

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

VIVIANE RAMOS CAGIDO

INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA CAUSADA POR
MICROCISTINA-LR EM CAMUNDONGOS

Rio de Janeiro
Janeiro de 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

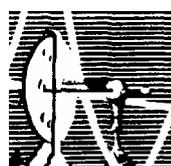


VIVIANE RAMOS CAGIDO

**INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA CAUSADA POR
MICROCISTINA-LR EM CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida à Pós-graduação do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro visando à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia).

Orientador: Walter Araújo Zin



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2007

Cagido, Viviane Ramos

Inflamação pulmonar aguda causada por microcistina-LR em camundongos / Viviane Ramos Cagido. – Rio de Janeiro: UFRJ / IBCCF, 2007.

xvi, 99 f. : il. ; 31 cm

Orientador: Walter Araújo Zin

Dissertação (mestrado) -- UFRJ, IBCCF, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia, 2007.

Referências bibliográficas: f. 76-92

1. Cianobactérias - patogenicidade. 2. Microcistinas – toxicidade. 3. Mecânica respiratória - fisiologia. 4. Pulmão - patologia. 5. Camundongos. 6. Animal. 7. Fisiologia - Tese. I. Zin, Walter Araújo. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia. III. Título.

INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA CAUSADA POR MICROCISTINA-LR EM CAMUNDONGOS

VIVIANE RAMOS CAGIDO

ORIENTADOR: WALTER ARAÚJO ZIN

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

APROVADA POR:

Prof. Walter Araújo Zin – Orientador
Prof. Titular UFRJ

Prof. Paulo Hilário Nascimento Saldiva
Prof Titular USP

Prof^a Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo
Prof^a Adjunta UFRJ

Prof^a. Vânia Maria Correa da Costa
Prof^a. Adjunta UFRJ

Prof^a Débora Souza Faffe – Revisora e Suplente Interna
Prof^a. Adjunta UFRJ

Prof Marcelo Torres Bozza – Suplente Externo
Prof. Adjunto UFRJ

Rio de Janeiro
Janeiro de 2007

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia da Respiração do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho de Ensino para Graduados e Pesquisa da UFRJ (CEPG-UFRJ), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*Aos meus avós, pelo
amor, imensa dedicação e apoio em
todos os momentos de minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Nesta importante fase de minha vida, não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que, de alguma forma, me ajudaram no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Walter Araújo Zin, por todos os momentos que se dedicou a mim, sempre me auxiliando e compartilhando sua sabedoria em todas as etapas deste trabalho, pela atenção a qualquer momento que precisasse, sempre ouvindo as minhas dúvidas, por sempre me incentivar e com isto aumentar ainda mais minha vontade de aprender, pelo exemplo profissional que tanto admiro e, sobretudo, pela pessoa maravilhosa que me recebe sempre com boa vontade. Muito Obrigada.

À Prof^a Débora Souza Faffe, por seus ensinamentos, conselhos e auxílios ao longo da minha formação, pela prestatividade e disponibilidade para ajudar, além da valorosa revisão deste trabalho.

Ao Prof. Marcelo Torres Bozza, pela imensa ajuda com a interpretação e discussão dos dados e, principalmente pela amizade e carinho.

À Prof^a Patrícia Rocco, pela atenção e ensinamentos passados ao longo dos quatro anos de convivência.

Aos queridos colegas do Laboratório de Fisiologia da Respiração, pela preocupação, compreensão, paciência, carinho e, também, pelos momentos de descontração. Com certeza, nesses cinco anos de convivência no laboratório, foram criados laços de amizade que perdurarão para o resto da vida. Agradeço especialmente à Giovanna Cavalcante, Douglas Fonseca, Douglas Riva, Clarissa Magalhães e Aline Schmidt pela ajuda crucial nos momentos mais difíceis deste trabalho. Que a vida lhes retorne em dobro todas as coisas boas que fizeram por mim.

Aos amigos do Laboratório de Investigação Pulmonar, pelo apoio, incentivo, carinho e amizade.

Às colaboradoras e amigas do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, Prof^a Sandra Azevedo, Prof^a Valéria Magalhães, Raquel Soares e Luana Mattos por todo o auxílio, dedicação e imensa paciência para responder às minhas dúvidas.

Aos funcionários do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, em especial aos técnicos de laboratório Sr. Antônio Carlos de Souza Quaresma e Srta. Verônica Cristina dos Santos, sempre dispostos a ajudar.

Às minhas queridas mãe e irmã, pelo amor, amizade e torcida para que tudo desse certo. Amo vocês.

Aos meus familiares e amigos, Ronaldo, Ivone, Edinho, Lisete, Susete e Leleco, pelo entusiasmo com as minhas conquistas e todo o apoio prestado.

Aos meus primos Felipe, Karina e Rafael, pela compreensão e apoio nas horas de extrema irritação e pelos momentos de descontração juntos para aliviar minhas angústias.

E, finalmente, a Deus, por tudo que sou.

RESUMO

INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA CAUSADA POR MICROCISTINA-LR EM CAMUNDONGOS

Viviane Ramos Cagido

Orientador: Walter Araújo Zin

Resumo da dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre.

Cianobactérias tóxicas na água utilizada pela população podem causar graves problemas à saúde. Avaliaram-se os efeitos da microcistina-LR (MCYST-LR) sobre a mecânica e a histologia pulmonares, atividade das proteínas fosfatases (PP) 1 e 2A, celularidade total e diferencial no sangue e no lavado do fluido broncoalveolar (BALF), além da quantificação de MCYST-LR no tecido pulmonar de camundongos. Camundongos suíços machos (n=71) foram divididos em dois grupos. O controle (CTRL, n=16) recebeu solução salina intraperitonealmente (i.p., 300 µl) e o CIANO (n=55) uma dose subletal de MCYST-LR (i.p., 40 µg MCYST/kg). Em 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a injeção mediu-se a mecânica pulmonar de 6 animais/grupo. O pulmão esquerdo seguiu para análise histológica: fração de área de colapso alveolar, conteúdo de células polimorfo (PMN) e mononucleares (MN) e tecido pulmonar. O pulmão direito serviu para análise de atividade das PP1 e 2A e quantificação de MCYST-LR por ELISA. Do restante dos animais (CTRL=10 e CIANO=25) coletaram-se sangue e BALF.

O colapso alveolar aumentou nos grupos CIANO, alcançando máximo em 8 e 24 horas. O montante de células PMN aumentou, chegando ao pico em 2 e 8 horas, decrescendo a partir daí, sem retornar aos valores de CTRL. Os componentes elásticos e resistivos aumentaram em todos os grupos CIANO em relação ao CTRL. Houve recrutamento de neutrófilos no sangue e no BALF já em 2 horas. As atividades de PP1 e 2A não foram alteradas, assim como não foi detectada a presença de MCYST-LR livre no pulmão.

A MCYST-LR leva a uma resposta inflamatória aguda no tecido pulmonar que permanece até o quarto dia.

Palavras-chave: Cianobactéria, Microcistina-LR, Mecânica Respiratória, Inflamação Pulmonar.

Rio de Janeiro

Janeiro, 2007

ABSTRACT**ACUTE LUNG INJURY CAUSED BY MICROCYSTIN-LR IN MICE**

Author: Viviane Ramos Cagido

Supervisor: Walter Araujo Zin

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre.

Toxic cyanobacteria present in the water for human use may yield serious health conditions. The effects of microcystin-LR (MCYST-LR) on lung mechanics and histology, protein phosphatases (PP) 1 and 2A activities, total and differential cell counts in the blood and broncho-alveolar lavage fluid (BALF) and the presence of MCYST-LR in lung tissue were investigated in mice.

Male Swiss mice (n=71) were randomly divided in 2 groups: CTRL (n=16) was injected intraperitoneally (i.p.) with 300 μ l of 0.9% NaCl solution and the 5 CIANO groups (n=55) received a sublethal dosis of MCYST-LR (i.p., 40 μ g MCYST/kg). At 2, 8, 24, 48 e 96 h after the injection lung mechanics were measured in 6 animals/group. The left lung underwent histological analysis: fractional area of alveolar collapse, amount of polymorpho- (PMN) and mononuclear (MN) cells, and lung tissue. In the right lung the activities of PP1 and 2A and the amount of MCYST-LR were determined by ELISA. In the remaining animals (CTRL=10 and CIANO=25) blood and BALF were collected.

Alveolar collapse increased in the CIANO groups, reaching maxima at 8 and 24 h. The amount of PMN augmented, showing peak values at 2 and 8 h, decreasing thereafter but not decaying to CTRL values. Pulmonary elastic and resistive mechanical components were higher in all CIANO groups than in CTRL. As early as 2 h neutrophils were recruited in the blood and BALF. PP1 and 2A activities were not altered and free MCYST-LR was not detected in the lung.

MCYST-LR generates an acute inflammatory response in the lung tissue, which persists until the fourth day after injection.

Key-words: Cyanobacteria, Microcystin-LR, Pulmonary Mechanics, Lung Inflammation.

Rio de Janeiro

January, 2007

ÍNDICE

Agências Financiadoras	iv
Resumo	viii
Abstract	ix
Índice	x
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xiv
Abreviaturas	xv
I. Introdução	01
I.1. Características gerais das cianobactérias	02
I.2. Microcistinas	05
I.2.1. Estrutura Química	05
I.2.2. Farmacocinética	07
I.2.3. Mecanismo de Ação e Efeitos	08
I.2.4. Metabolização, Detoxificação e Eliminação	11
I.2.5. Efeitos em Outros Órgãos	13
I.2.6. Considerações Finais sobre as MCYSTs	16
I.3. Mecânica Respiratória	17
I.3.1. Noções Básicas	17
I.3.2. Estudo da Mecânica Respiratória	20
II. Justificativa	27
III. Objetivos	28
III.1. Objetivo Geral	28
III.2. Objetivos Específicos	28

IV. Materiais e Métodos	30
IV.1. Animais utilizados	31
IV.2. Caracterização dos Grupos Experimentais	32
IV.3. Protocolo Experimental	32
IV.4. Estudo da Mecânica Respiratória	37
IV.5. Análise da Histologia do Parênquima Pulmonar	40
IV.5.1. Fixação e Preparo das Lâminas para Microscopia Óptica	40
IV.5.2. Análise Histológica e Morfométrica	42
IV.6. Análise do Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) e do sangue	43
IV.7. Análise da Atividade de Proteínas Fosfatases 1 e 2A	44
IV.8. Análise de Microcistina-LR por ELISA	46
IV.9. Análise Estatística	48
V. Resultados	49
V.1. Mecânica Respiratória	50
V.2. Análise Histopatológica e Morfométrica	54
V.2.1. Análise Qualitativa	54
V.2.2. Análise Quantitativa	56
V.3. Análise do número de Leucócitos no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF)	58
V.4. Análise do número de Leucócitos no Sangue	59
V.5. Análise da Atividade de Proteínas Fosfatase 1 e 2A	60
V.6. Quantificação de MCYST-LR por Elisa	61
VI. Discussão	62
VII. Conclusões	74
VIII. Referências Bibliográficas	76

