

CAMILA RANZATTO DOGO

**CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS
DA FRAÇÃO ATIVA DA CEPA SPC 920
Geitlerinema amphibium (CYANOPHYCEAE,
OSCILLATORIALES) NA MICROCIRCULAÇÃO
E EM FIBRAS MUSCULARES: ANÁLISE POR
MICROSCOPIA INTRAVITAL**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2010

CAMILA RANZATTO DOGO

**CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS
DA FRAÇÃO ATIVA DA CEPA SPC 920
Geitlerinema amphibium (CYANOPHYCEAE,
OSCILLATORIALES) NA MICROCIRCULAÇÃO
E EM FIBRAS MUSCULARES: ANÁLISE POR
MICROSCOPIA INTRAVITAL**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. LUCIANA RETZ DE CARVALHO

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Dogo, Camila Ranzatto

D654c Caracterização dos efeitos tóxicos da fração ativa da cepa CCIBt 920
Geitlerinema amphibium (Cyanophyceae, Oscillatoriales) na microcirculação e em
fibras musculares: análise por microscopia intravital / Camila Ranzatto Dogo -- São
Paulo, 2010.
117 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio
Ambiente, 2010
Bibliografia.

1. Algas. 2. Cianobactéria. 3. Cianotoxinas. I. Título

CDU: 582.26

À minha orientadora Dra. Luciana Retz de Carvalho, por todos os ensinamentos, por todo apoio e por ser um exemplo em minha vida, tanto profissional quanto pessoal.

Aos meus pais Luiz e Terezinha

Agradecimentos

Agradeço à Dra. Mônica Lopes-Ferreira, do Laboratório de Imunofarmacologia do Centro Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan, sem a qual este trabalho não teria sido realizado. Por todos os ensinamentos, e por ceder espaço, equipamentos e material necessário para realização dos ensaios por microscopia intravital e ensaios biológicos.

À Dra. Célia Leite Sant'Anna, por disponibilizar a cepa em estudo e o espaço do Banco de Cultura de Cianobactérias do Núcleo de Pesquisas em Ficologia. Pelos ensinamentos e amizade.

À Dra. Carla Lima, do Laboratório de Imunofarmacologia do Centro Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan, por todas as explicações e ensinamentos.

À Dra. Marisa Rangel, pela realização dos testes.

À Dra. Elaine Cardoso-Lopes, pela realização dos ensaios bioautográficos.

À Msc. Fernanda M. Bruni, do Laboratório de Imunofarmacologia do Centro Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan, pelo auxílio em todos os experimentos, pela amizade, pelas conversas e risadas.

Ao Fernando Pípole, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da USP, pela amizade, por toda ajuda e por todas as conversas.

Às pesquisadoras do Núcleo de Pesquisas em Ficologia, Dra. Andrea, Dra. Sílvia, Dra. Nair, Dra. Diclá e Dra. Mutuê pela ótima convivência durante esses seis anos.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisas em Ficologia do Instituto de Botânica de São Paulo: Fernanda, pela “coragem” nas idas e vindas ao instituto; Camilae Edna pelas conversas, risadas e noites na seção; Kleber, pelo grande auxílio quando precisei; Raquel, por todos os favores e amizade, “Felipets” pelas explicações e pelos momentos de descontração. Agradeço também à Ana Cláudia, Marisa, Daniella, Fernanda Ramlov, Kenner, Júlio, Ingrid, Sandra, Jonata e César, pela convivência.

Aos amigos do Laboratório de Imunofarmacologia, do Centro Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan, Lidiane, Márcio, Fernanda Magalhães, Evilín, Anderson e Edson, pelo auxílio nos experimentos, pela amizade e boa convivência. Às funcionárias, e amigas, do Núcleo de Pesquisas em Ficologia, Neide, Neuzete e Elizete.

À Sheila e Shirley Priori, grandes amigas, pela amizade e apoio em todas as horas.

A todos vocês muito obrigada, por participarem desta importante etapa da minha vida.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. a) Fotografia ilustrando o gênero *Geitlerinema*, b) a cepa CCIBT 920 – *Geitlerinema amphibium* e c) fotografia indicando os grânulos (setas) presentes em cada um dos lados dos septos das células do tricoma. Fotografia a) Núcleo de Pesquisas em Ficologia; c) Bittencourt-Oliveira *et al.* 2009.....21
- Figura 2. Esquema do processo de multiplicação da cepa CCIBT 920 – *G. amphibium*. ...32
- Figura 3. Esquema do processo de extração da biomassa e fracionamento do extrato metanólico de CCIBT 920 – *G. amphibium*.35
- Figura 4. Foto apresentando o posicionamento do camundongo e do músculo cremáster sobre placa aquecida para visualização ao microscópio óptico.38
- Figura 5. Esquema apresentando as doses e períodos de incubação utilizados nas análises por microscopia intravital.41
- Figura 6. Esquema do ensaio imuno-enzimático (ELISA) para dosagem de quimiocinas e citocinas.44
- Figura 7. Perfil de distribuição das frações na cromatoplaça de gel de sílica. Em a) Fotografia mostrando a placa com as frações demarcadas manualmente após a corrida cromatográfica com o solvente CHCl₃:MeOH:H₂O 64:36:08. Em b) e c) a fotografia mostra a visualização da placa sob radiação UV nos comprimentos de onda de 365 (b) e 254 (c) nm.48
- Figura 8. Perfil cromatográfico da fração 6, obtido por CLAE, no comprimento de onda de 220 nm.51
- Figura 9. Variação na síntese de substâncias por CCIBT 920 - *G. amphibium*. A foto mostra o extrato metanólico de CCIBT – *G. amphibium* que contém a fração 3 (seta contínua) e do extrato metanólico em que a fração está ausente (seta tracejada). Placa observada sob radiação UV no comprimento de onda de 365 nm, após corrida cromatográfica com o solvente CHCl₃:MeOH:H₂O 64:36:08.54

Figura 10. Congestão no fígado causada pelo extrato metanólico de CCIBT 920 - *G. amphibium*. Em a) Fotografia mostrando a veia centrilobular e sinusóides com arquitetura normais do fígado de animal controle. Em b) e c) as fotografias mostram a veia hepática (*) e sinusóides (seta) dilatados e preenchidos por eritrócitos, caracterizando congestão difusa acentuada, causados pela administração de 10 mg de extrato metanólico de CCIBT 920 - *G. amphibium*. Cortes histológicos corados com HE e observados sob aumento de 40x.....56

Figura 11. Congestão nos pulmões causada pelo extrato metanólico de CCIBT 920 - *G. amphibium*. Em a) Fotografia mostrando o pulmão de animal controle com características histológicas normais. Em b) e c) as fotografias mostram o pulmão de animal que recebeu 10 mg do extrato metanólico de CCIBT 920 - *G. amphibium*: notar congestão acentuada (setas). Cortes histológicos corados com HE e observados sob aumento de 40x.....57

Figura 12. Estase venular transitória causada pelo extrato de CCIBT 920 - *G. amphibium*. Em a) vênula com fluxo normal antes da administração tópica de 120 µg do extrato metanólico de CCIBT 920 - *G. amphibium*, em b) vênula sem fluxo sanguíneo após 5 minutos da administração do extrato metanólico e em c) vênula com o fluxo sanguíneo restabelecido após 15 minutos da administração.....59

Figura 13. Aumento do número de leucócitos rolantes causado pelo extrato metanólico de CCIBT 920 - *G. amphibium*. A dose de 2,5 mg do extrato metanólico foram administrados i.p. e após o período de incubação de 30 minutos foi feita a exposição do músculo cremaster. A contagem de leucócitos rolantes nas vênulas foi feita por minuto, em intervalos de cinco minutos, até o fim do experimento (30 minutos).....61

Figura 14. Estase venular e arteriolar causadas pelo extrato de CCIBT 920 - *G. amphibium*. A dose de 20 mg do extrato metanólico foi administrada i.p. e após o período de incubação de duas horas foi feita a exposição do músculo cremaster. Em a) vênula (seta contínua) e arteríola (seta tracejada) exatamente após a exposição do músculo cremaster e em b), c) e d) após 10, 15 e 20 minutos da exposição do músculo, respectivamente. Observar que a estase venular e arteriolar aumentam com o tempo.....62

Figura 15. Resultados obtidos com as frações do extrato metanólico de CCIBT 920 - *G. amphibium*. Doses de 2 mg de cada uma das seis frações foram administrados i.p. e após o

período de incubação de 30 minutos foi feita a exposição do músculo cremaster. A contagem de leucócitos rolantes nas vênulas foi feita por minuto, em intervalos de cinco minutos, até o fim do experimento (30 minutos)..... 64

Figura 16. Resultados obtidos com a microcistina-LR. A dose de $62,5 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ foi administrada i.p. e após o período de incubação de 15 minutos foi feita a exposição do músculo cremaster. Em a) vênula (seta contínua) e arteríola (seta tracejada) com fluxo sanguíneo lento após a exposição do músculo, em b) após 5 minutos e em c) após 15 minutos, sem fluxo sanguíneo..... 66

Figura 17. Aumento do número de leucócitos rolantes causado por CCIBT 639 – *Scytonema* sp. Doses de 20, 40 e 120 μg do extrato de CCIBT 639 – *Scytonema* sp. foram administrados topicamente e a contagem de leucócitos rolantes nas vênulas foi feita por minuto, em intervalos de cinco minutos, até o fim do experimento (30 minutos)..... 67

Figura 18. Aumento do número de leucócitos rolantes causado por CCIBT 639 – *Scytonema* sp. A dose de 2,5 mg de extrato foi administrada i.p. e após o período de incubação de 30 minutos foi feita a contagem do número de leucócitos rolantes por minuto, em intervalos de cinco minutos, até o fim do experimento (30 minutos)..... 68

Figura 19. Comparação da indução do aumento de leucócitos rolantes por CCIBT – 639 *Scytonema* sp. e CCIBT 920 – *G. amphibium*. Doses de 2,5 mg do extrato metanólico de CCIBT 920 – *G. amphibium* ou de CCIBT – 639 *Scytonema* sp. foram administrados i.p. e após o período de incubação de 30 minutos foi feita a contagem do número de leucócitos rolantes por minuto, em intervalos de cinco minutos, até o fim do experimento (30 minutos).
..... 69

Figura 20. Ativação de leucócitos induzida pelo extrato metanólico de CCIBT 920 – *G. amphibium*. A dose de 2,5 mg do extrato metanólico foi administrada i.p. e após o período de incubação de 30 minutos foi feita sangria pelo plexo oftálmico dos camundongos para avaliação do perfil celular..... 72

Figura 21. Indução do recrutamento celular pelo extrato metanólico de CCIBT 920 – *G. amphibium*. A dose de 2,5 mg do extrato metanólico foi administrada i.p. e após diferentes períodos o influxo celular foi avaliado na cavidade peritoneal. 73

Figura 22. Indução da produção de citocinas pelo extrato metanólico de CCIBT 920 – *G. amphibium*. A dose de 2,5 mg do extrato metanólico foi administrada i.p. e, após diferentes períodos de incubação, foi feito o lavado peritoneal para obtenção da suspensão celular para a dosagem de citocinas por ELISA. 76

Figura 23. Indução da produção de quimiocinas pelo extrato metanólico de CCIBT 920 – *G. amphibium*. A dose de 2,5 mg do extrato metanólico foi administrada i.p. e, após diferentes períodos de incubação, foi feito o lavado peritoneal para obtenção da suspensão celular para a dosagem de quimiocinas por ELISA. 77

Figura 24. Inibição da enzima acetilcolinesterase, representada por halos brancos (setas). O halo possui Rf de 0.89, indicando que a fração ativa é a fração 6. 78

Figura 25. Cromatograma da fração 6, obtido por CLAE, no comprimento de onda de 220 nm. Abaixo estão apresentados os espectros de UV dos picos significativos (6, 9, 10, 11 e 12) e o espectro de UV do alcalóide nostocarbolina. 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de substâncias extraídas de espécies de <i>Microcystis</i> e suas respectivas estruturas planares.....	5
Tabela 2. Exemplos de substâncias extraídas de cianobactérias e suas estruturas planares.	10
Tabela 3. Resumo das principais características da Imunidade Inata e da Imunidade Adquirida	23
Tabela 4. Composição das soluções-estoque para o preparo do meio ASM-1.	30
Tabela 5. Preparo do meio concentrado.	30
Tabela 6. “ <i>Rfs</i> ” apresentados por cada fração obtida por CCDP.....	49
Tabela 7. Massas, obtidas por MALDI-MS, de cada uma das frações do extrato metanólico de CCIBT 920 - <i>G. amphibium</i>	50
Tabela 8. Doses empregadas nos testes e tempo decorrido até o óbito.	50
Tabela 9. Resultados dos testes realizados com as frações pré-purificadas do extrato metanólico de CCIBT 920 - <i>G. amphibium</i>	53
Tabela 10. Resumo dos efeitos observados pela administração de diferentes doses do extrato de CCIBT 920 – <i>G. amphibium</i> , nos diferentes períodos de incubação.	60
Tabela 11. Resultados dos testes realizados com o extrato metanólico de CCIBT 920 - <i>G. amphibium</i> e o antibiótico polimixina B.	71

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ADDA	ácido 3-amino,2,6,8-trimetil,9-metoxi,10-fenildeca-(4,6-dien)-dienóico
ANTX-S	Anataxina-a(S)
BMAA	β -metil-L-amino-alanina
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CCIBT	Coleções de Cultura do Instituto de Botânica de São Paulo
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Da	Dalton (unidade de medida de massa)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
GTX	Goniautoxina
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
KC	<i>Keratinocyte-derived chemokine</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
MALDI-MS	<i>Matrix assisted laser desorption ionization – Mass</i>
MC	Microcistina
MCP-1	<i>Monocytes chemotactic protein -1</i>
MN	Leucócitos mononucleares
NK	Células Natural Killer
NOD	Nodularina

PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
PSP	Paralytic Shellfish Poison
STX	Saxitoxina
TFA	Ácido trifluoracético
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor – α</i>

Sumário

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
Introdução	1
Substâncias bioativas isoladas de cianobactérias	1
Toxinas e implicações à saúde humana	1
Substâncias com atividade anticolinesterásica isoladas de cianobactérias	3
Substâncias com outras atividades isoladas de cianobactérias	4
A espécie <i>Geitlerinema amphibium</i> (C. Agardh ex Gomont) Anagnostidis 1989	20
Ocorrência	22
Toxicidade	22
Informações básicas sobre Sistema Imune: Ênfase em Imunidade Inata e Inflamação	23
Inflamação	25
A Microscopia Intravital	26
Objetivos	28
Objetivo geral	28
Objetivos específicos	28
Material e Métodos	29
A cepa em estudo: CCIBT 920 – <i>Geitlerinema amphibium</i>	29
Produção de biomassa	29
Preparo do meio ASM-1, utilizado para o cultivo da espécie em estudo	29
Multiplicação da cepa	30
Obtenção das frações	32
Extração	32
Fracionamento	33
Estudo das frações por Espectrometria de Massas (MALDI-MS)	33
Obtenção do perfil cromatográfico, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da fração com atividade anti-AChE	33
Obtenção do extrato de CCIBT 639 – <i>Scytonema</i> sp.	36
Estudos biológicos	36

Animais.....	36
Teste padrão em camundongos.....	36
Confecção das lâminas histológicas.....	37
Avaliação da presença de lipopolissacarídeos no extrato metanólico de CCIBT 920 – <i>G. amphibium</i> , pelo teste de polimixina B.....	37
Testes por Microscopia Intravital.....	37
Procedimento cirúrgico.....	37
Parâmetros analisados.....	38
Administração do extrato metanólico de CCIBT 920 – <i>G. amphibium</i>	39
Administração das frações.....	39
Administração da cianotoxina microcistina-LR.....	40
Administração do extrato em ácido acético de CCIBT 639 – <i>Scytonema</i> sp.....	40
Dosagem de citocinas e quimiocinas do lavado peritoneal.....	42
Preparação do material: lavado peritoneal.....	42
Contagem total e diferencial de leucócitos.....	42
Dosagem de citocinas e quimiocinas por ELISA.....	42
Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue.....	45
Ensaio bioautográfico para avaliação de atividade anti-AChE.....	45
Análises estatísticas.....	46
Resultados e Discussão	47
Extrato metanólico e frações de CCIBT 920 – <i>G. amphibium</i>	47
Testes com o extrato metanólico e frações de CCIBT 920 – <i>G. amphibium</i>	52
Análises histológicas dos órgãos após a administração do extrato metanólico de CCIBT 920– <i>G. amphibium</i>	54
Efeitos induzidos pela administração do extrato metanólico de CCIBT 920 – <i>G. amphibium</i> na microcirculação.....	58
Efeitos induzidos pela administração das frações de CCIBT 920 – <i>G. amphibium</i> na microcirculação.....	63
Efeitos da administração intraperitoneal da cianotoxina Microcistina-LR na microcirculação.....	64
Efeitos da administração do extrato em ácido acético 0,1 M de CCIBT 639 – <i>Scytonema</i> sp. na microcirculação.....	67
Implicações da administração da polimixina B sobre os efeitos do extrato metanólico de CCIBT 920 – <i>G. amphibium</i>	70

Cinética do influxo de células no sangue e na cavidade peritoneal induzido pela administração do extrato metanólico de CCIBT 920 – <i>G. amphibium</i>	71
Indução de citocinas pró-inflamatórias pela administração do extrato metanólico de CCIBT 920 – <i>G. amphibium</i>	73
Inibição da enzima acetilcolinesterase, <i>in vitro</i> , pela fração 6.....	78
Conclusões	81
Resumo	83
Abstract.....	85
Referências bibliográficas	87

INTRODUÇÃO

SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS ISOLADAS DE CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias, organismos procariontes e fotossintetizantes, são hoje consideradas rica fonte de metabólitos secundários, os quais podem apresentar atividades biológicas associadas, na maioria das vezes, à inibição enzimática (Yamaki *et al.* 2005) e ao crescimento e desenvolvimento de outros organismos. São substâncias que apresentam atividades distintas, tais como anti-fúngica (Skulberg 2000), anti-tumoral (Al-Awar *et al.* 2004), anti-microbiana (Berry *et al.* 2004) e anti-viral (Zainuddin *et al.* 2004).

Entretanto, os mais conhecidos desses compostos são toxinas, as quais foram agrupadas por sua ação em mamíferos.

CIANOTOXINAS E IMPLICAÇÕES À SAÚDE HUMANA

As toxinas sintetizadas por cianobactérias, denominadas cianotoxinas, são atualmente agrupadas em hepatotoxinas, neurotoxinas e citotoxinas (Carvalho 2006, Cox *et al.* 2003). Ao primeiro grupo pertencem as microcistinas e as nodularinas; ao segundo, as saxitoxinas, as anatoxinas-a, a anatoxina-a(S) e o amino ácido β -metil-aminoalanina e ao terceiro, as cilindrospermopsinas.

As microcistinas são peptídeos cíclicos formados por cinco aminoácidos comuns a todas as variantes e dois aminoácidos que definem cada uma delas; um dos aminoácidos comuns é o ADDA [ácido 3-amino,2,6,8-trimetil,9-metoxi,10-fenildeca-(4,6-dien)-dienóico], que confere toxicidade à molécula (Song *et al.* 1998). São as mais estudadas entre as cianotoxinas, sendo responsáveis por diversos casos de intoxicação em animais e em seres humanos (Azevedo *et al.* 2002, Soares *et al.* 2006). Estas toxinas são inibidores específicos das proteínas fosfatases 1 e 2A, causam hemorragia intra-hepática e como consequência, a morte por choque hipovolêmico. Atualmente, são conhecidas mais de 70 variantes de microcistinas, que são produzidas por diversas espécies de cianobactérias pertencentes aos gêneros *Microcystis*, *Planktothrix*, *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Nostoc* e *Radiocystis* (Namikosh *et al.* 1998, Vezie *et al.* 1998, Hummert *et al.* 2001, Christiansen *et al.* 2003, McElhiney & Lawton 2005).

As nodularinas, pentapeptídeos cíclicos, por possuírem o mesmo aminoácido tóxico ADDA, apresentam efeito hepatotóxico idêntico ao das microcistinas. Nodularinas foram isoladas somente do gênero *Nodularia* (McElhiney & Lawton 2005).

A cilindrospermopsina é um alcalóide guanidínico que, além do efeito hepatotóxico, causa danos em células cardíacas, renais e pulmonares. Uma particularidade desta cianotoxina é sua ação lenta: em testes em camundongos são necessários de cinco a sete dias para que o efeito letal seja observado (Carvalho 2006, Van Apeldoorn *et al.* 2007). Esta substância foi isolada de *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *Raphidiopsis curvata*, *Umezakia natans* e *Anabaena bergii*, não tendo sido isolada no Brasil (Wiegand & Pflugmacher 2005).

O conjunto de metabólitos neurotóxicos de cianobactérias é formado por alcalóides e um aminoácido. Dentre os alcalóides, os mais comuns são as saxitoxinas, (“Paralytic Shellfish Poisoning”- PSP), grupo dividido em três classes, segundo seu grau de sulfatação: as saxitoxinas propriamente ditas (STX), não são sulfatadas; as goniatoxinas (GTX) são monossulfatadas e as C-toxinas, dissulfatadas. Todas as variáveis do grupo atuam nos canais de sódio, bloqueando a transmissão nervosa, o que induz à paralisia e à morte por parada respiratória (Hunter 1998, Carvalho 2006, Van Apeldoorn *et al.* 2007). São produzidas por diversas espécies, dentre elas *Anabaena circinales*, *A. spiroides*, *A. flos-aquae* e *Cylindrospermopsis raciborskii* (Van Apeldoorn *et al.* 2007).

A anatoxina-a e a homoanatoxina-a têm efeito semelhante ao da acetilcolina e em camundongos, causam forte respiração abdominal, cianose e convulsões, seguidas de paralisia progressiva e morte, minutos após a inoculação (Wiegand & Pflugmacher 2005, Carvalho 2006). Foram isoladas principalmente de espécies dos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix*, *Cylindrospermopsis*, *Oscillatoria* e *Microcystis* (Wiegand & Pflugmacher 2005).

A anatoxina-a(S) [antx-a(S)] bloqueia a ação da acetilcolinesterase de modo similar ao dos pesticidas fosforados. Além da sintomatologia semelhante à descrita para as anatoxinas-a, causa também intensa salivação em mamíferos, sintoma que a diferencia da anatoxina-a e ao qual faz referência o (S) justaposto ao termo anatoxina-a, que também a nomeia (Hunter 1998, Wiegand & Pflugmacher 2005).

O aminoácido β -metilamino-L-alanina (BMAA) tem efeito crônico neurodegenerativo, causando sintomas semelhantes à Doença de Parkinson/Esclerose Lateral Amiotrófica (Murch *et al.* 2004). Foi isolado primeiramente do gênero *Nostoc*,

(Cox *et al.* 2003), porém já foi identificado em outros gêneros de cianobactérias (Cox *et al.* 2005).

Os lipopolissacarídeos (LPS) são característicos da parede celular de todas as bactérias gram-negativas e comuns também a todas as cianobactérias. Causam irritações na pele e alergias, sintomas também observados em espécies de enterobactérias, como *Escherichia coli* ou *Salmonella* sp. Além disso, se ingeridas, podem desencadear uma série de efeitos, como níveis anormais de glicose, trombocitopenia e neutropenia (Wiegand & Pflugmacher 2005, Carvalho 2006).

A produção de cianotoxinas traz graves consequências à saúde humana, uma vez que as cianobactérias estão presentes em grande variedade de ambientes, nos quais se incluem os reservatórios de abastecimento público. Nestes locais, pode ocorrer a reprodução excessiva de determinada espécie, processo denominado floração, o que pode acarretar odor e sabor desagradáveis à água, além de intoxicações de animais e de seres humanos (Azevedo *et al.* 2002). Além do mais, a exposição prolongada a pequenas doses de cianotoxinas tem sido associada ao desenvolvimento de câncer primário no fígado e de doenças neurodegenerativas (Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992; Murch *et al.* 2004).

No Brasil, florações de cianobactérias tóxicas ocorrem freqüentemente e em todo o país. Episódios de florações foram relatados em diferentes regiões: Rio Grande do Norte (Chellappa & Costa 2003), São Paulo (Sotero-Santos *et al.* 2006), Distrito Federal (Branco & Senna 1994), Minas Gerais (Jardim *et al.* 2001), Pernambuco (Bouvy *et al.* 1999), Alagoas (Porfirio *et al.* 1999), Rio de Janeiro (Magalhães *et al.* 2001) e Rio Grande do Sul (Yunes *et al.* 2003).

SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA, ISOLADAS DE CIANOBACTÉRIAS

Até o presente, apenas duas substâncias com atividade anticolinesterásica foram isoladas de cianobactérias. Presentemente, tal classe de substâncias tem despertado grande interesse, porque esta enzima desempenha função importante na Doença de Alzheimer.

Além disso, substâncias com ação anticolinesterásica podem ser extremamente tóxicas para mamíferos, caso da anatoxina-a(S), organofosforado natural (éster metílico

da N-hidroxiguanidina fosfato), com massa molecular de 252 D (Rodríguez *et al.* 2006), isolado pela primeira vez de *Anabaena flos-aquae* e já citado neste texto.

A segunda substância de origem cianobacteriana a apresentar essa atividade é o alcalóide indólico nostocarbolina, isolado de cianobactéria do gênero *Nostoc* (Becher *et al.* 2008). Não existem estudos quanto à sua toxicidade para mamíferos, entretanto, este alcalóide mostrou ser um eficiente algicida, induzindo, rapidamente, a morte de organismos fotossintetizantes, tanto procariontes quanto eucariontes.

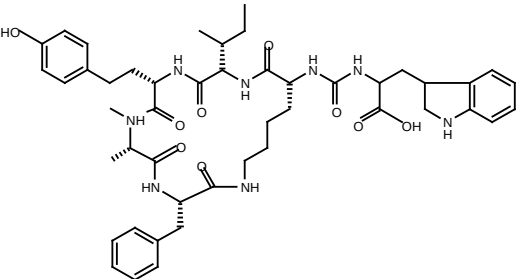
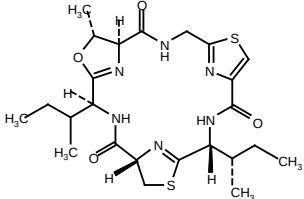
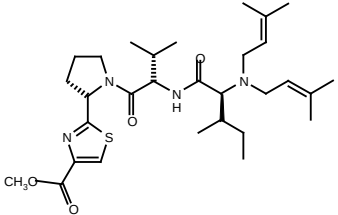
SUBSTÂNCIAS COM OUTRAS ATIVIDADES ISOLADAS DE CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias sintetizam uma grande variedade de metabólitos bioativos com raras e complexas estruturas, sendo a maioria delas constituída por polipeptídios, híbridos de policetídeos e polipeptídeos e por depsipetídeos (Tan 2007; Gerwick *et al.* 2001). Entretanto, também entre eles são também encontrados alcalóides (Becher *et al.* 2008), terpenos (Prinsep *et al.* 1996), fenóis halogenados (Choi *et al.*, 2010) e derivados da prolina (Clark *et al.* 2008), além de muitos outros grupos químicos.

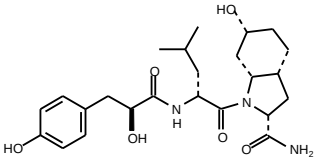
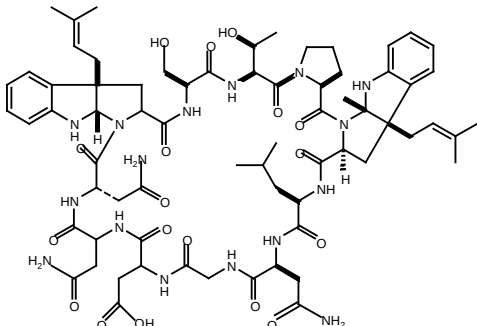
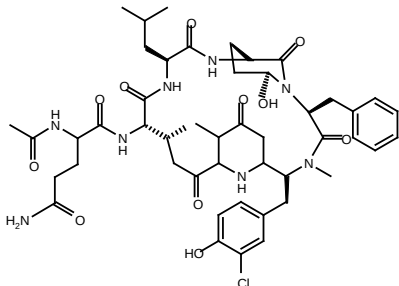
Outra característica interessante das cianobactérias, com relação à produção de metabólitos, é a síntese de grupos bastante numerosos de análogos, como o formado pelas microcistinas (Namikosh *et al.* 1998, Vezie *et al.* 1998, Hummert *et al.* 2001, Christiansen *et al.* 2003, McElhiney & Lawton 2005), pelas saxitoxinas (Llewellyn 2006) e pelas criptoficinas (Golakoti *et al.* 1995).

Algumas das cianobactérias são mais estudadas do que outras, ou por produzirem toxinas e formarem florações ou por serem fonte de uma diversidade maior de metabólitos portadores de diversas atividades, como por exemplo, os gêneros *Microcystis* e *Lyngbya*, respectivamente. A Tabela 1 reúne informações sobre as substâncias metabolizadas pelo gênero *Microcystis* e a 2, sobre os gêneros mais estudados, em geral.

