

Hepatotoxicidade da cianotoxina microcistina

Hepatotoxicity of the microcystin cyanotoxin

Andréa de Castro Leal¹ e Manoel do Carmo Pereira Soares¹

RESUMO

*Constitui interesse emergente em saúde pública avaliar a possibilidade de intoxicação humana por biotoxinas de algas cianofíceas, principalmente as hepatotoxinas do grupo das microcistinas. A microcistina, um heptapeptídeo monocíclico, é produzida principalmente pela cianobactéria *Microcystis aeruginosa*. São caracterizadas por alguns aminoácidos variáveis, dois deles com uma estrutura não usual que possuem importante papel na hepatotoxicidade da microcistina. Apesar do acometimento humano atribuído as microcistinas incluem gastroenterite, reações alérgicas ou irritativas, neurotoxicidade, o principal alvo da toxina é o fígado. Nos hepatócitos as microcistinas são carregadas pelo sistema transportador do ácido biliar, inibindo a atividade da proteína fosfatase no citoplasma. A inibição leva a mudanças morfológicas na membrana plasmática pela hiperfosforilação de citoqueratinas, e à atividade de promoção tumoral pelas proteínas hiperfosforiladas. Os métodos de detecção e quantificação de microcistinas no ambiente incluem a cromatografia líquida, o bioensaio em camundongos e os testes imunoenzimáticos. O último vem ganhando destaque pela praticidade e alta sensibilidade.*

Palavras-chaves: Hepatotoxicidade. Cianotoxina. Microcistina.

ABSTRACT

*At public health, there is increasingly interest on evaluating the possibility of human intoxication by biotoxins from blue-green algae, mainly the hepatotoxins from the microcystin group. Microcystin, a monocyclic heptapeptide, is mainly produced by a cyanobacteria called *Microcystis aeruginosa*. It is characterized by a few variable amino acids, from which two of them have an unusual structure and play an important role in the hepatotoxicity of the microcystin. Although human illnesses include gastroenteritis, allergic or irritative reactions, and neurotoxicity, the main target of this toxin is the liver. Inside the hepatocytes, microcystins are carried by the transportation system of the bile acid, inhibiting the activity of the protein phosphatase in the cytoplasm. This inhibition causes a morphologic change in the plasmatic membrane because of the hyperphosphorylation of cytokeratins, and also the tumoral promotion by the hyperphosphorylated proteins. The techniques used in the detection and quantification of the microcystins in the environment include liquid chromatography, bioanalysis of mice, and immunoenzymatic tests using mono and polyclonal antibodies against those toxins. The latter has been remarked because of its practicality and its high sensibility.*

Key-words: Hepatotoxicity. Microcystin. Cyanotoxin.

As microcistinas são uma família de toxinas produzidas por espécies de cianobactérias, principalmente pela *Microcystis aeruginosa*, mas também por outras espécies como *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc* e *Cylindrospermopsis*^{5 6 13 14 25 30 44 45 50}.

As cianobactérias ou cianofíceas (algas azuis), são microorganismos aeróbicos fotoautotróficos. Entretanto, sua organização celular demonstra que esses microorganismos são procariontes e, portanto, muito semelhantes bioquimicamente e estruturalmente às bactérias. Algumas de suas espécies podem produzir toxinas ao crescerem em altas densidades nos ecossistemas

aquáticos eutrofizados, fenômeno este denominado floração (*bloom* ou *waterbloom* em inglês)^{2 6 8 14 15 18 23 26 36}.

Desde o primeiro relato de intoxicação de animais relacionados a cianobactéria tóxica publicado por George Francis na revista *Nature* em 1878, a floração de cianobactérias em ecossistemas aquáticos eutrofizados tem sido referida em várias regiões do mundo. Essas florações tóxicas tem provocado mortes de animais domésticos e silvestres, além de intoxicações em humanos^{1 8 9 15 32 33 38}.

As estruturas destas microcistinas foram uniformemente determinadas como monocíclicas fazendo parte de sua composição dois L-aminoácidos variáveis que incluem, por

1. Seção de Hepatologia do Instituto Evandro Chagas, Belém, PA.

Endereço para correspondência: Dr. Manoel do Carmo Pereira Soares. Av. Almirante Barroso 492. 66090-000 Belém, PA.

Fax: 91 211-4418.

e-mail: manoesoares@iec.pa.gov.br

exemplo, leucina e alanina (LA), leucina e arginina (LR), tirosina e arginina (YR), tirosina and alanina (YA), tirosina e metionina (YM), e dois aminoácidos não usuais, N-metildehidroalanina (MdhA) e ácido 3-amino-metoxi-10-fenil-2,6,8- trimetildeca-4,6-dienóico (Adda)^{3 30 31 41}.