Anexo I. Parâmetros da mecânica pulmonar em cada animal	94
Anexo II. Percentual de áreas normais, hiperinsufladas e colapsadas em cada animal	96
Anexo III. Celularidade total e diferencial em cada animal	98

ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura 1. Floração tóxica de cianobactéria	3
Figura 2. Desenho esquemático da molécula de microcistina-LR	6
Figura 3. Desenho esquemático do efeito de microcistinas sobre hepatócitos e capilares sinusóides	10
Figura 4. Modelo linear unicompartimental	21
Figura 5. Modelo de molas e amortecedores para interpretação da mecânica do sistema respiratório	23
Figura 6. Montagem experimental da Mecânica <i>in vivo</i>	36
Figura 7. Método de Oclusão ao Final da Inspiração	38
Figura 8. Retículo para quantificação dos parâmetros morfométricos	43
Figura 9. Variações de pressão necessárias para vencer os componentes resistivo, viscoelásticos/inomogeneos pulmonares e pressão total exercida contra os componentes viscosos e viscoelásticos do pulmão	52
Figura 10. Elastância estática e diferença entre as elastâncias estática e dinâmica do pulmão	53
Figura 11. Fotomicrografias do parênquima pulmonar	55
Figura 12. Número de células totais e diferenciais no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF)	58
Figura 13. Número de células totais e diferenciais no sangue	60
Figura 14. Atividade de proteínas fosfatase 1 e 2A no pulmão de camundongos	61

ÍNDICE DAS TABELAS

Tabela 1. Fluxo e Volume nos animais dos grupos controle e cianobactéria nos diferentes tempos	50
Tabela 2. Morfometria Pulmonar	56
Tabela 3. Celularidade total e diferencial no parênquima pulmonar	57

ABREVIATURAS

ΔE – variação de elastância

ΔP – variação de pressão

Adda – (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetildeca-4,6-ácido dienólico

BALF – fluido de lavado broncoalveolar

CIANO – grupo cianobactéria

CRF – capacidade residual funcional

CTRL – grupo controle

D-Ala – D-aminoácido Alanina

D-Glu – Ácido glutâmico

D-MeAsp – D-eritro- β -ácido metilaspártico

E – elastância tecidual

Edyn – elastância dinâmica do pulmão

Est – elastância estática do pulmão

GPX – glutathione peroxidase

GSH – glutathione reduzida

GST – glutathione S-transferase

HE – Hematoxilina e Eosina

IL – interleucina

Ip – intraperitoneal

Mdha – *N*-metilaldehidroalanina

P – pressão

PAF – fator de ativação plaquetária

PEEP – pressão positiva ao final da expiração

P_i – pressão pulmonar no ponto de inflexão

P_{el} – pressão de retração elástica do pulmão

$P_{m\acute{a}x}$ – pressão máxima ou de pico inspiratória

PP – proteína fosfatase

P_{tr} – pressão traqueal

R – resistência

R_{eq} – resistência do equipamento

T_i – tempo inspiratório

TNF – fator de necrose tumoral

V' – fluxo

V_T – volume corrente

INTRODUÇÃO

I – INTRODUÇÃO

I.1 – CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS CIANOACTÉRIAS

As cianobactérias, também conhecidas como cianofíceas ou algas-azuis, são microrganismos procariontes com características de algas, já que são aeróbicos e fotoautotróficos, porém bioquímica e estruturalmente bastante semelhantes às bactérias. Estima-se que tenham sido os primeiros produtores primários de matéria orgânica a liberarem oxigênio elementar na atmosfera, tendo sua origem datada há 3,5 bilhões de anos. A grande diversidade genotípica e fenotípica encontrada entre elas tem explicação na ampla distribuição geográfica que apresentam (AZEVEDO, 1998; LEAL & SOARES, 2004).

Os ecossistemas de água doce, naturais ou artificiais, mares e águas salobras são os habitats com maior ocorrência de cianobactérias (HUMM & VICKS, 1980). Quando esses sistemas estão sob condições favoráveis de luminosidade, temperatura e abundância de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, pode ocorrer o fenômeno conhecido como floração (YOO *et al.*, 1995). A floração é o intenso crescimento de cianobactérias, com dominância de uma ou poucas espécies destes microrganismos em determinado ambiente, podendo apresentar-se como camadas espessas de células na superfície da água (Figura 1).

O aumento na quantidade de nutrientes na água configura o processo de eutrofização. Esse processo é intensificado, principalmente, pela atividade humana ligada ao desenvolvimento urbano, agrícola e industrial, com despejo de esgoto nos corpos d'água. Em todo o mundo, a eutrofização tem favorecido a ocorrência de florações. Esse fenômeno traz consigo enorme preocupação, porquanto algumas espécies podem, potencialmente, produzir toxinas. O primeiro relato de intoxicação

de animais relacionado à cianobactéria foi publicado em 1878, por George Francis na revista Nature (citado em LEAL & SOARES, 2004) e, desde então, florações tóxicas foram descritas em vários países, incluindo o Brasil (YOO *et al.*, 1995).

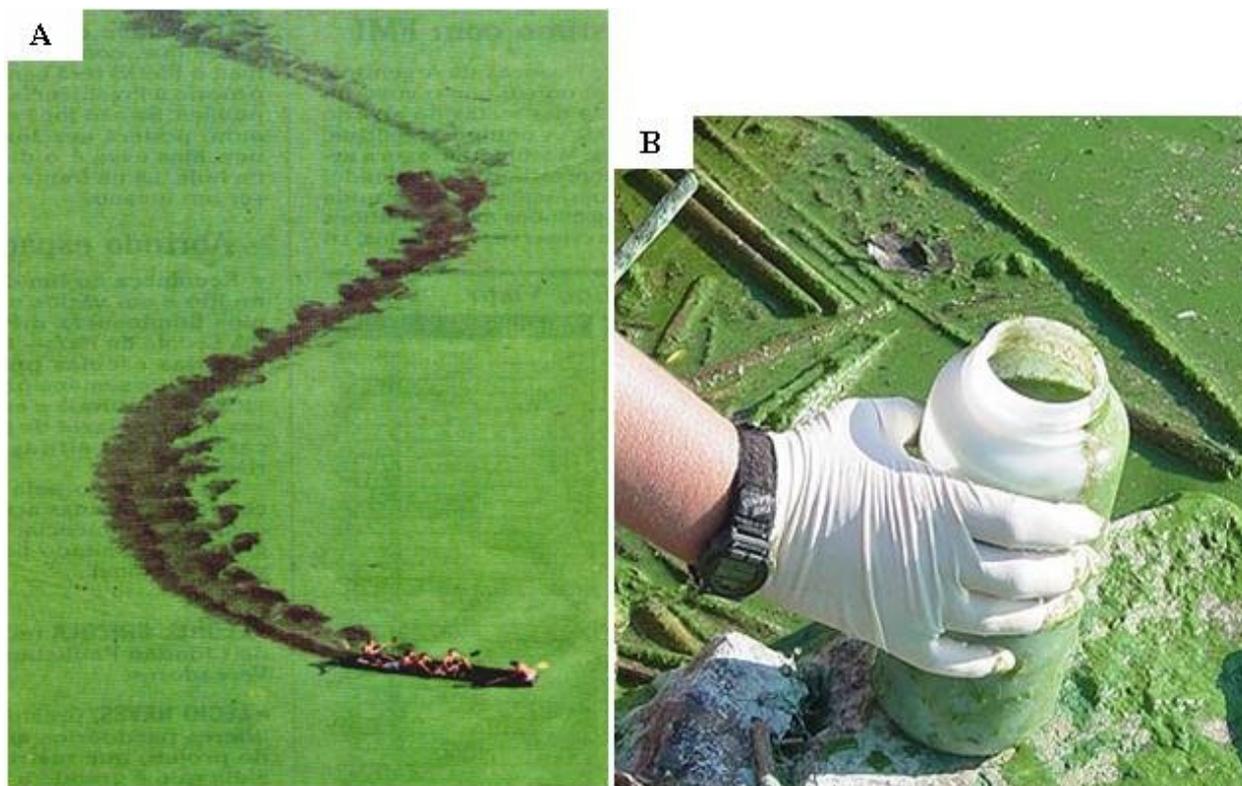


Figura 1. Floração tóxica de cianobactéria. *Foto A:* Lagoa de Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brasil. Foto publicada na primeira página do jornal O Globo em 13/08/01. Observe o barco na parte inferior da foto abrindo um caminho no meio da densa camada de células. *Foto B:* Reservatório Copco (Rio Klamath), Sacramento, Califórnia, EUA. Foto tirada por Karuk Tribe, em matéria publicada por Matt Weiser no *The Sacramento Bee*, em 15 de agosto de 2006 (disponível em <http://dwb.sacbee.com/content/news/science/story/14297374p-15153377c.html>).

No Brasil, a intensa eutrofização dos ecossistemas aquáticos tem favorecido a dominância desses organismos, com o agravante que grande parte das cepas de cianobactérias isoladas de corpos d'água brasileiros mostrou-se produtora de

toxinas (COSTA & AZEVEDO, 1994; DOMINGOS *et al.*, 1999; SANT'ANNA & AZEVEDO, 2000). Como muitos desses mananciais abastecem a rede pública, a liberação dessas toxinas na água representa um risco relevante para a saúde pública.

As toxinas produzidas pelas cianobactérias são endotoxinas normalmente liberadas quando há o rompimento celular. Por isso, a tentativa de controlar as florações com o uso de algicidas, na verdade só agrava o problema, uma vez que provoca a lise desses organismos, liberando as toxinas para a água. Uma importante característica desse grupo reside no fato de uma mesma espécie de cianobactéria ter a capacidade de produzir mais de um tipo de toxina, assim como podem existir cepas produtoras e cepas não produtoras de toxinas. Os principais grupos de cianotoxinas são as dermatotoxinas, as neurotoxinas e as hepatotoxinas, sendo as duas últimas as mais freqüentemente encontradas em corpos d'água (CARMICHAEL, 1997).

As principais vias de exposição à cianotoxinas são: dérmica e oral, pelo uso recreativo da água e o consumo de água, peixes e alimentos a base de microalgas. Porém, outras vias devem ser consideradas, como a inalatória e, no caso de hemodiálise, a via endovenosa (RESSOM *et al.*, 1994; LEAL & SOARES, 2004). Atividades aquáticas, tais como, nado, mergulho e esqui aquático envolvem um alto risco de exposição quando realizadas em corpos d'água com presença de mais de 15.000 – 20.000 células de cianobactérias/mL, caso seja uma floração tóxica (RESSOM *et al.*, 1994).