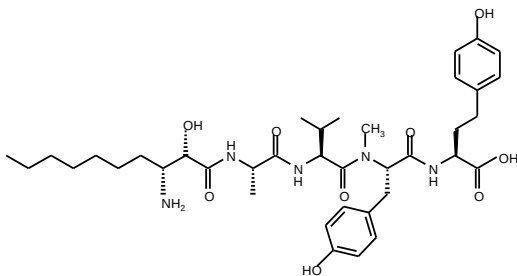
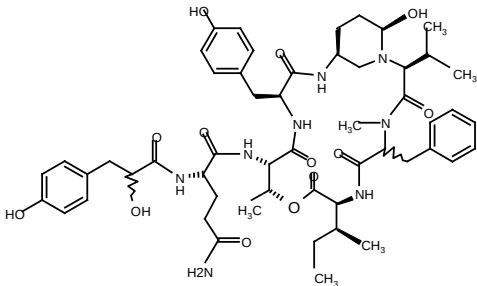
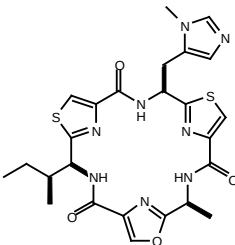
Tabela 1: Exemplos de substâncias extraídas de espécies de *Microcystis* e suas respectivas estruturas planares.

Nome	Estrutura planar	Massas moleculares Dalton	Atividade	Referência
Ácido ferintóico A		867,4417 (M + H) ⁺	Não submetida a ensaios biológicos	Williams <i>et al.</i> 1996
Aeruciclamida A		557,1982 [M + Na] ⁺	Não submetida a ensaios biológicos	Portmann <i>et al.</i> 2008.
Aeruginosamida		561,3516(M + H) ⁺	Citotóxica (para células A2780 de tumor de ovário humano e células K562 de leucemia humana)	Lawton <i>et al.</i> 1999.

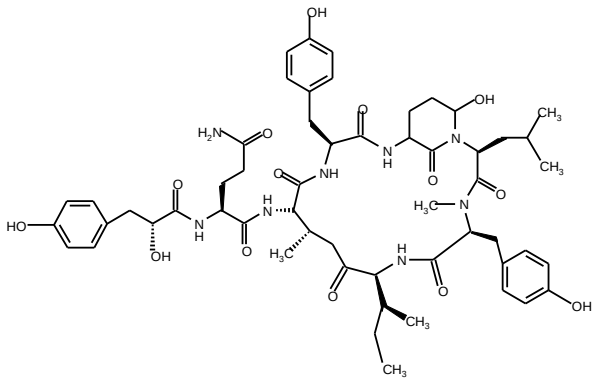
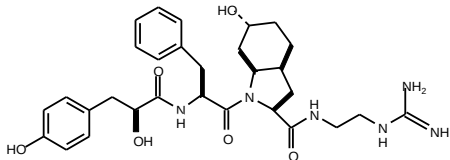
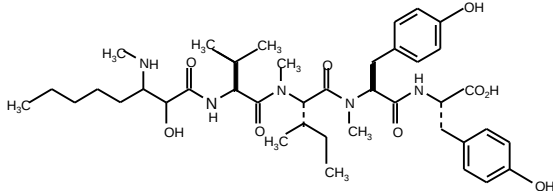
Continuação

Aeruginosina EI461		484,2432(M + H)⁺	Inibidora de tripsina	Ploutno <i>et al.</i> 2002
Cauaguchipectina A		1421,6895 (M + H)⁺	Não submetida a ensaios biológicos	Ishida <i>et al.</i> 1996.
Cianopectolina 954		977,4141 (M + Na)⁺	Inibidora de quimotripsina	Von Elert <i>et al.</i> 2005.

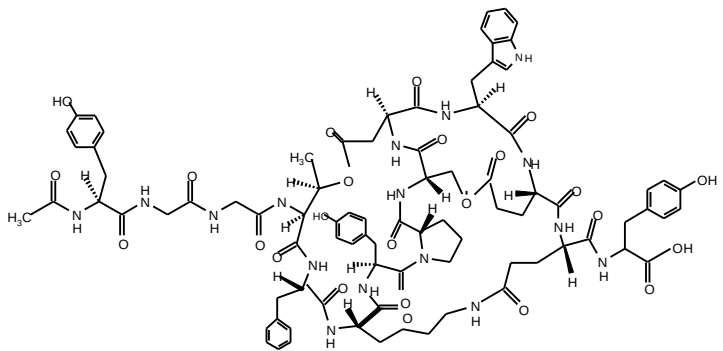
Continuação

Cianostatina A		728,4196 (M + H) ⁺	Inibidora de leucina aminopeptidase M	Sano <i>et al.</i> 2005
Ictiopeptina A		1043.5090 (M + H) ⁺	Antiviral	Zainuddin <i>et al.</i> 2007.
Microciclâmica		583.1931 (M + H) ⁺	Citotóxica (contra células P388 de leucemia de ratos)	Ishida <i>et al.</i> 2000.

Continuação

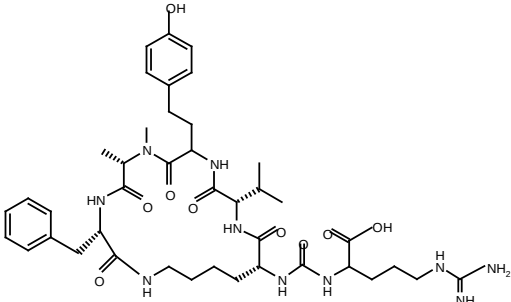
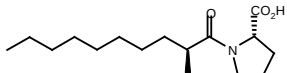
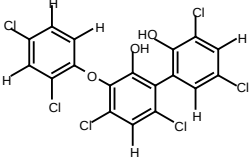
Microcistilida A		1095,5057 (M + H) ⁺	Citotóxica	Tsukamoto <i>et al.</i> 1993.
Microcina SF608		609,3 (M + H) ⁺	Inibidora de serino- proteases	Banker & Carmeli 1999
Microginina SD755		756,4536 (M + H) ⁺	Inibidora de aminoproteases [Bovine Amino Peptidase N (APN)]	Reshef & Carmeli 2001

Continuação

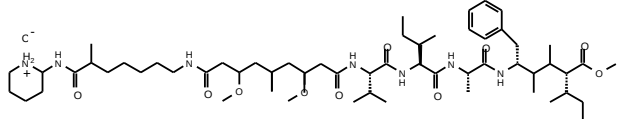
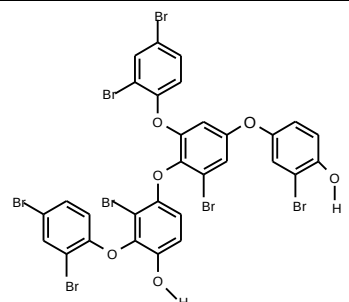
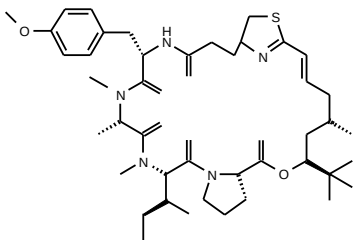
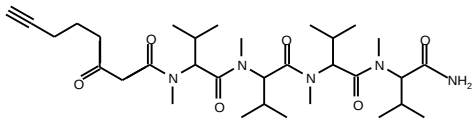
Microviridina*		1729,7220 (M +) ⁺	Inibidora de tirosinase	Ishitsuka <i>et al.</i> 1990.
----------------	--	-------------------------------	----------------------------	-------------------------------

*Também sintetizadas pelos gêneros *Nostoc* e *Oscillatoria*

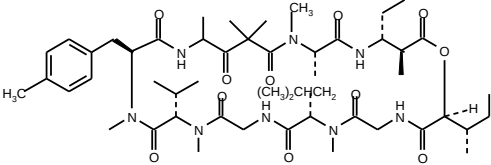
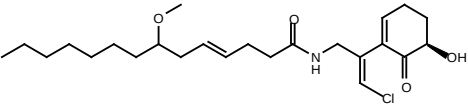
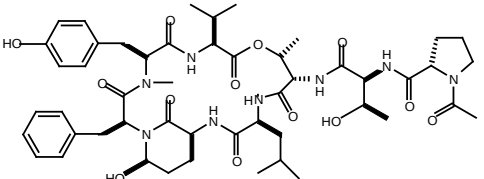
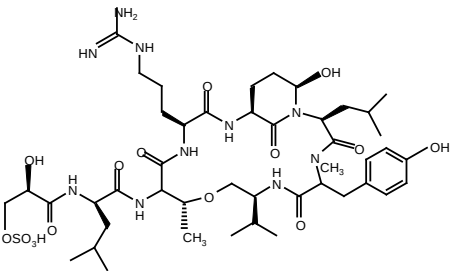
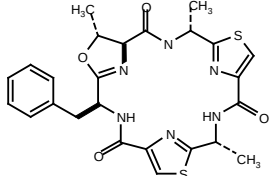
Tabela 2. Exemplos de substâncias extraídas de cianobactérias e suas estruturas planares.

Nome	Estrutura Planar	Massa Molecular Dalton	Organismo	Atividade	Referência
Anabaenopeptina B		837,4593 [M + H] ⁺	<i>Anabaena</i> sp <i>Oscillatoria agardhii</i>	Inibidora de serino-proteases	Murakami <i>et al.</i> 1997.
Ácido tumonóico D		284,2211 [M + H] ⁺	<i>Blennothrix cantharidosmum</i> **	Antimalárica	Clark <i>et al.</i> 2008.
Ambigol A		481,8548 [M + H] ⁺	<i>Fischerella ambigua</i> *	Inibidora das enzimas ciclooxygenases; da HIV reverse transcriptase; antibacteriana, antifúngica e moluscicida	Falch <i>et al.</i> 1993.

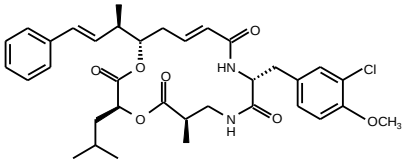
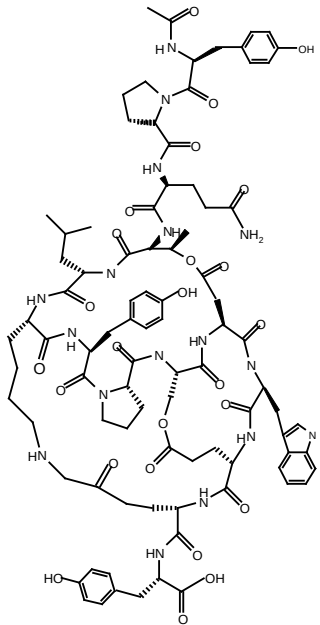
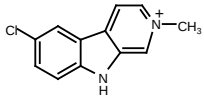
Continuação

Mitsoamida		1057,7 [M + H] ⁺	<i>Geitlerinema</i> sp.**	Citotóxica	Andrianasolo <i>et al.</i> 2007.
Crosbianol A		1046,5045 [M + Na] ⁺	<i>Leptolyngbya crossbyana</i> **	Tóxica	Choi <i>et al.</i> 2010.
Apratoxina E		796,699 [M + H] ⁺	<i>Lyngbya bouillonii</i> **	Citotóxica (contra linhagens de câncer de cólon, cervix e ossos)	Matthew <i>et al.</i> 2008.
Dragonamida D		628,4067 [M+ Na] ⁺	<i>Lyngbya polychroa</i> **	Não submetida a ensaios biológicos	Gunasekera <i>et al.</i> 2008.

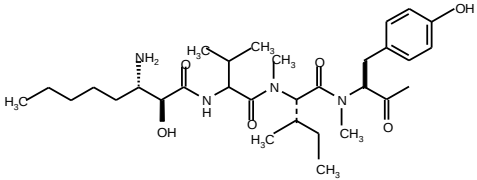
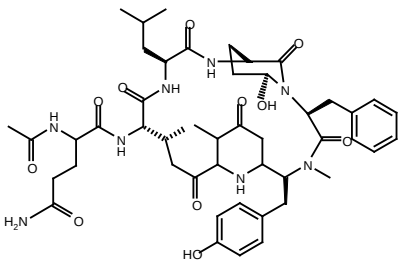
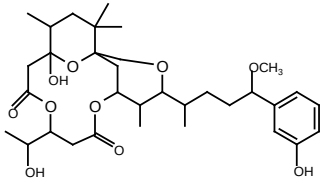
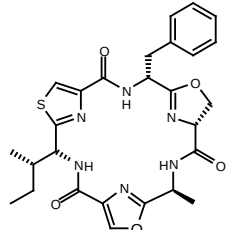
Continuação

Lingbiastatina 1		1000,00 [M + H] ⁺	<i>Lyngbya majuscula</i> **	Citotóxica	Harrigan <i>et al.</i> 1998
Malingamida F		440,022 [M + H] ⁺	<i>Lyngbya majuscula</i> **	Inibidora da produção de ON.	Villa <i>et al.</i> 2010
Quempopeptina A		1013,4965 [M + Na] ⁺	<i>Lyngbya majuscula</i> **	Inibidora de serino-protease	Taori <i>et al.</i> 2008.
A90720A		1041 [M + H] ⁺	<i>Microchaete loktakensis</i> *	Inibidora de serina protease	Bonjouklian <i>et al.</i> 1996.
Baniasciclâmica A		538,1460 [M + H] ⁺	<i>Nostoc</i> sp.	Não submetida a ensaios biológicos	Ploutno & Carmeli 2002.

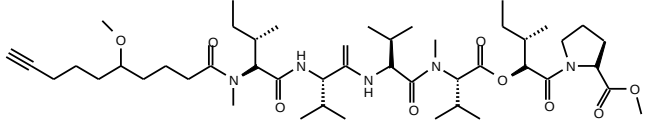
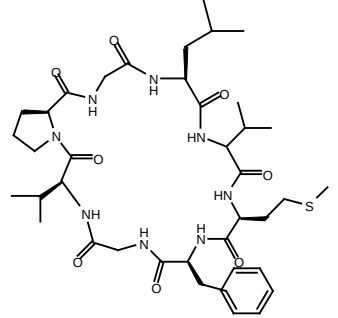
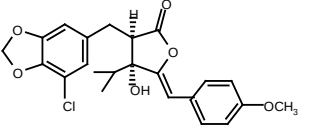
Continuação

Criptoficina C		638,2761 [M + H] ⁺	<i>Nostoc</i> SP*	Citotóxica (contra tumores resistentes a outras drogas)	Barrow <i>et al.</i> 1995
Microviridina G		1806 [M + H] ⁺	<i>Nostoc minutum</i> e <i>Oscillatoria agardhii</i>	Inibidora de serino-proteases	Shin <i>et al.</i> 1996, Murakami <i>et al.</i> 1996, 1997, Rohrlack <i>et al.</i> 2003, 2004
Nostocarbolina		231,5 [M + H] ⁺	<i>Nostoc</i> sp.	Inibidora de acetilcolinesterase e tripsina	Becher <i>et al.</i> 2008.

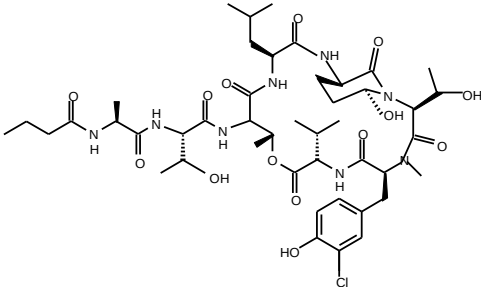
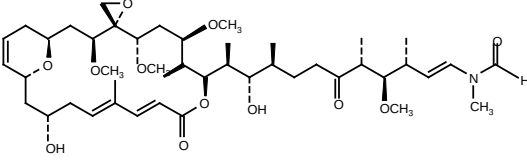
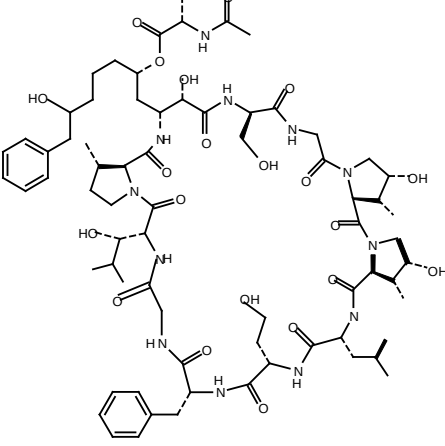
Continuação

Nostogina BN741		764,4177 [M - H] ⁻	<i>Nostoc</i> sp.	Não submetida a ensaios biológicos	Ploutno & Carmeli, 2002.
Nostopeptina BN920		919,2 [M + H] ⁺	<i>Nostoc</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i>	Inibidora de quimotripsina	Von Elert <i>et al.</i> 2005.
Oscilatoxina A		732,1341 [M + H] ⁺	<i>Oscillatoria nigroviridis</i> ** <i>Schizothrix calcicola</i> **	Causadora do Mal de Ciguatera	Mynderse & Moore 1978.
Raociclamida A		550,1991 [M + H] ⁺	<i>Oscillatoria raoi</i> *	Citotóxica (contra embriões de ouriços marinhos)	Admi <i>et al.</i> 1996.

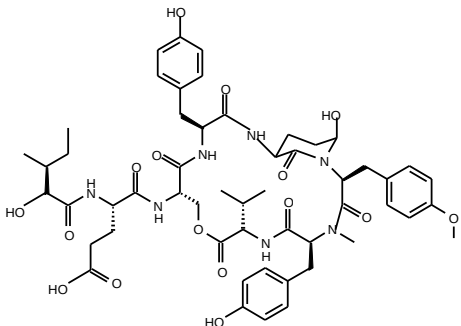
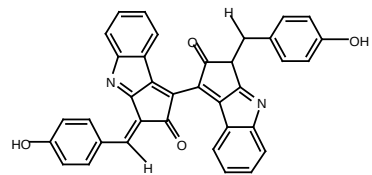
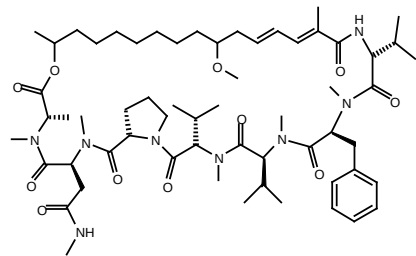
Continuação

Viridamida A		862,5827 [M + H] ⁺	<i>Oscillatoria Nigro-viridis**</i>	Anti tripanosoma e anti leishmaniose	Simmons <i>et al.</i> 2008.
Planctociclina		801,4327 [M + H] ⁺	<i>Planktothrix rubescens</i>	Inibidora de tripsina e de quimotripsina	Baumann <i>et al.</i> 2007
Cianobacterina		402/404 [M + H] ⁺	<i>Scytonema hofmanni</i>	Algicida(inibidora do crescimento de cianobactérias) e inibidora do transporte de elétrons no fotossistema II	Lee & Gleason 1994.

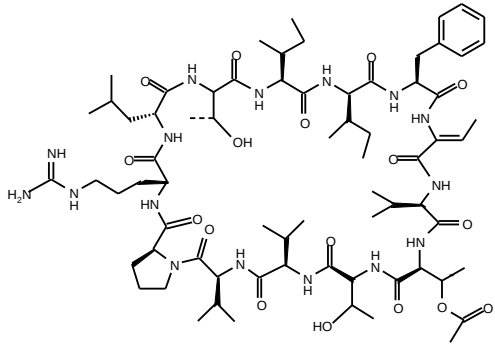
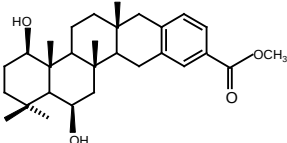
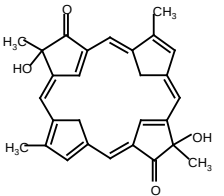
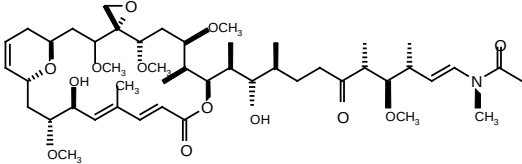
Continuação

Ciptolina A		1003,4512 [M + Na] ⁺	<i>Scytonema hofmanni</i> *	Inibidora (elastase pancreática de suínos)	Matern <i>et al.</i> 2001
Citoficina A		822 [M + H] ⁺	<i>Scytonema pseudohofmanni</i> *	Citotóxica e antifúngica	Yshibashi <i>et al.</i> 1986.
Citonemina A		1462 [M + H] ⁺	<i>Scytonema</i> sp	Antagonista de cálcio	Helms <i>et al.</i> 1988

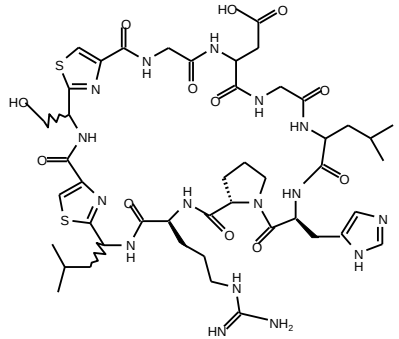
Continuação

Hofmanolina		1075 [M + H] ⁺	<i>Scytonema hofmanni</i> *	Não submetida a ensaios biológicos	Matern <i>et al.</i> 2003.
Citonemina		544 [M + H] ⁺	<i>Stigonema</i> sp	Antiproliferativa	Stevenson <i>et al.</i> 2002.
Malevamida E		1103,7145 [M + H] ⁺	<i>Symploca laeteviridis</i> **	Inibidora dos canais de cálcio	Adams <i>et al.</i> 2008.

Continuação

Tolibissidina A		1488 [M + Na] ⁺	<i>Tolypothrix byssoidea</i> **	Antifúngica	Jaki <i>et al.</i> 2001.
Tolipodiol		456,2870 [M + H] ⁺	<i>Tolypothrix nodosa</i> *	Antiinflamatória	Prinsep & Thomson 1996.
Toliporfina J		430,1651 [M + H] ⁺	<i>Tolypothrix nodosa</i> *	Inibidora do transporte de drogas por P-glicoproteínas	Prinsep <i>et al.</i> 1998.
Tolitoxina≡Citoficina		817,4878 [M + H] ⁺	<i>Tolypothrix conglutinata</i> * <i>Scytonema pseudohofmanni</i> *	Citotóxicas e fungicidas	Carmeli <i>et al.</i> 1990.

Continuação

Tricamida		1099 [M + H] ⁺	<i>Trichodesmium erythraeum</i> **	Tóxica	Sudek <i>et al.</i> 2006.
-----------	--	---------------------------	------------------------------------	--------	---------------------------

* Espécie terrestre; ** Espécie marinha

A ESPÉCIE *G. amphibium* (C. Agardh ex Gomont) Anagnostidis 1989

Geitlerinema amphibium pertence à ordem Oscillatoriales e à família Pseudanabaenacea.

O gênero apresenta-se sob a forma de filamentos homocitados, solitários ou emaranhados, com células mais longas que largas; há a presença de grânulos de carotenóides ou cianoficina nos pólos das células (Figura 1) (Komárek & Anagnostidis, 2005).

A cepa CCIBT 920 – *G. amphibium* apresenta-se na forma de tricomas solitários ou emaranhados, flexuosos, móveis; sem bainha; células cilíndricas, 1,2 a 2,4 vezes mais longas do que largas (média 1,7), 2,1-3,4µm (média 2,76µm) compr. x 1,3-2,1µm (média 1,64µm) larg; célula apical cilíndrica com extremidade arredondada, não capitada; septos com um grânulo de cada lado; conteúdo celular verde-azulado, homogêneo; reprodução por formação de hormogônios.

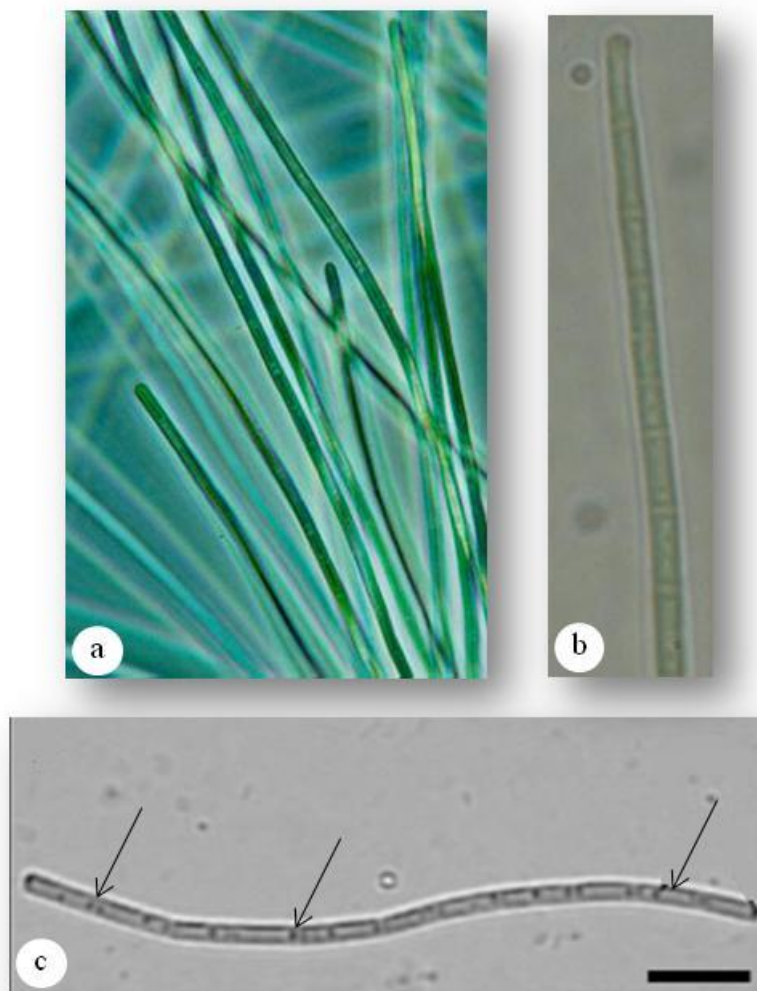


Figura 1. a) Fotografia ilustrando o gênero *Geitlerinema*, b) a cepa CCIBT 920 – *Geitlerinema amphibium* e c) fotografia indicando os grânulos (setas) presentes em cada um dos lados dos septos das células do tricoma. Fotografia a) Núcleo de Pesquisas em Ficologia; c) Bittencourt-Oliveira *et al.* 2009

A espécie *Oscillatoria* Brühl & Biswar *quadripunctulata* var. *unigranulata* Rama N. Singh, em 2000, passou a ser chamada *Geitlerinema unigranulatum* (Rama N. Singh) Komárek & Azevedo 2000, e *Oscillatoria amphibia* C. Agardh ex Gomont 1982, em 1989, passou a ser designada *Geitlerinema amphibium* Anagnostidis 1989.

Pesquisas recentes, que englobam estudos de morfologia, biologia molecular e ultraestrutura, sugerem que as espécies *G. unigranulatum* e *G. amphibium* sejam a mesma espécie. Em casos como este a denominação mais antiga passa a ser utilizada e, portanto, o nome a ser adotado neste caso é *Geitlerinema amphibium* (Bittencourt-Oliveira *et al.* 2009).

OCORRÊNCIA

O gênero *Geitlerinema* possui ampla distribuição e pode ocorrer tanto em corpos d'água marinhos (Myers *et al.* 2007) quanto continentais (Carvalho *et al.*, 2007; Sant'Anna *et al.* 2007).

No Brasil, *Geitlerinema amphibium* (*Geitlerinema unigranulatum*) foi encontrada principalmente nas regiões Sul e Sudeste, como no Paraná (Krupek *et al.* 2008), Minas Gerais (Souza 2007, Jardim *et al.* 2007) e São Paulo (Carvalho *et al.* 2004, Carvalho *et al.* 2007, Sant'Anna *et al.* 2007).

Chama atenção o fato de que, em alguns destes locais, a espécie foi encontrada também em reservatórios de abastecimento público. Pesquisas recentes mostram que *G. amphibium* apresenta mais de 50% de frequência nas Represas Billings e Guarapiranga (Lopes 2008, Sawatani 2008) que, juntas, abastecem mais de 3,8 milhões de pessoas da Região Metropolitana de São Paulo.

TOXICIDADE

Apesar de ser uma espécie com ampla distribuição e de ser freqüente em reservatórios de abastecimento público, não existem estudos voltados para avaliação da toxicidade de *G. amphibium* e para pesquisa de compostos bioativos produzidos pela espécie.

Há ausência de trabalhos na literatura mundial a respeito da toxicidade desta espécie e, no Brasil, apenas duas publicações falam sobre o assunto.

