL, L.C.; HENSON, P.M.; JOHNSTON, R.B. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. **J. Exp. Med.**, v. 160, p. 1656-1671, 1984.

HAMPTON, M.B.; KETTLE, A.J.; WINTERBOUR, C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v.92, p. 3007-3017, 1998.

HELLEWELL, P.G.; WILLIAMS, T.J. **Immunopharmacology of Neutrophils**. London: Academic Press Limited, 1994, p. 1-3.

HENDERSON, L.M.; CHAPPELL, J.B. NADPH oxidase of neutrophils. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1273, p. 87-107, 1996.

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.

HERSCOWITZ, H.B.; HOLDEN, H.T.; BELLANTI, J.A.; GHAFAR, A. Manual of macrophage methodology. New York: Marcel Dekker, 1981. p. 272-275.

HIEMSTRA, P.S. Role of neutrophils and mono-nuclear phagocytes in host defense and inflammation. **J. Inter. Fed. Clin. Chem.**, v. 5, p. 224-231, 1993. *apud Rev. Facul. Med. Lisboa*, v. 4, série III, n. 2, 1999.

HOEGER, S.J.; DIETRICH, D.R.; HITZFELD, B.C. Effect of Ozonation on the Removal of Cyanobacterial Toxins during Drinking Water Treatment. **Environ. Health Persp.**, v. 110, p. 1127-1132, 2002.

HOEGER, S.J.; SHAW, G.; HITZFELD, B.C.; DIETRICH, D.R. Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in two Australian drinking water treatment plants. **TOXICON**, v. 43, n. 6, p. 639-649, 2004.

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.

- HOTTO, A.; SATCHWELL, M.; BOYER, G. Seasonal production and molecular characterization of microcystins in Oneida Lake, New York, USA. **Environ. Toxicol.**, v. 20, n. 3, p. 243-248, 2005.
- HUIZINGA, T.W.J.; ROOS, D.; VON, D.M.; BORNE, A.E.G. Neutrophils Fc γ receptors: a two-way bridge in the immune system. **Blood**, v. 75, p. 1211-1214, 1990.
- ISHII, H.; NISHIJIMA, M.; ABE, T. Characterization of degradation process of cyanobacterial hepatotoxins by a gram-negative aerobic bacterium. **Water Res.**, v. 38, p. 2667-2676, 2004.
- ITO, E.; KONDO, I.F.; TERAOKA, K.; HARADA K.I. Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR. **Toxicol.**, v. 35, n. 9, p. 1453-1457, 1997.
- JAESCHKE, H.; SMITH, C.W.; CLEMENS, M.G.; GANEY, P.E.; ROTH, R. Mechanisms of inflammation liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils. **Toxicol. Appl. Pharm.**, v. 139, p. 213-226, 1996.
- 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.
- JANJIC, D.; WOLLHEIM, C.B. Islet cell metabolism is reflected by the MTT (tetrazolium) colorimetric assay. **Diabetologia**, v. 35, p. 482-485, 1992.
- 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, mar, p. 873-878, 1998.

JOHNSON, C.H.; GOLDEN, S.S.; KONDO, T. Adaptive significance of circadian programs in cyanobacteria. **Trends Microbiol.**, v. 6, n. 10, p. 407-410, 1998.

KEANE, P.M.; STRIETER, R.M. Chemokine signaling in inflammation. **Crit. Care. Med.**, v. 28, p. 13-26, 2000.

KETTLE, A.J.; WIELERBOURN, C.C. Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production. **Redox Rep.** v. 3, p. 3-15, 1997 *apud* WEB OF SCIENCE. Disponível em: <http://isi02.isiknowledge.com/portal.cgi?DestApp=WOS&Func=Frame>. Acesso em: 10 maio 2005.

KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ-LEGNEKOVÁ, J.; SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; SENNA, P.A.C. Two common *Microcystis* species (Chroococcales, Cyanobacteria) from tropical America, including *M. panniformis* sp. nov. **Cryptogamie**, v. 23, n. 2, p. 159-177, 2002.

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

LANKOFF, A.; CARMICHAEL, W.W.; GRASMAN, K.A.; YUAN, M. The uptake kinetics and immunotoxic effects of microcystin-LR in human and chicken peripheral blood lymphocytes *in vitro*. **Toxicology**, v. 204, n. 1, p. 23-40, 2004.