A intoxicação causada por hepatotoxina constitui-se no tipo mais comum e os sinais observados após ingestão dessas toxinas incluem prostração, anorexia,

vômitos, dor abdominal, diarreia, tosse seca e pneumonia atípica (CARMICHAEL & SCHWARTZ, 1984; BEASLEY *et al.*, 1989).

I.2 – MICROCISTINAS

Microcistinas (MCYST) são cianotoxinas hepatotóxicas, produzidas por algumas espécies de cianobactérias, principalmente pela *Microcystis aeruginosa*, e estão entre as cianotoxinas mais frequentemente encontradas (CARMICHAEL, 1994).

I.2.1 – Estrutura Química

A estrutura química das MCYSTs foi elucidada por BOTES *et al.* (1984, 1985) como heptapeptídeos cíclicos contendo 2 L-aminoácidos variáveis e cinco D-aminoácidos: D-aminoácido alanina (D-Ala); D-eritro- β -ácido metilaspártico (D-MeAsp); ácido glutâmico (D-Glu); *N*-metildehidroalanina (Mdha) e (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetildeca-4,6-ácido dienóico (Adda). Esses dois últimos são tidos como aminoácidos não-usuais.

A estrutura das MCYSTs pode variar nos grupos metil e na natureza de seus dois L-aminoácidos, gerando cerca de 70 variantes. Tais modificações trazem conseqüências para a estrutura terciária da molécula, resultando em diferenças significativas de toxicidade e de suas propriedades hidrofóbicas/hidrofílicas (RINEHART *et al.*, 1994; GULLEDGE *et al.*, 2002). Na figura 2 estão destacados os dois L-aminoácidos da molécula de microcistina-LR (MCYST-LR), no caso a leucina (L) e a arginina (R). A estrutura química das MCYSTs possibilita a sua estabilidade em água, podendo resistir a grandes variações de temperatura e de pH. A meia-vida

da molécula foi estimada em três semanas, numa solução de pH 1 e temperatura de 40°C (WATANABE *et al.*, 1996).

O aminoácido Adda é essencial para a atividade biológica e hepatotoxicidade das MCYSTs, além de conferir hidrofobicidade à molécula (HARADA *et al.*, 1990a,b; CHOI *et al.*, 1993). DAHLEM (1989) demonstrou que a remoção ou saturação deste aminoácido reduz muito a toxicidade da MCYST-LR. Outra importante característica para a toxicidade das MCYSTs é conferida pela presença de um ácido carboxílico livre na unidade D-Glu (STOTTS *et al.*, 1993).

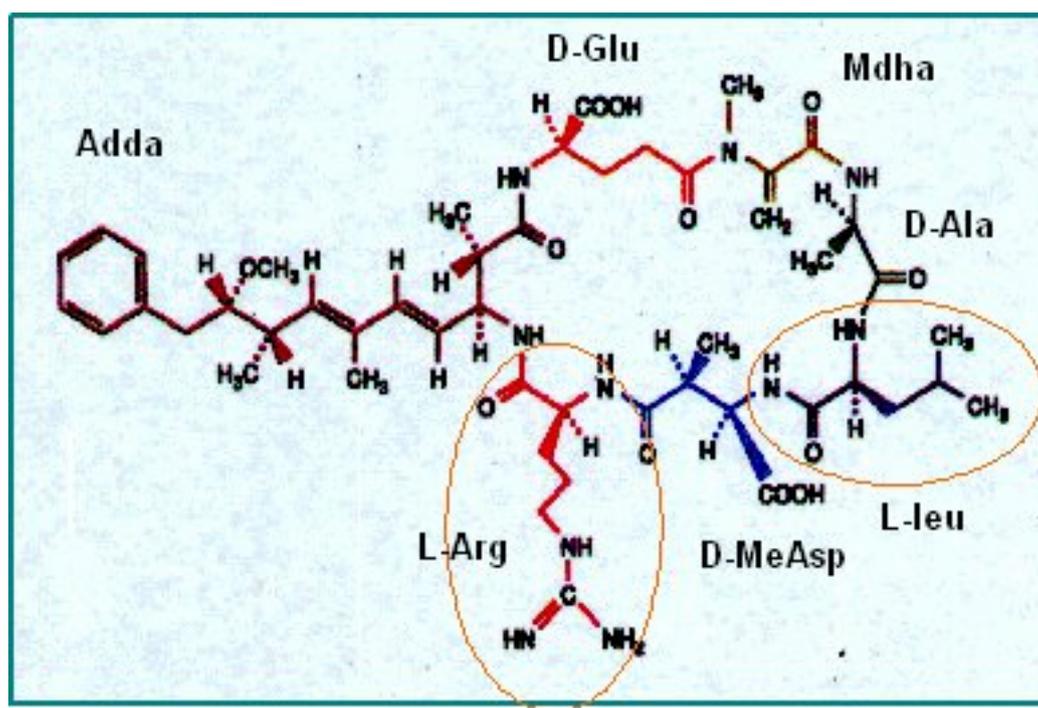


Figura 2. Desenho esquemático da molécula de microcistina-LR. Estão destacados os dois L-aminoácidos variáveis (L = leucina e R = arginina). D-Ala (D-aminoácido alanina); D-MeAsp (D-eritro- β -ácido metilaspártico); D-Glu (ácido glutâmico); Mdha (N- metildehidroalanina); Adda [(2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetildeca-4,6-ácido dienólico]. Adaptado de CARMICHAEL (1994).

I.2.2 – Farmacocinética

As MCYSTs são moléculas hidrofílicas e não há indícios de que essas toxinas atravessem a membrana celular por simples difusão, requerendo um mecanismo de captação ativo (RUNNEGAR *et al.*, 1991). No fígado, essas moléculas são captadas através do sistema de transporte do ácido biliar. Esse fato foi comprovado através da observação *in vitro* de que o influxo de MCYST no hepatócito reduz-se de forma concentração-dependente na presença de sais biliares. Mais que isso, a membrana do hepatócito possui carreadores responsáveis pela captação ativa de ácidos biliares, e a inibição completa da captação da toxina foi conseguida na presença dos inibidores desses transportadores, como a rifampicina (ERIKSSON *et al.*, 1990). Esse mecanismo de entrada celular explicaria uma provável especificidade das MCYSTs. No entanto, estudos *in vitro* mostraram que a MCYST-LR é capaz de gerar o mesmo grau de lesão em hepatócitos, células epiteliais renais e fibroblastos, após 4 minutos, 1 e 8 horas, respectivamente (KHAN *et al.*, 1995). Alterações semelhantes na morfologia do citoesqueleto desses três tipos celulares também ocorrem se maior tempo de incubação e maiores concentrações de MCYST forem utilizados para as células renais e fibroblastos (WICKISTROM *et al.*, 1995). Esses dados sugerem que a MCYST é capaz de entrar na célula por pinocitose e que as diferenças observadas *in vivo* e *in vitro* se devem ao mecanismo de captação mais demorado em outros tipos celulares, em relação aos hepatócitos (RUNNEGAR *et al.*, 1993).

Outra importante característica é a rapidez do transporte dessa toxina. Em experimentos *in vivo*, utilizando camundongos, foi administrada MCYST [¹⁴C] intraperitonealmente (i.p.). Após 1 minuto, 70% deste marcador já se localizava no fígado, aumentando para 90% após 3 horas (BROOKS & CODD, 1987). Em estudos

posteriores onde [³H]-MCYST-LR foi injetada também i.p., foi verificado que 60-70% da toxina já se encontrava no fígado 1 hora após a injeção (ROBINSON *et al.*, 1989, 1991a). Embora a diferença entre os tempos observados nos estudos de BROOKS & CODD (1987) e de ROBINSON *et al.* (1989, 1991a) seja grande, ainda assim, os resultados indicam uma chegada rápida da MCYST no fígado.

A dose letal para 50% dos camundongos injetados i.p. com MCYST-LR (DL₅₀) varia de 32,5 a 100 µg/kg de peso corpóreo. Tal variação se deve a diferenças de idade, sexo, raça e condições fisiológicas dos animais. A morte ocorre entre 1 e 3 horas após a administração de MCYST (WATANABE *et al.*, 1996). Já a DL₅₀ oral apresenta valores de 50 a 170 vezes mais altos que a DL₅₀ i.p.. No entanto, não há evidências de que a MCYST seja hidrolisada por peptidases gástricas. Pouco se sabe acerca dos processos de absorção gastrointestinal desta toxina, mas aparentemente uma quantidade significativa consegue ultrapassar a barreira intestinal e ser absorvida (CHORUS & BARTRAM, 1999).

I.2.3 – Mecanismo de Ação e Efeitos

Diversos autores demonstraram os efeitos tóxicos das MCYSTs em grupos variados de organismos, incluindo peixes e mamíferos (BURY *et al.*, 1997; MIURA *et al.*, 1989). Sua bioacumulação também já foi bem caracterizada em zooplâncton, peixes, crustáceos e moluscos (FERRÃO-FILHO *et al.*, 2002b; MAGALHÃES *et al.*, 2003; SOARES *et al.*, 2004).

No fígado, essas moléculas inibem as proteínas fosfatases (PP) da família serina/treonina, especialmente as PP1 e 2A dos hepatócitos, podendo levar ao óbito ou intoxicação crônica, inclusive induzindo o aparecimento de tumores hepáticos (FUGIKI, 1992; NISHIWAKI-MATSUHIMA *et al.*, 1992). Nas células eucarióticas, a

maior parte da fosforilação protéica ocorre em resíduos de serina e treonina. Portanto, o papel das fosfatases do grupo PP1 e PP2 é crucial, uma vez que estas enzimas são responsáveis por grande parte da atividade fosfatásica celular. A ligação MCYST-PPase ocorre em duas etapas principais: inicialmente, o aminoácido hidrofóbico Adda das MCYSTs ocupa o sítio ativo das PP através de ligação não-covalente, o que produz o efeito inibitório da toxina. Em seguida, o aminoácido Mdha liga-se covalentemente ao resíduo de cisteína 273 das PP (HONKANEN & GOLDEN, 2002).

