

65484
13828434104

13000

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

EFEITO DA MICROCISTINA-LR EM RIM E INTESTINO
ISOLADOS E NA SECREÇÃO DE INSULINA

ARLANDIA CRISTINA LIMA NOBRE

15-329-46
16/11/03
2003

FORTALEZA-CEARÁ

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

EFEITO DA MICROCISTINA-LR EM RIM E INTESTINO
ISOLADOS E NA SECREÇÃO DE INSULINA

ARLANDIA CRISTINA LIMA NOBRE

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, sob orientação da Prof.a. Dra. Helena Serra Azul Monteiro, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia

FORTALEZA-CEARÁ

2003

N671e Nobre, Arlandia Cristina Lima

Efeito da microcistina-LR em rim e intestino isolados e na secreção de insulina / Arlandia Cristina Lima Nobre. – Fortaleza, 2003.

228 f. :il.

Orientadora: Prof.a. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

1. Cyanobactérias. 2. Microcistina-LR.
3. Macrófagos. 4. Nefrotoxicidade. 5. Secreção intestinal. 6. Secreção de insulina. I. Título.

CDD 589.46

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Esta tese foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade federal do ceará, e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca Setorial da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Arlandia Cristina Lima Nobre

Aprovada em 27-02-2003

Banca Examinadora:

n n n n n

Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama

Prof. Dr. Krishnamurti Moraes de Carvalho

Profa. Dra. Elisabete Amaral de Moraes

Prof. Dr. Aldo Angelo Moreira Lima

Fiel aos seus ideais o cientista poderá, no crepúsculo da sua jornada e com o pensamento na humanidade, dizer como Pasteur: “é preciso que, ao aproximar-se o grande fim, cada um de nós possa dizer: fiz o que pude” tanto na construção do edifício da ciência, quanto no da sociedade – feliz, pacífica, justa, humana enfim.

(José Reis)

A Deus que, com sabedoria, mostra-nos o verdadeiro caminho.

Aos meus pais, Argemiro Nobre e Isabel Nobre,
por fazerem tudo valer a pena

AGRADECIMENTOS

- À Profª. Dra. Helena Serra Azul Monteiro, pela orientação científica e efetiva participação durante todas as etapas deste trabalho. Pela amizade e confiança.
- Ao Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles, pela orientação e apoio imprescindíveis na elaboração científica desta pesquisa.
- Ao Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, que muito contribuiu cientificamente.
- Ao Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama, pela colaboração no estudo da secreção de insulina.
- À profª. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo, pela colaboração no estudo da embriotoxicidade.
- Aos Amigos Alexandre Havt, Alice Martins, Sandra Nunes, Manoel Serra Azul, Nilberto Falcão e Regina Feitosa, pela colaboração em etapas desta pesquisa, de forma desinteressada, pelo simples prazer de ajudar.
- À técnica de laboratório Maria Sílvia Helena Freire França, cujo suporte técnico foi de fundamental importância, pela eficiência e elevado padrão de trabalho.
- Ao Farmacêutico-Bioquímico Domingos Barreto de Oliveira, pela execução cuidadosa dos ensaios bioquímicos.
- Aos funcionários da Unidade de Pesquisas Clínicas, Kátia Maria L. Nogueira, Fabiana Maria da Silva, José A. de Souza, Jociê Andrade da Silva, Bento F. de Oliveira, Joana M. Tavares e Terezinha F. França, que, de uma forma ou de outra, prestaram-me uma ajuda muito importante.
- Aos estudantes de graduação, pela colaboração na parte experimental.

- Aos colegas de pós-graduação da Unidade de Pesquisas Clínicas, pela amizade.
- À Sílvia Maria A. de Lima, pelo apoio junto à coordenação do curso em Farmacologia.
- À Bibliotecária Norma Carvalho Linhares, pela paciente orientação nas referências bibliográficas.
- A todos os professores, colegas de doutorado, técnicos e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.
- Ao meu irmão Heráclito Nobre, e demais familiares, pela solidariedade e amizade.
- Ao meu namorado Manoel Hozanan de Moraes Filho, pelo apoio incondicional e estímulo.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xx
RESUMO.....	xxv
ABSTRACT.....	xxvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Cianobactéria.....	2
1.2. Microcistina.....	5
1.3. Toxicidade da microcistina.....	13
1.4. Relatos de casos de envenenamento de animais.....	16
1.5. Relatos de casos de envenenamento de humanos.....	17
1.6. Toxicidade hepático.....	21
1.7. Toxicidade renal.....	22
1.8. Fisiologia da mucosa intestinal.....	25
1.9. Secreção de insulina.....	27
1.10. Envolvimento de macrófagos.....	28
1.11. Justificativa.....	31
2. OBJETIVOS.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1. Estudo da microcistina-LR no modelo de anel de aorta.....	37
3.1.1. Animais.....	37

3.1.2. Toxina.....	37
3.1.3. Anel de aorta isolado de rato.....	37
3.2. Cultura de macrófagos peritoneais.....	38
3.2.1. Animais.....	38
3.2.2. Substâncias utilizadas.....	39
3.2.3. Meio de cultura.....	39
3.2.4. Pré-tratamento.....	40
3.2.5. Obtenção dos macrófagos peritoneais.....	40
3.2.6. Viabilidade celular.....	41
3.3. Perfusão renal.....	43
3.3.1. Animais.....	43
3.3.2. Substâncias utilizadas.....	43
3.3.3. Solução perfusora.....	44
3.3.4. Sistema de perfusão de rim isolado.....	44
3.3.5. Técnica cirúrgica.....	48
3.3.6. Calibração do sistema.....	50
3.3.7. Protocolo experimental.....	52
3.3.8. Grupos experimentais.....	52
3.3.9. Análise bioquímica.....	54
3.3.10. Parâmetros funcionais renais.....	55
3.4. Cultura de macrófagos intestinais.....	59
3.4.1. Animais.....	59
3.4.2. Substâncias utilizadas.....	60
3.4.3. Meio de cultura.....	60
3.4.4. Obtenção dos macrófagos da lâmina própria.....	61
3.5. Alça isolada de rato.....	64

3.5.1. Animais.....	64
3.5.2. protocolo experimental.....	64
3.6. Perfusão intestinal.....	65
3.6.1. Animais.....	65
3.6.2. Solução perfusora.....	66
3.6.3. Sistema de perfusão intestinal.....	66
3.6.4. Grupos experimentais.....	67
3.6.5. Análises bioquímicas.....	68
3.7. Embricitotoxicidade.....	70
3.7.1. Desenvolvimento embrionário de ovos de ouriço.....	70
3.8. Secreção de insulina.....	74
3.8.1. Animais.....	74
3.8.2. Ilhotas de Langerhans.....	74
3.8.2.1. Medida da secreção de insulina.....	74
3.8.3. Dosagem de insulina.....	76
3.9. Análises estatísticas.....	77
4. RESULTADOS.....	78
4.1. Efeito da microcistina no modelo de anel de aorta.....	79
4.2. Perfusão renal.....	80
4.2.1. Efeito do sobrenadante de macrófagos sem estímulo.....	80
4.2.2. Efeitos renais do sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR.....	80
4.2.3. Efeito do inibidor de síntese protéica (ciclohexamida) sobre o efeito renal induzido pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR.....	82

4.2.4. Efeito dos inibidores de fosfolipase A ₂ sobre o efeito renal induzido pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR.....	83
4.2.5. Efeito do inibidor de fator de necrose tumoral (TNF- α) sobre o efeito renal induzido pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR.....	84
4.3. Efeito na alça intestinal isolada de rato.....	109
4.4. Efeito na perfusão intestinal.....	112
4.5. Embriotoxicidade.....	122
4.6. Efeito da microcistina na secreção de insulina.....	123
5. DISCUSSÃO.....	125
6. CONCLUSÕES.....	147
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149
8. ANEXOS.....	201
8.1. Tabelas.....	202
8.2. Trabalhos publicados.....	227

LISTA DE ABREVIATURAS

CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CICLO	Ciclohexamida
DEXA	Dexametasona
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FU	Fluxo urinário
h	Hora
IL	Interleucina
KCl	Cloreto de potássio
KDa	Quilodalton (S)
MCLR	Microcistina-LR
min	Minuto
mL	Mililitros
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PP	Pressão de perfusão
PP1	Proteína fosfatase tipo 1
PP2A	Proteína fosfatase tipo 2A
%TNa ⁺	Percentual de transporte de sódio
%pTNa ⁺	Percentual de transporte proximal de sódio
%TK ⁺	Percentual de transporte de potássio
%pTK ⁺	Percentual de transporte proximal de potássio
QUINA	Quinacrina
RFG	Ritmo de filtração glomerular

RPMI	Meio de cultura
RVR	Resistência vascular renal
SOBMØS	Sobrenadante de macrófagos
TALI	Talidomida
TC	Toxina da cólera
TNF	Fator de necrose tumoral
vs	Versus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Florescência.....	3
Figura 2- Microscopia eletrônica da <i>Microcystis aeruginosa</i>	6
Figura 3- Estrutura da microcistina-LR.....	9
Figura 4- Obtenção e manuseio de macrófagos peritoneais.....	42
Figura 5- Esquema do sistema de perfusão de rim isolado.....	47
Figura 6- Técnica cirúrgica.....	49
Figura 7- Retas de calibração da velocidade da bomba vs pressão de perfusão.....	50
Figura 8- Retas de calibração da velocidade da bomba vs fluxômetro.....	51
Figura 9- Retas de calibração da velocidade da bomba vs fluxo.....	51
Figura 10- Obtenção e manuseio de macrófagos da lâmina própria.....	63
Figura 11- Esquema do sistema de perfusão intestinal.....	69
Figura 12- Coleta de gametas de ouriço.....	72
Figura 13- Fotomicrografias das primeiras fases do desenvolvimento embrionário do ouriço <i>Lytechinus variegatus</i>	73
Figura 14- Obtenção das ilhotas de Langerhans e secreção de insulina.....	75
Figura 15- Efeito da microcistina-LR em anel de aorta isolado de rato.....	79
Figura 16- Ação do inibidor de síntese protéica sobre a pressão de perfusão (PP) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR).....	85

Figura 17- Ação do inibidor de síntese protéica sobre a resistência vascular renal (RVR) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR)..	86
Figura 18- Ação do inibidor de síntese protéica sobre o fluxo urinário (FU) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR).....	87
Figura 19- Ação do inibidor de síntese protéica sobre o ritmo de filtração glomerular (RFG) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR).....	88
Figura 20- Ação do inibidor de síntese protéica sobre o percentual de transporte de sódio (%TNa ⁺) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR).....	89
Figura 21- Ação do inibidor de síntese protéica sobre o percentual de transporte de sódio proximal (%pTNa ⁺) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR).....	90
Figura 22- Ação do inibidor de síntese protéica sobre o percentual de transporte de potássio (%TK ⁺) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR).....	91
Figura 23- Ação do inibidor de síntese protéica sobre o percentual de transporte de potássio proximal (%pTK ⁺) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR).....	92

Figura 24- Ação dos inibidores de fosfolipase A ₂ sobre pressão de perfusão (PP) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR).....	93
Figura 25- Ação dos inibidores de fosfolipase A ₂ sobre resistência vascular renal (RVR) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR)..	94
Figura 26- Ação dos inibidores de fosfolipase A ₂ sobre fluxo urinário (FU) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR).....	95
Figura 27- Ação dos inibidores de fosfolipase A ₂ sobre o ritmo de filtração glomerular (RFG) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR).....	96
Figura 28- Ação dos inibidores de fosfolipase A ₂ sobre o percentual de transporte de sódio (%TNa ⁺) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR).....	97
Figura 29- Ação dos inibidores de fosfolipase A ₂ sobre o percentual de transporte de sódio proximal (%pTNa ⁺) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR).....	98
Figura 30- Ação dos inibidores de fosfolipase A ₂ sobre o percentual de transporte de potássio (%TK ⁺) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR).....	99

Figura 31- Ação dos inibidores de fosfolipase A ₂ sobre o percentual de transporte de potássio proximal (%pTK ⁺) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR).....	100
Figura 32- Ação do inibidor de TNF sobre a pressão de perfusão (PP) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR).....	101
Figura 33- Ação do inibidor de TNF sobre a resistência vascular renal (RVR) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR).....	102
Figura 34- Ação do inibidor de TNF sobre fluxo urinário (FU) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR).....	103
Figura 35- Ação do inibidor de TNF sobre ritmo de filtração glomerular (RFG) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR)..	104
Figura 36- Ação do inibidor de TNF sobre o percentual de transporte de sódio (%TNa ⁺) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR).....	105
Figura 37- Ação do inibidor de TNF sobre o percentual de transporte de sódio proximal (%pTNa ⁺) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR).....	106
Figura 38- Ação do inibidor de TNF sobre o percentual de transporte de potássio (%TK ⁺) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR).....	107

Figura 39- Ação do inibidor de TNF sobre o percentual de transporte de potássio proximal (%pTK ⁺) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR).....	108
Figura 40- Efeito intestinal da toxina da cólera, microcistina-LR (MCLR) e sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR (1µg/mL) em modelo de alça isolada de rato.....	111
Figura 41- Efeito no transporte de sódio da toxina da cólera e microcistina-LR na ausência e presença de pré-tratamento com toxina da cólera.....	114
Figura 42- Efeito no transporte de potássio da toxina da cólera e microcistina-LR na ausência e presença de pré-tratamento com toxina da cólera.....	115
Figura 43- Efeito no transporte de água da toxina da cólera e microcistina-LR na ausência e presença de pré-tratamento com toxina da cólera.....	116
Figura 44- Efeito no transporte de cloreto da toxina da cólera e microcistina-LR na ausência e presença de pré-tratamento com toxina da cólera.....	117
Figura 45- Efeito no transporte de sódio do sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR.....	118
Figura 46- Efeito no transporte de potássio do sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR.....	119
Figura 47- Efeito no transporte de água do sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR.....	120
Figura 48- Efeito no transporte de cloreto do sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR.....	121

Figura 49- Secreção de insulina na presença e ausência de microcistina-LR	124
Figura 50- Esquema do mecanismo de ação da microcistina-LR (MCLR) em células β pancreáticas.....	146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição da solução salina tamponada com fosfato (PBS).....	65
Tabela 2- Pressão de perfusão (mmHg) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1 µg/mL) na presença de ciclohexamida (CICLO).....	202
Tabela 3- Resistência vascular renal (mmHg/mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1 µg/mL) na presença de ciclohexamida (CICLO).....	203
Tabela 4- Fluxo urinário (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1 µg/mL) na presença de ciclohexamida (CICLO).....	204
Tabela 5- Ritmo de filtração glomerular (mmHg/mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1 µg/mL) na presença de ciclohexamida (CICLO).....	205
Tabela 6- Percentual de transporte de sódio dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1 µg/mL) na presença de ciclohexamida (CICLO).....	206

Tabela 7- Percentual de transporte proximal de sódio dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1 µg/mL) na presença de ciclohexamida (CICLO).....	207
Tabela 8- Percentual de transporte potássio dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1 µg/mL) na presença de ciclohexamida (CICLO).....	208
Tabela 9- Percentual de transporte proximal de potássio dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1 µg/mL) na presença de ciclohexamida (CICLO).....	209
Tabela 10- Pressão de perfusão (mmHg) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR-1 µg/mL) na presença de dexametasona (DEXA) e quinacrina (QUINA).....	210
Tabela 11- Resistência vascular renal (mmHg/mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR-1 µg/mL) na presença de dexametasona (DEXA) e quinacrina (QUINA).....	211
Tabela 12- Fluxo urinário (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR-1 µg/mL) na presença de dexametasona (DEXA) e quinacrina (QUINA).....	212

Tabela 13- Ritmo de filtração glomerular ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR-1 $\mu\text{g/mL}$) na presença de dexametasona (DEXA) e quinacrina (QUINA).....	213
Tabela 14- Percentual de transporte de sódio dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR-1 $\mu\text{g/mL}$) na presença de dexametasona (DEXA) e quinacrina (QUINA).....	214
Tabela 15- percentual de transporte proximal de sódio dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR-1 $\mu\text{g/mL}$) na presença de dexametasona (DEXA) e quinacrina (QUINA).....	215
Tabela 16- percentual de transporte de potássio dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR-1 $\mu\text{g/mL}$) na presença de dexametasona (DEXA) e quinacrina (QUINA).....	216
Tabela 17- percentual de transporte proximal de potássio dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR-1 $\mu\text{g/mL}$) na presença de dexametasona (DEXA) e quinacrina (QUINA).....	217
Tabela 18- Pressão de perfusão (mmHg) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1 $\mu\text{g/mL}$) na presença de talidomida (TALI).....	218

Tabela 19- Resistência vascular renal ($\text{mmHg/mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - $1 \mu\text{g/mL}$) na presença de talidomida (TALI).....	219
Tabela 20- Fluxo urinário ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - $1 \mu\text{g/mL}$) na presença de talidomida (TALI).....	220
Tabela 21- Ritmo de filtração glomerular ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - $1 \mu\text{g/mL}$) na presença de talidomida (TALI).....	221
Tabela 22- Percentual de transporte de sódio dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - $1 \mu\text{g/mL}$) na presença de talidomida (TALI).....	222
Tabela 23- Percentual de transporte proximal de sódio dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - $1 \mu\text{g/mL}$) na presença de talidomida (TALI).....	223
Tabela 24- Percentual de transporte de potássio dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - $1 \mu\text{g/mL}$) na presença de talidomida (TALI).....	224

Tabela 25- Percentual de transporte proximal de potássio dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1 µg/mL) na presença de talidomida (TALI).....	225
Tabela 26- Efeito intestinal da toxina da cólera, microcistina-LR e sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR em modelo de alça isolada de rato.....	110
Tabela 27- Efeito no transporte de sódio, potássio, água e cloreto da toxina da cólera e microcistina-LR na ausência e presença de pré-tratamento com toxina da cólera (TC+MCLR).....	226
Tabela 28- Efeito da microcistina-LR no desenvolvimento de ovos de ouriço do mar <i>Lytechinus variegatus</i>	122

RESUMO

EFEITO DA MICROCISTINA-LR EM RIM E INTESTINO ISOLADOS E NA SECREÇÃO DE INSULINA. Arlandia Cristina Lima Nobre. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2003. Orientadora Helena Serra Azul Monteiro.

A microcistina-LR é uma toxina de cianobactéria amplamente distribuída nos reservatórios de água e que representa grande risco para a saúde de animais e humanos. Neste trabalho avaliou-se o efeito da microcistina-LR em anel de aorta isolado de rato nas doses de 1, 3, 10, 30, 100 e 300 ng/mL, os efeitos renais induzidos por sobrenadante de macrófagos estimulados com esta toxina (1µg/mL), o efeito secretório induzido por microcistina-LR (1µg/mL) e sobrenadante de macrófagos ativados em alça isolada e perfusão intestinal, além da atividade antimitótica e teratogênica da microcistina-LR em ouriço do mar, assim como, a atividade na secreção de insulina utilizando ilhotas de Langerhans isoladas. Observou-se que a toxina não exerceu nenhum efeito no modelo de anel de aorta isolado nas doses utilizadas. Por outro lado, o sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina mostrou-se capaz de alterar de modo significativo (*p<0,05), a pressão de perfusão, resistência vascular renal, fluxo urinário, ritmo de filtração glomerular, percentual de transporte de sódio e percentual de transporte proximal de sódio e potássio no modelo de rim isolado. Os bloqueadores farmacológicos, ciclohexamida (10^{-5} M), dexametasona (10^{-5} M) e quinacrina (10^{-5} M) bloquearam a maioria das alterações renais observadas, enquanto talidomida ($1,5 \times 10^{-5}$ M) reverteu apenas o efeito na resistência vascular renal. Estes resultados sugerem que macrófagos estimulados com microcistina-LR liberam mediadores capazes de promover nefrotoxicidade *in vitro*. Evidenciou-se também que a microcistina-LR assim como, o sobrenadante de macrófagos estimulados com esta toxina, induzem secreção de água e de eletrólitos (sódio, potássio e cloreto) de modo semelhante à toxina da cólera, em alça isolada e perfusão intestinal. Por outro lado, a toxina não provocou nenhuma alteração no desenvolvimento embrionário de ouriço do mar *Lytechinus variegatus*, entretanto, mostrou-se capaz de potencializar a secreção de insulina induzida por glicose, associado à provável apoptose das células β pancreáticas. Portanto, os dados deste trabalho sugerem que macrófagos estimulados com microcistina-LR, induzem a liberação de mediadores protéicos, capazes de provocar nefrotoxicidade e secreção intestinal. Ademais, a toxina é capaz de atuar na secreção de insulina provavelmente pelo aumento do influxo de cálcio.

Palavras-chave: Microcistina-LR, macrófagos, nefrotoxicidade, secreção intestinal, secreção de insulina.

ABSTRACT

THE EFFECTS MICROCYSTIN-LR IN THE ISOLATED KIDNEY AND INTESTINE AND INSULIN SECRETION. Arlandia Cristina Lima Nobre. Doutoral Thesis – Medicine Faculty – Federal University of Ceara, 2003.

Microcystin -LR is a toxin produced by freshwater cyanobacteria widely spread in water reservoirs, representing a health risk to animals and humans. In this work it was investigated the effects of mycrocystin-LR (MCLR) in the isolated aorta rings using the doses of 1, 3, 10, 30, 100 and 300 ng/mL; the renal effects of the supernatant from macrophages stimulated by this toxin (1 µg/mL); intestine water and electrolytes secretion induced by MCLR (1 µg/mL) and by the supernatant of activated macrophages in isolated loop and isolated perfused intestine; the antimitotic and theratogenic activity of MCLR in sea urchin *Lytechinus variegates* eggs; as well as insulin secretion using isolated Langerhans islets. It was observed that microcystin-LR did not cause any alteration in the isolated aorta rings method. On the other hand, the supernatant of MCLR activated macrophages altered significantly ($*p<0,05$) the renal perfusion pressure, renal vascular resistance, urinary flow, glomerular filtration rate, the percentage of sodium tubular transport and the percentage of proximal sodium and potassium tubular transport after using the isolated perfused rat kidney method. Cycloheximide (10^{-5} M), dexamethasone (10^{-5} M) and quinacrine (10^{-5} M) blocked almost all renal alterations promoted by microcystin, while thalidomide (1.5×10^{-5} M) reverted only the effects in renal vascular resistance. These results suggest that microcystin-LR induced activated macrophages to liberate some mediators, which promoted *in vitro* nephrotoxicity. It was also demonstrated that microcystin-LR and the supernatant of macrophages stimulated by this toxin induced water and electrolytes (sodium, potassium and chloride) intestine secretion in a similar pattern to cholera toxin, using isolated loop and intestine perfusion. Microcystin-LR did not altered the embryonic growing rate of the sea urchin *Lytechinus variegates* eggs and larval stage, however, it was able to increase glucose induced insulin secretion associated to pancreatic β cells apoptosis. Therefore, these data suggest that macrophages, stimulated by microcystin-LR, induced protein mediator release, which were able to cause nephrotoxicity and intestine secretion. In addition, this toxin was capable to cause insulin secretion of pancreatic cells, probably by the increase of calcium influx.

Keywords – microcystin-LR, macrophages, nephrotoxicity, intestine secretion, insulin secretion.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cianobactéria

As cianobactérias são organismos extremamente antigos, considerados os primeiros colonizadores da terra no curso da evolução biológica (SCHOPT, 1993), distribuídas em todo o mundo e que freqüentemente apresentam crescimento maciço na superfície da água, resultando em danos extensivos à saúde de animais e humanos, inclusive morte (HOOSER e cols., 1989; FALCONER e cols., 1994).

As condições favoráveis para o desenvolvimento das cianobactérias são águas com temperatura entre 15 a 30° C, presença de vento suave, pH neutro a alcalino (entre 6 a 9), presença de nutrientes contendo nitrogênio e fósforo, produzidos por causas antropogênicas, entre elas, poluição industrial, detritos, uso de detergentes e fertilizantes (BRITTAIN e cols., 2000; BISCHOFF, 2001).

A análise de amostras de água coletadas na Antártica nos verões de 1997 a 1999 mostrou a presença das hepatotoxinas, nodurarina e microcistina, demonstrando que espécies produtoras de toxinas também podem ser encontradas sob essas condições ambientais (HITZFELD e cols., 2000).

As florações de cianobactérias (Figura 1), já registradas em diversos reservatórios, açudes, lagos e lagoas brasileiros, ocorrem em geral em ambientes eutrofizados, caracterizados pelo aumento de nutrientes

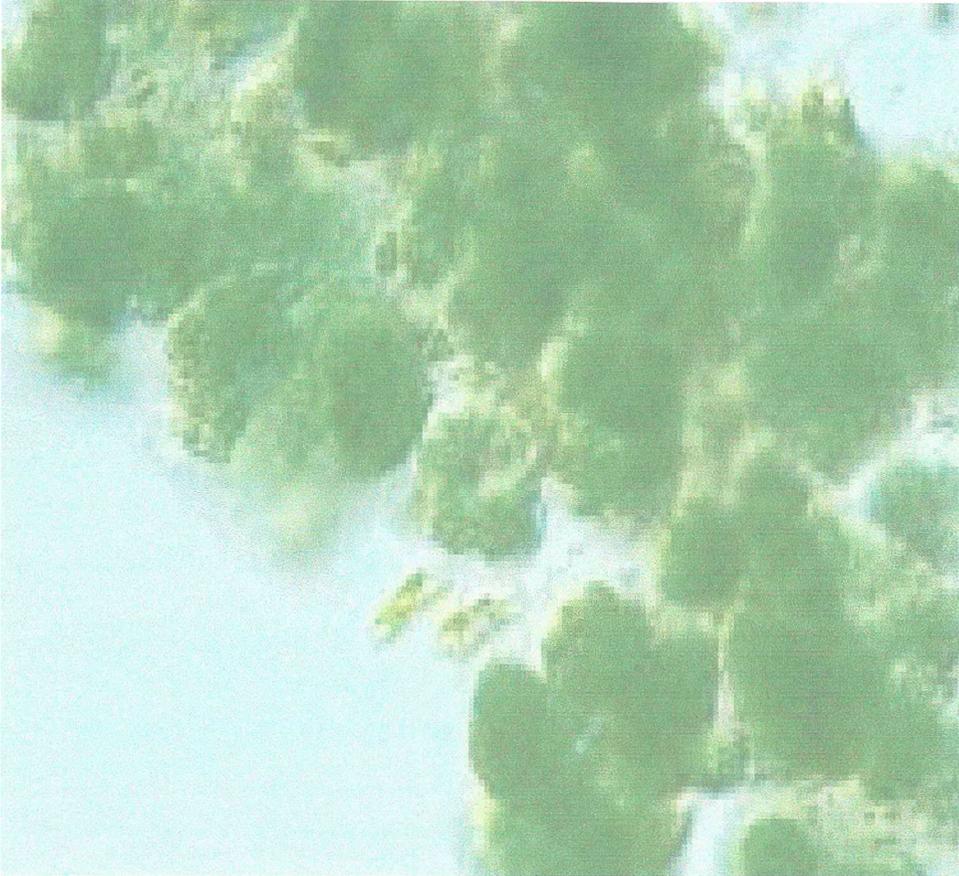


Figura 1-Florescência

dependentes de poluição. Costumam estar envolvidos em florações os gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon* e, em casos mais recentes, *Cylindrospermopsis* (BOUVY e cols., 1999).

As proliferações excessivas (florações) em ambientes aquáticos têm conseqüências negativas para esses ecossistemas, redução da penetração da luz, além de odor e/ou sabor da água desagradável. Os principais problemas, no entanto, decorrem das neurotoxinas e hepatotoxinas que esses organismos produzem e liberam no ambiente com efeitos farmacologicamente diferentes (FALCONER 1996).

A cianobactéria *Anabaena* produz um alcalóide neurotóxico chamado anatoxina-a. Este composto atua como um agente bloqueador neuromuscular pós-sináptico, causando morte por paralisia respiratória progressiva dentro de minutos ou horas (CARMICHAEL e cols., 1979, WHO, 1998).

Uma segunda neurotoxina de *Anabaena* é um potente anticolinesterásico chamado anatoxina-a (s). Os efeitos do envenenamento são salivação excessiva e lacrimejamento com ataxia e diarreia. A sua molécula é muito semelhante a de um inseticida organofosforado.

O terceiro grupo de neurotoxinas de *Anabaena* foi identificado na Austrália em 1994 e incluem saxitoxina, neosaxitoxina e uma série de goniautoxinas, todas potentes alcalóides bloqueadores dos canais de sódio

ue inibem a despolarização axonal e dessa forma, a transmissão do impulso nervoso (HUMPAGE e cols., 1994).

As hepatotoxinas de cianobactérias podem ser divididas em dois grupos, peptídeos cíclicos de *Microcystis* e *Nodularia* e alcalóides de *Cylindrospermopsis raciborskii*. Os peptídeos cíclicos são um grupo de heptapeptídeos chamados microcistinas e pentapeptídeos chamados nodularinas. A especificidade pelo órgão depende largamente de dois fatores, a via pela qual a toxina entra no organismo e a habilidade das células para absorver a toxina (CARMICHAEL, 1997).

2. Microcistina

As microcistinas são uma família de potentes peptídeos tóxicos (DL 50 I.P. em camundongos 50-60 µg/mL/kg de peso corpóreo) (BOTES e cols., 1985) produzidas por cianobactérias dos gêneros *Nabaena*, *Microcystis*, *Oscillatoria* e *Nostoc*. São extremamente estáveis e resistentes à hidrólise química ou oxidação em pH próximo ao neutro. Entretanto, podem ser oxidadas pelo ozônio e outros agentes e degradadas pela intensa luz ultravioleta (UV) (Figura 2).

As microcistinas são heptapeptídeos monocíclicos constituída de dois L-aminoácidos variáveis, leucina e arginina para a microcistina-LR, e dois D-aminoácidos, alanina, γ ácido glutâmico e eritro-β-ácido etilaspártico e aminoácidos não usuais, N-metildehidroalanina e 3-amino-

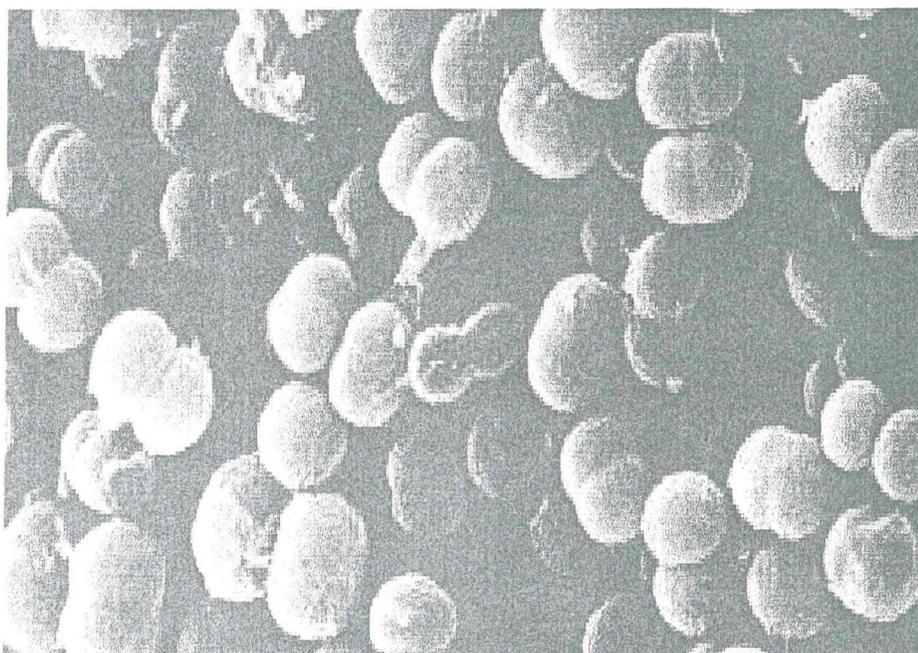


Figura 2- Microscopia eletrônica da *Microcystis aeruginosa*

9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetil-deca 4(E), 6(E)- ácido dienóico (Adda) (NISHIWAKI-MATSUHIMA e cols., 1991), com peso molecular entre 0,9 e 1,0 KD (COÊLHO, 1998) (FIGURA 3).

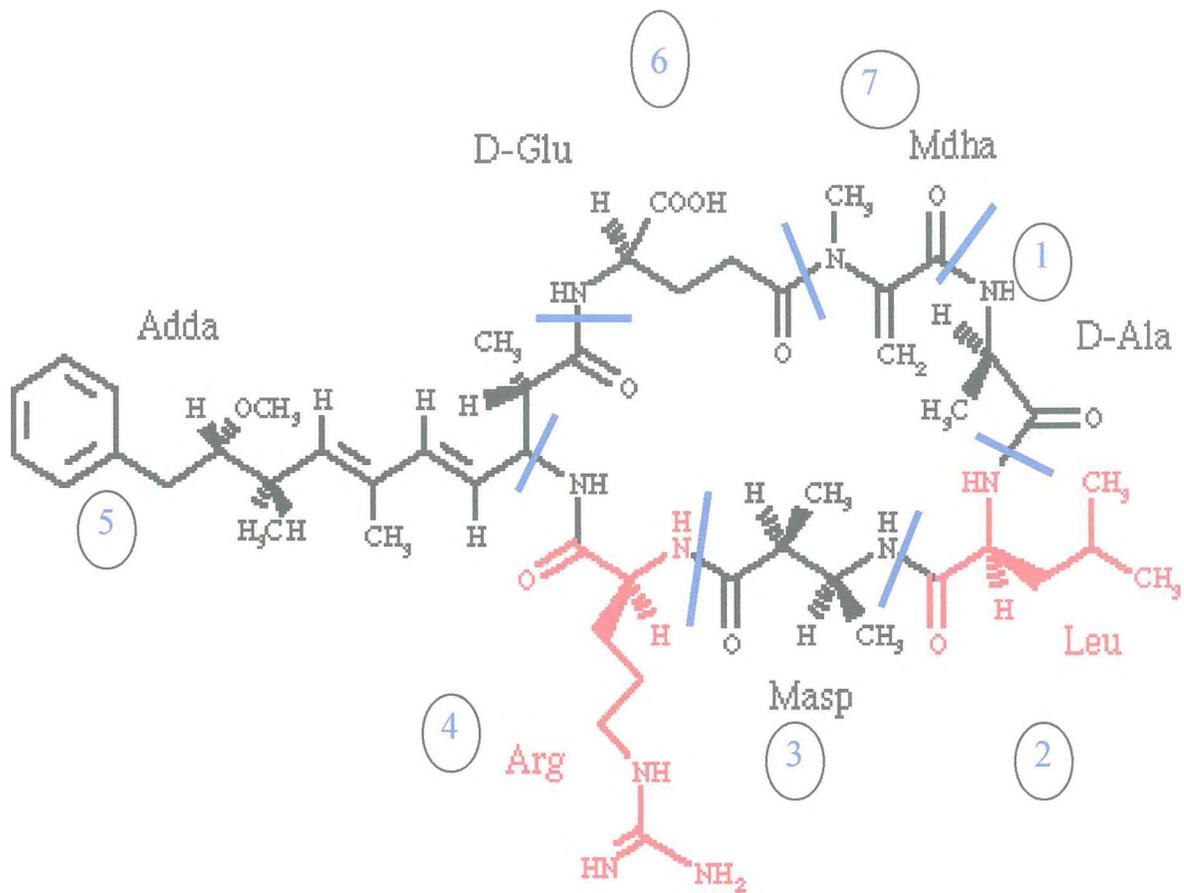
Cerca de 60 variantes estruturais de microcistinas têm sido caracterizadas (CARMICHAEL, 1997; SIVONEN; JONES, 1999). A variação estrutural tem sido relatada em todos os sete aminoácidos, entretanto ocorre mais freqüentemente a substituição dos dois L-aminoácidos variáveis das posições 2 e 4, e desmetilação do aminoácido da posição 3 e/ou 7.

O único aminoácido hidrofóbico, Adda (CARMICHAEL e cols., 1988) e resíduos de glutamina da molécula de microcistina-LR têm importante papel na hepatotoxicidade das microcistinas (STOTTES e cols., 1993). A porção 4(E),6(E) de Adda da estrutura da microcistina parece importante na interação com as proteínas fosfatases, e dessa forma tem relação com o potencial de promoção, de tumor desta toxina (NISHIWAKI-MATSUSHIMA e cols., 1991).

As microcistinas são sintetizadas e mantidas nas células de cianobactérias e, durante o envelhecimento das florações ou morte celular, são liberadas na água. Alguns processos de tratamentos de água utilizados na atualidade (floculação, sedimentação, filtração em areia e adição de cloro) causam danos às células das cianobactérias e em consequência, aumentam a concentração de toxinas no reservatório, podendo acarretar

danos à saúde de animais e humanos, com grandes prejuízos à sociedade, sendo portanto, um problema de saúde pública (HIMBERG e cols., 1989).

Sabe-se que as microcistinas são quimicamente estáveis (HARADA, 1995; HARADA e cols., 1996) e se não forem diluídas, podem persistir na água por vários dias ou semanas (LAHTI e cols., 1997). Harada (1995) sugeriu uma possível via de detoxificação da microcistina através de vários processos como diluição com massa de água não contaminada, adsorção no material particulado, decomposição dependente de pH e temperatura, fotólise e degradação biológica.



1- D-ala: alanina

2- Leu: leucina

3- Masp: eritro- β -ácido metilaspártico,

4- Arg: argenina

5- Adda: 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetildeca-4,6-ácido dienóico

6- D-Glu: γ ácido glutâmico

7- Mdha: N-metildehidroalanina

Figura 3- Estrutura da microcistina-LR. Peso Molecular: 995.2.

A principal via de exposição de animais à microcistina-LR é o consumo oral de células de cianobactérias que possuem toxina intracelular ou água contendo a toxina dissolvida. Após a ingestão, a absorção da microcistina ocorre nos intestinos, no jejuno por difusão passiva, entretanto pode ser preferencialmente absorvida no íleo devido a presença de carreadores específicos de ácidos biliares (BISCHOFF, 2001).

Apesar da exposição por via oral ser a mais provável, a literatura mostra que a inalação também deve ser considerada. Falconer (1996) relatou um episódio ocorrido na Austrália de intoxicação associado às florações de cianobactérias. A toxina entrou no organismo de um esquiador de água por via inalatória, o qual apresentou um quadro de dificuldade respiratória severa. Aplicação intranasal de toxina de cianobactéria tem sido demonstrada experimentalmente por ser equivalente à injeção intraperitoneal (FILTZGEORGE e cols., 1994).

As microcistinas acumulam-se em vertebrados aquáticos e invertebrados, incluindo peixes (BEATTIE e cols., 1998), mexilhões (WATANABE et al., 1997) e zooplâncton (WATANABE e cols., 1992). O envenenamento de animais por cianobactérias pode ocorrer por duas vias, direto, através do consumo de células de cianobactérias presentes na água ou indiretamente, através do consumo de outros animais que tenham alimentado-se de cianobactérias e acumulado cianotoxinas (WATANABE et al., 1997).

Atualmente, são consumidos produtos a base de algas nos Estados Unidos, Canadá e Europa por seus potentes efeitos benéficos, incluindo aumento de energia e elevação do humor. Entretanto, durante a coleta pode haver contaminação por microcistina acima dos níveis aceitáveis (1µg/g). Devido ao potencial risco de contaminação desses alimentos por essa toxina, é fundamental um aumento no controle, a fim de se evitar um grave problema de saúde pública (GILROY e cols., 2000).

A microcistina é absorvida por um mecanismo de transporte multiespecífico de ácidos biliares, o qual reconhece vários ânions orgânicos adicionais e também um grande número de polipeptídeos hidrofóbicos neutros (FRIMMER; ZIEGLER, 1988). O transportador hepatocelular é aparentemente não somente responsável pela absorção de ácidos biliares, mas também pelo clearance de vários substratos (FRIMMER, 1982; PETZINGER e cols., 1987). Um grande número de diferentes compostos entram no fígado através de transporte mediado por carreador nos hepatócitos (FRIMMER; ZIEGLER, 1988).

Bárány (1972; 1974) postulou a existência de um sistema de transporte semelhante ao hepático para a absorção de iodipamida no rim e plexo coróide, o qual era inibido por ácidos biliares.

O transportador de ácidos biliares é encontrado no intestino, fígado e células renais (FALCONER e cols., 1992; RUNNEGAR e cols., 1991; SAUVANT e cols., 2002). O mecanismo de transporte da

microcistina nos túbulos proximais renais parece ser semelhante ao das células intestinais no íleo de rato, através da membrana de borda em escova, enquanto no fígado esse transporte ocorre através da membrana sinusoidal, ambos associados ao transporte de sódio.

Estudos de afinidade revelaram entretanto, que os sais biliares ligados a polipeptídeos no íleo diferem marcadamente, com relação ao seu peso molecular, das proteínas envolvidas no transporte de sais biliares no hepatócito (BURCKHARDT e cols., 1987).

A incorporação de radioatividade na membrana de borda em escova renal é comparável àquela encontrada no íleo, ambos mostrando alta radioatividade no polipeptídeo de peso molecular aparente de 99 KDa, mas não no jejuno. Parece que uma proteína de membrana idêntica está envolvida no co-transporte de sais biliares/ Na^+ no rim e no íleo. Enquanto na membrana sinusoidal de hepatócitos é mediada por uma proteína de membrana diferente (BURCKHARDT e cols., 1987).

A microcistina-LR é rapidamente excretada, 75% dentro de 12 horas, enquanto o restante em até 6 dias (GRUPTA, 1998). A excreção da microcistina-LR pode ser feita pela bile, fezes (15%) e urina (9%). Nos rins através da filtração glomerular e secreção tubular. Presumivelmente, a saturação das células do túbulo proximal pode resultar em acúmulo da microcistina-LR no órgão (HEWITT e cols., 1991).

1.3. Toxicidade da microcistina

As microcistinas exercem seus efeitos tóxicos por interferir no principal mecanismo de transdução celular, isto é, a fosforilação reversível que é usada para o controle de uma ampla variedade de processos celulares como contração muscular, divisão celular, expressão de genes, metabolismo, memória (MUMBY; WALTER, 1993), canais iônicos, transcrição e síntese protéica (LI; DAMUNI, 1994). As microcistinas, produzidas por um complexo enzimático multifuncional (KAEBERNICK e cols., 2000), interferem com esse mecanismo de transdução pela inibição da proteína fosfatase serina/treonina inibindo as subunidades catalíticas tipo 1 (PP – 1c) e tipo 2A (PP – 2Ac) (HONKANEN e cols., 1990; HARDIE, 1995; TILLET e cols., 2000).

O fígado tem sido considerado o alvo primário, acumulando 50–70 % da dose de microcistina-LR total administrada por via intravenosa (I.V.) e intraperitoneal (I.P.) em experimentos animais (MERILUOTO e cols., 1990, ROBINSON e cols., 1991). No intestino e nos rins têm se observado acúmulo de quantidade significativa de microcistina-LR.

O efeito adverso predominante da microcistina-LR, que resulta da fosforilação de proteínas, é a alteração do citoesqueleto e inclui reorganização de microfilamentos (FALCONER; YEUNG, 1992) em particular contração de actina, colapso de microtúbulos (WICKSTROM e cols., 1995) e filamentos intermediários como remoção das citoqueratinas 8

e 18 em torno do núcleo (FALCONER, 1993, RUNNEGAR e cols., 1993), o que acarreta em diminuição da adesão célula-célula e invaginação na membrana plasmática (RADBERG e cols., 1991), observa-se ainda, aumento do fluxo de cálcio intracelular, incremento da atividade de fosforilase a (RUNNEGAR e cols., 1987) e liberação de ácido araquidônico (NASEEN e cols., 1988).

A destruição do parênquima e células sinusoidais causam hemorragia intra-hepática letal e/ou insuficiência hepática. Microcistina reduz a quantidade de citocromo P-450 e b5, o qual aumenta P-420, corroborando com conclusões que esta toxina interfere com a integridade e função da membrana (BROOKS; CODD, 1987).

A microcistina-LR induz deformidade, semelhante à dos hepatócitos, em experimentos com células intestinais isoladas (FALCONER e cols., 1992). Hemorragia no intestino também foi observada em experimentos animais (GALEY e cols., 1987). Entretanto, os efeitos no intestino não são tão severos quanto os descrito no fígado. As células intestinais são expostas a altas concentrações de microcistina-LR após exposição oral e a toxina entra no organismo presumivelmente, transportada através destas células (DAHLEM e cols., 1989).

Lesões e danos celulares têm sido observado no glomérulo e nos túbulos (HOOSER e cols., 1990). Nosso laboratório demonstrou pela primeira vez a capacidade da microcistina-LR induzir alteração dos

parâmetros funcionais em rim isolado de rato, sugerindo a participação de fosfolipase A₂ e ciclooxigenase nessa toxicidade (NOBRE e cols., 1999; 2001). Estudos renais utilizando células de cianobactérias liofilizadas também revelaram efeitos na função renal (THEISS e cols., 1988).

Kotak e cols. (1996) mostraram que células epiteliais tubulares renais de peixes (*Oncorhynchus mykiss*) também são afetadas pela microcistina. Radberg e cols. (1991) também relataram mudanças degenerativas nas células epiteliais de túbulos, glómerulo e tecido intersticial do rim de carpa (*Cyprinus carpio*). Microcistina-LR induz formação de vesículas e reorganização de organelas como filamentos intermediários, seguidos pelos microtúbulos e microfilamentos, evidenciadas a nível ultraestrutural em cultura de células renais e fibroblastos semelhantes ao que se observa em cultura de hepatócitos (KHAN e cols., 1995).

O possível dano hepático, intestinal e renal resultante da exposição à água contaminada com essas toxinas indicam a necessidade de monitoramento constante dos reservatórios de fornecimento e adequação das concentrações de segurança (FALCONER, 1996).

A microcistina-LR tem sido considerada um dos mais potentes promotores tumorais conhecidos (DRAGON e cols., 1992), tendo sido implicada na promoção de tumores da pele (FALCONER; BUCKLEY, 1989) e fígado (NISHIWAKI-MATSUSHIMA e cols., 1992; HUMPAGE e

cols., 2000). A parede do cólon apresenta um grande risco de lesão pela absorção da toxina e por ser uma via excretória, dessa forma, é um potencial sítio para a promoção de tumor ou carcinogenicidade induzida pela microcistina (HUMPAGE e cols., 2000). A inibição da proteína fosfatase tem sido apresentada como o mecanismo geral responsável por esta atividade (FUJIKI, 1992). A capacidade da microcistina promover reorganização do citoesqueleto também contribui substancialmente para promoção tumoral (NISHIWAKI-MATSUSHIMA e cols., 1992).

A toxicidade crônica devido a ingestão oral de *Microcystis* em camundongos resulta em uma degeneração generalizada do hepatócito com necrose, fibrose progressiva e infiltração de leucócitos mononucleares (ELLEMAN e cols., 1978; FALCONER e cols., 1988).

1.4. Relatos de casos de envenenamento de animais

A morte de animais pelo consumo de água contendo cianobactérias tem sido relatada em muitas partes do mundo. A primeira descrição documentada de maneira científica a cerca da intoxicação animal foi feita por Francis (1878) na cidade de Adelaide – Austrália, onde ovelhas, cães, cavalos, porcos e bovinos morreram após ingerir água do lago de Alexandria que estava contaminado com florações, de cianobactérias.

Steyn (1945) relatou que milhares de caprinos e bovinos morreram devido envenenamento por cianobactérias durante o período de 1915 a 1945 na África do Sul e observou que a cianobactéria continha uma potente hepatotoxina que era liberada quando da sua morte.

No verão de 1959, vários cães, peixes, bovinos e cavalos morreram após ingestão de água contendo cianobactérias (DILLENBERG; DEHNEL, 1960). Autópsia de dois cães revelaram fígado edemaciado e cheio de vesículas, excesso de fluido nos pulmões e inflamação no intestino (MAIN e cols., 1977). Em 1989, vinte ovelhas e quinze cães morreram após exposição à água com floração de cianobactéria contendo microcistina-LR (LAWTON; CODD, 1991).

Muitos incidentes de intoxicação animal têm ocorrido quando há o consumo de água contendo células de cianobactérias. Os sintomas geralmente são inconsciência, fraqueza, palidez das mucosas, vômitos, convulsão, diarreia, anorexia, polidipsia, choque e morte dentro de poucas horas ou dias (BEASLEY e cols., 1989; DEVRIES e cols., 1993).

1.5. Relatos de casos de envenenamento de humanos

Em 1887, na Austrália, humanos ficaram doentes provavelmente pela ação da microcistina (HAYMAN, 1992). Dez crianças apresentavam quadro de diarreia e vômitos após banhar-se em água de lagos encobertos por cianobactérias. Células de *Anabaena*, produtoras de

microcistina-LR (HARADA e cols., 1991), foram encontradas nas fezes de uma das crianças.

Nos anos de 1920 e 1940 foram observados casos de intoxicação humana que sugeriram como causa à exposição a peixes contaminados por toxinas produzidas por cianobactérias. Constatações clínicas deste envenenamento humano incluem náusea, gastroenterite, alergia, irritação, visão turva, convulsões, doença hepática e hemorragia interna (DAWSON., 1998).

Em 1930, em torno de 8.000 a 10.000 pessoas em Charleston, sofreram de uma doença intestinal aguda (TISDALE, 1931) caracterizada por dor na região do estômago, usualmente náusea e/ou vômitos, seguidos de diarreia de severidade variada. O reservatório de água apresentava floração de cianobactérias e havia sido recentemente tratado com sulfato de cobre e carvão ativado em adição ao tratamento convencional. O sulfato de cobre induziu a morte das cianobactérias e com isso promoveu a liberação de toxinas, que foram responsabilizadas pelo episódio, visto a ausência de patógenos conhecidos na água (VELDEE, 1931).

Entre 1960 e 1965 em Zimbabwe, crianças que consumiram água de fontes que continham florações de cianobactérias apresentaram gastroenterite (ZILBERG, 1966); algumas crianças apresentaram convulsão, febre e acidose respiratória. O surto acontecia anualmente no

verão, época em que as cianobacterias do gênero *Microcystis* predominavam (MARSHALL, 1991).

Incidência de gastroenterite semelhante envolvendo 138 crianças e 10 adultos ocorreu na Austrália em 1979, após o consumo de água contendo grande quantidade de cianobactérias (BYTH, 1980).

Vários casos de doença em humanos associada com água contendo floração de cianobactéria foram relatados em 1981 (BILLINGS, 1981). Um desses incidentes envolvendo doze crianças e um adulto que apresentaram quadro de gastroenterite dentro de 12 horas. As crianças encontram-se mais susceptíveis que os adultos porque ingerem uma grande quantidade de água em proporção ao seu peso corpóreo.

Na Austrália em 1983, uma floração de cianobactéria *Microcystis aeruginosa* ocorreu em um reservatório de abastecimento de água e foi tratada com sulfato de cobre (FALCONER e cols., 1983). Os moradores consumiram a água e observou-se um aumento significativo nos níveis séricos da enzima γ -glutamyltranspeptidase, um marcador hepático, indicando dano no fígado.

O principal surto letal atribuído a toxinas de cianobactérias na água de consumo foi na região de Paulo Afonso na Bahia (Brasil) em 1988, durante a construção da barragem de Itaparica, onde ocorreram 2.000 casos de gastroenterites, num período de 42 dias, quando oitenta e oito pacientes morreram (TEIXEIRA e cols., 1993).

Na Inglaterra, em 1989, oito soldados apresentaram sintomas semelhantes aos causados pelo vírus influenza após nadarem em água contendo floração de cianobactéria, sendo a *Microcystina-LR* identificada nas amostras de água (LOWTON; CODD, 1991).