LAWTON, L.A.; EDWARDS, C. Purification of microcystins. **J. Chromatogr. A**, v. 912, p. 191-209, 2001.

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

LINDHOLM, T.; VESTERKVIST, P.; SPOOF, L.; LUNDBERG-NIINISTO, C.; MERILUOTO, J. Microcystin occurrence in lakes in Åland, SW Finland. **Hydrobiologia**, v. 505, n. 1-3, p. 129-138, 2003.

LOMGOBARDO, D.; ESTEVES, G.F.; VALENTIM, M.I. **Sensibilização do sistema imunitário: um desafio para a toxicologia *in vitro***. 2002. Disponível em: <http://www.Fmv.utl.pt/democ/sft/sem0001/g26.htm>. Acesso em 23.julho.2003.

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.

MALECH, H.L.; GALLIN, J.I. Current concepts immunology neutrophils in human diseases. **New Engl. J. Med.**, v. 317, p. 687-694, 1987.

MEREISH, M.; GEHRINGER M.M.; SHEPHARD, E.G.; DOWNING, T.G.; WIEGAND, C.; NEILAN, B.A. An investigation into the detoxification of microcystin-LR by the glutathione pathway in Balb/c mice. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 36, p. 931-941, 2004.

MERILUOTO, J. Chromatography of microcystins. **Anal. Chim. Acta**, v. 352, p. 277-298, 1997.

MCPHAIL, L.C.; SHIRLEY, P.S.; CLAITON, C.C.; SNYDERMAN, R. Activation of the respiratory burst enzyme from human neutrophils in a cell-free-system. **J. Clin. Invest.**, v. 75, p. 1735-1739, 1985.

MITTENBÜHLER, K.; LOLEIT, M.; BAIER, W.; FISCHER, B.; SEDELMEIER, E.; JUNG, G.; WINKELMANN, G.; JACOBI, C.; WECKESSER, J.; ERHARD, M.H.; HOFMANN, A.; BESSLER, W.; HOFFMANN, P. Drug specific antibodies: T-cell epitope-lipopeptide conjugates are potent adjuvants for small antigens in vivo and in vitro. **Int. J. Immunopharm.**, v. 19, n. 5, pp. 277-287, 1997.

MOLLÍNEDO, F.; BORREGAARD, N.; BOXER, A.L. Novel trends in neutrophil structure, function and development. **Immunol. Today**, v. 20, p. 537-539, 1999.

MORENO, I.M.; PEREIRA, P.; FRANCA, S.; CAMEAN, A. Toxic cyanobacteria strains isolated from blooms in the Guadiana River (southwestern Spain). **Biol. Res.**, v. 37, n. 3, p. 405-417, 2004.

MORRIS, R.J.; WILLIAMS, D.E.; LUU, H.A.; HOLMES, C.F.B.; ANDERSEN, R.J.; CALVERT, S.E. The adsorption of microcystin-LR by natural clay particles. **Toxicon**, v. 38, p. 303-308, 2000.

MS. Portaria n. 518 de 25 de março de 2004. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=10959>. Acesso em 04 abr 2004.

NAMIKOSHI, M.; RINEHART, R.; SAKAI, R.; STOTTS, R.R.; DAHLEM, A.M.; BEASLEY, V.R.; CARMICHAEL, W.W.; EVANS, E.R. Identification of 12

hepatotoxins from a homer bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, and *Microcystis wesenbergii*: nine new microcystins. **J. Org. Chem.**, v. 57, p. 866-872, 1992.

ORTEA, P.M.; ALLIS, O.; HEALY, B.M.; LEHANE, M.; SHUILLEABHÁIN, A.N.; FUREY, A.; JAMES, K.J. Determination of toxic cyclic heptapeptides by liquid chromatography with detection using ultra-violet, protein phosphatase assay and tandem mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 55, p. 1395-1402, 2004.

PAWLIK-SKOWRONSKA, B.; SKOWRONSKI, T.; PIRSZEL, J.; ADAMCZYK, A. Relationship between cyanobacterial bloom composition and anatoxin-A and microcystin occurrence in the eutrophic dam reservoir (SE Poland). **Polish J. Ecol.**, v. 52, n. 4, p. 479-490, 2004.

PENDLETON, P.; SCHUMANN, R.; WONG, S.H. Microcystin-LR Adsorption by Activated Carbon. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 240, p. 1-8, 2001.