Na primeira, a potencial toxicidade do gênero foi mostrada por Zagatto *et al.* (1998) em duas cepas diferentes de *Oscillatoria amphibia* (= *G. amphibium*) provenientes da Represa Guarapiranga, em São Paulo. Na ocasião, os autores utilizaram o teste padrão em camundongos e observaram que ambas possuíam toxicidade baixa para cianotoxinas (Harada *et al.* 1999), com DL_{min} de 687 mg.Kg⁻¹. No entanto, os autores não fazem referência à natureza química da toxina em questão ou aos sinais e achados *post-mortem* apresentados pelos animais intoxicados.

Na segunda, Sant'Anna *et al.* (2008) avaliaram quanto à toxicidade a cepa SPC 920 – *Geitlerinema unigranulatum*, igualmente proveniente da Represa Guarapiranga. Neste trabalho, os autores, também fazendo uso do teste padrão em camundongos, mostraram que a cepa apresentava toxicidade e que os sintomas apresentados pelos

animais eram distintos dos causados pelas cianotoxinas conhecidas até o presente, sendo que neste caso também não foi feita referência à natureza química da(s) substância(s).

INFORMAÇÕES BÁSICAS SOBRE SISTEMA IMUNE: ÊNFASE EM IMUNIDADE INATA E INFLAMAÇÃO

Segundo Abbas & Lichtman (2007) e Jancar 2001, Imunidade é definida como a capacidade de um organismo em defender-se contra agentes nocivos; tal capacidade é conferida por um conjunto de células e moléculas que compõem o Sistema Imune ou Sistema Imunológico.

É função do sistema imune prevenir ou erradicar infecções já estabelecidas no organismo e, para isso, utiliza artifícios da Imunidade Inata (ou Natural) e da Imunidade Adquirida (ou Adaptativa). Assim, podemos afirmar que os mecanismos de defesa de um organismo são constituídos pela Imunidade Inata, que é responsável pela primeira linha de defesa contra infecções, ou seja, pode bloquear a entrada de microrganismos ou erradicar rapidamente os que conseguem penetrar nos tecidos do hospedeiro, e Imunidade Adquirida, responsável por uma resposta mais tardia e muito mais específica a diferentes infecções.

As principais características que definem as imunidades inata e adquirida estão resumidas na Tabela 3.

Tabela 3. Resumo das principais características da Imunidade Inata e da Imunidade adquirida.

Imunidade Inata	Imunidade Adquirida
Primeira linha de defesa do organismo	Demora alguns dias a se estabelecer
Não guarda memória	Possui memória
Constitui-se principalmente de: - Barreiras físicas e químicas; - Fagócitos e células NK	Constitui-se principalmente de linfócitos
Reconhecimento de agentes nocivos através de receptores que reconhecem padrões moleculares.	Reconhecimento de agentes nocivos através de receptores específicos.

Segundo o exposto, pode-se afirmar que fazem parte da imunidade inata barreiras físicas (pele e mucosas, por exemplo) e químicas (pH ácido nos tratos digestório e genitourinário e secreção de substâncias com atividade antimicrobiana, por exemplo), além da defesa celular, que inclui principalmente os leucócitos polimorfonucleares (PMN) (neutrófilos, eosinófilos, basófilos e mastócitos), os macrófagos e as células Natural Killer (NK). Ainda, têm importante papel na imunidade inata, proteínas e peptídeos solúveis no soro, denominadas citocinas e quimiocinas, que medeiam as reações imunes e inflamatórias e que podem ser produzidas por diversos tipos celulares.

Os neutrófilos e macrófagos, também denominados fagócitos, possuem papel fundamental na imunidade inata: os neutrófilos estão presentes no sangue e são os primeiros a chegarem ao local infectado, pois possuem rápida velocidade de migração e alto potencial de diapedese. Os macrófagos estão presentes no sangue, onde são denominados monócitos, e também em vários tipos de tecido conjuntivo (baço, linfonodos, fígado, etc.) e cavidades, como a peritoneal e pleural. Ao contrário dos neutrófilos, que morrem após fagocitarem, os macrófagos removem restos celulares de tecidos lesados, o que é essencial para a reparação tecidual, e fazem a ligação entre imunidade inata e adquirida, pois fagocitam e processam o microrganismo para apresentar antígenos aos linfócitos.

O reconhecimento de microrganismos pelos fagócitos ocorre através de receptores que reconhecem padrões moleculares, ao contrário dos linfócitos da imunidade adquirida, os quais possuem grande diversidade de receptores para muitos tipos de moléculas.

Dentre os grupos de receptores que reconhecem padrões moleculares incluem-se os receptores para manose, que reconhecem carboidratos (manose e β galactose) presentes em diversos microrganismos, mas não em células humanas, e incluem-se também os receptores semelhantes ao Toll (TLR), que reconhecem distintos padrões moleculares oriundos de bactérias. Alguns exemplos são o TLR-2, que reconhece os peptideoglicanos presentes na parede celular de bactérias Gram-positivas, o TLR-4, que reconhece os lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular de bactérias Gram-negativas, e o TLR-5, que reconhece a flagelina, presente em algumas bactérias móveis.

Em resumo, após passar por barreiras físicas e químicas, o microrganismo é reconhecido por macrófagos e neutrófilos que, quando ativados produzem substâncias que irão induzir uma resposta imune ou inflamatória.

INFLAMAÇÃO

Nos casos em que o microrganismo consegue passar por barreiras físicas e químicas, têm início diversas reações bioquímicas, vasculares e celulares, denominadas inflamação. A reação inflamatória, no entanto, ocorre sempre que há dano, independente da presença de um agente infeccioso, pois o organismo do hospedeiro age no sentido de restaurar a integridade perdida. Portanto, é importante saber que “toda infecção (com poucas exceções) é inflamatória, mas nem toda inflamação é infecciosa”.

A inflamação é caracterizada principalmente por quatro sinais e sintomas: tumor, dor, rubor e calor, que se iniciam na microcirculação sanguínea, composta principalmente de arteríolas, capilares e vênulas pós-capilares. No local lesado há, inicialmente, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e acúmulo de leucócitos, eventos que ocorrem devido à liberação de mediadores pró-inflamatórios (mediadores lipídicos e citocinas).

A vasodilatação leva a um maior aporte de sangue no local, fato que é responsável pelo calor e rubor. Ainda, com o aumento da permeabilidade, pode haver acúmulo de líquidos nos tecidos, que pode causar inchaço na região (tumor denominado edema) e pressionar terminações nervosas causando dor.

O acúmulo de leucócitos, por sua vez, ocorre em três etapas: 1) aumento do número de leucócitos rolantes nas vênulas próximas ao local lesado (também denominado *rolling* ou rolamento de leucócitos), 2) adesão dos leucócitos ao endotélio das vênulas e 3) migração destes leucócitos para o tecido. O aumento do rolamento é mediado por moléculas de adesão da classe das selectinas, a firme adesão ao endotélio venular é mediada por moléculas da classe das integrinas e, finalmente, a transmigração através do endotélio é mediada por imunoglobulinas.

Tais etapas são reguladas por diferentes moléculas de adesão expressas após a liberação de citocinas pró-inflamatórias [interleucina-1 (IL-1), Interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)] produzidas, principalmente, por macrófagos ativados após entrarem em contato com o microrganismo.

Deste processo participam também quimiocinas (citocinas quimioatraentes) capazes de atrair quimicamente neutrófilos, caso da quimiocina KC (*Keratinocyte-derived chemokine*) de camundongos, homóloga à interleucina-8 (IL-8) de humanos, e da quimiocina MCP-1 (*Monocytes chemotactic protein -1*), responsável pela atração de macrófagos.

Assim, com base no exposto, é correto afirmar que substâncias que interfiram nestes eventos podem causar sérios danos à saúde humana.

A MICROSCOPIA INTRAVITAL

O teste-padrão para a pesquisa de cianotoxinas é o teste em camundongo (Harada *et al.* 1999). Entretanto, esse teste não caracteriza suficientemente o modo de ação de substâncias como as saxitoxinas, cuja toxicodinâmica impossibilita a observação de lesões anatômicas e não permite a visualização de seus efeitos “*in vivo*” (Van Apeldoorn *et al.* 2007).

A Microscopia Intravital (MI) permite a visualização direta da rede microcirculatória em animais anestesiados e vivos e utiliza tecnologia de ponta para gerar informações sobre o mecanismo de ação de uma toxina, fornecendo indicações que só seriam obtidas pelo emprego de diversas análises.

Os modelos animais utilizados para os experimentos são, principalmente, camundongos, ratos e coelhos, e pode ser observada a microcirculação de diferentes tecidos, como o mesentério, pulmões, pele (utilizando camundongos *nude*) e músculo cremáster (que reveste os testículos) (Gavins & Chatterjee 2004, Kuebler *et al.* 2007, Vajkoczy *et al.* 2000).

Deste modo, fazendo uso deste método, é possível observar a dinâmica dos eventos fisiológicos e patológicos que ocorrem nos microvasos, contando com a participação dos elementos figurados do sangue, componentes do plasma, variações hemodinâmicas e alterações morfológicas das paredes vasculares (Raud & Lindborn 1994).

Além do papel fisiológico, os vasos da microcirculação participam ativamente de processos patológicos, pois respondem a estímulos nocivos ou a substâncias endógenas com alterações morfológicas e funcionais características. Por isso, sua observação permite diagnosticar principalmente hipertensão, distúrbios hemostáticos e os eventos que ocorrem na resposta inflamatória, conforme descrito anteriormente. Além disso, no caso do músculo cremáster, também é possível verificar alterações nas fibras musculares.

No Brasil, a Microscopia Intravital é utilizada principalmente em pesquisas sobre veneno de ofídios, toxinas de anfíbios e animais aquáticos (Lopes-Ferreira *et al.* 2002; Clissa *et al.* 2006, Conceição *et al.* 2006, Magalhães *et al.* 2006, Junqueira *et al.*

2007) e, até o presente, apenas um trabalho utiliza a metodologia para avaliar os efeitos de cianotoxinas muito conhecidas e vastamente estudadas (microcistina-LR, -YR e -RR) sobre o rolamento de leucócitos (Kujbda *et al.* 2009). Com exceção deste, não há estudos que permitam observar os efeitos de metabólitos de cianobactérias “*in vivo*”.

OBJETIVO GERAL

Identificar a fração tóxica no extrato metanólico da cepa CCIBT 920 *Geitlerinema amphibium* (Cyanobacteria, Oscillatoriales) e estudar seu modo de ação.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar a cepa CCIBT 920 - *Geitlerinema amphibium*, obter seu extrato metanólico e testar sua toxicidade.
- Analisar os efeitos do extrato metanólico de CCIBT 920 - *Geitlerinema amphibium* sobre a microcirculação e fibras musculares de camundongo, através da microscopia intravital.
- Verificar o padrão de indução da produção de citocinas e do recrutamento celular pelo extrato de CCIBT 920 - *Geitlerinema amphibium*.
- Avaliar o potencial inibitório da enzima acetilcolinesterase sobre o extrato metanólico de CCIBT 920 - *Geitlerinema amphibium*.
- Fracionar o extrato metanólico e avaliar o efeito de cada uma das frações sobre a microcirculação e fibras musculares de camundongo, através da microscopia intravital.

MATERIAL E MÉTODOS

A CEPA EM ESTUDO: CCIBT 920 – *Geitlerinema amphibium*

A cepa CCIBT 920 – *G. amphibium* foi coletada em agosto de 2002, na Represa Guarapiranga, sendo mantida no Banco de Cultura de Cianobactérias do Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica de São Paulo, sob temperatura de $23 \pm 1^\circ$ C, irradiância de $40\text{-}50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 14 - 10h claro-escuro, em meio ASM-1.

PRODUÇÃO DE BIOMASSA

PREPARO DO MEIO ASM-1, UTILIZADO PARA O CULTIVO DA ESPÉCIE EM ESTUDO

O meio ASM-1 (Aguiar e Azevedo in CETESB 1992) foi preparado em três etapas, como segue:

1. Preparo das soluções-estoque A, B, C e D, que compõem o meio (Tabela 4). Tais soluções são imediatamente congeladas após o preparo;
2. O meio concentrado foi produzido a partir das soluções-estoque, segundo as indicações da Tabela 5;
3. Por fim, o meio concentrado foi diluído em água deionizada e esterilizado em autoclave a 120° C, por trinta minutos, resfriado a temperatura ambiente e empregado na cultura e multiplicação da cepa. São necessários 22,5 mL de meio concentrado para produzir 1 litro de meio de cultura.

Tabela 4. Composição das soluções-estoque para o preparo do meio ASM-1.

Solução-estoque	Componentes	Quantidade (g/l)
A (200 ml de água bideionizada.)	NaNO_3	1,7000g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,4900g
	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,4100g
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2900g
B (100 ml de água bideionizada.)	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1,1400g
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1,7800g
	H_3BO_3	2,4800g
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,3900g
C (100 ml de água bideionizada.)	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,0800g
	ZnCl_2	0,3350g
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0190g
	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0014g
D (100 ml de água bideionizada.)	EDTA	1,8600g

Tabela 5. Preparo do meio concentrado.

Solução-estoque	Alíquota
A	400 ml
B	40 ml
C	2 ml
D	8 ml

MULTIPLICAÇÃO DA CEPA

Para a obtenção de biomassa necessária para os estudos, a cepa CCIBT 920 – *G. amphibium* foi cultivada sob as condições constantes e controladas de temperatura e luminosidade descritas anteriormente, de acordo com o seguinte protocolo (Figura 2):

1. 5 mL de inóculo foram transferidos para frasco contendo 50 mL de meio de cultura, mantidos sob rotação constante ($70 \text{ rotações.minuto}^{-1}$);
2. constatado o crescimento do organismo, 50 mL desta cultura foram transferidos para 500 mL do mesmo meio, ainda sob rotação constante;
3. novamente, após o crescimento da cultura, 500 mL da mesma foram transferidos para 5.000 mL do meio de cultura. Nesta etapa, a rotação foi substituída por aeração constante e o fotoperíodo foi substituído por iluminação também constante. Essas condições foram mantidas até a fase estacionária de crescimento (20 dias aproximadamente).

Como a demanda por biomassa, nesse estudo, foi consideravelmente grande, foram cultivados diversos inóculos ao mesmo tempo.



Figura 2. Esquema do processo de multiplicação da cepa CCIBT 920 – *Geitlerinema amphibium*.

OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES

EXTRAÇÃO

A biomassa resultante do cultivo da cepa foi liofilizada, pesada e submetida à extração com MeOH/H₂O 75:25 v/v (5x), por exposição a ultra-som (40 x 30 sec., 50-w) para lise celular e centrifugada a 1045 x g por 50 minutos (Fastner, *et al.* 1998). Os sobrenadantes foram reunidos, concentrados a vácuo e pesados para obtenção do peso do extrato metanólico.

Parte deste extrato metanólico foi utilizada para o cálculo da DL_{min} , por teste padrão em camundondos e para as análises por microscopia intravital.

O restante do extrato metanólico foi dividido em alíquotas de 20 mg as quais foram fracionadas por Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) (Figura 3).

FRACIONAMENTO

Para o fracionamento do extrato metanólico por CCDP, alíquotas de 20 mg de extrato metanólico, diluídas em 500 μ L de solução de MeOH/H₂O 75:25 foram aplicadas a cromatoplasas Analtech Uniplate Sílicagel Preparative Layer UV₂₅₄, 20x20cm, 1000 μ ; após a eliminação do solvente sob corrente de ar, os cromatogramas foram desenvolvidos na fase móvel constituída por CHCl₃/MeOH/H₂O 64:36:08 v/v/v.

Após secagem, as placas foram observadas sob radiação ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda (λ) de 254 e 365 nm e demarcadas manualmente.

As faixas (frações) demarcadas foram retiradas manualmente das cromatoplasas, sendo as mais polares extraídas com ácido acético 0,1 M (valores de “R_f” menores) e as apolares (valores de “R_f” maiores), com CHCl₃/ MeOH/H₂O 64:36:08 v/v/v.

Todas as frações obtidas foram concentradas e/ou liofilizadas, submetidas a teste em camundongo e à análise por microscopia intravital, para determinação da fração tóxica (Figura 3).

ESTUDO DAS FRAÇÕES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MALDI-MS)

As frações foram submetidas à Espectrometria de Massas em equipamento MALDI-MS- Shimadzu Biotech Launchpad 2.8.2.20080604, no modo Reflectron, intervalo de massas 100 a 50.000 D. Foram utilizados, para a calibração interna, os seguintes padrões: Bradicinina (fragmento) M = 756,3997 D; ACTH (fragmento) M = 2.465,1989 D e P14R M = 1.532,8582 D. Como matriz, foi empregado o ácido sinápico 98% Sigma.

OBTENÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO, POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE), DA FRAÇÃO COM ATIVIDADE ANTI-ACHE

Para as análises por CLAE foi utilizado cromatógrafo Dionex, com bomba automática P680 HPLC, detector UVD340U e software Chromeleon versão 6.66.

Como solvente A foi utilizado TFA 0,1 % e como solvente B ACN/TFA 0,1%. A corrida cromatográfica foi feita em coluna analítica Analtech, o comprimento de onda (λ) foi de 220 nm e fluxo de 1 mL.min⁻¹. A duração da corrida cromatográfica foi de 50 minutos, com o seguinte gradiente de solventes:

0 a 5 min.: 5% de B

6 a 30 min.: de 5 a 100% de B

31 a 40 min.: 100% de B

41 a 45 min.: de 100 a 5% de B

46 a 50 min.: 5% de B.

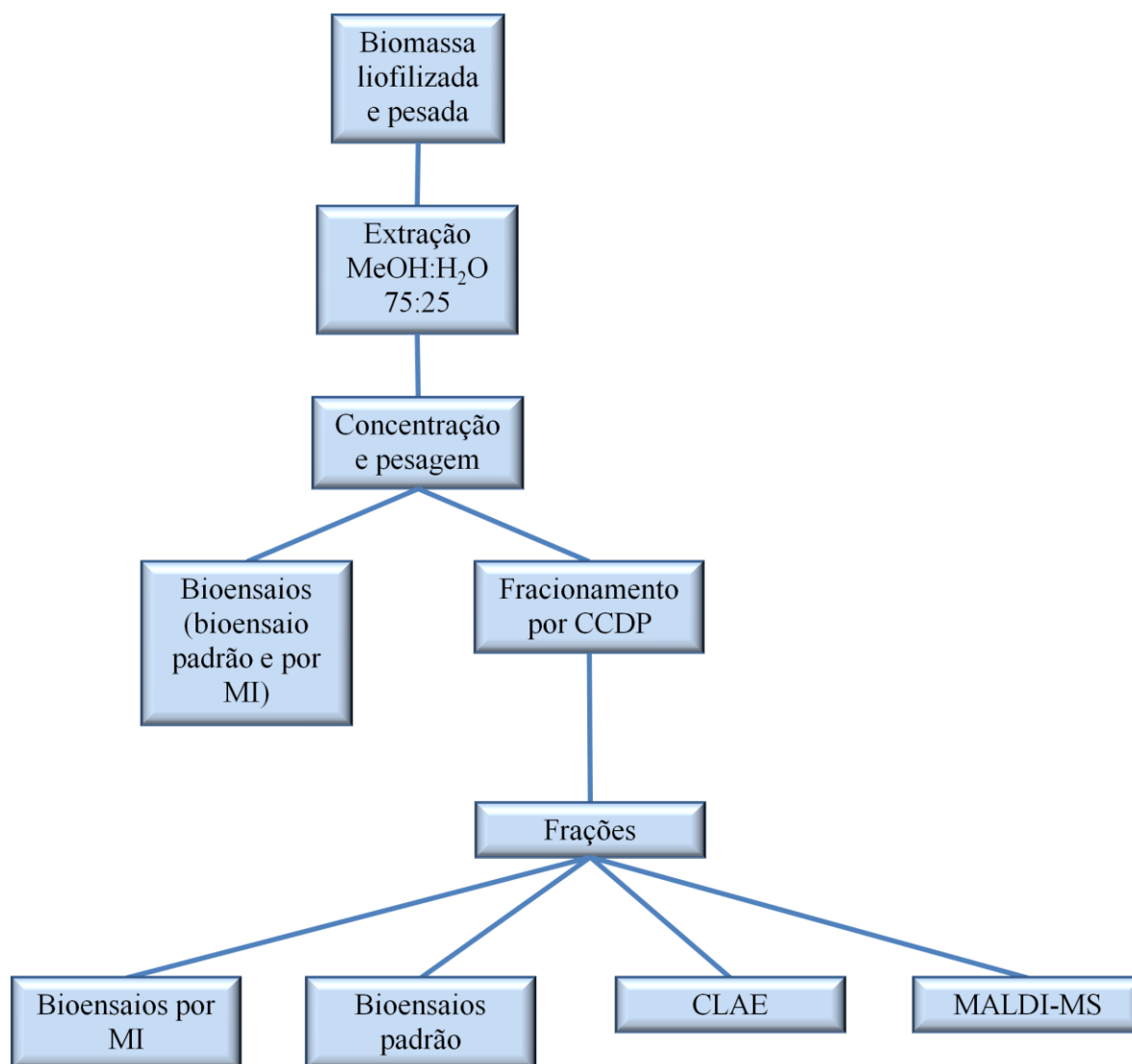


Figura 3. Esquema do processo de extração da biomassa e fracionamento do extrato metanólico de CCIBT 920 – *Geitlerinema amphibium*.

OBTENÇÃO DO EXTRATO DE CCIBT 639 – *Scytonema* sp.

A biomassa da cepa CCIBT 639 - *Scytonema* sp. foi obtida segundo o protocolo utilizado para a obtenção da biomassa da cepa CCIBT 920 *G. amphibium*. Após ser liofilizada, foi submetida à extração com ácido acético 0,1M (5x), por exposição a ultrasom (40 x 30 sec., 50-w); o extrato obtido foi centrifugado a 1045 x g por 50 minutos (Fastner, *et al.* 1998). Os sobrenadantes foram reunidos, liofilizados e pesados.

ESTUDOS BIOLÓGICOS

ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss, com peso variando de 18 a 22 g, provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan.

Nos dias que antecederam cada experimento, os animais foram mantidos em grupos de cinco por caixa, com água e ração *ad libitum*, em condições controladas (temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$; ciclo 12/12h claro/escuro e sistema de exaustão) no biotério do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada.

TESTE PADRÃO EM CAMUNDONGOS

Para confirmar a toxicidade da cepa e calcular a DL_{min} , as quantidades de 20, 15, 10, 5 e 2,5 mg [correspondentes a 1000, 750, 500, 250 e 125 mg.Kg^{-1} de peso corpóreo (p.c), respectivamente] de extrato metanólico foram ressuspensas em 500 μL de solução salina estéril/diluyente e injetadas intraperitonealmente (i.p.) nos camundongos.

Os testes foram também utilizados para monitorar o fracionamento do extrato metanólico por CCDP; cada faixa (fração) extraída e processada (equivalente a 20 mg de extrato metanólico) foi diluída em 500 μL de solução salina estéril/diluyente e injetada i.p. nos camundongos.

Em todos os testes, os sinais de intoxicação foram observados e anotados, o período de observação foi de sete dias e o n, no mínimo, igual a 3. Como controle negativo, foi utilizado o mesmo volume de solução salina estéril/diluyente.

CONFEÇÃO DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS

Para a avaliação das alterações histopatológicas nos principais órgãos dos camundongos, os testes seguiram os mesmos procedimentos descritos anteriormente. As doses administradas intraperitonealmente foram de 10 mg (500 mg.Kg^{-1}) de extrato metanólico e, após o óbito dos animais, os pulmões, o rim esquerdo e o fígado foram retirados e preservados em formol 4 %.

Para a avaliação de um possível efeito dose-resposta, foi administrada também a dose de 2,5 mg (125 mg.Kg^{-1}) de extrato metanólico. Neste caso, após 24 horas da inoculação, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os mesmos órgãos (pulmões, rim esquerdo e fígado) foram retirados e preservados em formol 4%. Como controle negativo, para todas as doses e períodos, foi utilizado o mesmo volume de solução salina estéril/diluyente e o $n=3$, por grupo de animais.

As lâminas histológicas confeccionadas com os órgãos preservados desses animais foram preparadas segundo metodologia padronizada e coradas com hematoxilina e eosina (HE).

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE LIPOPOLISSACARÍDEOS NO EXTRATO METANÓLICO DE CCIBT 920 – *G. amphibium* PELO TESTE DE POLIMIXINA B

Para essa avaliação, foram formados 4 grupos de animais (camundongos) sendo que o primeiro recebeu concomitantemente, 500 mg.Kg^{-1} de extrato metanólico e 1 mg.Kg^{-1} de polimixina B (920+POL.B), antibiótico conhecido por inibir a atividade inflamatória dos LPS de bactérias Gram-negativas (Danner *et al.* 1989); o segundo grupo foi tratado somente com 1 mg.Kg^{-1} de polimixina B (POL.B), ao terceiro, foram administrados 500 mg.Kg^{-1} do extrato (CCIBT 920) e, por fim, o grupo controle negativo foi tratado apenas com solução salina estéril/diluyente (Co). A administração ocorreu por via intraperitoneal e, para cada grupo, $n=3$.

TESTES POR MICROSCOPIA INTRAVITAL

PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

O método utilizado foi o de Lomonte *et al.* (1994): os camundongos foram anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol® Cristália; 50 mg.Kg^{-1}) e mantidos

sobre placa com temperatura controlada (37° C). Por manipulação cirúrgica da bolsa escrotal, o músculo cremáster foi exposto e fixado em área transparente da placa. Esta foi posicionada sobre o *charriot* do microscópio óptico, para possibilitar visualização “*in vivo*” da microcirculação local e das fibras musculares (Figura 4). As preparações foram mantidas úmidas e aquecidas por irrigação com PBS (phosphate buffer saline) 0.15 M.

Após o procedimento cirúrgico, foram feitas observações com intervalos de cinco minutos, até o fim do experimento (30 minutos), sendo as observações denominadas T=0', T=5', T=10', T=15', T=20', T=25' e T=30', respectivamente.

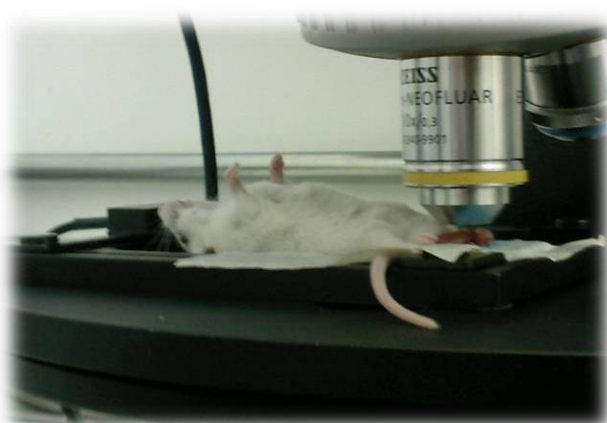


Figura 4. Foto apresentando o posicionamento do camundongo e do músculo cremáster sobre placa aquecida para visualização ao microscópio óptico.

PARÂMETROS ANALISADOS

Foram avaliados, por microscopia intravital, os seguintes parâmetros:

Na fibra muscular: hipercontração;

Na arteríola: diâmetro para analisar contração ou vasodilatação e alterações no fluxo;

Na vênula pós-capilar: velocidade de rolamento dos leucócitos, número de leucócitos rolando pelo vaso, número dos firmemente aderidos, número dos que transmigraram e alterações no fluxo.

A velocidade dos leucócitos rolantes, expressa em micrômetros por segundo, é definida como o cociente entre o espaço de 100 μm percorrido pelo leucócito e o tempo

gasto para percorrê-lo. O número de leucócitos aderidos à vênula é quantificado em área de 100 μm de comprimento. Um leucócito é considerado firmemente aderido ao endotélio da vênula se permanece parado por, no mínimo, 30 segundos. A transmigração de leucócitos é definida como o número de leucócitos que ultrapassa a vênula, por campo de visão (Granger & Kubes 1994).

ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO DE CCIBT 920 – *G. amphibium*

Inicialmente, três doses de extrato metanólico de CCIBT 920 – *G. amphibium* foram aplicadas topicamente sobre o músculo cremáster de camundongos: 20, 40 e 120 μg diluídos em 20 μL de solução salina estéril/diluyente. Como controle negativo, para todas as doses, foi utilizado o mesmo volume de solução salina estéril/diluyente.

Nas análises nas quais a via de administração foi intraperitoneal, as doses foram: 120 μg , 2.5, 5, 10 e 20 mg (equivalentes a 6, 125, 250, 500 e 1000 mg.Kg^{-1} respectivamente), diluídos em 500 μL de solução salina estéril/diluyente, sendo que para todas as doses foram realizadas análises após os períodos de 30 e 120 minutos da inoculação (Figura 5). Como controle negativo, em todas as doses e períodos, foi utilizado o mesmo volume de solução salina estéril/diluyente. Em todas as análises, em cada grupo de animais, $n=3$.