Em humanos, a ingestão de toxinas produzidas por cianobactérias tem causado epidemias de gastroenterite (TEIXEIRA e cols., 1993). Reações alérgicas são relativamente comuns e têm sido descrita após contato de humanos, enquanto nadam em águas com florações de cianobactérias (CARMICHAEL; FALCONER, 1993).

Lambert e cols. (1994) relataram um caso de gastroenterite associada a cefaléia e náusea em um indivíduo que entrou em contato com águas contendo cianobactérias, e outro caso de náusea, diarréia dolorosa e vômito intenso, horas após a ingestão desta água, ambos apresentaram células de *Microcystis* nas suas fezes.

As cianobactérias são abundantes na superfície de águas de determinadas regiões da China onde a incidência de carcinoma hepatocelular em humanos é uma das maiores no mundo. Dessa forma, o câncer hepático tem sido associado às fontes de água de consumo (SHUN-ZHANG, 1989; YU, 1995).

O uso para recreação de água contaminada com *Microcystis*, *Anabaena* e outros gêneros de cianobactérias tem sido associado ao aumento da incidência de doenças em humanos em muitos países. Os

sintomas incluem dor no estômago, vômito, diarreia, febre, cefaléia, rinorréia, dores nos músculos e articulações, fraqueza, bem como irritação da pele, olhos e garganta, além de respostas alérgicas (GRUPTA, 1998).

Um incidente desastroso aconteceu em 1996 na cidade de Caruaru – PE, onde os pacientes submetidos à hemodiálise desenvolveram doença hepática colestática e setenta e nove morreram. A microcistina-LR foi encontrada no filtro da unidade de diálise, no sangue e no tecido hepático destes pacientes. Esta foi a primeira confirmação de óbitos em humanos causados por toxinas de cianobactérias (JOCHIMSEN e cols., 1998).

1.6. Toxicidade hepática

Os compostos orgânicos anfipáticos exógenos e endógenos do sistema portal são removidos pelo fígado (CATTORI e cols., 2001). O primeiro passo do processo de clearance é mediado pelo sistema de transporte ativo na membrana plasmática sinusoidal (basolateral) do hepatócito (MÉIER e cols., 1997). Estes sistemas de transporte incluem polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos como os sais biliares, esteróides, hormônios, peptídeos e drogas (KULLAK-UBLICK e cols., 2000; 2001).

A toxina da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* tem causado deformação em hepatócitos isolados de rato (RUNNEGAR e cols., 1981).

A entrada de microcistina no hepatócito ocorre rapidamente e pode ser por difusão, que parece negligenciável (RUNNEGAR e cols., 1995) ou por transporte mediado por carreador (PETZINDER e cols., 1983). Este sistema, consiste de vários sub-sistemas, e é responsável pelo transporte de ácidos biliares, assim como também é via de entrada para vários xenobióticos (FRIMMER; ZIEGLER, 1988).

Há evidências de que a entrada no hepatócito dos ácidos biliares é mediada por carreador com gasto de energia e que este transporte pode ser dependente ou independente de sódio (HARDISON e cols., 1984; OKHUMA; KURIYAMA, 1982).

1.7. Toxicidade renal

O rim é vulnerável a toxinas e venenos, devido ao alto fluxo sangüíneo e a sua capacidade de concentrar substâncias na urina (MARCONDES, 1993). As células epiteliais renais formam uma barreira que previne a entrada de patógenos na mucosa, e responde à infecções produzindo várias moléculas de defesa (POLJAKOVIC e cols., 2002) tendo, portanto, um papel importante nas respostas imunes (PARRY e cols., 2001).

Doenças inflamatórias do glomérulo são acompanhadas por mudanças na expressão de fatores de crescimento, mediadores e proteínas associadas à matriz (BECK e cols., 2001). A proliferação das células

epiteliais glomerulares é usualmente observada em glomerulonefrite e a interleucina 1 beta (IL-1 β) tem um efeito mitogênico nas células mesangiais além de ser produzido por estas células, atuando de maneira autócrina (TATEYAMA e cols., 2001).

Aukema e cols. (2002) demonstraram que fosfolipase A₂ e ciclooxigenase 1 e 2, importantes na regulação da formação de prostaglandinas ativas, têm sua produção aumentada em várias desordens renais. Schmid e Kohan (2001) mostraram a possibilidade de células epiteliais glomerulares metabolizar e liberar araquidonato na injúria renal.

Gormley e cols. (2002) demonstraram que as células tubulares proximais são vulneráveis à injúria mediada por citocinas pró-inflamatórias, incluindo entre elas IL-8, TNF- α e IL-1 β , que têm baixo peso molecular, e portanto, mais rapidamente filtradas pelo glomérulo. Células epiteliais renais podem ser ativadas por TNF- α e IL-1 β resultando em um aumento na produção de citocinas (VESEY e cols., 2002a; 2002b).

Poucos trabalhos na literatura mostram o efeito agudo da microcistina-LR no sistema renal. Recentemente demonstramos a capacidade da microcistina-LR produzir nefrotoxicidade em rim isolado de rato. A utilização deste sistema permitiu o estudo do efeito direto da toxina sem interferências sistêmicas (NOBRE e cols., 1999).

A microcistina-LR parece induzir ativação de fosfolipase A₂ e ciclooxigenase no rim de modo semelhante ao efeito observado no fígado.

As alterações renais promovidas pela microcistina-LR provavelmente ocorrem devido a danos em sítios vasculares e glomerulares (NOBRE e cols., 2001).

Fischer e cols. (2000) demonstraram alterações patológicas no rim de carpas (*Cyprinus carpio*), uma espécie de peixe que se alimenta de cianobactérias. Estes efeitos deve-se ao rápido transporte da toxina que induziu apoptose como principal mecanismo de morte celular.

Bhattacharya e cols. (1997) observaram aumento nos níveis plasmáticos de uréia e creatinina acompanhados de diminuição na excreção da lactato desidrogenase e transaminase glutâmica oxalacética indicando, possível potencial nefrotóxico de extrato de cianobactéria *Microcystis aeruginosa*.

Necrose tubular foi observada em várias espécies animais expostas à microcistina-LR (BEASLEY e cols., 2000). Esta toxina *in vitro* promove alterações dos microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários das células epiteliais renais de modo semelhante aos hepatócitos (KHAN e cols., 1996).

Milutinovic e cols. (2002) investigaram os efeitos da administração crônica de baixas doses de microcistinas nos rins e observaram lesões nos túbulos. Estes apresentavam-se danificados, dilatados e preenchidos com material eosinófilo homogêneo. Portanto, a

exposição a microcistina por longo prazo possui um risco de injúria renal que deve ser considerado.

1.8. Fisiologia da mucosa intestinal

O epitélio intestinal atua como barreira no controle de patógenos intestinais (THEODOROU e cols., 1996; KEDINGER e cols., 1998). A mucosa intestinal contém grande número de células imunocompetentes, linfócitos, macrófagos, neutrófilos, mastócitos, etc, localizadas próximo ao epitélio e geralmente associadas a estruturas nervosas (PERDUE; MCKAY, 1994).

As células imunes da lâmina própria são aptas para sintetizar determinados mensageiros químicos, metabólitos do ácido araquidônico, fator de agregação plaquetária, oxidantes, aminas biogênicas e citocinas que, por sua vez, podem alterar as funções do epitélio intestinal de forma direta ou até mesmo indiretamente, através da ativação de outros tipos celulares e/ou sistema nervoso entérico (THEODOROU e cols., 1996).

Os metabólitos do ácido araquidônico, em especial as prostaglandinas, desempenham um papel relevante na fisiopatologia das diarreias inflamatórias (STACK e cols., 1995). A principal fonte de prostaglandinas no intestino são os macrófagos e mastócitos da região subepitelial que, por sua vez, são particularmente reconhecidos como grandes produtores de eicosanóides (EBERHART; DUBOIS, 1995).

Determinadas citocinas, em especial, IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α , participam da fisiopatologia da lesão e/ou secreção intestinal. Essas moléculas possuem ações, do tipo autócrina, parácrina e endócrina, que medeiam direta ou indiretamente as alterações funcionais, locais ou sistêmicas, relacionadas com a patogênese das doenças inflamatórias no intestino (SARTOR, 1994).

O fator de necrose tumoral é uma citocina pró-inflamatória produzida por vários tipos celulares, em especial linfócitos, macrófagos e mastócitos, que compõem a lâmina própria do intestino. Esta citocina tem sido apontada como um dos mediadores inflamatórios implicados nas alterações da fisiologia epitelial (MCKAY; PERDUE, 1993).

Dentre as células imunocompetentes que compõem a mucosa intestinal, os macrófagos têm se destacado por sua elevada capacidade de sintetizar e liberar rapidamente interleucina-1 que, por sua vez, possui influência marcante na fisiopatologia da lesão e secreção intestinal (THEODOROU e cols., 1994).

As íntegrinas estão envolvidas na regulação da função celular intestinal e diferenciação (BEAULIEU, 1999). Uma grande variedade de subunidades de íntegrinas são detectadas no intestino delgado humano normal e cólon (LEE; JULIANO, 2000) e parecem ter importância na regulação da morte celular programada também no trato gastrointestinal (STAPPENBECK e cols., 1998; LEE; JULIANO, 2000).

As células da lâmina própria intestinal produzem mediadores pró-inflamatórios importantes na infiltração celular, lesão tecidual, ulceração, secreção, motilidade e fibrose intestinal (SARTOR, 1994).

1.9. Secreção de insulina

As células β pancreáticas constituem 60 a 80% da ilhota formando seu núcleo central e são relativamente fáceis de isolar e de manter em condições laboratoriais.

Sabe-se que as células β possuem vários canais, principalmente os de cálcio e potássio e que a entrada de cálcio através desses canais voltagem-dependentes é considerada primordial para estimular a secreção de insulina (WOLLHEIM e cols., 1996). As proteínas fosfatases, por sua vez, têm um papel crucial na regulação da função dos canais de cálcio (LEVITAN, 1994) e por conseguinte, na secreção de insulina (SJOHOLM e cols., 1993).

Marangoni e cols. (1995) demonstraram que as células β pancreáticas são úteis como modelo biológico para o estudo da ação fisiológica e farmacológica de toxinas. As neurotoxinas provenientes do veneno de *Crotalus durissus terrificus* atuam nas células β de ilhotas de Langerhans isoladas de rato, potencializando, em condições experimentais a secreção de insulina (TOYAMA e cols., 2000).

As fosfatases tipo 1 e 2A foram identificadas em homogenato de extrato de células de insuloma de ratos (RINm5F) através de ensaio imunoenzimático e Western blot (SJOHOLM e cols., 1993) e foi observado que apenas estas fosfatases, possuem atividade significativa quando fosforilase a, enzima fosforilada do metabolismo do glicogênio, é usada como substrato (INGEBRITSEN; COHEN, 1983).

A microcistina-LR, um inibidor específico e efetivo de fosfatase serina/treonina tipo 1 e 2A, afeta os canais de cálcio e libera insulina de células RINm5F através da inibição da atividade de proteína fosfatase extracelular, visto que a entrada da mesma na célula intacta é improvável pela ausência de transportador (LAIDLEY e cols., 1997). A existência de um sítio de ação extracelular para inibidores de fosfatases tipo 1 e 2A, explica porque a microcistina é capaz de elevar os níveis de cálcio intracelular e dessa forma, favorecer a secreção de insulina (LEIERS e cols., 2000).

3.10. Envolvimento de macrófagos

Os macrófagos fazem parte do sistema fagocitário mononuclear (OGLE e cols., 1994; LASKIN; PENDINO, 1995) sendo encontrados em praticamente todos os tecidos e fluidos do organismo (VAN FURTH, 1988). Embora apresentem a mesma origem, os macrófagos residentes em diferentes locais podem apresentar

características bioquímicas e estruturais distintas, dependendo do seu microambiente (OGLE e cols, 1994).

Dessa forma, os macrófagos podem receber diversas denominações, tais como células de Kupper (fígado), macrófagos alveolares (pulmão), macrófagos pleurais e peritoneais (cavidades serosas), células microgliais (sistema nervoso central), osteoclastos (osso), células mesangiais (rim), etc.

Os macrófagos possuem a propriedade de serem ativados por estímulos externos, e dessa forma, tornarem-se células mais responsivas. Estas células têm a capacidade de liberar uma variedade de mediadores pró-inflamatórios e citotóxicos, incluindo citocinas, enzimas hidrolíticas e mediadores lipídicos, tendo um papel fundamental na injúria tecidual (NATHAN, 1986; LASKIN; PENDINO, 1995).

Macrófagos ativados por antígenos podem liberar eicosanóides, como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (NATHAN, 1986) que atuam principalmente nos tecidos onde são produzidos (FERREIRA, 1972). O fator de necrose tumoral (TNF) é outro produto secretado por essas células e pode agir de forma autócrina estimulando a liberação de outros mediadores citotóxicos e imunoreguladores, incluindo IL-1, IL-6, PAF, prostaglandinas e fator estimulante de colônia (TRACEY e cols., 1986; BEUTLER; CERAMI, 1989; OHMANN e cols., 1990).

As fosfolipases fazem parte de uma família de enzimas que hidrolizam ácidos graxos de fosfolipídios, possuem um papel central no metabolismo de lipídios e estão intimamente relacionadas com a liberação do ácido araquidônico, precursor de lipídios ativos tais como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos (DENNIS, 1994, 2000; TAKASAKI e cols., 1999).

As fosfolipases são amplamente distribuídas e são classificadas como intracelulares e extracelulares e estão envolvidas no processo inflamatório (ARNI; WARD, 1996) pela influência na resposta vascular e no recrutamento de células inflamatórias (SERAFIN; AUSTEN, 1987).

Naseen e cols. (1990) mostraram que a microcistina intensifica a liberação de ácido araquidônico e seus metabólitos, tromboxano B₂ e prostaciclina, de cultura de hepatócitos de rato e que o pré-tratamento com glicocorticóides reduziu significativamente a liberação desses eicosanóides pela microcistina. Esta toxina foi considerada portanto, um potente agente inflamatório.

Certas atividades biológicas da microcistina podem ser dependentes da estimulação de células imunológicas. A microcistina induz a produção de TNF mediada por macrófagos. Este mediador está envolvido no choque em animais e portanto, o anticorpo anti-TNF protege camundongos contra doses letais de microcistina.

TNF- α e IL-1 são produtos da ativação de macrófagos peritoneais por extrato de cianobactérias ou microcistina de forma dose-dependente (NAKANO e cols., 1991). A microcistina-LR induz a liberação de interleucina-1 beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), por macrófagos peritoneais *in vitro* e o sobrenadante destes macrófagos induz a secreção eletrogênica em mucosa ileal de coelho (ROCHA e cols., 2000).

O flavonóide silimarim, o antibiótico rifampicina e o imunossupressor ciclosporina A evitam os efeitos tóxicos da microcistina (HERMANSKY e cols., 1991) e a proteção destes compostos, pode ser em parte, pela ação nos macrófagos, os quais, parecem participar na fisiopatologia da microcistina (ADAMS e cols., 1985; 1989). Baseado neste dados, Hermansky e cols. (1991), concluíram que a microcistina pode modular o sistema imune e/ou produzir alterações na estabilidade da membrana hepática, explicando portanto, a proteção pela ciclosporina A e rifampicina.

1.11. Justificativa

As cianobactérias são amplamente distribuídas em todo o mundo. Durante um levantamento florístico realizado em 1996 no açude Gavião, reservatório que abastece Fortaleza e a região metropolitana, foram encontrados vários gêneros de cianobactérias capazes de produzir a microcistina.

Os riscos da presença de cianobactérias em mananciais de abastecimento público precisam ser mais bem avaliados. Esse é um problema novo, até porque os efeitos da ingestão de pequenas quantidades dessas toxinas (ou de intoxicações crônicas) ainda não são bem conhecidos.

Além disso, diante de crescimento do consumo de frutos do mar e produtos a base de algas que podem estar contaminados por toxinas de cianobactérias, da ineficácia dos atuais processos de tratamento, bem como da elevada toxicidade da microcistina e óbitos tanto de animais como de humanos, é de fundamental importância o estudo do efeito desta toxina nos mais variados órgãos.

A partir dos resultados obtidos previamente, evidenciando a nefrotoxicidade induzida pela microcistina-LR no modelo de rim isolado de rato (NOBRE e cols., 1999; 2001), bem como o fato, desta toxina induzir a liberação de interleucina 1- β e fator de necrose tumoral- α por macrófagos peritoneais *in vitro* (ROCHA e cols., 2000), levantou-se a hipótese de que os efeitos renais resultam de mecanismos indiretos mediados, em parte, pela estimulação de células residentes, em especial macrófagos que, por sua vez, têm um papel de destaque na fisiologia do sistema renal. Em adição, a existência de transportadores multiespecíficos idênticos no rim e intestino, que permitem a entrada da microcistina-LR na célula (BURCKHARDT e cols., 1987) e a capacidade de sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR induzir secreção em câmara

de Üssing, levantou-se a possibilidade desta toxina afetar a função intestinal de modo semelhante ao observado no rim.

No tocante a embriotoxicidade da microcistina-LR, pouco descrita na literatura, resolveu-se testar a capacidade desta toxina induzir atividade antimitótica e teratogênica, em ouriço do mar.

As microcistinas sabidamente inibem as proteínas fosfatases tipo 1 e 2A (HONKANEN e cols., 1990), resolveu-se então, avaliar a sua participação em funções reguladas por estas fosfatases, entre elas, a secreção de insulina.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- Identificar os efeitos renais e intestinais induzidos pelo sobrenadante de macrófagos estimulados pela microcistina-LR
- Demonstrar a atividade desta toxina na vasculatura de aorta, no desenvolvimento embrionário e na secreção de insulina.
- Estudar a participação de mediadores, através de diferentes bloqueadores farmacológicos, liberados por macrófagos no efeito tóxico renal induzido por microcistina-LR.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Estudo da microcistina-LR no modelo de anel de aorta

3.1.1. Animais

Foram usados ratos Wistar adultos machos, pesando aproximadamente 300 g, provenientes do biotério da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará, acondicionados em caixa de polietileno e mantidos sob temperatura média de 26 °C, em ciclo claro/escuro de 12 horas, em jejum de 24 horas antes do experimento e com água *ad libitum*.

3.1.2 Toxina

A toxina utilizada em nossos experimentos foi a microcistina-LR obtida da *Microcystis aeruginosa* (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA; peso molecular: 995,2).

3.1.3. Anel de aorta isolado de rato

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/Kg, IP). As aortas torácicas foram removidas, limpas de tecidos adjacentes e cortadas em anéis. A função das células endoteliais foi preservada e os anéis montados sob 1 g de tensão e colocados suspensos

em ganchos de aço em banhos de 5ml de capacidade contendo solução de Krebs com a seguinte composição (mM): NaCl 120; KCl 4,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 1,43; NaHCO₃ 25; KH₂PO₄ 1,17 e glicose 11; aerada em carbogênio (95 % O₂ e 5% de CO₂). A tensão desenvolvida foi registrada através de um transdutor de deslocamento de força GOULD acoplado a um polígrafo da mesma marca. Os fragmentos de tecidos foram deixados em equilíbrio por 90 min antes do início de qualquer observação farmacológica. Foi administrado fenilefrina (1μM) diretamente na cubeta para demonstrar a responsividade da aorta. Em seguida, após lavagem, foram administradas as doses de 1, 3, 10, 30, 100 e 300 ng/ml de microcistina-LR em intervalos de 5 min.

3.2. Cultura de macrófagos peritoneais

3.2.1. Animais

Foram usados ratos Wistar adultos, de ambos os sexos, pesando entre 180 e 200 g, provenientes do biotério da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará, acondicionados em caixa de polietileno e mantidos sob temperatura média de 26 °C, em ciclo claro/escuro de 12 horas, em jejum de 24 horas antes do experimento e com água *ad libitum*.

3.2.2. Substâncias utilizadas

As substâncias utilizadas na cultura de macrófagos peritoneais estão relacionadas na tabela abaixo.

Substâncias utilizadas	Marca
Bicarbonato de sódio	Gibco
Ciclohexamida	Sigma
Dexametasona	Merck
Microcistina-LR	Sigma
Quinacrina	Sigma
RPMI 1640	Sigma
Talidomida	ICN Biomedical Inc.
Tampão HEPES	Sigma
Tioglicolato	Difco

3.2.3. Meio de cultura

O meio de cultura utilizado em nossos experimentos foi o RPMI (Rosewell Park Memorial Institute). Foi adicionado RPMI 1640 (10,4 g) a 1 litro de água destilada e deionizada, em seguida foi acrescido 2,2 g de bicarbonato de sódio e 2,38 g de tampão HEPES. O pH do meio foi ajustado para 7,4. Após a preparação, o meio foi filtrado em bomba à vácuo utilizando filtro especial (0,2 μm) e frasco filterware-Nalgene de 500mL.

3.2.4. Pré-tratamento

Os animais foram pré-tratados 4 dias antes do experimento com tioglicolato (3% wt/vol., 10 mL) via intraperitoneal, a fim de induzir o aumento da população de macrófagos na região.

3.2.5. Obtenção dos macrófagos peritoneais

Os macrófagos peritoneais foram obtidos usando a técnica descrita por Rocha e cols. (1998). Os animais foram sacrificados com éter etílico. Em seguida, após assepsia, foi administrado 10 mL do meio de cultura (RPMI) contendo heparina (0,1 mL de heparina/100 mL de meio) por via intraperitoneal. Após massagem no abdome destinada a deslocar as células residentes, cerca de 70-80% do volume injetado foi recuperado usando seringas (10 mL) com agulhas (40 x 12) fenestradas, sendo acondicionado em tubos Falcon.

Após a coleta do exsudato peritoneal, as células presentes neste material foram lavadas com RPMI e centrifugadas por 5 min a 1000 rpm por duas vezes. As células foram então ressuspensas em meio de cultura. Esta suspensão obtida, com base na contagem total em câmara de Neubauer, apresentava 1×10^7 células/mL. A seguir esta suspensão foi colocada em placas de 12 poços (2 mL/poço) e incubadas por 90 min a 37 °C em estufa de CO₂ a 5%, a fim de promover a aderência dos macrófagos peritoneais. Em seguida, as células aderidas na placa foram lavadas, três

vezes com RPMI, de modo a desprender linfócitos, monócitos e outras células que estivessem presentes no material coletado, considerando que normalmente elas não aderem ao plástico, propriedade exclusiva dos macrófagos. A adesão celular foi verificada em microscópio invertido.

Nos grupos com bloqueio farmacológico, a dexametasona (10^{-5} M) e quinaquina (10^{-5} M), inibidores da fosfolipase A_2 ; ciclohexamida (10^{-5} M), inibidor de síntese protéica; e talidomida ($1,5 \times 10^{-5}$ M), inibidor de TNF- α , foram colocados em contato com as células aderidas 30 min antes do estímulo com microcistina-LR (1 μ g/mL), e em seguida, foram incubados por 60 min. As monocamadas de macrófagos foram lavadas por 3 vezes com meio de cultura e foi adicionado 1 mL de solução: RPMI + soro fetal bovino a 10%. A placa foi incubada por mais 120 min (Figura 4). A seguir o sobrenadante dos macrófagos presente nos poços da placa foi coletado e armazenado a -70 °C para uso na perfusão renal.

3.2.6. Viabilidade celular

A viabilidade dos macrófagos foi determinada através da técnica do corante azul de tripam como descrito por Marshall e cols. (1996). A viabilidade dos macrófagos variou de 93 a 98% nos diferentes experimentos.

Coleta dos macrófagos peritoneais

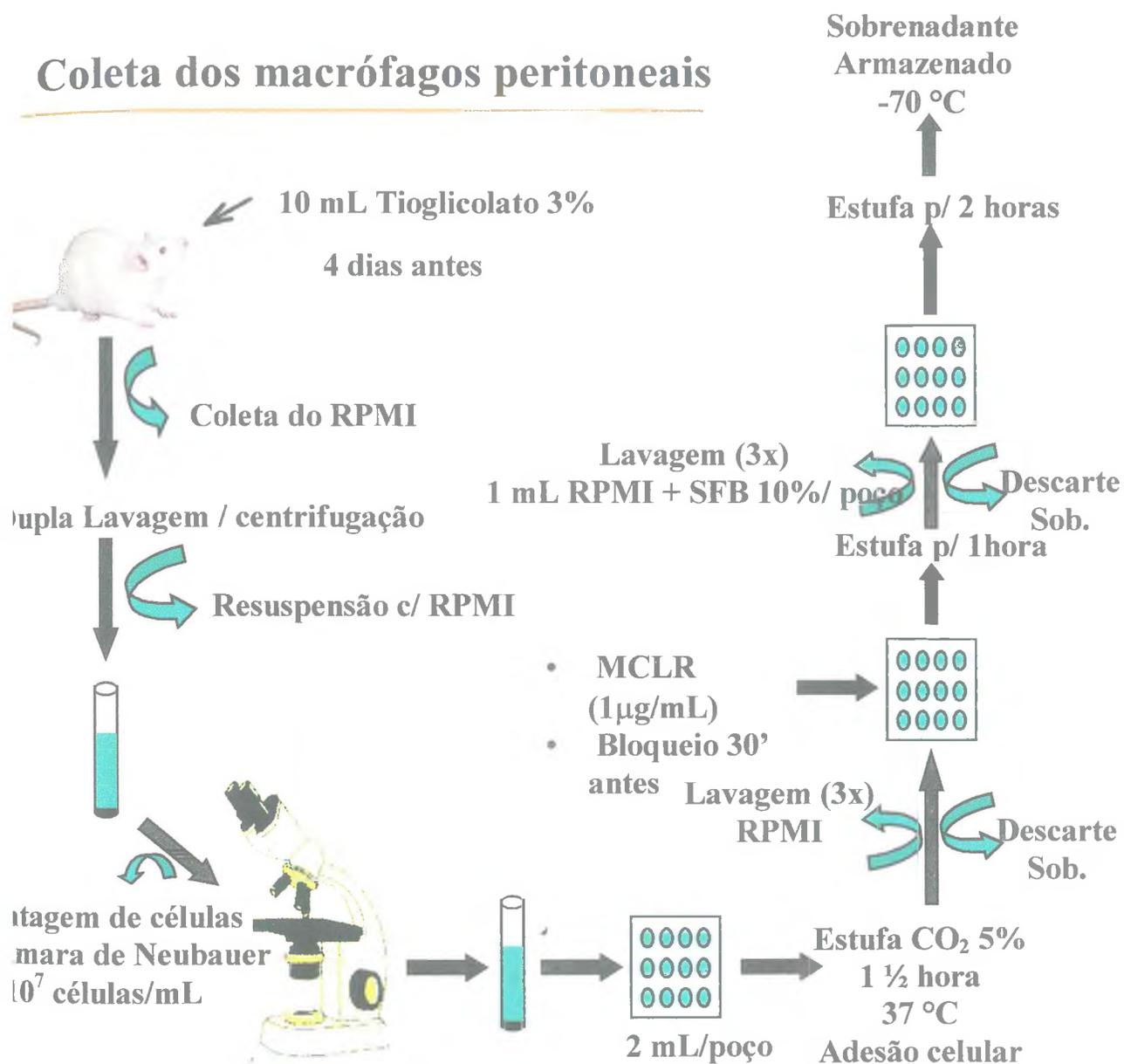


Figura 4- Obtenção e manuseio de macrófagos peritoneais.

MCLR- microcistina-LR; RPMI- meio de cultura; SFB- soro fetal bovino

3.3. Perfusão renal

3.3.1. Animais

Foram usados ratos Wistar adultos, de ambos os sexos, pesando entre 230 e 280 g, provenientes do biotério da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará, acondicionados em caixa de polietileno e mantidos sob temperatura média de 26 °C, em ciclo claro/escuro de 12 horas, em jejum de 24 horas antes do experimento e com água *ad libitum*.

3.3.2. Substâncias utilizadas

Substâncias utilizadas	Marca
Albumina bovina fração V	Sigma
CaCl ₂	Reagen
Glicose	Squibb
Heparina	CEME
Inulina	Sigma
KCl	Merck
Manitol	Reagen
MgSO ₄	Reagen
NaCl	Synth
NaHCO ₃	Synth
NaH ₂ PO ₄	Synth
Penicilina G potássica cristalina	Squibb
Pentobarbital sódico	Sigma
Uréia	Reagen

3.3.3. Solução perfusora

A solução perfusora utilizada em nossos experimentos foi a de Krebs-Henseleit modificada, concentrada 20 vezes com NaCl (138 g), KCl (7,0 g), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (3,2 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,8 g) e uréia (10,0 g). Em seguida foram retirados 100 mL desta solução e acrescentado NaHCO_3 (4,2 g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,74 g), glicose (2,0 g), penicilina (50 mg) e completado o volume para 2000 mL com água bidestilada. Após este procedimento, foram retirados 300 mL desta solução, onde foi adicionado albumina bovina 6%, sendo em seguida dialisada por 48 horas antes do experimento, para retirar várias substâncias contaminantes, como citrato, piruvato e lactato (HANSON; BALLARD, 1968; ROSS e cols., 1973; COHEN e cols., 1977; SCHUREK, 1978). O restante da solução (1700 mL) serviu como solução de diálise, sendo trocada a cada 24 horas. A diálise foi mantida sobre um homogeneizador a 4°C. Ao término da diálise, o pH foi ajustado em 7,3-7,4 e foi acrescentada inulina (0,15 g). O volume de solução perfusora, para cada experimento, foi 100mL.

3.3.4. Sistema de perfusão de rim isolado

A necessidade do conhecimento dos mecanismos de controle da função renal levou inúmeros pesquisadores a desenvolver a técnica de perfusão de rim isolado. O nosso sistema consiste na perfusão de rim

isolado com recirculação (FONTELES, LEIBACH, 1982; FONTELES e cols., 1983; 1998; MONTEIRO, 1990; 1999), com dois sub-sistemas, um *in situ* e outro com circuito fechado, para perfusão *in vitro*, mantidos ambos a uma temperatura de 37°C. Este sistema apresenta a vantagem de manutenção constante de parâmetros funcionais renais, com utilização de albumina na solução perfusora, em menor volume, mantendo constantes as substâncias dialisáveis com oxigenação adaptada ao próprio sistema (Figura 5).

Componentes do sistema de perfusão:

- coletor de urina - serve para coletar amostra de urina
- condensador - serve de reservatório de aquecimento da solução perfusora;
- seringa graduada - para retirada de amostra de perfusato;
- bomba de perfusão (Watson) - para manutenção do fluxo de perfusão renal;
- filtro (USA - Millipore 8µm) - promove uma melhor perfusão através da filtração constante da solução perfusora;
- oxigenador (pulmão artificial) constituído de tubos silásticos - onde acontecem as trocas gasosas (95% de O₂ e 5% de CO₂);
- banho maria (Fanem - modelo 100) - aquece e mantém o pulmão a 37°C;
- fluxômetro - permite a leitura do fluxo de perfusão durante o experimento;

- catabolhas - câmara que retém bolhas, evitando o embolismo gasoso do órgão;
- manômetro de mercúrio - permite fazer a leitura direta da pressão de perfusão;
- bomba aquecedora com termostato - para manutenção de todo o sistema de perfusão a 37°C.

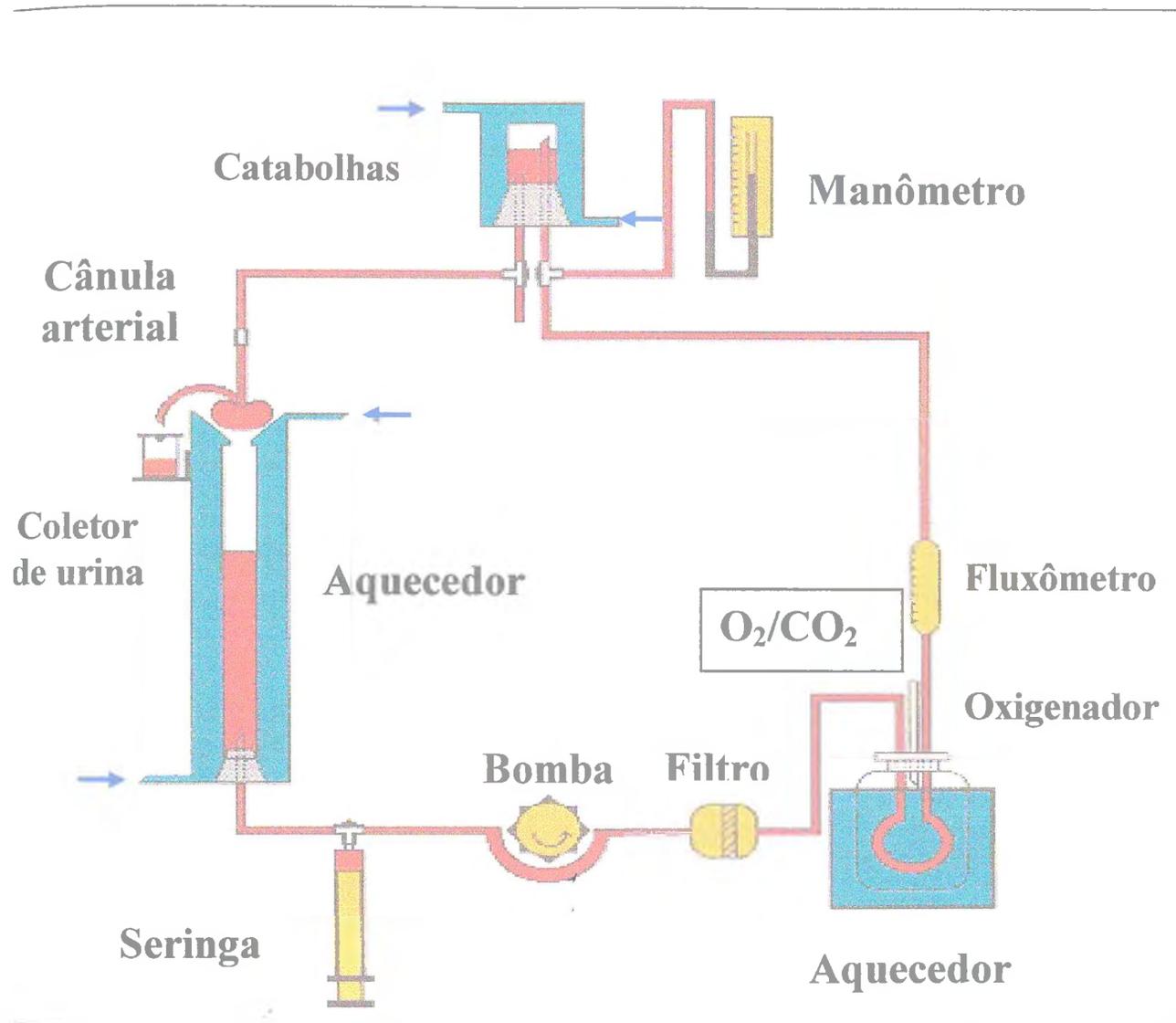


Figura 5- Esquema do sistema de perfusão de rim isolado

3.3.5. Técnica cirúrgica

O animal foi anestesiado com pentobarbital sódico, na dose de 50 mg/kg de peso corporal por via intra-peritoneal. Inicialmente, a veia femural foi isolada e 3 mL de manitol a 20% foram administrados, a fim de facilitar a canulação posterior do ureter. Após a assepsia da parede abdominal, foi realizada uma incisão mediana e duas incisões perpendiculares à linha alba, para uma melhor observação das estruturas anatômicas. As vísceras abdominais foram afastadas para o lado esquerdo, a fim de facilitar a visualização do rim direito e estruturas circunvizinhas, mantendo-as umedecidas com solução salina a 37°C. O ureter direito foi isolado e dissecado dos tecidos conjuntivo e adiposo que o envolvem, sendo em seguida canulado com um tubo de polietileno (PE50), a uma distância de aproximadamente 3 cm do pedúnculo renal. O rim direito foi descapsulado e dissecado dos tecidos peritubulares. A supra-renal foi identificada e seccionada, para evitar liberação de substâncias como adrenalina e noradrenalina. Com uma lupa (7x), a artéria mesentérica e a artéria renal foram identificadas e isoladas (Figura 6). A cânula arterial foi introduzida na artéria mesentérica superior até a artéria renal, onde foi feita a fixação da cânula (WEISS, 1959; NISHITSUTSUJUWO e cols., 1967; BAHLMANN e cols., 1967). Uma parte da solução (40mL) foi desviada para o sistema de perfusão *in situ*, para perfundir o rim ainda *in vivo*, evitando qualquer isquemia no órgão.

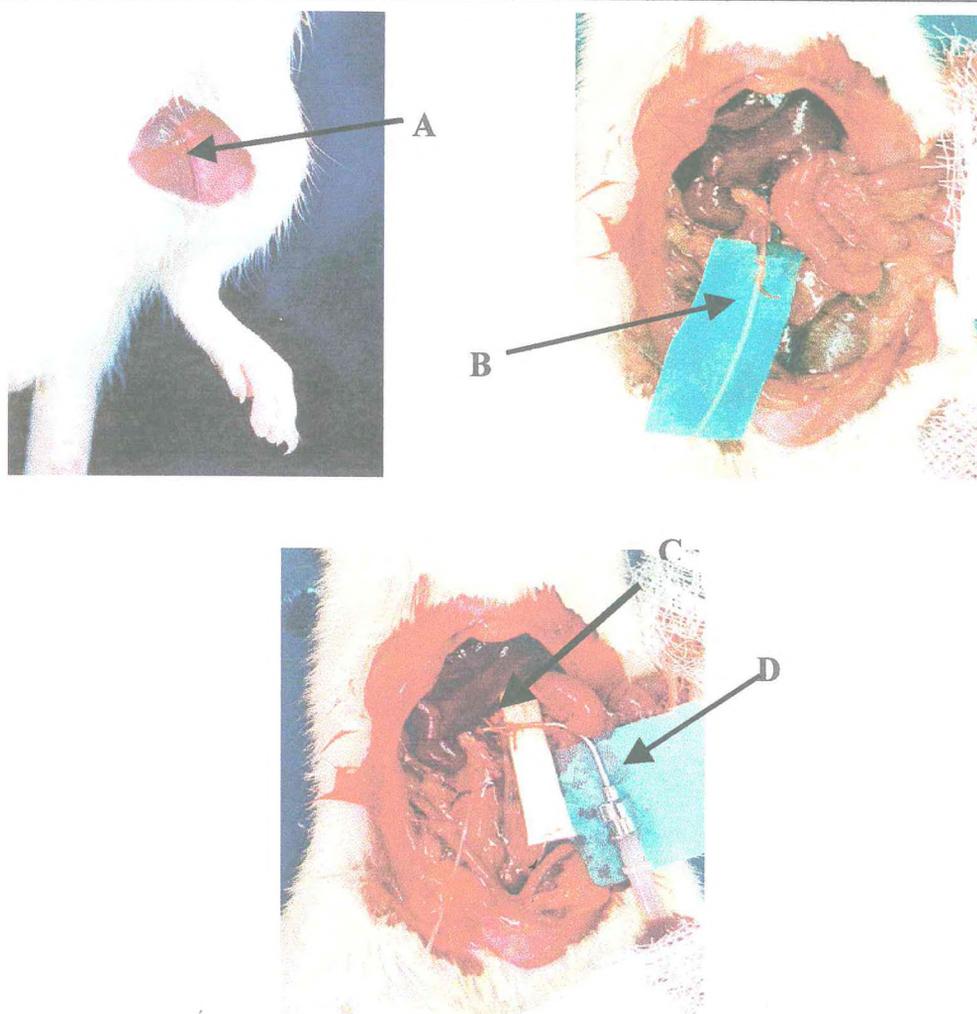


Figura 6– Técnica cirúrgica. A– veia femural; B– ureter direito canulado; C– artéria renal; D– cânula arterial.

3.3.6. Calibração do sistema

Após a limpeza com água bidestilada aquecida, o sistema foi montado e calibrado. Foram montadas curvas relacionando a leitura da pressão de perfusão (Figura 7), fluxômetro (Figura 8) e o fluxo em mL/min (Figura 9) com as cinco velocidades da bomba que compõe o sistema. Em cada velocidade, foi medido o fluxo na ponta da cânula, para se conhecer o fluxo de perfusão renal em face da resistência da própria cânula e a pressão, determinada pela resistência ao fluxo do sistema, registrada em manômetro.

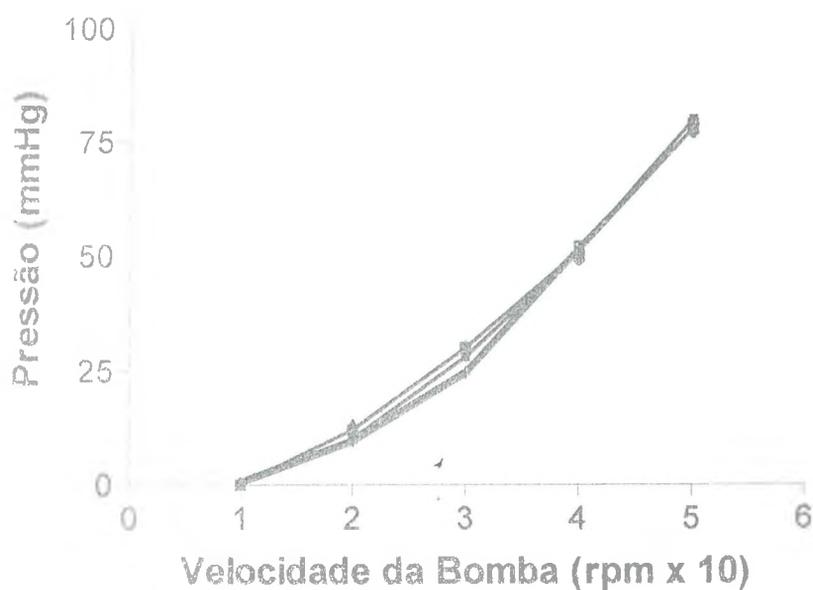


Figura 7- Retas de calibração da velocidade da bomba vs pressão de perfusão.

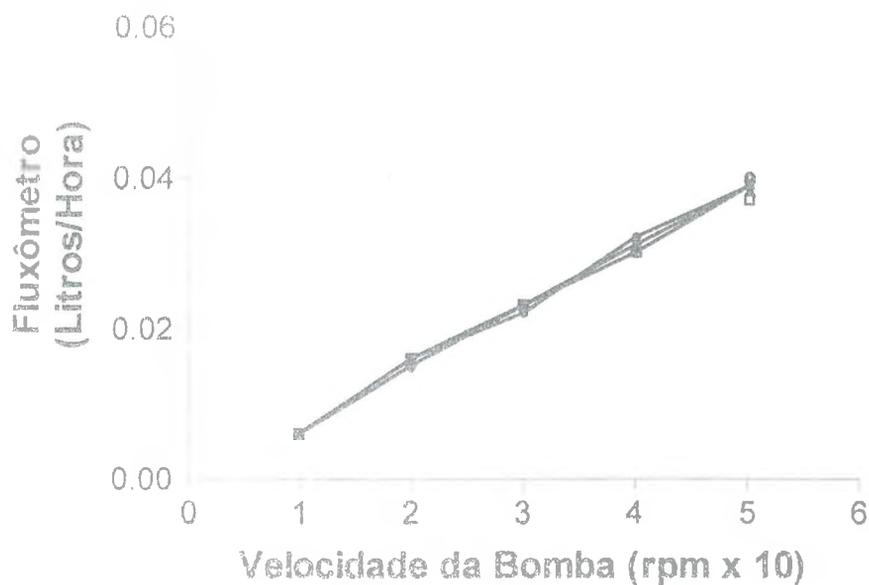


Figura 8- Retas de calibração da velocidade da bomba vs fluxômetro.

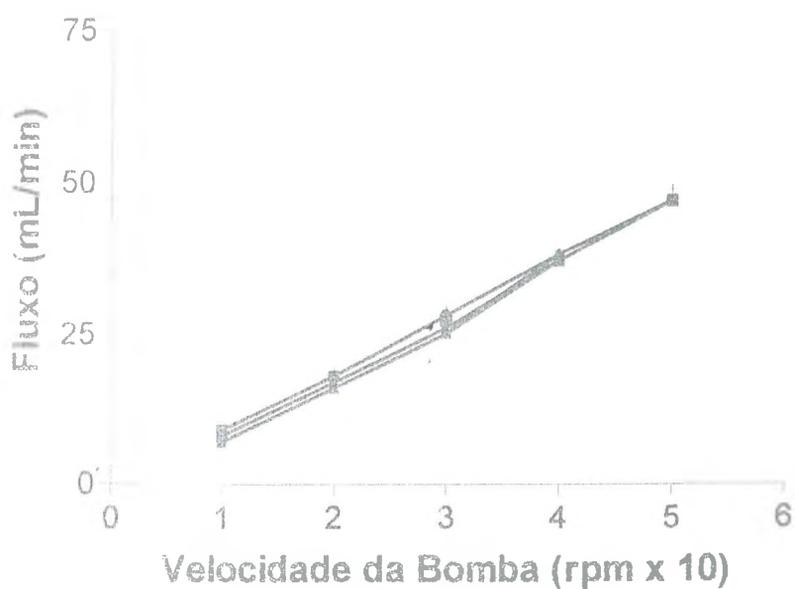


Figura 9- Retas de calibração da velocidade da bomba vs fluxo.

3.3.7. Protocolo experimental

Após o rim ter sido colocado no sistema, aguardou-se um período de tempo de 15 a 20 minutos para que o órgão se adaptasse às novas condições experimentais. Iniciado o experimento, os primeiros 30 minutos foram considerados como um controle interno. O sobrenadante de macrófagos peritoneais estimulados com microcistina-LR (1 µg/mL) na ausência e presença de bloqueadores farmacológicos foi administrado aos 30 minutos. O tempo de perfusão foi de 120 minutos, sendo que, a cada 5 minutos, procedeu-se às leituras do fluxômetro e manômetro de mercúrio. A cada 10 minutos, foram colhidas amostras de urina e perfusato para análise bioquímica. Estas amostras foram armazenadas em “freezer” à temperatura de -20°C. Posteriormente, em cada amostra, foram determinados inulina, sódio, potássio e osmolaridade.

3.3.8. Grupos experimentais

Grupo controle: os rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit modificada, contendo 6% de albumina bovina, sendo adicionado o sobrenadante de macrófagos sem estímulo (RPMI) (n=6).

Grupo tratado (SOB M ϕ S + MCLR): os rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit modificada, contendo 6% de albumina bovina e, aos 30 min de perfusão, foi adicionada ao sistema sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR (1 μ g/mL) (n=6).

Grupo SOB M ϕ S + DEXA + MCLR: os rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit modificada, contendo 6% de albumina bovina e foram adicionadas aos 30 min sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR (1 μ g/mL), pré incubados com dexametasona (Dexa, 10^{-5} M, n=6).

Grupo SOB M ϕ S + QUINA + MCLR: os rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit modificada, contendo 6% de albumina bovina e foram adicionadas aos 30 min sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR (1 μ g/mL), pré incubados com quinacrina (Quina, 10^{-5} M, n=6).

Grupo SOB M ϕ S + CICLO + MCLR: os rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit modificada, contendo 6% de albumina bovina e foram adicionadas aos 30 min sobrenadante de macrófagos estimulados

com microcistina-LR (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), pré incubados com ciclohexamida (CICLO, 10^{-5} M, n=6).

Grupo SOB M ϕ S +TALI + MCLR: os rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit modificada, contendo 6% de albumina bovina e foram adicionadas aos 30 min sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), pré incubados com talidomida (Tali, $1,5 \times 10^{-5}$ M, n=6).

3.3.9. Análise bioquímica

3.3.9.1. Dosagem de eletrólitos: as dosagens de sódio e potássio da urina e perfusato foram realizadas por fotometria de chama (Flame Photometer - modelo 443)

3.3.9.2. Dosagem de inulina: as dosagens de amostra de urina e perfusato foram realizadas pelo método de hidrólise direta com modificações (WALSON e cols., 1955; FONTELES e cols., 1983), reduzindo as quantidades de amostras e reagentes utilizados. As seguintes etapas foram seguidas para dosagem:

a) em tubos de ensaio previamente marcados foi adicionado 1,0 mL de NaOH 1N;

- b) foi adicionado 30 μL de urina (com auxílio de uma micropipeta), perfusato ou água bidestilada (para padrão zero) de acordo com a amostra contida no tubo de ensaio;
- c) misturou-se o conteúdo em um aparelho vortex-mixer (agitador);
- d) as amostras foram aquecidas a 100°C por vinte minutos, em seguida foram transportadas para resfriamento a 4°C na geladeira, durante 30 minutos;
- e) acrescentou-se nos mesmos tubos 3mL de difenilamina, levando-os ao aparelho misturador, a seguir repetiu-se a etapa descrita no item d;
- f) finalmente, fez-se a leitura das densidades óticas das amostras em um espectrofotômetro (UNICAN) em 620 nanômetros (nm).

3.3.9.3. Dosagem de osmolaridade: as medidas da osmolaridade nas amostras de urina e de perfusato foram realizadas em um osmômetro (Vapor pressure osmometer - modelo 5100c ESCOR).

3.3.10. Parâmetros funcionais renais

As seguintes fórmulas foram utilizadas para determinação de parâmetros funcionais renais (PITTS, 1971; MARTINEZ-MALDONADO e cols., 1978; FONTELES, 1980).

1. FU ($\text{mL.g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) = Fluxo urinário

FU = Peso do volume urinário / Peso do rim esquerdo . 10

admitiu-se que a urina possui a mesma densidade da água

2. PP = Pressão de perfusão (mmHg) = Leitura em manômetro

3. RFG ($\text{mL.g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) = Ritmo de filtração glomerular

RFG = (DOU in / DOP in . FU)

DOU in = densidade ótica da inulina na urina

DOP in = densidade ótica da inulina no perfusato

4. FPR ($\text{mL.g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) = Fluxo de perfusão renal

Fluxo registrado a cada 10 min / intervalo de tempo . Peso do rim

5. RVR ($\text{mmHg/mL.g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) = Resistência vascular renal

RVR = PP (mmHg) / FPR

6. FNa⁺ ($\mu\text{Eq.g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) = Sódio filtrado

FNa⁺ = RFG . PNa⁺

PNa⁺ = Concentração de sódio no perfusato

7. $\dot{E}Na^+ = (\mu Eq.g^{-1} \cdot min^{-1}) = \text{Sódio excretado}$

$$\dot{E}Na^+ = \dot{V}U \cdot UNa^+$$

$UNa^+ = \text{Concentração de sódio na urina}$

8. $\dot{T}Na^+ = (\mu Eq.g^{-1} \cdot min^{-1}) = \text{Sódio transportado}$

$$\dot{T}Na^+ = \dot{F}Na^+ - \dot{E}Na^+$$

9. $\% \dot{T}Na^+ = \text{Percentual de sódio transportado}$

$$\% \dot{T}Na^+ = \dot{T}Na^+ \cdot 100 / \dot{F}Na^+$$

10. $\dot{A}dNa^+ (\mu Eq.g^{-1} \cdot min^{-1}) = \text{Aporte distal de sódio}$

$$\dot{A}dNa^+ = d\dot{T}Na^+ + \dot{E}Na^+$$

11. $p\dot{T}Na^+ (\mu Eq.g^{-1} \cdot min^{-1}) = \text{Transporte proximal de sódio}$

$$p\dot{T}Na^+ = \dot{F}Na^+ - \dot{A}dNa^+$$

12. $\% p\dot{T}Na^+ = \text{Percentual de transporte proximal de sódio}$

$$\% p\dot{T}Na^+ = p\dot{T}Na^+ \cdot 100 / \dot{F}Na^+$$

13. $d\dot{T}Na^+ (\mu Eq.g^{-1} \cdot min^{-1}) = \text{Transporte distal de sódio}$

$$d\dot{T}Na^+ = C_{H_2O} \cdot PNa^+$$

14. $\%dTNa^+ (\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}) =$ Percentual de transporte distal de sódio

$$\%dTNa^+ = dTNa^+ . 100 / Ad$$

15. $FK^+ = (\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}) =$ Potássio filtrado

$$FK^+ = RFG . PK^+$$

$PK^+ =$ Concentração de potássio no perfusato

16. $EK^+ = (\mu Eq.g) =$ Potássio excretado

$$EK^+ = FU . UK^+$$

$UK^+ =$ Concentração de potássio na urina

17. $TK^+ (\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}) =$ Potássio transportado

$$TK^+ = PK^+ - EK^+$$

18. $\%TK^+ =$ Percentual de potássio transportado

$$\%TK^+ = TK^+ . 100 / PK^+$$

19. $AdK^+ (\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}) =$ Aporte distal de potássio

$$AdK^+ = dT.K^+ + EK^+$$

20. $pTK^+ (\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}) =$ Transporte proximal de potássio

$$pTK^+ = FK^+ - AdK^+$$

21. %pTK⁺ = Percentual de transporte proximal de potássio

$$\%pTK^+ = pTK^+ \cdot 100 / FK^+$$

22. dTK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Transporte distal de potássio

$$dTK^+ = C_{H_2O} \cdot PK^+$$

23. %dTK⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Percentual de transporte distal de potássio

$$\%dTK^+ = dTK^+ \cdot 100 / Ad$$

24. Cosm (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Clearance osmótico

$$Cosm = (Uosm / Posm) \cdot FU$$

Uosm = osmolaridade urinária

Posm = osmolaridade do perfusato

25. C_{H₂O} (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Clearance de água livre

$$C_{H_2O} = FU - Cosm$$

3.4. Cultura de macrófagos intestinais

3.4.1. Animais

Foram usados ratos Wistar adultos, de ambos os sexos, pesando aproximadamente 250 g, provenientes do biotério da Unidade de

Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará, acondicionados em caixa de polietileno e mantidos sob temperatura média de 26 °C, em ciclo claro/escuro de 12 horas, em jejum de 24 horas antes do experimento e com água *ad libitum*.