Assim, a sua toxicidade é classificada em 3 grupos, dependendo da substituição de dois L-aminoácidos variáveis: forte: -LR, -LA, e -YR; média: -WR; ou fraca: -RR e -M(O)R. Resultados de pesquisas sugerem que os resíduos de Adda e Glu da molécula de microcistina-LR possuem importante papel na hepatotoxicidade da microcistina^{30 50}.

TOXICIDADE EM ANIMAIS

Toxicidade aguda. As microcistinas causam morte em camundongos e ratos de laboratório dentro de 1 a 3 horas. O fígado é o órgão mais severamente afetado, demonstrando necroses hemorrágicas extensas e desestruturação dos sinusóides. A congestão hepática leva ao aumento do órgão, dobrando o peso do fígado. Em contraste, outros órgãos apresentam-se aparentemente normais. Quando a microcistina-LR foi injetada intraperitonealmente em camundongo, a DL₅₀ (dose letal para 50% dos animais expostos) observada variou de 32,5 a 100µg/kg. Esta variação pode ser devido a diferenças de idade, sexo, raça e condições fisiológicas dos animais^{11 12 18 20}.

Experimentos *in vivo* e *in vitro* têm sido realizados para avaliar a toxicidade da microcistina. Em experimentos *in vivo*, a microcistina [¹⁴C] foi administrada intraperitonealmente em camundongo. Setenta por cento deste marcador foi localizado no fígado após um minuto; este valor aumentou para 90% após 3 horas. As elevações de enzimas séricas, particularmente a desidrogenase sorbitol, específica para as mitocôndrias hepáticas, foram correlacionadas com a lesão hepática. A pesquisa morfológica a partir de micrografias eletrônicas demonstrou mudanças no formato celular, incluindo dilatação do retículo endoplasmático rugoso, reorganização dos microfilamentos hidrópicos das mitocôndrias desprovidos de depósitos eletrônicos, alteração da arquitetura sinusoidal e, por último, lise dos hepatócitos^{12 30}.

Em fígados perfundidos com a microcistina-LR, as lesões microscópicas aparecem 15 minutos após o início da perfusão, tornando-se progressivamente mais severas. As lesões iniciais são localizadas na região periportal, sendo caracterizadas por vacuolização hepática seguida de sua dissociação e arredondamento. Em 45 minutos, a necrose é observada nas regiões periportais, com dissociação dos hepatócitos nas regiões centrolobulares²⁸.

O exame histopatológico, obtido de biópsias hepáticas e necropsias de pacientes expostos a microcistina em um centro de hemodiálise em Caruaru, confirmou a presença de uma hepatite tóxica aguda, similar aquelas observadas em animais expostos a microcistinas. Nas vítimas necropsiadas, não foram encontradas alterações macroscópicas, porém histologicamente foi observada severa necrose dos hepatócitos de forma difusa, panlobular e individual em vários estágios, com o rompimento

celular e apoptose. Foi observado também variáveis graus de colestase canalicular, além de infiltrado inflamatório misto consistindo predominantemente de neutrófilos e alguns linfócitos em regiões portais não comprometidas. Entre as células necróticas, hepatócitos regenerativos multinucleares foram observados. Contrastando com os modelos animais para avaliar a hepatotoxicidade pela microcistina, não houve evidências de hemorragia intra-hepática. A microscopia eletrônica demonstrou edema intracelular, alterações mitocondriais, comprometimento do retículo endoplasmático liso e rugoso, vacúolos lipídicos e corpúsculos residuais^{29 40}.

A morte por intoxicação por microcistinas é geralmente aceita como resultado de hemorragia intra-hepática e choque hipovolêmico, podendo ocorrer dentro de poucas horas ou até em alguns dias, havendo a possibilidade de ser precedida de coma, tremores musculares e de insuficiência respiratória. Outros achados como diarreia aquosa ou sanguinolenta podem estar presentes^{8 21 30}.

Toxicidade crônica. Apenas uma publicação sobre a toxicidade crônica da microcistina foi levantada. No trabalho de Falconer (1988) a *Microcystis aeruginosa* foi coletada a partir do armazenamento de água de uma fazenda. As células foram lisadas e seu extrato obtido através de centrifugação. Este extrato possuía um valor de DL₅₀ de 1,7mg/kg, correspondendo ao total de concentração de microcistina de 56,6µg/ml, e foi administrado aos camundongos em séries de diluições como uma única fonte de água. Camundongos de ambos os sexos, assim como os controles, foram dissecados em intervalos de mais de um ano de exposição. Foram também realizadas autópsias, exames histopatológicos, e análise plasmática da desidrogenase láctica e alaninaminotransferase¹⁶.