ADMINISTRAÇÃO DAS FRAÇÕES

Para avaliar os efeitos das frações, obtidas a partir do extrato metanólico de *G. amphibium*, sobre a microcirculação e verificar qual(is) dela(s) causa(m) o efeito observado pela administração do extrato, foram escolhidas duas doses : 1 e 2 mg (50 e 100 mg.Kg^{-1} , respectivamente) de cada fração, sendo essas doses diluídas em solução salina estéril/diluyente e administradas i.p. As análises ao microscópio foram feitas após o período de trinta minutos de inoculação (Figura 5) e, como controle negativo, foi utilizado o mesmo volume de solução salina estéril/diluyente. Em todas as análises, em cada grupo de animais, $n=3$.

ADMINISTRAÇÃO DA CIANOTOXINA MICROCISTINA-LR

Para estabelecer padrões de comparação com cianotoxina conhecida, foram feitas análises com a microcistina-LR (MC-LR) (Sigma, 95% de pureza). A dose, administrada i.p., foi de 1,25 µg (equivalente a 62,5 µg.Kg⁻¹), diluída em 500 µL de solução salina estéril/diluyente; após o período de 15 minutos da inoculação, o músculo cremáster foi exposto, para observação dos efeitos tóxicos (Figura 5). Como controle negativo, foi utilizado o mesmo volume de solução salina estéril/diluyente. Em todas as análises, n=3 em cada grupo.

ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO EM ÁCIDO ACÉTICO DE CCIBT 639 *Scytonema* sp.

Primeiramente, a fim de observar os principais efeitos causados pelo extrato de CCIBT 639 – *Scytonema* sp., foram administradas topicamente três doses: 20, 40 e 120 µg, diluídos em solução salina estéril/diluyente.

Após estes testes preliminares, foram administradas, por via intraperitoneal, doses de 2,5 mg e 20 mg de extrato (125 e 1000 mg.Kg⁻¹, respectivamente); para a primeira dose foi observado tempo de incubação de 30 minutos e a para a segunda, de 30 e 120 minutos (Figura 5). Como controle negativo, foi utilizado o mesmo volume de solução salina estéril/diluyente. Em todas as análises, n=3 por grupo.

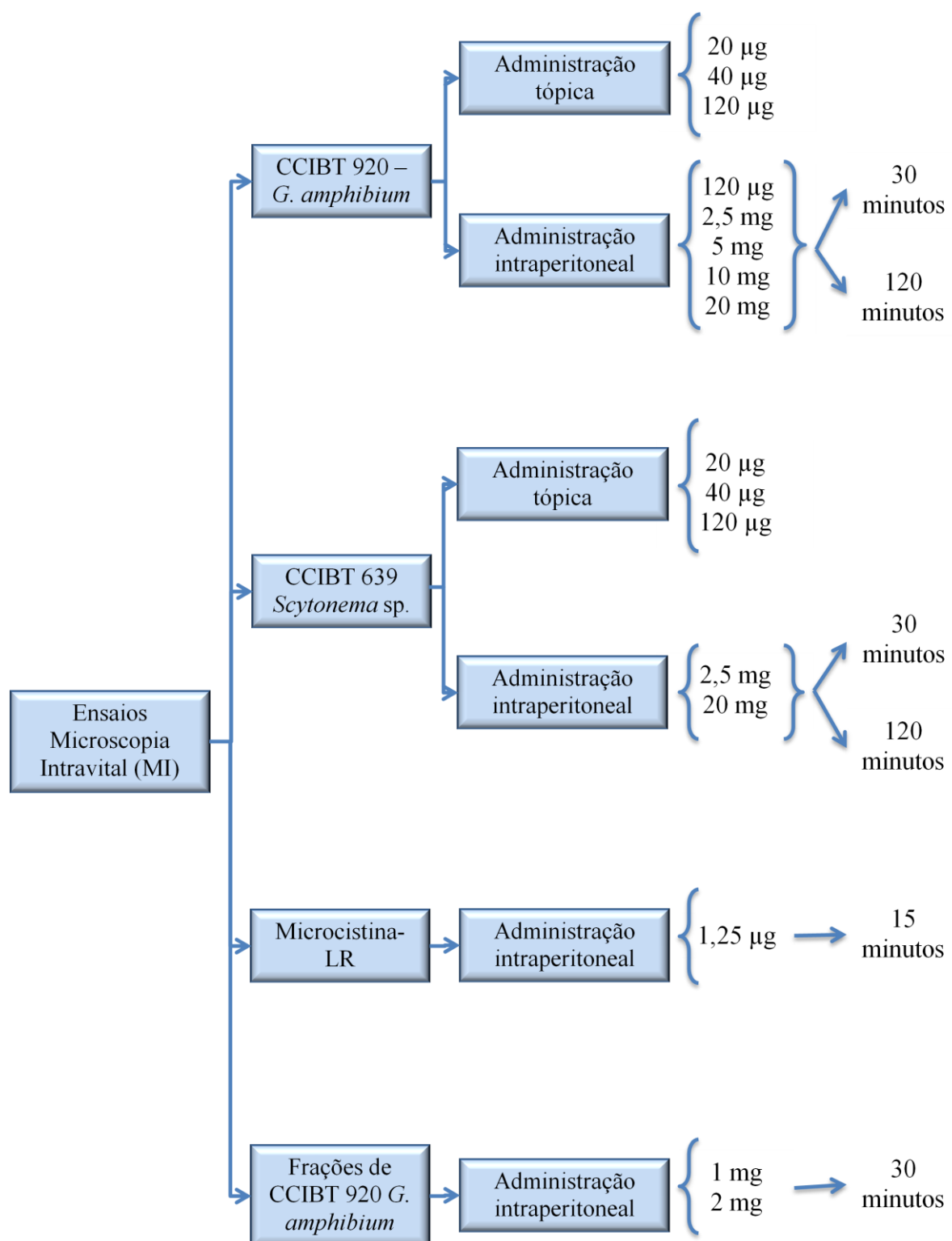


Figura 5. Esquema apresentando as doses e períodos de incubação utilizados nas análises por microscopia intravital.

DOSAGEM DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS DO LAVADO PERITONEAL E SANGUE

PREPARAÇÃO DO MATERIAL: LAVADO PERITONEAL

Os camundongos (n=5) foram inoculados com 2,5 mg de extrato metanólico de CCIBT 920 – *G. amphibium* diluídos em 500 µL de solução salina estéril/diluyente. O grupo controle foi tratado apenas com 500 µL de solução salina estéril/diluyente. Após quatro períodos de incubação distintos (0,5, 2, 6 e 24 horas) os animais foram mortos e foi realizada a lavagem da cavidade peritoneal com 5 mL de solução PBS + EDTA 50 mM, para obtenção da suspensão celular. Esta suspensão foi centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos, a 4° C e o sobrenadante foi separado e armazenado a -20° C, para posterior utilização na dosagem de citocinas e quimiocinas. O botão celular foi ressuspenso em 1 mL solução de PBS + BSA 0,1% para as contagens total e diferencial de leucócitos (Lima *et al.* 2003).

CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS

A contagem total de leucócitos foi feita em Câmara de Neubauer, como segue: 10 µL da solução do botão celular obtido pelo lavado peritoneal foram diluídos em 200 µL de Solução de Turk (0,2 % de azul de cristal de violeta em 30% de ácido acético). A Câmara de Neubauer foi então preenchida e a contagem dos quatro quadrantes foi feita ao microscópio óptico. O resultado da contagem foi multiplicado por 21 (diluição) e expresso em cels x 10⁴.

A contagem diferencial foi feita em uma alíquota de 100 µL da solução do botão celular, submetido à centrifugação por 10 minutos em centrífuga Cytospin. Cada lâmina foi corada com Hema-3, para exame ao microscópio óptico. Foi feita a contagem de 200 células, diferenciadas em macrófagos e neutrófilos, em campos aleatórios da lâmina.

DOSAGEM DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS POR ELISA

Foram dosadas no sobrenadante do lavado peritoneal as quimiocinas KC e MCP-1, e as citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α .

A dosagem foi feita segundo o protocolo de Junqueira *et al.* (2007), com algumas modificações, como segue: placas de 96 poços (Costar) distintas foram

sensibilizadas (100 μ L por poço) com anticorpos monoclonais específicos para cada quimiocina e citocina: anti-KC, anti-IL-1 β e anti-IL-6 diluídos em tampão carbonato pH 9,6 e anti-TNF- α e anti-MCP-1 diluídos em tampão fosfato pH 6,5. Após período de incubação de 1 hora, à temperatura de 37° C, foram lavadas com PBS + Tween 0,05% (PBST) e novamente incubadas a 37° C, por 18 horas, com 200 μ L de solução PBS+BSA 10%, por poço. A este período de incubação seguiram-se outra série de lavagens, e novo período de incubação de 3 horas a 4° C, agora com os respectivos anticorpos recombinantes, para a confecção da curva-analítica e análise das amostras (100 μ L por poço); após a lavagem, os poços foram preenchidos com 100 μ L dos respectivos anticorpos de detecção e permanecerem por mais 1 hora, à temperatura ambiente. Por fim, as placas foram incubadas com 100 μ L por poço de estreptoavtidina-peroxidase, por 1 hora, à temperatura ambiente.

As placas foram então reveladas pela adição de 100 μ L de solução de 3.3' 5.5' tetrametilbenzidina (TMB) e água oxigenada (H₂O₂) 1:1, sendo a reação interrompida pela adição de 50 μ L de ácido cítrico 0,2 M, por poço (Figura 6).

A leitura das placas foi feita a 450 nm em espectrofotômetro Victor 3 (Multilabel Counter, PerkinElmer), e os limites de detecção para cada quimiocina e citocina foram os seguintes (em pg.mL⁻¹): quimiocina KC: 3.9, MCP-1: 7.81, IL-6: 31.25, IL-1: 15.62 e TNF- α : 1.9.

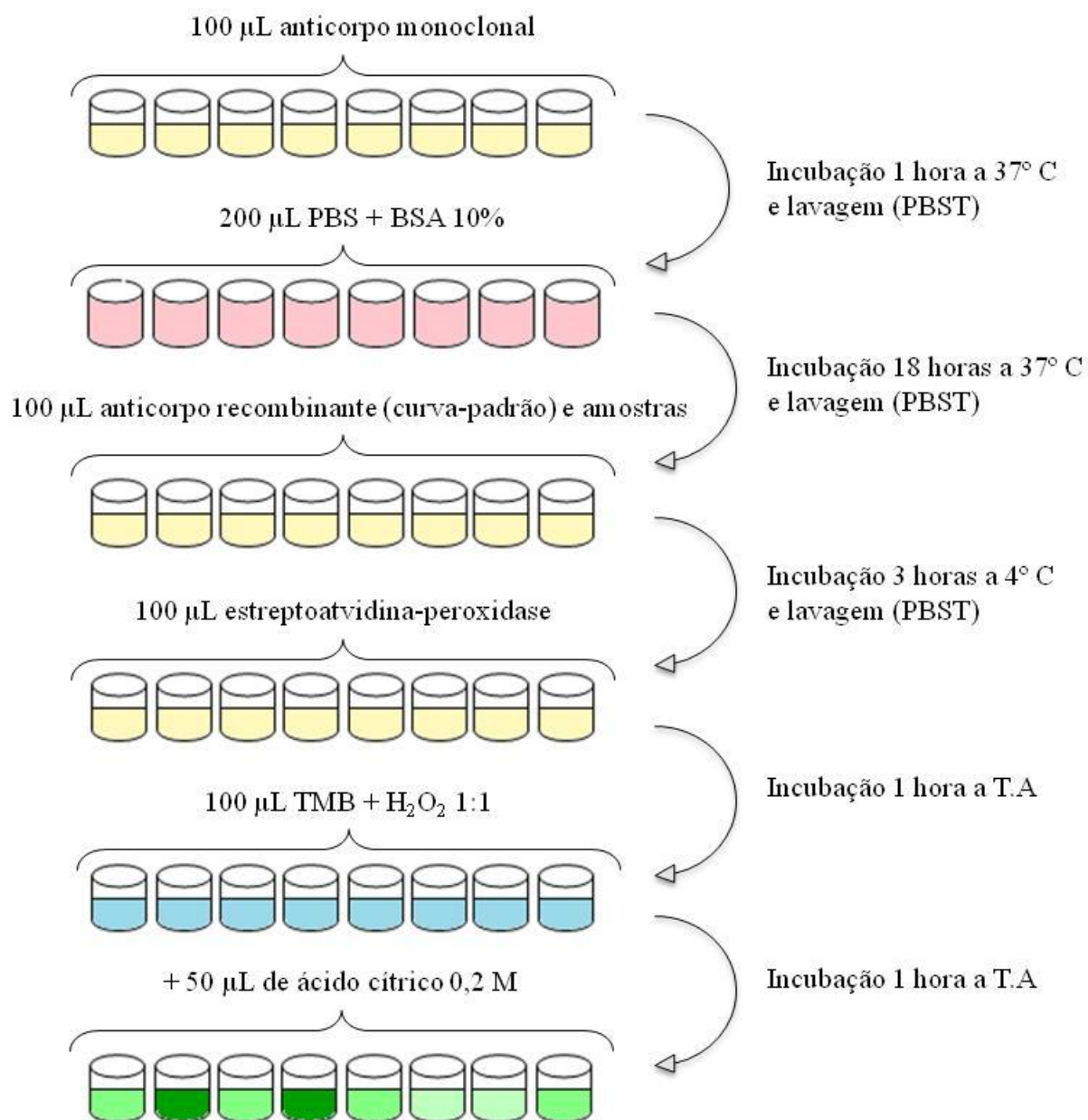


Figura 6. Esquema do ensaio imuno-enzimático (ELISA) para a dosagem de quimiocinas e citocinas.

CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS NO SANGUE

Camundongos (n=5) foram inoculados i.p. com 2,5 mg de extrato metanólico de *G. amphibium* e, após 30 minutos de incubação foi feita sangria pelo plexo oftálmico para as contagens total e diferencial de leucócitos.

Para a contagem total, 10 μ L de sangue foram diluídos em 200 μ L de Solução de Turk (0,2 % de azul de cristal de violeta em 30% de ácido acético). A Câmara de Neubauer foi então preenchida e a contagem dos quatro quadrantes foi feita ao microscópio óptico. O resultado da contagem foi multiplicado por 21 (diluição) e expresso em cels $\times 10^4$.

Para a contagem diferencial, 5 μ L de sangue foram utilizados para a confecção do esfregaço sanguíneo, que foi corado com Hema-3, para exame ao microscópio óptico. Foi feita a contagem de 200 células, diferenciadas em macrófagos e neutrófilos, em campos aleatórios da lâmina.

ENSAIO BIOAUTOGRÁFICO PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTI-ACHe

Para avaliar o potencial inibitório de CCIBT 920 – *G. amphibium* sobre a enzima acetilcolinesterase, o extrato metanólico foi aplicado sobre cromatoplaça de gel de sílica e eluído com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 64:36:08 (v/v/v); após a eluição, a cromatoplaça foi seca em corrente de ar e empregada em autobiografia para detecção de atividade anticolinesterásica.

Segundo o protocolo, a enzima acetilcolinesterase (500 U) foi dissolvida em tampão Tris 0,05 M (pH 7,8) e estabilizada pela adição de 150 μ g de albumina de soro bovino. Esta solução foi mantida à temperatura de 4 °C e nebulizada sobre a cromatoplaça, que foi então incubada a 37 °C, durante 20 minutos.

A seguir, a placa foi nebulizada com solução de 1-naftil acetato em etanol e de *Fast Blue B salt* em água que, reagindo com a enzima, mudou a coloração da placa para púrpura em 1 a 2 minutos. Se presentes, substâncias capazes de inibir a ação da enzima acetilcolinesterase, formam manchas brancas contra o fundo púrpura (Marston, Kissling & Hostettmann 2002). Como padrão positivo foram utilizados 5 μ L de solução-mãe do alcalóide fisostigmina, em concentração de 1 mg/mL (3,63 mM).

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0 para todas as análises. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média, e as diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para as citocinas e Bonferroni para as células. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

EXTRATO METANÓLICO E FRAÇÕES DE CCIBT 920 – *G. amphibium*

O rendimento do extrato metanólico de CCIBT 920 – *G. amphibium* foi de, em média, 33,59 % em relação à biomassa total, o que equivale à aproximadamente 253,27 mg.

O fracionamento do extrato metanólico, empregando CCDP, resultou na obtenção de 6 frações (Figura 7). Como as faixas (frações) são constituídas por mais de uma substância, adotou-se o cociente entre a distância do ponto de aplicação da amostra ao centro da faixa e a distância do ponto de partida ao “front” do cromatograma como parâmetro para a determinação dessas faixas (Tabela 6).

Esse cociente, análogo ao R_f , que caracteriza cada fração e uniformiza as medidas usadas para a extração das faixas, foi denominado “ R_f ”.

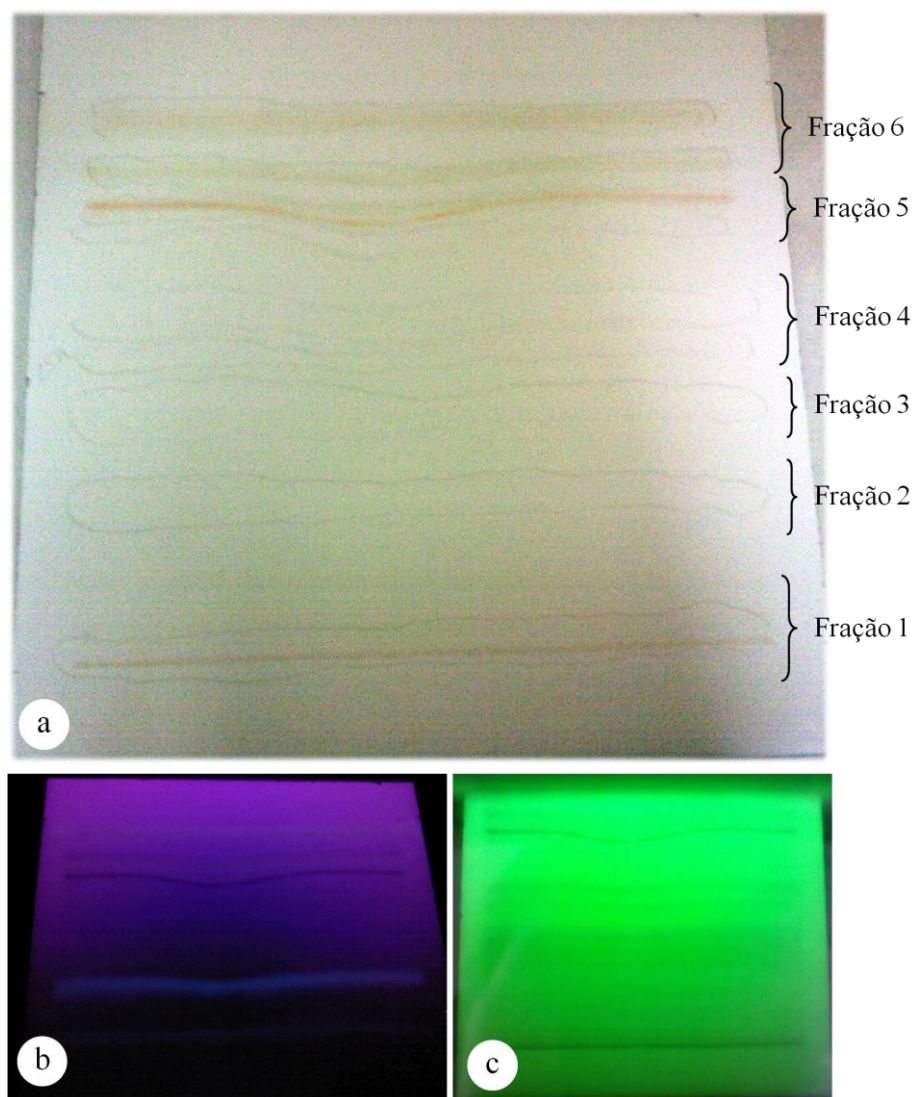


Figura 7. Perfil de distribuição das frações na cromatoplaça de gel de sílica. Em a) Fotografia mostrando a placa com as frações demarcadas manualmente após a corrida cromatográfica com o solvente $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 64:36:08. Em b) e c) a fotografia mostra a visualização da placa sob radiação UV nos comprimentos de onda de 365 (b) e 254 (c) nm.

Tabela 6. “ R_f s” apresentados por cada fração obtida por CCDP.

Fração	R_f
1	0,06
2	0,29
3	0,45
4	0,64
5	0,8
6	0,89

O estudo químico preliminar das seis frações incluiu sua análise por espectrometria de massas (MALDI-MS) e um estudo do perfil cromatográfico, por CLAE. Por MALDI-MS, verificou-se que as massas das substâncias que constituem as seis frações (Tabela 7) são semelhantes às das cianobactérias extraídas com solventes de igual polaridade (Tabelas 1 e 2).

Tabela 7. Massas, obtidas por MALDI-MS, de cada uma das frações do extrato metanólico de CCIBT 920 - *G. amphibium*.

Fração 1		Fração 2	
Massa (Da)	%Área	Massa (Da)	%Área
687.5476	7.2993	640.3218	66.9585
891.1355	11.7847	699.3069	280.8123
914.5171	6.6386	701.0748	231.6760
990.3001	6.1640	709.022	444.3161
1093.3771	11.9077	711.0553	606.5126
1198.5048	7.5945	714.0251	129.0616
1253.4322	18.3899	835.1012	38.3754
1404.4124	10.2278	860.3138	47.5622
1426.7651	11.9270	880.2442	83.2347
1472.4222	11.4776	971.2633	37.9318
1548.3108	6.8835	1045.9099	50.3968
1636.7206	8.3921	1225.6289	46.8867
1679.2586	14.5919	1341.5264	64.5127
1721.5765	16.5249	1941.3715	91.1553
1785.2682	10.8140	2164.1407	101.0312
1845.1432	11.1333	2310.2026	111.5877
2123.8950	11.7175	2500.1668	117.4149
2151.7349	20.4558	2582.4305	147.2474
2162.3644	10.6957	2603.7733	146.8947
2222.4867	19.7201	2758.1618	112.3207
2224.2584	3.1374	2771.5515	51.7949
Fração 3		Fração 4	
Massa (Da)	%Área	Massa (Da)	%Área
1053.4339	1.4729	633.3921	5.3209
1199.6624	2.9691	674.1047	10.0068
1450.0362	4.3205	699.3721	11.6015
1523.2199	0.5408	701.2027	38.9043
1542.7184	1.9205	701.8800	11.1494
2677.3445	1.0255	705.6543	21.8230
		808.8979	14.3816
		827.4123	19.5464
		970.7860	19.3123
		998.9910	10.8932
		1165.8557	10.5817
		1207.5926	20.2357
		1394.9408	24.9631
		1414.1082	18.7365
		1469.8838	19.0710
		1477.0370	2.2169
		1488.1129	1.3407
		1496.0087	1.7157
		1521.7625	4.3820
		1555.6133	11.9841

Continuação

Fração 5		Fração 6	
Massa (Da)	%Área	Massa (Da)	%Área
700.8636	10.3271	620.4954	3.1366
704.9276	8.9863	701.1831	29.0007
708.8525	7.1085	710.8438	18.9748
718.9395	6.0378	721.1682	24.0685
720.9574	8.7074	753.5189	28.1790
830.7908	6.3167	782.7855	19.7122
857.0912	10.6995	783.2323	19.7932
944.0222	14.0598	786.4851	27.8330
988.0564 1	3.7168	849.3125	24.5516
1226.8358	6.0162	900.5936	20.8363
1418.7430	15.8002	911.2244	27.8034
1546.5153	6.7541	932.4299	15.0125
1730.1469	11.8697	1001.0669	11.5895
1777.7743	6.5577	1049.1858	18.0993
1873.6062	15.1754	1065.8576	25.0895
2272.1255	7.2902	1084.2657	19.9999
2585.1482	17.6979	1093.7938	14.3387

O perfil cromatográfico da fração 6 está mostrado na Figura 8, e será o único a ser aqui apresentado, pois somente essa fração apresentou resultado positivo em ensaio de inibição enzimática.

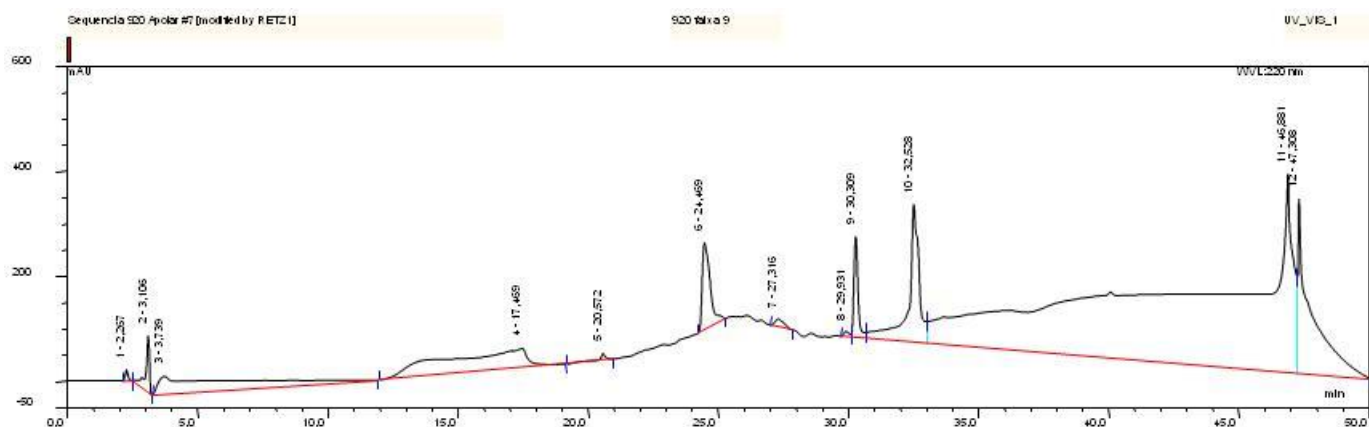


Figura 8. Perfil cromatográfico da fração 6, obtido por CLAE, no comprimento de onda de 220 nm.

TESTES COM O EXTRATO METANÓLICO E FRAÇÕES DE CCIBT 920 – *G. amphibium*

A DL_{min} do extrato metanólico foi estabelecida com base nos dados apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Doses empregadas nos testes e tempo decorrido até o óbito.

Dose (mg.Kg ⁻¹ p.c)	Tempo decorrido até o óbito
1000	De 35 minutos a 19 horas
750	2 horas
500	Entre 34 minutos e 2,5 horas
250	Não levou os animais ao óbito

Como pode ser observado, a dose de 250 mg.Kg⁻¹ (5 mg) não levou os animais à morte, no período de observação de sete dias; as doses de 1000, 750 e 500 mg.Kg⁻¹ (20, 15 e 10 mg) causaram o óbito dos animais em períodos que variaram de 34 minutos à 19 horas. Portanto, a menor dose letal é a de 500 mg.Kg⁻¹ (10 mg).

No exame *post-mortem*, o fígado, os rins e o coração tinham aparência e tamanho normais, sendo que a única alteração visível ocorreu nos pulmões, que apresentaram congestão. Esses achados excluem a possibilidade da presença de hepatotoxinas (MC's e NOD's) no extrato, uma vez que estas causam aumento do fígado e hemorragia intrahepática; ainda, o tempo decorrido até o óbito e os danos causados aos pulmões excluem a presença de neurotoxinas (STX's e ANTX's), que levam os animais ao óbito, em geral, em até vinte minutos e não causam nenhum dano macroscópico aos órgãos (Carvalho, 2006).

Como observado na Tabela 8, o tempo decorrido até o óbito variou sensivelmente entre os animais do mesmo grupo e também entre animais de grupos diferentes, sugerindo diferenças de susceptibilidade entre eles.

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados da avaliação de toxicidade (teste padrão em camundongo) das seis frações obtidas do extrato metanólico; as doses inoculadas foram equivalentes a 20 mg de extrato.

Tabela 9. Resultados dos testes realizados com as frações pré-purificadas do extrato metanólico de CCIBT 920 - *G. amphibium*.

Fração	Dose [(mg) média de 3 testes]	Óbito
1	9,52 mg	-----
2	9,97 mg	-----
3	7,02 mg	1
4	7,27 mg	-----
5	6,26 mg	-----
6	1,73 mg	-----

Nenhuma das frações causou a morte dos animais, dentro do período de observação de sete dias, com exceção da fração 3, que levou apenas um animal a óbito, o que pode ser atribuído a diferenças de susceptibilidade entre os animais. Embasa esta suposição, a comparação entre as placas cromatográficas desenvolvidas com extratos de CCIBT 920 – *G. amphibium*, obtidos a partir de culturas diferentes, a qual mostra que a fração 3 estava ausente em um extrato que apresentou toxicidade, quando submetido ao teste padrão, indicando que a(s) substância(s) tóxica(s) não se encontra(m) na fração 3 (Figura 9).