3.4.2. Substâncias utilizadas

Substâncias utilizadas	Marca
Bicarbonato de sódio	Gibco
Dulbecco	Gibco
Hank	Gibco
Protease (dispase)	Sigma
Microcistina-LR	Sigma
Tampão HEPES	Sigma

3.4.3. Meio de cultura

O meio de cultura utilizado em nossos experimentos foi o Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium). Foi adicionado Dulbecco (13,5 g) a 1 litro de água destilada e deionizada, em seguida foi acrescido 2,2 g de bicarbonato de sódio e 2,38 g de tampão HEPES. O pH do meio foi ajustado para 7,4. Após a preparação o meio foi filtrado em bomba à vacuo utilizando filtro especial (0,2 µm) e frasco filterware-Nalgene de 500 mL.

3.4.4. Obtenção de macrófagos da lâmina própria

Os animais foram sacrificados com éter etílico. Em seguida foi realizada assepsia do abdome com álcool iodado ou iodo. Realizou-se uma incisão mediana à linha alba a fim de expor o intestino. Este foi desprendido do mesentério, limpo e mantido em PBS. O intestino delgado foi então, seccionado na altura do piloro e porção cranial do cecum. Foi realizada uma incisão longitudinalmente em toda a extensão do intestino, retirando-se o muco com gaze estéril e em seguida, transversalmente em fragmentos de 2 cm aproximadamente, enquanto as placas de Peyer foram retiradas, devido a presença de outras linhagens celulares. Os segmentos intestinais foram colocados em solução tampão (Henk's Balanced Salt Solution diluído em 1L de água destilada e deionizada) e lavados por 2 vezes com a mesma solução. Foi adicionado protease (dispase – 0,3 g) em 100 mL de meio de cultura e acrescentou-se os fragmentos intestinais. Em seguida, foram incubados durante 15 min a 37 °C e 5% de CO₂ agitando os tubos em vortex a cada 5 min. Após este período, o sobrenadante foi descartado para remoção das células epiteliais. O restante da solução foi adicionada aos fragmentos e novamente incubados por 30 min, agitando-se em vortex a cada 5 min. Os fragmentos intestinais foram descartados e o sobrenadante foi coletado e centrifugado durante 7 min a 3000 rpm, para que os macrófagos se depositassem nos tubos. O sobrenadante foi descartado para eliminação da dispase, e o processo se repetiu. As células

foram ressuspensas com 15 mL de meio de cultura. Esta suspensão obtida apresentava 1×10^7 células/mL, com base na contagem total em câmara de Neubauer. A suspensão foi colocada em placas de 12 poços (2mL/poço) e incubadas por 90 min a 37 °C em estufa de CO₂ a 5%, a fim de promover a aderência dos macrófagos intestinais. Em seguida, as células aderidas na placa foram lavadas de modo a desprender linfócitos, monócitos e outras células que estivessem presentes no material coletado. A adesão celular foi verificada em microscópio invertido. Os macrófagos então, foram estimulados com microcistina-LR (1 µg/mL) e incubados novamente por 60 min. Em seguida, as monocamadas de macrófagos foram lavadas por 3 vezes com meio de cultura e foi adicionado 1 mL de solução: Dulbecco + soro fetal bovino a 10%. A placa foi incubada por mais 120 min (Figura 10). A seguir o sobrenadante dos macrófagos presente nos poços da placa foi coletado e armazenado a -70 °C para uso em alça isolada e perfusão intestinal. A viabilidade foi determinada através da técnica do corante azul de tripam como descrito por Marshall e cols. (1996). A viabilidade dos macrófagos variou de 93 a 97% nos diferentes experimentos (FEITOSA, 2003).

Obtenção e manuseio de macrófagos da lâmina própria

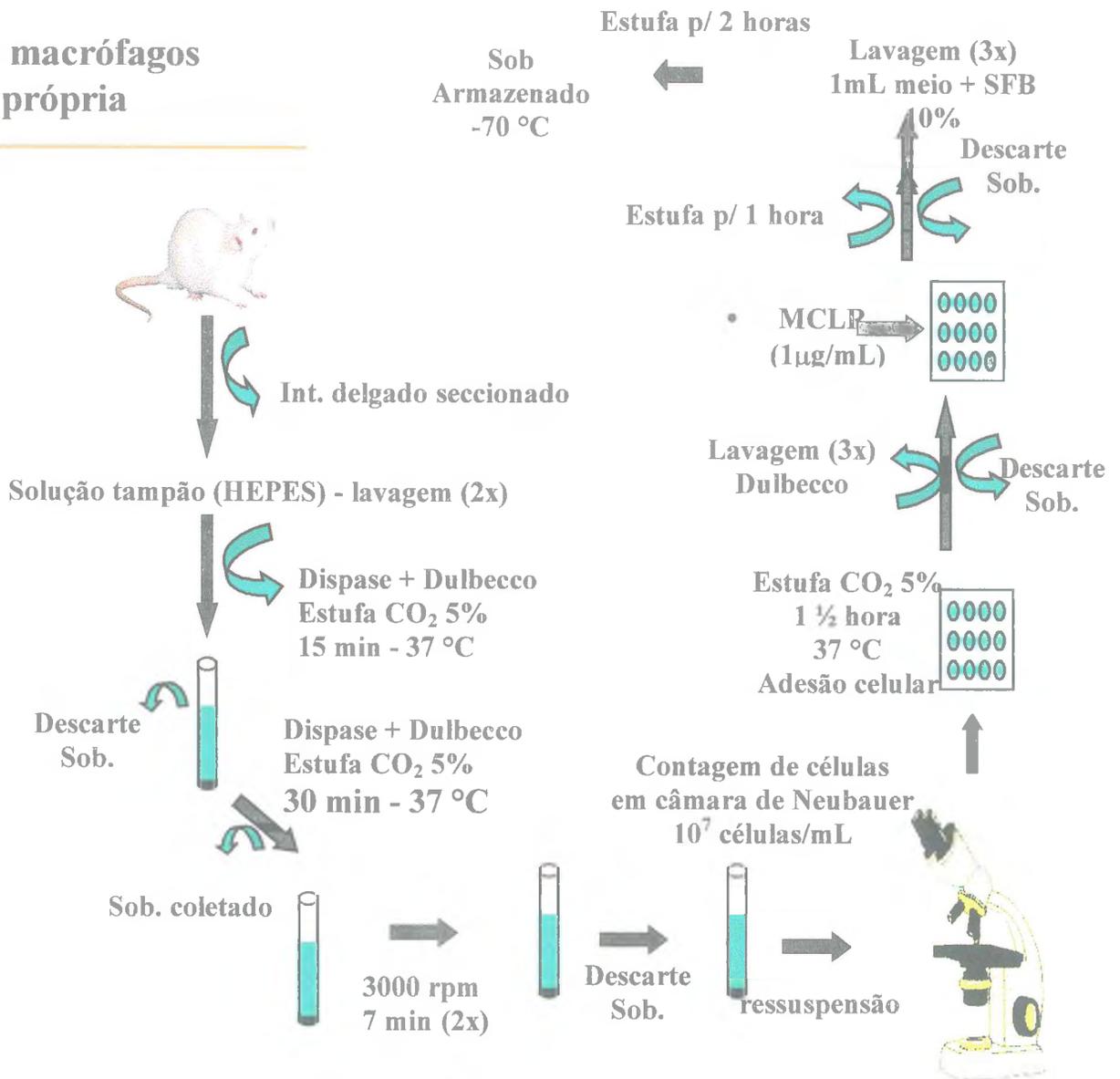


Figura 10- Obtenção e manuseio de macrófagos da lâmina própria

MCLR-microcistina-LR; SFB- soro fetal bovino; SOB- sobrenadante.

3.5. Alça isolada de rato

3.5.1. Animais

Foram usados ratos Wistar adultos, de ambos os sexos, pesando entre 180 a 220 g, provenientes do biotério da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará, acondicionados em caixa de polietileno e mantidos sob temperatura média de 26 °C, em ciclo claro/escuro de 12 horas, em jejum de 24 horas antes do experimento e com água *ad libitum*.

3.5.1 Protocolo experimental

Os animais foram anestesiados com ketamina (60 mg/kg corporal, IM) e xylazina (10 mg/kg corporal, IM). Foi realizada uma laparotomia mediana de aproximadamente 2 cm para visualização do intestino. Em seguida foi efetuada uma laqueadura distal cerca de 3 cm do cecum. Foi isolado 30 cm do íleo terminal, onde foram feitas alças de 4-5 cm de comprimento separada entre si por 1 cm (LIMA E COLS., 1988).

Foi administrado nas alças controle, PBS (Tabela 1) ou sobrenadante de macrófagos intestinais sem estímulo (Dulbecco) e nas alças tratadas, toxina da cólera (controle secretório positivo - 1µg/mL), microcistina-LR (1µg/mL) e sobrenadante de macrófagos intestinais estimulados com microcistina-LR (1µg/mL). A cavidade abdominal foi suturada. Os animais foram sacrificados com éter etílico após 18 horas para

a determinação da presença ou ausência de secreção. A taxa de secreção de fluido foi avaliada através da obtenção de seus pesos úmido e seco dividido pelo comprimento (cm) da alça intestinal ligada.

Tabela 1- Composição da solução salina tamponada com fosfato (PBS)

Composição	Concentração	Marca
Água destilada	1,0 L	-
Cloreto de potássio	0,2 g	Reagen
Cloreto de sódio	8,0 g	Reagen
Fosfato de sódio dibásico	1,15 g	Fisher
Fosfato de sódio monobásico	0,2 g	Reagen

3.6. Perfusão intestinal

3.6.1 Animais

Foram usados ratos Wistar adultos, de ambos os sexos, pesando entre 180 a 220 g, provenientes do biotério da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará, acondicionados em caixa de polietileno e mantidos sob temperatura média de 26 °C, em ciclo claro/escuro de 12 horas, em jejum de 24 horas antes do experimento e com água *ad libitum*.

3.6.2 Solução perfusora

A solução perfusora foi a de Ringer com NaCl (6,5 g), KCl (0,14 g), CaCl₂ (0,12 g), NaHCO₃ (0,20 g) e NaH₂PO₄ (0,01 g) e completado para 1000 mL. A esta solução perfusora foi acrescida 0,005 g de fenolsulfaleína (PSP) como marcador não absorvível, para os cálculos dos parâmetros de absorção de sódio, potássio, cloreto e água. A solução foi mantida a 37 °C e pH 7,4.

3.6.3 Sistema de perfusão intestinal

Os animais foram anestesiados com ketamina (60 mg/kg corporal, IM) e xylazina (10 mg/kg corporal, IM). Foi realizada uma laparotomia mediana de aproximadamente 2 cm para visualização do intestino. Em seguida foi efetuada uma laqueadura distal cerca de 3 cm do cecum. Foi isolado 30 cm do íleo terminal, onde foram introduzidas cânulas nas extremidades proximal e distal (Figura 11). A perfusão foi realizada através da cânula proximal utilizando uma bomba (Holter Roller Pump 900, Extracorporeal Medical Specialities Inc., King of Prússia, PA, USA) de baixo fluxo (0,11 mL/min) devidamente calibrada. Após estabilização do fluxo luminal, o perfusato foi coletado a cada 20 min, durante 100 min. Uma alíquota da solução perfusora foi retirada no início do experimento para controle. Foram analisadas as diferenças entre a amostra controle e as coletadas do perfusato quanto aos valores de

osmolalidade (mosm/L), sódio (mmol), potássio (mmol) e cloreto (mmol). Ao final do experimento, os animais foram sacrificados e o segmento ileal perfundido foi retirado para obtenção dos pesos úmido e seco. Este foi utilizado para correção dos parâmetros funcionais de absorção (LIMA e cols., 2002).

3.6.4. Grupos experimentais

Grupo controle (Ringer): O intestino foi perfundido com solução de Ringer modificada (n=6).

Grupo controle positivo (TC): O intestino foi perfundido com solução de Ringer modificada, contendo 50 µg/mL de fenolsulfaleína. A toxina da cólera (1 µg/mL) foi administrada 18 h antes (n=6).

Grupo tratado (MCLR): O intestino foi perfundido com solução de Ringer modificada sendo adicionado no sistema aos 20 min de perfusão a microcistina-LR (1 µg/mL) (n=8).

Grupo TC+MCLR: A toxina da cólera (1 µg/mL) foi administrada 18 horas antes. O intestino foi perfundido com solução de Ringer modificada sendo adicionado no sistema aos 20 min de perfusão a microcistina-LR (1 µg/mL) (n=5).

Grupo controle (meio de cultura): O intestino foi perfundido com solução de Ringer modificada sendo adicionado no sistema aos 20 min de perfusão o sobrenadante de macrófagos intestinais sem estímulo (Dulbecco) (n=8).

Grupo tratado (SOB M ϕ S + MCLR): O intestino foi perfundido com solução de Ringer modificada sendo adicionado no sistema aos 20 min de perfusão, o sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR (1 μ g/mL) (n=8).

3.6.5. Análises bioquímicas

A fenolsulfaleína foi medida por espectrofotometria (Spectrophotometer Model B382, Micronal S.A. Aparelhos de precisão, São Paulo, SP, Brasil) de acordo com Schedl e Clifton (1961). As dosagens dos teores de sódio e potássio nas amostras de perfusato foram realizadas por fotometria de chama (Flame Photometer model 444, Lexington, MA, USA). O método colorimétrico para cloretos foi utilizado de acordo com as especificações do fabricante (Labtest Bio. Diagnósticos, Belo Horizonte, Brasil). A osmolalidade das amostras de perfusato foi medida em osmômetro (Model 5100C, Wescor, Logan, UT, USA).

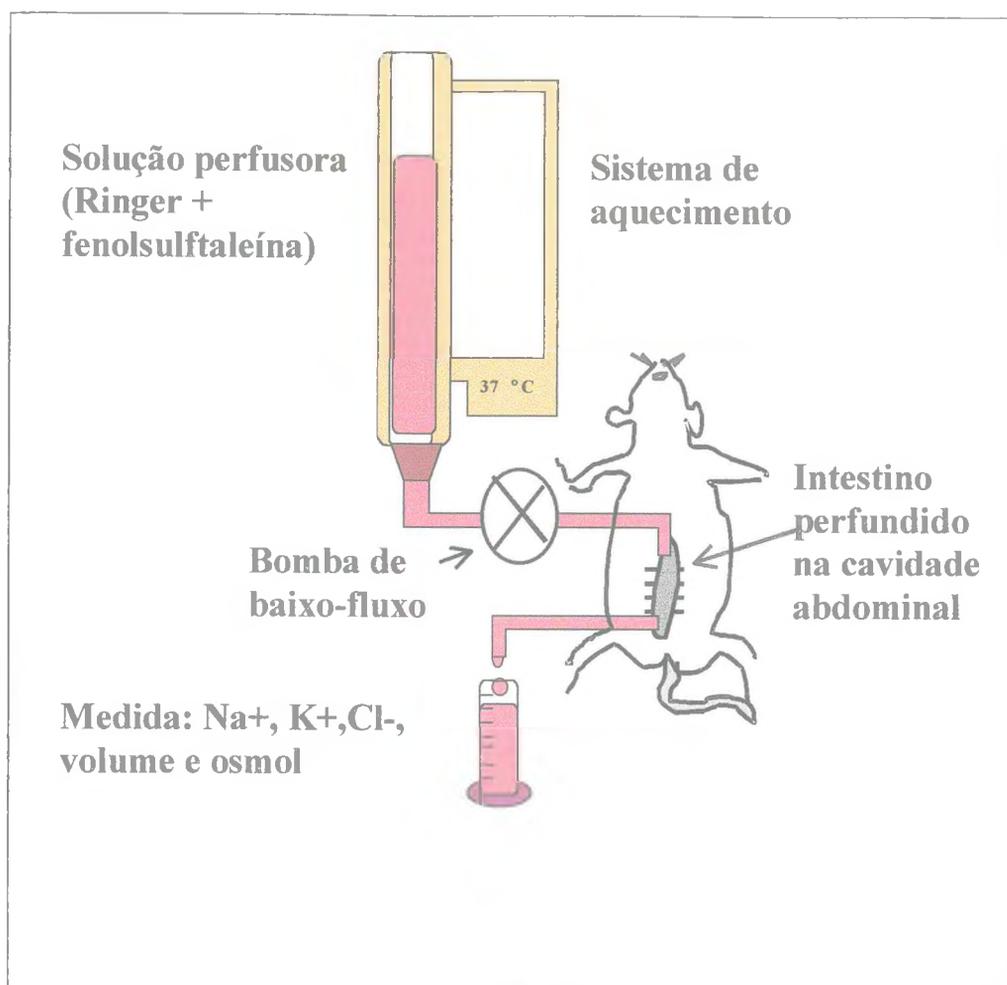


Figura 11- Esquema do sistema de perfusão intestinal. Sistema aberto de perfusão intestinal *in vivo*, composto de um tubo para solução perfusora, um sistema de aquecimento e uma bomba de baixo fluxo.

3.7. Embriotoxicidade

3.7.1. Desenvolvimento embrionário de ovos de ouriço

O estudo das alterações sobre o desenvolvimento embrionário de ovos de ouriço do mar permite avaliar o potencial citotóxico, teratogênico e antineoplásico de compostos, sendo amplamente utilizado para determinação do potencial embriotóxico (FUSETANI, 1987; JACOBS; WILSON, 1986; MALPEZZI e cols., 1994; COSTA e cols., 1996).

Foram utilizados ouriços *Lytechinus variegatus* coletados na praia da Lagoinha, no município de Paraipaba (Ceará, Brasil). Foram administrados 3 mL de KCl 0,5 M na cavidade celômica para eliminação de gametas. Os óvulos, de coloração alaranjada, foram coletados em um recipiente com água do mar filtrada, de modo que o ouriço ficasse com a superfície oral para cima. Após a eliminação, os óvulos foram lavados por decantação por 2 vezes. Os espermatozóides foram coletados com uma pipeta Pasteur e conservados em geladeira até o momento de sua utilização (Figura 12).

Após a última lavagem, os óvulos foram ressuspensos em 50 mL de água do mar filtrada. A fecundação foi realizada pela adição de 1 mL da suspensão de espermatozóides (50 μ L de suspensão concentrada + 2,45 mL de água do mar filtrada) à suspensão de óvulos (50 mL). Após cerca de dois minutos, a fecundação foi confirmada pela presença da membrana da

fecundação, através da observação de uma amostra das células em microscópio óptico (Figura 13). Os ovos (1 mL) foram distribuídos numa multiplaca, com 24 cavidades, contendo a microcistina-LR (0,1; 0,3; 1; 3 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os ovos foram incubados num volume final de 2 mL, mantidos à temperatura ambiente (26 ± 2 °C) sob agitação constante. Nos intervalos correspondentes a primeira e terceira divisões, blástula (Figura 13) e larva foram fixadas alíquotas de 0,2 mL em formalina 10%. Cem embriões foram contados em cada amostra para obtenção da percentagem de células normais.

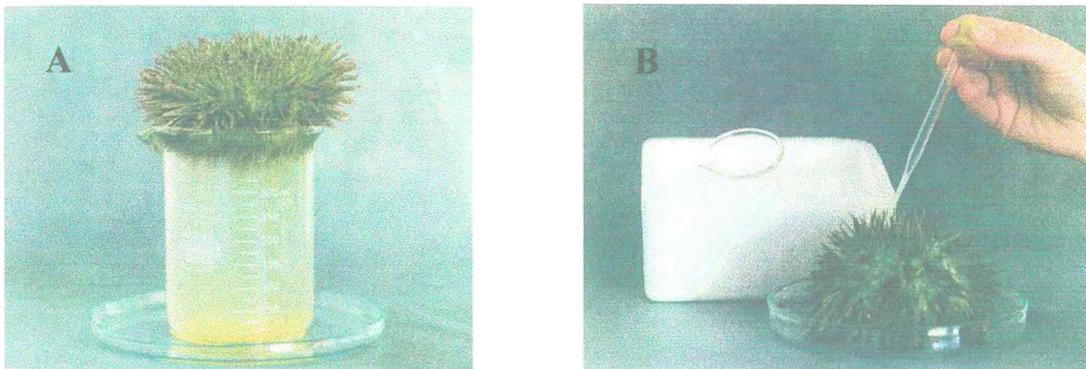


Figura 12- Coleta de gametas de ouriço. A: Coleta dos óvulos. B: Coleta dos espermatozoides. Fotos de Ricardo Mastroti.

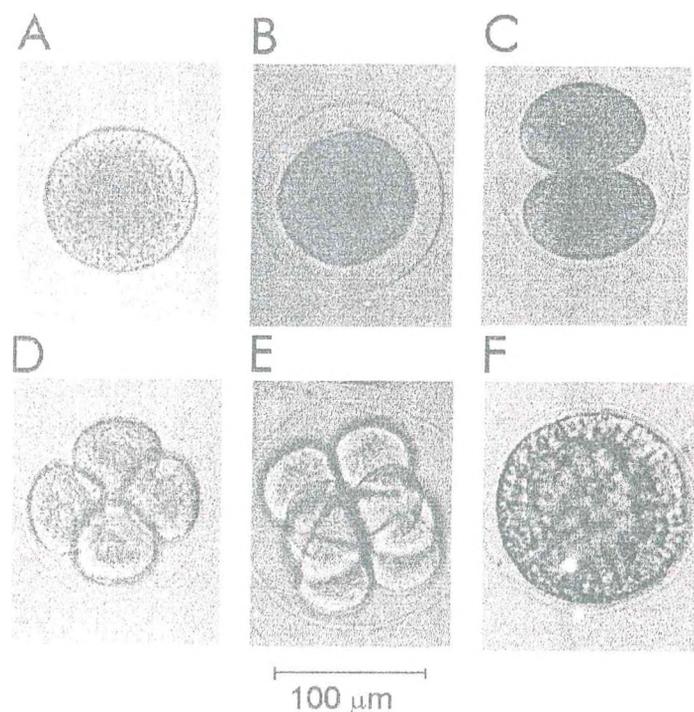


Figura 13- Fotomicrografias das primeiras fases do desenvolvimento embrionário do ouriço *Lytechinus variegatus*. A - óvulo; B - ovo com membrana de fecundação; C - 1^a. divisão; D - 2^a. divisão; E - 3^a. divisão; F - blástula.

3.8. Secreção de insulina

3.8.1. Animais

Foram usados ratos Wistar adultos, de ambos os sexos, pesando entre 250 a 300 g, acondicionados em caixa de polietileno e mantidos sob temperatura média de 26 °C, em ciclo claro/escuro de 12 horas, com ração e água *ad libitum*.

3.8.2. Ilhotas de Langerhans

3.8.2.1. Medida da secreção de insulina

O pâncreas foi removido e inflado com solução tampão Hank's na presença de 0,8 mg de colagenase/mL e incubado por 18 minutos a 37°C. Em seguida, após homogeneização manual, as ilhotas foram separadas com o auxílio de pipeta Pasteur. Grupos de 100 a 150 ilhotas foram pré-incubadas durante 45 minutos, sob gaseamento constante com carbogênio (5% de CO₂ e 95% de O₂) em solução de Krebs, contendo 5,6 mM de glicose. A seguir, grupos de 5 ilhotas foram incubados durante 60 min em solução de Krebs contendo 2,8 e 16,4 mM de glicose na presença e ausência de microcistina-LR (5µg/mL). Durante os 10 min iniciais de incubação o pH foi equilibrado a 7,4 com carbogênio. Após a incubação, o sobrenadante foi armazenado a 20 °C para posterior dosagem de insulina (Figura 14)

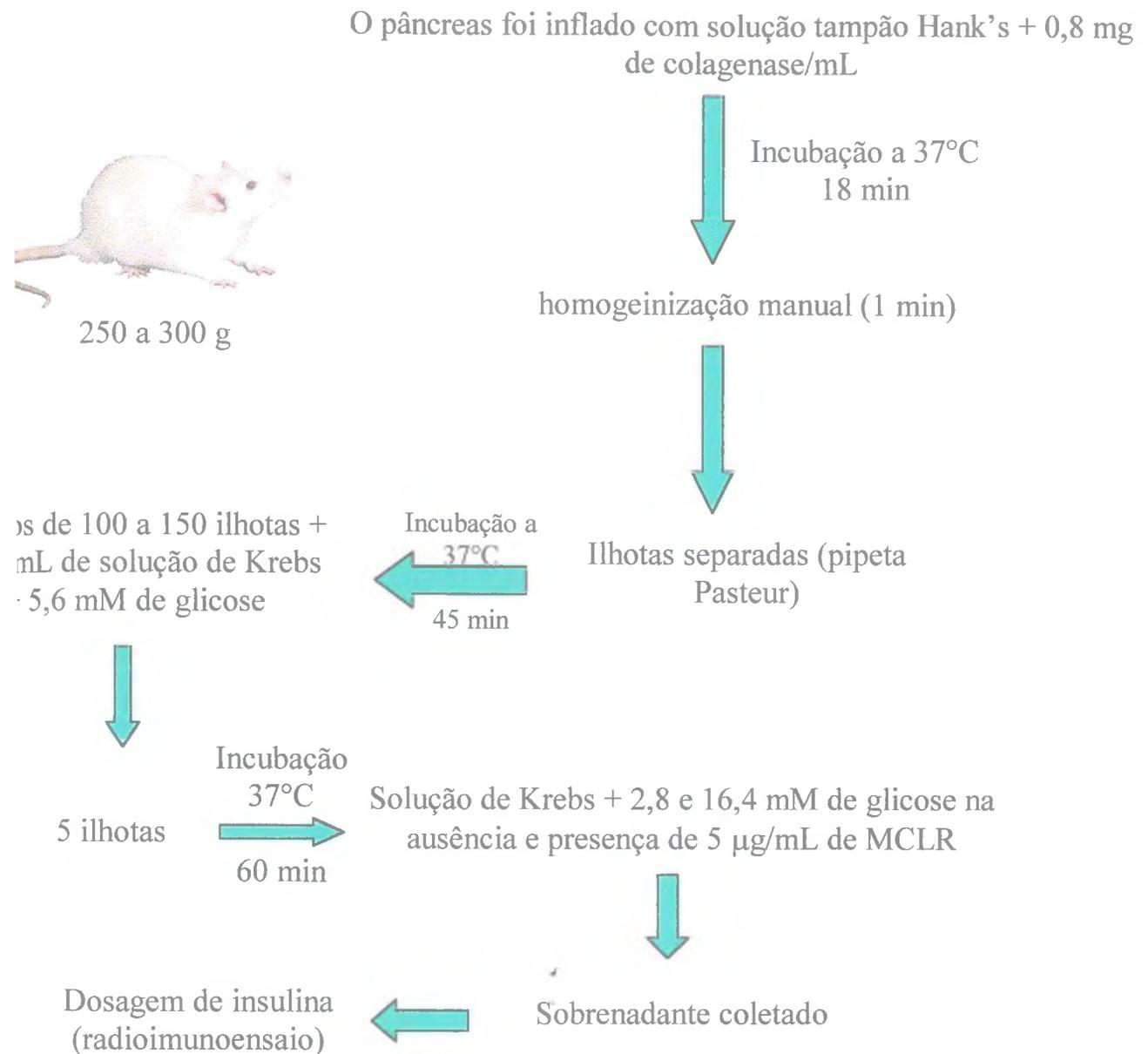


Figura 14- Obtenção das ilhotas de Langerhans e secreção de insulina

MCLR- microcistina-LR

3.8.3. Dosagem de insulina

A insulina secretada durante o experimento foi determinada por radioimunoensaio (SCOTT e cols., 1981). Para isso, 0,1 mL das amostras de sobrenadante foram transferidas para um tubo de ensaio, os quais receberam 0,2 mL de solução contendo anticorpo antiinsulina (1:200) e insulina marcada com ^{125}I (traçador) em tampão fosfato com pH 7,4 acrescido de 0,9% de NaCl e albumina 0,5%. Em seguida foram preparados os seguintes controles:

- a) 3 tubos (ligação não específica) contendo 0,2 mL de tampão fosfato com insulina marcada com ^{125}I para a averiguação da radiação máxima.
- b) 3 tubos (ligação não específica) contendo 0,2 mL de tampão fosfato com insulina marcada com ^{125}I e 0,1 mL de tampão fosfato, para determinar possíveis interferências no ensaio pelos componentes do tampão.
- c) 3 tubos (referência) contendo 0,2 mL de tampão fosfato contendo insulina marcada com ^{125}I e anticorpo anti-insulina e 0,1 mL de tampão fosfato constituindo assim o zero de insulina da curva padrão.

Em seguida foram preparados, uma série de tubos (curva padrão), contendo 0,1 mL de insulina nas seguintes concentrações: 0,02; 0,039; 0,078; 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,5 e 5,0 ng/mL. Cada tubo dessa série recebeu também 0,2 mL de solução tampão fosfato contendo insulina marcada com ^{125}I e anticorpo anti-insulina. No final da preparação os tubos

(amostras, controle e curva padrão), foram agitados em vortex e estocados a 4 °C durante 48 h.

Após este período de incubação, com exceção dos totais para análise da radiação máxima, todos os outros tubos receberam 0,2 mL da solução contendo 2,5% de carvão (Norit A), 0,5% de albumina e 0,25% de dextran T70. Os tubos foram deixados em repouso durante 20 min, em seguida, centrifugados durante 20 min a 2800 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a radioatividade contida em cada tubo avaliada em contador de radiação γ (gama). Os 3 tubos elaborados para análise de radiação máxima não tiveram o sobrenadante descartado, sendo a radiação dos mesmos avaliada diretamente. Com base nos valores obtidos nos tubos contendo insulina conhecida, elaborou-se uma curva padrão que foi utilizada para a avaliação dos valores desconhecidos das amostras. Os resultados foram expressos em ng/mL de insulina secretada durante o experimento *in vitro*.

3.9. Análises estatísticas

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Para a comparação múltipla dos dados paramétricos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. O teste “t” de Student foi utilizado para dados não paramétricos ($p < 0,05$).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da microcistina no modelo de anel de aorta

A microcistina-LR nas doses utilizadas (1, 3, 10, 30, 100 e 300 ng/mL) não foi capaz de provocar efeito direto sobre a aorta de rato, nem foi capaz de potencializar o efeito da fenilefrina (Figura 15).

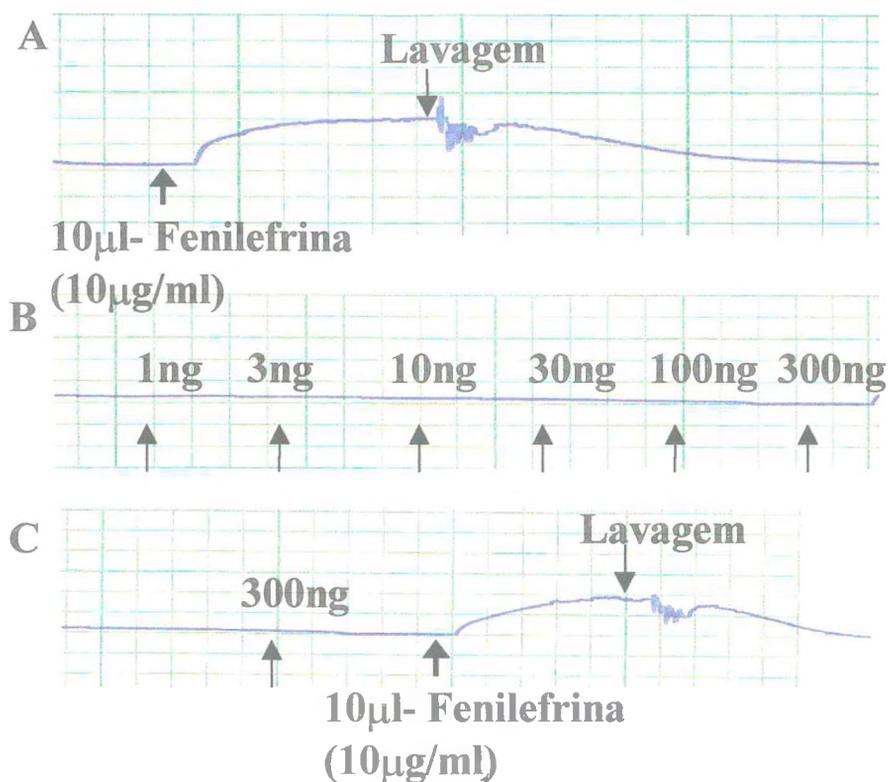


Figura 15– Efeito da microcistina-LR em anel de aorta isolado de rato. **Painel A:** Resposta da aorta à fenilefrina (1 μ M); **Painel B:** Efeito da microcistina-LR (1, 3, 10, 30 100 e 300 ng/mL) na aorta; **Painel C:** Efeito da microcistina-LR associada à fenilefrina (1 μ M).

4.2. Perfusão renal

4.2.1. Efeito do sobrenadante de macrófagos sem estímulo

O grupo controle em que os rins foram perfundidos com sobrenadante de macrófagos peritoneais sem estímulo (SOBM ϕ S+RPMI), não apresentou nenhuma alteração significativa dos parâmetros funcionais renais, pressão de perfusão (PP), resistência vascular renal (RVR), ritmo de filtração glomerular (RFG), fluxo urinário (FU), percentual de transporte de sódio (%TNa⁺), percentual de transporte de potássio (%TK⁺), percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa⁺) e percentual de transporte proximal de potássio (%pTK⁺), permanecendo constantes durante todo o período do experimento (120 min), quando comparados com o controle interno (Tabelas 2 a 9).

4.2.2. Efeitos renais do sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR

O sobrenadante coletado (1 mL) de macrófagos peritoneais estimulados com 1 μ g/mL de microcistina-LR foi administrado ao sistema de perfusão de rim isolado de rato aos 30 min. Os 30 min iniciais foram considerados controle interno. A adição do sobrenadante causou alterações significativas dos parâmetros funcionais. Foram observados aumento significativo ($p < 0,05$) da pressão de perfusão, resistência vascular renal, ritmo de filtração glomerular e fluxo urinário. O percentual de transporte

de sódio (%TNa⁺), percentual de transporte proximal de sódio (%pTNa⁺) e percentual de transporte proximal de potássio (%pTK⁺) apresentaram redução significativa ($p < 0,05$), enquanto o percentual de transporte de potássio (%TK⁺) não sofreu alteração. Todos os parâmetros foram comparados com o grupo controle e com o controle interno. Os resultados estão sumarizados nas tabelas 2 a 9.

A adição do sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR causou um discreto, mas significativo aumento na pressão de perfusão e resistência vascular renal aos 60 min (Figuras 16 e 17). O fluxo urinário (FU) também foi significativamente incrementado na presença de sobrenadante ativado pela toxina aos 60, 90 e 120 min. Este aumento apresentou resposta máxima aos 120 min quando comparado com o grupo controle e com o controle interno (Figura 18). O ritmo de filtração glomerular foi aumentado aos 60, 90 e 120 min, quando comparados com o grupo controle e com o controle interno, com efeito máximo aos 60 min (Figura 19). O percentual de transporte de sódio, o percentual de transporte proximal de sódio e o percentual de transporte proximal de potássio foram reduzidos aos 120 min (Figuras 20, 21 e 23), enquanto o percentual de transporte de potássio não foi alterado (Figura 22).

4.2.3. Efeito do inibidor de síntese protéica (ciclohexamida) sobre o efeito renal induzido pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR.

A ciclohexamida (10^{-5} M), um inibidor de síntese protéica, foi adicionado às culturas de macrófagos 30 min antes da microcistina-LR e permaneceu durante todo o período de estímulo.

As alterações induzidas pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR na resistência vascular renal, fluxo urinário, ritmo de filtração glomerular e percentual de transporte de sódio, foram bloqueadas significativamente pela ciclohexamida.

A ciclohexamida mostrou capacidade de reverter a maioria das alterações provocadas pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR, quando comparada com o grupo controle e com o controle interno (Tabelas 2 a 9). A droga reverteu o aumento observado na resistência vascular renal aos 60 min (Figura 17). Mostrou-se capaz de bloquear o aumento observado no fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular aos 60, 90 e 120 min (Figuras 18 e 19). Também antagonizou o decréscimo no percentual de transporte de sódio aos 120 min (Figura 20).

Não houve reversão das alterações causadas na pressão de perfusão (Figura 16), percentual de transporte proximal de sódio (Figura 21) e potássio (Figura 23).

4.2.4. Efeito dos inibidores de fosfolipase A₂ sobre o efeito renal induzido pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR.

Dexametasona (10^{-5} M), um inibidor de síntese protéica e de fosfolipase A₂, e quinacrina (10^{-5} M), um inibidor seletivo de fosfolipase A₂, administrados ao sobrenadante de macrófagos 30 min antes e durante a estimulação com microcistina-LR foram capazes de bloquear os efeitos na resistência vascular renal, fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular (Figuras 25, 26 e 27). Os inibidores de fosfolipase A₂ reverteram o aumento observado nestes parâmetros funcionais renais quando comparados com o grupo controle e com o controle interno. Os dados estão sumarizados nas tabelas 9 a 17.

A dexametasona reverteu o aumento na resistência vascular renal aos 60 min (Figura 25). Mostrou-se capaz de antagonizar os efeitos do sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR no fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular aos 60, 90 e 120 min (Figuras 26 e 27).

A quinacrina também reverteu o aumento na resistência vascular renal aos 60 min (Figura 25). Mostrou-se capaz de antagonizar os efeitos do sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR no fluxo urinário aos 60, 90 e 120 min (Figura 26) e no ritmo de filtração glomerular aos 60 e 120 min (Figura 27).

Não houve reversão das alterações causadas na pressão de perfusão (Figura 24), percentual de transporte de sódio (Figura 28), percentual de transporte proximal de sódio (Figura 29) e potássio (Figura 31).

4.2.5. Efeito do inibidor de fator de necrose tumoral (TNF- α) sobre o efeito renal induzido pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR.

A talidomida ($1,5 \times 10^{-5}$ M), inibidor da síntese de TNF- α , bloqueou apenas o efeito do sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR na resistência vascular renal (Figura 30), não antagonizando o efeito em outros parâmetros (Figuras 29 e 31 a 36).

A talidomida antagonizou de modo significativo o aumento da resistência vascular renal observado aos 60 min, quando comparada com o grupo controle e controle interno (Figura 33).

Esses dados estão sumarizados nas tabelas 18 a 25.

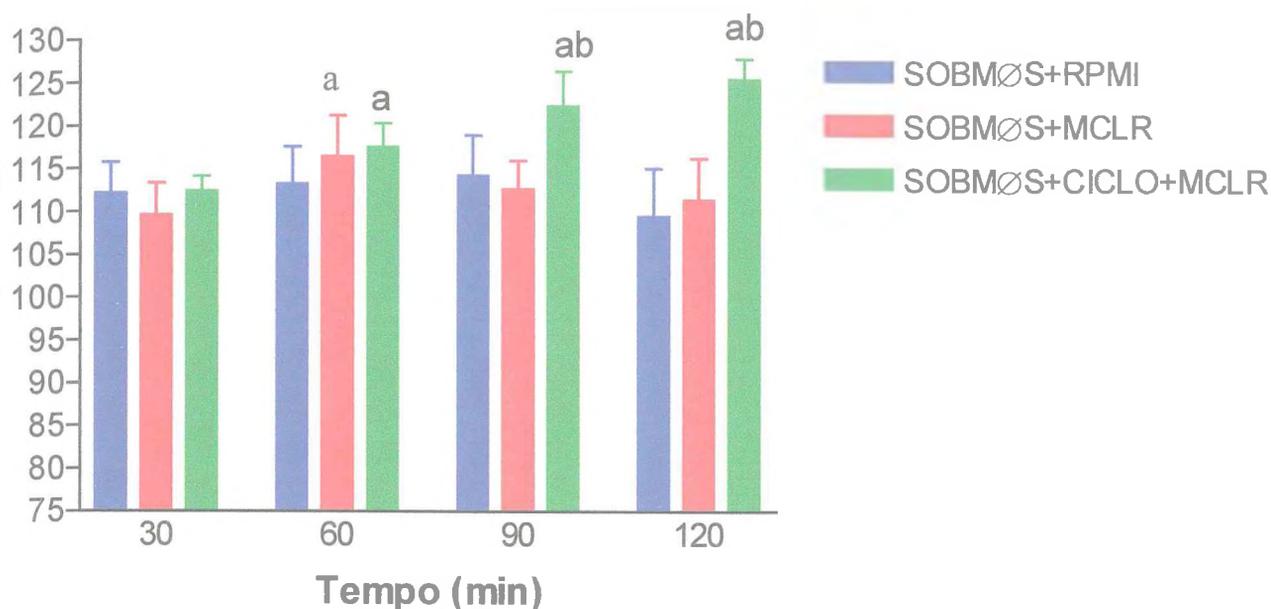


Figura 16– Ação do inibidor de síntese protéica sobre a pressão de perfusão (PP) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR; 1µg/mL; n=6). A ciclohexamida (CICLO; 10⁻⁵M) foi adicionada às culturas de macrófagos 30 min antes de estimulação com a toxina. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

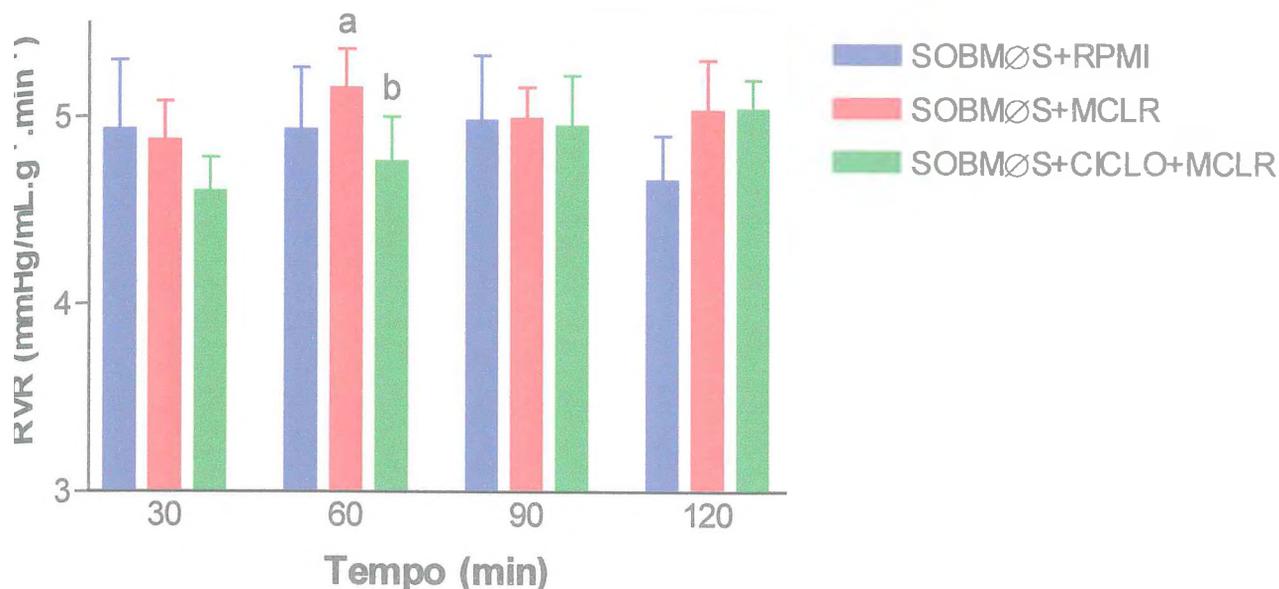


Figura 17– Ação do inibidor de síntese protéica sobre a resistência vascular renal (RVR) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR; 1µg/mL; n=6). A ciclohexamida (CICLO; 10⁻⁵M) foi adicionada às culturas de macrófagos 30 min antes de estimulação com a toxina. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

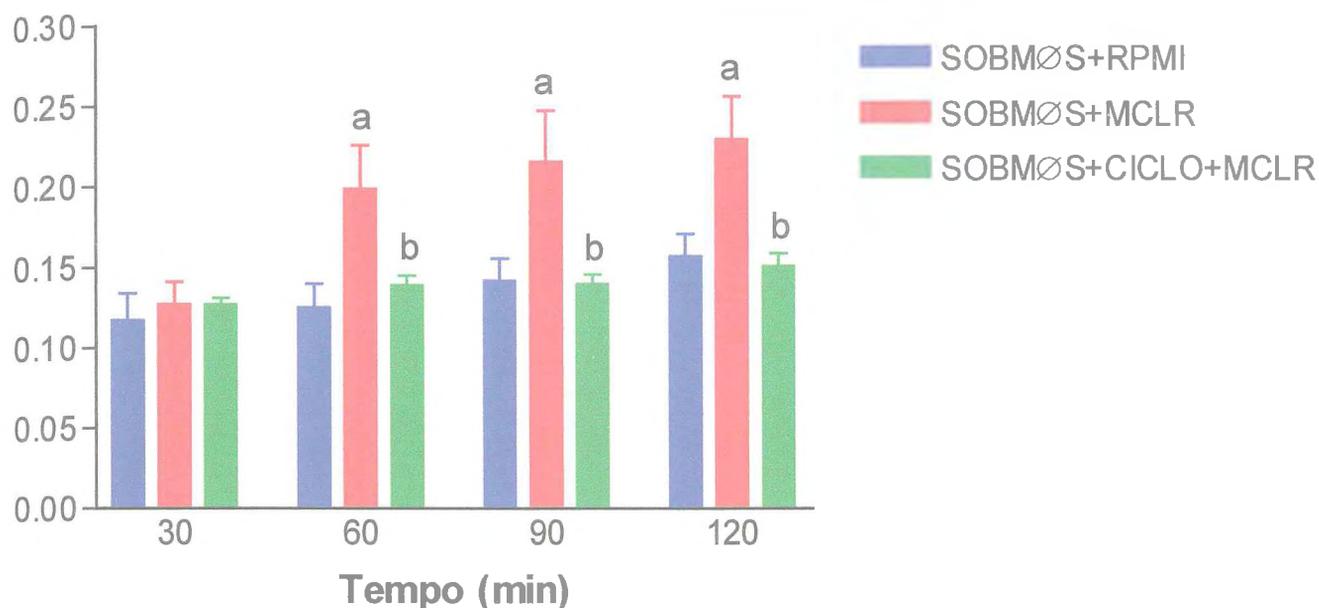


Figura 18– Ação do inibidor de síntese protéica sobre o fluxo urinário (FU) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR; 1µg/mL; n=6). A ciclohexamida (CICLO; 10⁻⁵M) foi adicionada às culturas de macrófagos 30 min antes de estimulação com a toxina. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

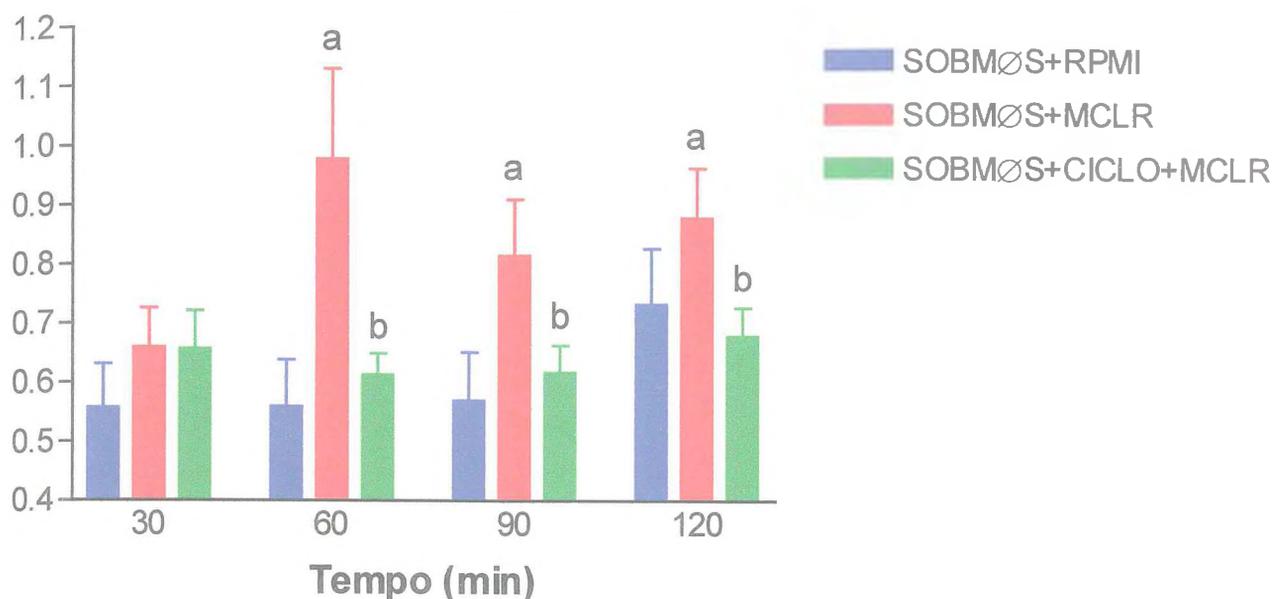


Figura 19– Ação do inibidor de síntese protéica sobre o ritmo de filtração glomerular (RFG) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR; 1µg/mL; n=6). A ciclohexamida (CICLO; 10⁻⁵M) foi adicionada às culturas de macrófagos 30 min antes de estimulação com a toxina. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