Ainda com relação ao trabalho de Falconer (1988), a progressiva lesão do hepatócito e sua necrose, a filtração leucocitária e fibrose foram os efeitos crônicos observados, além da amiloidose entre os hepatócitos e o endotélio sinusoidal e das veias porta. Nenhum efeito foi observado na fertilidade feminina, na mortalidade do embrião, na viabilidade neonatal ou no desenvolvimento esquelético. Nenhuma das alterações descritas foram observadas no grupo controle. Concluindo, o principal efeito advindo da toxicidade crônica está relacionada à lesão hepática¹⁶.

Recentemente, tem sido indicado que a microcistina LR é um promotor tumoral hepático mediado através das atividades das proteínas fosfatases tipo 1 e tipo 2A, e é um efetivo inibidor do início do desenvolvimento embriogênico em camundongo. A carcinogênese e a lesão embriogênica estão provavelmente relacionados com a atividade de promotor tumoral hepático da microcistina^{7 12 27 30 43}.

MECANISMO TÓXICO NO FÍGADO

Sistema de transporte do ácido biliar. Os mecanismos celulares de captação da microcistina têm sido estudados através do uso da dihidromicrocistina radiomarcada. A captação da microcistina radiomarcada demonstrou ser

específica para os hepatócitos isolados de ratos podendo ser reduzida de forma concentração-dependente quando estes são incubados na presença de sais biliares, colatos e taurocolatos²⁸.

A inibição completa é alcançada na presença dos inibidores dos transportadores dos ácidos biliares, como a antamanida, sulfobromoftaleína e rifampicina. A membrana do hepatócito possui carreadores responsáveis pela captação ativa dos ácidos biliares. A incorporação da microcistina no interior dos hepatócitos é inibida pelos ácidos biliares, e isto apoia a evidência de que o sistema de transporte do ácido biliar é um carreador de microcistina. Este mecanismo de entrada celular pode explicar a especificidade e o organotropismo da microcistina^{12 42}.

Inibição da proteína fosfatase e promoção tumoral. A microcistina-LR (1µM) induz a fosforilação de uma variedade de proteínas de hepatócitos de rato. Nesta concentração da toxina há a fosforilação três vezes maior de citoqueratinas 8 e 18 em relação às outras proteínas. A hiperfosforilação das citoqueratinas 8 e 18 induzem a mudanças no formato celular e no rearranjo da rede de filamentos intermediários no citoplasma. A perda dos filamentos intermediários de citoqueratina associado a sua fosforilação em células tratadas com microcistina pode ser o elo que explique a atividade potencial de promotor tumoral da microcistina^{30 43}.

Alguns trabalhos sugerem que as microcistinas e as nodularinas podem provavelmente induzir a inativação dos produtos do gene de supressão tumoral nos hepatócitos^{17 18 21 34}.

PROTEÇÃO CONTRA TOXICIDADE DA MICROCISTINA

Devido à rápida, irreversível e severa lesão hepática causada pela microcistina, a terapia contra sua toxicidade parece ter pouco ou nenhum valor, sendo que a efetiva medida de profilaxia também é questionável¹².

Por outro lado, com o objetivo de desenvolver antídotos para a toxicose causada pela microcistina um certo número de compostos biologicamente ativos têm sido testados em camundongos. Os antioxidantes ativos de membrana como a vitamina E, a silimarina, o glutathione e o éster monoetilico de glutathione, produzem significativa proteção contra a letalidade. A vitamina E, um antioxidante lipossolúvel, previne a morte em 50% dos camundongos tratados com a dose letal da microcistina³⁰.

Como foi discutido anteriormente, a captação hepatocelular da microcistina pode ser inibida na presença de sais biliares e de inibidores do transporte do ácido biliar como a antamanida, a sulfobromoftaleína e a rifampicina^{12 19 30}.

O efeito dos glicocorticóides na liberação induzida de microcistina de ácido aracdônico (C¹⁴) foi estudado, sendo demonstrado que a fluocinolona, a dexametasona e a hidrocortisona, como glicocorticóides, suprimem a liberação induzida pela microcistina de ácido aracdônico livre e a liberação de prostaciclina e TXB₂³⁰.