A inibição de PP por MCYSTs aumenta a fosforilação de diversos alvos subcelulares, inclusive proteínas do citoesqueleto e proteínas associadas ao mesmo, provocando o seu desarranjo. Conseqüentemente, as células hepáticas tendem a se arredondar, se separam e perdem sua estrutura normal. Também ocorre rompimento dos capilares sinusoidais, com extravasamento de sangue para o espaço intersticial. Não há evidências de que o rompimento dos capilares sinusoidais esteja relacionado aos efeitos da MCYST nas células endoteliais. Considera-se que o rompimento dos sinusóides seja uma conseqüência das alterações provocadas por essas toxinas na estrutura dos hepatócitos (FALCONER *et al.*, 1981; HOOSER *et al.*; 1990; WICKSTROM *et al.*; 1996) (Figura 3). Na intoxicação aguda, observa-se necrose hemorrágica extensa, desestruturação dos sinusóides e mudanças no formato celular, incluindo dilatação do retículo endoplasmático rugoso e lise dos hepatócitos (MIURA *et al.*, 1989). Na hemorragia intra-hepática, o sangue retido no fígado faz com que o órgão duplique de peso, levando à morte por choque hipovolêmico ou falência hepática (CARMICHAEL, 1994). Debris de hepatócitos de camundongos injetados com MCYST-LR foram

encontrados nos capilares pulmonares (THEISS *et al.*, 1988; HOOSER *et al.*, 1990) e também nos rins (ASHWORTH & MASON, 1946; HOOSER *et al.*, 1990).

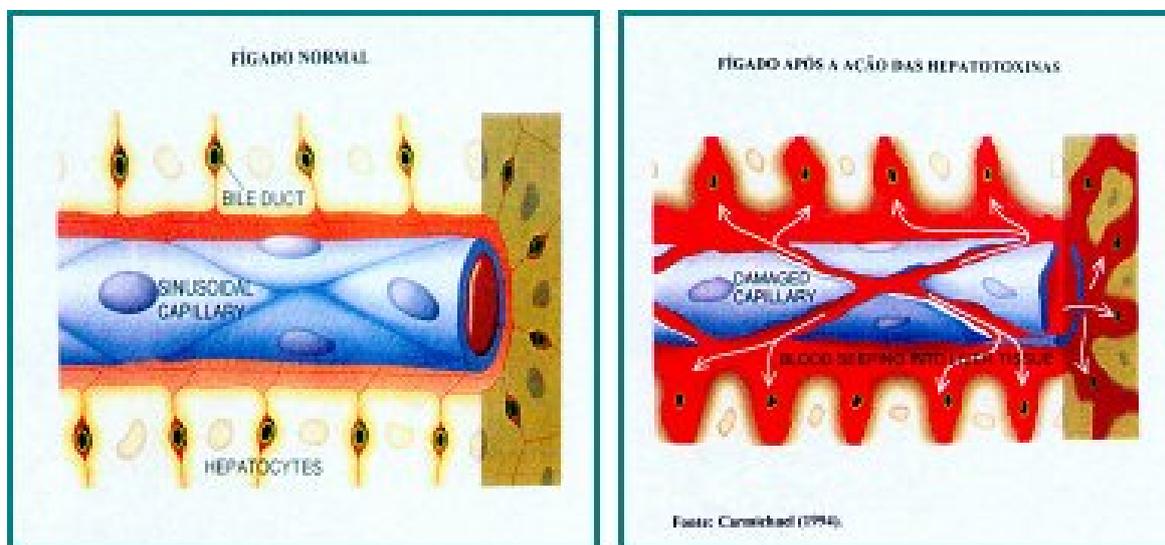


Figura 3. Desenho esquemático do efeito de microcistinas sobre hepatócitos e capilares sinusóides. Retirado de CARMICHAEL (1994).

De acordo com WATANABE *et al.* (1996), embora a ação clássica das MCYSTs seja através da inibição das PP1 e 2A, há evidências demonstrando que o dano oxidativo tem um importante papel na sua toxicidade. As MCYSTs também ativam enzimas que participam da via metabólica do ácido aracdônico, como fosfolipase A₂ e cicloxigenase, que, por sua vez, induzem a produção dos mediadores inflamatórios tromboxano A₂ (indutor de agregação plaquetária) e prostaglandina I₂. Além disso, alguns estudos demonstraram que MCYSTs têm a capacidade de estimular macrófagos peritoniais a produzirem TNF- α (fator de necrose tumoral- α) e IL-1 (interleucina-1). Desta forma, é possível que macrófagos hepáticos (células de Kupffer) respondam às MCYSTs, produzindo mediadores

inflamatórios, e que esse processo inflamatório no fígado contribua para a patogênese e letalidade.

I.2.4 – Metabolização, Detoxificação e Eliminação

A glutathiona reduzida (GSH) constitui a principal via de metabolização e detoxificação das MCYSTs no fígado. De fato, RUNNEGAR *et al.* (1987) descreveram um decréscimo dose-dependente no “pool” de GSH em hepatócitos expostos às MCYSTs, indicando a participação de GSH no processo de detoxificação destas toxinas.

Até determinada concentração, as MCYSTs podem ser biotransformadas por meio de ligação não-enzimática com GSH ou através da ação da glutathiona S-transferase (GST). A GST é o principal grupo de proteínas solúveis do fígado envolvido na detoxificação celular de compostos eletrofílicos. Sua ação detoxificante é importante na proteção contra estresse oxidativo, câncer e outras doenças degenerativas. A conjugação de agentes tóxicos com o tripeptídeo GSH é catalisada, na sua fase inicial, pela GST que atua na fase II da biotransformação, prevenindo danos à membrana celular e outras macromoléculas (KIDD, 1997; MALMEZAT *et al.*, 2000; DYBING *et al.*, 2002). A conjugação de substâncias eletrofílicas à glutathiona, as torna mais hidrossolúveis e facilita o processo de excreção.

As MCYSTs se conjugam à GSH por meio do terminal metileno do aminoácido Mdha, a mesma unidade que se liga covalentemente ao resíduo de cisteína 273 das proteínas fosfatases. O conjugado MCYST-SG, além de ser um composto mais facilmente excretável, também fica impossibilitado de estabelecer a ligação covalente com as fosfatases (WIEGAND *et al.*, 2002). No entanto, já foi

observado que este conjugado, apesar de muito menos tóxico, ainda pode lesar o fígado, pois o aminoácido Adda das MCYSTs continua disponível para a ligação com o sítio ativo das fosfatases (KONDO *et al.*, 1992).

A importância da GSH e da GST na proteção do fígado contra os efeitos deletérios da MCYST foi estudada por GEHRINGER *et al.* (2004). Esses autores verificaram um aumento da peroxidação lipídica, o que resulta em estresse oxidativo, seguido de um aumento na atividade de glutathiona peroxidase (GPX), após a injeção com 75% da DL₅₀ de MCYST-LR em camundongos. Também foi observado um decréscimo inicial de GSH total, relacionado ao aumento da atividade da GST. Os níveis de GSH voltaram ao normal 24 horas após a administração da toxina, claramente devido ao aumento da atividade da glutathiona sintetase. Esse grupo mostrou que o aumento da atividade enzimática foi regulado ao nível transcripcional.

A avaliação da excreção de MCYST-LR em camundongos injetados com uma dose sub-letal via i.v. demonstrou que aproximadamente 24% da toxina administrada foi eliminada através da urina (9%) e das fezes (15%), ao longo de seis dias de estudo (ROBINSON *et al.* 1991a). FALCONER *et al.* (1986) também observaram em ratos que, após 120 minutos da injeção i.v. de MCYST, 9,4% da dose administrada estava presente no conteúdo intestinal e que 2,9% estava presente na urina, sugerindo que a excreção biliar tem um importante papel na eliminação de MCYSTs.

Poucos estudos foram realizados em humanos para avaliar a eliminação de MCYSTs do organismo. Através do acompanhamento de pacientes em diálise expostos a MCYST via i.v., em dois incidentes ocorridos no Brasil, foi observado que

mais de cinquenta dias após a exposição, ainda havia toxina no soro destes pacientes (HILBORN *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2006).

I.2.5 – Efeitos em Outros Órgãos

Os efeitos de doses sub-letais de MCYSTs não se restringem aos danos causados ao fígado, sendo também observadas lesões em outros órgãos, como intestino, rins e pulmões.

Em 1997, ITO *et al.* publicaram um estudo onde a MCYST-LR foi administrada a camundongos por via oral. Através da utilização de técnicas de imunohistoquímica, foi verificado que a absorção da toxina se deu principalmente do intestino delgado, onde foi observada erosão das células epiteliais de superfície e da lâmina própria. Também já foram relatadas alterações de atividades enzimáticas (sucrase, fosfatase ácida e succinato desidrogenase) e aumento da peroxidação lipídica na mucosa intestinal de ratos, assim como apoptose em quase todo o trato gastrointestinal de camundongos injetados com MCYSTs i.p. (MORENO *et al.*, 2003; BOTHA *et al.*, 2004).

O rim parece ser o segundo órgão mais afetado pela MCYST. Em estudos de distribuição da toxina após injeção i.p., foi verificado que este é o órgão que mais concentra MCYST, depois do fígado (FALCONER *et al.*, 1986; RUNNERGAR *et al.*, 1986). LOVELL *et al.* (1989) conduziram um estudo com camundongos no qual uma dose letal de MCYST-LR era administrada i.p.. Esses autores observaram que quanto maior a sobrevivência do animal, maior a chance do rim ter seu peso aumentado, e que esse efeito, assim como as lesões renais, poderiam estar relacionados com a hipóxia, edema e diminuição do ritmo de filtração glomerular, relatados previamente por ASHWORTH & MASON (1946), bem como a presença

de debris hepático-embólicos de acordo com HOOSER *et al.* (1989). NOBRE *et al.* (2001) relataram alterações no funcionamento de rins de ratos perfundidos com MCYST-LR, talvez relacionadas a lesões vasculares e glomerulares. Em 2003, este mesmo grupo utilizou o sobrenadante de macrófagos estimulados *in vitro* com MCYST-LR para perfundir rins isolados de ratos, e mostraram que essas células liberam mediadores inflamatórios capazes de promover nefrotoxicidade (NOBRE *et al.*, 2003).

Há poucos trabalhos analisando os efeitos das MCYSTs no pulmão, apesar deste ser um órgão que pode ser exposto às toxinas tanto pela via aérea quanto pela circulação sanguínea. Os pulmões são particularmente vulneráveis às lesões inflamatórias, por um lado (via direta), porque mantém contato com o meio externo e, por outro lado (via indireta), porque os mediadores são liberados na circulação e os pulmões recebem a totalidade do débito cardíaco. Como consequência, leucócitos são atraídos, tornam-se ativados, liberando mediadores inflamatórios, como oxidantes e proteases que lesam diretamente o epitélio alveolar e/ou o endotélio vascular, propagando o processo inflamatório (MARTIN, 1999).