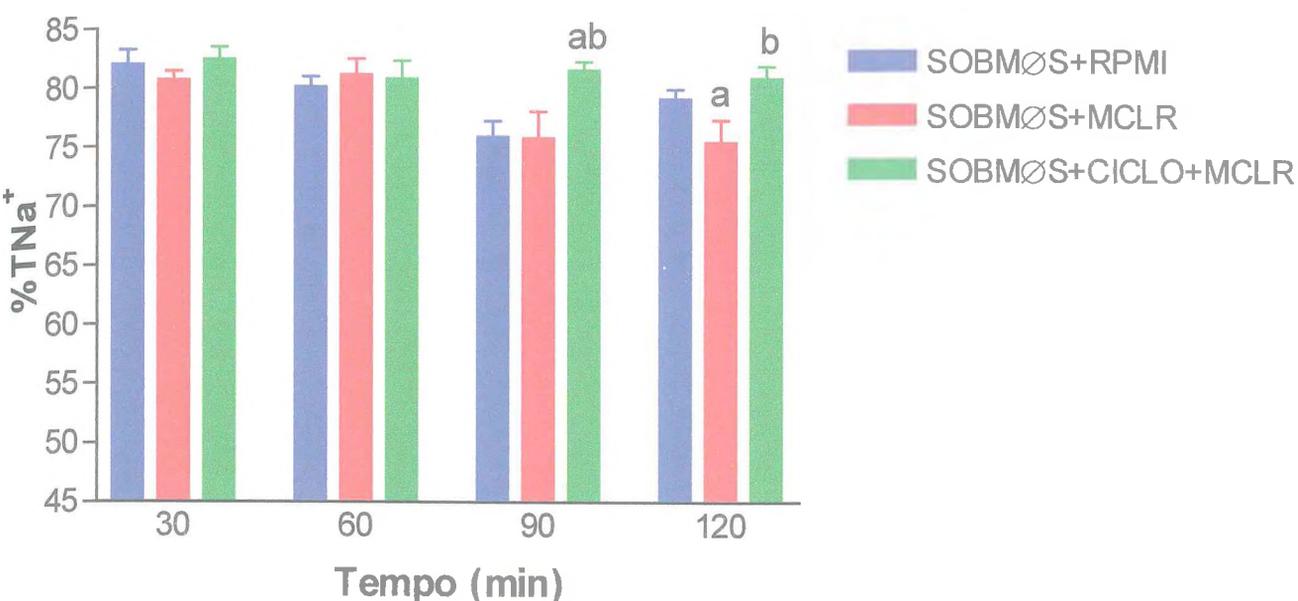


Figura 20– Ação do inibidor de síntese protéica sobre o percentual de transporte de sódio (%TNa⁺) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR; 1µg/mL; n=6). A ciclohexamida (CICLO; 10⁻⁵M) foi adicionada às culturas de macrófagos 30 min antes de estimulação com a toxina. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

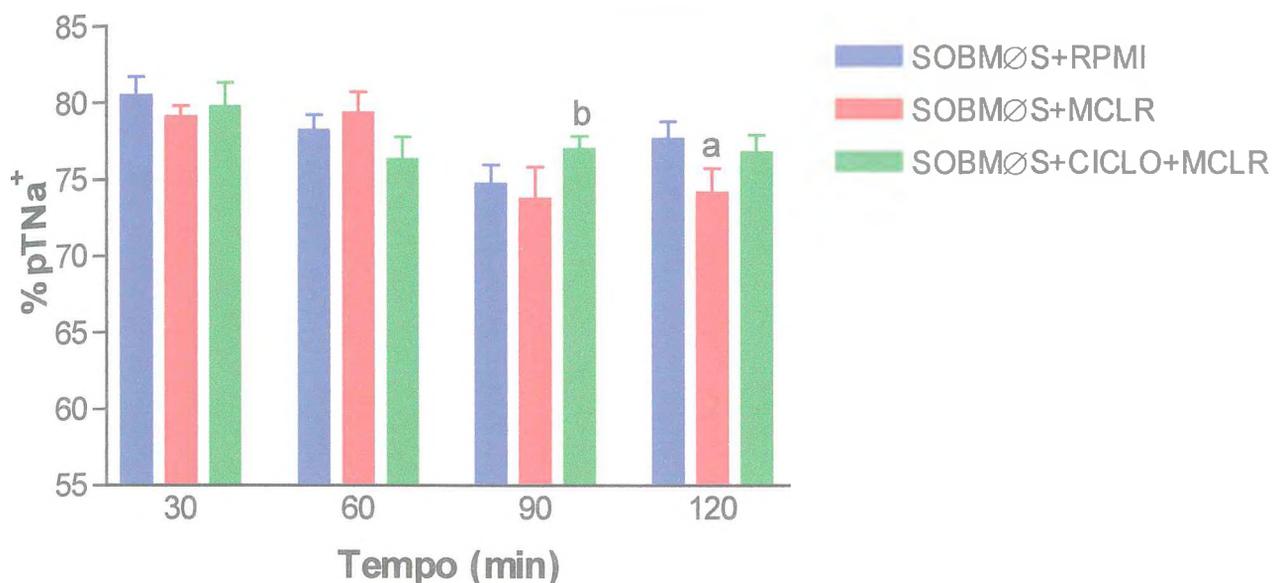


Figura 21– Ação do inibidor de síntese protéica sobre o percentual de transporte de sódio proximal (%pTNa⁺) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR; 1µg/mL; n=6). A ciclohexamida (CICLO; 10⁻⁵M) foi adicionada às culturas de macrófagos 30 min antes de estimulação com a toxina. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

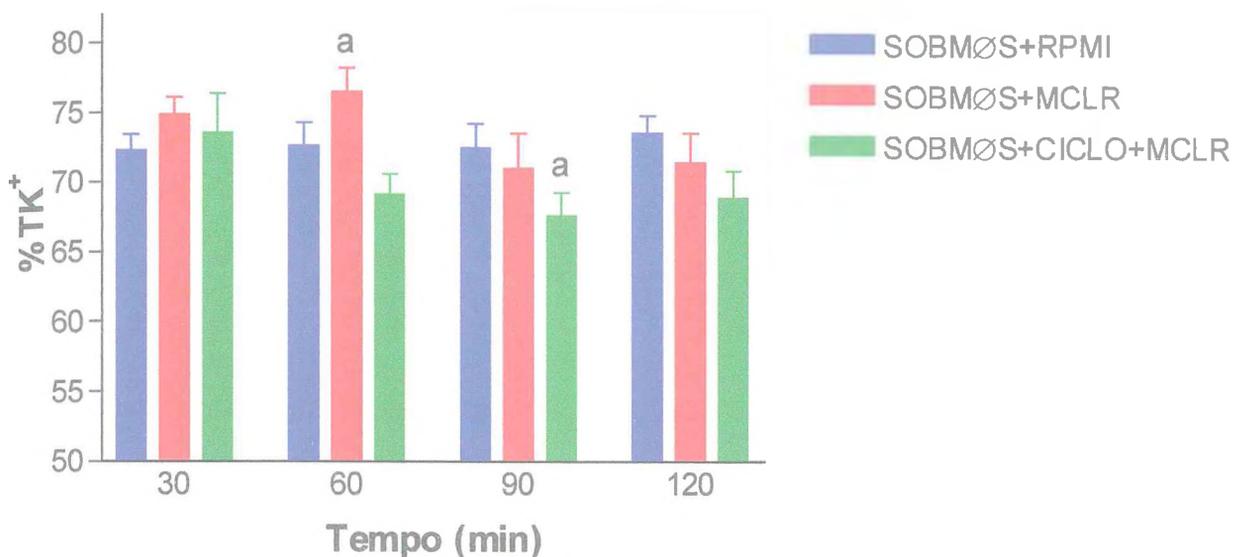


Figura 22– Ação do inibidor de síntese protéica sobre o percentual de transporte de potássio ($\%TK^+$) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR; $1\mu\text{g/mL}$; $n=6$). A ciclohexamida (CICLO; 10^{-5}M) foi adicionada às culturas de macrófagos 30 min antes de estimulação com a toxina. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle ($p<0,05$); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR ($p<0,05$), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

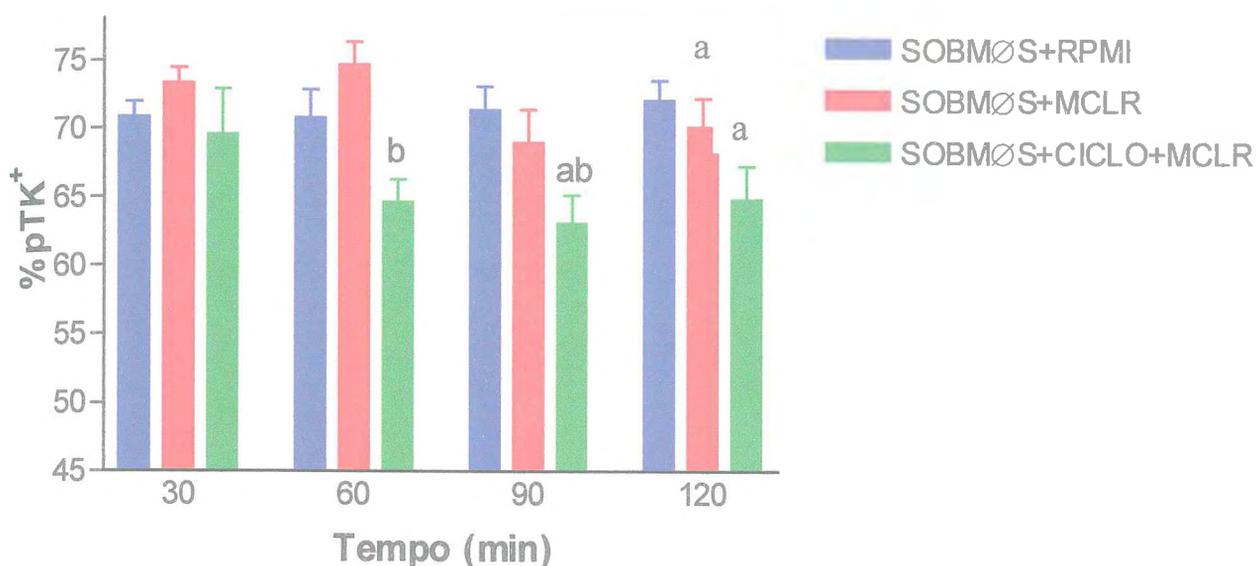


Figura 23– Ação do inibidor de síntese protéica sobre o percentual de transporte de potássio proximal (%pTK⁺) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR; 1µg/mL; n=6). A ciclohexaímida (CICLO; 10⁻⁵M) foi adicionada às culturas de macrófagos 30 min antes de estimulação com a toxina. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

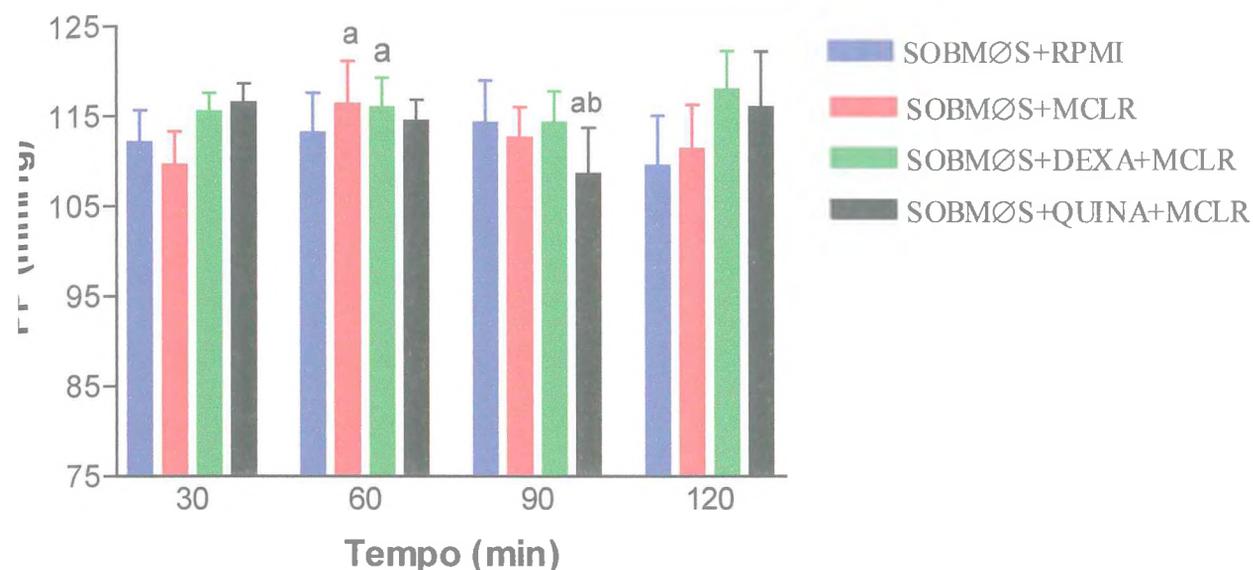


Figura 24— Ação dos inibidores de fosfolipase A₂ sobre a pressão de perfusão (PP) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR; 1µg/mL; n=6). A dexametasona (DEXA; 10⁻⁵M) e quinacrina (QUINA; 10⁻⁵M) foram adicionadas às culturas de macrófagos 30 min antes de estimulação com a toxina. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

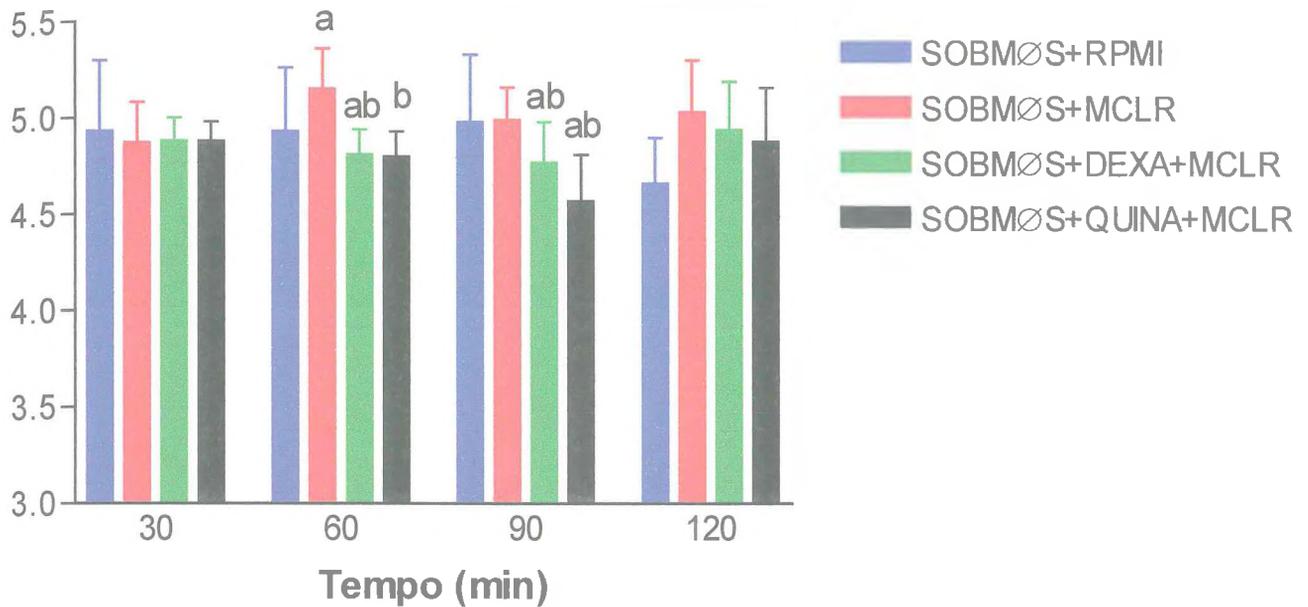


Figura 25– Ação dos inibidores de fosfolipase A₂ sobre a resistência vascular renal (RVR) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR; 1µg/mL; n=6). A dexametasona (DEXA; 10⁻⁵M) e quinacrina (QUINA; 10⁻⁵M) foram adicionadas às culturas de macrófagos 30 min antes de estimulação com a toxina. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

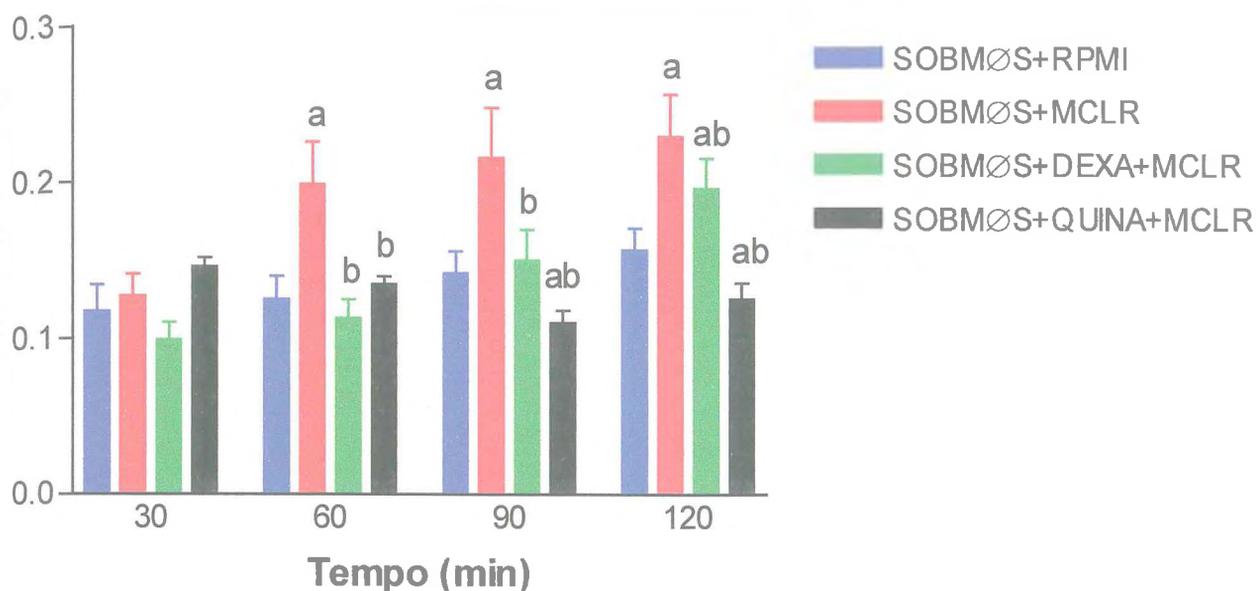


Figura 26– Ação dos inibidores de fosfolipase A₂ sobre o fluxo urinário (FU) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR; 1µg/mL; n=6). A dexametasona (DEXA; 10⁻⁵M) e quinacrina (QUINA; 10⁻⁵M) foram adicionadas às culturas de macrófagos 30 min antes de estimulação com a toxina. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

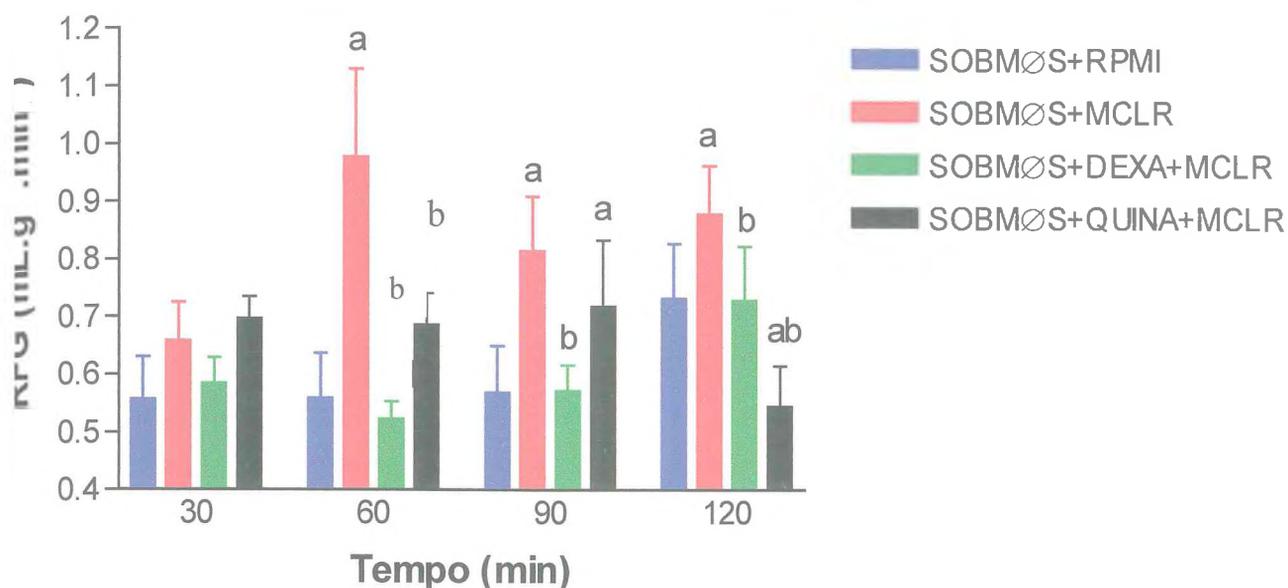


Figura 27– Ação dos inibidores de fosfolipase A₂ sobre o ritmo de filtração glomerular (RFG) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR; 1µg/mL; n=6). A dexametasona (DEXA; 10⁻⁵M) e quinaçrina (QUINA; 10⁻⁵M) foram adicionadas às culturas de macrófagos 30 min antes de estimulação com a toxina. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

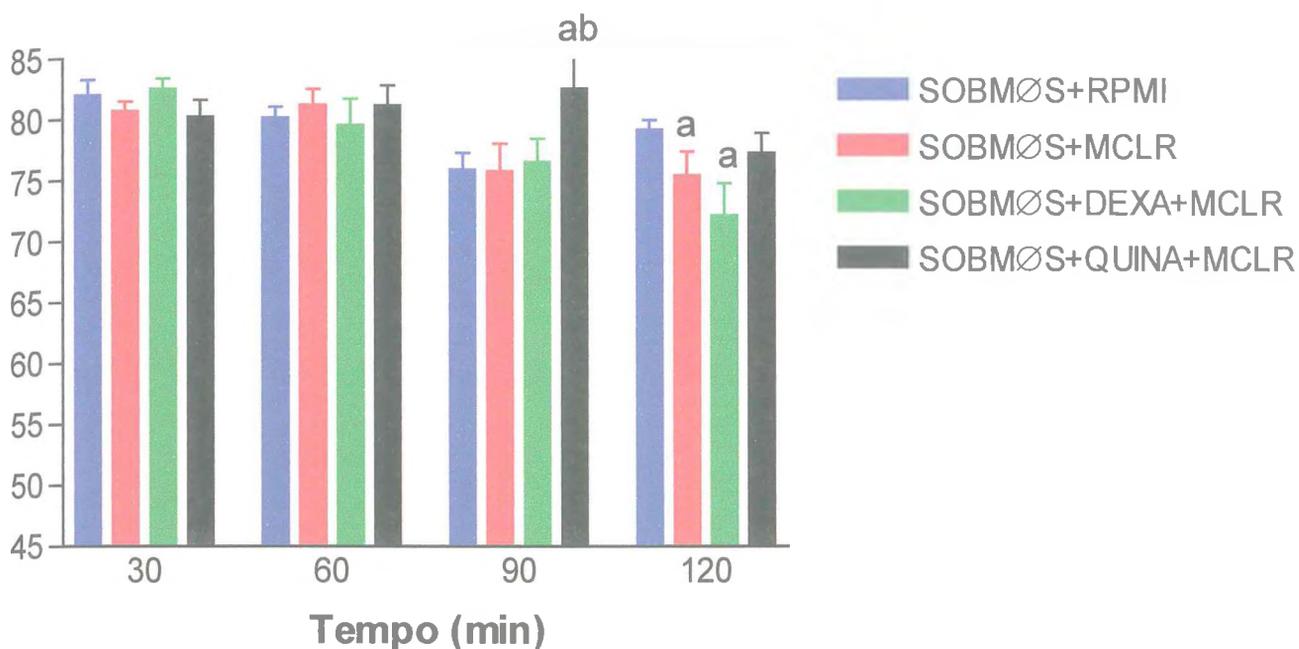


Figura 28– Ação dos inibidores de fosfolipase A_2 sobre o percentual de transporte de sódio ($\%TNa^+$) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR; $1\mu\text{g/mL}$; $n=6$). A dexametasona (DEXA; 10^{-5}M) e quinacrina (QUINA; 10^{-5}M) foram adicionadas às culturas de macrófagos 30 min antes de estimulação com a toxina. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle ($p<0,05$); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR ($p<0,05$), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

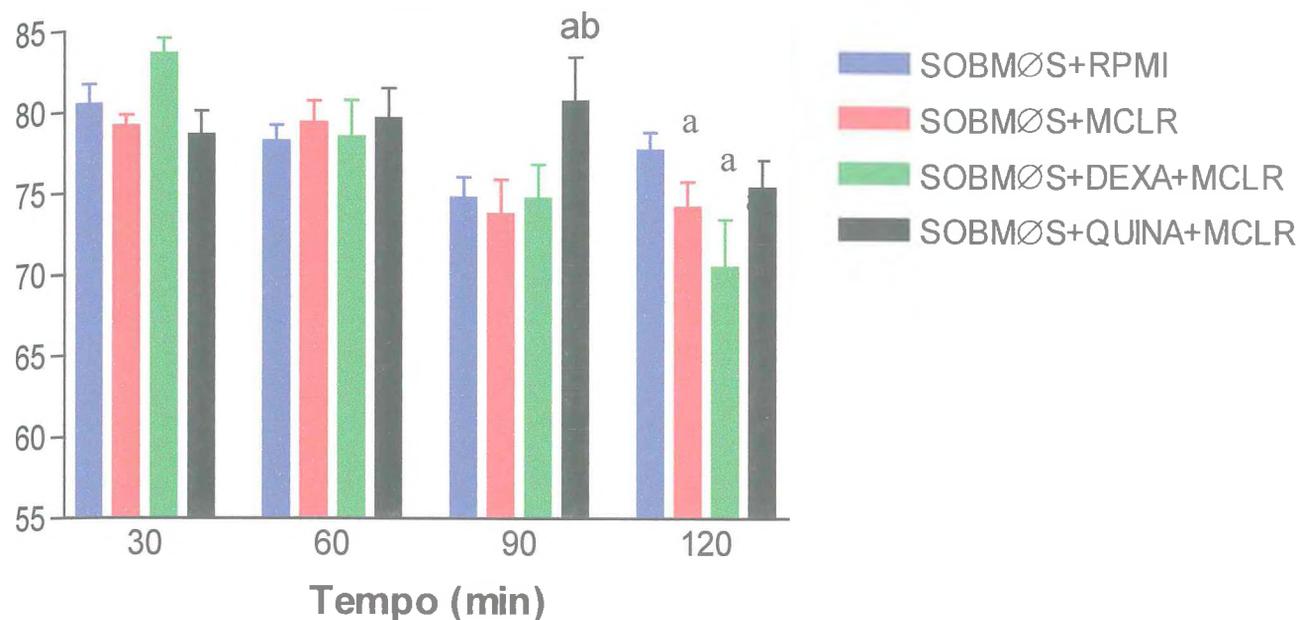


Figura 29– Ação dos inibidores de fosfolipase A_2 sobre o percentual de transporte de sódio proximal (%pTNa⁺) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR; 1µg/mL; n=6). A dexametasona (DEXA; 10⁻⁵M) e quinacrina (QUINA; 10⁻⁵M) foram adicionadas às culturas de macrófagos 30 min antes de estimulação com a toxina. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

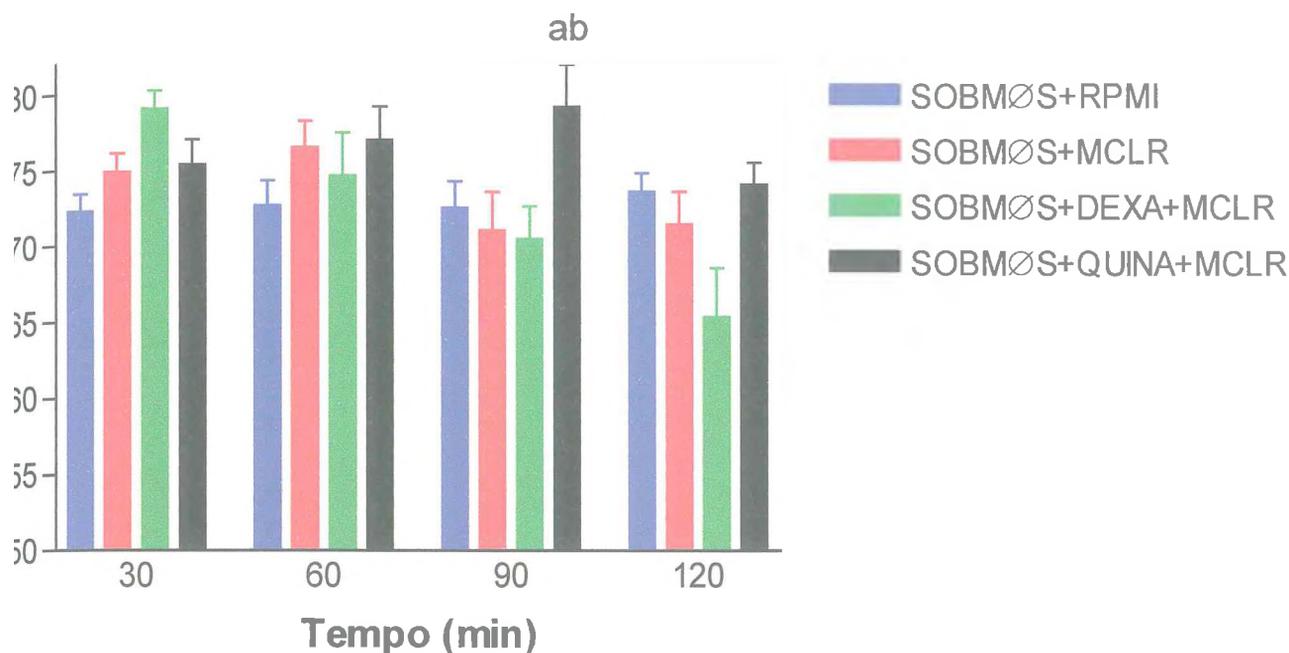


Figura 30– Ação dos inibidores de fosfolipase A_2 sobre o percentual de transporte de potássio ($\%TK^+$) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR; $1\mu\text{g/mL}$; $n=6$). A dexametasona (DEXA; 10^{-5}M) e quinacrina (QUINA; 10^{-5}M) foram adicionadas às culturas de macrófagos 30 min antes de estimulação com a toxina. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle ($p<0,05$); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR ($p<0,05$), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

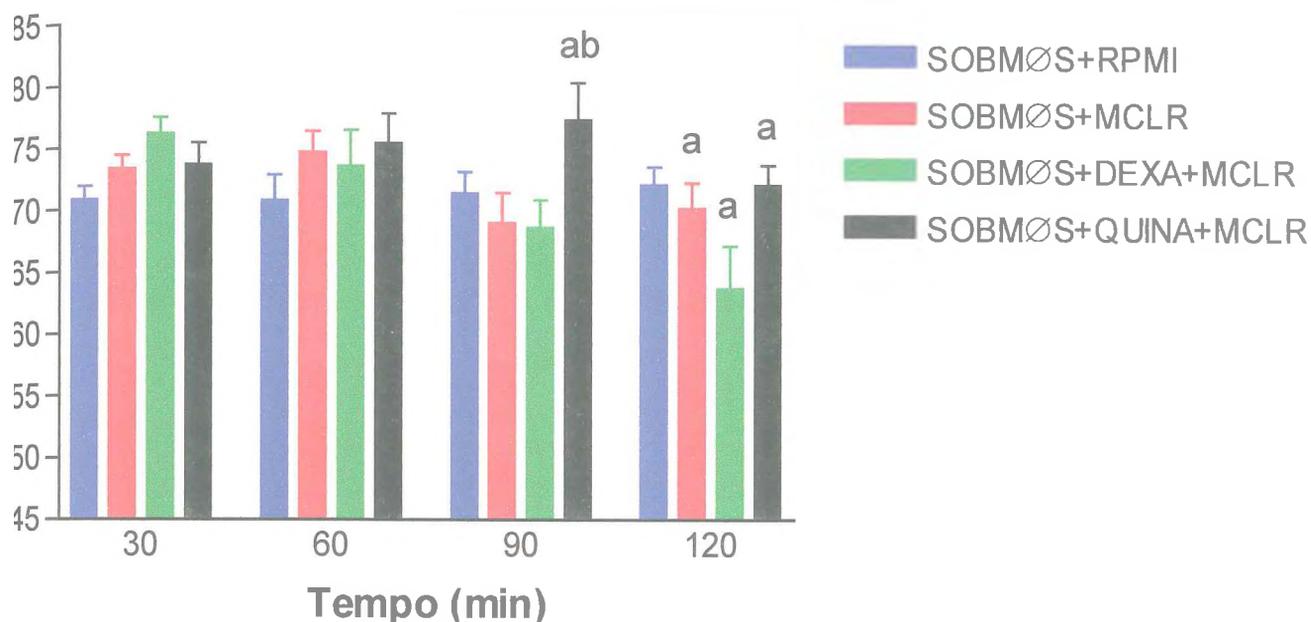


Figura 31– Ação dos inibidores de fosfolipase A_2 sobre o percentual de transporte de potássio proximal (%pTK⁺) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR; 1µg/mL; n=6). A dexametasona (DEXA; 10⁻⁵M) e quinacrina (QUINA; 10⁻⁵M) foram adicionadas às culturas de macrófagos 30 min antes de estimulação com a toxina. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

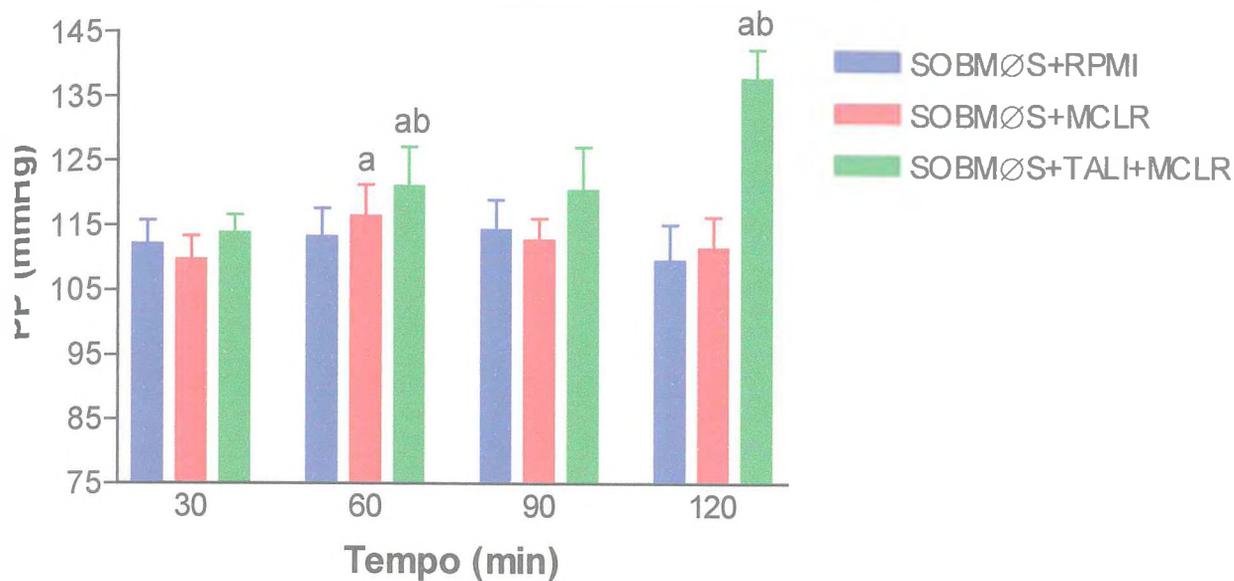


Figura 32– Ação do inibidor de TNF sobre a pressão de perfusão (PP) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR; 1µg/mL; n=6). A talidomida (TALI; 1,5x10⁻⁵M) foi adicionada às culturas de macrófagos 30 min antes de estimulação com a toxina. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

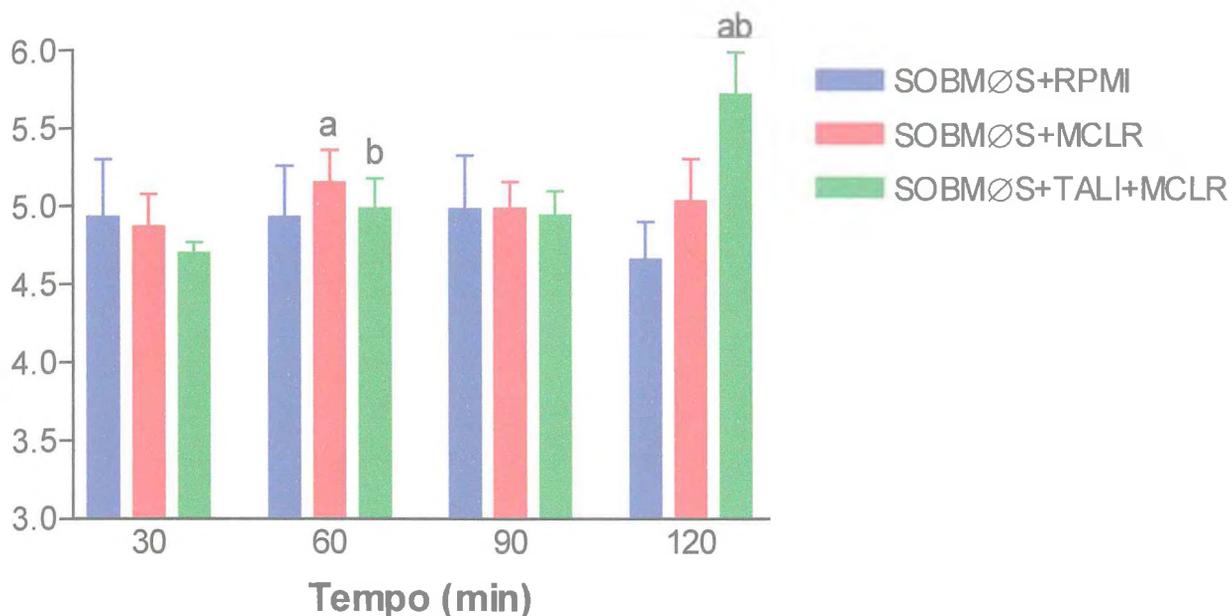


Figura 33– Ação do inibidor de TNF sobre a resistência vascular renal (RVR) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR; $1\mu\text{g}/\text{mL}$; $n=6$). A talidomida (TALI; $1,5\times 10^{-5}\text{M}$) foi adicionada às culturas de macrófagos 30 min antes de estimulação com a toxina. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle ($p<0,05$); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR ($p<0,05$), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

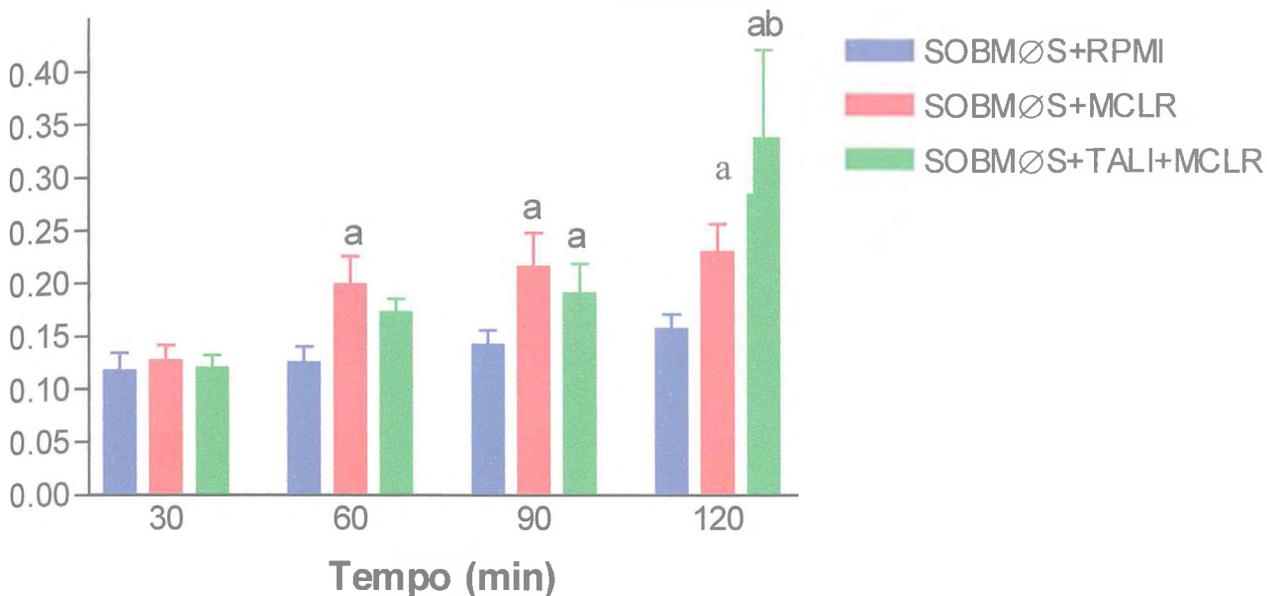


Figura 34– Ação do inibidor de TNF sobre o fluxo urinário (FU) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR; 1µg/mL; n=6). A talidomida (TALI; 1,5x10⁻⁵M) foi adicionada às culturas de macrófagos 30 min antes de estimulação com a toxina. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

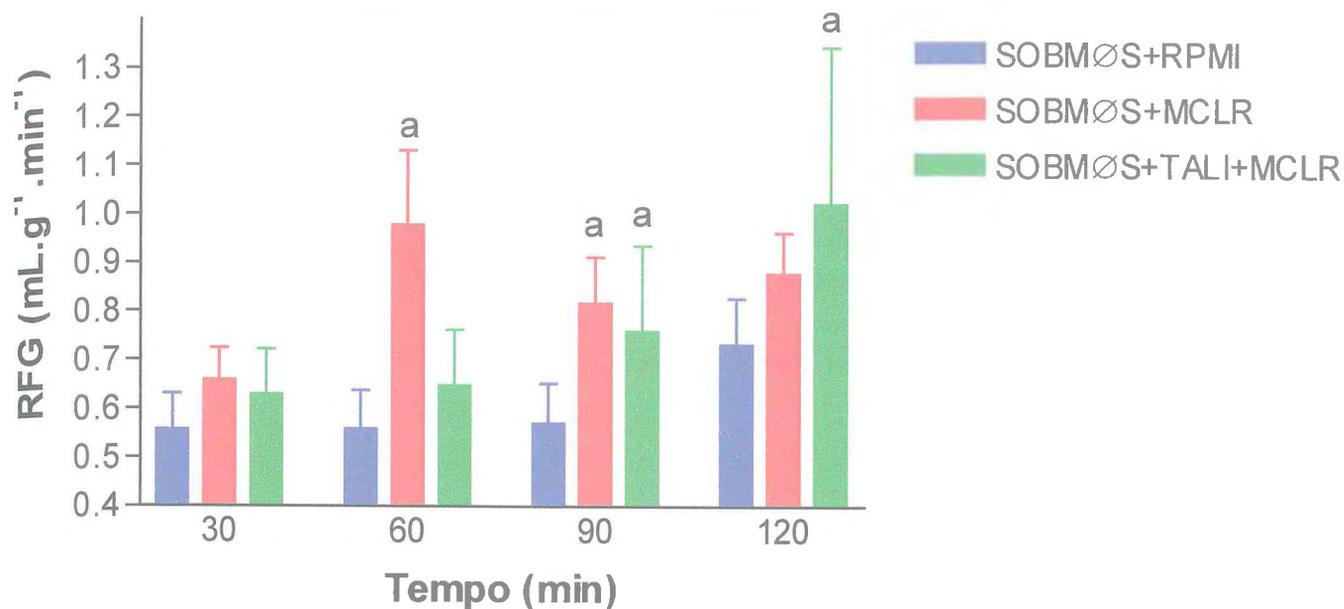


Figura 35– Ação do inibidor de TNF sobre o ritmo de filtração glomerular (RFG) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR; 1µg/mL; n=6). A talidomida (TALI; 1,5x10⁻⁵M) foi adicionada às culturas de macrófagos 30 min antes de estimulação com a toxina. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

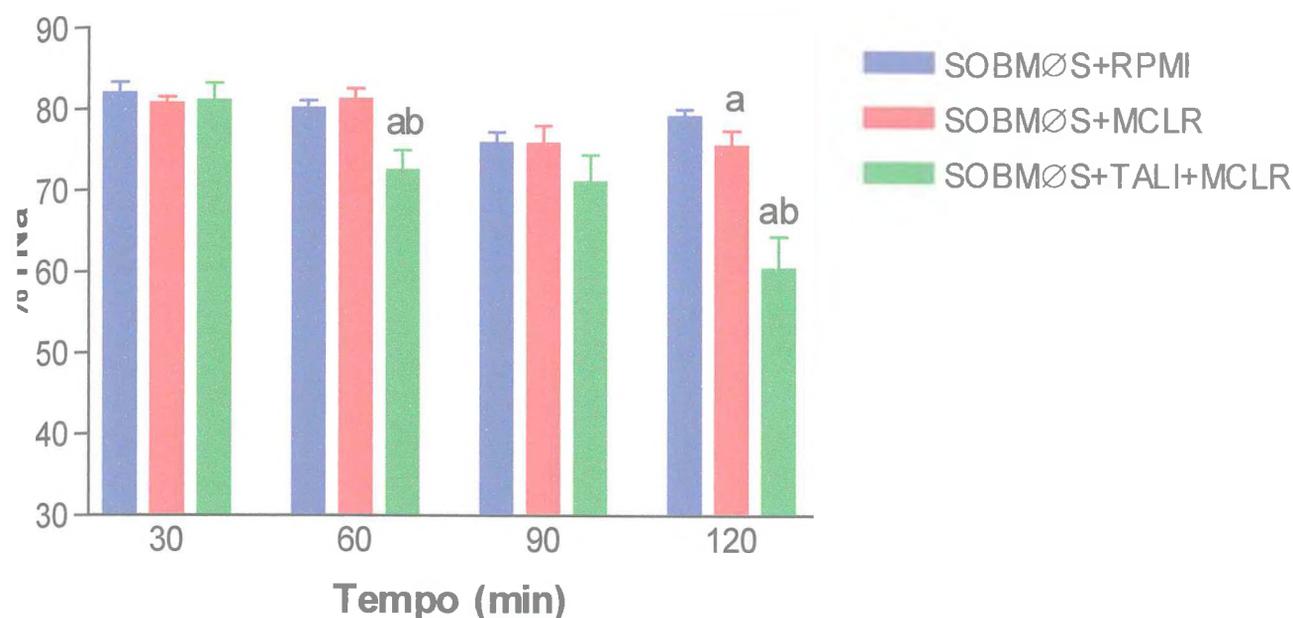


Figura 36– Ação do inibidor de TNF sobre o percentual de transporte de sódio (%TNa⁺) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR; 1µg/mL; n=6). A talidomida (TALI; 1,5x10⁻⁵M) foi adicionada às culturas de macrófagos 30 min antes de estimulação com a toxina. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

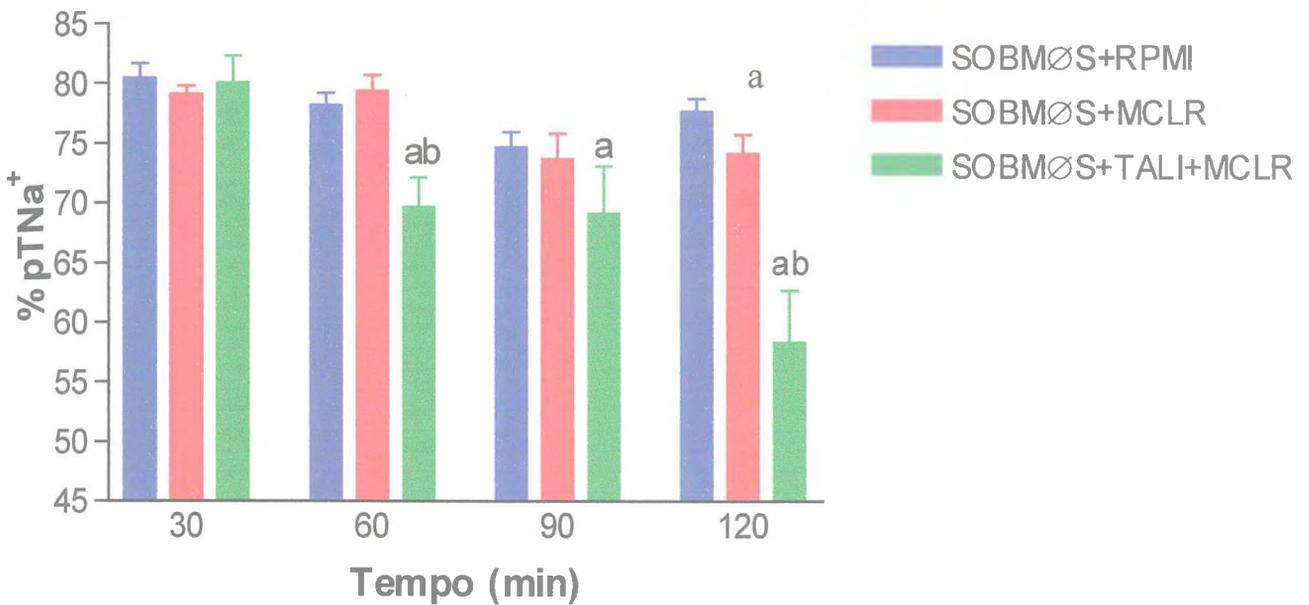


Figura 37– Ação do inibidor de TNF sobre o percentual de transporte de sódio proximal (%pTNa⁺) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR; 1µg/mL; n=6). A talidomida (TALI; 1,5x10⁻⁵M) foi adicionada às culturas de macrófagos 30 min antes de estimulação com a toxina. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

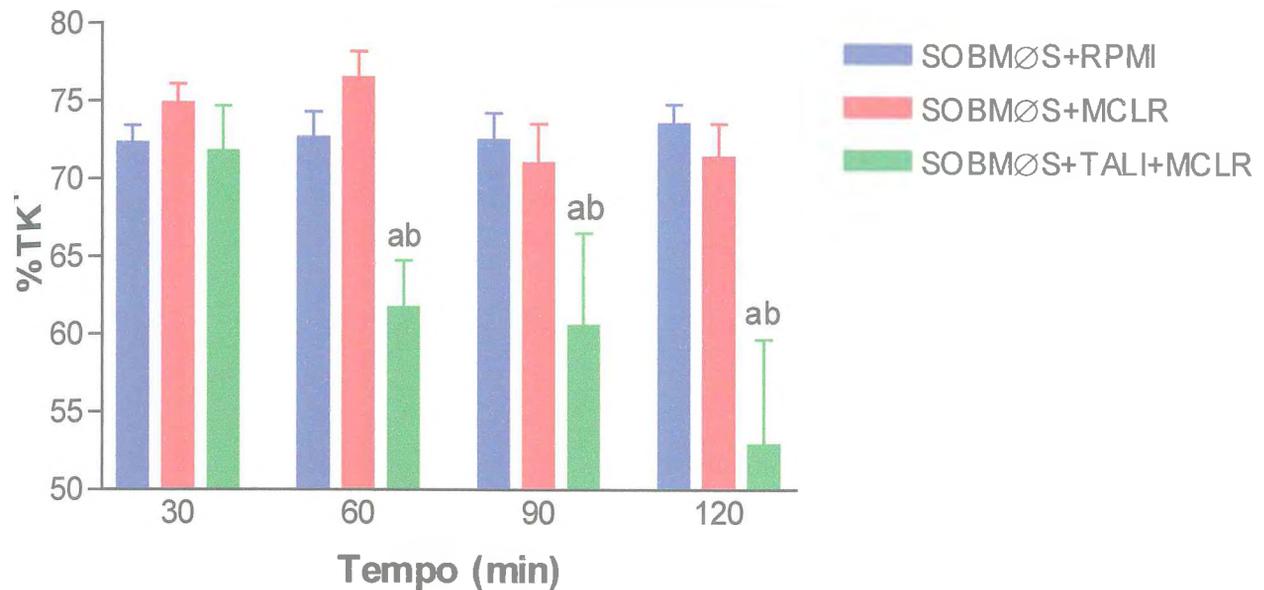


Figura 38– Ação do inibidor de TNF sobre o percentual de transporte de potássio (%TK⁺) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR; 1µg/mL; n=6). A talidomida (TALI; 1,5x10⁻⁵M) foi adicionada às culturas de macrófagos 30 min antes de estimulação com a toxina. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

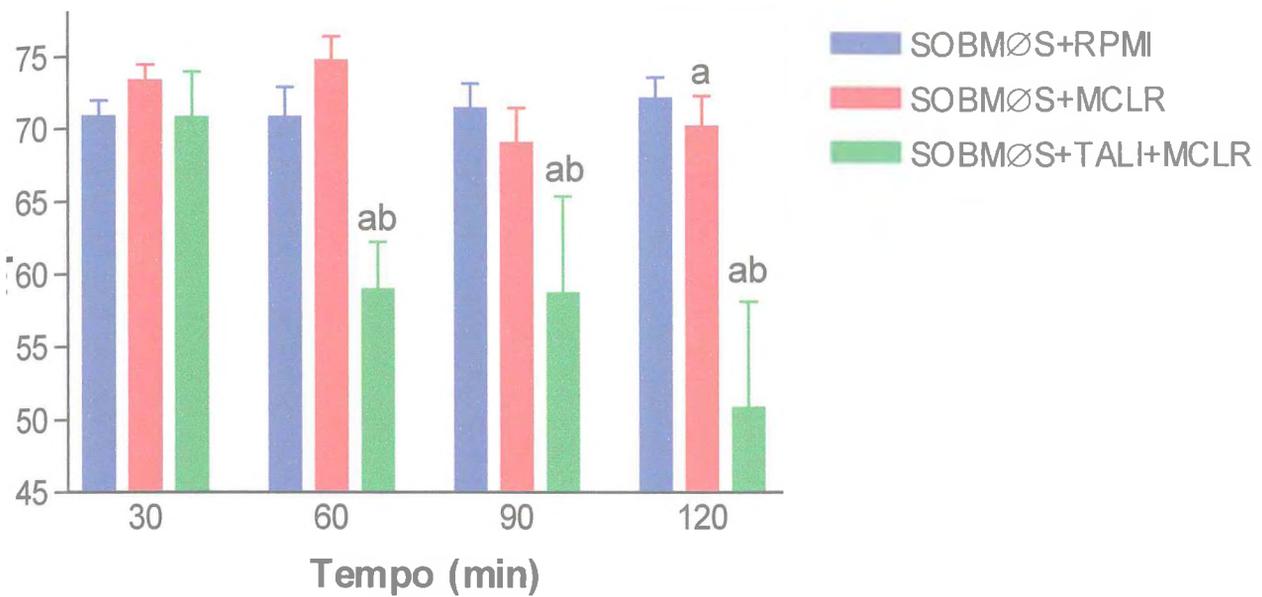


Figura 39– Ação do inibidor de TNF sobre o percentual de transporte de potássio proximal (%pTK⁺) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR; 1µg/mL; n=6). A talidomida (TALI; 1,5x10⁻⁵M) foi adicionada às culturas de macrófagos 30 min antes de estimulação com a toxina. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

4.3. Efeito na alça intestinal isolada de rato.

No modelo de alça intestinal isolada de rato e no tempo de 18 horas, foi observado atividade secretória da toxina da cólera, utilizada como controle positivo. A microcistina-LR (1 μ g/mL) e o sobrenadante de macrófagos da lâmina própria estimulados com microcistina-LR (1 μ g/mL) foram capazes de induzir secreção significativa neste modelo (Figura 40). A taxa de secreção do fluido intestinal foi avaliada levando em consideração os pesos úmido e seco dividido pelo comprimento da alça (Tabela 26).