A rifampicina é um derivado semi-sintético derivado da rifamicina B, o qual pertence a um grupo estruturalmente

similar, um complexo de antibióticos macrocíclicos produzidos pelo *Streptomyces mediterranei*. Uma dose de 600mg administrada pela via intragástrica em camundongos, uma hora antes do uso de uma concentração de duas vezes a DL50 da microcistina LR, protege todos os animais contra os efeitos letais da toxina através da imunomodulação, bloqueio celular da captação da microcistina, inibição da síntese protéica, ou a combinação destes efeitos^{12 30}.

EVIDÊNCIAS DE INTOXICAÇÕES HUMANAS POR CIANOBACTÉRIAS

As intoxicações de populações humanas pelo consumo oral de água contaminada por cepas tóxicas de cianobactérias já foram descritas em países como Austrália, Inglaterra, China e África do Sul^{8 16 39 49}.

As principais vias de exposição a cianotoxinas são o uso recreativo de lagos e rios (via oral e dérmica) e o consumo de água potável e de alimentos de algas (via oral). Uma via de exposição menos comum é através do uso de chuveiros (via inalatória) e excepcionalmente através da hemodiálise (via endovenosa)^{8 18 29 40}.

Os sintomas exibidos por pessoas expostas ao contato com a água contendo cianobactérias incluem irritações de pele e da mucosa ocular, sintomas tipo febre do feno, vertigem, fadiga e gastroenterite aguda. Geralmente não é possível determinar qual dos grupos de cianobactérias, se as hepatotoxinas ou as neurotoxinas, como responsável pelos sintomas observados⁸.

A toxicose aguda letal provocada pelas cianotoxinas raramente ocorre em humanos, pois a filtração normal, a coagulação e outros processos de tratamento de água nos sistemas de abastecimento municipais, diluem as células tóxicas havendo a liberação de toxinas em níveis abaixo daqueles para causar estes efeitos agudos letais^{2 8 18}.

Porém, publicações nos Estados Unidos e Austrália implicam as cianotoxinas em casos de doença humana (sintomas agudos não letais e toxicidade crônica) a partir da contaminação de sistemas de abastecimento de água municipal, especialmente após o tratamento da floração com sulfato de cobre, havendo a consequente lise das células e a liberação das toxinas através do sistema de distribuição^{6 22 33 37 38}.

Nestes e em outros casos envolvendo a ingestão acidental, os sintomas descritos incluem dor abdominal, náuseas, vômitos, diarreia, faringite, tosse seca, cefaléia, pneumonia atípica, e a elevação de enzimas hepáticas no soro (especialmente a gamaglutamiltransferase). Apesar de na maioria das vezes a cianobactéria e algumas vezes as toxinas envolvidas serem identificadas, os níveis da toxina associado à doença não têm sido estabelecidos em nenhum destes casos⁴⁸.

No Brasil, o trabalho de Teixeira et al⁴⁶ descreve uma evidência de correlação entre a ocorrência de florações de cianobactérias, no reservatório de Itaparica (Bahia) e a morte de 88 pessoas, entre as 200 intoxicadas, pelo consumo de água do reservatório, entre março e abril de 1988⁴⁶.

No início de 1996, 123 pacientes renais crônicos, após terem sido submetidos a sessões de hemodiálise em uma clínica da cidade de Caruaru (PE), passaram a apresentar um quadro clínico compatível com uma grave hepatotoxicose, que no entanto não era correlacionada com nenhum dos fatores usualmente tidos como causadores deste tipo de intoxicação. Destes, 54 vieram a falecer até cinco meses após o início dos sintomas e, de acordo com informações fornecidas pela Secretaria de Saúde de Estado de Pernambuco, a referida clínica recebia água sem um tratamento completo e usualmente era feita cloração no próprio caminhão tanque utilizado para transportar a água, em períodos de falha no abastecimento pela rede pública^{3 29 40}.

Como havia o conhecimento prévio da ocorrência de florações de cianobactérias em mananciais de abastecimento da região nordeste, foi testada a hipótese dessas intoxicações estarem sendo causadas por hepatotoxinas presentes na água utilizada durante as sessões de hemodiálise.

As análises feitas pelo Prof. Wayne W. Carmichael na Wright State University – Ohio – Estados Unidos, confirmaram a presença de microcistinas no carvão ativado utilizado no sistema de purificação de água da clínica, bem como em amostras de sangue e fígado dos pacientes intoxicados^{4 8}. Além disso, as contagens das amostras do fitoplâncton do reservatório que abastecia a cidade demonstraram uma dominância de gêneros de cianobactérias comumente relacionados com a produção de cianotoxinas.