Sabe-se que as MCYSTs podem alcançar o pulmão, sendo absorvidas de forma rápida por via direta (ITO *et al.* 2001). Uma única administração de dose subletal de MCYST-LR via intratraqueal (i.t.) em camundongos levou à presença desta toxina no tecido pulmonar por 7 horas, como evidenciado por técnicas de imunohistoquímica. Após esse período, a toxina só foi identificada fagocitada no interior de macrófagos. Outros estudos experimentais e relatos de doenças em humanos fornecem fortes indícios de que a via aérea é uma importante porta de entrada para as MCYSTs. Em um estudo sobre a exposição por inalação, FITZGEORGE *et al.* (1994) comprovaram que a DL₅₀ de MCYST-LR para

camundongos por administração intranasal foi igual à DL₅₀ por injeção intraperitoneal. Os autores verificaram necrose extensa do epitélio da mucosa, tanto da via respiratória quanto olfatória, o que teria facilitado a absorção da toxina pela ampla rede de capilares presentes na região. Outro trabalho, utilizando aerosol contendo MCYST-LR, também mostrou necrose ou inflamação das células epiteliais respiratórias da cavidade nasal, com presença de infiltrado neutrofílico e degeneração, necrose e atrofia das células epiteliais olfatórias em camundongos. No entanto, nenhuma alteração pulmonar foi encontrada (BENSON *et al.*, 2005).

A exposição por inalação a estas toxinas assume maior relevância quando se considera o uso recreativo de corpos d'água com florações de cianobactérias. Partículas de água contaminada podem ser inaladas, em especial pelo spray lançado por lanchas e jet skis. TURNER *et al.* (1990) descreveram episódio em que recrutas no Reino Unido deram entrada no hospital com quadro de pneumonia basal esquerda, 5 dias após exercícios de canoagem em um reservatório com alta concentração de células de *Microcystis aeruginosa*, onde beberam e inalaram água. Também foram observados inflamação da faringe, tosse seca, vômito e dor abdominal. A floração de cianobactéria foi comprovada como tóxica (células produtoras de MCYST-LR) e os autores acreditam ter sido esta a razão mais plausível para o quadro clínico observado.

Em um dos primeiros trabalhos citando os efeitos da MCYST no pulmão, SLATKIN *et al.* (1983) observaram que camundongos injetados i.p. com altas doses de MCYST-LR apresentaram trombose pulmonar atípica. FALCONER *et al.* (1988), em um longo estudo de intoxicação crônica, ofereceram a camundongos água contendo extratos de *Microcystis aeruginosa* produtora de MCYSTs, em cinco doses

diferentes que variavam de 750 – 12.000 µg/kg/dia, e verificaram broncopneumonia naqueles animais submetidos a doses mais altas.

Recentemente, foi descrito pelo nosso grupo um processo inflamatório no pulmão de camundongos, causado pela injeção i.p. de dose sub-letal (40 µg/kg) do extrato aquoso obtido de uma linhagem tóxica da *Microcystis aeruginosa*. A inflamação teve como característica um início rápido (2 horas após a injeção), que persistiu mesmo após 96 horas de estudo, caracterizada na histologia pulmonar por edema intersticial e recrutamento de células inflamatórias, além de colapso alveolar (PICANÇO *et al.*, 2004). No entanto, a presença de metabólitos secundários no extrato poderia ter contribuído para os resultados observados. Por isso, a utilização da toxina purificada seria importante para avaliar seus efeitos sobre os pulmões.

I.2.6 – Considerações Finais sobre as MCYSTs

Um dos maiores problemas em relação à presença de cianobactérias tóxicas na água é representado pelo consumo oral, principalmente em países onde o tratamento da água para abastecimento da população é deficitário. Há alguns relatos, de diferentes regiões do mundo, sobre intoxicação humana devido à ingestão de cianobactéria tóxica, levando inclusive ao óbito (BILLINGS, 1981; FALCONER, 1989). TEIXEIRA *et al.* (1993) descreveram evidência de correlação entre a ocorrência de florações de cianobactérias no reservatório de Itaparica (Bahia) e a morte de 88 pessoas, entre 200 intoxicadas, pelo consumo de água do reservatório, nos meses de março e abril de 1988.

O primeiro caso confirmado de morte humana por intoxicação por MCYST ocorreu na cidade de Caruaru (1996), onde mais de cem pacientes renais crônicos foram intoxicados e 52 morreram devido à exposição do circuito de hemodiálise à

água contendo MCYST (JOCHIMSEN *et al.*, 1998; CARMICHAEL *et al.*, 2001; AZEVEDO *et al.*, 2002). A região sofria de uma forte seca naquela época, os reservatórios que abasteciam a cidade estavam com volumes reduzidos e apresentavam intensa floração de cianobactérias. A intermitência no abastecimento de água levou as clínicas de hemodiálise da cidade a buscar água diretamente dos reservatórios, transportada por caminhões-pipa. Entretanto, a adição de cloro nesses caminhões-pipa para tratar a água resultou em lise das cianobactérias e liberação da toxina na água. Na clínica, o tratamento dado à água mostrou-se inadequado, já que os sistemas de colunas de troca iônica e carvão ativado não estavam em condições adequadas de uso e, assim, não puderam reter as toxinas.

A preocupação mundial com os riscos impostos pela ocorrência de cianobactérias em corpos d'água utilizados para o abastecimento público se reflete na criação de legislações específicas, visando ao aperfeiçoamento do controle da qualidade da água, incluindo o monitoramento de cianotoxinas. O Brasil foi o primeiro país a estabelecer tal medida, por meio da portaria 1469 do Ministério da Saúde (2000), posteriormente substituída pela portaria 518 (2004).

I.3 – MECÂNICA RESPIRATÓRIA

I.3.1- Noções Básicas

A respiração se constitui em um processo cíclico que envolve certo trabalho mecânico por parte dos músculos respiratórios para a movimentação do sistema respiratório. O sistema respiratório é formado por dois componentes: o pulmão e a parede torácica. Como parede torácica subentende-se todas as estruturas que se movem durante o ciclo respiratório à exceção dos pulmões. A pressão motriz,

gerada pela contração muscular durante a inspiração, precisa vencer forças de oposição, tais como: a) forças elásticas dos tecidos pulmonares e parede torácica; b) forças resistivas resultantes do fluxo de gás pelas vias aéreas e movimentação das moléculas constituintes do tecido pulmonar e dos tecidos da parede torácica (MOUNT, 1955); c) forças viscoelásticas dos tecidos pulmonares e da parede torácica (MOUNT, 1955; HILDEBRANDT, 1970); d) forças plastoelásticas responsáveis pela histerese (HILDEBRANDT 1970); e) forças inerciais, dependentes da massa dos tecidos e dos gases (MEAD & WHITTENBERGER, 1954); f) forças gravitacionais, incluídas nas forças elásticas (MILIC-EMILI, 1977); g) forças de distorção da parede torácica. Contudo, durante a respiração basal, as forças inerciais e de distorção da parede são consideradas desprezíveis (RODARTE & REHDER, 1986).

A elasticidade é uma propriedade da matéria que permite ao corpo retornar à sua forma original após ter sido deformado por uma força sobre ele aplicada. Um corpo perfeitamente elástico, como uma mola, obedece a lei de Hooke, ou seja, a variação de comprimento (ou volume) é diretamente proporcional à força (ou pressão) aplicada até que seu limite elástico seja atingido.

Os tecidos pulmonares e da parede torácica possuem propriedades elásticas e, logo, obedecem à lei de Hooke, de modo que quanto maior a pressão motriz, maior o volume de gás inspirado. A inclinação da curva volume-pressão, ou a relação entre a variação de volume gasoso mobilizado (ΔV) e a pressão motriz necessária para manter o sistema respiratório insuflado, é conhecida como complacência do sistema respiratório (C_{rs}). Logo, $C_{rs} = \Delta V/P_{el,rs}$, onde $P_{el,rs}$ corresponde à pressão de retração elástica do sistema respiratório.

Existem dois fatores responsáveis pelo comportamento elástico do pulmão. Um deles é representado pelos componentes elásticos do tecido pulmonar (fibras elásticas e colágenas). No entanto, acredita-se que o comportamento elástico do pulmão não depende do simples alongamento das fibras de tecido conjuntivo, mas principalmente de seu arranjo geométrico. O segundo fator que participa das forças elásticas é a tensão superficial na interface ar-líquido que recobre a zona de troca gasosa.

Durante a movimentação do sistema respiratório, quando ocorre fluxo de gás, um elemento adicional ao elástico precisa ser vencido pela pressão motriz: a resistência. A resistência do sistema respiratório (R_{rs}) pode ser calculada dividindo-se a pressão resistiva ($P_{res,rs}$) pelo fluxo aéreo.

A resistência pulmonar pode ser subdividida em dois subcomponentes: a resistência das vias aéreas (R_{aw}), que depende do fluxo de ar no interior dos pulmões, e a resistência tecidual (R_{tis}), que é determinada pelas perdas energéticas geradas pela viscosidade (isto é, atrito) pertinente à movimentação do pulmão. A resistência das vias aéreas pode ser influenciada pela geometria da árvore traqueobrônquica, pelo volume pulmonar, pela complacência das vias aéreas, pela densidade e viscosidade do gás inspirado e pela musculatura lisa dos brônquios. A resistência tecidual depende da velocidade do deslocamento, o que é importante tanto durante a inspiração quanto na expiração.

Além dos componentes elásticos e resistivos, o sistema respiratório apresenta também propriedades viscoelásticas, que atuam no tecido pulmonar e na parede torácica. A viscoelasticidade foi descrita a partir do comportamento de fios de seda, por Wilhem Weber em 1835. Substâncias viscoelásticas, quando mantidas sob deformação constante, apresentam uma queda de tensão, chamada de “*stress*

relaxation”, ou relaxamento de tensão. Por outro lado, sob uma tensão constante, o corpo tende a se deformar continuamente com o decorrer do tempo, fenômeno chamado “*creep*” (DORRINGTON, 1980). É importante notar que esta deformação não é irreversível, mas sim reprodutível, podendo ser repetida desde que seja precedida por um período no qual o material permaneça em condições de repouso, a fim de apagar a memória do evento anterior. Do ponto de vista morfofuncional, a viscoelasticidade ocorre ao nível de tecido pulmonar e de parede torácica, permitindo o intercâmbio de energia (pressão) entre o componente elástico e o resistivo. Por exemplo, durante uma pausa inspiratória, a energia potencial (pressão) acumulada no componente elástico pode ser dissipada na forma de calor pelo componente resistivo.

I.3.2 - Estudo da Mecânica Respiratória

O sistema respiratório e os seus componentes, pulmão e parede torácica, são constituídos por diversos elementos. A complexidade do sistema respiratório estimulou a busca de modelos matemáticos, relativamente simples, capazes de mimetizar o seu comportamento mecânico.