Tabela 26- Efeito intestinal da toxina da cólera (TC -1 μ g/mL - controle positivo), microcistina-LR (MCLR - 1 μ g/mL) e sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR (SobMCLR - 1 μ g/mL) em modelo de alça isolada de rato.

Grupo	Peso úmido	Peso seco	g/cm
PBS (controle)	0.120 \pm 0.02	0.053 \pm 0.001	0.07 \pm 0.001
TC	0.179 \pm 0.01 ^a	0.062 \pm 0.004	0.12 \pm 0.004
MCLR	0.155 \pm 0.01 ^a	0.069 \pm 0.003	0.09 \pm 0.003
Dulbecco (controle)	0.124 \pm 0.01	0.052 \pm 0.002	0.03 \pm 0.002
SOBMCLR	0.162 \pm 0.01 ^b	0.066 \pm 0.003	0.10 \pm 0.003

Os dados representam a média \pm E.P.M. ($p < 0,05$) e foram analisados por teste *t* de Student não pareado. Foram utilizados 6 animais em cada grupo. Dulbecco – meio de cultura utilizado para obtenção de sobrenadante de macrófagos da lâmina própria (representa o grupo controle sem estímulo). a- significância em relação ao grupo controle Ringer; b- significância em relação ao grupo controle Dulbecco.

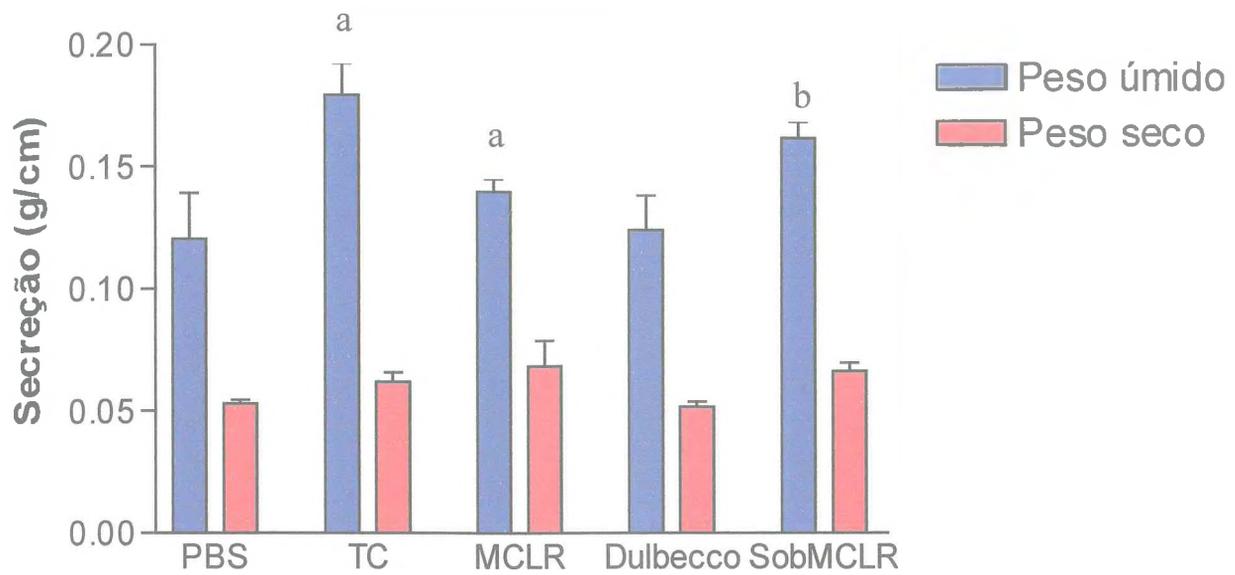


Figura 40- Efeito intestinal da toxina da cólera (TC – controle secretório positivo), microcistina-LR (MCLR) e sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR (1 μ g/mL) em modelo de alça isolada de rato. Foram utilizados 6 animais em cada grupo. Dulbecco – meio de cultura utilizado para obtenção de sobrenadante de macrófagos da lâmina própria (representa o grupo controle sem estímulo). Os dados representam a média \pm E.P.M. e foram analisados teste *t* de Student não pareado com significância de $p < 0,05$. a- significância em relação ao grupo controle Ringer; b- significância em relação ao grupo controle Dulbecco.

4.4. Efeito na perfusão intestinal.

O modelo de perfusão intestinal *in vivo*, foi utilizado para avaliar o efeito da microcistina-LR (1 μ g/mL) e do sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR (1 μ g/mL), na absorção de eletrólitos e água. A toxina da cólera foi utilizada como controle secretório positivo. O meio de cultura utilizado para obtenção de macrófagos da lâmina própria foi o Dulbecco e este grupo representa o sobrenadante sem estímulo.

A microcistina-LR alterou significativamente a absorção intestinal de sódio quando comparada com o grupo controle (RINGER) da mesma forma que a toxina da cólera (Figura 41). Entretanto, quando houve o pré-tratamento com a toxina da cólera, a microcistina-LR promoveu uma diminuição da atividade secretora, quando comparada com as toxinas utilizadas isoladamente.

Por sua vez, microcistina-LR promoveu alteração significativa na absorção intestinal de potássio quando comparada com o grupo controle da mesma forma que a toxina da cólera. Foi observado ainda uma redução da secreção de potássio nos animais pré-tratados com toxina da cólera 18 horas antes do experimento (Figura 42).

A microcistina-LR, da mesma forma que a toxina da cólera, promoveu alteração significativa na absorção de água. Nos animais pré-

tratados com a toxina da cólera, a microcistina-LR foi capaz de promover redução desta secreção (Figura 43).

Com relação à absorção de cloreto, a microcistina-LR também foi responsável por alteração significativa, assim como a toxina da cólera. No grupo tratado previamente com toxina da cólera, a perfusão com microcistina-LR demonstrou resultado semelhante ao da microcistina-LR e da toxina da cólera usadas isoladamente (Figura 44).

Por sua vez, o sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR também promoveu alteração na absorção de sódio de modo semelhante à microcistina e à toxina da cólera (Figura 45).

Efeito significativo semelhante também foi observado na absorção de potássio e de água (Figuras 46 e 47). Com relação à absorção de cloreto, foi observado que o sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR causa alteração similar à da microcistina-LR e toxina da cólera diretamente (Figura 48).

Estes resultados demonstram que o sobrenadante de macrófagos da lâmina própria estimulados com microcistin-LR é capaz de promover alteração na absorção de água e dos eletrólitos, sódio, potássio e cloreto, comparável aos efeitos da toxina da cólera e da microcistina-LR diretamente. Os dados estão sumarizados na tabela 27.

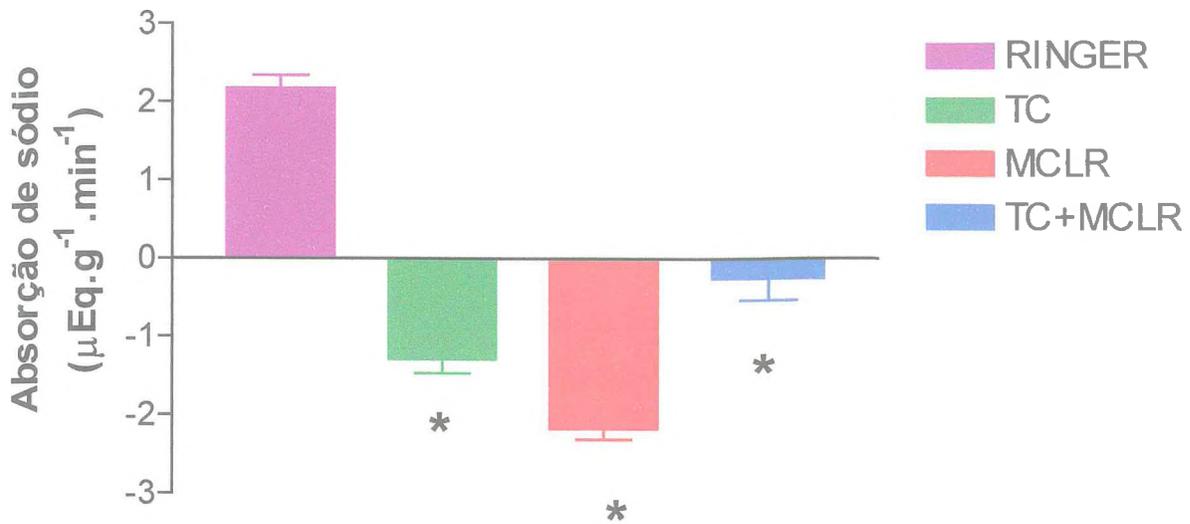


Figura 41- Efeito no transporte de sódio da toxina da cólera (TC - $1\mu\text{g/mL}$ – controle positivo) e microcistina-LR (MCLR - $1\mu\text{g/mL}$) na ausência e presença de pré-tratamento com toxina da cólera (TC+MCLR). Os dados representam a média \pm E.P.M. e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni) com significância de $p < 0,05^*$. Os valores negativos são considerados como balanço secretório e valores positivos são considerados balanço de absorção.

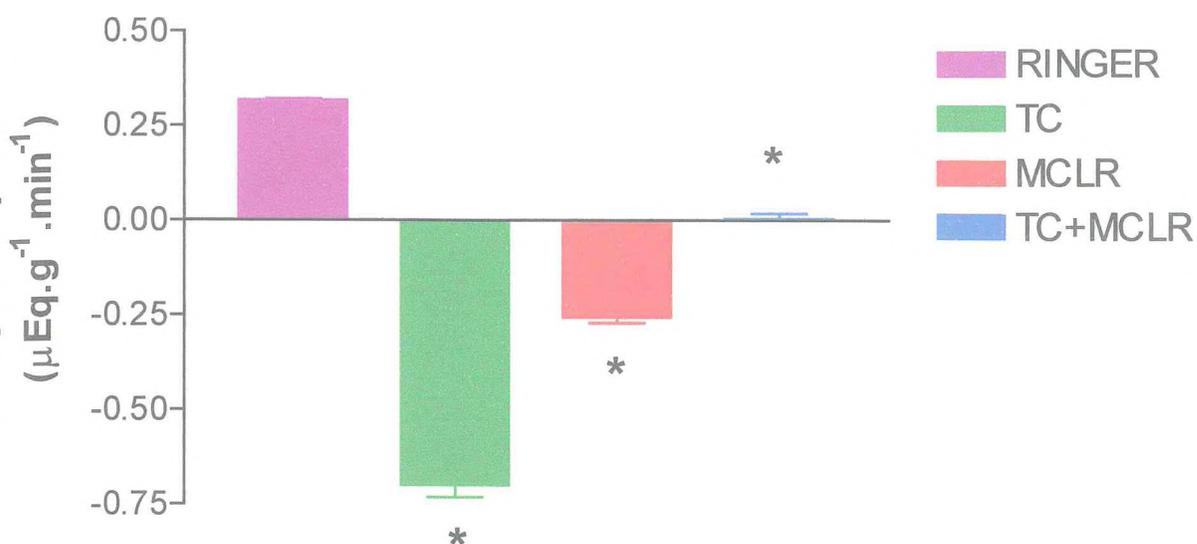


Figura 42- Efeito no transporte de potássio da toxina da cólera (TC - $1\mu\text{g}/\text{mL}$ - controle positivo) e microcistina-LR (MCLR - $1\mu\text{g}/\text{mL}$) na ausência e presença de pré-tratamento com toxina da cólera (TC+MCLR). Os dados representam a média \pm E.P.M. e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni) com significância de $p < 0,05^*$. Os valores negativos são considerados como balanço secretório e valores positivos são considerados balanço de absorção.

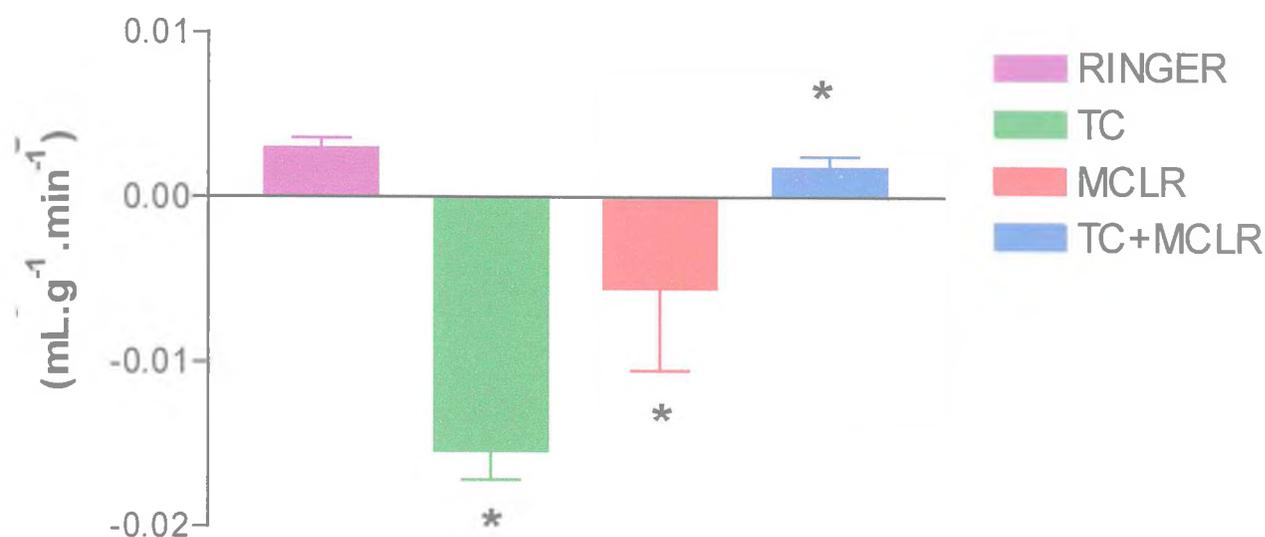


Figura 43- Efeito no transporte de água da toxina da cólera (1µg/mL – controle positivo) e microcistina-LR (1µg/mL) na ausência e presença de pré-tratamento com toxina da cólera. Os dados representam a média ± E.P.M. e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni) com significância de $p < 0,05^*$. Os valores negativos são considerados como balanço secretório e valores positivos são considerados balanço de absorção.

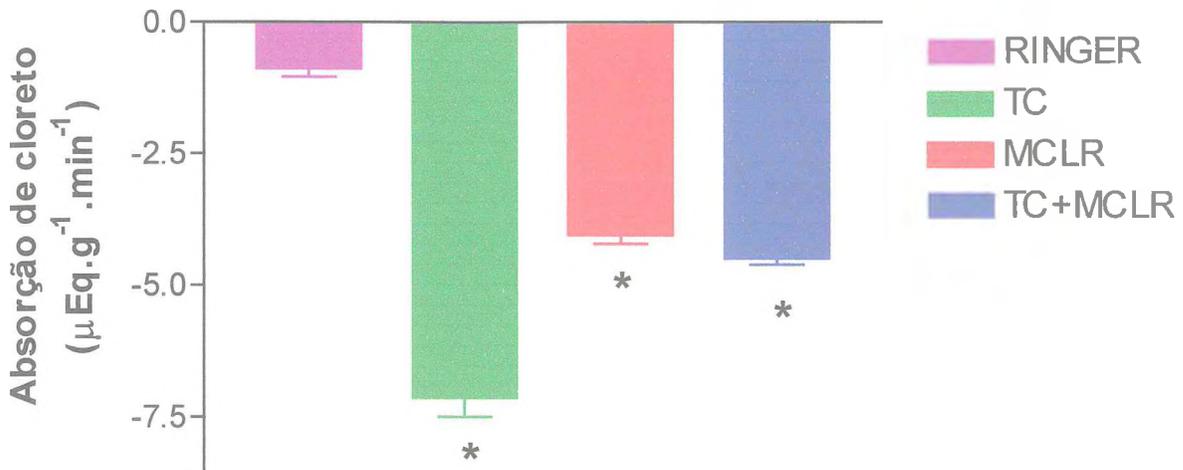


Figura 44- Efeito no transporte de cloreto da toxina da cólera (TC - 1µg/mL – controle positivo) e microcistina-LR (MCLR - 1µg/mL) na ausência e presença de pré-tratamento com toxina da cólera (TC+MCLR). Os dados representam a média \pm E.P.M. e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni) com significância de $p < 0,05^*$. Os valores negativos são considerados como balanço secretório e valores positivos são considerados balanço de absorção.

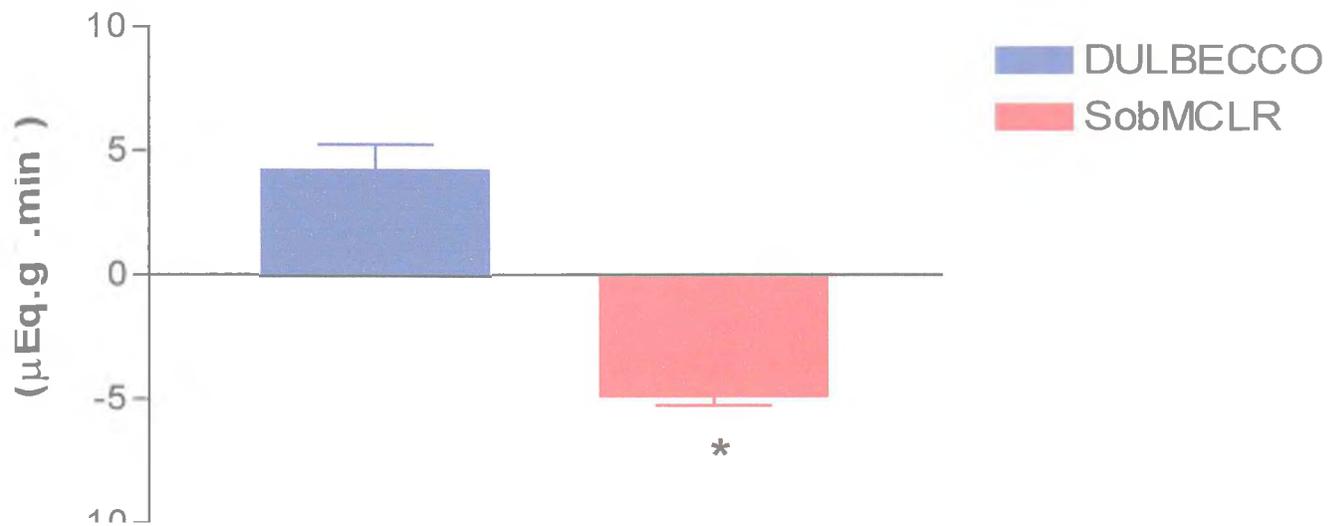


Figura 45- Efeito no transporte de sódio do sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1µg/mL). Os dados representam a média \pm E.P.M. e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni) com significância de $p < 0,05^*$. Os valores negativos são considerados como balanço secretório e valores positivos são considerados balanço de absorção. Dulbecco (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento.

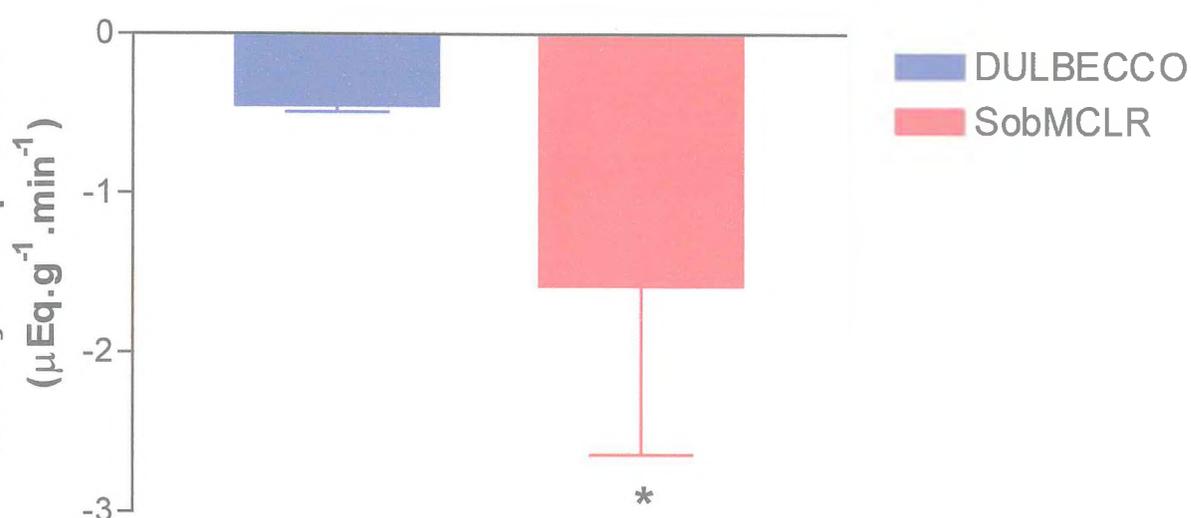


Figura 46- Efeito no transporte de potássio do sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR (MCLR - $1\mu\text{g/mL}$). Os dados representam a média \pm E.P.M. e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni) com significância de $p < 0,05^*$. Os valores negativos são considerados como balanço secretório e valores positivos são considerados balanço de absorção. Dulbecco (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento.

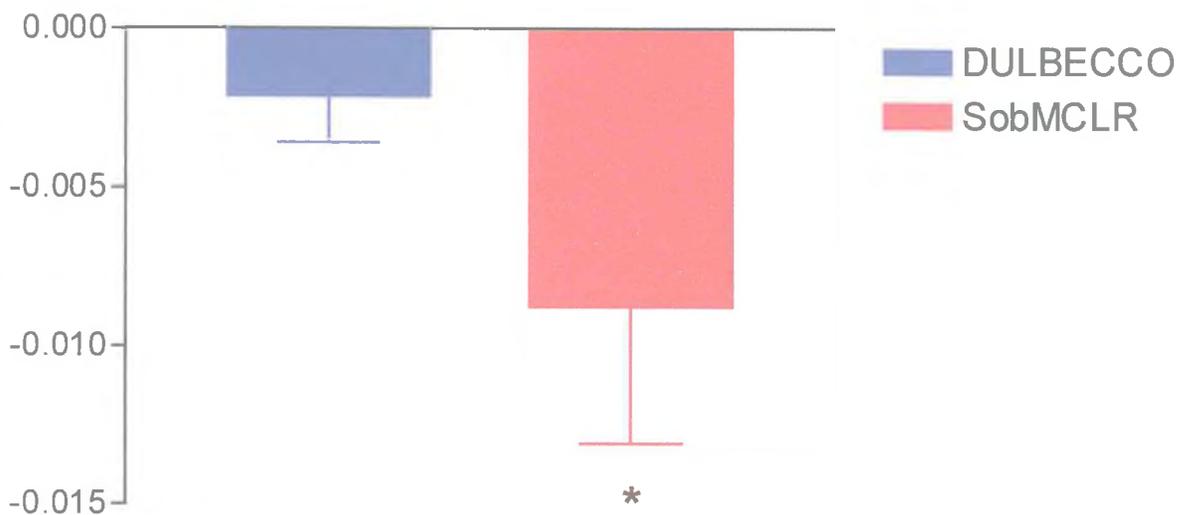


Figura 47- Efeito no transporte de água do sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1µg/mL). Os dados representam a média \pm E.P.M. e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni) com significância de $p < 0,05^*$. Os valores negativos são considerados como balanço secretório e valores positivos são considerados balanço de absorção. Dulbecco (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento.

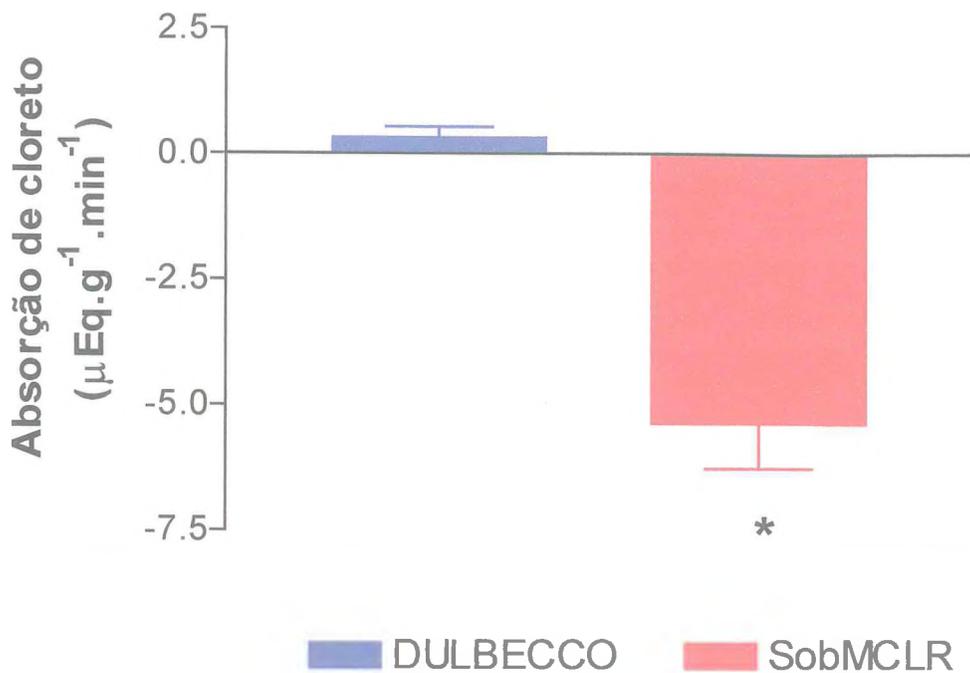


Figura 48- Efeito no transporte de cloreto do sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1μg/mL). Os dados representam a média ± E.P.M. e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni) com significância de $p < 0,05^*$. Os valores negativos são considerados como balanço secretório e valores positivos são considerados balanço de absorção. Dulbecco (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento.

4.5. Embriotoxicidade

A tabela 28 mostra os resultados obtidos com a microcistina-LR no desenvolvimento embrionário de ovos de ouriço do mar *Lytechinus variegatus*. Este método permite avaliar o potencial citotóxico, teratogênico e antineoplásico de compostos, sendo amplamente utilizado para determinação do potencial embriotóxico. Nas concentrações testadas (0,1; 0,3; 1; 3; e 10 $\mu\text{g/mL}$), a microcistina-LR não causou alterações em nenhum dos estágios observados ($p < 0,05$).

Tabela 28- Efeito da microcistina-LR (10 $\mu\text{g/mL}$) no desenvolvimento de ovos de ouriço do mar *Lytechinus variegatus*.

	Controle	Microcistina-LR
1ª divisão	91.0 \pm 0.6	86.7 \pm 3.0
2ª divisão	94.3 \pm 1.5	90.7 \pm 1.2
Blástula	88.5 \pm 1.5	91.0 \pm 1.0
Larva	73.5 \pm 1.5	76.5 \pm 2.5

A toxina foi adicionada 2 minutos após a fecundação. Foram fixadas alíquotas relativas à primeira e terceira divisões, blástula e larva. Foram contados 100 embriões em cada amostra. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de 3 experimentos.

4.6. Efeito da microcistina na secreção de insulina

A Microcistina-LR potencializou a secreção de insulina induzida por 16,7 mM de glicose. Na presença de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (~ 5 nmol) desta toxina, a secreção de insulina foi 2,25 vezes maior que o respectivo controle (16,7 mM), mas na presença de baixa concentração de glicose de 2,8 mM (próximo da concentração basal), o efeito da toxina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) não foi observado (Figura 49a). Após o tempo de incubação, as células foram lavadas duas vezes com 0,75 mL de Krebs tamponado com bicarbonato, seguindo-se uma nova incubação apenas na presença de glicose. Após este período de incubação, nas ilhotas que foram incubadas com 16,7 mM de glicose mais 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de toxina foi observado uma redução de quatro vezes na secreção de insulina quando comparado com o respectivo controle. Com 2,8 mM de glicose nenhuma diferença foi observada (Figura 49b)

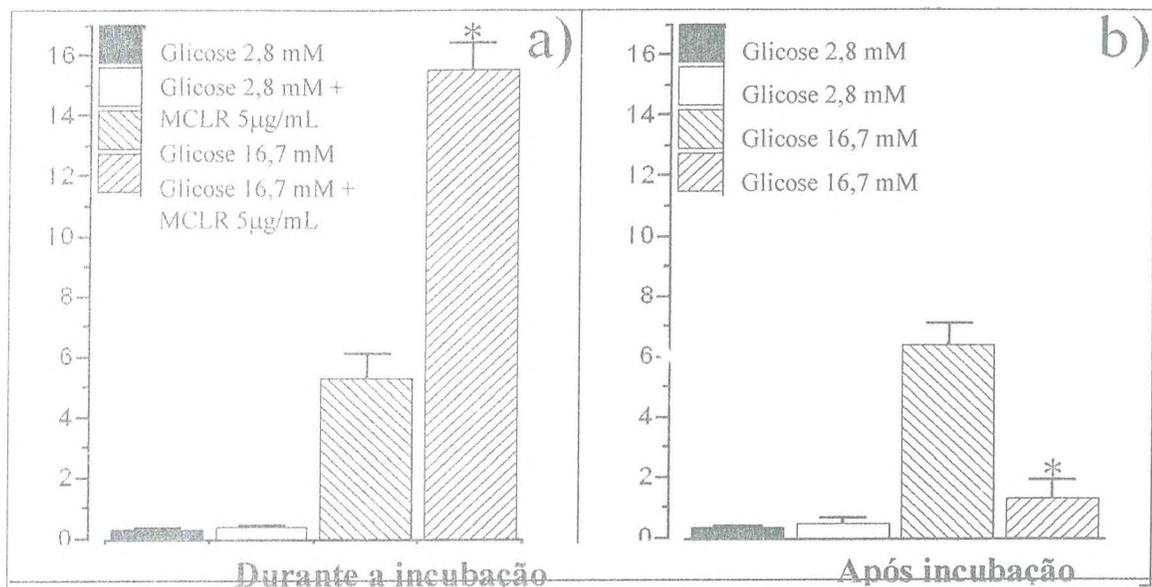


Figura 49- Secreção de insulina na presença e ausência de microcistina-LR (MCLR). A secreção foi avaliada durante (a) e após o período de incubação (b).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Em nossos experimentos anteriores com rim isolado de rato foi demonstrado a capacidade da microcistina-LR alterar a pressão de perfusão e a resistência vascular renal de forma significativa. Na tentativa de verificar se este efeito deve-se a uma ação direta da toxina sobre a vasculatura ou à liberação de mediadores capazes de desencadear esse efeito vasoconstrictor foi avaliado o efeito da microcistina-LR (1, 3, 10, 30, 100 e 300 ng/mL) em anel de aorta isolado de rato.

A microcistina-LR nas doses utilizadas (dose máxima de ~1,5 μM) não exerceu nenhum efeito sobre o leito vascular de aorta de rato, apesar de Katsuyama e Morgan (1993) terem demonstrado que nas concentrações de 1 μM e 100 nM, a microcistina-LR seja capaz de induzir, através da ação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e cálcio intracelular, contração significativa em células do anel de aorta de furão (*Mustela putorius furo*). A dose máxima utilizada foi escolhida com base em dados da literatura e por ter se mostrado capaz de alterar os parâmetros funcionais renais em nossos experimentos (NOBRE e cols., 1999).

As células endoteliais possuem propriedades de contratilidade e sistema actinmiosina com características semelhantes às do músculo esquelético e o íon cálcio tem participação no fenômeno de excitação e contração (GUYTON, 1994). A microcistina-LR tem a capacidade de

aumentar o fluxo de cálcio intracelular (RUNNEGAR e cols., 1987), além de induzir a liberação de ácido araquidônico, assim como seus mediadores (NASEEN e cols., 1988). É possível, que o efeito constritor entretanto, seja dependente de mediadores liberados pela ação da toxina.

Alguns trabalhos demonstram que a microcistina-LR pode estimular além da liberação de ácido araquidônico, citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α (NAKANO e cols., 1991; FUJIKI; SUGANUMA, 1994). Rocha e cols. (2000) demonstraram, através de análise por ELISA, que sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR são capazes de sintetizar IL-1 β e TNF- α .

Vesey e cols. (2002b) observaram que a IL-1 β é capaz de suprimir a proliferação celular, aumentar a produção de fibronectina e promover a expressão de actina em células tubulares proximais de humanos. Esta expressão de actina também é observada em células mesangiais de rato, devido à síntese protéica e à reorganização do citoesqueleto (WANG e cols., 2002).

Ruiz-Ortega e cols. (2002) demonstraram a presença de TNF- α nos glomérulos, principalmente nas células endoteliais, túbulos renais e veias. Esta citocina pode ter um papel importante na apoptose renal (KORNHAUSER e cols., 2002). Além disso, o TNF- α pode ser útil no diagnóstico precoce de carcinoma de célula renal e no acompanhamento pós operatório (YOSHIDA e cols., 2002).

Por sua vez, Gormley e cols. (2002) demonstraram que as células renais são vulneráveis à injúria mediada por citocinas pró-inflamatórias, entre elas, IL-8, TNF- α e IL-1 β . Baseado nesses dados, resolveu-se demonstrar a participação de macrófagos na atividade biológica da microcistina-LR, bem como o efeito de mediadores inflamatórios no sistema renal.

A adição do sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR causou significativo aumento na pressão de perfusão, resistência vascular renal, ritmo de filtração glomerular e fluxo urinário. Foi capaz ainda de reduzir de modo significativo o percentual de transporte tubular de sódio, o percentual de transporte proximal de sódio e o percentual de transporte proximal de potássio, enquanto o percentual de transporte tubular de potássio não foi alterado. Tais achados corroboram com trabalho anterior, no qual foi demonstrada a nefrotoxicidade da microcistina-LR (NOBRE e cols., 1999).

Os resultados observados no rim isolado, sugerem que macrófagos estimulados com microcistina-LR estão envolvidos indiretamente nos efeitos promovidos pela toxina, através da liberação de mediadores com ação renal, que atuam a nível glomerular, vascular e tubular, principalmente no segmento proximal, interferindo na reabsorção dos eletrólitos sódio e potássio.

Na tentativa de investigar quais os mediadores envolvidos na nefrotoxicidade da microcistina-LR, realizou-se um “screening” farmacológico.

Para tanto, inicialmente foi utilizado ciclohexamida, um inibidor clássico de síntese protéica (OHH; TAKEI, 1995) e de mediadores inflamatórios (JIAO e cols., 1991). Neste protocolo experimental, observou-se que a droga, antes e durante a estimulação dos macrófagos com microcistina-LR produziu um bloqueio significativo nas alterações promovidas na resistência vascular renal, fluxo urinário, ritmo de filtração glomerular e percentual de transporte tubular de sódio, evidenciando dessa forma, que a nefrotoxicidade do referido sobrenadante era dependente da síntese protéica.

Um suporte adicional para essa evidência, baseou-se no fato de que a dexametasona, um inibidor de síntese protéica e de fosfolipase A₂ (BARNES; ADCOCK, 1993), também interferiu de forma significativa nos efeitos promovidos pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR na resistência vascular renal, fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular. Nesse contexto, vale ressaltar, que a dexametasona é capaz de bloquear a transcrição do RNA mensageiro de determinadas citocinas, como TNF- α , IL-1 e IL-8, com conseqüente inibição da síntese destes fatores protéicos, por macrófagos (WILCKENS; RIJK, 1997).

A toxicidade renal observada provavelmente é desencadeada pela ação de um mediador de natureza protéica, provavelmente uma citocina, com atividade pró-inflamatória, presente no sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR.

Macrófagos são importantes células imunes, que atuam sinalizando a presença de substratos estranhos através da liberação de frações de fosfolipídeos, do tipo ácido araquidônico, através da atividade da enzima fosfolipase A_2 que servem de substrato para a síntese de prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e citocinas (ROCHA, 1998; ROCHA e cols., 2000). É bem descrito que eicosanóides medeiam injúria epitelial glomerular (LIU e cols., 2001) e que RNAm de fosfolipase A_2 , do grupo II, estão presentes no baço, pulmão, fígado e rim de ratos normais (YOSHIKAWA e cols., 2001). O metabolismo alterado do ácido araquidônico tem sido implicado na patogênese de várias injúrias renais (CUMMING e cols., 2002).

Dando continuidade ao rastreamento farmacológico, além da dexametasona foi utilizado a quinacrina, um inibidor seletivo de fosfolipase A_2 (YINGST e cols., 2000), que se mostrou tão eficaz quanto a dexametasona no bloqueio dos efeitos na resistência vascular renal, fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular. Esses resultados sugerem a participação de fosfolipase A_2 , bem como outros mediadores protéicos, ratificando a importância desta enzima, bem como de eicosanóides, nas

alterações renais induzidas por microcistina-LR, em rim isolado de rato, relatada por Nobre e cols. (2001).

A microcistina-LR é capaz de provocar a liberação de IL-1 β e TNF- α por macrófagos peritoneais (ROCHA e cols., 2000). Com a finalidade de investigar a participação de TNF- α na nefrotoxicidade promovida por sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR, foi utilizada a talidomida, um inibidor seletivo da síntese de TNF- α cujo mecanismo de ação envolve a degradação do RNA mensageiro desta citocina (MOREIRA e cols., 1993; GEORGE e cols., 2000).

A talidomida suprime a produção de TNF- α por monócitos-macrófagos *in vitro*, reduz o TNF- α sérico de pacientes com hanseníase (TRAMONTANA e cols., 1995) e é capaz de inibir o TNF- α derivado de células T de maneira direta e seletiva. Foi demonstrado que, tanto talidomida como dexametasona, inibem a produção de TNF- α ; entretanto, pouco se sabe sobre a seletividade celular (ROWLAND e cols., 1999).

A talidomida bloqueou apenas o efeito do sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR na resistência vascular renal, não antagonizando os efeitos em outros parâmetros. Esses dados sugerem que o TNF- α presente no sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR, não é o principal mediador responsável pela toxicidade

renal, apesar de estar envolvido em outras atividades biológicas da microcistina-LR.

Da mesma forma, Rocha e cols. (2000) demonstraram que o sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR é capaz de causar efeito eletrogênico em íleo de coelho e que o TNF- α não afeta a atividade secretora intestinal.

Sueoka e cols. (1997) demonstraram que nodularina e microcistina-LR induzem a liberação de TNF- α em hepatócitos *in vitro*, o qual pode estar relacionado com a hepatotoxicidade destas toxinas. Além disso, TNF- α pode estar envolvido na promoção e progressão tumoral em humanos induzida por microcistina-LR (FUJIKI; SUGANUMA, 1994, 1999).

Relatos anteriores descrevem que TNF- α pode atuar, de maneira autócrina, levando a gênese de outros mediadores da inflamação, com a conseqüente amplificação de suas ações biológicas (ROCHA e cols., 1998), provavelmente o TNF- α está atuando como um importante modulador autócrino, um possível amplificador, e não como agente desencadeador da nefrotoxicidade deste sobrenadante.

Rocha e cols. (2000) sugeriram que a IL-1 β , presente no sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR, pode ser um fator secretório intestinal importante, envolvido na resposta eletrogênica produzida em íleo de coelho. Na nefrotoxicidade do

sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR pode-se supor a participação deste mediador.

Vale salientar que além dos rins, o intestino foi identificado como local de acúmulo de quantidade significativa de microcistina-LR (ROBINSON e cols., 1991), sendo a parede intestinal, o primeiro tecido vulnerável a entrar em contato com a toxina presente na água de consumo. Ademais, a microcistina-LR tem causado epidemias de gastroenterite em humanos (TEIXEIRA e cols., 1993) e quadro diarréico em animais (DEVRIES e cols., 1993).

A microcistina-LR não é rapidamente permeável através das membranas celulares, sendo entretanto, ativamente transportada por um mecanismo de transporte de ácidos biliares presente no fígado, intestino e células renais (FALCONER e cols., 1992; RUNNEGAR e cols., 1991, CATTORI e cols., 2001).

O transporte através das células intestinais é seguido pela passagem através da veia porta no fígado, onde a maioria da toxina é absorvida diretamente no hepatócito, seu principal alvo. Portanto, a toxina parece atacar preferencialmente o epitélio do intestino delgado e hepatócitos (FALCONER 1993).

Com base nestas informações e diante dos resultados obtidos em rim isolado de rato, foi realizado o estudo do efeito direto da microcistina-LR na secreção intestinal.

Para tanto inicialmente, foi utilizado o modelo de alça intestinal de rato. O segmento ileal foi selecionado tendo em vista a presença de carreadores específicos de ácidos biliares que favorecem a absorção da microcistina-LR (BISCHOFF, 2001). A toxina do *Vibrio cholera* foi utilizada como controle secretório positivo, devido o seu efeito no bloqueio da absorção de água e eletrólitos e a estimulação da secreção dos mesmos (LIMA, 1998; SILVA e cols., 1998; SILVA, 2002). Neste protocolo experimental, foi observado que a microcistina-LR induz secreção *in vivo*, da mesma forma que a toxina da cólera.

Na etapa subsequente da tentativa de determinar o efeito secretório da microcistina foi utilizado o modelo de perfusão intestinal *in vivo*, onde o perfusato coletado durante intervalos de 20 min, em um total de 100 min, foi destinado a dosagens de sódio, potássio, cloreto e osmolalidade.

A partir deste protocolo experimental, demonstrou-se que a microcistina altera a absorção de sódio, potássio, cloreto e água de modo similar ao efeito da toxina da cólera. Neste contexto, observou-se um aumento na secreção de água e eletrólitos, caracterizando o efeito desta toxina na secreção intestinal.

Existe uma série de relatos na literatura evidenciando a participação de mediadores sintetizados por macrófagos, entre eles, interleucina 1 (HINTERLEITNER e cols., 1996), fator de necrose tumoral

(KANDILH e cols., 1992), fator de agregação plaquetária (HINTERLEITNER e cols., 1997), leucotrienos (SMITH e cols., 1990) e prostaglandinas (CIANCIO; CHANG, 1992) na indução, direta ou indireta, da secreção intestinal *in vivo* e/ou *in vitro*.

Por outro lado, Rocha e cols. (2000) demonstraram a capacidade da microcistina-LR induzir a liberação de interleucina 1 β e fator de necrose tumoral- α de macrófagos *in vitro*. A partir destas informações, resolveu-se demonstrar a participação de macrófagos na atividade biológica da microcistina-LR, bem como o efeito de mediadores inflamatórios na secreção intestinal.

No modelo de alça intestinal, foi observado que o sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR induz secreção *in vivo*, da mesma forma que a toxina da cólera e a microcistina-LR diretamente.

Na etapa subsequente, utilizando o modelo de perfusão intestinal *in vivo*, foram obtidos dosagens de sódio, potássio, cloreto e osmolalidade, para avaliação do efeito secretório do sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR.

A partir deste protocolo experimental, demonstrou-se que o sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR altera a absorção de sódio, potássio, cloreto e água de modo similar ao efeito da toxina da cólera e da microcistina-LR diretamente. Neste contexto,

observou-se um aumento na secreção de água e eletrólitos, caracterizando o efeito de mediadores liberados por macrófagos estimulados com microcistina-LR na secreção intestinal.

Estes resultados observados sugerem que macrófagos estimulados com microcistina-LR estão envolvidos indiretamente nos efeitos promovidos pela toxina, através da liberação de mediadores com ação intestinal. Estes dados estão em concordância com Rocha e cols. (2000) que demonstraram que o sobrenadante de macrófagos peritoneais *in vitro* estimulados com microcistina-LR induzem secreção eletrogênica em mucosa ileal de coelho no modelo de câmara de Üssing.

Por outro lado, na perfusão intestinal, a microcistina-LR mostrou-se capaz de inibir parcialmente o efeito secretório da toxina cólera, quando os animais foram pré-tratados 18 horas antes. Estes dados sugerem que, provavelmente, a microcistina-LR e toxina da cólera atuem em mecanismos distintos.

As funções secretórias e absorptivas do trato intestinal são espacialmente separadas, a secreção ocorre predominantemente nas células da cripta, enquanto que a absorção nos vilos (SILVA, 2002).

A absorção de sódio ocorre por meio de mecanismos situados na membrana apical das células de borda em escova, todos eles impulsionados pelo potencial eletroquímico de sódio (BACHMANN e cols., 2003). Este potencial eletroquímico é aproveitado para transportar o

ion Cl^- , além disso, este transporte vai aumentando de importância à medida que se desloca para o íleo terminal. O íon potássio tem um potencial químico altamente desfavorável a um transporte transcelular, de forma que apenas a via paracelular possibilita a absorção passiva deste íon (SILVA, 2002), enquanto a passagem da água ocorre através de um canal de baixa condutância (LOO e cols., 1999).

O sódio absorvido pelo epitélio acarreta em um aumento na absorção de sódio transcelular acompanhado de um aumento na condutância da membrana basolateral ao potássio (CLARKSON, 1967). A atividade do canal de potássio parece ser regulada pelo grau de organização da actina do citoesqueleto do enterócito (SCHULTZ; DUBINSKY, 2001). A microcistina-LR induz deformação do citoesqueleto de enterócitos de maneira semelhante ao observado em hepatócito (FALCONER e cols., 1992). Por conseguinte, o efeito secretório de potássio desencadeado pela microcistina-LR e pelo sobrenadante de macrófagos ativados com a toxina, podem envolver a depolimerização da actina, um dos microfilamentos que são afetados por esta toxina em questão (WICKSTROM e cols., 1995).

A literatura relata que a toxina da cólera ativa adenilatociclase e como consequência, a concentração intracelular de cAMP é grandemente aumentada. Este ativa a quinase A que, catalisa a transferência de um fosfato terminal do ATP para serinas ou treoninas específicas de determinadas proteínas, entre elas, os canais de Cl^- na membrana apical das

células da cripta ou os co-transportadores de $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ nas células dos vilos. A resposta final é o exacerbado aumento da secreção de Cl^- nas células da cripta e uma concomitante redução da absorção em co-transporte do $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ nas células dos vilos (SILVA, 2002).

O co-transporte basolateral $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ tem sido demonstrado como um sítio regulatório para secreção eletrogênica de Cl^- (FAROKHZAD e cols., 1999; TURNHEIM e cols., 2002; LARSEN e cols., 2002).

A microcistina-LR é uma potente inibidora das fosfatases serina e treonina, incluindo as proteínas fosfatases tipo 1 e 2A e é capaz de prevenir em peixe *Squalus acanthias*, a defosforilação do co-transportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$, componente necessário de ativação de secreção intestinal na toxicidade da diarreia. Microcistina, nodularina e caliculina A são potentes inibidores da defosforilação de co-transportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$, demonstrando que fosfatase 1 ou fosfatase 2A são provavelmente as fosfatases que estão envolvidas (BEHNKE e cols., 1999).

Portanto, é possível supor que a microcistina-LR iniba a defosforilação do co-transportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ e dessa forma promova uma secreção de eletrólitos significante. Por outro lado, os mediadores liberados pelos macrófagos estimulados por microcistina-LR também desempenham papel importante nesta secreção intestinal.

Os resultados da investigação no rim e intestino, corroboram com dados da literatura que demonstram a existência de uma proteína idêntica no rim e íleo envolvida no transporte de uma série de substratos, entre eles, a microcistina-LR. Por conseguinte, a toxina que teve seu transporte favorecido, pôde promover ações tóxicas tanto no rim como no intestino.

Estes resultados mostraram-se bastante coerentes com os dados em rim isolado de rato, visto que, tanto a microcistina-LR como o sobrenadante de macrófagos estimulados com esta toxina, induzem efeito glomerular bastante intenso, evidenciado pelo aumento de fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular, assim como efeito tubular, caracterizado pela diminuição na reabsorção de sódio e potássio.

Com relação à citotoxicidade *in vitro*, existem poucos estudos envolvendo a exposição de linhagens celulares à microcistina-LR purificada e eles mostram que esta substância não é tóxica para as células testadas (HENNING e cols., 1992a,b). Entretanto, Chong e cols. (2000) mostraram o efeito citotóxico da microcistina-LR em células de carcinoma epidermóide oral de humanos (KB) e células de hepatomas H35 de ratos Reuber (II-4-II-E).

Por outro lado, informações dos efeitos genotóxicos são muito limitadas. O potencial mutagênico de toxinas de cianobactérias foi avaliado usando teste de mutagenicidade em *Salmonella typhimurim*, teste de

esporulação multigene de *Bacillus subtilis* e teste utilizando linfócitos humanos. Os ensaios bacterianos sugeriram que as toxinas não foram mutagênicas, mas induziram elevadas taxas de aberrações cromossômicas em linfócitos (REPAVICH e cols., 1990).