Este passou a ser o primeiro caso confirmado de mortes humanas causadas por uma toxina produzida por cianobactérias^{29 40}. Em termos globais, os relatos clínicos de danos para a população humana, pelo consumo oral de toxinas de cianobactérias em águas de abastecimento, aparecem como consequência de acidentes ou má administração. Como resultado, esses relatos são parcialmente estimados e as circunstâncias originais são frequentemente de difícil definição.

Em regiões agriculturáveis ou áreas densamente povoadas há muitas vezes o aparecimento em reservatórios de abastecimento público de florações constantes de cianobactérias e, usualmente, as autoridades de meio ambiente tentam controlar as florações com o tratamento convencional utilizando sulfato de cobre. Este método provoca a lise desses organismos, liberando as toxinas para a água. Tais ações podem causar exposições agudas às toxinas. Além disso, há evidências que populações abastecidas por reservatórios que apresentam extensas florações podem estar expostas a baixos níveis de toxinas por longo período¹⁵.

Essa exposição prolongada deve ser considerada como um sério risco à saúde uma vez que, como descrito anteriormente, as microcistinas, que são o tipo mais comum de toxinas de cianobactérias, são potentes promotoras de tumores e, portanto, este consumo continuado de pequenas doses de hepatotoxinas pode levar a uma maior incidência de câncer hepático na população exposta. Dessa forma, é importante que os efeitos crônicos de exposições prolongadas por ingestão oral de baixas concentrações dessas toxinas sejam avaliados^{17 47}.

No Brasil, os estudos que vem sendo realizados no Laboratório de Fisiologia e Cultivo de Microalgas do Núcleo

de Produtos Naturais (NPPN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), tem confirmado a ocorrência de cepas tóxicas de cianobactérias em corpos d'água (reservatórios de abastecimento público, lagos artificiais, lagoas salobras e rios) dos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná, Bahia, Pernambuco e do Distrito Federal^{1 34}. Aproximadamente 75% das cepas isoladas se mostraram tóxicas quando testadas em bioensaios de toxicidade, sendo que apenas uma delas é produtora de neurotoxinas enquanto que as demais de hepatotoxinas¹.

Na região Norte foi detectado, através de método imunoenzimático (Envirogard Microcystins Plate Kit), traços de microcistina em amostras de água de ambientes aquáticos lóticos no Município de Anajás, Ilha do Marajó³².

Para se estabelecer os padrões de segurança da água são necessárias demonstrações dos efeitos de toxicidade dose-dependentes e determinação dos níveis máximos que não causam efeitos adversos ou Nível Máximo Aceitável ("Maximum Acceptable Level" - MAC), pelo uso de muitos tipos de dados biológicos, toxicológicos e epidemiológicos. Por exemplo, nos Estados Unidos eles são publicados pela Academia Nacional de Ciências como: "Risk Assessment in Federal Government: Managing the Process". Esses padrões são suplementados por publicações mais específicas como da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA). O Canadá se utiliza do *Guidelines for Canadian Drinking Water Quality – Supporting Documentation*^{2 40}.

Na Austrália, uma proposta para limite de concentração de microcistinas que não apresente efeito adverso foi publicada por Falconer et al¹⁸. A proposta que resultou desse trabalho, incluindo a incorporação de um fator de segurança contra a promoção de tumores é de 1,0mg de microcistina ou nodularina/L. Baseado no uso de células de *Microcystis* na dieta dos porcos, esta concentração corresponde a 5.000 células/mL³.

Um número similar para MAC foi apresentado em junho de 1994, num documento da *Canadian Drinking Water*, onde a dose máxima aceitável é de 0,5µg/L para microcistina LR. Finalmente, em 1997 a Organização Mundial de Saúde (OMS) editou um *Guideline* específico para toxinas de cianobactérias em águas de abastecimento público, onde foi estabelecido o limite de 1µg/L, como máximo aceitável para consumo oral humano diário.

No Brasil, o anexo a Portaria n° 1469 de 20 de 12 de 2000, intitulada *Norma de Qualidade da água para consumo humano*, estabelece como padrão de potabilidade para a microcistina valores até 10µg/L em até 3 amostras nas análises realizadas nos 12 meses. Estabelece também que o monitoramento de cianobactérias na água do manancial, no ponto de captação, deve obedecer frequência mensal, quando o número de cianobactérias não exceder 10.000 células/ml, caso exceda este valor, será exigida análise semanal de cianotoxinas na águas de saída do tratamento e nas entradas (hidrômetro) das clínicas de hemodiálise e indústrias de injetáveis. Para análise de cianobactérias e cianotoxinas e comprovação de toxicidade por bioensaios em camundongos, devem ser adotados as metodologias propostas pela Organização Mundial de Saúde em sua

publicação: *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their Public Health consequences, monitoring and management*⁸⁵.