Durante muitos anos, a mecânica do sistema respiratório foi estudada como um modelo de compartimento único composto por dois elementos, um representando uma resistência (tubo) e outro representando uma elastância (balão), que é o inverso da complacência, como descrito na figura 4. Esse modelo baseava-se na assertiva de que as propriedades mecânicas do sistema respiratório independiam do volume pulmonar e do fluxo, e que os fatores inerciais eram desprezíveis. Considerando-se o sistema respiratório normal, esse modelo pode ser utilizado, e tornou-se tão popular que a equação a ele associada é geralmente

referida como "equação de movimento do sistema respiratório". Essa equação é dada por $P(t) = E.V(t) + R.V'(t)$, onde em qualquer instante t , E e R são, respectivamente, a elastância e a resistência do sistema respiratório e P é a pressão motriz capaz de produzir volume (V) e fluxo aéreo (V'). Entretanto, apesar do modelo de compartimento único continuar sendo amplamente utilizado, ele não oferece precisão para o estudo da mecânica em presença de doenças pulmonares. Nesses casos, faz-se necessário um modelo de dois ou mais compartimentos, que apresentam diferentes constantes de tempo, para descrever o comportamento mecânico do sistema respiratório. Além disso, a equação de movimento não explica o decaimento lento da pressão traqueal observado após oclusão das vias aéreas ao final da inspiração (DON & ROBSON, 1965; BATES *et al.*, 1985ab), a dependência de frequência de R e E na faixa de 0-2 HZ (BATES *et al.*, 1989; BARNAS *et al.*, 1987; BRUSASCO *et al.*, 1989; HANTOS *et al.*, 1986 e 1987), bem como a presença de histerese na curva volume-pressão quase-estática em pulmões isolados.

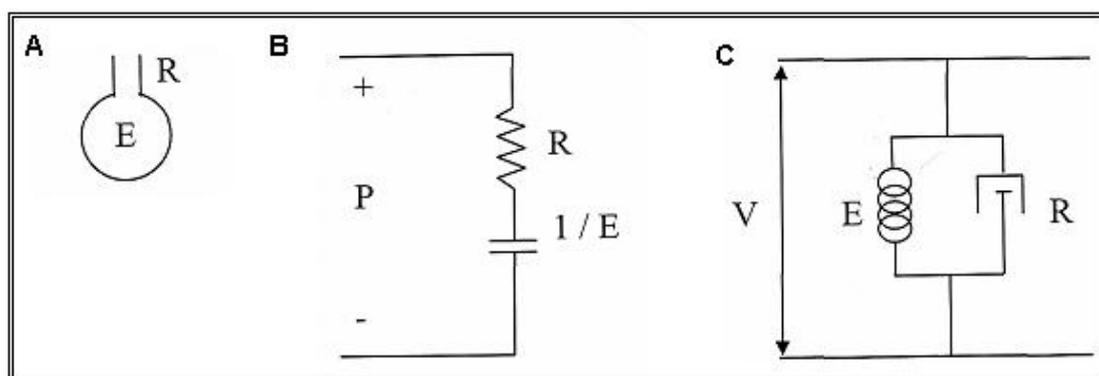


Figura 4. Modelo linear unicompartmental. Representação anatômica (A), elétrica (B) e reológica (corpo de Voigt, C). R , resistência do sistema respiratório; E , elastância do sistema respiratório; P = diferença de potencial elétrico; V , variações de volume.

Iniciou-se, então, o estudo da mecânica respiratória utilizando-se modelos bicompartimentais (que detalharemos a seguir), que consideram a heterogeneidade de distribuição do gás nos pulmões (MEAD, 1969) e a viscoelasticidade dos tecidos (MOUNT, 1955).

Na década de 50 foram descritos os primeiros modelos bicompartimentais para estudo da mecânica respiratória, que associavam a natureza multicompartimental do sistema respiratório à heterogeneidade da distribuição de gás nos pulmões (MEAD, 1961) e a viscosidade dos tecidos (MOUNT, 1955).

Em 1985, Bates *et al.* expandiram o modelo, originalmente proposto por Mount, na forma de um modelo físico composto por elementos elásticos representados por molas e os resistivos expressos por amortecedores (BATES *et al.*, 1985b). Os autores realizaram uma análise teórica do comportamento não homogêneo do sistema respiratório submetido a ventilação mecânica com fluxo inspiratório constante, seguida por oclusão súbita das vias aéreas. Imediatamente após a oclusão, ocorre uma queda rápida da pressão traqueal (ΔP_1 , rs), indo do seu valor máximo (P_{max} , rs) até um ponto de inflexão (P_i , rs), seguida por uma queda lenta (ΔP_2 , rs) até atingir um platô, que corresponde à pressão de retração elástica do sistema respiratório (P_{el} , rs).

O modelo de Bates *et al.* é constituído por dois submodelos, pulmão e parede torácica, apresentando um arranjo em paralelo, uma vez que são submetidos à mesma variação de volume (Figura 5). A subunidade pulmonar consiste de um amortecedor, representando a resistência das vias aéreas (R_{init} , L), em paralelo com um corpo de Kelvin, que consiste de uma mola representando a elastância estática (E_2 , L) em paralelo com um corpo de Maxwell, caracterizado por uma mola, componente elástico (E_2 , L), e um amortecedor, componente resistivo (R_2 , L), dispostos em série. E_2, L , R_2, L e a constante de tempo correspondente (τ_2 , $L=R_2, L/E_2, L$) estimam as propriedades viscoelásticas do pulmão. Já a subunidade da parede torácica é representada por uma resistência ($R_{init,w}$) e pelo corpo de

Kelvin, caracterizado pela elastância estática da parede torácica (Est,w) e dos parâmetros que correspondem à viscoelasticidade ($E2,w$, $R2$ e $\tau2w$).

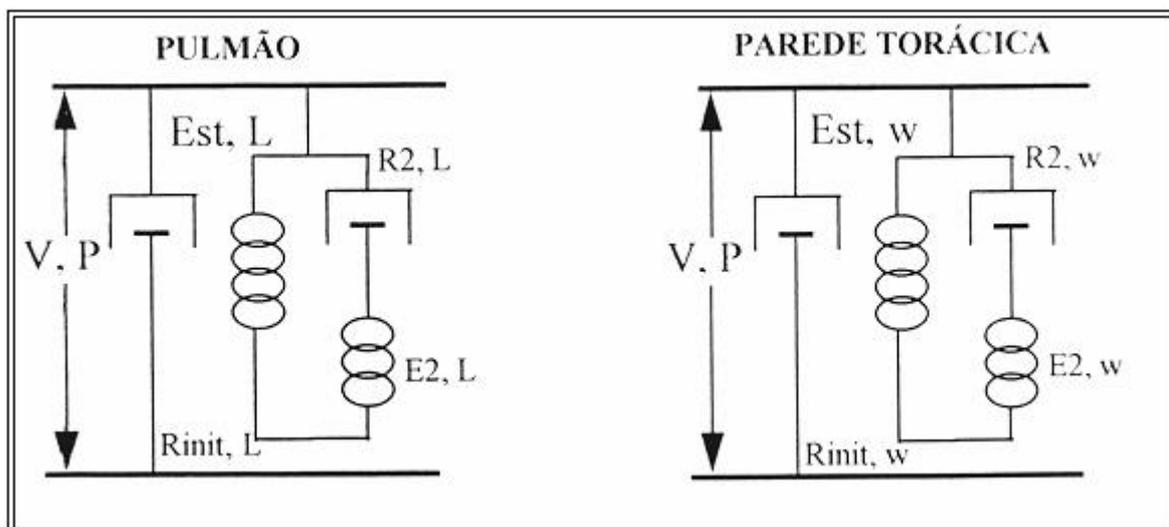


Figura 5. Modelo de molas e amortecedores para interpretação da mecânica do sistema respiratório com a técnica de interrupção do fluxo, proposto por Bates *et al.* Pulmão e parede torácica apresentam um componente resistivo ($R_{init,L}$ e $R_{init,w}$, respectivamente) em paralelo com um corpo de Kelvin; composto por componente elástico (Est,L e Est,w , respectivamente), representando a elastância estática dos dois compartimentos em paralelo com um corpo de Maxwell, conjunto de amortecedor e mola em série ($R2,L - E2,L$, e $R2,w - E2,w$, respectivamente), o qual representa o comportamento viscoelástico. A distância entre as duas barras horizontais é análoga do volume pulmonar (V) e a tensão entre elas é análoga da pressão de abertura das vias aéreas (P).

Quando esse modelo é alongado (afastamento das duas barras horizontais) a uma velocidade constante (v), a carga da mola $E2$ aumenta com o tempo (T_i) e a velocidade do amortecedor $R2$ se aproxima da velocidade de alongamento (v), assim, a força exercida pela mola $E2$ aproxima-se de $R2.v$. Se uma manobra de “interrupção de fluxo” for realizada, o movimento relativo das duas barras horizontais cessa. Com isso, o comprimento da mola $E2$ diminui gradualmente até atingir seu

comprimento de equilíbrio. Logo, nesse modelo, o decaimento pressórico lento (ΔP_2), observado após a interrupção do fluxo, é interpretado como o equivalente ao relaxamento da mola E2, resultando em dissipação resistiva de energia no amortecedor R2.

Baseado no modelo de Bates *et al.* (BATES *et al.*, 1988b), a queda de pressão que ocorre imediatamente após a oclusão das vias aéreas, durante a insuflação pulmonar com fluxo constante, fornece a variação de pressão do sistema respiratório que seria obtida na ausência de desigualdades de constantes de tempo e *stress relaxation*, ou seja, o componente viscoso ou homogêneo do sistema respiratório. A queda mais lenta da pressão, que ocorre subsequente até ser atingido o platô, reflete a pressão dissipada em decorrência da viscoelasticidade e/ou inhomogeneidade do sistema, as quais são determinadas, respectivamente, pelo *stress relaxation* e *pendelluft* (BATES *et al.*, 1985b; BATES *et al.*, 1988b).

Stress relaxation é a capacidade do pulmão de se adaptar a uma insuflação mantida, apresentando redução da pressão em função do tempo. Quando permanece sob um comprimento constante (volume), a tensão pulmonar se altera com o tempo; logo, o gradiente de pressão diminui progressivamente. O *stress relaxation* ocorre após alterações súbitas do comprimento, *strain* (DORINGTON, 1980). Nesse caso, súbito significa que o tempo necessário para o estiramento é menor do que a constante de tempo ($R_2 \cdot C_2$). O *stress relaxation* depende do realinhamento da matriz extracelular e de perdas de energia nos tecidos pulmonares e na interface ar-líquido (HORIE & HILDEBRANDT, 1971). Já o *pendelluft* é a transferência de um pequeno volume de gás dos compartimentos pulmonares de maior pressão para os compartimentos de menor pressão, representando o reajuste

estático das diferenças regionais de volume pulmonar resultantes de desigualdades de constante de tempo (BATES *et al.*, 1985b; OTIS *et al.*, 1956).