Rapala *et al.* (1997), Wiedner *et al.* (2003) e Tonk *et al.* (2005) realizaram estudos sobre a supressão da produção de uma substância em um determinado “batch”, entre uma sequência de “batchs”, e atribuíram o fenômeno a mudanças sutis nas condições ambientais do experimento, sem contudo esclarecê-las.

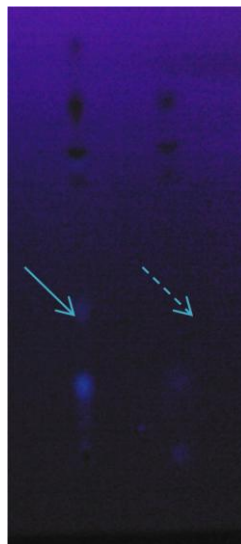


Figura 9. Variação na síntese de substâncias por CCIBT 920 - *G. amphibium*. A foto mostra o extrato metanólico de CCIBT – *G. amphibium* que contém a fração 3 (seta contínua) e do extrato metanólico em que a fração está ausente (seta tracejada). Placa observada sob radiação UV no comprimento de onda de 365 nm, após corrida cromatográfica com o solvente $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 64:36:08.

Os resultados dos testes realizados com as frações obtidas do extrato metanólico de *G. amphibium* nos levam a sugerir um possível sinergismo entre as substâncias contidas nas diferentes frações, devido à ausência do efeito letal. Harada (2007) relatou a ocorrência de casos em que extratos brutos de cianobactérias apresentaram toxicidade maior e efeitos distintos dos apresentados pelas próprias cianotoxinas isoladas.

ANÁLISES HISTOLÓGICAS APÓS ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO DE CCIBT 920 – *G. amphibium*

Com o objetivo de avaliar os efeitos do extrato metanólico de *G. amphibium* nos principais órgãos, camundongos foram inoculados com 2,5 mg do mesmo e após 24 horas da inoculação foram mortos para a coleta dos órgãos e confecção de lâminas histológicas; outro grupo foi inoculado com 10 mg de extrato metanólico e, neste caso, os órgãos foram coletados após o óbito dos animais.

Foram observadas as seguintes alterações: o fígado dos animais que receberam a dose de 2,5 mg apresentou congestão difusa leve a moderada, caracterizada por veias e

sinusóides hepáticos dilatados e preenchidos por eritrócitos. No pulmão foi vista congestão difusa leve à moderada, caracterizada por vasos repletos de eritrócitos e hiperplasia de pneumócitos tipo II. Ainda, alguns vasos de pequeno calibre continham material homogêneo fibrilar eosinofílico, caracterizando microtrombos, além de edema e enfisema multifocal, este caracterizado por descontinuidade das paredes dos alvéolos e sacos alveolares.

Nos animais que receberam 10 mg do extrato metanólico de *G. amphibium*, o fígado apresentou congestão difusa acentuada, caracterizada por veias e sinusóides hepáticos dilatados e repletos de eritrócitos (Figura 10). Nos pulmões havia congestão difusa acentuada, caracterizada por vasos acentuadamente dilatados e repletos de eritrócitos. Em algumas áreas havia presença de material homogêneo eosinofílico na luz alveolar (edema pulmonar) e hiperplasia de pneumócitos tipo II (Figura 11). Ainda havia áreas focalmente extensas e acentuadas de enfisema, assim como hemorragias multifocais.

Nos rins, baço e coração dos animais que receberam ambas as doses havia congestão difusa leve a moderada (dados não mostrados).

As alterações encontradas caracterizam um distúrbio circulatório agudo. A presença de trombos e de edema pulmonar com presença de proteína (uma vez que o material era eosinofílico) indicam processo agudo com lesão em capilares e alteração da permeabilidade vascular.

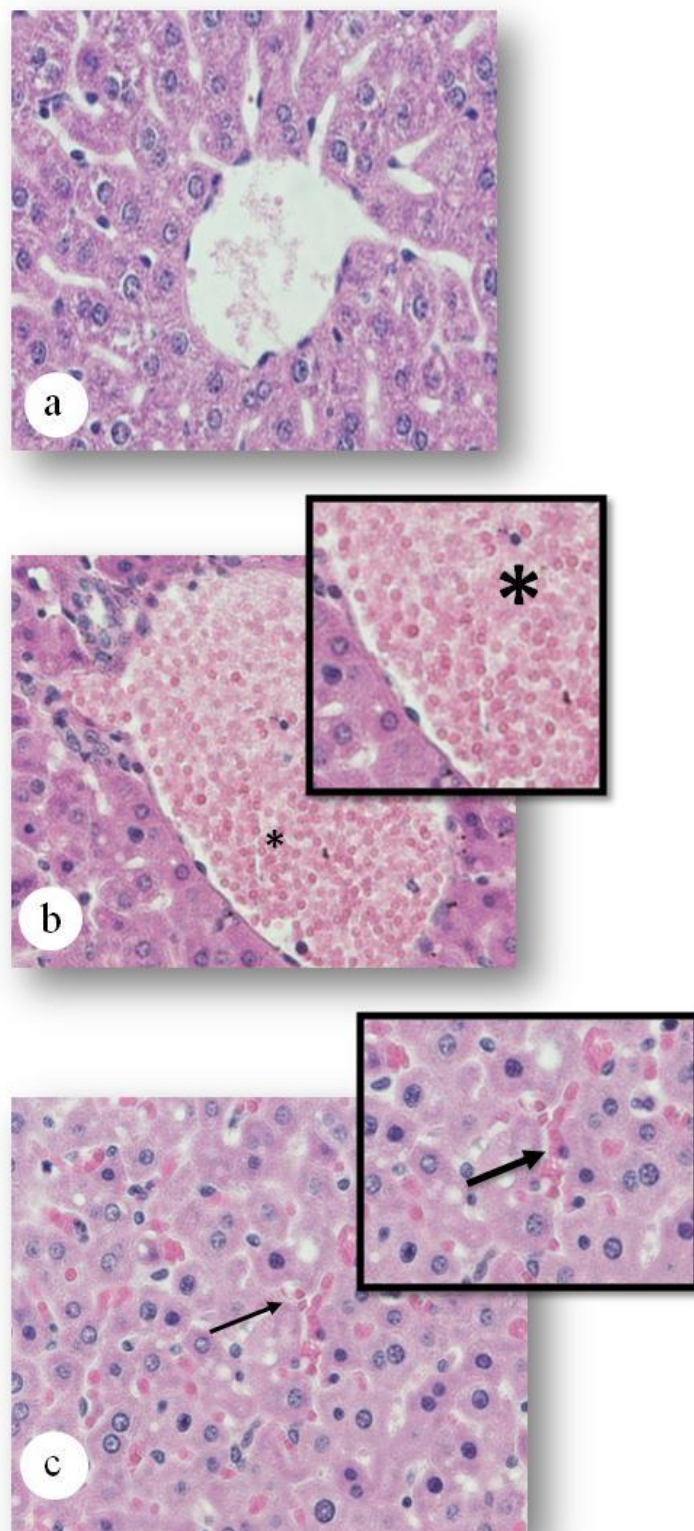


Figura 10. Congestão no fígado causada pelo extrato metanólico de CCIBT 920 - *G. amphibium*. Em a) Fotografia mostrando a veia centrilobular e sinusóides com arquitetura normais do fígado de animal controle. Em b) e c) as fotografias mostram a veia hepática (*) e sinusóides (seta) dilatados e preenchidos por eritrócitos, caracterizando congestão difusa acentuada, causados pela administração de 10 mg de extrato metanólico de CCIBT 920 - *G. amphibium*. Cortes histológicos corados com HE e observados sob aumento de 40x.

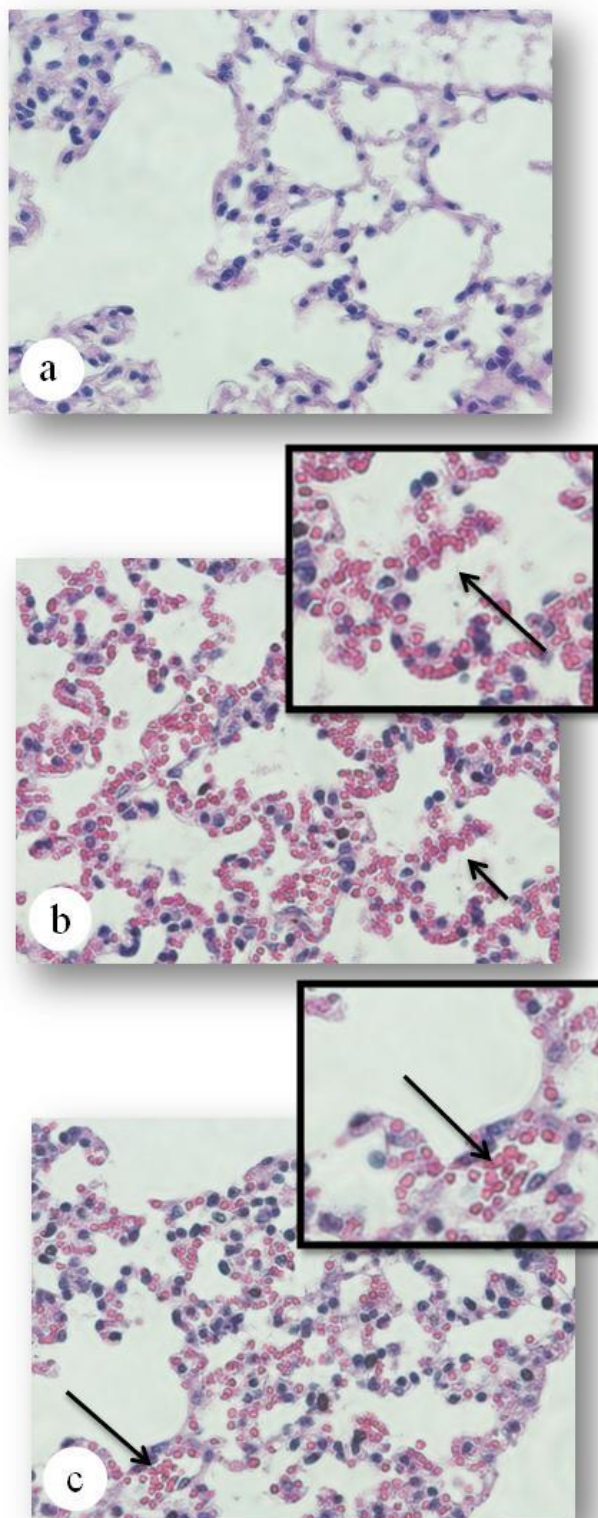


Figura 11. Congestão nos pulmões causada pelo extrato metanólico de CCIBT 920 - *G. amphibium*. Em a) Fotografia mostrando o pulmão de animal controle com características histológicas normais. Em b) e c) as fotografias mostram o pulmão de animal que recebeu 10 mg do extrato metanólico de CCIBT 920 - *G. amphibium*: notar congestão acentuada (setas). Cortes histológicos corados com HE e observados sob aumento de 40x.

**EFEITOS INDUZIDOS PELA ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO DE CCIBT
920 – *G. amphibium* NA MICROCIRCULAÇÃO**

A microscopia intravital, que permite a visualização da microcirculação sanguínea e de importantes eventos e alterações que possam ocorrer nesse sistema (Gavins & Charttejee 2004), foi empregada para a observação “*in vivo*” dos efeitos causados pela administração do extrato metanólico de *G. amphibium* (CCIBT 920).

Este é o primeiro estudo, utilizando a microscopia intravital, com extratos de cianobactérias cuja toxina é de natureza desconhecida.

Preliminarmente, para avaliar os possíveis efeitos da(s) toxina(s) presente(s) no extrato metanólico de *G. amphibium*, foram feitos ensaios com aplicação tópica de três doses distintas: 20, 40 e 120 µg. As doses de 20 e de 40 µg não induziram efeitos sobre a microcirculação, porém, a aplicação da dose de 120 µg causou estase venular transitória, conforme registro apresentado na Figura 12.

Em sequência, para avaliar a relação dose ou tempo-dependência, foram feitos ensaios, por via i.p., com diferentes doses (6, 125, 250, 500 e 1000 mg.Kg⁻¹) e diferentes períodos de incubação (0,5 e 2 horas).

A dose de 120 µg, equivalente a 6 mg.Kg⁻¹ p.c, no período de incubação de 30 minutos, causou estase venular e aumento do número de leucócitos rolantes, mas estas alterações foram moderadas, se comparadas com as doses a partir de 2,5 mg, nas quais foram observados aumento do número de leucócitos rolantes e estase venular parcial (algumas vênulas) ou total, como apresentado na Tabela 10.

Nos ensaios com período de incubação de 2 horas, foram notados os mesmos efeitos, com posterior comprometimento das arteríolas (caracterizado por depósitos de fibrina), em todas as doses testadas. Neste período, em alguns casos, observou-se a alteração do número de leucócitos rolantes e aderidos (Tabelas 10).

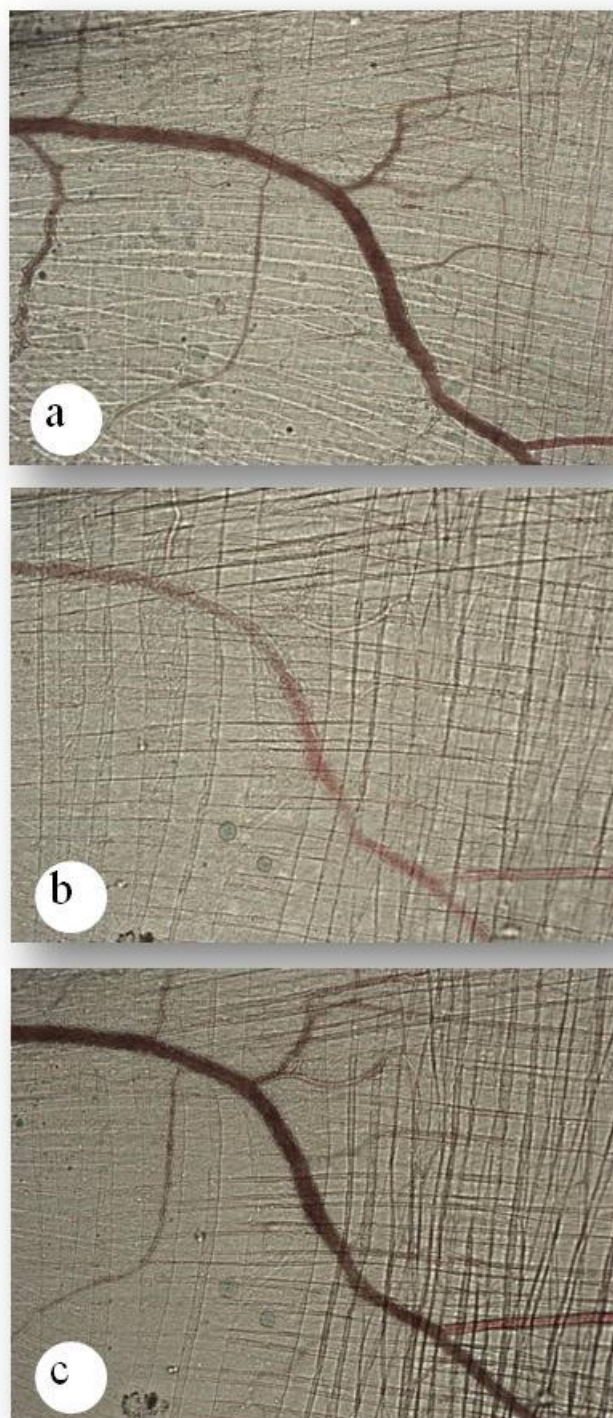


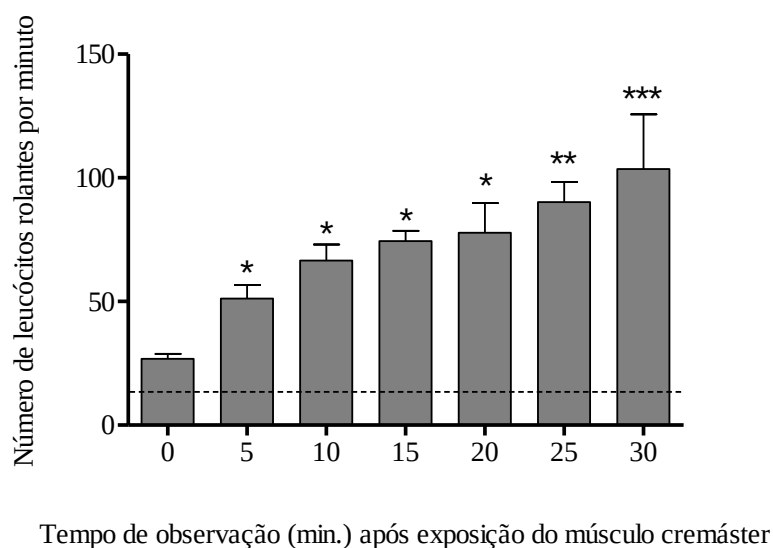
Figura 12. Estase venular transitória causada pelo extrato de CCIBT 920 - *G. amphibium*. Em a) vênula com fluxo normal antes da administração tópica de 120 μ g do extrato metanólico de CCIBT 920 - *G. amphibium*, em b) vênula sem fluxo sanguíneo após 5 minutos da administração do extrato metanólico e em c) vênula com o fluxo sanguíneo restabelecido após 15 minutos da administração.

Tabela 10. Resumo dos efeitos observados pela administração de diferentes doses do extrato de CCIBT 920 – *G. amphibium*, nos diferentes períodos de incubação.

Tempo (T) em minutos	120 µg	2,5 mg		5 mg		10 mg		20 mg	
	30 minutos	30 minutos	120 minutos	30 minutos	120 minutos	30 minutos	120 minutos	30 minutos	120 minutos
0'	Parada parcial no fluxo venular (+)	Fluxo sanguíneo normal	Parada parcial no fluxo venular (+)	Fluxo sanguíneo normal	Parada parcial no fluxo venular (+)	Fluxo sanguíneo normal	Parada parcial no fluxo venular (+)	Parada parcial no fluxo venular (+)	Vênulas com fluxo sanguíneo reduzido
5'	Parada parcial no fluxo venular (+)	Parada parcial no fluxo venular (+)	Quadro de estase venular aumentado (++)	Fluxo sanguíneo normal	Quadro de estase venular aumentado (++)	Fluxo sanguíneo normal	Quadro de estase venular aumentado (++)	Vênulas sem fluxo sanguíneo ou com fluxo reduzido	Parada parcial no fluxo venular (+); aumento no número de leucócitos
10'	Parada parcial no fluxo venular (+)	Parada parcial no fluxo venular (+)	Quadro de estase venular aumentado (+++)	Parada parcial no fluxo venular (+)	Quadro de estase venular aumenta (++++)	Parada parcial no fluxo venular (+)	Quadro de estase venular aumentado (++)	Vênulas sem fluxo sanguíneo ou com fluxo reduzido	Idem T5'
15'	Fluxo sanguíneo de algumas vênulas se restabelece.	Parada parcial no fluxo venular (+)	Quadro de estase venular aumentado (++++)	Leucócitos aderidos	Arteriolas comprometidas	Idem T10'; leucócitos aderidos	Idem T10'	Vênulas sem fluxo sanguíneo	Vênulas sem fluxo sanguíneo
20'	Idem T15'	Quadro de estase venular aumentado (++)	Idem T15'	Idem T15'	Vênulas sem fluxo sanguíneo; arteriolas de menor calibre comprometidas	Idem T15'	Arteriolas comprometidas; vênulas sem fluxo sanguíneo	Arteriolas comprometidas	Arteriolas comprometidas
25'	Idem T15'	Parada parcial no fluxo venular (++)	Idem T15'	Idem T15'	Idem T20'	Idem T15'	Apenas arteriola de maior calibre com fluxo sanguíneo	Idem T20'	Idem T20'
30'	Idem T15'	Idem T25'	Arteriolas também comprometidas	Idem T15'	Idem T20'	Idem T15'	Apenas arteriola de maior calibre com fluxo sanguíneo	Idem T20'	Idem T20'

Com base nos dados mostrados na Tabela 10, é possível afirmar que pequenas doses de extrato metanólico (2,5 e 5 mg), em curtos períodos de incubação (0,5 hora), causam aumento do número de leucócitos rolantes (Figura 13) e estase venular parcial, e que doses maiores (10 e 20 mg) causam estase venular total, com comprometimento das arteríolas; do mesmo modo, pode-se concluir que um período de incubação maior (todas as doses em 2 horas) causa estase venular parcial e, na maioria dos casos, total, o que impossibilita o recrutamento de leucócitos (Figura 14) e resulta em quadro isquêmico.

Destas observações dos ensaios por microscopia intravital, que estão de acordo com os resultados das análises histológicas, infere-se que a estase venular observada no músculo cremáster também ocorre na microcirculação dos órgãos analisados (pulmões, fígado e rins), a qual é caracterizada pela congestão. Ou seja, é válido concluir que a morte dos animais que receberam altas doses (20, 15 e 10 mg), durante o teste padrão, tenha ocorrido em consequência do processo isquêmico, observado nas mesmas doses (20 e 10 mg) durante o teste por microscopia intravital.



* $P < 0,05$ comparado a $T=0'$; ** $P < 0,01$ comparado a $T=0'$; *** $P < 0,001$ comparado a $T=0'$; (----) Controle.

Figura 13. Aumento do número de leucócitos rolantes causado pelo extrato metanólico de CCIBT 920 - *G. amphibium*. A dose de 2,5 mg do extrato metanólico foi administrada i.p. e após o período de incubação de 30 minutos foi feita a exposição do músculo cremaster. A contagem de leucócitos rolantes nas vênulas foi feita por minuto, em intervalos de cinco minutos, até o fim do experimento (30 minutos).

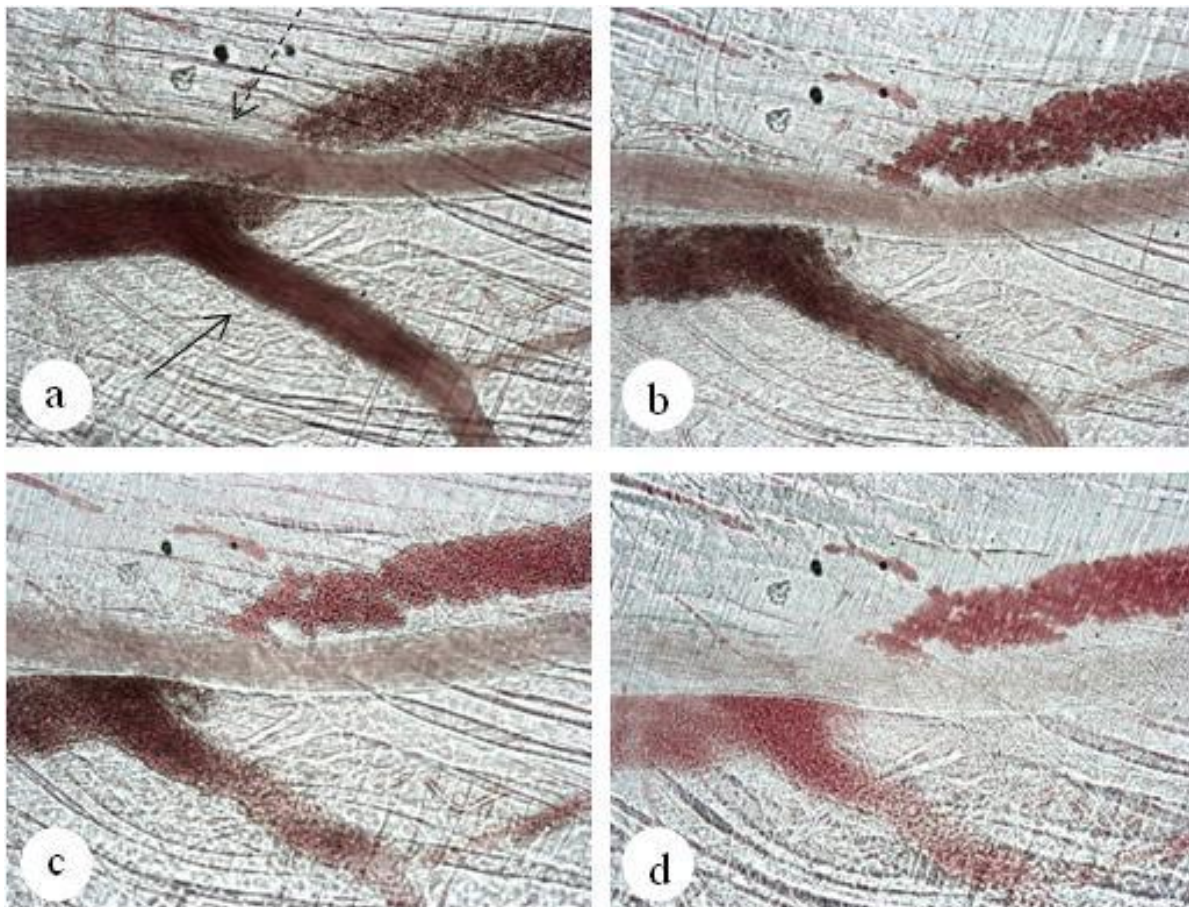


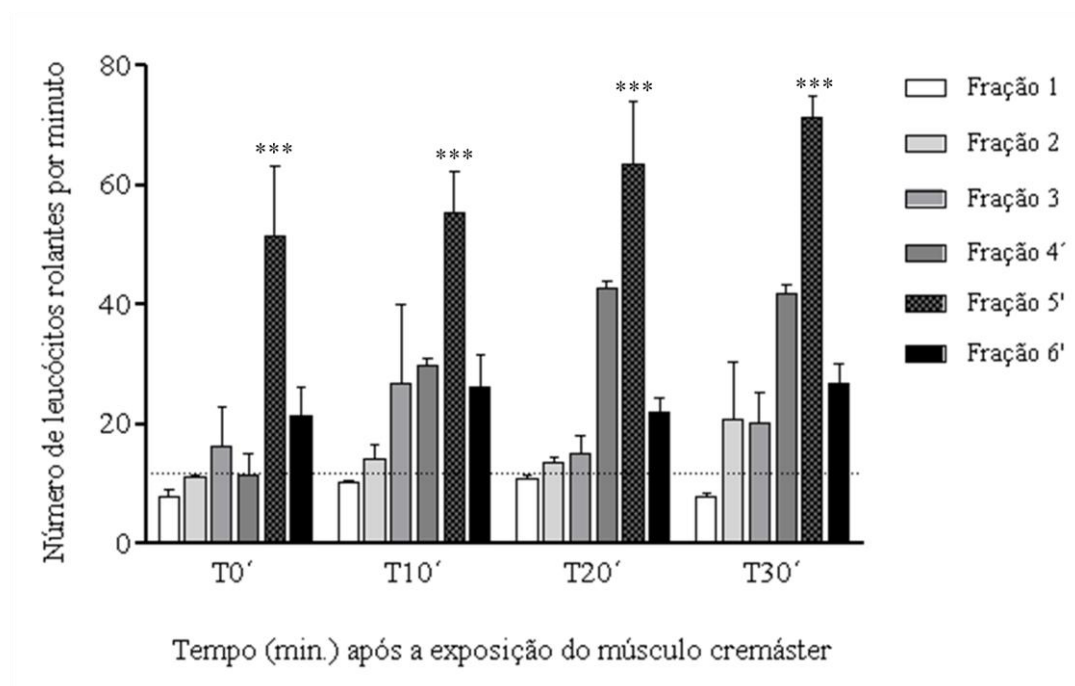
Figura 14. Estase venular e arteriolar causadas pelo extrato de CCIBT 920 - *G. amphibium*. A dose de 20 mg do extrato metanólico foi administrada i.p. e após o período de incubação de duas horas foi feita a exposição do músculo cremaster. Em a) vênula (seta contínua) e arteríola (seta tracejada) exatamente após a exposição do músculo cremaster e em b), c) e d) após 10, 15 e 20 minutos da exposição do músculo, respectivamente.

EFEITOS INDUZIDOS PELA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DAS FRAÇÕES DE CCIBT 920 – *G. amphibium* NA MICROCIRCULAÇÃO

Para determinar qual das frações do extrato metanólico de *G. amphibium* é capaz de induzir os mesmos efeitos causados pelo extrato metanólico, na microcirculação sanguínea, foram realizados ensaios com as doses de 1 e 2 mg, de cada uma das frações, as quais foram administradas i.p., com período de incubação de 30 minutos. A escolha dessa dose e período de incubação baseou-se no fato de que a administração de 2,5 mg de extrato metanólico, com mesmo período de incubação, causou aumento de rolamento e estase venular parcial e também em nossa opção de utilizarmos doses com efeitos comparáveis aos que foram observados para o extrato metanólico.

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as doses de 1 e 2 mg (dados não apresentados).