MÉTODOS DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MICROCISTINAS

Ao longo do tempo e no âmbito de suas atividades, ficologistas e outros profissionais têm desenvolvido e aplicado métodos de detecção e quantificação de microcistinas no ambiente. A cromatografia líquida e o bioensaio em camundongos são métodos freqüentemente utilizados nos países industrializados para detectar essas toxinas oriundas do ambiente ou de espécimes biológicos^{3 12 24}.

Entretanto, o bioensaio em camundongos é inespecífico, possui baixa sensibilidade, e requer uma grande quantidade de amostras da toxina e um número considerável de animais de laboratório. A cromatografia líquida é método dispendioso e demorado, porém útil para a quantificação, isolamento e purificação das cianotoxinas a partir de células liofilizadas^{3 25}.

Dessa forma, mais recentemente, vem ganhando destaque a utilização de testes imunoenzimáticos utilizando anticorpos mono ou policlonais contra as diversas toxinas de cianobactérias^{9 10}. Pela sua praticidade, alta sensibilidade e pela capacidade de quantificar as cianotoxinas de um número de amostras considerável em um período de tempo curto, acredita-se na sua implementação na vigilância ambiental e epidemiológica do agravo em questão, através de sua implantação em laboratórios de referência das Instituições afiliadas ao Ministério da Saúde do Brasil.

São escassas as informações sobre a utilização desses métodos na detecção das toxinas em espécimes biológicos de humanos. Tal abordagem somente tem se apresentado em circunstâncias isoladas de surtos da intoxicação com repercussões trágicas como entre os hemodialisados de Caruaru, Pernambuco, 1996.