Rao e cols. (1998) demonstraram efeito danoso da microcistina-LR no DNA de células de rim de hamster recém-nascido (BHK 21) e fibroblastos de embrião de camundongos (MEF). Esta citotoxicidade está fortemente correlacionada com a fragmentação do DNA. Boe e cols. (1991) têm mostrado que microcistina-LR (0,8 μM por 3 horas) induz fragmentação nuclear e apoptose em cultura de hepatócitos de ratos. Khan e cols. (1995) também relataram alterações nucleares compatíveis com apoptose em fibroblastos e células renais tratadas com microcistina-LR (10, 100, 200 μM por 6 a 18 horas). Esses dados indicam que a microcistina-LR é capaz de induzir dano no DNA *in vitro* de algumas linhagens celulares.

Por outro lado, no estudo de teratogenicidade utilizando o peixe de água doce, *Misgurnus mizolepis* Gunthe, demonstrou-se que a microcistina-LR é tóxica nos estágios de clivagem, gástrula e pós eclosão. Observou-se que a toxina foi letal para os peixes jovens em exposição subaguda, mas de forma menos sensível que os embriões e as larvas (LIANG e cols., 1988; ZHOU e cols., 1995a; ZHOU e cols., 1995b; LIU e cols., 2002).

Com base nos dados descritos na literatura, resolveu-se avaliar o efeito da microcistina-LR no desenvolvimento de ouriço do mar, a fim de determinar sua possível ação antimitótica e teratogênica.

Em nossos experimentos, a microcistina-LR não causou inibição nas clivagens do ouriço do mar *Lytechinus variegatus*, nem foi capaz de induzir anomalias no estágio larval deste animal, indicando que nas concentrações testadas, a toxina não interfere no desenvolvimento embrionário desta espécie.

Isto provavelmente, deve-se a dificuldade que a microcistina-LR tem de entrar nas células. A hipótese de que esta toxina penetra na célula por simples difusão tem sido demonstrada como inválida. O sistema transportador multiespecífico de ácidos biliares parece explicar a especificidade da toxina pelo fígado e mais recentemente seu efeito no rim e intestino (ERIKSSON e cols., 1988; 1990). Ademais, não existem dados sobre um sistema de transporte semelhante para as células de ouriço, o que explicaria a ausência de efeito.

Nossos dados estão de acordo com Oberemn e cols. (1997) que estudaram o efeito da microcistina-LR no desenvolvimento do peixe *Donio rerio* e não encontraram nenhuma alteração no desenvolvimento embrionário nem larval. A variação de condições de exposição, uso de outras espécies, variação do estágio de vida, além da ineficiência da toxina

penetrar em determinadas células, podem justificar esta discrepância de resultados.

Partindo do princípio que as proteínas fosfatases têm um importante papel na regulação dos canais de cálcio, resolveu-se avaliar o efeito da microcistina-LR nas células β pancreáticas isoladas, que possuem vários canais, principalmente os de cálcio e potássio.

A secreção de insulina é um processo rigidamente controlado, destinado a proporcionar concentrações estáveis de glicose. A secreção de insulina depende da concentração intracelular de cálcio (HELLMAN e cols., 1986), que atua como o secretagogo deste hormônio. O metabolismo da glicose resulta da inibição de um canal de potássio sensível ao ATP e despolarização da célula induzindo o aumento do fluxo de cálcio externo. Este cátion ativa fosfolipase A_2 e fosfolipase C, que provocam a formação de ácido araquidônico, inusitol polifosfatos (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 eleva ainda mais a concentração citosólica de cálcio, mobilizando-o a partir do retículo endoplasmático.

Microcistina-LR tem sido caracterizada como um efetivo inibidor de fosfatase serina/treonina tipo 1 e 2A, proteína importante para a manutenção do nível adequado de fosforilação protéica em combinação com a proteína quinase (HONKANEN e cols., 1990, CARTUS e cols., 1998). Além disso, a abertura e funcionalidade de canais de cálcio

voltagem-dependente também depende da desfosforilação como mostrado por France e Hartzell (1993) e Bouron e cols. (1995).

Nossos experimentos com células β -pancreáticas mostraram que a microcistina-LR é capaz de potencializar a secreção de insulina induzida por glicose, provavelmente pela ação na proteína fosfatase, provocando uma hiperfosforilação, e conseqüente aumento do influxo de cálcio.

As células- β tratadas com microcistina-LR foram destruídas, já que sua atividade, isto é, a capacidade de secretar insulina, após a lavagem e posterior incubação na presença de glicose, não foi restaurada. A provável apoptose após o tratamento com microcistina-LR, parece estar relacionada com o aumento do conteúdo de cálcio intracelular. Além disso, pode ter havido geração de reativos de oxigênio na mitocôndria (DING e cols., 2000; 2002). Dessa forma, a apoptose observada nas células β tratadas com microcistina-LR pode ser conseqüência da ativação de calpaína e radicais de oxigênio, produzidos indiretamente pelo aumento do cálcio intracelular.

Nossos dados mostram ainda, que em baixas doses de glicose este efeito não foi observado, porque a glicose apresentava níveis basais incapazes de estimular a secreção de insulina.

As calpaínas são proteases que regulam uma variedade de funções celulares, entre elas, a secreção de insulina. Foi observado que

inibidores de calpaína aumentam a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas de camundongo (SREENAN e cols., 2001).

A microcistina-LR induz apoptose em cultura de hepatócitos de rato através da ativação de calpaína, provavelmente pelo aumento da liberação de cálcio intracelular das mitocôndrias (DING e cols., 2002). Nakata e cols. (1999) demonstraram o papel de óxido nítrico, cálcio e ativação da protease calpaína na apoptose de células β pancreáticas.

Relatos prévios mostram que inibidores de proteína fosfatase, entre eles a microcistina, podem induzir apoptose através da expressão da forma ativa de CaMKII (proteína quinase dependente de calmodulina sub-tipo II) (FLADMARK e cols., 2002), além de afetar os canais de cálcio e a liberação de insulina devido a inibição da atividade de uma proteína fosfatase extracelular (LEIERS e cols., 2000).

A microcistina-LR não é capaz de entrar com facilidade nas células intactas, entretanto, a toxina pode atuar na proteína fosfatase extracelular, promovendo um aumento do cálcio intracelular (WOLLHEIN e cols., 1996) e dessa forma, induzindo a secreção de insulina em células de insuloma de ratos (RINm5F) (LEIERS e cols., 2000). A existência de um sítio de ação extracelular para inibidores de fosfatases tipo 1 e 2A pode explicar o efeito da microcistina-LR em células β -pancreáticas.

A figura 47 mostra o provável mecanismo de ação da microcistina-LR em células β pancreáticas. A toxina inibe a proteína

fosfatase extracelular e dessa forma, desencadeia um aumento no influxo de cálcio pelos canais voltagem-dependentes, desencadeando uma potencialização da secreção de insulina promovida pela administração de glicose. A elevada concentração de cálcio é ainda responsável pela ativação de calpaína, uma protease envolvida na apoptose observada.

Os dados deste trabalho sugerem que macrófagos estimulados com microcistina-LR são capazes de provocar efeitos renais e que fosfolipase A₂, além de outros mediadores protéicos, estão envolvidos nesta nefrotoxicidade. Demonstram ainda que, TNF- α não é o principal responsável por estes efeitos, apesar da sua importância em outras atividades biológicas da microcistina-LR. Em adição, a microcistina-LR e o sobrenadante de macrófagos estimulados são capazes de provocar secreção no modelo de alça isolado e perfusão intestinal. Por outro lado, a microcistina-LR mostrou-se incapaz de promover atividade antimitótica e teratogênica em ouriço do mar, enquanto potencializou a secreção de insulina induzida por glicose. Por fim, foi demonstrado que, tanto os efeitos renais quanto à secreção intestinal ocorrem de maneira indireta, via síntese de mediadores e que a microcistina afeta a secreção de insulina.

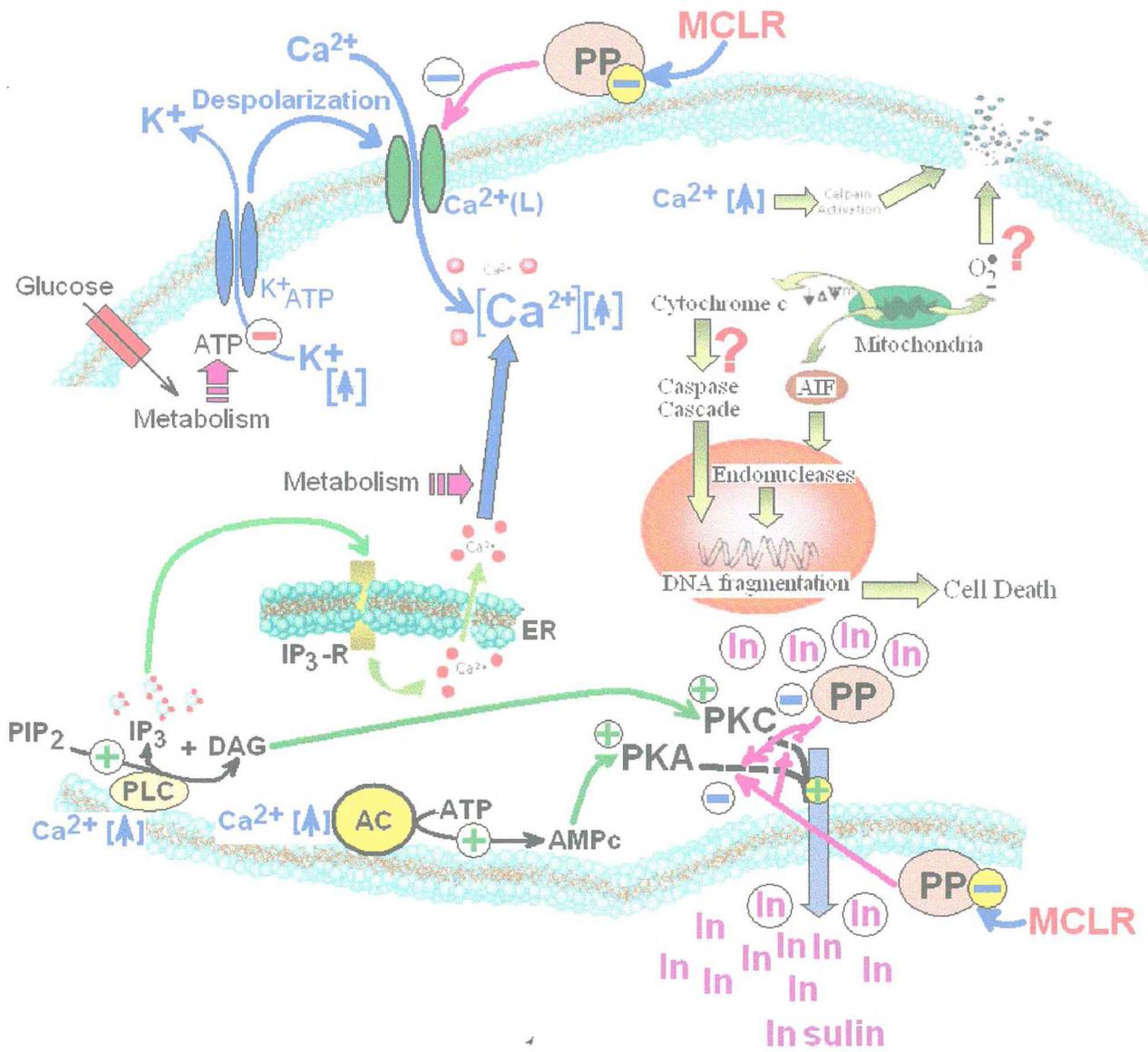


Figura 50– Esquema do mecanismo de ação da microcistina-LR (MCLR) em células β pancreáticas.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- A microcistina-LR nas doses utilizadas não é capaz de promover efeito vasoconstritor em anel de aorta isolado de rato.
- O sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR causa nefrotoxicidade.
- Fosfolipase A₂, além de outros mediadores protéicos, parecem estar envolvidos nos efeitos renais induzidos pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR.
- TNF- α participa, de maneira autócrina, na nefrotoxicidade.
- A microcistina-LR e o sobrenadante de macrófagos estimulados com esta toxina, produzem secreção em alça isolada e perfusão intestinal.
- A microcistina-LR, nas doses utilizadas, não altera o desenvolvimento embrionário nem larval do ouriço do mar *Lytechinus variegatus*.
- A microcistina-LR é capaz de potencializar a secreção de insulina induzida por glicose, além de provavelmente induzir apoptose nas células β das ilhotas de Langerhans.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, W. H.; STONER, R. D.; ADAMS, D. G.; SLATKIN, D. N.; SIEGELMAN, H. W. Pathophysiologic effects of a toxic peptide from *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon**, v. 23, p. 441-447, 1985.

ADAMS, W. H.; STONER, R. D.; ADAMS, D. G.; READ, H.; SLATKIN, D. N.; SIEGELMAN, H. W. Prophylaxis of cyanobacterial and mushroom cyclic peptide toxins. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 249, p. 552-556, 1989.

ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase a2 – a structural review. **Toxicon**, v. 34, p. 827-841, 1996.

AUKEMA, H. M.; ADOLPHE, J.; MISHRA, S.; JIANG, J.; CUOZZO, F. P.; OGBORN, M. R. Alterations in renal cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenases in polycystic kidney disease. **FASEB J.**, v. 17, n. 2, p. 298-300, 2003.

BACHMANN, O.; ROSSMANN, H.; BERGER, U. V.; COLLEDGE, W. H.; RATCLIFF, R.; EVANS, M. J.; GREGOR, M.; SEIDLER, U. cAMP-mediated regulation of murine intestinal/pancreatic Na⁺/HCO₃-

cotransporter subtype pNBC1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, v. 284, n. 1, p. G37-45, 2003.

BAHLMANN, J.; GIEBISH, G.; OCHWADT, B.; SCOEPPE, W. Micropuncture study of isolated perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.*, v. 212, p. 77-82, 1967.

BARANY, E. H. Inhibition by hippurate and probenecid of in vitro uptake of iodipamide and o-iodohippurate. A composite uptake system for iodipamide in choroids plexus, kidney cortex and anterior uvea of several species. *Acta Physiol. Scand.*, v. 86, n. 1, p. 12-27, 1972.

_____. Bile acids as inhibitors of the liver-like anion transport system in the rabbit kidney, uvea and choroids plexus. *Acta Physiol. Scand.*, v. 92, n. 2, p. 195-203, 1974.

BARNES, P. J.; ADCOCK, I. Antiinflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 14, p. 436-441, 1993.

BEASLEY, V. R.; COOK, W. O.; DAHLEN, A. M.; HOOSER, S. B.; LOVELL, R. A.; VALENTINE, W. M. Algae intoxication in livestock and waterfowl. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.*, v. 5, p. 345-361, 1989.

BEASLEY, V. R.; LOVELL, R. A.; HOLMES, K. R.; WALCOTT, H. E.; SCHAEFFER, D. J.; HOFFMANN, W. E.; CARMICHAEL, W. W. Microcystin-LR decreases hepatic and renal perfusion, and causes circulatory shock, severe hypoglycemia, and terminal hyperkalemia in intravascularly dosed swine. **J. Toxicol. Environ. Health.**, v. 61, p. 281-303, 2000.

BEATTIE, K. A.; KAYA, K.; SANO, T.; CODD, G. A. Three dehydrobutyrine (Dhb)-containing microcystins from the cyanobacterium *Nostoc* sp. **Phytochemistry.** v. 47, n. 7, p. 1289-1292, 1998

BEAULIEU, J. F. Integrins and human intestinal cell functions. **Front. Biosci.**, v. 4, p. D310-D321, 1999.

BECK, K. F.; WALPEN, S.; EBERHARDT, W.; PFEILSCHIFTER, J. Downregulation of integrin-linked kinase mRNA expression by nitric oxide in rat glomerular mesangial cells. **Life Sci.**, v. 69, n. 25-26, p. 2945-2955, 2001.

BEHNKE, R.; BIESWAL, F.; FORBUSH III, B. A protein phosphatase binding site in the N-terminus of the Na-K-Cl cotransport protein (NKCC1)

is important in determining the activation state of the transporter. **FASEB J.**, v. 13, n. 4 pt. 1, p. A397, 1999.

BEUTLER, B.; CERAMI, A. The biology of cachectin/TNF – a primary mediator of the host response. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 625-655, 1989.

BHATTACHARYA, R.; SUDENDRAN, K.; DANGI, R. S.; RAO, P. V. Toxicity evaluation of freshwater cyanobacterium microcystis aeruginosa PCC 7806: II. Nephrotoxicity in rats. **Biomed. Environ. Sci.**, v. 10, n. 1, p. 93-101, 1997.

BILLINGS, W. H. water-associated human illness in northeast Pennsylvania. In: CARMICHAEL, W. W. (Ed.) **The water environment: algal toxins and health.** New York: Plenum Press, 1981. p. 243-255.

BISCHOFF, K. The toxicology of microcystin-LR: Occurrence, toxicokinetics, toxicodynamics, diagnosis and treatment. **Vet. Human Toxicol.**, v. 43, n. 5, p. 294-297, 2001.

BOE, R.; GJERTSEN, B. T.; VINTEMYR, O. L.; HOUGE, G.; LANOTLE, M.; DOSKELAND, S. O. The protein phosphatase inhibitor

okadaic acid induces morphological changes typical of apoptosis in mammalian cells. *Exp. Cell Res.*, v. 195, p. 237, 1991.

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

BOURON, A., SOLDATOV, N. M.; REUTER, H. The β -subunit is essential for modulation by protein kinase C of a human and a non-human L-type Ca^{2+} channel. *FEBS Lett.*, v. 377, p. 159-162, 1995.

BOUVY, M.; MOLICA, R. J. R.; NASCIMENTO, S. M. Cianobactérias: risco em águas de abastecimento. *Ciência Hoje*, n. 154, p. 67-69, out. 1999.

BRITTAIN, S.; MOHAMED, Z. A.; WANG, J.; LEHMANN, V. K. B.; CARMICHAEL, W. W.; RINEHART, K. L. Isolation and characterization of microcystis from a river Nile strain of *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont. *Toxicon*, v. 38, p. 1759-1771, 2000.

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

BURCKHARDT, G.; KRAMER, W.; KURZ, G.; WILSON, F. A. Photoaffinity labelling studies of the rat renal sodium/bile salt cotransport system. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 143, p. 1018-1023, 1987.

BYTH, S. Palm Island mystery disease. **Med. J. Aust.**, v. 2, p. 40-42, 1980.

CARMICHAEL, W. W.; BIGGS, D. F.; PETERSON, M. A. Pharmacology of anatoxin-a, produced by the freshwater cyanophyte *Anabaena flos-aquae* NRC-44-1. **Toxicon**, v. 17, p. 229-236, 1979.

CARMICHAEL, W. W.; BEASLEY, V.; BUNNER, D. L.; ELOFF, J. N.; FALCONER, I.; GORHAM, P.; HARADA, K.; MIN-JUAN, Y.; KRISNAMURTHY, T.; MOORE, R. E.; RINEHART, K.; RUNNEGAR, M.; SKULBERG, O. M.; WATANABE, M. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). **Toxicon**, v. 26, p. 971-973, 1988.

CARMICHAEL, W. W.; FALCONER, I. R. Disease related to freshwater algal blooms. In: FALCONER, I. R. **Algal toxins in seafood and drinkyng water**. London: Academic Press, 1993. p. 187-209.

CARMICHAEL, W. W. The cyanotoxins. In: CALLOW, J. A. (Ed.). **Advances in btanical research**. London: Academic Press, 1997. p. 211-256.

CARTUS, T.; HEURICH, R. O.; DREWS, G.; AMON, H. P. T. Distribution of protein phosphatase type 1 and 2A in RINm5F cells. **Regul. Pept.**, v. 77, p. 77-81, 1998.

CATTORI, V.; van MONTFOORT, J. E. V.; STIGER, B.; LANDMANN, L.; MEIJER, D. K. F.; WINTERHALTER, K. H; MEIER, P. J.; HAGENBUCH, B. Localization of organic anion transporting polypeptide 4 (Oatp4) in rat liver and comparason of its substrate specificity with Oatp1, Oatp2 and Oatp3. **Pflugers Arch.**, v. 443, n. 2, p. 188-195, 2001.

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

CIANCIO, M. J.; CHANG, E. B. Epithelial secretory response to inflammation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 644, p. 210-221, 1992.

CLARKSON, T. W. The transport of salt and water across isolated rat ileum. Evidence for at least two distinct pathways. *J. Gen. Physiol.*, v. 50, n. 3, p. 695-727, 1967.

COHEN, J. J.; KOOK, Y. J.; LITTLE, J. R. Substrate-limited function and metabolism of the isolated perfused rat kidneys: effects of lactate and glucose. *J. Physiol.*, v. 226, p. 130-121, 1977.

COSTA, L. V.; MALPEZZI, E. L. A.; MATSUI, D. H.; MACHADO-SANTELLI, G. M.; FREITAS, J. C. Cytotoxic activity of a methanol extract of *Phallusia nigra* (Tunicata, Ascidiacea). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 29, p. 367-373, 1996.

CUMMINGS, B. S.; MCHOWAT, J.; SCHNELLMANN, R. G. Role of an endoplasmic reticulum Ca^{2+} -independent phospholipase A(2) in oxidant-induced renal cell death. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, v. 283, n. 3, p. F492-498, 2002.

DAHLEM, A. M.; HASSAN, A. S.; SWANSON, S. P.; CARMICHAEL, W. W.; BEASLEY, V. R. A model system for studying the bioavailability of intestinally administered microcystin-LR, a hepatotoxic peptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 64, p. 177-181, 1989.

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

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 13057-13060, 1994.

_____. Phospholipase A2 in eicosanoid generation. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 161, p. S32-S35, 2000.

DEVRIES, S.E.; GALEY, F. D.; NAMIKOSHI, M.; WOO, J. C. Clinical and pathologic findings of blue-green algae (*Microcystis aeruginosa*) in a dog. **J. Vet. Diag. Invest.**, v. 5, p. 403-408, 1993.

DILLENBERG, H. O.; DEHNEL, M. K. Toxic water bloom in Saskatchewan. **Can. Med. Assoc. J.**, v. 83, p. 1151-1154, 1960.

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

_____. Calpain activation after mitochondrial permeability transition in microcystin-induced cell death in rat hepatocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 219, n. 2, p. 321-331, 2002.

DRAGON, Y. P.; XU, X.; GOLDSWORTHY, T. L.; CAMPBELL, H.; MARONPOT, R. R.; PITOT, H. C. Characterization of the promotion of altered hepatic foci by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in female rat. **Carcinogenesis**, v. 13, p. 1389-1395, 1992.

EBERHART, C. E.; DUBOIS, R. N. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. **Gastroenterology**, v. 109, p. 285-301, 1995.

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

ERIKSSON, J. E.; KUJARI, H. P.; SKULBERG, O. M. A comparason of toxins isolated from cyanobacteria *Oscillatoria agarghii* and *Microcystis aeruginosa*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 89, p. 207-210, 1988.

ERIKSSON, J. E.; GRONBERG, L.; NYGARD, S.; SLOTTE, J. P. C. Hepatocellular uptake of ³H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1025, p. 60-66, 1990.

FALCONER, I. R.; BERESFORD, A. M.; RUNNEGAR, M. T. C. Evidence of liver damage by toxin from a blood of a blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. **Med. J. Aust.**, v. 1, p. 511-514, 1983.

FALCONER , I. R.; SMITH, J. V.; JACKSON, A. D.; JONES, A.; RUNNEGAR, M. Oral toxicity of a bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* administered to mice over periods up to one year. **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 24, p. 291-305, 1988.

FALCONER, I. R.; BUCKLEY, T.H. Tumour promotion by *Microcystis* sp., a blue-green occurring in water supplies. **Med. J. Austr.**, v. 150, p. 351, 1989.

FALCONER, I. R.; DORNBUSCH, M.; MORAN, G.; YEUNG, S. K. Effect of the cyanobacterial (blue-green algal) toxins from *Microcystis aeruginosa* on isolated enterocytes from the chicken small intestine. *Toxicon*, v. 30, p. 790-793, 1992.

FALCONER, I. R.; YEUNG, D. S. K. Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by *Microcystis* toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins. *Chem. Biol. Interact.*, v. 81, p. 181-196, 1992.

FALCONER, I. R. Mechanism of toxicity of cyclic peptide toxins from blue-green algae. In: FALCONER, I. R. **Algal toxins in seafood and drinking water**. London: Academic Press, 1993. p. 177-186.

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 for human injury and risk assessment. *Environ. Toxic. Water*, v. 9, n. 2, p. 131-139, 1994.

FALCONER, I. R. Potential impact on human health of toxic cyanobacteria. *Phycologia*, v. 35, suppl., p. 6-11, 1996.

FAROKHZAD, O. C.; SAGAR, G. D.; MUN, E. C.; SICKLICK, J. K.; LOTZ, M.; SMITH, J. A.; SONG, J. C.; O'BRIEN, T. C.; SHARMA, C. P.; KINANE, T. B.; HODIN, R. A.; MATTHEWS, J. B. Protein kinase C activation downregulates the expression and function of the basolateral Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter. *J. Cell Physiol.*, v. 181, n. 3, p. 489-498, 1999.

FEITOSA, R. G. Atividade imuno-inflamatória de ovalbumina: papel de células e mediadores do sistema imune intestinal na migração de eosinófilos. Fortaleza, 2003. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2003.

FERREIRA, S. H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nature*, v. 240, p. 20-203, 1972.

FISCHER, W. J.; DIETRICH, D. R. Pathological and biochemical characterization of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 164, n. 1, p. 73-81, 2000.

FLADMARK, K. E.; BRUSTUGUN, O. T.; MELLGREN, G.; KRAKSTAD, C.; BOE, R.; VINTERMYR, O. K.; SCHULMAN, H.; DOSKELAND, S. O. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is required for microcystin-induced apoptosis. *Am. Soc. Biochem. Mol. Biol.*, v. 277, n. 4, p. 2804-2811, 2002.

FONTELES, M. C. *Efeitos do ácido 2-tetradecilglicídio no rim isolado: papel dos lipídios endógenos no transporte de sódio e função renal.* Fortaleza, 1980. Tese (Titular)– Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 1980.

FONTELES, M. C.; LEIBACH, F. H. Glucose formation from glutathione in the isolated perfused rat kidney. *Arch. Int. Physiol. Biochem. Biophys.*, v. 90, p. 159-161, 1982.

FONTELES, M. C.; COHEN, J. J.; BLACY, A. J.; WERTHEIN, S. J. Support of renal kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. *Am. J. Physiol.*, v. 244, p. 235-246, 1983.

FONTELES, M. C.; GREENBERG, R. N.; MONTEIRO, H. S. A.; CURRIE, M.G.; FORTE, L. R. Natriuretic and kaliuretic activities of

guanylin and uroguanylin in the perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 275, n. 44, p. 191-197, 1998.

FRANCE, A. M.; HARTZELL, H. C. Opposite effect of phosphatase inhibitors on L-type calcium and delayed rectifier currents in frog cardiac myocytes. **J. Physiol.**, v. 472, p. 305-326, 1993.

FRANCIS, G. Poisonous Australian lake. **Nature**. v. 18, p. 11-12, 1978.

FRIMMER, M. Organotropism by carrier-mediated transport. **Trend. Pharmacol. Sci.**, v. 3, n. 10, p. 395-397, 1982.

FRIMMER, M.; ZIEGLER, K. The transport of bile acids in liver cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 947, p. 75-99, 1988.

FUJIKI, H. Is the inhibition of protein phosphatase 1 and 2^A activities a general mechanism of tumor promotion in human cancer development. **Mol. Carcinog.**, v. 5, p. 91-94, 1992.

FUJIKI, H.; SUGANUMA, M. Tumor necrosis factor-alpha, a new tumor-promoter, engendered by biochemical studies of okadaic acid. **J. Biochem.**, v. 115, p. 1-5, 1994.

_____. Unique features of the okadaic acid activity class of tumor promoters. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 125, n. 3-4, p. 150-155, 1999.

FUSETANI, N. Marine metabolites which inhibit development of echinoderm embryos. In: SCHEUER P. (Ed.). **Bioorganic marine chemistry**. Berlin: Spinger-Verlag, 1987.

GALEY, F.,D.; BEASLEY, V. R; CARMICHAEL, W. W.; KLEPPE, G.; HOOSER, S. B.; HASCHEK, W. M. Blue-green algae (microcystis aeruginosa) hepatotoxicosis in dairy cows. **Am. J. Vet. Res.**, v. 48, p. 1415-1420, 1987

GEORGE, A.; MARZINIAK, M.; SCHAFERS, M.; TOYKA, K. V.; SOMMER, C. Thalidomide treatment in chronic constrictive neuropathy decrease endoneurial tumor necrosis factor-alpha, increases interleukin-10 and has long-term effects on spinal cord dorsal horn met-enkephalin. **Pain**, v. 88, n. 3, p. 267-275, 2000.

GILROY, D. J.; KAUFFMAN, K. W.; HALL, R. A.; HUANG, X.; CHU, F. S. Assessing potential health risks from microcystin toxins in blue-green

algae dietary supplements. **Environ. Health Perspect.**, v. 108, n. 5, p. 435-439, 2000.

GONZALEZ, M.,C; SUTHERLAND, E.; SIMON, F. R. Regulation of hepatic transport of bile-salts-effect of protein synthesis inhibition on excretion of bile-salts and their binding to live surface-membrane fractions. **J. Clin. Invest.**, v. 63, n. 4, p. 684-694, 1979.

GORMLEY, S. M.; MCBRIDE, W. T.; ARMSTRONG, M. A.; MCCLEAN, E.; MACGOWAN, S. W.; CAMPALANI, G.; MCMURRAY, T. J. Plasma and urinary cytokine homeostasis and renal function during cardiac surgery without cardiopulmonary bypass. **Cytokine**, v. 17, n. 2, p. 61-65, 2002.

GUPTA, A. K.; PAL, L. S. Seasonal relapse of healed duodenal ulcer. **J. Assoc. Physicians India**, v. 46, n. 5, p. 489, 1998.

GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 1994. p. 78.

HANSON, R. W.; BALLARD, F. S. Citrate, pyruvate and lactate contaminants of commercial serum albumin. **J. Lip. Res.**, v. 9, p. 667-668, 1968.

HARADA, K-I.; OGAWA, K.; KIMURA, Y.; MURATA, H.; SUZUKI, M.; THORN, P. M.; EVANS, W. R.; CARMICHAELA, W. W. Microcystins from *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 4, p. 540-545, 1991.

HARADA, K-I. Chemistry and detection of microcystins. In: **Toxic microcystins**. Boca Raton, NY: CRC Press, 1995. p. 103-143.

HARADA, K-I.; TSUKI, K.; ATANABE, M. F.; KONDO, F. Stability of microcystins from cyanobacteria – III. Effects of pH and temperature. **Phycologia**, v. 35, n. 6 suppl., p. 83-88, 1996.

HARDIE, D. G. **Protein phosphorylation (a practical Approach)**. Oxford: IRL Press, 1995. p. 197-229.

HARDISON, W. G. M.; BELLENTANI, S.; HEASLY, V.; SHELLHAMER, D. **Am. J. Physiol.**, v. 246, p. G477-G483, 1984.

HAYMAN, J. Beyond the Barcoo-probable human tropical cyanobacterial poisoning in outback Australia. **Med. J. Aust.**, v. 157, p. 794-796, 1992.

HECHT, G.; KOUTSOURIS, A. Enteropathogenic *E. coli* attenuates secretagogue-induced net intestinal ion transport but not Cl⁻ secretion. **Am. J. Physiol.**, v. 276, n. 3 pt. 1, p. G781-G788, 1999.

HELLMAN, B. Calcium transport in the pancreatic β -cells: implications for glucose regulation of insulin release. **Diabetes Metab. Rev.**, v. 2, p. 215-241, 1986.

HENNING, K.; CREMER, J.; MEYER, H. Cytotoxicity of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Zentralbe Veterinarmed B.**, v. 39, n. 4, p. 307-310.

HERMANSKY, S. J.; STOHS, S. J.; ELDEEN, Z. M.; ROCHE, V. F.; MEREISH, K. A. Evaluation of potential chemoprotectants against microcystin-LR hepatotoxicity in mice. **J. Appl. Toxicol.**, v. 11, p. 61-73, 1991.

HEWITT, W. R.; GOLDSTEIN, R. S.; HOOK, J. B. Toxic response of the kidney. In: AMDUR, M. O.; J. DOULL, J.; KLAASSEN, C. D. (Ed.).

Casarett and Doull's toxicology – the basic science of poisons. New York: Pergamon Press, 1991. chapt. 11.

HIMBERG, K.; KEIJOLA, A. M.; HIISVIRTA, L.; PYYSAALO, H.; SIVONEN, K. The effect of water treatment process on the removal of hepatotoxins from *Microcystis* and *Oscillatoria* cyanobacteria: a laboratory study. *Water Res.*, v. 23, p. 979-984, 1989.

HINTERLEITNER, T. A.; SAADA, J. I.; BERSCHNEIDER, H. M.; POWELL, D. W.; VALENTICH, J. D. IL-1 stimulates intestinal myofibroblast COX gene expression and augments activation of Cl⁻ secretion in T84 cells. *Am. J. Physiol.*, v. 271, p. C1262-C1268, 1996.

HINTERLEITNER, T. A.; VALENTICH, J. D.; CHA, J. H.; WILL, P.; WELTON, A.; POWELL, D. W. Platelet-activating factor contributes to immune cell and oxidant-mediated intestinal secretion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 281, p. 1264-1271, 1997.

HITZFELD, B. C.; LAMPERT, C. S.; SPEATH, N.; MOUNTFORT, D.; KASPAR, H.; DIETRICH, D. R. Toxin production in cyanobacterial mats from ponds on the McMurdo ice shelf, Antarctica. *Toxicon*, v. 38, n. 12, p. 1731-1748, 2000.

HONKANEM, 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 2^A protein phosphatases. *J. Biol. Chem.*, v. 265, p. 19401-19404, 1990.

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

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

HONKANEN, R. E.; ZWILLE, J.; MOORE, R. E.; DAILY, S. L.; KHATRA, B. S.; DUKELOW, M.; BOYNTON, A. L. *J. Biol. Chem.*, v. 265, p. 19401-19404, 1990.

HUMPAGE, A. R.; ROSITANO, J.; BRETAG, A. H.; BROWN, R.; BAKER P. D.; NICHOLSON, B. C.; STEFFENSEN, D. A. Paralytic

shellfish poisons from Australian cyanobacterial blooms. **Aust. J. Mar. Fresh. Res.**, v. 45, n. 5, p. 761-771, 1994.

HUMPAGE, A. R.; HARDY, S. J.; MOORE, E. J.; FROSCIO, S. M.; FALCONER, I. R. Microcystins (cyanobacterial toxins) in drinking water enhance the growth of aberrant crypt foci in the mouse colon. **J. Toxicol. Environ. Health A**, v. 61, n. 3, p. 155-165, 2000.

INGEBRITSEN, T. S.; COHEN, P. The protein phosphatases involved in cellular regulation. I. Classification and substrate specificities. **Eur. J. Biochem.**, v. 132, p. 255-261, 1983.

JACOBS, R. S.; WILSON, L. Fertilized sea urchin egg as a model for detecting cell division inhibitors. In: ASZALOR A. (Ed.) **Modern analysis of antibiotics**. New York: Marcel Dekker, 1986.

JIAO, J.; ECHEVARRIA, C.; VIDAL, J.; CHOLLET, R. Protein turnover as a component in the light/dark regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase protein-serine kinase activity in C4 plants. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, n. 7, p. 2712-2715, 1991.

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

KAEBERNICK, M.; NEILAN, B. A.; BORNER, T.; DITTMANN, E. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster kaebernick. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 8, p. 3367-3392, 2000.

KANDIL, H.; BERSCHNEIDER, H.; ARGENZIO, A. TNF- α alters intestinal ion transport through a paracrine mechanism involving prostaglandins. **Gastroenterology**, v. 102, p. A217, 1992.

KATSUYAMA, H.; MORGAN, K. G. Mechanisms of Ca(2+)-independent contraction in single permeabilized ferret aorta cells. **Circ. Res.**, v. 72, n. 3, p. 651-657, 1993.

KEDINGER, M.; DULUC, I.; FRITSCH, C.; LORENTZ, O.; PLATEROTI, M.; FREUND, J. N. Intestinal epithelial-mesenchymal cell interactions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 17, p. 1-17, 1998.

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

KHAN, S. A.; WICKSTROM, M. L.; HASCHEK, W. M.; SCHAEFFER, D. J.; GHOSH, S.; BEASLEY, V. R. Microcystin-LR and kinetics of cytoskeletal reorganization in cultured hepatocytes, kidney cells, and fibroblasts. *Nat. Toxins.*, v. 4, p. 206-214, 1996.

KORNHAUSER, C.; DUBEY, L. A.; GARAY, M. E.; PEREZ-LUQUE, E. L.; MALACARA, J. M.; VARGAS-ORIGEL, A. Serum and urinary insulin-like growth factor-1 and tumor necrosis factor in neonates with and without acute renal failure. *Pediatr. Nephrol.*, v. 17, n. 5, p. 332-336, 2002.

KOTAK, B. G.; SEMALULU, S.; FRITZ, D. L.; PREPAS, E. E.; HRUDEY, S. E.; COPPOCK, R. W. Hepatic and renal pathology of

intraperitoneally administered microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicol.**, v. 34, n. 5, p. 517-525, 1996.

KULLAK-UBLICK, G. A.; STIEGER, B.; HAGENBUCH, B.; MEIER, P. J.; Hepatic transport of bile salts. **Semin. Liver Dis.**, v. 20, p. 273-292, 2000.

KULLAK-UBLICK, G. A.; ISMAIR, M. G.; STIEGER, B.; LANDMANN, L.; HUBER, R.; PIZZAGALLI, F.; FATTINGER, K.; MEIER, P. J.; HAGENBUCH, B. Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. **Gastroenterology**, v. 120, p. 525-533, 2001.

LAIDLEY, C. W.; COHEN, E.; CASIDA, J. E. Protein phosphatase in neuroblastoma cells: [3H]cantharidin binding site in relation to cytotoxicity. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 280, p. 1152-1158, 1997.

LAHTI, K.; RAPALA, J.; FÄRDING, M.; NIEMELÄ, M.; SIVONEN, K. Persistence of cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR, in particulate material and dissolved in lake water. **Water Res.**, v. 31, n. 5, p. 1005-1012, 1997.

LAMBERT, T. W.; HOLMES, C. F. B.; HRUDEY, S. E. Microcystin class of toxins: health effects and safety of drinking water supplies. **Environ. Rev.**, v. 2, p. 167-186, 1994.

LARSEN, E. H.; SORENSEN, J. B.; SORENSEN, J. N. Analysis of the sodium recirculation theory of solute-coupled water transport in small intestine. **J. Physiol.**, v. 542, p. 33-50, 2002.

LASKIN, D. L.; PENDINO, K. J. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 35, p. 655-677, 1995.

LAWTON, L. A.; COOD, G. A. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins and their significance in U.K. and European waters. **J. Inst. Water Environ. Manage.**, v. 5, p. 460-465, 1991.

LAWTON, L. A.; CAMPBELL, D. L.; BEATTIE, K. A.; CODD, G. A. Use of a rapid bioluminescence assay for detecting cyanobacterial microcystin toxicity. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 11, n. 4, p. 205-207, 1990.

LEE, J. W.; JULIANO, R. L. $\alpha 5\beta 1$ integrin protects intestinal epithelial cells from apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B-dependent pathway. **Mol. Biol. Cell**, v. 11, p. 1973-1987, 2000.

LEIERS, T.; BIHLMAYER, A.; AMMON, H. P.; WAHL, M. A. $[Ca^{2+}]_{(i)}$ - and insulin-stimulating effect of the non-membrane permeable phosphatase-inhibitor microcystin-LR intact insulin-secreting cells (RINm5F). **Br. J. Pharmacol.**, v. 130, n. 6, p. 1406-1410, 2000.

LEVITAN, I. B. Modulation of ion channels by protein phosphorylation and dephosphorylation. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 56, p. 193-212, 1994.

LI, M.; DAMUNI, Z. Okadaic acid and microcystin-LR directly inhibit the methylation of protein phosphatase 2A by its specific methyltransferase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 202, n. 2, p. 1023-1030, 1994.

LIANG, Z. X.; LIANG, J. Y.; CHEN, C.; LI, Z. J.; LIN, J. H.; ZHANG, J. J. The embryonic development and fingerling culture of loach, *Misgurnis mizolepis* Gunthe. **Acta Hydrobiol. Sinica.**, v. 12, n. 1, p. 27-42, 1988.

LIMA, A. A. M.; LYERLY, D. M.; WILKINS, T. D.; INNES, D. J.; GUERRANT, R. L. Effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in rabbit

small and large intestine in vivo and on cultured cells in vitro. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 3, p. 582-588, 1988.

LIMA, A. A. M. **Glutamina e alanil-glutamil-glutamina: síntese química, efeito no transporte de água, eletrólitos e permeabilidade intestinal**, 1998. Tese (Titular) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 1998.

LIMA, A. A. M.; CARVALHO, G. H. P.; FIGUEIREDO, A. A.; GIFONI, A. R.; SOARES, A. M.; SILVA, E. A. T.; GUERRANT, R. L. Effects of an alanyl-glutamine-based oral rehydration and nutrition therapy solution on electrolyte and water absorption in a rat model of secretory diarrhea induced by cholera toxin. **Nutrition**, v. 18, p. 458-462, 2002.

LIU, J.; TAKANO, T.; PAPILLON, J.; KHADIR, A.; CYBULSKY, A. V. Cytosolic phospholipase A2-alpha associates with plasma membrane, endoplasmic reticulum and nuclear membrane in glomerular epithelial cells. **Biochem. J.**, v. 353, p. 79-90, 2001.

LIU, Y.; SONG, L.; LI, X.; LIU, T. The toxic effects of microcystin-LR on embryo-larval and juvenile development of loach, *Misgurnus mizolepis* Gunther. **Toxicol.**, v. 40, p. 395-399, 2002.

LOG, D. D.; HIRAYAMA, B. A.; MEINILD, A. K.; CHANDY, G.; ZEUTHEN, T.; WRIGHT, I. Passive water and ion transport by cotransporters. **J. Physiol.**, v. 518, p. 195-202, 1999.

MAIN, D. C.; BERRY, P. H.; PEET, R. L.; ROBERTSON, J. P. Sheep mortalities associated with the blue green alga *Nodularia spumigena*. **Aust. Vet. J.**, v. 53, n. 12, p. 578-581, 1977

MALPEZZI, E. L. A.; DAVINO, S. C.; COSTA, L. V.; FREITAS, J. C.; GIESBRECHT, A. M.; ROQUE, N. F. Antimitotic action of extracts of *Petiveria alliacea* on sea urchin egg development. **Braz. J. Méd. Biol. Res.**, v. 27, p. 749-754, 1994.

MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; ARANTES, E. C.; GIGLIO, J. R.; DA SILVA, C. A.; CARNEIRO, E. M.; GONÇALVES, A. A.; OLIVEIRA, B. Amino acid sequence of TsTX-V, an α -toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom, and its effect on K⁺ permeability of β -cells from isolated rat islets of Langerhans. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1243, n. 3, p. 309-314, 1995.

MARCONDES, M. Snakebite induce acute renal failure: an experimental model. *Am J. Trop. Med. Hyg.*, v. 48, p. 82-88, 1993.

MARSHALL, B. E. Toxic cyanobacteria in Lake Chivero: a possible health hazard? *Trans. Zimbabwe Sci. Assoc.*, v. 65, p. 16-19, 1991.

MARSHALL, J. S.; LEAL-BERUMEN, I.; NIELSEN, L.; GLIBETIC, M.; JORDANA, M. Interlukin (IL)-10 inhibits long-term interleukin-6 production but not preformed mediator release from rat peritoneal mast cells. *J. Clin. Invest.*, v. 97, p. 1122-1128, 1996.

MARTINEZ-MALDONADO, M.; STAWROULAKI-TSAPARA, A.; TSAPARA, N.; SUKI, W. N.; EKNOYAN, G. Renal effects of lithium administration in rats: alteration in water and electrolyte metabolism and the response to vasopressin and cyclic-adenosine monophosphate during prolonged administration. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 80, n. 3, p. 445-461, 1978.

MATSUSHIMA, H.; ROUSSEL, M. F.; MATSUSHIMA, K.; HISHINUMA, A.; SHERR, C. J. Cloning and expression of murine interleukin-1 receptor antagonist in macrophages stimulated by blony-stimulating factor 1. *Blood*, v. 78, n. 3, p. 616-623, 1991.

MCKAY, D. M.; PERDUE, M. H. Intestinal epithelial function: the case for immunophysiological regulation. Cells and mediators. **Dig. Dis. Sci.**, v. 38, p. 1377-1387, 1993.

MEIER, P. J.; ECKHARDT, U.; SCHOEDER, A.; HAGENBUCH, B.; STIEGER, B. Substrate apecificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. **Hepatology**, v. 26, p. 1667-1677, 1997.

MEREISH, K. A.; SOLW, R. Effect of antihepatotoxic agents against microcystin-LR toxicity in cultured rat hepatocytes. **Pharmacol. Res.**, v. 7, p. 256-259, 1990.

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

MERILUOTO, J. A. O.; NYGARD, S. E.; DAHLEM, A. M.; ERIKSSON, J. E. Synthesis, organotropism and hepatocellular uptake of two tritium-

labelled epimers of dihydromicrocystin-LR, a cyanobacterial peptide toxin analog. *Toxicon*, v. 28, p. 1439-1446, 1990.

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

MOREIRA, A. L.; SAMPAIO, E. P.; ZMUIDZINAS, A.; FRINDT, P.; SMITH, K. A.; KAPLAN, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor α by enhancing mRNA degradation. *J. Exp. Med.*, v. 177, p. 1675-1680, 1993.

MONTEIRO, H. S. A. Efeitos nefrotóxicos do veneno de *Bothrops jararaca* no rim perfundido de rato. Estudo de antagonistas do PAF e da indometacina. Campinas, 1990. Tese (Doutorado)- Centro de Ciências da Saúde, Universidade de Campinas, 1990.

MONTEIRO, H. S. A.; FONTELES, M. C. The effect of *Bothrops jararaca* venom rat kidney after short-term exposure: preliminary results. *Pharmacol. Toxicol.*, v. 85, p. 198-200, 1999.

- MUMBY, M. C.; WALTER, G. Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. **Physiol. Rev.**, v. 73, p. 673-699, 1993.
- NAKANO, Y.; SHIRAI, M.; MORI, N.; NAKANO, M. Neutralization of microcystin-LR shock in mice by tumor necrosis factor alpha anti-serum. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, p. 327-330, 1991.
- NAKATA, M.; UTO, N.; MARUYAMA, I.; YADA, T. Nitric oxide induces apoptosis via Ca²⁺-dependent processes in the pancreatic beta-cell line MIN6. **Cell Struct. Funct.**, v. 24, n. 6, p. 451-455, 1999.
- NASEEM, S. M.; HINES, H. B.; CREASIA, D. A.; MEREISH, K. A. Comparative effect of toxins on arachidonic acid release and metabolism in cultured rat hepatocytes and alveolar macrophages. **FASEB J.**, v. 2, n. 5, p. A1353, 1988.
- NASEEM, S. M.; HINES, H. B.; CREASIA, D. A. Inhibition of microcystin-induced release cyclooxygenase products from rat hepatocytes by anti-inflammatory steroids. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 195, p. 345-349, 1990.

NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Invest.**, v. 79, p. 319-326, 1986.

NISHITSUTSUJI-UWO, J. M.; ROSS, B. D.; KREBS, H. A. Metabolic activities of isolated perfused rat kidney. **Biochem. J.**, v. 103, n. 3, p. 852-862, 1967.

NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R.; NISHIWAKI, S.; OHTA, T.; YOSHIZAWA, S.; SUGANUMA, M.; HARADA, K-I.; WATANABE, M. F.; FUJIKI, H. Structure-function relationships of microcystins, liver tumor promoters, in interaction with protein phosphatase. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 82, p. 993-996, 1991.

NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R.; OHTA, T.; NISHIWAKI, S.; SUGANUMA, M.; KOHYAMA, K.; ISHIKAWA, T.; CARMICHAEL, W. W.; FUJIKI, H. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 118, p. 420-424, 1992.

NOBRE, A. C. L.; JORGE, M. C. M.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Effects of microcystin-LR in isolated perfused rat kidney. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, p. 985-988, 1999.

NOBRE, A. C. L.; COÊLHO, G. R.; COUTINHO, M. C. M.; SILVA, M. M. M.; ANGELIM, E. V.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. The role of phospholipase A2 and cyclooxygenase in renal toxicity induced by microcystin-LR. *Toxicol.*, v. 39, p. 727-724, 2001.

OBBEREMM, A.; FASTNER, J.; STEINBERG, C. E. W. Effects of microcystin-LR and cyanobacterial crude extracts on embryo-larval development of zebrafish (*Danio rerio*). *Water Res.*, v. 31, n. 11, p. 2918-2921, 1997.

OGLE, C. K.; WU, J. K.; MAO, X.; SZCZUR, K.; ALEXANDER, J. W.; OGLE, J. D. Heterogeneity of kupffer cells and splenic, alveolar, and peritoneal macrophages for the production of TNF, IL-1, and IL-6. *Inflammation*, v. 18, p. 511-523, 1994.

OHH, M.; TAKEI, F. Regulation of ICAM-1 mRNA stability by cycloheximide: role of serine/threonine phosphorylation and protein synthesis. *J. Cell Biochem.*, v. 59, n. 2, p. 202-213, 1995.

OHMANN, H. B.; CAMPOS, M.; MCDUGALL, L.; LAWMAN, M. J.; BABIUK, L. A. Expression of tumor necrosis factor-alpha receptors on bovine macrophages, lymphocytes and polymorphonuclear leukocytes, internalization of receptor-bound ligand, and some functional effects. *Lymphokine Res.*, v. 9, n. 1, p. 43-58, 1990.

OKHUMA S., KURIYAMA K. Uptake of cholic acid by freshly isolated rat hepatocytes: presence of a common carrier for bile acid transports. *Steroids.*, v. 39, n. 1, p. 7-19, 1982.

PARRY, R. G.; GILLESPIE, K. M.; MATHIESON, P. W. Effects of type 2 cytokines on glomerular epithelial cells. *Exp. Nephrol.*, v. 9, n. 4, p. 275-283, 2001.

PERDUE, M. H.; MCKAY, M. M. Integrative immunophysiology in the intestinal mucosa. *Am. J. Physiol.*, v. 267, p. G151-G165, 1994.

PETZINGER, E.; JOPPEN, C.; FRIMMER, M. Common properties of hepatocellular uptake of cholate, iodipamide and antanamide as distinct from the uptake of bromsulfophthalein. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Exp. Pathol.*, v. 322, p. 174-178, 1983.

PETZINGER, E.; ZIGLER, K.; FRIMMER, M. In: GEROK, W.; PAUMGARTNER, G.; STIEHL A. (Ed.). **Bile acid and the liver**. Lancaster: MTP Press, 1987. p. 111-124.

PITTS, R. F.. Metabolism of aminoacids by the perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 220, n. 4, p. 862-867, 1971.

POLJAKOVIC, M.; KARPMEN, D.; SVANBORG, C.; PERSSON, K. Human renal epithelial cells express iNOS in response to cytokines but not bacteria. **Kidney**, v. 61, n. 2, p. 444-455, 2002.