O comportamento não homogêneo da parede torácica não está completamente esclarecido. A parede torácica pode se comportar como um sistema de dois compartimentos, um de baixa complacência, representado pela caixa torácica e outro de complacência mais elevada, o abdômen (PESLIN *et al.*, 1975). Além disso, a pressão intrapleural não é uniforme em toda a cavidade torácica, sendo afetada pela contração do diafragma (VU-DINH MINH *et al.*, 1974) e músculos intercostais (D'ANGELO *et al.*, 1974), além da movimentação do abdômen (D'ANGELO *et al.*, 1974; VU-DINH MINH *et al.*, 1974). As propriedades mecânicas do sistema respiratório podem sofrer influência da parede abdominal, ajudando a explicar a queda não homogênea da pressão pleural após oclusão das vias aéreas (ZIN *et al.*, 1989). A abertura extensa da parede abdominal leva ao aumento da elastância e resistência, provavelmente secundário à redistribuição de volumes gasosos no pulmão (ZIN *et al.*, 1989).

O primeiro estudo em animais realizado de acordo com o proposto por Bates *et al.* (1985b), com subdivisão dos componentes pulmonar e de parede, foi realizado por Saldiva *et al.* (1987). Posteriormente, outros trabalhos também demonstraram a contribuição significativa da parede torácica para as desigualdades do sistema respiratório, comprovando que elas podem ser atribuídas aos componentes de pulmão e parede (AULER *et al.*, 1987; ZIN *et al.*, 1989).

O método de oclusão das vias aéreas após insuflação com fluxo constante não é capaz de determinar a contribuição relativa do *pendelluft* (desigualdades de constantes de tempo) e do *stress relaxation* (componente viscoelástico) para o desenvolvimento da queda lenta observada na pressão traqueal (BATES *et al.*,

1985b e 1988a; KOCHI *et al.*, 1988a). No entanto, vários autores acreditam ser a maior contribuição representada provavelmente pelo *stress relaxation* (BATES *et al.*, 1988b; KOCHI *et al.*, 1988a; SIMILOWSKI *et al.*, 1991).

No final dos anos 80, foi demonstrada, através do método de oclusão ao final da inspiração, a dependência das resistências pulmonares em relação ao fluxo e volume (KOCHI *et al.*, 1988a). Em condições de isovolume, a resistência intrínseca do pulmão ($R_{init,L}$) e do sistema respiratório ($R_{init,rs}$) aumentam linearmente com o aumento do fluxo, enquanto que a resistência adicional (ΔR_{L} e ΔR_{rs}), determinada pela dissipação de energia para vencer o componente viscoelástico e/ou inhomogêneo, diminui exponencialmente. Esse comportamento se reflete na resistência pulmonar total ($R_{tot,L}$) que é maior em baixos fluxos do que em fluxos intermediários. Na situação de isofluxo, aumentando-se o volume, $R_{init,L}$ e $R_{init,rs}$ decrescem, enquanto que $R_{tot,L}$ e ΔR_{rs} aumentam (D'ANGELO *et al.*, 1989; KOCHI *et al.*, 1988a).

Em 1988, o modelo de oclusão ao final da inspiração foi validado através de estudos experimentais utilizando cápsulas posicionadas em pontos diferentes da superfície pleural. Ao medir diretamente a pressão alveolar, comprovou-se ser esta homogênea através dos pulmões, apresentando pico de pressão coincidente com o ponto de inflexão (P_i) observado na curva de pressão traqueal. Logo, a pressão alveolar mostrava comportamento semelhante ao encontrado na segunda fase da pressão traqueal, a de queda lenta. Tal observação indica que a variação de pressão responsável pela queda lenta (ΔP_2) ocorre em consequência a um fenômeno distal ao alvéolo, ou seja, no tecido pulmonar. Logo, ΔP_2 é uma manifestação do comportamento tecidual de adaptação ao stress (BATES *et al.*, 1988b; SALDIVA *et al.*, 1992).

Apesar das diversas técnicas que analisam a mecânica do sistema respiratório, nos últimos anos o método da oclusão ao final da inspiração vem sendo bastante utilizado, a fim de estudar a mecânica respiratória tanto em animais quanto em humanos anestesiados (AULER *et al.*, 1987; BATES *et al.*, 1985b; D'ANGELO *et al.*, 1989 e 1994; SALDIVA *et al.*, 1987; Dias *et al.*, 2004; FERNANDES *et al.*, 2006). Este método foi utilizado no presente trabalho, por fornecer informações individualizadas sobre o componente pulmonar e permitir a análise de suas propriedades elástica, viscosa e viscoelástica.

II – JUSTIFICATIVA

A compreensão dos efeitos de doses sub-letais de MCYSTs torna-se relevante, pelo fato de populações humanas estarem mais expostas a pequenas doses do que a doses letais da toxina. Embora o órgão alvo da ação da MCYST seja o fígado, alguns estudos com animais e relatos de intoxicação em humanos dão conta do aparecimento de alterações no sistema respiratório, mesmo quando a via de contaminação não é a inalatória.

ITO *et al* (2000, 2001) identificaram por métodos de imunocoloração a presença de MCYST no pulmão após administração oral e intratraqueal da toxina. Hepatócitos danificados também foram encontrados no tecido pulmonar após injeção de MCYST i.p. (THEISS *et al*, 1988). Há relatos ainda de outras alterações pulmonares, como, trombose pulmonar atípica, broncopneumonia, necrose extensa do epitélio da mucosa, tanto da via respiratória quanto olfatória, e pneumonia (CARMICHAEL *et al.*, 1984; BEASLEY *et al.*, 1989; TURNER *et al.*, 1990; FITZGEORGE *et al.*, 1994). A administração i.p. de extrato tóxico de cianobactérias

contendo MCYST-LR também já demonstrou causar efeitos deletérios no pulmão, evidenciado através da análise histológica (PICANÇO *et al.*, 2004).

No entanto, as informações sobre lesão no sistema respiratório ainda são escassas na literatura, tendo a maior parte dos estudos avaliado a histologia pulmonar e de vias aéreas apenas de forma qualitativa. Além disso, nenhum estudo sobre como as alterações encontradas no sistema respiratório afetam a função pulmonar, ou sobre os mecanismos envolvidos nesse tipo de injúria, foi encontrado.

Os estudos experimentais representam uma importante ferramenta na avaliação dos riscos das cianotoxinas para a população humana. Sendo as MCYSTs as toxinas mais comumente encontradas nos ambientes aquáticos, seus efeitos sub-letais no pulmão foram escolhidos como objeto de estudo desta dissertação.

III. OBJETIVOS

III.1- OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é analisar temporalmente o comportamento da mecânica e da histologia pulmonares, assim como os mecanismos relacionados com a inflamação pulmonar, e a atividade das proteínas fosfatase 1 e 2A no pulmão em resposta a dose sub-letal de MCYST-LR administrada intraperitonealmente.

III.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 - Avaliar, pelo método da oclusão ao final da inspiração, as propriedades resistivas, elásticas e viscoelásticas e/ou inomogêneas do pulmão.

2 - Estudar as alterações morfológicas e a celularidade total e diferencial no parênquima pulmonar.

3 - Avaliar os efeitos de MCYSTs sobre a atividade de proteínas fosfatases 1 e 2A no pulmão.

4 - Avaliar a presença de MCYST no tecido pulmonar.

5 - Avaliar as alterações na celularidade do fluido do lavado broncoalveolar e do sangue.

MATERIAIS E MÉTODOS

IV – MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1 - ANIMAIS UTILIZADOS

Setenta e um camundongos Suiços machos normais adultos, oriundos do Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro, pesando 25-30 g, foram divididos, aleatoriamente, em dois grupos, a saber: grupo controle (16 animais) e grupo cianobactéria (55 animais). Os animais receberam cuidados conforme o guia preparado pelo Comitê de Cuidados e Uso dos Animais de Laboratório do Conselho Nacional de Pesquisas dos Estados Unidos (U.S. Department of Health and Humane Services, 1985). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa (CAUAP) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Inicialmente, animais do grupo controle (n=6) e do grupo cianobactéria (n=30) foram submetidos à avaliação da mecânica respiratória *in vivo*, histologia pulmonar para análise da morfometria e quantificação da celularidade total, análise da atividade da proteína fosfatase 1 e 2A (PP1 e 2A) e ELISA para detecção de microcistina no pulmão. Para análise do fluido do lavado broncoalveolar (BALF) e de amostras de sangue foram utilizados dois subgrupos distintos com 10 e 25 animais em cada grupo, respectivamente.

A medida da mecânica respiratória, a análise da histologia por microscopia óptica e a contagem de celularidade diferencial do BALF e do sangue foram realizadas no Laboratório da Fisiologia da Respiração, enquanto as análises restantes foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactéria, ambos do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (UFRJ).

IV.2 - CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para as análises descritas acima, os camundongos foram aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais:

- Grupo CTRL (controle) – 300 μ L de salina (NaCl a 0,9%) foram injetados intraperitonealmente (i.p.).
- Grupo CIANO (cianobactéria) – foi injetada uma dose sub-letal (40 μ g/kg i.p.) de microcistina-LR (MCYST-LR, padrão cedido pelo Prof. Wayne Carmichael, Wright State University, EUA). Este grupo foi subdividido em 5 grupos de 6 animais, com base no tempo pós-injeção em que foram realizadas as análises, em 2, 8, 24, 48 e 96 horas.

IV.3 - PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais foram sedados com diazepam (1 mg/kg i.p.), pesados (balança Filizola, modelo BR, Indústrias Filizola AS, SP, Brasil) e, em seguida, anestesiados com pentobarbital sódico [Hypnol[®], Cristália, Itapira, SP, Brasil (20 mg/kg i.p.)]. Essa dose é suficiente para manter o animal em plano anestésico (supressão do reflexo córneo-palpebral) por 1 hora. As medidas de mecânica pulmonar não duraram mais do que 30 minutos.

Depois de anestesiados, os animais foram colocados em uma pequena mesa sob foco cirúrgico, em decúbito dorsal, sendo seus membros fixados com esparadrapo. Os membros superiores foram mantidos estendidos a 90 graus em relação ao corpo e os membros inferiores abduzidos em diagonal. Após o posicionamento cirúrgico, foi realizada traqueotomia com introdução de jelco 20G com 32 mm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno, sendo a cânula fixada à

traquéia por meio de fios de algodão. Os animais foram paralisados com injeção intravenosa de brometo de pancurônio (0,4 mg/kg).