Nenhuma das frações foi capaz de induzir estase venular parcial ou total, nas doses e no período de incubação avaliados, efeitos contrários aos observados após a administração do extrato metanólico de *G. amphibium*. Entretanto, de acordo com os resultados mostrados na Figura 15, a Fração 5 foi capaz de induzir maior aumento do rolamento de leucócitos. Ainda, apesar de não haver diferenças significativas, as frações 3, 4 e 6 também foram capazes de induzir tal aumento, em alguns períodos de observação. Esses dados sustentam a hipótese de haver sinergismo entre as substâncias presentes nas diferentes frações do extrato metanólico e, que por isso, seus efeitos sejam amplificados ou somados, em relação às frações administradas isoladamente.



***P<0,001 quando comparados a todos os períodos das frações 1, 2 e 6.

Figura 15. Resultados obtidos com as frações do extrato metanólico de CCIBT 920 - *G. amphibium*. Doses de 2 mg de cada uma das seis frações foram administrados i.p. e após o período de incubação de 30 minutos foi feita a exposição do músculo cremaster. A contagem de leucócitos rolantes nas vênulas foi feita por minuto, em intervalos de cinco minutos, até o fim do experimento (30 minutos).

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DA CIANOTOXINA MICROCISTINA – LR, NA MICROCIRCULAÇÃO

A MC-LR, neste estudo, foi administrada intraperitonealmente, em dose de 62,5 $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ p.c., observando-se período de incubação de 15 minutos. Como ilustra a Figura 16, em T=0' foi observada estase venular; em T=5' foram notados depósitos de fibrina em arteríolas e em T=15', parada total do fluxo sanguíneo, que perdurou até o fim do experimento (T=20').

Em estudo anterior, realizado por Kujbida *et al.* (2009), foram avaliados os efeitos de três variantes de MC's sobre a microcirculação do mesentério, com o objetivo de confirmar seu potencial quimioatraente para neutrófilos porém, utilizando unicamente a administração tópica das toxinas. Entretanto, pesquisas anteriores, “*in vitro*”, haviam demonstrado que microcistinas (MC-LR e Asp-MC-LR) atraem quimicamente os neutrófilos e também que extratos de *M. aeruginosa*, contendo

microcistinas, elevam as concentrações de IL-1 e de TNF- α . Mostraram, também, que a administração prévia (30 minutos) em camundongos, via i.p., de soro anti-TNF- α aumenta o percentual de sobreviventes (90%) (Nakano *et al.* 1989, Nakano *et al.* 1991, Kujbida *et al.* 2006), provando que o TNF- α tem importante participação nos casos de intoxicação por microcistinas.

Estas citocinas (IL-1 e TNF- α) têm importantes funções, tais como ativação de células endoteliais e de neutrófilos, o que pode explicar o aumento de rolamento de leucócitos, observado quando pequenas doses da toxina são administradas topicamente (Kujbida *et al.* 2009).

Além disso, o TNF- α também é responsável pelos sinais como hipotensão arterial e coagulação intravascular disseminada (Pintão & Franco 2001), o que pode explicar o quadro observado, após administração i.p., da dose de 62,5 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$.

Com base nessas observações, pode-se concluir que como primeira hipótese a que os efeitos observados ao microscópio intravital, nos ensaios com MC-LR (estase venular e isquemia), são devidos à capacidade da toxina de induzir os macrófagos a produzirem IL-1 e TNF- α .

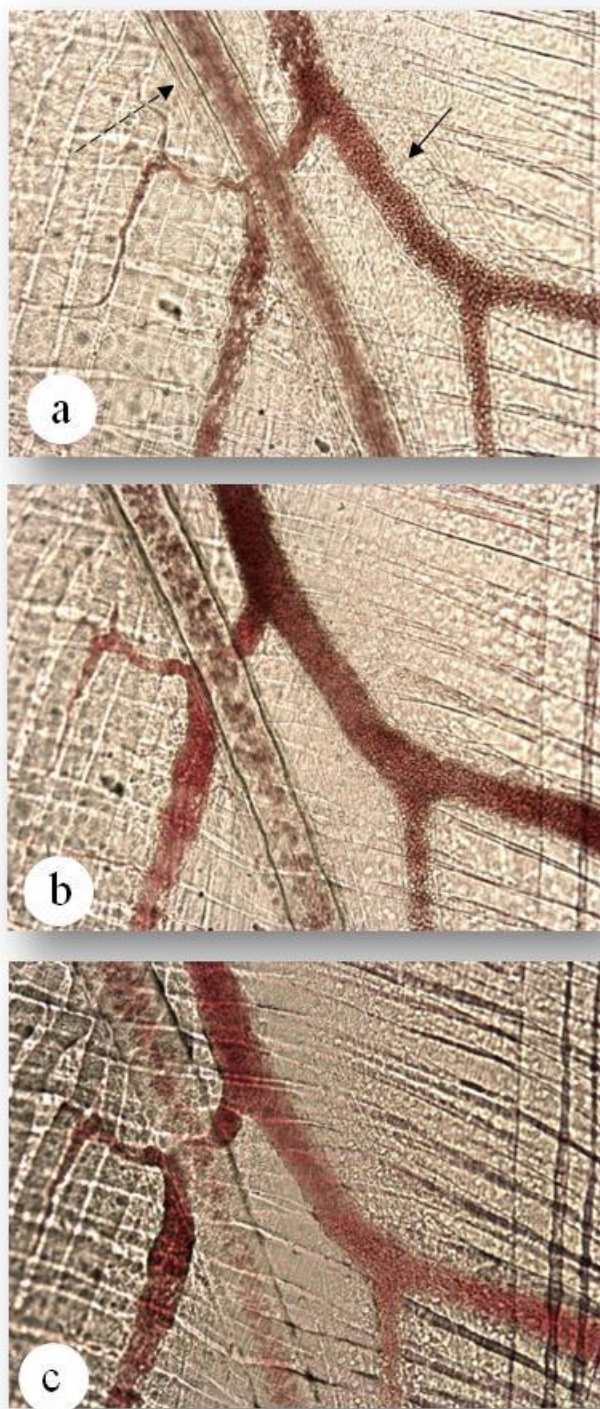


Figura 16. Resultados obtidos com a microcistina-LR. A dose de $62,5 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ foi administrada i.p. e após o período de incubação de 15 minutos foi feita a exposição do músculo cremaster. Em a) vênula (seta contínua) e arteríola (seta tracejada) com fluxo sanguíneo lento após a exposição do músculo, em b) após 5 minutos e em c) após 15 minutos, sem fluxo sanguíneo.

EFEITOS DO EXTRATO EM ÁCIDO ACÉTICO 0,1 M DE CCIBT 639 *Scytonema* sp. NA MICROCIRCULAÇÃO

Para comparar os efeitos de uma cepa tóxica (CCIBT 920 – *G. amphibium*) com os de outra não tóxica (CCIBT 639 - *Scytonema* sp) sobre a microcirculação, foram realizados ensaios pelas vias de administração tópica e de administração intraperitoneal.

Diferentemente do observado no estudo do extrato metanólico de *G. amphibium*, a administração tópica de 20, 40 e 120 µg do extrato em ácido acético 0,1 M de CCIBT 639 - *Scytonema* sp. foi capaz de induzir aumento no número de leucócitos rolantes, em todas as doses, sem que fossem observados outros efeitos. Dentre as doses avaliadas, a de 120 µg foi a que causou maior aumento (Figura 17).

A administração intraperitoneal de 2,5 mg, com 30 minutos de incubação, causou o aumento do número de leucócitos rolantes, como pode ser observado na Figura 18. Por fim, a dose de 20 mg, nos dois períodos de incubação, causou estase venular parcial (afetando apenas algumas vênulas), porém, em nenhum dos casos, este efeito persistiu até o fim do experimento (30 minutos).

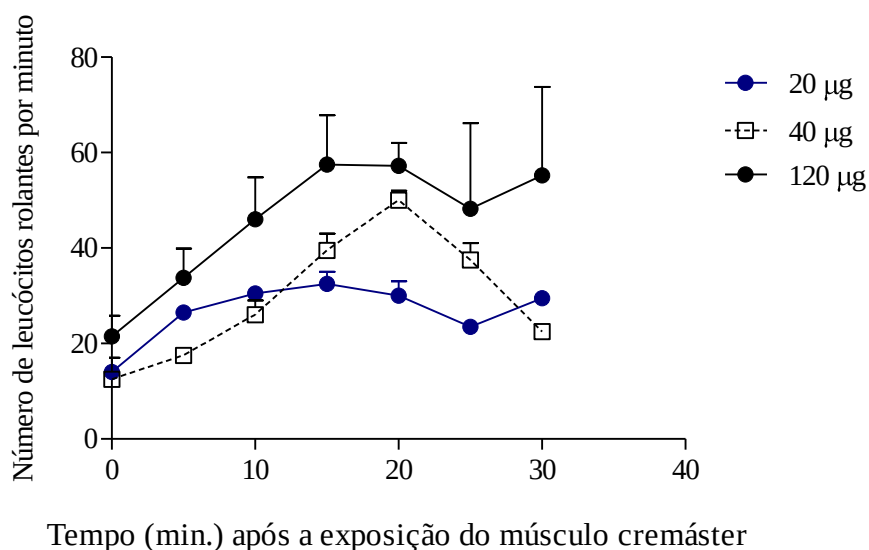
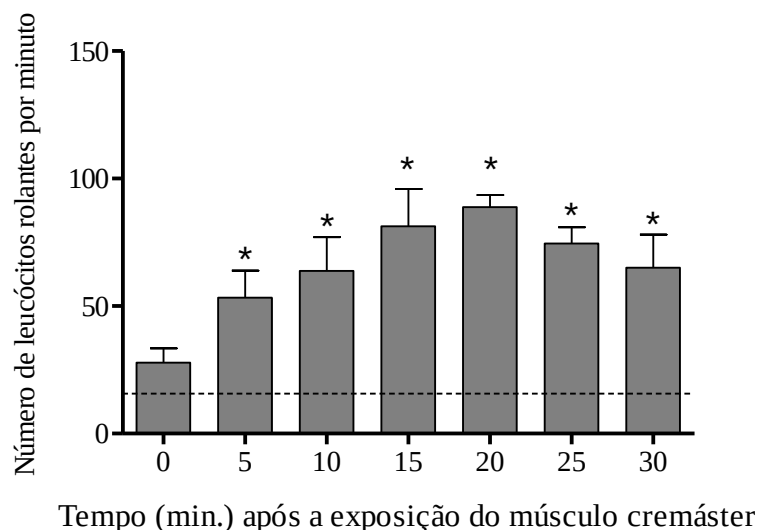


Figura 17. Aumento do número de leucócitos rolantes causado por CCIBT 639 – *Scytonema* sp. Doses de 20, 40 e 120 µg do extrato de CCIBT 639 – *Scytonema* sp. foram administrados topicamente e a contagem de leucócitos rolantes nas vênulas foi feita por minuto, em intervalos de cinco minutos, até o fim do experimento (30 minutos).



* $P < 0,05$ comparado a $T=0$; (-----) Controle.

Figura 18. Aumento do número de leucócitos rolantes causado por CCIBT 639 – *Scytonema* sp. A dose de 2,5 mg de extrato foi administrada i.p. e após o período de incubação de 30 minutos foi feita a contagem do número de leucócitos rolantes por minuto, em intervalos de cinco minutos, até o fim do experimento (30 minutos).

Ao comparar os efeitos da administração de 2,5 mg do extrato de *G. amphibium* com os de *Scytonema* sp., observamos que ambos causaram aumento de rolamento. No entanto, como descrito anteriormente, e como pode ser observado na Figura 19, apesar de não haver diferença significativa neste aumento, há uma tendência de aumento do rolamento de leucócitos no experimento com *G. amphibium*, enquanto que há uma tendência de diminuição deste número, no decorrer do tempo, no caso de inoculação com o extrato de *Scytonema* sp.

A mesma tendência pode ser observada, em relação à estase venular, causada pela administração de 20 mg dos dois extratos: enquanto o quadro evoluiu para dano isquêmico, após a administração do extrato metanólico de *G. amphibium*, a estase venular causada pela administração do extrato em ácido acético de *Scytonema* sp. foi apenas parcial e sofreu regressão no decorrer do experimento.

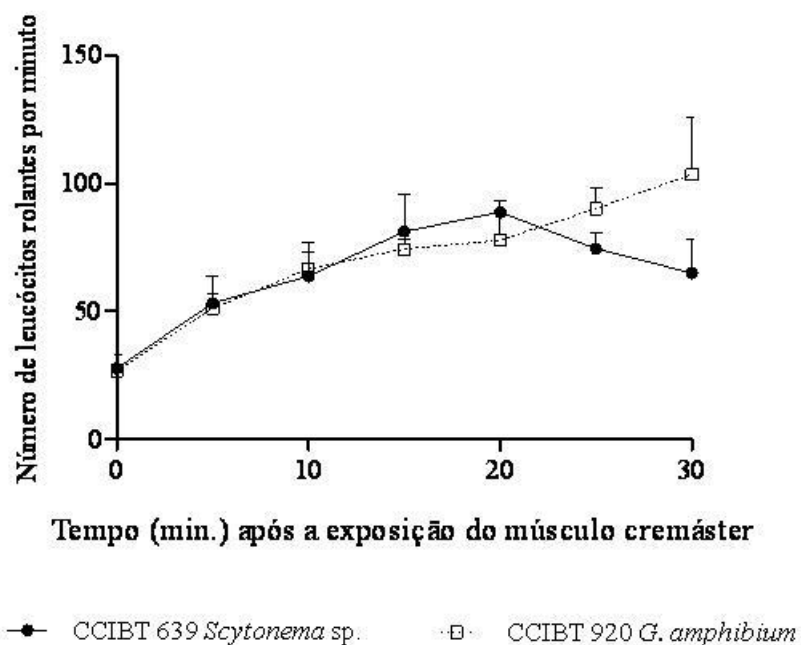


Figura 19. Comparação da indução do aumento de leucócitos rolantes por CCIBT – 639 *Scytonema* sp. e CCIBT 920 – *G. amphibium*. Doses de 2,5 mg do extrato metanólico de CCIBT 920 – *G. amphibium* ou de CCIBT – 639 *Scytonema* sp. foram administrados i.p. e após o período de incubação de 30 minutos foi feita a contagem do número de leucócitos rolantes por minuto, em intervalos de cinco minutos, até o fim do experimento (30 minutos).

Conforme descrito anteriormente, a inflamação é uma resposta do hospedeiro para eliminar o agente lesivo e restaurar a integridade do organismo. Uma das primeiras etapas dessa reação é o aumento do rolamento de leucócitos, que pode ser causado por substâncias diversas (Granger & Kubes 1994). Como visto acima, ambos os extratos causam aumento de rolamento, porém, apesar de não haver diferença estatística significativa entre esses aumentos, o causado pelo extrato metanólico de *G. amphibium* é mais acentuado; também o efeito provocado por este extrato parece persistir mais, quando comparado com o da *Scytonema* sp. As tendências observadas nas linhas do gráfico da Figura 19 mostram que, se o experimento tivesse se estendido por um período de tempo maior, o rolamento causado por *G. amphibium* continuaria aumentando, enquanto que o causado por *Scytonema* sp., continuaria em decréscimo.

Essas diferenças observadas ao microscópio intravital, aliadas ao fato de que o extrato de *Scytonema* sp. não leva os animais-teste a óbito, atestam que as substâncias que causam o efeito de rolamento são diferentes entre si.

IMPLICAÇÕES DA ADMINISTRAÇÃO DE POLIMIXINA B SOBRE OS EFEITOS DO EXTRATO METANÓLICO DE CCIBT 920 – *G. amphibium*.

As bactérias gram-negativas têm parede celular constituídas por LPSs (Allen 1968, Rapala *et al.* 2002), substâncias que são conhecidas por se ligarem aos receptores TLR-4, presentes em células do sistema imune e desencadearem resposta inflamatória que, se se tornar incontrolada e amplificada, evolui para choque séptico, que é fatal (Park *et al.* 2009).

As cianobactérias, organismos gram-negativos, possuem também LPSs em suas paredes celulares, porém, estudos realizados com diferentes espécies destes organismos mostram que o LPS cianobacteriano apresenta propriedades diferentes das que constituem a parede celular de outras bactérias gram-negativas, como a *Escherichia coli*, por exemplo. Mostram também que, na maioria dos casos, os LPS isolados de cianobactérias possuem baixa ou nenhuma toxicidade ou, que possuem efeito antagônico (Macagno *et al.* 2006, Stewert *et al.* 2006).

Em geral, devido ao tamanho e à alta polaridade de suas moléculas, os lipopolissacarídeos são extraídos com fenol/água, em temperaturas elevadas (Westphal & Jann 1965), do resíduo de centrifugação da biomassa cianobacteriana.

No presente estudo, a extração da biomassa cianobacteriana foi realizada com MeOH/H₂O 75:25 (v/v), por ação de ultrassom, seguida de centrifugação; o sedimento foi descartado e o sobrenadante, concentrado e submetido a fracionamentos e ensaios biológicos. A solução de MeOH/H₂O 75:25 (v/v) é apropriada para a extração de peptídeos, como a microcistina e outras substâncias com massa molecular e polaridades semelhantes aos desta substância (Fastner *et al.*, 1998).

Os resultados obtidos por microscopia intravital, com o extrato metanólico de *G. amphibium*, mostram que o mesmo é capaz de causar uma resposta inflamatória e, então, para excluir a possibilidade de haver LPS no extrato metanólico de CCIBT 920 – *G. amphibium* foi feito o teste utilizando a polimixina B.

A polimixina B é um antibiótico capaz de neutralizar os efeitos causados por lipopolissacarídeos. Portanto, a administração concomitante de uma amostra contendo LPS e o antibiótico neutraliza a toxina e permite que os animais sobrevivam (Danner *et al.* 1989). Esse experimento, realizado com o extrato metanólico de *G. amphibium*, gerou os resultados mostrados na Tabela 11.

Tabela 11. Resultados dos testes realizados com o extrato metanólico de CCIBT 920 - *G. amphibium* e o antibiótico polimixina B.

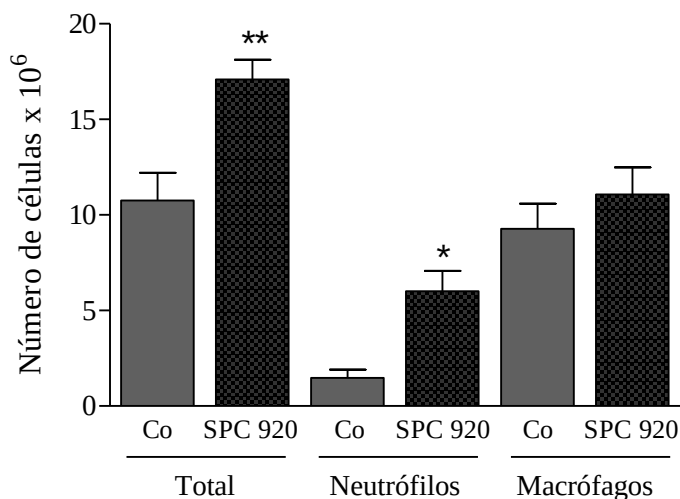
Grupo	Sobreviventes
Co	3/3
CCIBT 920	0/3
POL.B	3/3
CCIBT 920 + POL.B	0/3

Como apresentado na Tabela 11, a administração da polimixina B juntamente com o extrato metanólico não foi capaz de impedir o óbito dos animais, indicando que a morte dos mesmos não é causada por lipopolissacarídeos.

CINÉTICA DO INFLUXO DE CÉLULAS NO SANGUE E NA CAVIDADE PERITONEAL, INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO DE CCIBT 920 – *G. amphibium*

Um dos principais efeitos da administração do extrato metanólico de *G. amphibium* observado ao microscópio intravital foi o aumento de rolamento. Para avaliar se os efeitos do extrato eram sistêmicos, camundongos foram inoculados intraperitonealmente com 2,5 mg (125 mg.Kg^{-1}) de extrato metanólico e, após 30 minutos foi feita sangria, pelo plexo oftálmico, para a contagem total e diferencial de leucócitos.

O resultado da contagem total de leucócitos no sangue corrobora o que foi observado através da microscopia intravital: há aumento (32,1%) do número total de leucócitos, após trinta minutos da administração da dose de 2,5 mg do extrato (Figura 20); segundo os resultados da contagem diferencial, os neutrófilos são os principais responsáveis por este aumento, que foi de 73,65%, em relação ao controle.

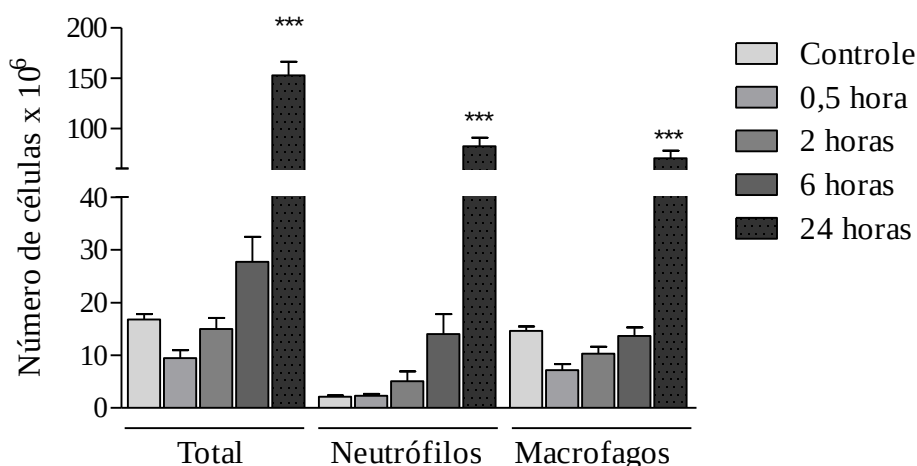


**P<0,01 comparado ao controle e *P<0,05 comparado ao controle

Figura 20. Ativação de leucócitos induzida pelo extrato metan3lico de CCIBT 920 – *G. amphibium*. A dose de 2,5 mg do extrato metan3lico foi administrada i.p. e ap3s o per3odo de incubação de 30 minutos foi feita sangria pelo plexo oft3lmico dos camundongos para avaliaç3o do perfil celular.

A an3lise das alteraç3es causadas pelo extrato metan3lico no perit3nio mostra que houve aumento do n3mero total de leuc3citos, com elevaç3o principalmente dos neutr3filos. Por3m, em contraste com o observado no sangue, cujo aumento acontece em apenas 30 minutos, no perit3nio o n3mero total de leuc3citos sofre aumento a partir de 6 horas, a contar da inoculaç3o do extrato metan3lico, sendo esse aumento, que tem pico m3ximo em 24 horas, devido principalmente aos neutr3filos; o n3mero de macr3fagos, no entanto, se mant3m pr3ximo aos do controle por seis horas, aumentando significativamente somente em 24 horas (Figura 21).

Estas informaç3es corroboram o que foi observado nas an3lises por microscopia intravital, ap3s a administraç3o do extrato metan3lico de *G. amphibium* e, quando comparadas às an3lises realizadas com o extrato de *Scytonema* sp., indicam uma tend3ncia de aumento do rolamento.



*** P < 0,001 comparados ao controle

Figura 21. Indução do recrutamento celular pelo extrato metanólico de CCIBT 920 – *G. amphibium*. A dose de 2,5 mg do extrato metanólico foi administrada i.p. e, após diferentes períodos de incubação, o influxo celular foi avaliado na cavidade peritoneal.

INDUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS PELA ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO DE CCIBT 920 – *G. amphibium*

A migração de leucócitos ocorre principalmente devido à ação de citocinas e quimiocinas, importantes mediadores da resposta inflamatória. As principais citocinas pró-inflamatórias são o TNF- α , IL-1 e IL-6; as principais quimiocinas envolvidas no processo inflamatório são a quimiocina KC, cuja principal função é atrair neutrófilos, e a quimiocina MCP-1, que é quimioatraente para monócitos (Feghali & Wright 1997, Rollins 1997). Dada sua importância no processo inflamatório e devido aos resultados observados tanto nas análises por microscopia intravital quanto nos ensaios de migração celular, foi feita dosagem destes compostos no sobrenadante do lavado peritoneal.

Os resultados mostram que a IL-1 aumenta significativamente em 0,5 hora e a partir de duas horas começa a decrescer, chegando próximo aos níveis basais em 24 horas; os níveis de IL-6 aumentam após 2 horas da inoculação e também retornam aos níveis basais em 24 horas, diferente das concentrações de TNF- α que, apesar de não haver diferenças significativas, aumentam ligeiramente a partir de 0,5 hora e mantêm-se estáveis até 24 horas após a inoculação (Figura 22).

IL-1 e TNF- α são as principais citocinas que medeiam a inflamação aguda: compartilham muitas de suas atividades pró-inflamatórias, como indução de febre, expressão de moléculas de adesão no endotélio e iniciam uma cascata de produção de mediadores inflamatórios (síntese de quimiocinas, iNOS, mediadores lipídicos, etc) (Dinarello 2000). Tais citocinas também induzem, secundariamente, atividade inflamatória, estimulando a produção de IL-6 por vários tipos celulares; IL-6 é a principal responsável pela produção de proteínas de fase aguda, pelo fígado. Ainda, assim como com a IL-1, TNF- α compartilha também atividades inflamatórias com IL-6, secundariamente, na síntese de proteínas de fase aguda. Porém, estudos mostram que IL-6 possui atividade inibitória da produção de TNF- α (Aderka et al. 1989), provavelmente para regular negativamente a resposta inflamatória, uma vez que IL-1 e TNF- α possuem atividade sinérgica em relação uma com a outra. Em nossos resultados, é possível observar, em 0,5 hora, concentrações elevadas de IL-1, o que provavelmente estimulou a produção de IL-6 que, por sua vez, inibiu a síntese de TNF- α , cujos níveis mantiveram-se próximos aos níveis basais até o último período de incubação avaliado (24 horas) (Heinrich *et al.* 1990, Feghali & Wright 1997).

Quanto às quimiocinas KC e MCP-1, ambas têm seu pico em duas horas e a partir de então começam a decrescer. Entretanto, a concentração de quimiocina KC retorna aos níveis basais em 24 horas, enquanto que os níveis de MCP-1 mantêm-se moderadamente elevados, nesse período (Figura 23).

Quimiocinas, famílias de citocinas que regulam a migração de leucócitos para os tecidos, são classificadas segundo a presença de quatro cisteínas em posições altamente conservadas. Desta forma, podemos destacar principalmente as famílias “CXC”, assim chamada por ter as cisteínas da porção N-terminal separadas por um aminoácido, e “CC”, que possui as cisteínas da porção N-terminal adjacentes uma à outra (Rollins 1997).

A quimiocina KC é homóloga à IL-8 humana que, por sua vez, pertence à família “CXC” e possui atividade quimioatraente para neutrófilos. Nossos resultados mostraram que, em 24 horas, quando houve maior influxo de neutrófilos, os níveis desta quimiocina retornaram aos níveis basais, o que sugere que há outra substância envolvida na migração destas células para a cavidade peritoneal, neste período. Outra possibilidade é a de que os neutrófilos tenham sido atraídos por altas concentrações desta quimiocina em período anterior da análise, estando ausentes após o período de 24 horas.

Em relação à quimiocina MCP-1, como pode ser observado na Figura 23, após 24 horas sua concentração ainda não havia retornado aos níveis basais e somente neste período houve aumento significativo de macrófagos, no peritônio.

No processo inflamatório agudo, os macrófagos substituem os neutrófilos, para apresentar o agente infeccioso às células da imunidade adquirida ou regenerar o tecido lesado. Em nosso trabalho, o perfil de migração apresentado aliado ao comportamento das quimiocinas, formam um quadro semelhante, uma vez que o número de macrófagos aumenta, ao final do período de avaliação.