POBER, J.S.; COTRAN, R.S. The role of endothelial cells in inflammation. **Transplantation**, v. 50, n. 4, p. 537-544, 1990. *apud* **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, v. 50, n. 1, p. 80-89, 1995.

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, jul, p. 21-26, 1998.

PUNCHARD, N.A.; KELLY, F.J., eds. **Free radicals: A practical approach**. New York: Oxford University Press, 1996. 310 p.

RAO, P.V.L.; BHATTACHARY, R.; PARIDA, M.M. , JANA, A.M.; BHASKAR, A.S.B. Freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UTEX 2385) induced DNA damage in vivo and in vitro. **Environ. Toxicol. Phar.**, v. 5, p. 1-6, 1998.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pacrômicos e estudo de diversos fatores. **Mem. Inst. Butantan**, v. 20, p. 315-328, 1947.

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

SAITO, K.; ISHII, H.; NISHIDA, F.; SAITO, H.; ABE, T.; YOSHIMASA, T. Purification of microcystins by DEAE and C₁₈ cartridge chromatography. **Toxicon**. v. 40, p. 97-101, 2002.

SAITO, T.; OKANO, K.; PARK, H.; ITAYAMA, T.; INAMORI, Y.; NEILAN, B.A.; BURNS, B.P.; SUGIURA, N. Detection and sequencing of the microcystin LR-degrading gene, mlrA ,from new bacteria isolated from Japanese lakes. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 229, p. 271-276, 2003.

SAWYER, D. W.; DONOWITZ, G.R.; MANDELL, G.L. Polymorphonuclear neutrophils: an effective antimicrobial force. **Rev. Infect. Dis.** v. 11, p. S1532-S1542, 1989. *apud* **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, v. 50, n. 1, p. 80-89, 1995.

- SCHAEFFER, D.J.; MALPAS, P.B.; BARTON, L.L. Risk Assessment of Microcystin in Dietary *Aphanizomenon flos-aquae*. **Ecotox. Environ. Safe.**, v. 44, p. 73-80, 1999.
- SCHELEIMER, R.P.; FREELAND, H.S.; PETERS, S.P.; BROWN, K.E.; DERSE, C.P. An assessment of the effects of glucocorticoids on degranulation, chemotaxis, binding to vascular endothelium and formation of leukotriene B₄ by purified human neutrophils. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 250, p. 598-605, 1989.
- SHEN, P.P.; ZHAO, S.W.; ZHENG, W.J.; HUA, Z.C.; SHI, Q.; LIU, Z.T. Effects of cyanobacteria bloom extract on some parameters of immune function in mice. **Toxicol. Lett.**, v. 143, p. 27-36, 2003.
- SPOOF, L.; KARLSSON, K.; MERILUOTO, J. High-performance liquid chromatographic separation of microcystins and nodularin, cyanobacterial peptide toxins, on C₁₈ and amide C₁₆ sorbents. **J. Chromatog. A**, v. 909, p. 225-236, 2001.
- SUZAKI, E.; KOBAYASHI, H.; KODAMA, Y.; MASUJIMA, T.; TERAOKA, S. Video-rate dynamics of exocytotic events associated with phagocytosis in neutrophils. **Cell Motil. Cytoskeleton**. v. 38, p. 215-228, 1998 *apud* WEB OF SCIENCE. Disponível em: <http://isi02.isiknowledge.com/portal.cgi?DestApp=WOS&Func=Frame>. Acesso em: 10 maio 2005.
- TAKANAKA, S.; OTSU, R. Effects of L-cysteine and reduced glutathione on the toxicities of microcystin LR: the effect for acute liver failure and inhibition of protein phosphatase 2A activity. **Aquat. Toxicol.**, v. 48, p.65-68, 1999.

THELEN, M.; DEWALD, B.; BAGGIOLINI, M. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. **Physiol. Rev.**, v. 73, p. 797-821, 1993.

THOMAS, L.T.; LEHRER, R.I. Human neutrophil antimicrobial activity. **Rev. Infect. Dis.**, v. 10, suppl. 2, p. S450-456, 1988 *apud* MEDLINE. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=3055215&dopt=Abstract. Acesso em: 10 maio 2005.

TONNESEN, M.G. Neutrophil-endothelial cell interactions: Mechanisms of neutrophil adherence to vascular endothelium. **J. Invest. Dermatol.**, v. 93, n. 2, iss. S2, p. 53-58, 1989.