RABERGH, C. M. I.; (RADBERG) BYLUND, G.; ERIKSSON, J. E. Histological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio L.*). **Aquat. Toxicol.**, v. 20, n. 3, p. 131-146, 1991.

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

REPAVICH, W. M.; STANDRIDGE, W. C.; WEDEPHOL, W. E.; MEISNER, L. F. Cyanobacteria (blue-green algae) in Wisconsin waters: acute and chronic toxicity. **Water Res.**, v. 24, p. 225, 1990.

ROBINSON, N. A.; PACE, J. G.; MATSON, C. F.; MIURA, G. A.; LAWRENCE, W. B. Tissue distribution, excretion and hepatic biotransformation of microcystin-LR in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 256, p. 176-182, 1991.

ROCHA, M. F. G. Efeito secretório intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A do *Clostridium difficile*: papel da interleucina-1 β . Fortaleza, 1998. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 1998.

ROCHA, M. F. G.; SOARES, A. M.; FLORES, C. A.; STEINER, T. S.; LYERLY, D. M.; GUERRANT, R. L.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. M. Intestinal secretory factor release by macrophages stimulated with *Clostridium difficile* toxin A: role of interleukin 1 β . **Infect. Immunol.**, v. 66, p. 4910-4916, 1998.

ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C.; SOARES, A. M.; JIMENEZ, G. C.; GUERRANT, R. L.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. M. Supernatants from

macrophages stimulated with microcystin-LR induce from eletrogenic intestinal response in rabbit ileum. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 87, p. 46-51, 2000.

ROSS, B. D.; EPSTEIN, F. H.; LEAF, A. Sodium reabsrtion in the perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 225, n. 5, p. 1165-1171, 1973.

ROWLAND, T. L.; MCHUGH, S. M.; DEIGHTON, J.; EWAN, P. W.; DEARMAN, R. J.; KIMBER, I. Selective down-regulation of T cell- and non-T cell-derived tumour necrosis factor alpha by thalidomide: comparisons with dexamethasone. **Immunol. Letter**, v. 68, n. 2-3, p. 325-332, 1999.

RUIZ-ORTEGA, M.; RUPEREZ, M.; LORENZO, O.; ESTEBAN, V.; BLANCO, J.; MEZZANO, S.; EGIDO, J. AngiotensinIII regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. **Kidney Int. Suppl.**, v. 82, p. 12-22, 2002.

RUNNEGAR, M.; BERNDT, N.; KAPLOWITZ, N. Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to know hepatic transporters. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 134, p. 264-272, 1995.

RUNNEGAR, M. T.; KONG, M. T.; BERNDT, N. Protein phosphataseinhibition and in vivo hepatotoxicity of microcystins. **Am. J. Physiol.**, v. 265, n. 2 pt. 1, p. G224-G230, 1993.

RUNNEGAR, M. T. C.; FALCONER, I. R.; SILVER, J. Deformation of isolated rat hepatocytes by a peptide hepatotoxin from blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Arch. Pharmacol.**, v. 317, p. 268-272, 1981.

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

RUNNEGAR, M. T. C.; GERDES, R. G.; FALCONER, I. R. The uptake of cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. **Toxicon**, v. 29, p. 43-51, 1991.

SARTOR, R. B. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. **Gastroenterology**, v. 106, p. 533-539, 1994.

- SAUVANT, C.; HOLZINGER, H.; GEKLE, M. Short-term regulation of basolateral organic anion uptake in proximal tubular OK cells: EGF acts via MAPK, PLA(2), and COX1. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 13, n. 8, p. 1981-1991, 2002.
- SCHEDL, D. P.; CLIFTON, J. A. Small intestinal absorption of steroids. **Gastroenterology**, v. 41, p. 419-499, 1961.
- SCHMID, D. I.; KOHAN, D. E. Effects of shigatoxin-1 on arachidonic acid release by human glomerular epithelial cells. **Kidney Int.**, v. 60, n. 3, p. 1199-1200, 2001.
- SCHOPT, J. W. Microfossils of the early Archean Apex Chert: new evidence of the antiquity of life. **Science**, v. 260, p. 640-646, 1993.
- SCHULTZ, S. G.; DUBINSKY, W. P. Sodium absorption, volume control and potassium channels: tribute to a great biologist. **J. Membr. Biol.**, v. 184, n. 3, p. 255-261, 2001.
- SCHUREK, H. J. Albumin filtration and effective pressure in nephrons in the isolated perfused rat kidney. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF NEPHROLOGY, 7., 1978, Montreal. **Proceedings...** Montreal, 1978.

SERAFIN, W. E.; AUSTEN, K. F. Mediators of immediate hypersensitivity reactions. *N. Engl. J. Med.*, v. 317, n. 1, p. 30-34, 1987.

SHUN-ZHANG, Y. Drinking water and primary liver cancer. In: TANG, Z. Y.; WU, M. C.; XIA, S. S. (Ed.). **Primary liver cancer**. Berlim: Springer – Verlang, 1989. p. 30-37.

SILVA, E. A. T. **Estudo comparativo de parâmetros elétricos na absorção de substratos Na⁺/H⁺-dependentes em epitélio jejunal e ileal de coelho em câmaras de Üssing: modulação com toxina da cólera**. Fortaleza, 2002. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2002.

SILVA, A. C.; SANTOS-NETO, M. S.; SOARES, A. M.; FONTELES, M. C.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A. M. Efficacy of a glutamine-based oral rehydration solution on the eletrolyte and water absorption in a rabbit model of secretory diarrhea induced by cholera toxin. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 26, p. 513-519, 1998.

SIMON, F. R.; SUTHERLAND, E. M.; GONZALES, M. D. Regulation of bile salt transport in reat liver. Evidence that increased maximum bile salt

secretory capacity is due to increased cholic acid receptors. **J. Clin. Invest.**, v. 70, p. 401-411, 1982.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequence, monitoring and management.** Local: Editora, ano. (WHO Publication. n. ., E & F.N. Spon, London – New York, 1999. p. 41-111.

SJOHOLM, A.; HONKANEN, R. E.; BERGGREN, P. O. Characterization of serine/threonine protein phosphatase in RINm5F insulinoma cells. **Biosci. Rep.**, v. 13, n. 6, p. 349-358, 1993.

SMITH, P. L.; CHIOSSONE, D. C.; MCCAFFERTY, G. P. Characterization of LTC₄ effects on rabbit ileal mucosa in vitro. **Arch. Pharmacol.**, v. 341, p. 94-100, 1990.

SPERBER, I. **The biliary system.** Oxford: Blackwell (Taylor W., ed.), 1965. p. 457-450.

SREENAN, S. K.; ZHOU, Y. P.; OTANI, K.; HANSEN, P. A.; CURRIE, K. P.; PAN, C. Y.; LEE, J. P.; OSTREGA, D. M.; PUGH, W.;

HORIKAWA, Y.; COX, N. L.; HANIS, C. L.; BURANT, C. F.; FOX, A. P.; BELL, G. I.; POLONSKY, K. S. Calpains play a role in insulin secretion and action. **Diabetes**, v. 50, n. 9, p. 2013-2020, 2001.

STACK, W. A.; KEELY, S. J.; O'DONOGHUE, D. P.; BAIRD, A. W. Immune regulation of human colonic electrolyte transport in vitro. **Gut**, v. 36, p. 395-400, 1995.

STAPPENBECK, T. S.; WONG, M. H.; SAAM, J. R.; MYSOREKAR, I. U.; GORDON, J. I. Notes from some crypt watchers: regulation of renewal in the mouse intestinal epithelium. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 10, p. 702-709, 1998.

STEYN, D. G. Poisoning of animals and human beings by algae. **S. Afr. J. Sci.**, v. 16, p. 243-244, 1945.

STOTTES, R. R.; NAMIKOSHI, M.; HASCHEK, W. M.; RINEHART, K. L.; CARMICHAEL, W. W.; DAHLEN, A. M.; BEASLEY, V. R. structural modifications imparting reduced toxicity in microcystins from *Microcystis* Spp. **Toxicon**, v. 31, p. 783, 1993.

SUEOKA, E.; SUEOKA, N.; OKABE, S.; KOZU, T.; KOMORI, A.; OHTA, T.; SUGANUMA, M.; KIM, S. T.; LIM, I. K.; FUJIKI, H. Expression of the tumor necrosis factor alpha gene and early response genes by nodularin, a liver tumor promoter, in primary cultured rat hepatocytes. **J. Cancer. Res. Clin. Oncol.**, v. 123, n. 8, p. 413-419, 1997.

TAKASAKI, J.; KAWAUCHI, Y.; MASUHO, Y. Synergistic effects of type II phospholipase A2 and platelet-activating factor on Mac-1 surface expression and exocytosis of gelatinase granules in human neutrophils: evidence for the 5-lipoxygenase-dependent mechanism. **J. Immunol.**, v. 160, p. 5066, 1999.

TATEYAMA, F.; YAMABE, H.; OSAWA, H.; KAIZUKA, M.; SHIRATO, K.; OKUMURA, K. Interleukin-1 beta is an autocrine growth factor of rat glomerular epithelial cells in culture. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 16, n. 6, p. 1149-1155, 2001.

TEIXEIRA, M. G. L. C.; COSTA, M. C. N.; CARVALHO, V. L. P.; PEREIRA, M. S.; HAGE, E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. **Bull. Pan Am. Health Org.**, v. 27, p. 244-253, 1993.

THEISS, W. C.; CARMICHAEL, W. W.; WYMEN, J.; BRUNER, R. Blood pressure and hepatocellular effects of the cyclic heptapeptide toxin produced by the freshwater cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa* strain PCC-7820. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 603-613, 1988.

THEODOROU, V.; EUTAMENE, H.; FIORAMONTI, J.; JUNIEN, J. L.; BUENO, L. Interleukin 1 induces a neurally mediated colonic secretion in rats: involvement of mast cells and prostaglandins. **Gastroenterology**, v. 106, p. 1493-1500, 1994.

THEODOROU, V.; FIORAMONTI, J.; BUENO, L. Integrative neuroimmunology of the digestive tract. **Vet. Res.**, v. 27, p. 427-442, 1996.

TILLET, D.; DITTMANN, E.; ERHARD, M.; VON DOHREN, H.; BORNER, T.; NEILAN, B. A. Structural organization of microcystin biosynthesis in *microcystis aeruginosa* PCC7806: na integrated peptide-polyketide synthetase system. **Chem. Biol.**, v. 7, n. 10, p. 753-764, 2000.

TISDALE, E. Epidemic of intestinal disorders in Charleston, Wva, occurring simultaneously with unprecented water supply conditions. **Am. J. Public Health**, v. 21, p. 198-200, 1931.

TOYAMA, M. H.; SOARES, A. M.; WEN-HWA, L.; POLIKARPOV, I.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S. Amino acid sequence of piratoxin-II, a myotoxic lys-49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops pirajai* venom. **Biochimie**, v. 82, n. 3, p. 245-250, 2000.

TRACEY, K. J.; BEUTLER, B.; LOWRY, S. F.; MERRYWEATHER, J.; WOLPE, S. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. **Science**, v. 234, p. 470-474, 1986.

TRAMONTANA, J. M.; UTAIPAT, U.; MOLLOY, A.; AKARASEWI, P.; BURROUGHS, M.; MAKONKAWKEYOON, S.; JOHNSON, B.; KLAUSNER, J. D.; ROM, W.; KAPLAN, G. Thalidomide treatment reduces tumor necrosis factor alpha production and enhances weight gain in patients with pulmonary tuberculosis. **Mol. Med.**, v. 1, n. 4, p. 384-397, 1995.

TURNHEIM, K.; PLASS, H.; WYSKOVSKY, W. Basolateral potassium channels of rabbit colon epithelium: role sodium absorption and chloride secretion. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1560, n. 1-2, p. 51-66, 2002.

- VAN FURTH, R. Origin and turnover of monocytes and macrophages. **Arch. Trop. Pathol.**, v. 79, p. 125, 1998.
- VELDEE, M. V. Epidemiological study of suspected water-borne gastroenteritis. **Am. J. Public Health.**, v. 21, p. 1227-1234, 1931.
- VESEY, D. A.; CHEUNG, C.; CUTTLE, L.; ENDRE, Z.; GOBE, G.; JOHNSON, D. W. Interleukin-1beta stimulates human renal fibroblast proliferation and matrix protein production by means of a transforming growth factor-beta-dependent mechanism. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 140, n. 5, p. 342-350, 2002a.
- _____. Interleukin-1beta induces human proximal tubule cell injury, alpha-smooth muscle actin expression and fibronectin production. **Kidney Int.**, v. 62, n. 1, p. 346-347, 2002b.
- WALSON, M.; DAVIDSON, D. G.; ORLOFF, J. The renal clearance of alkali-stable inulin. **J. Clin. Invest.**, v. 34, p. 1520-1523, 1955.
- WANG, Y.; LI, X. M.; WANG, H. Y. IL-1beta stimulates alpha-smooth muscle actin expression through JNK/p38 signal pathway in cultured rat mesangial cells. **Sheng. Li. Xue. Bao.**, v. 54, n. 3, p. 244-250, 2002.

WATANABE, M. M.; KAYA, K.; TAKAMURA, N. Fate of the toxic cyclic heptapeptides, the microcystins, from blooms of microcystis (cyanobacteria) in a hypertrophic lake. **J. Phycol.**, 28: 761-767, 1992.

WATANABE, M. F.; PARK, H-D.; KONDO, F.; HARADA, K-I.; HAYASHI, H.; OKINO, T. Identification and estimation of microcystins in freshwater mussels. **Nat. Toxins.**, v. 5, p. 31-35, 1997.

WEISS, J. Autoregulation of flow in isolated rat kidney in the absence of red cells. **Am. J. Physiol.**, v. 195, p. 1115-1118, 1959.

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

WILCKENS, T.; RIJK, R. Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. **Immunol. Today**, v. 18, p. 418-423, 1997.

WOLLHEIM, C. B.; LANG, J.; REGAZZI, R. The exocytotic process of insulin secretion and its regulation by Ca^{+2} and G-proteins. **Diabetes Rev.**, v. 4, p. 276-297, 1996.

WORRELL, R. T.; BAO, H. F.; DENSON, D. D.; EATON, D. C. Contrasting effects of cPLA2 on epithelial Na^{+} transport. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 281, n. 1, p. C12-C14, 2001.

YINGST, D. R.; DAVIS, J.; SCHIEBINGER, R. Inhibitors of tyrosine phosphatases block angiotensin II inhibition of Na^{+} pump. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 406, n. 1, p. 49-52, 2000.

YOSHIDA, N.; IKEMOTO, S.; NARITA, K.; SUGIMURA, K.; WADA, S.; YASUMOTO, R.; KISHIMOTO, T.; NAKATANI, T. Interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and interleukin-1beta in patients with renal cell carcinoma. **Br. J. Cancer**, v. 86, n. 9, p. 1396-1400, 2002.

YOSHIKAWA, T.; NARUSE, S.; KITAGAWA, M.; ISHIGURO, H.; NAGAHAMA, M.; YASUDA, E.; SEMBA, R.; TANAKA, M.; NORUMA, K.; HAYAKAWA, T. Cellular localization of group IIA phospholipase A2 in rats. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 49, n. 6, p. 777-782, 2001.

YU, S. Z. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 10, n. 6, p. 674-682, 1995.

ZHOU, Y. X.; CHENG, S. P.; ZHOU, R. Z. The embryo-larval toxicity of copper, zinc and pentachlorophenol (PCP) to loach and zebrafish. **Acta Hydrobiol. Sinica**, v. 19, suppl. 1, p. 7, 1995a.

ZHOU, Y. X.; CHENG, S. P.; HU, W. the subchronic toxicity of pentachlorophenol and chromium to *Misgurnus mizolepis* Gunther. **Acta Hydrobiol. Sinica.**, v. 19, suppl. 8, p. 13, 1995b.

ZILBERG, B. Gastroenteritis in salisbury European children – a five year study. **Cent. Afr. J. Med.**, v. 12, p. 164-168, 1966.

ANEXOS

Tabela 2- Pressão de perfusão (mmHg) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1 µg/mL) na presença de ciclohexamida (CICLO).

Tempo (min)	SOBMØS+RPMI (Controle)	SOBMØS+MCLR	SOBMØS+CICLO+MCLR
30	112.10±3.60	109.60±3.70	112.40±1.70
60	113.20±1.10	116.40±0.80 ^a	117.60±2.70 ^a
90	114.30±4.70	112.70±3.40	122.40±4.10 ^{ab}
120	109.50±5.60	111.4±4.90	125.60±2.40 ^{ab}

Os dados representam a média ± E.P.M. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

Tabela 3- Resistência vascular renal ($\text{mmHg/mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - $1 \mu\text{g/mL}$) na presença de ciclohexamida (CICLO).

Tempo (min)	SOBMØS+RPMI (Controle)	SOBMØS+MCLR	SOBMØS+CICLO+MCLR
30	4.93±0.37	4.87±0.21	4.60±0.18
60	4.93±0.33	5.15±0.21 ^a	4.76±0.24 ^b
90	4.98±0.35	4.99±0.17	4.95±0.27
120	4.66±0.24	5.03±0.27	5.040±0.16

Os dados representam a média \pm E.P.M. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle ($p<0,05$); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR ($p<0,05$), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

Tabela 4- Fluxo urinário ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - $1 \mu\text{g/mL}$) na presença de ciclohexamida (CICLO).

Tempo (min)	SOBMØS+RPMI (Controle)	SOBMØS+MCLR	SOBMØS+CICLO+MCLR
30	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.004
60	0.12 ± 0.01	0.20 ± 0.027^a	0.14 ± 0.01^b
90	0.14 ± 0.01	0.22 ± 0.03^a	0.14 ± 0.006^b
120	0.16 ± 0.01	0.23 ± 0.03^a	0.15 ± 0.008^b

Os dados representam a média \pm E.P.M. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle ($p < 0,05$); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR ($p < 0,05$), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

Tabela 5- Ritmo de filtração glomerular ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - $1 \mu\text{g/mL}$) na presença de ciclohexamida (CICLO).

Tempo (min)	SOBMØS+RPMI (Controle)	SOBMØS+MCLR	SOBMØS+CICLO+MCLR
30	0.56 ± 0.07	0.66 ± 0.06	0.66 ± 0.06
60	0.56 ± 0.08	0.98 ± 0.15^a	0.61 ± 0.04^b
90	0.57 ± 0.08	0.82 ± 0.09^a	0.62 ± 0.04^b
120	0.73 ± 0.09	0.88 ± 0.08^a	0.68 ± 0.05^b

Os dados representam a média \pm E.P.M. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle ($p < 0,05$); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR ($p < 0,05$), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

Tabela 6- Percentual de transporte de sódio dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1 µg/mL) na presença de ciclohexamida (CICLO).

Tempo (min)	SOBMØS+RPMI (Controle)	SOBMØS+MCLR	SOBMØS+CICLO+MCLR
30	81.94±1.28	80.64±0.79	82.47±1.05
60	80.11±0.92	81.18±1.35	80.85±1.50
90	75.88±1.40	75.81±2.24	81.57±0.76 ^{ab}
120	79.16±0.80	75.46±1.93 ^a	80.91±1.05 ^b

Os dados representam a média ± E.P.M. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

Tabela 7- Percentual de transporte proximal de sódio dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1 µg/mL) na presença de ciclohexamida (CICLO).

Tempo (min)	SOBMØS+RPMI (Controle)	SOBMØS+MCLR	SOBMØS+CICLO+MCLR
30	80.50±1.21	79.11±0.69	79.77±1.58
60	78.23±0.97	79.37±1.35	76.33±1.48
90	74.75±1.26	73.76±2.13	77.04±0.85 ^b
120	77.68±1.10	74.16±1.59 ^a	76.85±1.11

Os dados representam a média ± E.P.M. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

Tabela 8- Percentual de transporte de potássio dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1 µg/mL) na presença de ciclohexamida (CICLO).

Tempo (min)	SOBMØS+RPMI (Controle)	SOBMØS+MCLR	SOBMØS+CICLO+MCLR
30	72.27±1.12	74.84±1.24	73.57±2.81
60	72.65±1.67	76.49±2.70	69.13±1.50
90	72.52±1.72	71.03±2.54	67.65±1.61 ^a
120	73.56±1.26	71.42±2.14	68.89±1.96

Os dados representam a média ± E.P.M. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

Tabela 9- Percentual de transporte proximal de potássio dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1 µg/mL) na presença de ciclohexamida (CICLO).

Tempo (min)	SOBMØS+RPMI (Controle)	SOBMØS+MCLR	SOBMØS+CICLO+MCLR
30	70.82±1.11	73.31±1.11	69.54±3.32
60	70.78±2.07	74.67±1.68	64.62±1.66 ^b
90	71.39±1.73	68.98±2.47	63.12±2.04 ^{ab}
120	72.08±1.43	70.12±2.10 ^a	64.83±2.43 ^a

Os dados representam a média ± E.P.M. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

Tabela 10- Pressão de perfusão (mmHg) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR-1 µg/mL) na presença de dexametasona (DEXA) e quinacrina (QUINA).

Tempo (min)	SOBMØS+RPMI (Controle)	SOBMØS+MCLR	SOBMØS+DEXA+MCLR	SOBMØS+QUINA+MCLR
30	112.10±3.60	109.60±3.70	115.50±2.10	116.50±2.20
60	113.20±1.40	116.40±0.80 ^a	116.00±3.30 ^a	114.50±2.40
90	114.30±4.70	112.70±3.40	114.40±3.50	108.70±5.10 ^{ab}
120	109.50±5.60	111.4±4.90	118.00±4.30	116.10±6.20

Os dados representam a média ± E.P.M. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

Tabela 11- Resistência vascular renal ($\text{mmHg/mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR-1 $\mu\text{g/mL}$) na presença de dexametasona (DEXA) e quinacrina (QUINA).

Tempo (min)	SOBMØS+RPMI (Controle)	SOBMØS+MCLR	SOBMØS+DEXA+MCLR	SOBMØS+QUINA+MCLR
30	4.93±0.37	4.87±0.21	4.88±0.12	4.88±0.10
60	4.93±0.33	5.15±0.21 ^a	4.81±0.13 ^{ab}	4.80±0.13 ^b
90	4.98±0.35	4.99±0.17	4.77±0.21 ^{ab}	4.57±0.24 ^{ab}
120	4.66±0.24	5.03±0.27	4.94±0.25	4.88±0.28

Os dados representam a média \pm E.P.M. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle ($p<0,05$); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR ($p<0,05$), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

Tabela 12- Fluxo urinário ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR-1 $\mu\text{g/mL}$) na presença de dexametasona (DEXA) e quinacrina (QUINA).

Tempo (min)	SOBMØS+RPMI (Controle)	SOBMØS+MCLR	SOBMØS+DEXA+MCLR	SOBMØS+QUINA+MCLR
30	0.12±0.02	0.13±0.01	0.10±0.01	0.15±0.01
60	0.12±0.01	0.20±0.027 ^a	0.11±0.01 ^b	0.13±0.005 ^b
90	0.14±0.01	0.22±0.03 ^a	0.15±0.02 ^b	0.11±0.01 ^{ab}
120	0.16±0.01	0.23±0.03 ^a	0.20±0.02 ^{ab}	0.13±0.01 ^{ab}

Os dados representam a média \pm E.P.M. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle ($p<0,05$); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR ($p<0,05$), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

Tabela 13- Ritmo de filtração glomerular ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - $1 \mu\text{g/mL}$) na presença de dexametasona (DEXA) e quinacrina (QUINA).

Tempo (min)	SOBMØS+RPMI (Controle)	SOBMØS+MCLR	SOBMØS+DEXA+MCLR	SOBMØS+QUINA+MCLR
30	0.56 ± 0.07	0.66 ± 0.06	0.58 ± 0.04	0.70 ± 0.04
60	0.56 ± 0.08	0.98 ± 0.15^a	0.52 ± 0.03^b	0.69 ± 0.005^b
90	0.57 ± 0.08	0.82 ± 0.09^a	0.57 ± 0.04^b	0.72 ± 0.11^a
120	0.73 ± 0.09	0.88 ± 0.08^a	0.73 ± 0.09^b	0.55 ± 0.07^{ab}

Os dados representam a média \pm E.P.M. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle ($p < 0,05$); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR ($p < 0,05$), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

Tabela 14- percentual de transporte de sódio dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR-1 µg/mL) na presença de dexametasona (DEXA) e quinacrina (QUINA).

Tempo (min)	SOBMØS+RPMI (Controle)	SOBMØS+MCLR	SOBMØS+DEXA+MCLR	SOBMØS+QUINA+MCLR
30	81.94±1.28	80.64±0.79	82.49±0.84	80.26±1.35
60	80.11±0.92	81.18±1.35	79.55±2.12	81.16±1.67
90	75.88±1.40	75.81±2.24	76.61±1.88	82.62±2.48 ^{ab}
120	79.16±0.80	75.46±1.93 ^a	72.14±2.69 ^a	77.36±1.62

Os dados representam a média ± E.P.M. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

Tabela 15- percentual de transporte proximal de sódio dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1 µg/mL) na presença de dexametasona (DEXA) e quinacrina (QUINA).

Tempo (min)	SOBMØS+RPMI (Controle)	SOBMØS+MCLR	SOBMØS+DEXA+MCLR	SOBMØS+QUINA+MCLR
30	80.50±1.21	79.11±0.69	83.60±0.94	78.61±1.46
60	78.23±0.97	79.37±1.35	78.50±2.27	79.64±1.87
90	74.75±1.26	73.76±2.13	74.76±2.07	80.77±2.71 ^{ab}
120	77.68±1.10	74.16±1.59 ^a	70.48±2.91 ^a	75.37±1.70

Os dados representam a média ± E.P.M. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

Tabela 16- percentual de transporte de potássio dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1 µg/ml) na presença de dexametasona (DEXA) e quinacrina (QUINA).

Tempo (min)	SOBMØS+RPMI (Controle)	SOBMØS+MCLR	SOBMØS+DEXA+MCLR	SOBMØS+QUINA+MCLR
30	72.27±1.12	74.84±1.24	79.02±1.17	75.33±1.65
60	72.65±1.67	76.49±1.70	74.64±2.79	76.98±2.19
90	72.52±1.72	71.03±2.54	70.48±2.18	79.22±2.77 ^{ab}
120	73.56±1.26	71.42±2.14	65.38±3.20	74.06±1.46

Os dados representam a média ± E.P.M. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

Tabela 17- percentual de transporte proximal de potássio dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1 µg/mL) na presença de dexametasona (DEXA) e quinacrina (QUINA).

Tempo (min)	SOBMØS+RPMI (Controle)	SOBMØS+MCLR	SOBMØS+DEXA+MCLR	SOBMØS+QUINA+MCLR
30	70.82±1.11	73.31±1.11	76.14±1.32	73.67±1.79
60	70.78±2.07	74.67±1.68	73.58±2.86	75.46±2.38
90	71.39±1.73	68.98±2.47	68.63±2.27	77.38±3.01 ^{ab}
120	72.08±0.43	70.12±1.10 ^a	63.71±3.42 ^a	72.08±1.58

Os dados representam a média ± E.P.M. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

Tabela 18- Pressão de perfusão (mmHg) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1 µg/mL) na presença de talidomida (TALI).

Tempo (min)	SOBMØS+RPMI (Controle)	SOBMØS+MCLR	SOBMØS+TALI+MCLR
30	112.10±3.60	109.60±3.70	113.80±2.80
60	113.20±1.40	116.40±0.80 ^a	121.10±6.00 ^{ab}
90	114.30±4.70	112.70±3.40	120.50±6.60
120	109.50±5.60	111.4±4.90	137.80±4.50 ^{ab}

Os dados representam a média ± E.P.M. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

Tabela 19- Resistência vascular renal ($\text{mmHg/mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - $1 \mu\text{g/mL}$) na presença de talidomida (TALI).

Tempo (min)	SOBMØS+RPMI (Controle)	SOBMØS+MCLR	SOBMØS+TALI+MCLR
30	4.93 ± 0.37	4.87 ± 0.21	4.70 ± 0.07
60	4.93 ± 0.33	5.15 ± 0.21^a	4.99 ± 0.19^b
90	4.98 ± 0.35	4.99 ± 0.17	4.94 ± 0.16
120	4.66 ± 0.24	5.03 ± 0.27	5.72 ± 0.27^{ab}

Os dados representam a média \pm E.P.M. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle ($p < 0,05$); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR ($p < 0,05$), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

Tabela 20- Fluxo urinário ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - $1 \mu\text{g/mL}$) na presença de talidomida (TALI).

Tempo (min)	SOBMØS+RPMI (Controle)	SOBMØS+MCLR	SOBMØS+TALI+MCLR
30	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01
60	0.12 ± 0.01	0.20 ± 0.03^a	0.17 ± 0.01
90	0.14 ± 0.01	0.22 ± 0.03^a	0.19 ± 0.03^a
120	0.16 ± 0.01	0.23 ± 0.03^a	0.34 ± 0.08^{ab}

Os dados representam a média \pm E.P.M. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle ($p < 0,05$); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR ($p < 0,05$), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

Tabela 21- Ritmo de filtração glomerular ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - $1 \mu\text{g/mL}$) na presença de talidomida (TALI).

Tempo (min)	SOBMØS+RPMI (Controle)	SOBMØS+MCLR	SOBMØS+TALI+MCLR
30	0.56 ± 0.07	0.66 ± 0.06	0.63 ± 0.09
60	0.56 ± 0.08	0.98 ± 0.15^a	0.65 ± 0.11
90	0.57 ± 0.08	0.82 ± 0.09^a	0.76 ± 0.18^a
120	0.73 ± 0.09	0.88 ± 0.08^a	1.02 ± 0.32^a

Os dados representam a média \pm E.P.M. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle ($p < 0,05$); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR ($p < 0,05$), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

Tabela 22- Percentual de transporte de sódio dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1 µg/mL) na presença de talidomida (TALI).

Tempo (min)	SOBMØS+RPMI (Controle)	SOBMØS+MCLR	SOBMØS+TALI+MCLR
30	81.94±1.28	80.64±0.79	81.09±2.08
60	80.11±0.92	81.18±1.35	72.48±2.50 ^{ab}
90	75.88±1.40	75.81±2.24	71.07±3.38
120	79.16±0.80	75.46±1.93 ^a	60.43±3.91 ^{ab}

Os dados representam a média ± E.P.M. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle ($p < 0,05$); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR ($p < 0,05$), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

Tabela 23- Percentual de transporte proximal de sódio dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1 µg/mL) na presença de talidomida (TALI).

Tempo (min)	SOBMØS+RPMI (Controle)	SOBMØS+MCLR	SOBMØS+TALI+MCLR
30	80.50±1.21	79.11±0.69	80.11±2.24
60	78.23±0.97	79.37±1.35	69.68±2.52 ^{ab}
90	74.75±1.26	73.76±2.13	69.20±3.92 ^a
120	77.68±1.10	74.16±1.59 ^a	58.38±4.33 ^{ab}

Os dados representam a média ± E.P.M. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

Tabela 24- Percentual de transporte de potássio dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1 µg/mL) na presença de talidomida (TALI).

Tempo (min)	SOBMØS+RPMI (Controle)	SOBMØS+MCLR	SOBMØS+TALI+MCLR
30	72.27±1.12	74.84±1.24	71.77±2.92
60	72.65±1.67	76.49±1.70	61.73±3.03 ^{ab}
90	72.52±1.72	71.03±2.54	60.56±5.95 ^{ab}
120	73.56±1.26	71.42±2.14	52.88±6.78 ^{ab}

Os dados representam a média ± E.P.M. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle (p<0,05); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR (p<0,05), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

Tabela 25- Percentual de transporte proximal de potássio dos rins perfundidos com sobrenadante de macrófagos (SOBMØS) estimulados com microcistina-LR (MCLR - 1 µg/mL) na presença de talidomida (TALI).

Tempo (min)	SOBMØS+RPMI (Controle)	SOBMØS+MCLR	SOBMØS+TALI+MCLR
30	70.82±1.11	73.31±1.11	70.79±3.11
60	70.78±2.07	74.67±1.68	58.94±3.26 ^{ab}
90	71.39±1.73	68.98±2.47	58.68±6.67 ^{ab}
120	72.08±1.43	70.12±2.10 ^a	50.82±7.28 ^{ab}

Os dados representam a média ± E.P.M. SOBMØS+RPMI (grupo controle) representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento. a= significância em relação ao grupo controle ($p < 0,05$); b= significância em relação ao grupo tratado com SOBMØS+MCLR ($p < 0,05$), comparados por ANOVA (teste de Bonferroni).

Tabela 27- Efeito no transporte de sódio, potássio, água e cloreto da toxina da cólera (TC - 1µg/mL – controle positivo), microcistina-LR (MCLR - 1µg/mL) na ausência e presença de pré-tratamento com toxina da cólera (TC+MCLR) e sobrenadante de macrófagos estimulados como MCLR.

	Balanço de sódio (µEq.g ⁻¹ .min ⁻¹)	Balanço de potássio (µEq.g ⁻¹ .min ⁻¹)	Balanço de água (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)	Balanço de cloreto (µEq.g ⁻¹ .min ⁻¹)
Ringer (controle)	2.18±0.50	0.32±0.03	0.002±0.002	0.88±1.25
Toxina da Cólera (TC - controle positivo)	-1.29±0.30*	-0.70±0.04*	-0.015±0.004*	-7.13±1.34*
Microcistina-LR (MCLR)	-2.18±0.72*	-0.26±0.04*	-0.012±0.004*	-3.29±1.93*
TC+MCLR	-0.02±0.70*	0.005±0.04*	0.005±0.03*	-4.49±2.42*
Dulbecco (controle)	4.20±8.08	0.45±0.26	-0.00078±0.0015	0.57±1.96
SOBMCLR	-4.84±2.56*	-1.58±0.07*	-0.003±0.005*	-5.38±3.44*

Os dados representam a média ± E.P.M. e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni) com significância de p<0,05*. Os valores negativos são considerados como balanço secretório e valores positivos são considerados balanço de absorção.

Trabalhos Publicados [durante o doutorado (1999-2003)] relacionados com a Tese.

1. NOBRE, A. C. L.; COELHO, G. R.; JORGE, M. C. M.; SILVA, M. M. M.; COUTINHO, M. C. M.; ANGELIM, E. V.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Efeitos da microcistina-LR: toxicidade e alterações histopatológicas. *Pesquisa Médica*, v. 2, n. 2, p. 38-41, 1999.
2. NOBRE, A. C. L.; JORGE, M. C. M.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Effects of microcystin-LR in isolated perfused rat kidney. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 3, p. 985-988, 1999.
3. NOBRE, A. C. L.; COELHO, G. R.; COUTINHO, M. C. M.; SILVA, M. M. M.; ANGELIM, E. V.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. The role of phospholipase A2 and cyclooxygenase in renal toxicity induced by microcystin-LR. *Toxicon*, v. 39, p. 727-724, 2001.

Trabalhos Publicados [durante o doutorado (1999-2003)] relacionados com a Tese.

1. NOBRE, A. C. L.; COELHO, G. R.; JORGE, M. C. M.; SILVA, M. M. M.; COUTINHO, M. C. M.; ANGELIM, E. V.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Efeitos da microcistina-LR: toxicidade e alterações histopatológicas. *Pesquisa Médica*, v. 2, n. 2, p. 38-41, 1999.

2. NOBRE, A. C. L.; JORGE, M. C. M.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Effects of microcystin-LR in isolated perfused rat kidney. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 3, p. 985-988, 1999.

3. NOBRE, A. C. L.; COELHO, G. R.; COUTINHO, M. C. M.; SILVA, M. M. M.; ANGELIM, E. V.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. The role of phospholipase A2 and cyclooxygenase in renal toxicity induced by microcystin-LR. *Toxicon*, v. 39, p. 727-724, 2001.

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

EFEITOS DA MICROCISTINA-LR: TOXICIDADE E ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS

EFFECTS OF MICROCYSTIN-LR:
TOXICITY AND HISTOPATHOLOGIC ALTERATIONS

Arlandia Cristina Lima Nobre*, Gustavo Rêgo Coêlho**, Milena Camara de Melo Jorge***, Mércia Maria Moreira da Silva****, Maria Cristina Magalhães Coutinho****, Ederson Viana Angelim*****, Dalgimar Beserra de Menezes*****, Manasses Claudino Fonteles***** Helena Serra Azul Monteiro*****

RESUMO

A microcistina LR (MCLR) é um peptídeo altamente hepatotóxico, produzido pela cianobacteria (alga azul-verde) *Microcystis aeruginosa*, que inibe a proteína fosfatase tipo 1 e 2A. Este trabalho teve como objetivo determinar a toxicidade aguda em camundongos e demonstrar as alterações histopatológicas promovidas por esta toxina. Foram utilizados camundongos machos (25-35g) divididos em 7 grupos (n=10), que receberam via intraperitoneal as doses de 6, 15, 20, 25, 33, 50 e 67µg/kg de MCLR. Os órgãos usados para análise histopatológica foram fígado, rim, coração, pulmão, baço e cérebro. Este estudo foi feito por microscopia óptica e coloração de hematoxilina e eosina. O grupo tratado com 6µg/kg não apresentou alterações; os grupos tratados com 15, 20, 25 e 33µg/kg apresentaram hipocinesia inicial, seguida por hipercinesia com recuperação de todos os animais no período de 24 horas. Os animais tratados com 50 e 67µg/kg apresentaram paralisia, convulsão e morte (100%), nas duas horas iniciais. A análise histopatológica dos grupos tratados com 6, 15, 20, 25 e 33µg/kg não mostrou nenhuma alteração nos órgãos estudados. Os grupos tratados com 50 e 67µg/kg apresentaram alterações hepáticas macro e microvesicular citoplasmática, que sugerem esteatose nas áreas centrolobular, mediozonal e periportal, além de intensa congestão. Os dados indicam que a microcistina é tóxica e causa intensa hepatotoxicidade.

Unitermos: Microcistina, Toxicidade, Hepatotoxicidade

INTRODUÇÃO

As microcistinas são produzidas pelas cianobactérias filamentosas (*Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc* e *Hapalosiphon*) e coloniais (*Microcystis*). A microcistina LR é uma toxina cíclica, quimicamente muito estável, que representa um risco à saúde pública, visto ser encontrada nas águas utilizadas para consumo animal e humano.

Em Caruaru, uma cidade do Nordeste brasileiro, no Estado de Pernambuco, entre os dias 17 e 20 de novembro de 1996, dos 130 pacientes de um centro de hemodiálise, 116 pacientes (89%) apresentaram sintomas clínicos, náuseas e vômitos associados com este procedimento. Até o dia 24 de março, 26 destes

pacientes morreram por insuficiência hepática aguda. O número de mortes, relatado até o mês de novembro do mesmo ano, foi de 69 pacientes. Aparentemente todos os pacientes sofreram uma forma severa de hepatite tóxica.

A microcistina foi considerada responsável por esta tragédia, já que a detectaram na água do reservatório e no centro de diálise, no soro e no tecido hepático dos pacientes em questão. Este episódio foi a primeira confirmação de vítimas humanas devido à intoxicação por microcistina.

O levantamento florístico feito entre 1996 e 1997 nas amostras de água do açude Gavião, reservatório que abastece Fortaleza e zona metropolitana, demonstrou a presença de inúmeros gêneros de

* Farmacêutica, Mestre em Farmacologia pela UFC. Atualmente Doutoranda de Farmacologia da UFC
** Estudante do 8º Semestre da Faculdade de Medicina da UFC

*** Médica formada na UFC.

**** Estudantes do Internato da Faculdade de Medicina da UFC

***** Estudante do 5º Semestre da Faculdade de Medicina

***** Prof. Adjunto IV do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC

***** Prof. Aposentado do Departamento de Fisiologia e Farmacologia das UFC

***** Profa. Adjunta IV do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC

FIGURA 01: ÁREA CENTROLOBULAR COM ACÚMULO DE SANGUE E DILATAÇÃO DOS SINUSÓIDES. NOTAM-SE GLÓBULOS HEPATÓCITOS COM VACÚOLOS. HE 4 X 10

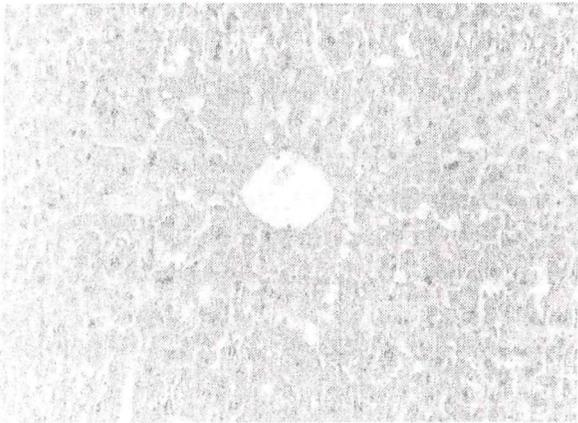
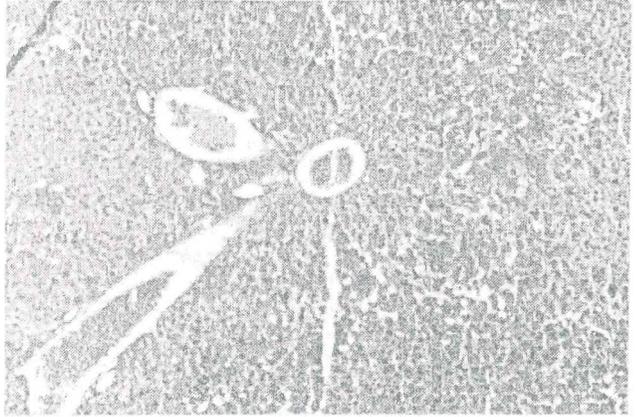


FIGURA 02: CONGESTÃO E ACÚMULO DE SANGUE NAS ÁREAS CENTROLOBULAR E MEDIOZONAL. HE 4 X 10



DISCUSSÃO

Na avaliação da toxicidade aguda da microcistina-LR (MCLR), o fígado foi o órgão mais gravemente afetado nas doses de 50 e 67 µg/kg, conforme nossos achados histopatológicos. Os outros órgãos analisados (cérebro, pulmão, baço, rim e coração) não apresentaram alterações importantes relacionadas com a exposição à toxina. Runnegar & Zoner (1986) demonstraram que hepatócitos isolados e incubados com hepatotoxina da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* são rapidamente deformados por um rearranjo das organelas celulares. Falconer et al. (1981) e Lambert et al. (1994) demonstraram que os ratos expostos à MCLR morreram em consequência de hemorragia hepática, devido à ruptura das células do parênquima e sinusóides, e, por fim, desencadearam um choque circulatório. Também observamos importante hemorragia intracelular, entretanto, havia acúmulo de sangue nos sinusóides e na região centrolobular dos camundongos. Sugerimos, portanto, que a morte dos animais mais ocorreu devido a um choque circulatório, que poderia guardar relação com a intensa congestão dos sinusóides hepáticos.

A dose de 50 µg/kg de MCLR matou todos os animais no período de tempo de duas horas. Em uma dose maior (67 µg/kg), também observamos a morte de todos os animais, de modo semelhante ao grupo

acima citado. Nessas doses, os animais apresentaram ataxia e convulsões. O grupo tratado com 6 µg/kg não mostrou nenhuma alteração; enquanto os grupos tratados com 15, 20, 25 e 33 µg/kg exibiram uma hipocinesia inicial seguida de hipercinesia, com recuperação nas 24 horas. Hermansky et al. (1991) demonstraram que a MCLR, administrada intraperitonealmente em camundongos, tem uma DL50 que varia de 32,5 a 100 µg/kg. Nossos resultados estão dentro da faixa de variação descrita na literatura. Esta variação pode ser devido a diferenças de idade, variedade, sexo e condições fisiológicas dos animais. Miura et al. (1991) mostraram que a DL50 i.p. da MCLR em ratos alimentados (122 µg/kg) foi significativamente maior que nos ratos em jejum (72 µg/kg), ressaltando que a alimentação é também um fator determinante dessa variação. Os camundongos morreram entre 1-2 horas após a administração i.p. de microcistina. Nestas circunstâncias, a toxina tem um grande impacto no fígado, permanecendo pouco tempo na circulação; dessa forma, a toxina não atinge concentrações suficientes para afetar outros órgãos.

CONCLUSÃO

O fígado foi o principal órgão afetado no estudo da toxicidade aguda da microcistina-LR, apresentando intensa congestão. A dose de 50 µg/kg foi capaz de provocar morte em todos os animais.

Summary

Microcystin is a highly hepatotoxic peptide, which is produced by the blue-green algae, *Microcystis aeruginosa*. It inhibits protein phosphatase type 1 and 2A. This work has the objective of determining the acute toxicity in mice and to demonstrate the histopathologic alterations promoted by this toxin. We used male mice (25-35g) to determine the acute toxicity. They were divided into 7 groups (n=10), which received i.p. doses: 6, 15, 20, 25, 33, 50 and 67mg/kg. The organs used for histopathologic analysis were liver, kidney, heart, lung, spleen and brain. This study was made by optic microscopy of slides stained with HE. The group treated with 6mg/kg exhibited no alterations; the 15, 20, 25 and 33mg/kg groups presented initial hypokinesia, followed by hyperkinesia with recovery of all animals in 24h period. The animals treated with 50 and 67mg/kg showed ataxia, convulsion and death (100%, 2h). The histologic analysis of the groups treated with 6, 15, 20, 25 and 33mg/kg did not show any alterations in the organs studied; the groups treated with 50 and 67mg/kg showed liver alterations: consisting of cytoplasmic macro and microvesicular or vacuolar suggesting steatosis in the centrilobular, midzonal and periportal areas and intensive congestion. The data indicate that microcystin is toxic and causes intense hepatotoxicity.

Keywords: Microcystin, Toxicity, Hepatotoxicity

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01) Bourke ATC, Hawes RB, Nielson A, Stallmann ND. An outbreak of hepatoenteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. *Toxicol Suppl* 1983; 3(45)
- 02) Carmichael WW. Toxic of freshwater algae. In: *Handbook of natural toxins*. New York: Marcel Dekker, 1988; 3: 21
- 03) Falconer IR, Jackson ARB, Langley J, Runnegar MT. Liver pathology in mice in poisoning by the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Aust J Biol Sci* 1981; 34: 179-187
- 04) Hermansky SJ, Stohs SJ, Eldeen ZM, Roche VF, Mereish KA. Evaluation of potencial chemoprotectants against microcystin-LR hepatotoxicity in mice. *J Appl Toxicol* 1991; 11: 65
- 05) Jochimsen EM, Carmichael WW, Na JS, Cardo DM, Cookson ST, Holmes CE, Antunes MB, De Melo Filho DA, Lyra TM, Barreto VS, Azevedo SM, Jarvis WR. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N Engl J Med* 1998; 338(13): 873-878
- 06) Lambert TW, Holmes CFB, Hruddy SE. Microcystins class of toxins: health effects and safety of drinking water supplies. *Environ Rev* 1994; 2:167-186
- 07) Miura GA, Robinson NA, Lawrence WB, Pace JG. Hepatotoxicity of microcystin-LR in fed and fasted rats. *Toxicol* 1991; 29: 337
- 08) Runnegar MT, Falconer IR. Effect of toxin from the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. *Toxicol* 1986; 24: 109-115

Endereço para correspondência:

Dra. Helena Serra Azul Monteiro
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Rua Col. Nunes de Melo, 1127
CEP: 60431-970 - Fortaleza - Ceará - Brasil
Fax: (85) 243.9333

Effects of microcystin-LR in isolated perfused rat kidney

A.C.L. Nobre¹,
M.C.M. Jorge¹,
D.B. Menezes²,
M.C. Fonteles¹ and
H.S.A. Monteiro¹

¹Departamento de Fisiologia e Farmacologia and
²Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina,
Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

Abstract

Microcystin is a hepatotoxic peptide which inhibits protein phosphatase types 1 and 2A. The objective of the present study was to evaluate the physiopathologic effects of microcystin-LR in isolated perfused rat kidney. Adult Wistar rats (N = 5) of both sexes (240-280 g) were utilized. Microcystin-LR (1 µg/ml) was perfused over a period of 120 min, during which samples of urine and perfusate were collected at 10-min intervals to determine the levels of inulin, sodium, potassium and osmolality. We observed a significant increase in urinary flow with a peak effect at 90 min (control (C) = 0.20 ± 0.01 and treated (T) = 0.32 ± 0.01 ml g⁻¹ min⁻¹, P<0.05). At 90 min there was a significant increase in perfusate pressure (C = 129.7 ± 4.81 and T = 175.0 ± 1.15 mmHg) and glomerular filtration rate (C = 0.66 ± 0.07 and T = 1.10 ± 0.04 ml g⁻¹ min⁻¹) and there was a significant reduction in fractional sodium tubular transport at 120 min (C = 78.6 ± 0.98 and T = 73.9 ± 0.95%). Histopathologic analysis of the perfused kidneys showed protein material in the urinary space, suggestive of renal toxicity. These data demonstrate renal vascular, glomerular and urinary effects of microcystin-LR, indicating that microcystin acts directly on the kidney by probable inhibition of protein phosphatases.

Key words

- Microcystin-LR
- Kidney
- Perfused kidney

Introduction

H.S.A. Monteiro
Departamento de Fisiologia e
Farmacologia, FM, UFC
Nunes de Melo, 1127
60000 Fortaleza, CE

0-85-243-9333

mailto:razul@traqnet-cc.com.br

supported by CAPES and

April 14, 1998

March 29, 1999

Members of the cyanobacterial genera *Microcystis*, *Oscillatoria* and *Anabaena* produce cyclic peptides, denoted microcystins, which are potent hepatotoxins. These substances are responsible for the death of fish, birds, wild animals and agricultural livestock in many countries where freshwaters contain toxic cyanobacterial blooms, and the adverse effects of these toxins on human health have been recognized (1,2).

Microcystin-LR (MCLR) is a highly hepatotoxic heptapeptide in mice and rats, which consists of two variable L-amino acids, i.e.,

leucine and arginine, three D-amino acids and the two unusual amino acids, N-methyl-dehydroalanine and 3-amino-9-methoxy-10-phenyl-2,6,8-trimethyl-deca-4(E),6(E)-dienoic acid (Adda) (3,4). MCLR has been shown to inhibit significantly the catalytic subunits of only two specific types of protein phosphatases, protein phosphatase 1 (pp-1c) and protein phosphatase 2A (pp-2Ac) (5-8). The purpose of the present study was to evaluate and compare the physiopathologic effects of microcystin-LR (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA; molecular mass

995.2) from *Microcystis aeruginosa* on the isolated perfused kidney without blood cells.

Adult Wistar rats of both sexes weighing 240-280 g were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg body weight *ip*). Twenty percent mannitol was administered intravenously just before the right ureter was cannulated with polyethylene (PE50) tubing. The right renal artery was cannulated with a 19-gauge blunt disposable needle passed through the superior mesenteric artery as described by Bahlmann et al. (9), Nishiitsutji-Uwo et al. (10) and Ross (11). The excised right kidney was perfused without interruption of kidney flow at 37°C with Krebs-Henseleit buffer containing 6 g/l bovine serum albumin (BSA fraction V, Sigma). The perfusion solution was dialyzed for 48 h at 4°C in 1.5 l of Krebs to reduce its contamination, and its pH was adjusted to 7.4. The total perfusate used per experiment was 100 ml and contained: 147 mmol/l Na⁺, 5 mmol/l K⁺, 2.5 mmol/l Ca²⁺, 2 mmol/l Mg²⁺, 110 mmol/l Cl⁻, 2.5 mmol/l HCO₃⁻, 1 mmol/l SO₄²⁻, 1 mmol/l PO₄³⁻, 0.075 g urea, 0.075 g inulin and 0.15 g glucose. The perfusion system was based on Bowman's technique (12) as modified in our laboratory by the addition of an artificial lung to improve oxygenation and of a 1.2-µm millipore filter (13). The flow rate of perfusion was maintained at 25-35 ml/min per kidney. The preparation was allowed to equilibrate for 15-20 min before the study period, which lasted 120 min. Perfusion pressure and resistance were measured at 5-min intervals. Samples of the perfusate and urine were collected every 10 min for the determination of sodium, potassium, inulin and osmolality and the results were averaged every 30 min. Sodium and potassium concentrations were determined by flame photometry (Flame Photometer Model 445) and inulin was determined according to Walson et al. (14). Fractional sodium tubular transport (%TNa⁺) was calculated by the method of Pitts (15). The osmolality of the samples was measured with

an Advanced Instrument osmometer (Needham Heights, MA, USA). After renal perfusion, the kidneys were evaluated histologically by light microscopy. The data are reported as mean ± SEM for three periods of 10 min each at 30, 60, 90 and 120 min. In each group, the first 30 min of perfusion were considered to be an internal control. The perfusion pressure (PP), urinary flow (UF), glomerular filtration rate (GFR) and %TNa⁺ remained stable in the control preparations throughout the 120-min perfusion. The data were analyzed by the Student *t*-test, with the level of significance set at P<0.05.