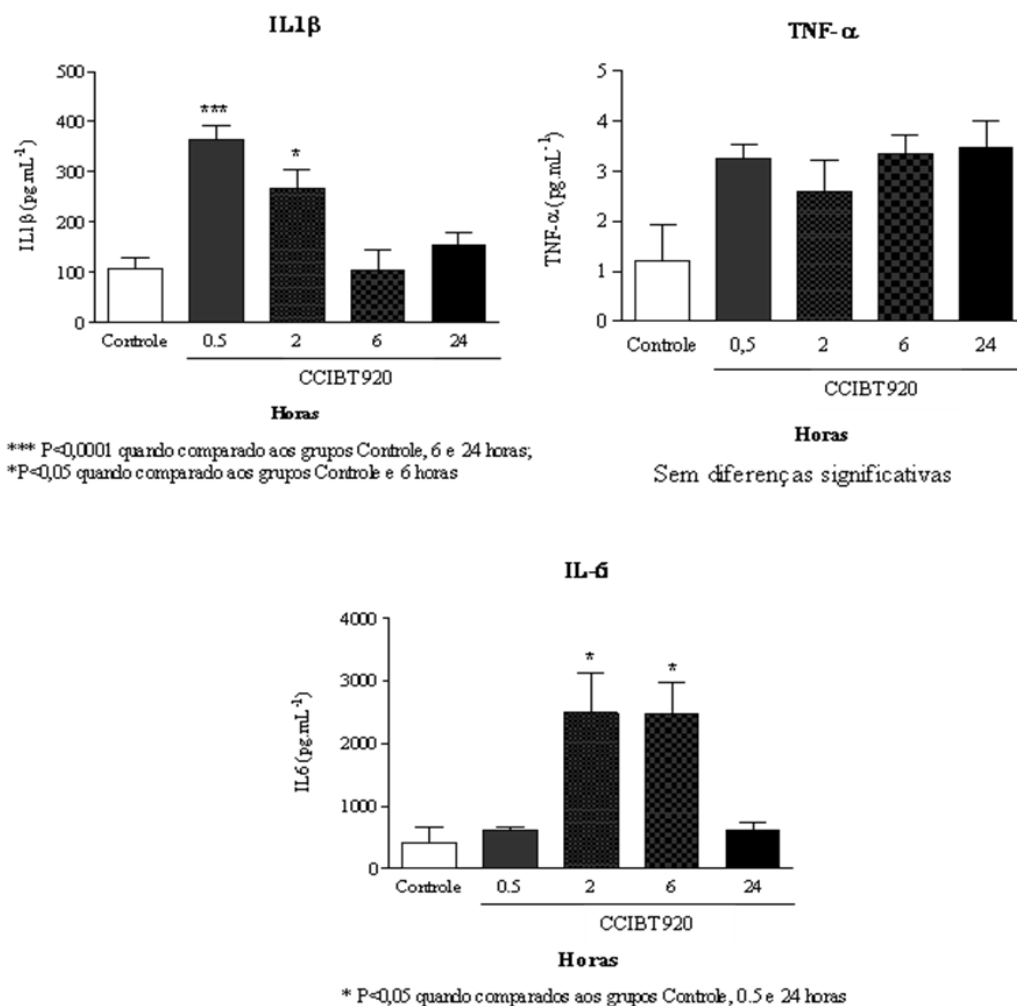
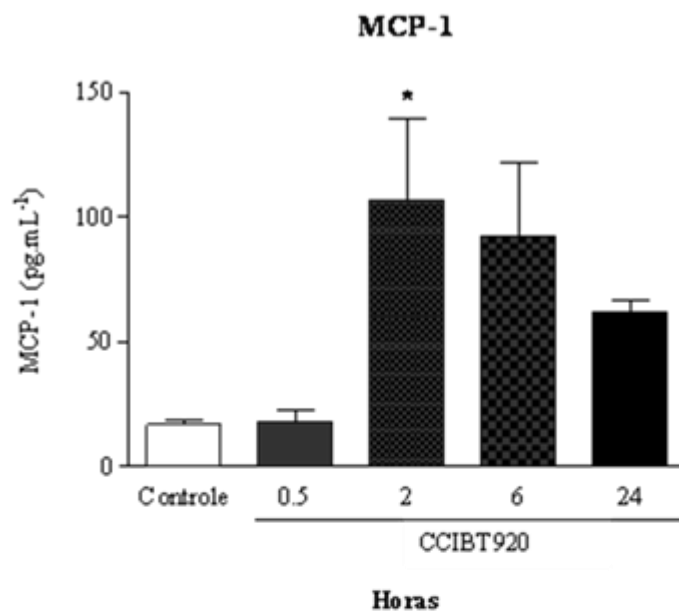
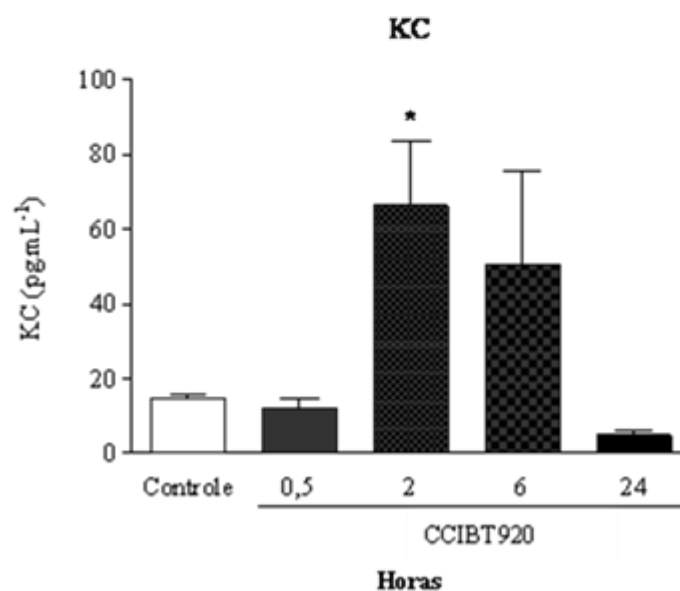


Figura 22. Indução da produção de citocinas pelo extrato metanólico de CCIBT 920 – *G. amphibium*. A dose de 2,5 mg do extrato metanólico foi administrada i.p. e, após diferentes períodos de incubação, foi feito o lavado peritoneal para obtenção da suspensão celular para a dosagem de citocinas por ELISA.



* P<0,05 quando comparado aos grupos Controle e 0.5 hora



* P<0,05 quando comparado aos outros grupos

Figura 23. Indução da produção de quimiocinas pelo extrato metanólico de CCIBT 920 – *G. amphibium*. A dose de 2,5 mg do extrato metanólico foi administrada i.p. e, após diferentes períodos de incubação, foi feito o lavado peritoneal para obtenção da suspensão celular para a dosagem de quimiocinas por ELISA.

A reunião dos resultados das análises por microscopia intravital, histopatológicas e dos ensaios de migração celular comprova que o extrato metanólico de CCIBT 920 – *G. amphibium* causa um intenso processo inflamatório.

Na inoculação de doses maiores do extrato metanólico, há amplificação do processo inflamatório e, como consequência, distúrbios microcirculatórios (estase venular e isquemia), sendo estes a principal causa da morte dos animais-teste, segundo as análises histológicas.

INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE, *IN VITRO*, PELA FRAÇÃO 6

O resultado do ensaio autobiográfico com a enzima acetilcolinesterase está apresentado na Figura 24. É possível observar, na figura, manchas brancas contra um fundo de cor púrpura, com $R_f=0,89$, as quais consistem de zonas de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE). Este ensaio indica potencial efeito inibitório da enzima AChE, por parte do extrato metanólico de CCIBT 920 – *G. amphibium*.

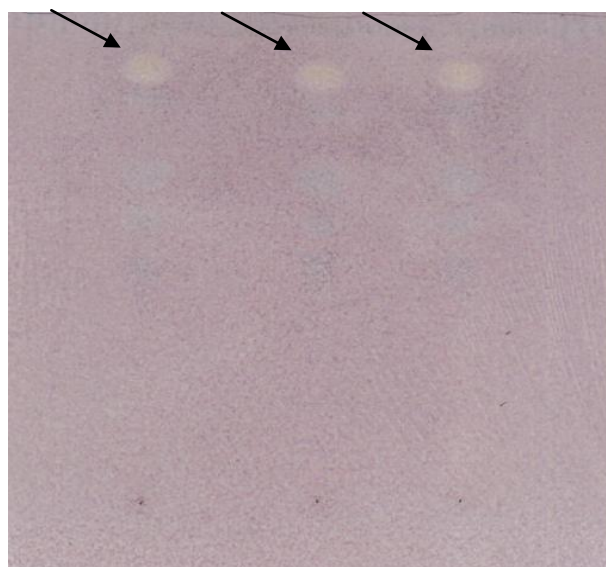


Figura 24. Inibição da enzima acetilcolinesterase, representada por halos brancos (setas). O halo possui R_f de 0.89, indicando que a fração ativa é a fração 6.

A comparação dos R_f s das manchas devidas à ação anticolinesterásica do extrato com os “ R_f s” das faixas originadas pelo fracionamento do extrato metanólico, por CCDC, conclui-se que a fração com atividade anticolinesterásica é a fração 6.

Como mencionado anteriormente, até o presente, apenas duas substâncias com atividade anticolinesterásica foram isoladas de cianobactérias: a toxina anatoxina-a(S) e o alcalóide nostocarbolina.

Os resultados dos testes realizados com o extrato metanólico de *G. amphibium* excluem a possibilidade da presença da ANTX-S; para verificar a possível presença do alcalóide nostocarbolina, na fração ativa, submeteu-se esta fração à CLAE, obtendo-se assim, o perfil cromatográfico e os espectros UV dos picos existentes no cromatograma, sendo esses espectros UV comparados ao espectro do alcalóide nostocarbolina (Figura 25).

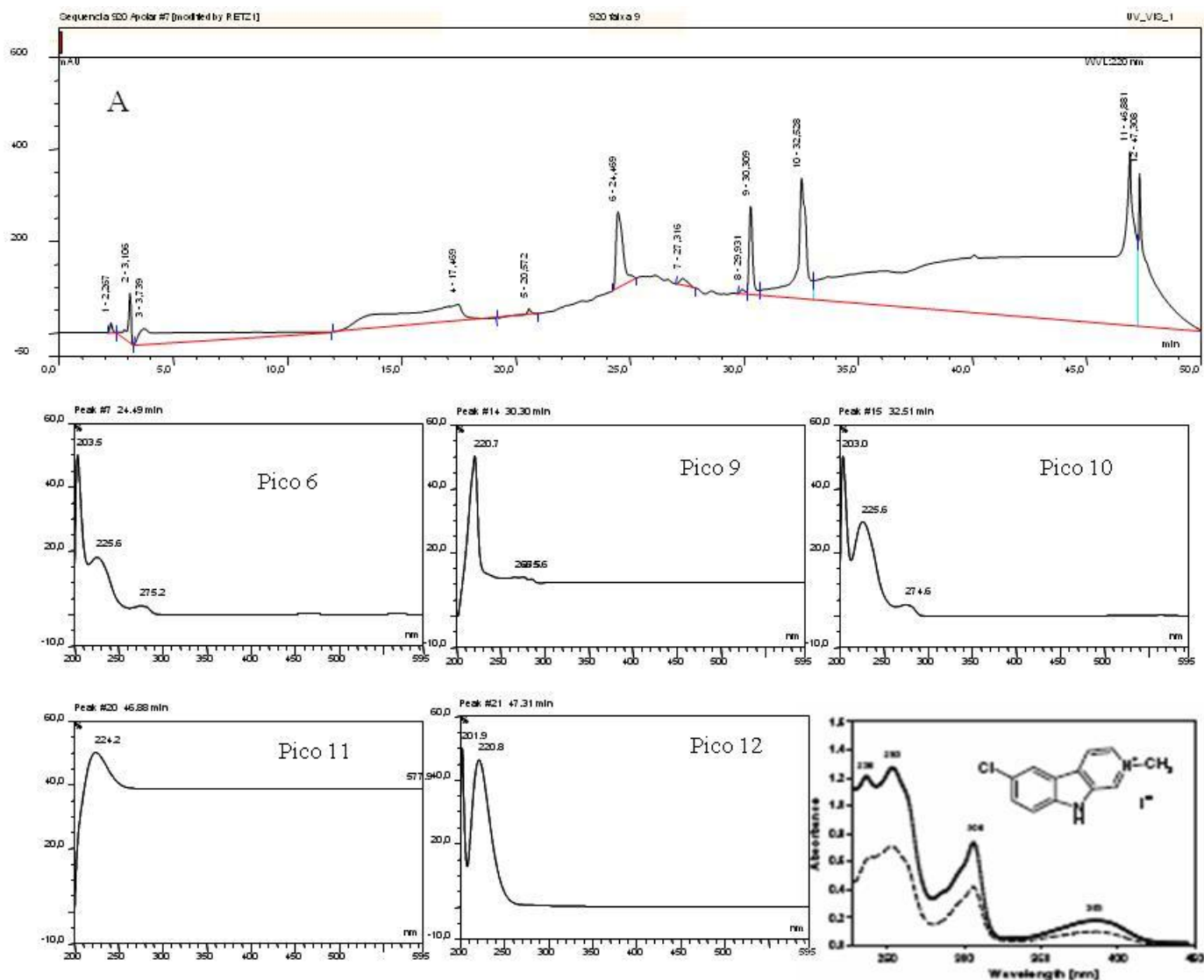


Figura 25. Cromatograma da fração 6, obtido por CLAE, no comprimento de onda de 220 nm. Abaixo estão apresentados os espectros de UV dos picos significativos (6, 9, 10, 11 e 12) e o espectro de UV do alcalóide nostocarbolina.

Essa comparação mostra que as estruturas das substâncias expressas pelos picos 6, 9, 10, 11 e 12 são distintas da estrutura do alcalóide nostocarbolina, levando à conclusão de que a substância ativa contida na fração 6 é desconhecida.

CONCLUSÕES

- Os animais intoxicados com o extrato metanólico de CCIBT 920 – *G. amphibium*, durante o teste padrão em camundongo, apresentaram sinais diferentes dos causados pelas cianotoxinas conhecidas, indicando que este extrato contém substância tóxica desconhecida.
- Do fracionamento do extrato metanólico de CCIBT 920 – *G. amphibium* resultaram seis frações, cuja análise, por espectrometria de massas, indicou serem compostas por substâncias com massas de até 3 kDa, o que exclui a possibilidade de existir LPS nas mesmas, pois estas substâncias possuem massa molecular de 8 a 20 kDa.
- As análises por microscopia intravital mostraram que a administração i.p. de baixas doses do extrato metanólico de CCIBT 920 – *G. amphibium* induz o aumento do rolamento de leucócitos e a administração de altas doses induz processo isquêmico, que causa a morte dos animais.
- A administração i.p. de 2,5 mg do extrato metanólico de CCIBT 920 – *G. amphibium* induz recrutamento celular na cavidade peritoneal, caracterizado principalmente por neutrófilos, e também a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Esses resultados mostram que o extrato metanólico de CCIBT 920 – *G. amphibium* possui efeito pró-inflamatório.
- Os resultados das análises histopatológicas corroboram o que foi observado através da microscopia intravital: os animais intoxicados morrem devido a danos circulatórios.
- Os resultados dos testes com as frações de CCIBT 920 – *G. amphibium* indicam que provavelmente há sinergismo entre as substâncias presentes no extrato.
- Os resultados das análises, por microscopia intravital, das frações de CCIBT 920 – *G. amphibium*, mostram que a fração que apresenta maior potencial pró-inflamatório é a fração 5 e que pode haver sinergismo entre esta e as frações 3, 4 e 6.
- Os resultados dos ensaios bioautográficos (anti-AChE) mostram que o extrato metanólico possui ação inibitória sobre a enzima acetilcolinesterase e que a fração com tal potencial é a fração 6.

- Os resultados da análise da fração 6, por CLAE, e os sinais de intoxicação, achados *post-mortem* e estudos histológicos mostram que a substância com potencial inibitório da enzima acetilcolinesterase é desconhecida, não sendo o alcalóide nostocarbolina ou a toxina ANTX-S.
- CCIBT 920 – *G. amphibium* produz substâncias pró-inflamatórias ainda desconhecidas.

Os resultados deste trabalho mostram que há necessidade de maiores pesquisas sobre CCIBT 920 – *G. amphibium*, que produz substâncias pró-inflamatórias, devido à frequência com que é encontrada nos corpos d'água de abastecimento público e, conseqüentemente, por suas possíveis implicações em problemas de saúde pública.

Esses estudos devem incluir o isolamento das substâncias tóxicas e a avaliação, em mamíferos, dos efeitos da exposição crônica a elas.

RESUMO

Geitlerinema amphibium é uma cianobactéria ainda pouco estudada quanto à toxicidade, porém frequente em reservatórios de abastecimento público da Região Metropolitana de São Paulo (Brasil). Estudos recentes mostram que linhagens desta espécie, provenientes da Represa Guarapiranga (São Paulo - Brasil), apresentam toxicidade, quando testadas pelo teste padrão, em camundongo. Entretanto, os sinais apresentados pelos animais intoxicados são distintos daqueles causados pelas cianotoxinas conhecidas até o presente (microcistinas, nodularinas, cilindrospermopsinas, anatoxinas e saxitoxinas), o que sugere a presença de uma nova cianotoxina, cuja natureza química e efeitos são desconhecidos. Devido à frequência com que *G. amphibium* é encontrada em reservatórios de abastecimento público, são imprescindíveis, além do estudo químico da toxina em questão, a avaliação de seus efeitos, em mamíferos. Para observar os efeitos induzidos pelo extrato metanólico de *G. amphibium* “*in vivo*”, especificamente na microcirculação e em fibras musculares de camundongos, foi empregada a técnica de microscopia intravital. Para tanto, a cepa CCIBT 920 – *G. amphibium* coletada na Represa Guarapiranga e mantida no Banco de Cultura de Cianobactérias do Núcleo de Pesquisas em Ficologia do Instituto de Botânica de São Paulo foi cultivada sob as seguintes condições: meio ASM-1, temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, irradiância $40 - 50 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 14 - 10h claro-escuro. A biomassa, obtida na fase exponencial de crescimento da cultura, foi liofilizada, pesada, extraída com metanol/água 75:25 (v/v) sob a ação de ultra-som e centrifugada (4x). Os sobrenadantes reunidos foram concentrados sob pressão reduzida e esse extrato metanólico seco foi empregado em testes por microscopia intravital. Os animais utilizados nesses ensaios (Camundongos Swiss, com peso entre 19 e 21 g), após serem anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol® Cristália; 50 mg.kg^{-1}), tiveram o músculo cremaster exposto, para observação direta da rede microcirculatória. Nos ensaios prévios, foram avaliados os efeitos de três doses (20, 40 e $120 \mu\text{g}$) do extrato metanólico de *G. amphibium*, administradas topicamente. Posteriormente, foram observados os efeitos de cinco doses [6, 125, 250, 500 e 1000 mg.kg^{-1} de peso corpóreo (p.c.)], administradas intraperitonealmente (i.p.); para cada dose administrada i.p. foram observados dois períodos de incubação: 30 e 120 minutos. Como controle negativo, foi utilizada solução salina estéril e para todos os ensaios foram feitas três repetições ($n=3$). As doses de 20 e $40 \mu\text{g}$, administradas topicamente, não causaram alterações na

microcirculação ou nas fibras musculares, porém a dose de 120 μg induziu estase venular transitória e depósitos de fibrina em arteríolas, além do aumento do número de leucócitos. As doses de 125 e 250 mg.kg^{-1} p.c., administradas i.p., nos dois períodos de incubação, foram capazes de induzir aumento do número de leucócitos e estase venular parcial; a dose de 500 mg.kg^{-1} , após período de incubação de 30 minutos, causou estase venular parcial e após período de 120 minutos causou estase venular e arteriolar; a dose de 1000 mg.kg^{-1} causou estase venular e arteriolar, nos dois períodos de incubação. Estes resultados mostram que o extrato de *G. amphibium* possui atividade pró-inflamatória dose e tempo-dependente, sendo que as doses menores (125 e 250 mg.kg^{-1}) causam aumento do número de leucócitos rolantes e estase venular parcial e as doses elevadas (500 e 1000 mg.kg^{-1}), injúria isquêmica. O extrato metanólico de *G. amphibium* foi submetido a fracionamento por Cromatografia em Camada Delgada em gel de sílica e as frações obtidas foram avaliadas quanto à presença de atividade pró-inflamatória, segundo o mesmo protocolo observado para o estudo do extrato metanólico. Essas frações foram também submetidas a estudos cromatográficos por CLAE e à Espectrometria de Massas (MALDI-MS). Os dados obtidos nesses estudos indicam que a atividade pró-inflamatória apresentada pelo extrato metanólico de *G. amphibium* deve-se principalmente às substâncias presentes na fração 5, podendo ainda, haver sinergismo entre esta e as frações 3, 4 e 6.

ABSTRACT

The cyanobacteria *Geitlerinema amphibium* has been little studied on its toxicity, but it is very common in Metropolitan Region of Sao Paulo (Brazil) public water supply reservoirs. Recent studies showed that *G. amphibium* species strains, collected from Guarapiranga Reservoir (Sao Paulo – Brazil) presented toxicity when tested by standard mouse bioassay. However, the signs presented by the intoxicated animals were distinct from those caused by known cyanotoxins (microcystins, nodularins, cylindrospermopsins, anatoxins and saxitoxins), suggesting the presence of a new cyanotoxin, with unknown chemical nature and effects. Due to the frequency which *G. amphibium* is found in public water supplies, it is essential to perform chemical studies on its extract, and evaluate its effects on mammals. The intravital microscopy technique was used to assess, *in vivo*, the effects induced on mice microcirculation and muscle fibers, by *G. amphibium* methanolic extract. For this, CCIBT 920 – *G. amphibium* strain collected in Guarapiranga Reservoir and kept in the Cyanobacterial Culture Collection of Center for Research in Phycology of Sao Paulo Botanic Institute was grown under the following conditions: ASM-1 medium, temperature of 23 ± 2 °C, irradiance of 40 to $50 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and 14-10 h light-dark. The biomass was taken in the exponential growth phase, lyophilized, weighed and extracted with methanol/water 75:25 (v/v) under ultrasound action, and centrifuged (4x). The supernatants were combined and concentrated under reduced pressure. The resulting dried methanolic extract was used in intravital microscopy bioassays with Swiss mice, (weighing between 19 and 21 g), which were anesthetized with pentobarbital sodium (Hypnol® Cristália, 50 mg.Kg^{-1}) and submitted to direct microscopic examination of the **microcirculatory network** of the **exposed cremaster muscle**. Initially, it was evaluated the effects of three doses (20, 40 and $120 \mu\text{g}$) of the *G. amphibium* administered topically methanolic extract. Subsequently, it was observed the effects of five intraperitoneally administered doses [$6, 125, 250, 500$ and 1000 mg.Kg^{-1} body weight (bw)]; for each dose administered ip, it was observed two incubation periods, of 30 and 120 minutes respectively. As a negative control, it was used sterile saline solution, and $n = 3$, for each experiment. Topical administration of 20 and $40 \mu\text{g}$ doses did not cause changes in microcirculation and muscle fibers, but the $120 \mu\text{g}$ dose induced transient venular stasis and fibrin deposits in arterioles, and an increase in leukocytes number. Intraperitoneally administered 125 and 250 mg.Kg^{-1} bw doses, in the two incubations periods, induced an increase in leukocyte

number and partial venular stasis; the 500 mg.Kg⁻¹ dose, after 120 minutes incubation period, caused arteriolar and venular stasis, similarly to the 1000 mg.Kg⁻¹ dose, for both incubation periods. These results show that the *G. amphibium* methanolic extract has time and dose-dependent pro-inflammatory activity, that the lower doses (125 and 250 mg.Kg⁻¹) increased the leukocyte rolling and partial venular stasis and the higher doses (500 and 1000 mg.Kg⁻¹) caused ischemic injury. The *G. amphibium* methanolic extract was fractionated by silica gel preparative thin layer chromatography and the fractions were assessed for the presence of pro-inflammatory activity, using the same protocol observed for the methanolic extract study. These fractions were also subjected to HPLC and mass spectrometry (MALDI-MS) studies. Data from these studies indicated that the pro-inflammatory activity displayed by the *G. amphibium* methanolic extract is mainly due to substances present in fraction 5, and there may be synergism between this fraction and the others (3, 4 and 6).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A.K. & Lichtman, A.H.** 2007. *Imunologia básica: Funções e distúrbios do sistema imunológico*. 2. ed. Saunders Elsevier, Rio de Janeiro, pp. 281-311.
- Adams, B., Pörzgen, P., Pittman, E., Yoshida, W.Y., Westenburg, H.E. & Horgen, F.D.** 2008. Isolation and structure determination of malevamide E, a dolastatin 14 analogue, from the marine cyanobacterium *Symploca laete-viridis*. *Journal of Natural Products* 71: 750-754.
- Aderka, D., Le, J.M. & Vilcek, J.** 1989. IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. *Journal of Immunology* 143: 3517-3523.
- Admi, V., Afek, U. & Carmeli, S.** 1996. Raocyclamides A and B, novel cyclic hexapeptides isolated from the cyanobacterium *Oscillatoria raoi*. *Journal of Natural Products* 59: 396-399.
- Al-Awar, R.S., Corbett, T.H., Ray, J.E., Polin, L., Kennedy, J.H., Wagner, M.M. & Williams, D.C.** 2004. Biological evaluation of cryptophycin 52 fragment A analogues: effect of the multidrug resistance ATP binding cassette transporters on antitumor activity. *Molecular Cancer Therapeutics* 3: 1061-1067.
- Allen, M.M.** 1968. Ultrastructure of the cell wall and cell division of unicellular blue-green algae. *Journal of Bacteriology* 96: 842-852.
- Andrianasolo, E.H., Goeger, D. & Gerwick, W.H.** 2007. Mitsoamide: a cytotoxic linear lipopeptide from the Madagascar marine cyanobacterium *Geitlerinema* sp. *Pure and Applied Chemistry* 79: 593-602.
- Anspach, F.B.** 2001. Endotoxin removal by affinity sorbents. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 49: 665-681.
- Azevedo, M.T.P. & Sant'anna, C.L.** 2003. *Sphaerocavum brasiliense*, a new planktic genus and species of Cyanobacteria from reservoirs of São Paulo State, Brazil. *Algological Studies* 109: 79-92.
- Azevedo, S.M.F.O., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw G.R. & Eaglesham, G.K.** 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru - Brazil *Toxicology* 181/182: 441-446.
- Banker, R. & Carmeli, S.** 1999. Inhibitors of serine proteases from a waterbloom of the cyanobacterium *Microcystis* sp. *Tetrahedron* 55: 10835-10844.

- Baumann H.I., Keller, S., Wolter, F.E., Nicholson, G.J., Jung, G., Süssmuth, R.D. & Jüttner, F.** 2007. Planktocyclin, a cyclooctapeptide protease inhibitor produced by the freshwater cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. *Journal of Natural Products* 70: 1611-1615.
- Becher, P.G., Baumann, H.I., Gademann K. & Jüttner, F.** 2009. The cyanobacterial alkaloid nostocarboline: an inhibitor of acetylcholinesterase and trypsin. *Journal of Applied Phycology* 20: 1-8.
- Berry, J.P., Gantar, M., Gawley, R.E., Wang, M. & Rein, K.S.** 2004. Pharmacology and toxicology of pahayokolide A, a bioactive metabolite from freshwater species of *Lyngbya* isolated from Florida Everglades. *Comparative Biochemistry and Physiology* 139: 231-238.
- Bittencourt-Oliveira, M.C., Kujbida, P., Cardozo, K.H.M., Carvalho, V.M., Moura, A.N., Colepicolo, P. & Pinto, E.** 2004. A novel rhythm of microcystin biosynthesis is described in the cyanobacterium *Microcystis panniformis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 326: 687-694.
- Bittencourt-Oliveira, M.C., Moura, A.N., Oliveira, M.C. & Massola Jr., N.S.** 2009. *Geitlerinema* species (Oscillatoriales, Cyanobacteria) revealed by cellular morphology, ultrastructure and DNA sequencing. *Journal of Phycology* 45: 716-725.
- Bonjouklian, R., Smitka, T.A., Hunt, A.H., Occolowitz, J.L., Perun Jr., T.J., Doolin, L., Stevenson, S., Wijayarathne, R., Szewczyk, S. & Patterson, G.M.L.** 1996. A90720A, a serine protease inhibitor isolated from a terrestrial blue-green alga *Microchaete loktakensis*. *Tetrahedron* 52: 395-404.
- Bouvy, M., Molica, R., Oliveira, S., Marinho, M. & Beker, B.** 1999. Dynamics of toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil. *Aquatic Microbial Ecology* 20: 285-287.
- Branco, C.W. & Senna, P.A.C.** 1994. Factors influencing the development of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* in Paranoá Reservoir, Brasília, Brazil. *Algological Studies* 75: 85-96.
- Carmeli, S., Moore, R.E. & Patterson, G.M.L.** 1990. Tolytoxin and new scytonemins from three species of *Scytonema*. *Journal of Natural Products* 53: 1533-1542.
- Carvalho, L. R., Sant' Anna, C. L., Dogo, C. R., Pimenta, A. M. ; Bemquerer, M. P. & Kiyota, S.** 2004. Diversidade de cianobactérias e detecção de microcistina-LR

nas Represas Billings e Guarapiranga, Alto Tietê, Estado de São Paulo. Pesquisa Veterinária Brasileira 24: 15-16.