TSUJI, K.; WATANUKI, T.; KONDO, F.; WATANABE, M.F.; SUZUKI, S.; NAKAZAWA, H.; SUZUKI, M.; UCHIDA, H.; HARADA, K.I. Stability of microcystin from cyanobacteria. 2. Effect of UV light on decomposition and isomerization. **Toxicon**, v. 33, n. 12, p. 1619-1631, 1995.

TSUJI, K.; WATANUKI, T.; KONDO, F.; WATANABE, A.F.; NAKAZAWA, H.; SUZUKI, A.; UCHIDA, H.; HARADA, K. Stability of microcystins from cyanobacteria-iv. Effect of chlorination on decomposition. **Toxicon**, v. 35, n. 7, p. 1033-1041, 1997.

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 *apud* MEDILINE. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?>

cdm=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8681449. Acesso em 10 maio 2005.

VIEIRA, J.M.S.; AZEVEDO, M.T.P.; AZEVEDO, S.M.F.O.; HONDA, R.Y.; CORRÊA, B. Microcystin production by *Radiocystis fernandoi* (Chroococcales, Cyanobacteria) isolated from a drinking water reservoir in the city of Belém, PA, Brazilian Amazonia region. **Toxicon**, v. 42, p. 709–713, 2003.

WETZEL, R.G. **Limnologia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1993. 919 p.

WHITE, S.H.; FABBRO, L.D.; DUIVENVOORDEN, L.J. Changes in Cyanoprokaryote populations, *Microcystis* morphology, and microcystin concentrations in lake Elphinstone (Central Queensland, Austrália). **Environ. Toxicol.**, v. 18, p. 403-412, 2003.

WOELFLE, M.A.; OUYANG, Y.; PHANVIJHITSIRI, K.; JOHNSON, C.H. The adaptive value of circadian clocks: an experimental assessment in Cyanobacteria. **Current Biology**, v. 14, p. 1481-1486, 2004.

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.

ZHAN, L.; SAKAMOTO, H.; SAKURABA, M.; WU, D.; ZHANG, L.; SUZUKI, T.; HAYASHI, M.; HONMA, M. Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells. **Mutation Res.**, v. 557, p. 1-6, 2004.

ZHANG, J.H.; FERRANTE, A.; APPIGO, A.P.; DAYER, J.M. Neutrophil stimulation and priming by direct contact with activated human T-lymphocytes. **J. Immunol.**, v. 148, p. 177-181, 1992.

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

YOSHIDA, M.; YOSHIDA, T.; TAKASHIMA, Y.; KONDO, R.; HIROISHI, S. Genetic diversity of the toxic cyanobacterium *Microcystis* in Lake Mikata. **Environ. Toxicol.**, v. 20, n. 3, p. 229-234, 2005.

Anexos

ANEXOS

ANEXO I: Aprovação do Comitê de Ética FCF-USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP**

Ofício CEP nº 096/2004

São Paulo, 05 de outubro 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 04 de outubro p.p., apreciou os esclarecimentos do projeto "Estudo da produção de microcistinas pela cianobactéria *Microcystis panniformis* Komárek et al. e testes imunotoxicológicos" (Protocolo nº 256) apresentado por Vossa Senhoria, o qual foi **APROVADO** em reunião de 30 de agosto de 2004.

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,

Assinatura manuscrita em tinta preta, legível como 'Valentina Porta'.

Prof.ª Dr.ª Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP.

Orientador: Prof. Silvia Berlanga de Moraes Barros
FBC

ANEXO II: Termo de Consentimento Pós Informação

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 Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas – FCF/USP

Inscrição Conselho Regional Nº: 30812

Departamento da FCF/USP: Análises Clínicas e Toxicológicas

3. 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 consequência imediata ou tardia do estudo. Nos projetos com coleta de sangue, incluir detalhadamente, como observação as possíveis reações decorrentes desse procedimento).

Duração da Pesquisa: 02 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 azuis), 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 antiinflamatório, 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 dos seguintes ensaios imunotoxicológicos: ensaio da atividade respiratória, de quimiluminescência e migração celular no Departamento de Bioquímica do Instituto de Química 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.

Orientador da Pesquisa: Prof. Dr. Ernani Pinto Júnior – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP – Fone: (11) 3091-2197.

Autora da Pesquisa: Discente de Pós-Graduação de Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas – FCF/USP - Paula da Silva Kujbida – Fone: (11) 6979-1374.

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

OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DOS
ARTIGOS NESTE ARQUIVO