Como conseqüência, os centros de diálise precisam considerar a toxicidade potencial de cianobactérias na água distribuída pelos sistemas de abastecimento público e um rigoroso controle interno do sistema de purificação de água das clínicas precisa ser feito pelas autoridades de saúde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Azevedo SMFO. Current studies on toxic cyanobacteria (blue-green algae) of Brazilian water bodies. Programas e resumos do IV Congresso Latino-Americano, II Reunião Ibero-Americana e VII Reunião Brasileira de Ficologia. Tema: "Conservação da Biodiversidade e novas tecnologias: promessas e perigos" p.19, 1996.
2. Azevedo SMFO. Toxic cyanobacteria and the Caruaru tragedy. The Journal of Venomous Animals and Toxins Available from: URL: <http://www.botunet.com.br/cevap/revistas/jvat197/report29>, 1997.
3. Azevedo SMFO. Toxinas de Cianobactérias: Causas e Conseqüências para a Saúde Pública. Medicina On Line, volume 1, ano 1, número 3, 1998.
4. Azevedo SMFO, Evans, WR, Carmichael WW, Namikoshi M. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystins aeruginosa*. Journal of Applied Phycology 6: 261-265, 1994.
5. Bourrelly P. Les algues bleues ou cyanophycées. In: Bourrelly P. Les Algues D'eau Douce. Société Nouvelle des Éditions Boubeé, Paris. p. 287-317, 1985.
6. Branco SM. Algas tóxicas - controle das toxinas em águas de abastecimento. Revista do Departamento de Água e Esgoto de São Paulo 20: 47-53, 1959.
7. Carbis CR, Simons JA, Mitchell GF, Anderson JW, Mccauley I. A biochemical profile for predicting the chronic exposure of sheep to *Microcystis aeruginosa*, an hepatotoxic species of blue-green alga. Research in Veterinary Science 57: 310-316, 1994.
8. Carmichael WW. Toxic Microcystis and the environment. In: Watanabe ME, Harada K, Carmichael WW, Fujiki H (eds) Toxic Microcystis. Boca Raton, New York, London, Tokio, CRC Press p. 1-11, 1996.
9. Chu FS, Huang X, Wei RD. Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Microcystins in blue-green algal blooms. Journal Association off Anals Chemike 73: 451-456, 1990.
10. Chu FS, Huang X, Wei RD, Carmichael WW. Production and characterization of antibodies against Microcystins. Applied and Enviromental Microbiology 55: 1928- 1933, 1989.
11. Dahlem AM, Hassan AS, Swanson SP, Carmichael WW, Beasley VR. A model system for studying the bioavailability of intestinally administered Microcystin-LR, a hepatotoxic peptide from the *Cyanobacterium Microcystis aeruginosa*. Pharmacology & Toxicology 64: 177-181, 1989.
12. Dawson RM. The Toxicology of Microcystins. Toxicon 36: 953-962, 1998.
13. Desikachary TV. General part. In: Desikachary TV (ed) Cyanophyta. New Delhi: Indian Council of Agricultural Research p. 3-58, 1959.
14. Esteves FA. Comunidade Fitoplantônica. In: Esteves FA (ed) Fundamentos de Limnologia Editora Interciência Ltda Rio de Janeiro, p. 363-428, 1988.
15. Esteves FA. Eutrofização Artificial. In: Esteves FA (ed) Fundamentos de Limnologia. Editora Interciência LTDA, Rio de Janeiro p. 489-513, 1988.
16. Falconer IA. Tumor promotion by *Myrocystis sp.* The Medical Journal of Australia 20:130: 351, 1989.
17. Falconer IA. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. Enviromental Toxicology and Water Quality: An International Journal 6: 177-184, 1991.
18. Falconer IA. Toxicity of the Blue-Green Alga (*Cyanobacterium*) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. Enviromental Toxicology and Water Quality: An International Journal 9: 131-139,1994.
19. Falconer IA. Potencial impact on human health of cyanobacteria. Phycologia 35: 6-11,1996.
20. Falconer IA, Buckley T, Runnegar MTC. Biological half-live, organ distribution and excretion of ¹²⁵I-labelled toxic peptide from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. Austrly Journal Biology Science 39: 17-21,1986.
21. Fujiki H, Sueoka E, Suganuma M. Carcinogenesis of Microcystins. In: Watanabe ME, Harada K, Carmichael WW, Fujiki H (eds) Toxic Microcystis. Editora Boca Raton CRC Press New York, London, Tokio p. 203-232,1996.
22. Googman TK, Gupta S, Combley H, Thomas BH. Microcystins in drinking water: risk assessment and derivation of possible guidance value for drinking water. Enviromental Health Directore p. 67-73, 1995.
23. Hanazato T. Toxic cyanobacteria and the zooplanton communit. In: Watanabe, ME, Harada K, Carmichael WW, Fujiki H (eds) Toxic Microcystis. Editora Boca Raton, CRC Press, New York, London, Tokio p. 79-101,1996.
24. Harada K. Chemistry and detection of microcystins. In: Watanabe ME, Harada K, Carmichael WW, Fujiki H (eds) Toxic Microcystis. Editora Boca Raton, CRC Press. New York, London, Tokio p. 103-149, 1996.
25. Harada K, Ohtani I, Iwamoto K, Suzuki M, Watanabe ME, Watanabe M, Terao K. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. Toxicon 32: 73-84, 1994.
26. Henriksen P, Carmichael WW, Na J, Moestrup O. Detection of na anatoxina (s)- like anticholinesterase in natural blooms and culture of cyanobacteria/ blue-green algae from danish lakes and it the stomach contents of poisoned birds. Toxicon 35: 901-913, 1997.
27. Honkanen RE, Zwiller J, Moore RE, Daily SL, Khatra BS, Dukelow M, Boynton AL. Characterization of Microcystin-LR, a potent inhibitor of type