Microcystins induce severe hepatic hemorrhage leading to shock (16). Gross macroscopic examination suggests that all the visceral organs are affected and the animal perhaps succumbs to multiple organ failure. However, except for the liver, gross histological examination of other visceral organs does not show any consistent abnormalities (17). Some conspicuous effects of microcystin-LR on carp kidney have been reported by Raberg et al. (18). These changes were apparently more severe than the relatively mild effects on kidney observed in mice (19-21). In addition, Kotak et al. (22) demonstrated kidney lesions in the fish (*Oncorhynchus mykiss*), consisting of coagulative tubular necrosis with dilation of Bowman's space. Bhattacharya et al. (23) showed a dose- and time-dependent elevation in plasma urea and creatinine levels with a concomitant decrease in total protein and albumin levels in rats. In view of these diverse observations, we have examined the potential nephrotoxicity of microcystin-LR in isolated perfused rat kidney, which permits the study of direct effects of toxin in the absence of systemic effects.

The infusion of 1 µg/ml microcystin-LR, which corresponds to 1 µM, after 30 min of an internal control caused a significant increase in perfusion pressure at 90 min (control (C) = 129.7 ± 4.81 and treated (T) = 175.0 ± 1.15 mmHg, P<0.05). Urinary flow was also significantly increased with a maxi-

effect at 90 min ($C = 0.20 \pm 0.01$ and $T = 2 \pm 0.01 \text{ ml g}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $P < 0.05$). GFR also increased at 90 min ($C = 0.66 \pm 0.07$ and $T = 0.66 \pm 0.04 \text{ ml g}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $P < 0.05$). $\%TNa^+$ was 78.6 ± 0.98 during the first 30 min of the basal control period and decreased significantly to 73.9 ± 0.95 ($P < 0.05$) at 120 min of perfusion after administration of the toxin (Table 1).

Histological evaluation of kidneys treated with microcystin-LR showed an intense amount of protein in the urinary spaces. The increase in perfusion pressure was followed by a significant increase in glomerular filtration rate. The time course of the effect of microcystin-LR on perfusion pressure coincided with that for glomerular filtration rate, suggesting that the latter effect is followed by an increase in perfusion pressure. This increase in perfusion pressure was probably responsible for the increase in glomerular pressure and, consequently, the increase in urinary flow. If microcystin-LR had a direct effect on the glomeruli we would expect a decrease resulting in an increase of glomerular filtration rate with a further increase in urinary flow rate. Sodium excretion depends on the relationship between glomerular filtrate and sodium reabsorption rate. In the present experiments, the fractional sodium tubular transport was reduced in the microcystin-LR-treated group, this effect probably occurring in the proximal renal tubules. An important component of the glomerulus is the mesangium. Mesangial cells exhibit mitotic activity and secrete prostaglandins and most of them also contain myofilaments and can contract in response to a

Table 1 - Effects of microcystin-LR on perfused rat kidney

The kidneys were perfused with $1 \mu\text{M}$ microcystin-LR (Mycyst) in modified Krebs-Henseleit solution and control conditions. Data are reported as mean \pm SEM for 5 rats. * $P < 0.05$ compared to control (Student's *t*-test). PP, Perfusate pressure; GFR, glomerular filtration rate; UF, urinary flow; $\%TNa^+$, fractional sodium tubular transport.

Time	PP (mmHg)	GFR ($\text{ml g}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	UF ($\text{ml g}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	$\%TNa^+$
30 min				
Control	118.3 ± 0.01	0.73 ± 0.06	0.15 ± 0.01	81.3 ± 0.16
Basal Mycyst	129.7 ± 4.81	0.66 ± 0.07	0.20 ± 0.01	78.6 ± 0.98
60 min				
Control	119.0 ± 0.58	0.72 ± 0.03	0.16 ± 0.01	82.0 ± 0.40
Mycyst	$160.7 \pm 8.69^*$	$1.03 \pm 0.05^*$	$0.28 \pm 0.02^*$	78.8 ± 1.14
90 min				
Control	116.9 ± 0.10	0.74 ± 0.05	0.16 ± 0.01	81.0 ± 0.44
Mycyst	$175.0 \pm 1.15^*$	$1.10 \pm 0.04^*$	$0.32 \pm 0.01^*$	$75.9 \pm 0.67^*$
120 min				
Control	115.6 ± 1.69	0.74 ± 0.05	0.16 ± 0.01	80.6 ± 0.32
Mycyst	$175.3 \pm 1.45^*$	$1.03 \pm 0.03^*$	$0.31 \pm 0.02^*$	$73.9 \pm 0.95^*$

variety of stimuli. Since mesangial cells are located in close contact with glomerular capillaries, they may influence the glomerular filtration rate by regulating blood flow through the capillaries (24). The intense amount of protein material was observed in the glomeruli of the toxin-treated group, probably because of toxic effects of the microcystin-LR on the glomeruli and tubules or due to an increase in vascular permeability due to endothelial injury. The present observations are the first demonstration of a direct specific effect of microcystin-LR, with alterations of renal functional parameters in the isolated perfused rat kidney in the absence of systemic effects. These renal effects are probably caused by inhibition of protein phosphatases.

References

- Blackintosh C, Beattie KA, Klumpp S, Cohen P & Codd GA (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *EBS Letters*, 264: 187-192.
- Iatsumura RN, Nishiwaki S, Ohta T, Yoshizawa S, Suganuma M, Harada K-I, Watanabe MF & Fujiki H (1991). Structure-function relationships of microcystins, liver tumor promoters, in interaction with protein phosphatase. *Japanese Journal of Cancer Research*, 82: 993-996.
- Botes DP, Tuinman AA, Wessels PL, Viljoen CC, Kruger H, Williams DH, Santikarn S, Smith RJ & Hammond SJ (1984). The structure of cyanobacterin-LA, a cyclic heptapeptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions*, 1: 2311-2316.

- Linehart KL, Harada KI, Namiyoshi M, Chen C, Havis CA, Munro MHG, Blunt JW, Mulligan PE, Beasley VR, Dahlem AM & Carmichael WW (1988). Nodularin, microcystin, and the configuration of Asda. *Journal of the American Chemical Society*, 110: 8557-8558.
- Montano RE, Zwiler J, Moore RE, Daly SL, Khatra BS, Dukelew M & Boynton AL (1990). Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *Journal of Bioorganic Chemistry*, 265: 19401-19404.
- Uchida A, Carmichael WW & Fujiki H (1990). Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. *Japanese Journal of Cancer Research*, 116: 609-614.
- Claeysens S, Francois A, Chedeville A & Lavoinne A (1995). Microcystin-LR induced an inhibition of protein synthesis in isolated rat hepatocytes. *Biochemical Journal* 306 (Part 3): 693-696.
- Tabrizi S, Khan AS, Wickstrom M & Beasley V (1995). Effects of microcystin-LR on actin and the actin-associated proteins alpha-actinin and talin in hepatocytes. *Toxicology*, 9: 405-414.
- Bahamandji J, Giesch G & Schwadt B (1977). Microanalytical study of isolated perfused rat kidney. *American Journal of Physiology*, 232: 1132.
- Montano-Reyes GL, Ross BD & Krebs DR (1967). Metabolic activities of the isolated perfused rat kidney. *Biochemical Journal*, 103: 852-862.
- Ross BD (1978). The isolated perfused rat kidney. *Clinical Science and Molecular Medicine*, 55: 13-21.
- Bowman RH (1970). Gluconeogenesis in the isolated perfused rat kidney. *Journal of Biological Chemistry*, 245: 1604-1612.
- Fonteles MC, Cohen JJ, Black AJ & Wertheim SJ (1983). Support of renal kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. *American Journal of Physiology*, 244: 235-246.
- Walson M, Davidson DG & Orloff J (1955). The renal clearance of alkali-stable inulin. *Journal of Clinical Investigation*, 34: 1520-1523.
- Pitts RK (1971). Metabolism of amino acids by the perfused rat kidney. *American Journal of Physiology*, 220: 862-867.
- Runnegar MTC & Falconer IR (1982). The *in vivo* and *in vitro* biological effects of the peptide hepatotoxin from blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *South African Journal of Science*, 75: 363-366.
- Theiss WC & Carmichael WW (1986). Physiological effect of a peptide toxin produced by fresh-water cyanobacteria (blue-green algae) *Microcystis aeruginosa* strain 7820. In: Steyn PS & Vleggaar R (Editors), *Mycotoxin and Phycotoxin, Bioactive Molecules*. VI. Elsevier, Amsterdam, 353-364.
- Raberg CMI, Bylund G & Eriksson JE (1991). Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Toxicology*, 20: 131-146.
- Eriksson JE, Meriluoto JAO, Kujari HP & Skulberg OM (1988). A comparison of toxins isolated from the cyanobacteria *Oscillatoria agardhii* and *Microcystis aeruginosa*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 89C: 207-210.
- Meriluoto JAO, Sandstroms A, Eriksson JE, Remaud G, Craig AG & Chattopadhyaya J (1989). Structure and toxicity of a peptide hepatotoxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Toxicol*, 27: 1021-1034.
- Hooser SB, Beasley VR, Lovell RA, Carmichael WW & Haschek WM (1989). Toxicity of microcystin-LR, a cyclic heptapeptide hepatotoxin from *Microcystis aeruginosa* to rat and mice. *Veterinary Pathology*, 26: 246-252.
- Kotak BG, Semalulu S, Fritz DL, Prepas EE, Hruddy SE & Coppock RW (1996). Hepatic and renal pathology of intraperitoneally administered microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol*, 34: 517-525.
- Bhattacharya R, Sugendran K, Dangi RS & Lakshmana Rao PV (1997). Toxicity evaluation of freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. II. Nephrotoxicity in rats. *Biomedical and Environmental Sciences*, 10: 93-101.
- Koeppen BM & Stanton BA (1992). Structure and function of the kidneys and the lower urinary tract. In: Kist K (Editor), *Renal Physiology*. Mosby Year Book, St. Louis, MO, 22-23.

The role of phospholipase A₂ and cyclooxygenase in renal toxicity induced by microcystin-LR

A.C.L. Nobre^a, G.R. Coêlho^a, M.C.M. Coutinho^a, M.M.M. Silva^a, E.V. Angelim^d,
D.B. Menezes^b, M.C. Fonteles^c, H.S.A. Monteiro^{d,*}

^aDepartment of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Rua Cel. Nunes de Melo, 1127, 60430-270 Fortaleza, CE, Brazil

^bDepartment of Pathology and Forensic Medicine, Federal University of Ceará, Rua Monsenhor Furtado, S/N,
60441-750 Fortaleza, CE, Brazil

^cCeara State University, Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, 60740-000 Fortaleza, CE, Brazil

Received 14 February 2000; accepted 12 June 2000

Abstract

We have shown previously that exposure to microcystin-LR (MCLR) causes renal toxic effects in isolated perfused rat kidney. That study was extended further to approach the perspective of pharmacological blockade of renal toxic effects by MCLR through the use of experimental therapeutic agents. An isolated kidney perfusion system was utilized and samples of urine and perfusate were collected at 10 min intervals to determine the levels of inulin, sodium, potassium and osmolality. Dexamethasone (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and indomethacin (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) were administered in the beginning of the perfusion and MCLR was employed in a dose of 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ after an interval control of 30 min to evaluate the perfusion pressure (PP), renal vascular resistance (RVR), glomerular filtration rate (GFR) and urinary flow (UF). Dexamethasone and indomethacin antagonized the toxic effects of MCLR on PP, RVR, GFR and UF. Histologic analysis of dexamethasone and indomethacin treated groups, did not show any vascular or interstitial alterations. MCLR potentially impairs the renal function, probably causing vascular and glomerular lesions and, promoting renal alterations through direct or indirect actions. These data seem to indicate that the renal alterations promoted by MCLR involves also phospholipase A₂ and arachidonic acid-derived mediators. © 2000 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Microcystin-LR; Perfused kidney; Dexamethasone; Indomethacin

There are few papers in the literature that show the effect of microcystin-LR (MCLR) in the renal system. Radbergh et al. (1991) have shown degenerative changes in the tubular epithelial cells, glomeruli and interstitial tissue in kidneys of carps exposed to MCLR, via intraperitoneal. In contrast to what occurs in fish, which presents more severe changes, renal damages are seldom observed in mice and this can be explained by the survival time to lethal dose. Kotak et al. (1996) showed renal lesions in fishes (*Oncorhynchus mykiss*) that consisted of coagulative tubular necrosis and dilatation of Bowman's space. Glomerular capillaries were filled with eosinophilic fibrillary material after nine hours of exposure to MCLR. There has been a mild vacuolization of

the proximal tubular epithelium with slight tubular dilatation (Hooser et al., 1989) and cellular damage were also found in glomeruli and tubules (Radbergh et al., 1991). The utilization of the perfusion system of isolated kidney permits the study of the direct effect of toxin without systemic interference. Our laboratory showed that MCLR is capable of changing the kidney functional parameters (perfusion pressure (PP), renal vascular resistance (RVR), glomerular filtration rate (GFR) and urinary flow (UF)) in isolated perfused rat kidney (Nobre et al., 1999). The scope of this work was to approach the perspective of pharmacological blockade through the use of experimental therapeutic agents.

MCLR (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA; Molecular mass 995.2) was used in the current experiments obtained from *Microcystis aeruginosa*. Adult Wistar rats of

* Corresponding author. Fax: +55-85-2815212.

E-mail address: serrazul@truenet-ce.com.br (H.S.A. Monteiro).

Table 1

Effects of dexamethasone and indomethacin in the renal toxicity caused by MCLR in perfused rat kidney (Results are expressed as means \pm SEM of Control kidneys ($n = 7$) versus MCLR treated kidneys ($n = 7$) and treated as: MCLR + microcystin-LR ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$); Dexa = dexamethasone ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$); Indo = indomethacin ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$). PP = perfusion pressure; RVR = renal vascular resistance; UF = urinary flow; GFR = glomerular filtration rate. The first 30 min represent the internal control for each group)

Time(min)/Group	PP (mmHg)	RVR (mmHg ml ⁻¹ g ⁻¹ min ⁻¹)	UF (ml g ⁻¹ min ⁻¹)	GFR (ml g ⁻¹ min ⁻¹)
30 min				
Control	111.8 \pm 1.58	4.80 \pm 0.17	0.15 \pm 0.01	0.89 \pm 0.01
Basal MCLR	113.8 \pm 1.58	5.13 \pm 0.06	0.19 \pm 0.01	1.07 \pm 0.16
Dexa(20 $\mu\text{g ml}^{-1}$) + MCLR	117.1 \pm 1.04	4.59 \pm 0.20	0.16 \pm 0.01	0.65 \pm 0.03
Indo(10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) + MCLR	108.4 \pm 1.01	4.95 \pm 0.04	0.15 \pm 0.01	0.67 \pm 0.06
60 min				
Control	114.0 \pm 2.59	5.17 \pm 0.09	0.16 \pm 0.01	0.83 \pm 0.01
MCLR (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	138.0 \pm 2.96 ^a	6.25 \pm 0.39	0.27 \pm 0.01 ^a	1.75 \pm 0.09 ^a
Dexa(20 $\mu\text{g ml}^{-1}$) + MCLR	109.6 \pm 3.33 ^b	4.10 \pm 0.13 ^b	0.16 \pm 0.01 ^b	0.66 \pm 0.05 ^b
Indo(10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) + MCLR	97.3 \pm 2.48 ^b	4.47 \pm 0.11 ^b	0.14 \pm 0.01 ^b	0.54 \pm 0.09 ^b
90 min				
Control	111.9 \pm 1.30	5.80 \pm 0.48	0.16 \pm 0.01	0.85 \pm 0.01
MCLR (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	152.9 \pm 0.96 ^a	6.90 \pm 0.06	0.31 \pm 0.01 ^a	1.93 \pm 0.06
Dexa(20 $\mu\text{g ml}^{-1}$) + MCLR	84.1 \pm 5.77 ^{a,b}	3.14 \pm 0.21 ^{a,b}	0.16 \pm 0.01 ^b	0.64 \pm 0.05 ^b
Indo(10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) + MCLR	90.2 \pm 0.96 ^b	4.17 \pm 0.03 ^{a,b}	0.10 \pm 0.01 ^{a,b}	0.35 \pm 0.01 ^{a,b}
120 min				
Control	111.6 \pm 1.74	6.22 \pm 0.10	0.16 \pm 0.01	0.83 \pm 0.02
MCLR (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	153.1 \pm 1.55 ^a	6.87 \pm 0.07 ^a	0.30 \pm 0.01 ^a	1.78 \pm 0.06 ^a
Dexa(20 $\mu\text{g ml}^{-1}$) + MCLR	68.8 \pm 0.88 ^{a,b}	2.53 \pm 0.03 ^{a,b}	0.13 \pm 0.01 ^b	0.38 \pm 0.05 ^{a,b}
Indo(10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) + MCLR	86.6 \pm 0.46 ^b	4.08 \pm 0.01 ^{a,b}	0.10 \pm 0.01 ^b	0.39 \pm 0.01 ^{a,b}

^a Significance in relation to control ($p < 0.05$).

^b Significance in relation to treated group with MCLR ($p < 0.05$), compared by ANOVA (Bonferroni test).

Both sexes weighing 250–280 g were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg kg⁻¹ body weight ip). Before the experiment, the animals were fasted for 24 h with access to water *ad libitum*. The right renal artery was cannulated as described by Bahlmann et al. (1967), Nishiitsutsji-Uwo et al. (1967) and Ross (1978). The perfusate was a modified Krebs–Henseleit solution with the following composition (mmol l⁻¹): Na⁺ 147, K⁺ 5, Ca⁺⁺ 2.5, Mg⁺⁺ 2, Cl⁻ 110, HCO₃⁻ 2.5, SO₄²⁻ 1, and PO₄³⁻ 1, 0.15 g glucose, 0.075 g casein and 0.075 g inulin. Six grams of bovine serum albumin (BSA fraction V, Sigma) were added to the solution after a previous dialysis for 48 h at 4°C in 1.5 l of Krebs. The pH is then adjusted to 7.4. Total perfusate used per experiment was 100 ml.

The perfused rat kidney model followed the method of Bowman (1970) as modified by Fonteles et al. (1983, 1998). The system was calibrated for flow and resistance before each experiment. The rate of perfusion flow was maintained at 25–35 ml min⁻¹ per kidney. The first 30 min of perfusion were considered to be an internal control. Each experiment was divided into four periods of 30 min; these periods were further subdivided into equal intervals of 10 min. During each 10 min period, samples of perfusate and urine were collected for determinations of sodium, potassium, inulin and osmolality.

Dexamethasone ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) and indomethacin ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) studies were initiated before an internal control of 30 min, and MCLR ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) after an internal control, and observations were made during the next 90 min. Na⁺ and K⁺ were determined by flame photometry (Flame Photometer IL Model 445), and inulin was analyzed according to Wilson et al. (1955) as modified by Fonteles et al. (1998). Osmolality of the samples was measured in an Advanced Instruments osmometer (Needham Heights, MA). After the renal perfusion a histologic evaluation of kidneys was made by optical microscopy. Dexamethasone was acquired from Merck and CO., Inc (EUA) and indomethacin from Sigma (St. Louis, MO).

The data were presented as mean \pm SEM. At least seven different animals were used for each data point. Data were analyzed by ANOVA (Bonferroni test). For statistical purposes, $p < 0.05$ was considered significant.

Previous results showed that infusion of $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ of MCLR after 30 min of internal control caused alterations of renal functional parameters (Nobre et al., 1999).

Dexamethasone ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) showed a capacity of reverting the renal changes promoted by MCLR when compared to the control group and internal control (Table 1). The drug was able to antagonize in a significant manner ($p < 0.05$) the effect on the PP, RVR, UF and GFR

at 60, 90 and 120 min. Indomethacin at the dose of $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ was able to protect the kidneys from the toxic effects of MCLR as compared with the control group and the internal control group (Table 1). A significant reversion of the effects of MCLR on the PP, RVR, UF and GFR at 60, 90 and 120 min.

Nobre et al. (1999) showed an intense amount of proteinaceous material in the urinary spaces following perfusion with MCLR. Proteinaceous material was not seen in the tubules or urinary space of kidneys pretreated with dexamethasone and indomethacin, nor were there any abnormalities in the renal vessels and interstitium, suggesting a protective effect of these substances.

Naseem et al. (1990) evaluated the effects of glucocorticoids in the release of arachidonic acid and its metabolites induced by MCLR in rat hepatocytes. They showed that fluorocinolone, dexamethasone and hydrocortisone suppress the release of arachidonic acid, prostacyclin ($6\text{-ketofF}_{1\alpha}$) and TXB_2 . It is known that microcystins are capable of inducing the cyclooxygenase via the metabolism of arachidonic acid thus being prone undergoing the action of glucocorticoids.

In our experiments, MCLR induces an increase in PP which was inhibited by indomethacin. The results suggest that this increase in pressure can be related to alterations in the homeostasis of cell calcium. If MCLR induces change in the calcium metabolism of smooth muscle cell, this change in calcium input can be contributing to an arteriolar vasoconstriction.

Calcium plays an important role in the activation of phospholipase A_2 . If MCLR influences the activity of calcium, it is possible that it also intensifies the activation of this enzyme. On the other hand MCLR is an inhibitor of protein phosphatases what favors hyperphosphorylation, that is an increased response to protein kinases. Protein kinase C which is responsible for the activation of phospholipase A_2 (Braquet, 1987) could be increased by the action of MCLR. The arachidonic acid inhibits L-type calcium current, via a mechanism which involves, in part, stimulation of protein phosphatase activity. On the other hand, dexamethasone and indomethacin inhibit arachidonic acid metabolism, what favors an inhibition of activity in these protein (Petit-Jacques and Hartzell, 1996). With the use of indomethacin and dexamethasone we raise the possibility of the participation of prostaglandin and of calcium, and phospholipase A_2 , respectively, in the alterations triggered by MCLR.

According to the literature MCLR affects two types of cells: hepatocytes and macrophages. In the hepatocytes the toxin acts as an inhibitor of protein phosphatases and an activator of phospholipase A_2 and cyclooxygenase. In the macrophages the toxin induces $\text{TNF}\alpha$ and IL-1 (Rocha et al., 2000). Cytokines induce the production of PAF, and the activation of prostaglandin which seem to be involved in the shock caused by MCLR. Microcystin specifically and potently inhibits protein phosphatase 1 and 2A, M110 and SHP2 that are expressed in kidney. (Haystead et al., 1995; Kuroda et al.,

1998). In our experiments we have observed that MCLR seems to induce the activation of phospholipase A_2 and cyclooxygenase as its effects were blocked by dexamethasone and indomethacin; this mechanism is similar to the hepatic effect. It is supposed that this renal change occurs probably by damaging both vascular and glomerular sites.

Acknowledgements

Acknowledgments are made to Maria Sílvia Helena Freire Franga and Domingos Barreto Oliveira for technical assistance. This research was supported by CNPq and CAPES (Brazil).

References

- Bahlmann, J., Giebisch, G., Oehwadt, B., Schoeppe, W., 1967. Micropuncture study of isolated perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.* 212, 77–82.
- Bowman, R.H., 1970. Gluconeogenesis in the isolated perfused rat kidney. *J. Biol. Chem.* 245, 1604–1612.
- Braquet, P., 1987. Perspectives in platelet activation factor research. *Pharmacol. Ther.* 39 (2), 92–145.
- Fonteles, M.C., Cohen, J.L., Black, A.J., Wertheim, S.J., 1983. Support of renal kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. *Am. J. Physiol.* 244, 235–246.
- Fonteles, M.C., Greenberg, R.N., Monteiro, H.S.A., Currie, M.G., Forte, L.R., 1998. Natriuretic and kaliuretic activities of guanidyl and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.* 275, F191–F197 (Renal Physiol 44).
- Haystead, C.M., Gailly, P., Somlyo, A.V., Haystead, T.A., 1995. Molecular cloning and functional expression of a recombinant 72.5 kDa fragment of the 110 kDa regulatory subunit of smooth muscle protein phosphatase 1M. *FEBS Lett.* 377 (2), 123–127.
- Hooser, S.B., Beasley, V.R., Lovell, R.A., Carmichael, W.W., Haschek, W.M., 1989. Toxicity of microcystin-LR, a cyclic heptapeptide hepatotoxin from *Microcystis aeruginosa*, to rat and mice. *Vet. Pathol.* 26, 246–252.
- Kotak, B.G., Semalulu, S., Fritz, D.L., Prepas, E.J., Hindey, S.E., Coppock, R.W., 1996. Hepatic and renal pathology of intraperitoneally administered microcystin-LR in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Toxicol* 34, 517–525.
- Kuroda, N., Hayashi, Y., Matozaki, T., Hanioka, K., Gotoh, A., Wang, W., Uchida, H., Hashimoto, K., Iwai, Y., Kawasaka, K., Imai, Y., Kasuga, M., Itoh, H., 1998. Differential expression of SHP2, a protein-tyrosine phosphatase with SRC homology 2 domains, in various types of renal tumour. *Virchows Arch.* 333 (4), 331–339.
- Naseem, S.M., Hines, H.B., Creasia, D., 1990. A inhibition of microcystin-induced release of cyclooxygenase products from rat hepatocytes by anti-inflammatory steroids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 195, 345.
- Nishitsutji-Uwo, G.M., Ross, B.D., Krebs, H.A., 1967. Metabolic activities of the isolated perfused rat kidney. *Biochem. J.* 103, 852–863.
- Nobre, A.C.L., Jorge, M.C.M., Menezes, D.B., Fonteles, M.C., Monteiro, H.S.A., 1999. Effects of microcystin-LR in isolated perfused rat kidney. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 32, 985–988.

- Petit-Jacques, J., Hartzell, H.C., 1996. Effect of arachidonic acid on the L-type calcium current in frog cardiac myocytes. *J. Physiol. (London)* 493, 67–81 (Pt 1).
- Radbergh, C.M.L., Bylund, G., Eriksson, J.E., 1991. Histological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Toxicol.* 20, 131–146.
- Rocha, M.F.G., Sidrim, J.J.C., Soares, A.M., Jimenez, G.C., Guerrant, R.L., Ribeiro, R.A., Lima, A.A.M., 2006. Supernatants from macrophages stimulated with microcystin-LR induce electrogenic intestinal response in rabbit ileum. *Pharmacology & Toxicology*, 85 (in press).
- Ross, B.D., 1978. The isolated perfused rat kidney. *Clinical Sci. Mol. Med.* 55, 13–21.
- Walson, M., Davidson, D.G., Orloff, J., 1955. The renal clearance of alkali-stable inulin. *J. Clin. Invest.* 34, 1520–1523.

Renal effects of supernatant from rat peritoneal macrophages activated by microcystin-LR: role protein mediators

A.C.L. Nobre^a, A.M.C. Martins^a, A. Havt^a, C. Benevides^a, A.A.M. Lima^a,
M.C. Fonteles^b, H.S.A. Monteiro^{a,*}

^aDepartment of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Institute of Biomedicine and Clinical Research Unit, Federal University of Ceara, Rua Cel Nunes de Melo, 1127, Fortaleza, CE 60430-270, Brazil

^bCeara State University, Av. Paranjana, 1700, Campus do Itapevi, Fortaleza, CE 60740-000, Brazil

Received 25 June 2002; accepted 16 October 2002

Abstract

We have demonstrated previously that microcystin-LR promoted some renal alterations using the isolated perfused rat kidney preparation. However, these effects were not proved to be direct or indirect. The aim of the current work is to examine the renal effects promoted by supernatants from rat macrophages stimulated with microcystin-LR and the role of inflammatory mediators. Peritoneal macrophages were collected previously and were incubated for 1 h in fresh medium (control) and in medium containing microcystin-LR. Dexamethasone, quinacrine, thalidomide and cycloheximide were administered 30 min before microcystin-LR. Supernatants of macrophages stimulated with or without pharmacological inhibitors were added on the perfused rat kidney model. The infusion of macrophages supernatants stimulated by microcystin-LR caused significant increases in renal vascular resistance (C: 4.93 ± 0.33 vs T: 5.15 ± 0.21), glomerular filtration rate (C: 0.559 ± 0.008 vs T: 0.978 ± 0.15) and urinary flow (C: 0.16 ± 0.01 vs T: 0.23 ± 0.03). Cycloheximide, quinacrine and dexamethasone blocked these effects and thalidomide blocked renal vascular resistance. Macrophages stimulated by microcystin-LR release mediators capable of promoting nephrotoxicity in isolated perfused rat kidney. Phospholipase A₂, TNF- α and other protein mediators appear to be involved on its renal toxic mechanism.

© 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Microcystin-LR; Macrophages; Kidney

1. Introduction

Microcystins are cyclic heptapeptides toxins, produced by freshwater cyanobacteria like *Microcystis*. They show potent hepatotoxicity and tumor-promoting activity through inhibition of protein phosphatases 1 and 2A (Tsuji et al., 2001). Microcystin increased the extend of phosphorylation of 19 and 110 Da phosphoproteins, ecto-phosphoprotein phosphatase in endothelial cells (Al-Nedawi et al., 1999). The most toxic of these toxins is microcystin-LR (MCLR),

which contains the amino acids leucine and arginine in the variable positions and a molecular weight of 995.2 Da (Carmichael, 1994).

We have demonstrated previously that microcystin-LR could affect renal physiology by altering vascular, glomerular and urinary parameters, indicating that MCLR could act directly on the kidney (Nobre et al., 1999). We also have observed that phospholipase A₂ (PLA₂) and arachidonic acid-derived mediators were involved in this process since dexamethasone and indometacin were able to block the renal effects promoted by MCLR (Nobre et al., 2001). However, we could not prove if its renal effects were direct or indirect.

Otherwise, Microcystin-LR induces the release of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α

* Corresponding author. Fax: +55-85-288-5212.

E-mail addresses: serrazul@truenet-ce.com.br (H.S.A. Monteiro), arlandia@zipmail.com.br (H.S.A. Monteiro).

(TNF- α) by peritoneal macrophages *in vitro*. The supernatants from these macrophages induce electrogenic secretion in rabbit ileal mucosa. These effects could possibly explain the intestinal dysfunction that happened after microcystin intoxication in animal and man (Roeha et al., 2000).

The aim of the present investigation was to examine the renal effects caused by supernatants from rat macrophages stimulated with microcystin-LR and investigate which inflammatory mediators are involved in this process through the use of experimental therapeutic agents.

2. Material and methods

Macrophage isolation. Adult Wistar rats from both sexes weighing 180–200 g, were fasted 24 h before experimentation with free access to water. Thioglycolate (3% w/v, 10 ml) was intraperitoneally administered and after 4 days the animals were killed using ethyl ether anesthesia. Peritoneal macrophages were then collected with RPMI (Roswell Park Memorial Institute; cell culture medium) and placed in plastic tissue culture dishes as previously described (Ribeiro et al., 1991). After incubation at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere for 1.5 h, the nonadherent cells were removed by washing their dishes three times with RPMI medium. The cell types were determined by cellular morphology by optical microscopy. The macrophages were incubated at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere for 1 h in fresh medium (control) and in a medium containing microcystin-LR (1.0 μ g/ml), Dexamethasone (10 μ M), quinaquine (10 μ M), thalidomide (15 μ M) and cicloheximide (10 μ M) were incubated for 30 min before the administration of microcystin-LR (1.0 μ g/ml). The supernatants were then discarded and, after additional washing as described earlier, the cells were incubated for a further 2 h with 1.0 ml of RPMI medium without toxin or drugs. Cell-free supernatants from macrophages were obtained by centrifugation (300g \times 5 min) and adjusted for 1.1×10^7 cells/ml using Neubauer's chamber. The viability of the macrophages was determined by tripan blue exclusion as described elsewhere (Marshall et al., 1996), and the viability of the macrophages used ranged from 85 to 95% in the different experimental protocols.

Isolated perfused rat kidney. The perfused rat kidney model followed the method of Fonteles et al., (1983). Adult Wistar rats from both sexes, weighing 250–280 g, were anesthetized with pentobarbital sodium (50 mg kg⁻¹ body weight ip). Before the experiment, the animals were fasted for 24 h with access to water *ad libitum*. The right renal artery was cannulated as described by Balhmann et al. (1967), Nishiitsulji-Uwo et al. (1967) and Ross (1978). The perfusate was a modified Krebs-Henseleit solution with the following composition in mmol/l: Na⁺

147, K⁺ 5, Ca²⁺ 2.5, Mg²⁺ 2, Cl⁻ 110, HCO₃⁻ 2.5, SO₄²⁻ 1, and PO₄³⁻ 1, 0.15 g glucose, 0.075 g urea and 0.075 g inulin. Six grams of bovine serum albumin (BSA fraction V, Sigma) were added to the solution after a previous dialysis for 48 h at 4 °C in 1.5 l of Krebs. The pH was then adjusted to 7.4. Total perfusate used per experiment was 100 ml. The system was calibrated for flow and resistance before each experiment. The rate of perfusion flow was maintained of 25–35 ml min⁻¹ per kidney. The first 30 min of perfusion were considered as an internal control. Each experiment was divided into four periods of 30 min named 30, 60, 90 and 120 min. During each 10 min period, samples of perfusate and urine were collected for determinations of sodium, potassium, inulin and osmolality.

Supernatants of macrophages stimulated by microcystin-LR, in absence or presence of pharmacological inhibitors, were added after 30 min of the beginning of each perfusion ($n = 6$), and observations were made during the next 90 min. Sodium and potassium were determined by flame photometry (Flame Photometer Model 445), and inulin was analyzed according to Fonteles et al. (1998). Osmolality was measured a vapor pressure in an osmometer (WESCOR 5100c).

Drugs. Purified microcystin-LR (MCLR), RPMI medium, trypan blue, cicloheximide (CHX) and quinaquine (QUINAC) were obtained from the Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Thioglycolate was obtained from Difco Laboratories (Detroit, MI, USA). Dexamethasone (DEXA) was acquired from Merck Sharp & Dohme (São Paulo, SP, Brazil) and thalidomide (THALID) was obtained from ICN Biomedical Inc., Aurora, Ohio.

Statistical analysis. The statistical significance of the differences between various groups was assessed by analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni test. The results were presented as the mean \pm standard error mean. The p value (≤ 0.05) was considered to indicate statistical significance.

3. Results

3.1. Rat kidneys perfused with supernatants of macrophages without microcystin-LR in modified Krebs-Henseleit solution

Selected renal functional parameters during stable experimental conditions were evaluated in the rat kidney perfused with the supernatant of macrophages (SUP.M ϕ S) in the absence of microcystin-LR stimulation (RPMI). The data are presented as mean \pm SEM for four periods of 30 min named 30, 60, 90 and 120. For each experiment, the first 30 min of perfusion were considered as an internal control. We did not observe any renal alterations in the group perfused with only RPMI.

3.2. Renal effects of supernatant of macrophages stimulated by microcystin-LR

The infusion of 1 ml of the supernatant of macrophages stimulated by microcystin-LR (1 µg/ml) caused significant increases in renal vascular resistance (RVR) (Table 1) and glomerular filtration rate (GFR), with a maximal effect at 60 min (Fig. 1). The urinary flow (UF) was also significantly increased by the infusion of the supernatant activated by the toxin, with a maximal response at 120 min (Fig. 2). The percentage of sodium tubular transport (%TNa⁺) was reduced in the period of 120 min, but the percentage of potassium tubular transport (%TK⁺) was not altered (Table 1).

3.3. Effects of pharmacological inhibitors on renal functional parameters

Cycloheximide (10 µM), quinacrine (10 µM) and dexamethasone (10 µM) 30 min before and during

the stimulation of macrophages with microcystin-LR (1 µg/ml) significantly blocked the increases in RVR (Table 1), GFR and UF (Figs. 1 and 2) promoted by MCLR. Cycloheximide also antagonized the effects in %TNa⁺ (Table 1). On the other hand, thalidomide (15 µM) blocked the microcystin-LR renal effects in RVR (Table 1), however, this compound did not affect other parameters.

4. Discussion

Some reports demonstrated that microcystin-LR could stimulate the release of arachidonic acid as well as cytokines, especially TNF-α and IL-1β (Nakano et al., 1991; Fujiki and Suganuma, 1994). Rocha et al. (2000) showed that supernatants from macrophages, stimulated with 1 µg/ml of microcystin-LR, induced electrogenic response in rabbit ileum. Thus, these data demonstrate

Table 1
Effects of pharmacological inhibitors in renal perfusion with supernatant of macrophages stimulated with MCLR on functional parameters

Time (min)	Treatment	RVR (mmHg/ml g ⁻¹ min ⁻¹)	%TNa ⁺	%TK ⁺
30	Control (RPMI)	4.93 ± 0.37	81.94 ± 1.28	72.27 ± 1.12
	Control (MCLR)	4.87 ± 0.21	80.64 ± 0.79	74.84 ± 1.24
	Control (CHX + MCLR)	4.60 ± 0.18	82.47 ± 1.05	73.57 ± 2.81
	Control (Quinac + MCLR)	4.88 ± 0.10	80.26 ± 1.35	75.33 ± 1.65
	Control (Dexa + MCLR)	4.88 ± 0.12	82.49 ± 0.84	79.02 ± 1.17
	Control (Thalid + MCLR)	4.70 ± 0.07	81.09 ± 2.08	71.77 ± 2.92
60	RPMI (control)	4.93 ± 0.33	80.11 ± 0.92	72.65 ± 1.67
	MCLR	5.15 ± 0.21 ^a	81.18 ± 1.35	76.49 ± 1.70
	CHX + MCLR	4.76 ± 0.24 ^b	80.85 ± 1.50	69.13 ± 1.50
	Quinac + MCLR	4.80 ± 0.13 ^b	81.16 ± 1.67	76.98 ± 2.19
	Dexa + MCLR	4.81 ± 0.13 ^{a,b}	79.55 ± 2.12	74.64 ± 2.79
	Thalid + MCLR	4.99 ± 0.19 ^b	72.48 ± 2.50	61.73 ± 3.03
90	RPMI (control)	4.98 ± 0.35	75.88 ± 1.40	72.52 ± 1.72
	MCLR	4.99 ± 0.17	75.81 ± 2.24	71.03 ± 2.54
	CHX + MCLR	4.95 ± 0.27	81.57 ± 0.76	67.65 ± 1.61
	Quinac + MCLR	4.57 ± 0.24 ^{a,b}	82.62 ± 2.48	79.22 ± 2.77
	Dexa + MCLR	4.77 ± 0.21 ^{a,b}	76.61 ± 1.88	70.48 ± 2.18
	Thalid + MCLR	4.94 ± 0.16	71.07 ± 3.38	60.56 ± 5.95
120	RPMI (control)	4.66 ± 0.24	79.16 ± 0.80	73.56 ± 1.26
	MCLR	5.03 ± 0.27	75.46 ± 1.93 ^a	71.42 ± 2.14
	CHX + MCLR	5.04 ± 0.16	80.91 ± 1.05 ^b	68.89 ± 1.96
	Quinac + MCLR	4.88 ± 0.28	77.36 ± 1.62	74.06 ± 1.46
	Dexa + MCLR	4.94 ± 0.25	72.14 ± 2.69	65.38 ± 3.20
	Thalid + MCLR	5.72 ± 0.27	60.43 ± 3.91	53.88 ± 6.28

Results are expressed as means ± SEM. Supernatant of macrophages (SUP.MφS) with microcystin-LR group was compared with the other experimental groups (n = 6). The (SUP.MφS) stimulated by MCLR (1 µg/ml; ANOVA (Bonferroni test; p < 0.05) and the pharmacological inhibitors were infused after 30 min of the perfusion. The first 30 min of perfusion were considered as an internal control. MCLR, microcystin-LR; CHX, cycloheximide (10 µM); Quinac, quinacrine (10 µM); Dexa, dexamethasone (10 µM); Thalid, thalidomide (15 µM). RVR, renal vascular resistance; %TNa⁺, percent of sodium tubular transport; %TK⁺, percent of potassium tubular transport.

^a Significance in relation to control (p < 0.05).

^b Significance in relation to treated group with SUP.MφS stimulates with MCLR (p < 0.05).

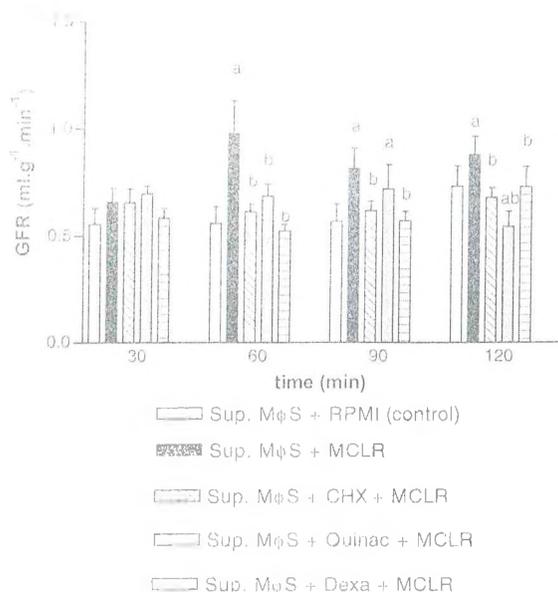


Fig. 1. Effects of supernatants of macrophages (SUP.MφS) stimulated with microcystin-LR (MCLR) in perfused rat kidney. Results are expressed as means \pm SEM. Supernatant of macrophages (SUP.MφS) with microcystin-LR group was compared with the other experimental groups ($n = 6$). The (SUP.MφS) stimulated by MCLR (1 μ g/ml; ANOVA (Bonferroni test); $p \leq 0.05$) and the pharmacological inhibitors were infused after 30 min of the perfusion. The first 30 min of perfusion were considered as an internal control. MCLR, microcystin-LR; CHX, cycloheximide (10 μ M); Quinac, quinaerine (10 μ M); Dexa, dexamethasone (10 μ M); GFR, glomerular filtration rate. a, significance in relation to control ($p \leq 0.05$); b, significance in relation to treated group with SUP.MφS stimulates with MCLR ($p < 0.05$).

the involvement of mediators from macrophages in this intestinal activity.

We demonstrated recently that microcystin-LR altered renal physiology (Nobre et al., 1999) and that PLA₂ and cyclooxygenase were involved in this process (Nobre et al., 2001). However, we could not prove if these effects were promoted directly or if they were influenced by the release of inflammatory mediators. Other reports have suggested that the toxicity of microcystin-LR may depend upon the stimulation of the immune system (Hermansky et al., 1990, 1991).

In order to evaluate if macrophages are involved in the renal effects promoted by microcystin-LR, we have tested the ability of the supernatants of macrophages (SUP.MφS) stimulated by this toxin on the renal parameters of RVR, GFR, UF, %TNa⁺ and %TK⁺. Our data showed that SUP.MφS activated by MCLR caused an increase in the RVR, GFR, UF and reduced the %TNa⁺. However, the %TK⁺ was not altered. Those results suggested that macrophages were involved indirectly in the renal effects promoted by MCLR.

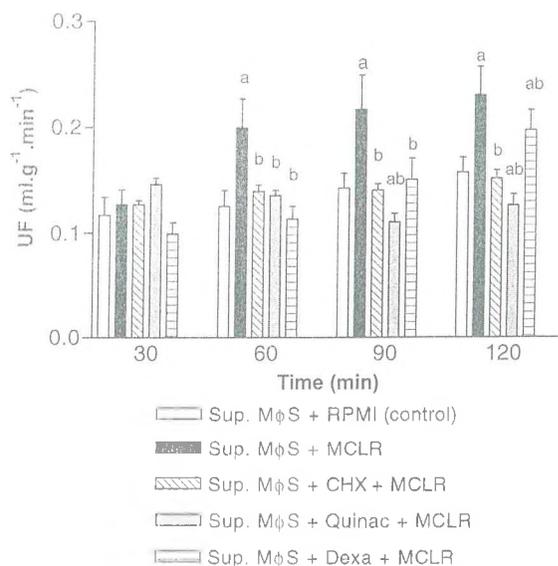


Fig. 2. Effects of supernatants of macrophages (SUP.MφS) stimulated with microcystin-LR (MCLR) in perfused rat kidney. Results are expressed as means \pm SEM. Supernatant of macrophages (SUP.MφS) with microcystin-LR group was compared with the other experimental groups ($n = 6$). The (SUP.MφS) stimulated by MCLR (1 μ g/ml; ANOVA (Bonferroni test); $p < 0.05$) and the pharmacological inhibitors were infused after 30 min of the perfusion. The first 30 min of perfusion were considered as an internal control. MCLR, microcystin-LR; CHX, cycloheximide (10 μ M); Quinac, quinaerine (10 μ M); Dexa, dexamethasone (10 μ M); UF, urinary flow. a, significance in relation to control ($p < 0.05$); b, significance in relation to treated group with SUP.MφS stimulates with MCLR ($p < 0.05$).

Macrophages are important immune cells, which act as alarm cells signaling the presence of foreign bodies through the synthesis and the release of inflammatory mediators, such as arachidonic acid metabolites and cytokines (Rocha et al., 2000).

To investigate which mediators were responsible for these renal effects we used cycloheximide, an inhibitor of inflammatory mediator synthesis (Jiao et al., 1991), quinaerine, PLA₂ inhibitor (Yingst et al., 2000), dexamethasone, a classic inhibitor of inflammatory mediator synthesis (Barnes and Adcock, 1993) and thalidomide (TNF- α synthesis inhibitor).

The ability of CHX, DEXA and QUINAC to revert the renal effects presented in this work suggested the participation of PLA₂ and other protein mediators.

Thalidomide blocked only the vascular effects promoted by SUP.MφS activated by MCLR. These results suggest that TNF- α apparently is not the main responsible mediator of these renal effects. A previous report described that TNF- α could stimulate macrophages in an autocrine manner (Rocha et al., 1998). TNF- α , now known to be a mediator of

cancer development, plays an important role in tumor promotion and progression in humans (Fujiki and Suganuma, 1999).

In conclusion macrophages stimulated by microcystin-LR release mediators capable to promote nephotoxicity in the isolated perfused rat kidney method. In addition, phospholipase A₂, TNF- α and other protein mediators appear to be involved in its renal toxic mechanism

Acknowledgements

Acknowledgments are made to Domingos Barreto and Maria Sílvia Helena Freire França for their technical assistance. This study was supported by CNPq (Brazil).

References

- Al-Nedawi, K.N., Pawlowska, Z., Cierniewski, C.S., 1999. Interferon gamma bound to endothelial cells in phosphorylated by ecto-protein kinases. *Acta Biochim. Pol.* 46 (3), 693–702.
- Balhlmann, J., Giebisch, G., Ochwadt, B., 1967. Micropuncture study of isolated perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.* 212, 77–82.
- Barnes, P.J., Adcock, I., 1993. Antiinflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol. Sci.* 14, 436–441.
- Carmichael, W.W., 1994. The toxins of cyanobacteria. *Sci. Amer.* 270, 78–86.
- Fonteles, M.C., Cohen, J.J., Black, A., Wertheim, S.J., 1983. Support of renal kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. *Am. J. Physiol.* 244, 235–246.
- Fonteles, M.C., Greenberg, R.N., Monteiro, H.S.A., Currie, M.G., Forte, L.R., 1998. Natriuretic and Kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.* 44, 191–197.
- Fujiki, H., Suganuma, M., 1994. Tumor necrosis factor- α , a new tumor promoter, engendered by biochemical studies of okadaic acid. *J. Biochem.* 115, 1–5.
- Fujiki, H., Suganuma, M., 1999. Unique features of the okadaic acid activity class of tumor promoters. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 125 (3–4), 150–155.
- Hermansky, S.T., Casey, P.J., Stohs, S.J., 1990. Cyclosporin-A, a chemoprotectant against microcystin-LR toxicity. *Toxicol. Lett.* 54, 279–285.
- Hermansky, S.T., Stohs, S.J., Eldeen, Z.M., Roche, V.J., Meresh, K.A., 1991. Evaluation of potential chemoprotectants against microcystin-LR hepatotoxicity in mice. *J. Appl. Toxicol.* 11, 65–73.
- Jiao, J., Echevarria, C., Vidal, J., Chollet, R., 1991. Protein turnover as a component in the light/dark regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase protein-serine kinase activity in C3 plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88 (7), 2712–2715.
- Marshall, J.S., Leal Berumen, I., Nielsen, I., Glibetic, M., Jordana, M., 1996. Interleukin (IL)-10 inhibits long-term IL-6 production but not perforated mediator release from rat peritoneal mast cells. *J. Clin. Investig.* 97, 1122–1128.
- Nakano, Y., Shirai, M., Mori, N., Nakano, M., 1991. Neutralization of microcystin-LR shock in mice by tumor necrosis factor alpha anti-serum. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 327–330.
- Nishiitsujii-Uwa, G.M., Ross, B.D., Krebs, H.A., 1967. Metabolic activities of the isolated perfused rat kidney. *Biochem. J.* 103, 852–862.
- Nobre, A.C.L., Jorge, M.C.M., Menezes, D.B., Fonteles, M.C., Monteiro, H.S.A., 1999. Effects of microcystin-LR in isolated perfused rat kidney. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32, 985–988.
- Nobre, A.C.L., Coelho, G.R., Coutinho, M.C.M., Silva, M.M.M., Angelim, E.V., Menezes, D.B., Fonteles, M.C., Monteiro, H.S.A., 2001. The role of phospholipase A2 and cyclooxygenase in renal toxicity induced by microcystin-LR. *Toxicol.* 49, 721–724.
- Ribeiro, R.A., Flores, C.A., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 1991. IL-3 causes in vivo neutrophil migration by a cell dependent mechanism. *Immunology* 73, 472–477.
- Rocha, M.F.G., Soares, A.M., Flores, C.A., Steiner, T.S., Lynch, D.M., Guerrant, R.L., Ribeiro, R.A., Lima, A.A.M., 1999. Intestinal secretory factor release by macrophages stimulated with *Clostridium difficile* toxin A: role of interleukin-1 β . *Immunol.* 66, 4910–4916.
- Rocha, M.F.G., Sidrim, J.J.C., Soares, A.M., Bionez, G.C., Guerrant, R.L., Ribeiro, R.A., Lima, A.A.M., 2000. Superantigens from macrophages stimulated with microcystin-LR induce electrogenic intestinal response in rabbit ileum. *Pharmacol. Toxicol.* 87, 46–51.
- Ross, B.D., 1978. The isolated perfused rat kidney. *Cryobiology* 15, 431–440.
- Tsuji, K., Mastii, H., Uemura, H., Mori, Y., Harada, K., 2001. Analysis of microcystins in sediments using MMFB method. *Toxicol.* 39, 687–692.
- Yingst, D.R., Davis, J., Schrelinger, R., 2000. Inhibitors of tyrosine phosphatases block angiotensin II inhibition of Na⁺/K⁺ pump. *Eur. J. Pharmacol.* 406 (1), 49–52.