- Carvalho, L.R.** 2006. Cianotoxinas. In: C.L., Sant'Anna, M.T.P. Azevedo, L.F. Agujaro, M.C. Carvalho, L.R. Carvalho & R.C.R. Souza (eds.). Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras. Interciência, Rio de Janeiro, pp. 9-19.
- Carvalho, L.R., Sant'Anna, C.L., Gemelgo, M.C.P. & Azevedo, M.T.P.** 2007. Cyanobacterial occurrence and detection of microcystin by planar chromatography in surface water of Billings and Guarapiranga Reservoirs, SP, Brazil. Revista Brasileira de Botânica 30: 141-148.
- Cetesb.** 1992. Implantação de métodos para avaliação de algas tóxicas. Relatório teórico. São Paulo.
- Chellappa, N.T. & Costa, M.A.M.** 2003. Dominant and co-existing species of Cyanobacteria from a eutrophicated reservoir of Rio Grande do Norte State – Brazil. Acta Oecologica 24: S3-S10.
- Choi, H., Eugene, N., Smith, J.E., Preskitt, L.B. & Gerwick, W.H.** 2010. Crossbianols A – D, toxic brominated polyphenyl ethers from the Hawai'ian bloom-forming cyanobacterium *Leptolyngbya crossbyana*. Journal of Natural Products, no prelo.
- Christiansen, G., Fastner, J., Erchard, M., Börner, T. & Dittman, E.** 2003. Microcystin biosynthesis in Plankyothrix: genes, evolution and manipulation. Journal of Bacteriology 185: 564-572.
- Clark, B.R., Eugene, N., Teasdale, M.E., Rowley D.C., Matainaho, T., Valeriote, F.A., & Gerwick, W.H.** 2008. Natural products chemistry and taxonomy of the marine cyanobacterium *Blennothrix cantharidosmum*. Journal of Natural Products 71: 1530-1537.
- Clissa, P.B, Lopes-Ferreira, M., Della-Casa, M.S., Farsky, S.H.P. & Moura-Da-Silva, A.M.** 2006. Importance of jararhagin disintegrin-like and cysteine-rich domains in the early events of local inflammatory response. Toxicon 47: 591-596.
- Codd, G.A., Lindsay, J., Young, L.M., Morrison, L.F. & Metcalf, J.S.** 2005. Harmful Cyanobacteria: from mass mortalities to management measures. In: *Harmful Cyanobacteria*. Huisman, J., Matthijs, H.C.P. & Visser, P.M. (eds.). Springer, Dordrecht.

- Conceição, K., Konno, K., Melo, R.L., Marques, E.E., Hituma-Lima, C.A., Lima, C., Richardson, M., Pimenta, D.C. & Lopes-Ferreira, M.** 2006. Orpotrin: a novel vasoconstrictor peptide from the venom of the brazilian stingray *Potomotrygom gr. orbigny*. *Peptides* 27: 3039-3046.
- Costa, S.M & Azevedo, S.M.F.O.** 1994. Implantação de um banco de culturas de cianofícias tóxicas. *Ilheringia Série Botânica* 45: 69-74.
- Cox, P.A., Banack, S.A. & Murch, S.J.** 2003. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 13380-13383.
- Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R.R., Metcalf, J.S., Morrison, L.F., Codd, G.A. & Bergman, B.** 2005. Diverse taxa of cyanobacteria produce β -methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 5074-5078.
- Danner, R.L., Joiner, K.A., Rubin, M., Patterson, W. H., Johnson, N., Ayers, K.M. & Parrillo, J.E.** 1989. Purification, toxicity and anti-endotoxin activity of polymyxin B nonapeptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33: 1428-1434.
- Dinarello, C.A.** 2000. Proinflammatory Cytokines. *Chest* 118: 503-508.
- Dittmann, E. & Wiegand, C.** 2006. Cyanobacterial toxins: occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Molecular Nutrition & Food Research* 50: 7-17.
- Falch, B.S., Konig, G.M., Wright, A.D. & Sticher, O.** 1993. Ambigol A and B: new biologically active polychlorinated aromatic compounds from the terrestrial blue-green alga *Fischerella ambigua*. *Journal of Organic Chemistry* 58: 6570-6575.
- Fastner, J., Flieger, I. & Neumann, V.** 1998. Optimized extraction of microcystins from field samples: a comparison of different solvents and procedures. *Water Research* 32: 3177-3181.
- Feghali, C.A. & Wright, T.M.** 1997. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers of bioscience* 2: 12-26.
- Gavins, F.N.E. & Chatterjee, B.E.** 2004. Intravital Microscopy for the study of mouse microcirculation in anti-inflammatory drug research: Focus on the mesentery and cremaster preparations. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 49: 1-14.

- Gerwick, W.H., Tan, L.T. & Sitachitta, N.** 2001. Nitrogen-containing metabolites from marine cyanobacteria. *In*: G.A. Cordell (ed.). The alkaloids. Chemistry and Biology 57, Academic Press, San Diego, pp. 75-177.
- Golakoti, T., Ogino, J., Heltzel, C.E., Le Husebo, T., Jensen, C.M., Larsen, L.K., Patterson, G.M.L., Moore, R.E., Mooberry, S.L., Corbett, T.H. & Valeriote, F.A.** 1995. Structure determination, conformational analysis, chemical stability studies, and antitumor evaluation of the cryptophycins. Isolation of 18 new analogs from *Nostoc* sp. Strain GSV 224. *Journal of American Chemical Society* 117: 12030-12049.
- Granger, D.N. & Kubes, P.** 1994. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *Journal of Leukocyte Biology* 55: 662-675.
- Gunasekera, S.P., Ross, C., Paul, V.J., Matthew, S. & Luesch, H.** 2008. Dragonamides C and D, linear lipopeptides from the marine cyanobacterium brown *Lyngbya polychroa*. *Journal of Natural products* 71: 887-890.
- Harada, K.** 2007. Cyanobacterial toxins present in *Microcystis aeruginosa* extracts – More than microcystins! *Toxicon* 50: 585-588.
- Harada, K., Kondo, F. & Lawton, L.** 1999. Laboratory analysis of cyanotoxins. *In*: I. Chorus & J. Bartram (eds.). Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, New York, pp. 369-405.
- Harrigan, G.H., Yoshida, W.Y., Moore, R.E., Nagle, D.G., Park, P.U., Biggs, J., Paul, V.J., Mooberry, S.L., Corbett, T.H. & Valeriotte, F.A.** 1998. Isolation, structure determination, and biological activity of dolastatin 12 and lyngbyastatin 1 from *Lyngbya majuscula*/*Schizothrix calcicola* cyanobacterial assemblages. *Journal of Natural Products* 61: 1221-1225.
- Heinrich, P.C., Castell, J.V. & Adus, T.** 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochemical Journal* 265: 621-636.
- Helms, G., Moore, R.E., Niemczura, W.P. & Patterson, G.M.L.** 1988. Scytonemin A, a novel calcium antagonist from a blue-green alga. *Journal of Organic Chemistry* 53: 1298-1307.
- Hummert, C., Dahlmann, J., Reichelt, M., & Luckas, B.** 2001. Analytical techniques for monitoring harmful cyanobacteria in lakes. *Lakes and Reservoirs: research and management* 6: 159-168.

- Hunter, P.R.** 1998. Cyanobacterial toxins and human health. *Journal of Applied Microbiology* 84: 35S-40S.
- Ishibashi M., Moore, R.E., Patterson, G.M.L., Xu, C. & Clardy, J.** 1986. Scytonophycins, cytotoxic and antimycotic agents from the cyanophyta *Scytonema pseudohofmanni*. *Journal of Organic Chemistry* 51: 5300-5306.
- Ishibashi M., Moore, R.E., Patterson, G.M.L., Xu, C. & Clardy, J.** 1986. Scytonophycins, cytotoxic and antimycotic agents from the cyanophyta *Scytonema pseudohofmanni*. *Journal of Organic Chemistry* 51: 5300-5306.
- Ishida, K., Matsuda, H., Murakami, M. & Yamaguchi, K.** 1996. Kawaguchiipeptin A, a novel cyclic undecapeptide from cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (NIES-88). *Tetrahedron* 52: 9025-9030.
- Ishida, K., Nakagawa, H. & Murakami, M.** 2000. Microcyclamide, a cytotoxic cyclic hexapeptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Natural Products* 63: 1315-1317.
- Ishitsuka, M.O., Kusumi, T. & Kakisawa, H.** 1990. Microviridin: a novel tricyclic depsipeptide from the toxic cyanobacterium *Microcystis viridis*. *Journal of American Chemical Society* 112: 8180-8182.
- Jaki, B., Zerbe, O., Heilmann, J. & Sticher, O.** 2001. Two novel cyclic peptides with antifungal activity from the cyanobacterium *Tolypothrix byssoidea* (EAWAG 195). *Journal of Natural Products* 64: 154-158.
- Jancar, S.** 2001. Imunidade natural e inflamação. In: V. Calich & C. Vaz. (eds.). *Imunologia*. Revinter, Rio de Janeiro, pp. 11-29.
- Jardim, F.A. Fonseca, Y.M.F., Vianna, L.N.L., Azevedo, S.M.F.O. & Ciscotto, P. H.C.** 2001. Primeira ocorrência de cianobactérias tóxicas em um reservatório da COPASA - Minas Gerais/Brasil. *BIOS – Cadernos do Departamento de Ciências Biológicas da PUC Minas* 9: 83-91.
- Jardim, F.A., Jardim, B.F.M., Neiva, V.M., VaLle, K.R. & Martins, A.** 2007. Adoção de um programa de monitoramento da qualidade da água para avaliação do impacto dos efluentes gerados em uma planta de extração de fosfatos – Araxá – MG. *Anais do 24º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, pp. 1-10.
- Junqueira, M.E., Grund, L.Z., Orii, N.M., Saraiva, T.C., de Magalhães Lopes, C. A., Lima, C. & Lopes-Ferreira, M.** 2007. Analysis of inflammatory reaction induced by the catfish (*Cathorops spixii*) venoms. *Toxicon* 49: 909-919.

- Komárek, J. & Anagnostides, K.** 2005. Cyanoprokaryota 2. Teil: Oscillatoriales. In: B. Büdel, L. Krienitz, G. Gärtner & M. Schagerl (eds.). Süßwasserflora von Mitteleuropa 19. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 1-548.
- Krupek, R.A., Branco, C.C.Z. & Peres, C.K.** 2008. Levantamento florístico das comunidades de macroalgas da bacia do Rio das Pedras, região centro-sul do Estado do Paraná, Sul do Brasil. *Hoehnea* 35: 189-208.
- Kuebler, W.M., Parthasarathi, K., Lindert, J. & Bhattacharya, J.** 2007. Real-time lung microscopy. *Journal of Applied Physiology* 102: 1255-1264.
- Kuiper-Goodman, T., Falconer, I. & Fitzgerald, J.** 1999. Human health aspects. In: Chorus & J. Bartram (eds.). Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, New York, pp. 113-153.
- Kujbida, P., Hatanaka, E., Campa, A., Colepicolo, P & Pinto, E.** 2006. Effects of microcystins on human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 341: 273-277.
- Kujbida, P., Hatanaka, E., Vinolo, M.A.R., Waisman, K., Cavalcanti, D.M.H., Curi, R., Farsky, S.H.P. & Pinto, E.** 2009. Microcystins –LA, -YR e –LR action on neutrophil migration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 382: 9-14.
- Kuroda, E.K., Minillo, A., Rocha, O., Filho, E.R. & Bernardo, L.D.** 2007. Acute toxicity evaluation for a microcystis spp. Strain by bioassay with male swiss albino mice. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental* 12: 24-31.
- Lawton, L., Morris, L.A. & Jaspars, M.** 1999. A bioactive modified peptide, aeruginosamide, isolated from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Organic Chemistry* 64: 5329-5332.
- Lee, E.-S.J. & Gleason, F.K.** 1994. A second algicidal natural product from the cyanobacterium, *Scytonema hofmanni*. *Plant Science* 103: 155-160.
- Lima, C., Clissa, P.B., Piran-Soares, A.A., Tanjoni, I., Moura-da-Silva, A.M., Lopes-Ferreira, M.** 2003. Characterization of local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mouse model of tissue injury. *Toxicon* 42: 499-507.
- Llewellyn, L.E.** 2006. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Natural Products Report* 23: 200-222.

- Lombardo, M., Pinto, F.C.R., Vieira, J.M.S., Honda, R.Y., Pimenta, A.M.C., Bemquerer, M.P., Carvalho, L.R. & Kiyota, S.** 2006. Isolation and structural characterization of microcystin-LR and three minor oligopeptides simultaneously produced by *Radiocystis feernandoi* (Chroococcales, Cyanobacteriae): A Brazilian toxic cyanobacterium. *Toxicon* 47: 560-566.
- Lomonte, B., Lungren, J., Johansson, B. & Bagge, U.** 1994. The dynamics of local tissue damage induced by *Bothrops asper* venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle; an intravital and electron microscopic study. *Toxicon* 32: 41-55.
- Lopes, R.I.** 2008. Estrutura da comunidade fitoplanctônica de uma estação de amostragem da Represa Guarapiranga, São Paulo, SP. XII Encontro de Iniciação Científica do Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo.
- Lopes-Ferreira, M., Moura-da-Silva, A.M., Piran-Soares, A.A., Ângulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M. & Farsky, S.H.P.** 2002. Hemostatic effects induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom: a model of endothelium mediated blood flow impairment. *Toxicon* 40: 1141-1147.
- Macagno, A., Molteni, M., Rinaldi, A., Bertoni, F., Lanzavecchia, A., Rossetti, C. & Sallusto, F.** 2006. A cyanobacterial LPS antagonist prevents endotoxin shock and blocks sustained TLR-4 stimulation required for cytokine expression. *Journal of Experimental Medicine* 203: 1281-1492.
- Magalhães, K.W., Lima, C., Piran-Soares, A.A., Marques, E.E., Hiruma-Lima, C. A. & Lopes-Ferreira, M.** 2006. Biological and biochemical properties of the brazilian *Potomotrygon* stingrays: *Potomotrygon* cf. *scobina* and *Potomotrygon* gr. *orbigny*. *Toxicon* 47: 575-583.
- Magalhães, V.F., Soares, R.M. & Azevedo, S.M.F.O.** 2001. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon* 39: 1077-1085.
- Mahmood, N.A. & Carmichael, W.W.** 1986. The pharmacology of anatoxin-a(S), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Toxicon* 24: 425-434.
- Marston A., Kissling J. & Hostettmann K.** 2002. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis* 13: 51-54.

- Matern, U., Oberer, L., Erhard, M., Herdman, M. & Weckesser, J.** 2003. Hofmannolin, a cyanopeptolin from *Scytonema hofmanni* PCC 7110. *Phytochemistry* 64: 1061-1067.
- Matern, U., Oberer, L., Falchetto, R.A., Erhard, M., König, W.A., Herdman, M. & Weckesser, J.** 2001. Scyptolin A and B, cyclic depsipeptides from axenic cultures of *Scytonema hofmanni* PCC 7110. *Phytochemistry* 58: 1087-1095.
- Matthew, S., Schupp, P.J. & Luesch, H.** 2008. Apratoxin E, a cytotoxic peptolide from a Guamanian Collection of the marine cyanobacterium *Lyngbya bouillonii*. *Journal of Natural Products* 71: 1113-1116.
- Matthiensen, A., Beattie, K. A., Yunes, J. S., Kaya, K. & Codd, G. A.** 2000. [D-Leu¹] Microcystin-LR, from the cyanobacterium *Microcystis* RST 9501 and from a *Microcystis* bloom in the Patos Lagoon estuary, Brazil. *Phytochemistry* 55: 383-387.
- McElhiney, J. & Lawton, L.A.** 2005. **Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins** *Toxicology and Applied Pharmacology* 203: 219-230.
- Murakami, M., Ishida, Q.S.K., Matsuda, H., Okino, T. & Yamaguchi, K.** 1997. Microviridins, elastase inhibitors from the cyanobacterium *Nostoc minutum* (NIES-26). *Phytochemistry* 45: 1197-1202.
- Murakami, M., Shin, H.J., Matsuda, H., Ishida, K. & Yamaguchi, K.** 1997. A cyclic peptide, anabaenopeptin B, from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Phytochemistry* 44: 449-452.
- Murch, S.J., Cox, P.A., Banack, S.A., Steele, J.C. & Sacks, O.W.** 2004. Occurrence of β -methilamino-L-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. *Acta Neurologica Scandinavica* 110: 267-269.
- Myers, J.L., Sekar, R. & Richardson, L.L.** 2007. Molecular detection and ecological significance of the cyanobacterial genera *Geitlerinema* and *Leptolyngbya* in black band disease of corals. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5173-5182.
- Mynderse, J.S. & Moore, R.E.** 1978. Toxins from blue-green algae: structures of Oscillatoxin A and three related bromine-containing toxins. *Journal of Organic chemistry* 43: 2301-2303.
- Nakano, M., Nakano, Y. & Saito-Taki, T.** 1989. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* K-139 Strain. *Microbiology and Immunology* 33: 787-792.

- Nakano, Y., Shirai, M., Mori, N. & Nakano, M.** 1991. Neutralization of microcystin shock in mice by tumor necrosis factor alpha antiserum. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 327-330.
- Namikosh, M., Yuan, M., Sivonem, K., Carmichael, W.W., Rinehart, K.L., Rouhiainen, L., Sun, F., Brittain, S. & Otsuki, A.** 1998. Seven new microcystins possessing two L-glutamic acid units, isolated from *Anabaena* sp. Strain 186. *Chemical Research in Toxicology* 11: 143-149.
- Nishiwaki-Matsushima, R., Ohta, T., Nishiwaki, S., Suganuma, M., Kohyama, K., Ishikawa, T., Carmichael, W.W. & Fujiki, H.** 1992. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 118: 420-424.
- Park, B.S., Song, D.H., Kim, H.M., Choi, B-S., Lee, H. & Lee, J-O.** 2009. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458: 1191-1196.
- Pintão, M.C.T. & Franco, R.F.** 2001. Coagulação intravascular disseminada. *Medicina, Ribeirão Preto*. 34: 282-291.
- Ploutno, A., Shoshan, M. & Carmeli, S.** 2002. Three novel protease inhibitors from a natural bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Natural Products* 65: 973-978
- Porfírio, Z., Ribeiro, M.P., Estevam, C.S., Houly, R.L. S. & Santana, E.G.** 1999. Hepatosplenomegaly caused by an extract of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* bloom collected in the Manguaba Lagoon, Alagoas-Brazil. *Revista de Microbiologia* 30: 278-285.
- Portmann, C., Blom, J., Gademann, K. & Jüttner, F.** 2008. Aeruciclamides A and B: isolation and synthesis of toxic ribosomal heterocyclic peptides from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Journal of Natural Products* 71: 1193-1196.
- Prinsep, M.R., Patterson, G.M.L., Larsen, L.K. & Smith, C.D.** 1998. Tolyporphins J and K, two further porphinoïd metabolites from the cyanobacterium *Tolypothrix nodosa*. *Journal of Natural Products* 61: 1133-1136.
- Rapala, J., Lahti, K., Räsänen, L.A., Esala, A-L., Niemelä, S.I. & Sivonen, K.** 2002. Endotoxins associated with cyanobacteria and their removal during drinking water treatment. *Water Research* 36: 2627-2635.

- Rapala, J., Sivonen, K., Lyra, C. & Niemelä.** 1997. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. As a function of growth stimuli. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2206-2212.
- Raud, J. & Lindborn, L.** 1994. Studies by intravital microscopy of basic inflammatory mechanisms and acute allergic inflammation. *In*: Brain, S. D. (ed.) *The handbook of immunopharmacology: immunopharmacology of the microcirculation*. Academic Press, London, pp. 127-170.
- Reshef, V. & Carmeli, S.** 2001. Protease inhibitors from a water bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron* 57: 2885-2894.
- Rodríguez, V., Moura, S., Pinto, E., Pereira, C.M.P. & Braga, R.C.** 2006. Aspectos toxicológicos e químicos da anatoxina-a e seus análogos. *Química Nova*. 29: 1365-1371.
- Rohrlack, T., Christoffersen, K., Hansen, P.E., Zhang, W., Czarnecki, O., Henning, M., Fastner, J., Erhard, M., Neilan, B.A. & Kaebernick, M.** 2003. Isolation, characterization and quantitative analysis of microviridin J, a new *Microcystis* metabolite toxic to *Daphnia*. *Journal of Chemical Ecology* 29: 1757-1770.
- Rohrlack, T., Christoffersen, K., Kaebernick, M. & Neilan, B.A.** 2004. Cyanobacterial protease inhibitor microviridin J, causes a lethal molting disruption in *Daphnia pulicaria*. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5047-5050.
- Rollins, B. J.** 1997. Chemokines. *Blood*. 90: 909-928.
- Russel, A.B., Hemscheidt, T., Liang, J., Paik, S., Moore, R.E. & Tius. M.A.** 1995. Total Synthesis of cryptophycins. Revision of the structure of cryptophycins A and C. *Journal of American Chemical Society* 117: 2479-2490.
- Sano, T., Takagi, H., Morrison, I.F., Metcalf, J.S., Codd, G.A. & Kaya, K.** 2005. Leucine aminopeptidase M inhibitors, Cyanostatin A and B, isolated from cyanobacterial water blooms in Scotland. *Phytochemistry* 66: 543-548.
- Sant'Anna C.L., Azevedo, M.T.P., Werner, V.R., Dogo, C.R., Rios, F.R. & Carvalho, L.R.** 2008. Review of toxic species of cyanobacteria in Brazil. *Algological Studies* 126: 251-265.
- Sant'Anna, C.L., Melcher, S.S., Carvalho, M.C., Gemelgo, M.P. & Azevedo, M.T.P.** 2007. Planktic cyanobacteria from Alto Tietê Basin, SP, Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 30: 1-17.

- Sawatani, M.** 2008. “Comunidade fitoplanctônica no Braço Taquacetuba da Represa Billings, São Paulo, Brasil”. XII Encontro de Iniciação Científica do Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo.
- Shin, H.J., Murakami, M., Matsuda, H. & Yamaguchi, K.** 1996. Microviridins D-F, serine protease inhibitors from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* (NIES-204). *Tetrahedron* 52: 8159-8168.
- Simmons, T.L., Eugene, N., Ureña, L.D., Romero, L.I., Ortega-Barría, E., Gerwick, L & Gerwick, W.H.** 2008. Viridamides A and B, lipodepsipeptides with antiprotozoal activity from the marine cyanobacterium *Oscillatoria nigro-viridis*. *Journal of Natural Products* 71: 1544-1550.
- Skulberg, O.M.** 2000. Microalgae as a source of bioactive molecules – experience from cyanophyte research. *Journal of Applied Phycology* 12: 341-348.
- Soares, R.M., Yuan, M., Servaites, J. C., Delgado, A., Magalhães, V.F., Hilborn, E.D., Carmichael, W.W. & Azevedo, S.M.F.O.** 2006. Sublethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Environ Toxicol.* 21: 95-103.
- Song, L., Sano, T., Li, R., Watanabe, M.M., Liu, Y. & Kaya, K.** 1998. Microcystin production of *Microcystis viridis* (Cyanobacteria) under different culture conditions. *Phycological Research* 46: 19-23.
- Sotero-Santos, R.B., Silva, C.R.S.E., Verani, N.F., Nonaka, K.O. & Rocha, O.** 2006. Toxicity of a cyanobacteria Bloom in Barra Bonita Reservoir (Middle Tietê River, São Paulo, Brazil). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64: 163-170.
- Souza, M.P.** 2007. Organismos planctônicos de sistemas de lagoas de tratamento de esgotos sanitários como alimento natural na criação de tilápia do nilo, Viçosa, MG. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Stevenson C.S., Capper, E.A., Roskak, A.K., Marquez, B., Eichman, C., Jackson, J.R., Mattern, M., Gerwick, W.H., Jacobs, R.S. & Marshall, L.A.** 2002. The identification and characterization of the marine natural product scytonemin as a novel antiproliferative pharmacophore. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 303: 858-866.
- Stewart, I., Schluter, P.J. & Shaw, G.R.** 2006. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health – a review. *Environmental Health: A Global Open Access Science Source*.

- Sudek, S., Haygood, M.G., Youssef, D.T.A. & Schmidt, E.W.** 2006. Structure of Trichamide, a cyclic cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum*, predict from the genoma sequence. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4382-4387.
- Tan, L.T.** 2007. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. *Phytochemistry* 68: 954-979.
- Taori, K., Paul, V.J. & Luesch, H.** 2008. Kempopeptins a and b, serine protease inhibitors with different selectivity profiles from a marine cyanobacterium *Lyngbya* sp. *Journal of Natural Products* 71: 1625-1629.
- Teixeira, M.G.L.C., Costa, M.C.N., Carvalho, V.L.P., Pereira, M.S. & Hage, E.** 1993. Gastroenteritis epidemic in the área of the Itaparica, Bahia, Brazil. *Bulletin of the Pan American Health Organization* 27: 244-253.
- Tonk, L., Visser, P.M., Christiansen, G., Dittmann, E., Snelder, E.O., Wieder, C., Mur, L. R. & Huisman, J.** 2005. The microcystin composition of the cyanobacterium *Planktothrix agardhii* changes toward a more toxic variant with increasing light intensity. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5177-5181.
- Tonk, L., Visser, P.M., Christiansen, G., Dittmann, E., Snelder, E.O., Wieder, C., Mur, L.R. & Huisman, J.** 2005. The microcystin composition of the cyanobacterium *Planktothrix agardhii* changes toward a more toxic variant with increasing light intensity. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5177-5181.
- Tsukamoto, S., Painuly, P., Young, K.A., Yang, X. & Shimizu, Y.** 1993. Microcystilide A: a novel cell-differentiation-promoting depsipeptide from *Microcystis aeruginosa*. *Journal American Chemical Society* 115: 11046-11047.
- Vajkoczy, P., Ullrich, A. & Menger, M. D.** 2000. Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation. *Neoplasia*. 2: 53-61.
- Van Apeldoorn, M.E., Van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A. & Bakker, G.J.I.** 2007. Toxins of Cyanobacteria. *Nutr. Food Res.* 51: 7-60.
- Vega, A. & Bell, E. A.** 1967. α -Amino-b-methylaminopropionic acid, a new amino acid from seeds of *Cycas circinalis*. *Phytochemistry* 6: 759-762.
- Vezie, C., Brient, L., Sivonen, K., Bertru, G. Lefevre, J.-C. & Salkinoja-Salonen, M.** 1998. Variation of microcystin content of cyanobacterial blooms and isolated strains in lake Grand-Lieu (France). *Microbial Ecology* 35: 126-135.

- Vieira, J.M.S., Azevedo, M.T.P., Azevedo, S.M.F.O., Honda, R.Y. & Corrêa, B.** 2005. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. *Toxicon* 45: 901-909.
- Villa, F., Lieske, k., & Gerwick, L.** 2010. Selective MyD88-dependent pathway inhibition by the cyanobacterial natural product malyngamide f acetate. *European Journal of Pharmacology* 629: 10-146.
- Von Elert, E., Oberer, L., Merkel, P., Huhn, T.& Blom, J.F.** 2005. Cyanopeptolin 954, a chlorine-containing chymotrypsin inhibitor of *Microcystis aeruginosa* NIVA Cy43. *Journal of Natural Products* 68: 1324-1327.
- Watanabe, W.** 1996. Isolation cultivation and classification of bloom-forming *Microcystis* in Japan. *In: Toxic Microcystis*. Watanabe. M.R. Watanabe, K.-i. Harada, W.W. Carmichael & H. Fujiki (eds.). CRC Press, New York, pp. 13-34.
- Westphal, O. & Jann, K.** 1965. Bacterial lipopolysaccharides: Extraction with phenolwater and further applications of the procedure. *In: Whistler, R. L., Wolan, M.L. (eds). Methods in Carbohydrate chemistry*. New York: Academic Press Inc. (5): 83-91.
- Wiedner, C., Visser, P. M., Fastner, J., Metcalf, J. S., Codd, G.A. & Mur, L.R.** 2003. Effects of light on the microcystin content of *Microcystis* strain PCC 7806. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1475-1481.
- Wiegand, C & Pflugmacher, S.** 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 203: 201-218.
- Williams, D.E., Craig, M., Holmes, C.F.B. & Andersen, R.J.** 1996. Ferriroic acids A and B, new cyclic hexapeptides from the freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Natural Products* 59: 570-575.
- Yamaki, H., Sitachitta, N., Sano, T. & Kaya, K.** 2005. Two new chymotrypsin inhibitors isolated from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-88. *Journal of Natural Products* 68: 14-18.
- Yunes, J.S., Cunha, N.T., Proença, L.A.O., Barros, L.P.C. & Monserrat, J.M.** 2003. Cyanobacterial neurotoxins from Southern Brazilian Freshwaters. *Comments on Toxicology*. 9: 103-115.
- Zagatto, P.A., Aragão, M.A., Domingues, D.F., Buratini, S.V. & Araujo, R.P.A.** 1998. Avaliação ecotoxicológica do reservatório do Guarapiranga, SP, com ênfase

à problemática das algas tóxicas e algicidas. Anais do IV Congresso Latino-Americano de Ficologia, pp. 63-81.

- Zainuddin, E.N., Mentel, R., Wray, V., Jansen, R., Nimtz, M., Lalk, M. & Mundt, S.** 2007. Cyclic depsipeptides, Ichthyopeptins A and B, from *Microcystis ichthyoblabe*. Journal of Natural Products 70: 1084-1088.
- Zainuddin, E.N., Mundt, S., Wegner, U. & Mentel, R.** 2004. Cyanobacteria a potencial source of antiviral substances against influenza virus. Medical Microbiology and Immunology 191: 181-182.