- 1 and type 2A protein phosphatases. The Journal of Biological Chemistry 265: 19401-19404, 1990.
28. Hooser SB, Kuhlenschmidt MS, Dahlem AM, Beasley VR, Carmichael WW, Haschek WM. Uptake and subcellular localization of tritiated dihydro-microcystin-LR in rat liver. Toxicol 29: 589-601, 1991.
29. Jochimsen EM, Carmichael WW, Na J, Cardo DM, Cookson ST, Holmes CEM, Antunes BC, Melo Filho DA, Lyra TM, Barreto, VST, Azevedo SMFO, Jarvis, WR. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. The New England Journal of Medicine 338: 873-878, 1998.
30. Kaya K. Toxicology of Microcystins. *In: Watanabe ME, Harada K, Carmichael WW, Fujiki H (eds) Toxic Microcystis*. Editora Boca Raton, CRC Press, New York, London, Tokio p. 175-202, 1996.
31. Kusumi T. NMR characterization of microcystins. *In: Watanabe ME, Harada K, Carmichael WW, Fujiki H (eds) Toxic Microcystis*. Editora Boca Raton, CRC Press, New York, London, Tokio p. 149-173, 1996.
32. Leal AC, Soares MCP, Silva CAM, Alves MM, Cartágenes PRB, Bensabath G. Níveis da hepatoxina Microcistina em ambientes aquáticos de área rural, Ilha do Marajó, Pará, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 32 (supl I): 448, 1999.
33. Mancuso PCS. Controle do desenvolvimento de algas em águas de abastecimento público. Revista Departamento de Águas e Esgotos de São Paulo 47: 151-156, 1987.
34. Matsushima RN, Ohta T, Nishiwaki S, Suganuma M, Kohyama K, Ishikawa T, Carmichael WW, Fujiki, H. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. Journal Cancer Research Clinical Oncology 118: 420-424, 1992.
35. Ministério da Saúde. Norma de qualidade da água para consumo humano. Anexo a Portaria n° 1469. Rio de Janeiro, 2000.
36. Odebrecht C. Florações de algas nocivas no ambiente marinho. *In: IV Congresso Latino-Americano, II Reunião Ibero-Americana e VII Reunião Brasileira de Ficologia*. Tema: "Conservação da Biodiversidade e novas tecnologias: promessas e perigos" (programas e resumos) p. 153, 1996.
37. Palmer CM. Importancia de las algas en los abastecimientos de agua. *In: Palmer CM (ed) Algas en abastecimientos de agua*. Primera edicion. Editorial Interamericana SA, Mexico p. 5-8, 1962.
38. Park H, Watanabe ME. Toxic Microcystis in eutrophic lakes. *In: Watanabe ME, Harada K, Carmichael WW, Fujiki H (eds) Toxic Microcystis*. Editora Boca Raton, CRC Press; New York, London, Tokio p. 57-77, 1996.
39. Parra OO, Avilés D, Becerra J, Dellarossa V, Montoya R. First toxic blue-green algal bloom recorder for Chile: a preliminary report. Gayafia Botanica 43: 15-17, 1986.
40. Pouria S, Andrade A, Barbosa J, Cavalcanti RL, Barreto VTS, Ward CJ, Preiser W, Poon GK, Neild GH, Codd GA. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. Lancet 4: 352, 1998.
41. Quinn RJ, Taylor C, Embrey KJ, Poulsen SP. Molecular Modeling of Microcystins. *In: Watanabe ME, Harada K, Carmichael WW, Fujiki H (eds) Toxic Microcystis*. Editora Boca Raton, CRC Press, New York, London, Tokio p. 233-248, 1996.
42. Runnegar MTC, Andrews J, Gerdes RG, Falconer IR. Injury to hepatocytes induced by a peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Toxicol 25: 1235-1239, 1987.
43. Sahin A, Tencalla FG, Dietrich DR, Naegelli H. Biliary excretion of biochemically active cyanobacteria (blue-green algae) hepatotoxins in fish. Toxicology 106: 123-130, 1996.
44. Soil & Water Conservation Society of Metro Halifax. A brief treatise on Eutrophication of lakes. [serial online] p. 1-6, 1997. Available from: URL: <http://www.chebucto.ns.ca/Science/SWCS/SWCS.html>, 1997
45. Soil & Water Conservation Society of Metro Halifax. The Blue-green algae (cyanobacteria) [serial online] p. 1-9, 1997. Available from: URL: <http://www.chebucto.ns.ca/Science/SWCS/SWCS.html>, 1997
46. Teixeira MGLC, Costa MCN, Carvalho VLP, Pereira MS, Hage E. Epidemia de gastroenterite na área de barragem de Itaparica, Bahia. Boletim of Sanitary Panamerican 114: 502-512, 1993.
47. Vasconcelos VM. Cyanobacterial Toxins in Portugal: Effects on Aquatic Animals and Risk for Human Health. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 32: 249- 254, 1999.
48. Vasconcelos VM, Sivonen K, Evans WR, Carmichael WW, Namikoshi M. Hepatotoxic microcystin diversity in cyanobacterial blooms collected in portuguese freshwaters. Water Research 30: 2377-2384, 1996.
49. Watanabe M. Isolation, cultivation and classification of bloom-forming Microcystis in Japan. *In: Watanabe ME, Harada K, Carmichael WW, Fujiki H (eds) Toxic Microcystis*. Editora Boca Raton, CRC Press, New York, London, Tokio p. 13-34, 1996.
50. Watanabe ME. Production of *Microcystins*. *In: Watanabe ME, Harada K, Carmichael WW, Fujiki H (eds) Toxic Microcystis*. Editora Boca Raton. CRC Press, New York, London, Tokio p. 35-55, 1996.