Os camundongos foram acoplados a um ventilador de fluxo constante (Samay VR15, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguai) e ventilados com frequência de 100 incursões respiratórias por minuto, volume corrente (V_T) de 0,2 mL e fluxo (V') de 1 mL/s. O ventilador foi ajustado previamente para gerar uma pausa de 5 segundos ao final da inspiração durante as medidas de mecânica. Foram tomados cuidados especiais na manutenção de V_T e V' constantes em todos os animais, a fim de evitar os efeitos de diferentes fluxos, volumes e duração da inspiração nas variáveis medidas (KOCHI *et al.*, 1988a, 1988b; SIMILOWSKI *et al.*, 1989).

Após a adaptação ao respirador, os animais foram submetidos a incisão cirúrgica por tesoura na linha média do abdomen, justo abaixo do apêndice xifóide. A incisão foi estendida, superficialmente, ao longo da parede torácica, sobre o esterno, sendo, então, a pele do animal descolada por tração lateral. A seguir, a incisão abdominal foi estendida lateralmente, para esquerda e para direita, seguindo o bordo inferior das costelas, até atingir a linha axilar anterior, bilateralmente. Com a cavidade abdominal aberta, foi possível visualizar o diafragma, que foi perfurado e seccionado segundo a mesma orientação da abertura da parede abdominal.

Antes da perfuração do diafragma, entretanto, foi determinada a pressão de retração elástica do pulmão (P_{el}) ao nível da capacidade residual funcional (CRF). O valor da P_{el} foi determinado da seguinte forma: justo antes da perfuração do diafragma as vias aéreas foram ocluídas ao final da expiração (i.e., CRF). Quando o diafragma foi, então, perfurado, houve um aumento na pressão transpulmonar (PL) correspondente à P_{el} . Esse mesmo valor de pressão (cerca de 2 cmH₂O) foi

instalado na linha expiratória do ventilador artificial como pressão positiva ao final da expiração (PEEP) (SALDIVA *et al.*, 1992), mantendo-se, por conseguinte, o volume pulmonar ao nível da CRF. A utilização da PEEP evita o colapso alveolar e o desenvolvimento de atelectasias resultantes da retirada da parede torácica (RODRIGUES *et al.*, 1993).

Após a retirada do diafragma, a parede torácica foi removida por cortes longitudinais bilaterais ao nível da linha axilar anterior, em toda sua extensão, e corte superior, transversal, abaixo da clavícula.

A cânula traqueal do animal foi conectada a um pneumotacógrafo para pequenos animais, como descrito por MORTOLA & NOWORAJ (1983), sendo o ventilador acoplado à outra extremidade do pneumotacógrafo. O pneumotacógrafo utilizado consiste de uma cânula metálica com duas saídas laterais com as seguintes características: diâmetro interno = 1,5 mm, comprimento = 4,2 cm e distância entre as saídas laterais = 2,1 cm. O gradiente de pressão através do pneumotacógrafo foi determinado utilizando-se um transdutor diferencial de pressão Validyne MP45-2 (Engeneering Corp, Northridge, CA, EUA) para medida de fluxo aéreo. O volume (V_T) mobilizado foi obtido por integração digital do sinal de fluxo. Através de outra saída lateral, a via aérea era conectada a um transdutor diferencial de pressão Validyne MP45-2 (Engeneering Corp, Northridge, CA, EUA) para medida da pressão transpulmonar (PL) (Figura 6).

Uma vez que não houve modificações abruptas no diâmetro do circuito, os erros de medida da resistência ao fluxo foram provavelmente evitados (CHANG & MORTOLA, 1981; LORING *et al.*, 1979). A resistência ao fluxo imposta pelo equipamento (R_{eq}), incluindo a cânula traqueal, era constante até fluxos de 26

mL/s, e correspondem a 0,8 cmH₂O/mL/s. O espaço morto do equipamento foi de 0,3 mL.

Todos os sinais foram condicionados e amplificados em um polígrafo Beckman tipo R (Beckman, Schiller Park, IL, EUA). Os sinais de pressão e fluxo foram passados através de filtros Bessel de 8 pólos (902LPF, Frequency Devices, Haverhill, MA, EUA), transformados de analógico para digital em conversor de 12 bits (DT-2801A, Data Translation, Malboro, MA, EUA) e armazenados em um microcomputador. Todos os dados foram coletados usando o software LABDAT (RHT-InfoData Inc., Montreal, Quebec, Canadá) (Figura 6).

Durante os experimentos foi evitada ao máximo a manipulação da cânula traqueal com aspirações e insuflações, para eliminar possíveis interferências sobre os parâmetros medidos.

A calibração do transdutor de pressão foi realizada com o auxílio de um tubo em "U" contendo água destilada. A aferição foi realizada antes de cada experimento para assegurar a confiabilidade do registro.

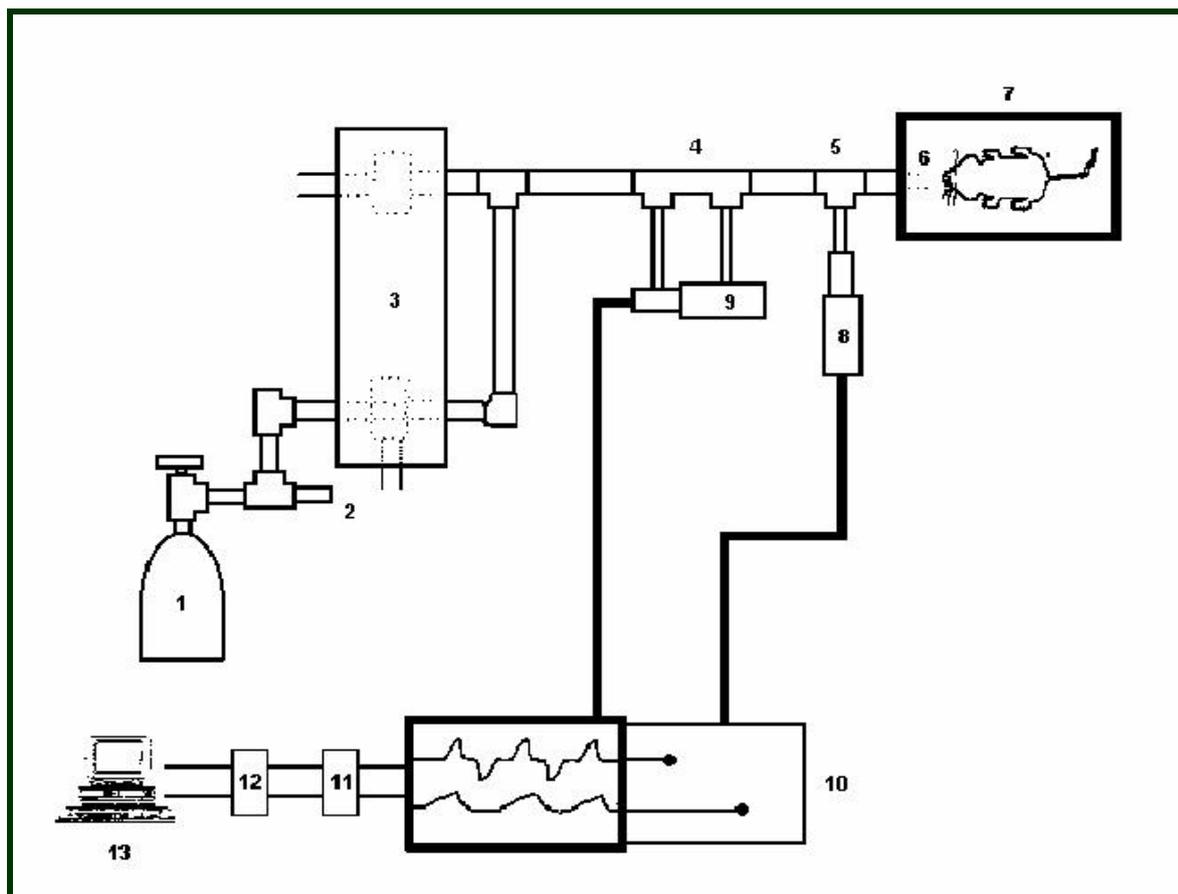


Figura 6. Montagem experimental consistindo de:

- 1 - Cilindro de ar comprimido.
- 2 - Válvula redutora de pressão.
- 3 - Ventilador de fluxo inspiratório constante composto por duas válvulas solenóides.
- 4 - Pneumotacógrafo.
- 5 - Peça em "T" para medição de pressão na abertura das vias aéreas.
- 6 - Cânula traqueal.
- 7 - Mesa cirúrgica.
- 8 - Transdutor diferencial de pressão transpulmonar.
- 9 - Transdutor diferencial de pressão para medição de fluxo.
- 10 - Polígrafo de oito canais para amplificação dos sinais de fluxo e pressão transpulmonar.
- 11 - Filtros passa-baixa Bessel de 8 polos.
- 12 - Conversor analógico-digital de 12 bits.
- 13 - Microcomputador.

IV.4 - ESTUDO DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA

A mecânica respiratória foi avaliada pelo método de oclusão ao final da inspiração após insuflação com fluxo constante (BATES *et al.*, 1985a, 1988b, 1989; KOCHI *et al.*, 1988a, 1988b), que permite analisar separadamente os componentes elástico, viscoso e viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão (Figura 7).

Em um experimento com a parede aberta, a pressão na abertura das vias aéreas representa a pressão transpulmonar (PL). Após a oclusão das vias aéreas ao final da inspiração, ocorre uma queda súbita da PL (ΔP_1) até um ponto de inflexão (P_i), a partir do qual o decaimento da pressão assume caráter mais lento (ΔP_2), atingindo um platô em sua porção terminal. Esta fase de platô corresponde à pressão de retração elástica do pulmão (P_{el}) (Figura 7). A diferença de pressão que caracteriza a queda rápida inicial (ΔP_1), representada pela diferença entre a pressão máxima inicial ($P_{m\acute{a}x}$) e o ponto a partir do qual a queda se torna mais lenta (P_i), corresponde à pressão dissipada para vencer o componente viscoso do pulmão, ou seja, reflete a pressão necessária para sobrepujar a resistência de vias aéreas centrais (BATES *et al.*, 1988b, 1989; KOCHI *et al.*, 1988a, 1988b). A segunda variação de pressão (ΔP_2), representada pela queda lenta, do P_i ao platô (P_{el}), reflete a pressão dissipada para vencer o componente viscoelástico (“stress relaxation”) e/ou inhomogêneo (“pendelluft”) do tecido pulmonar e vias aéreas terminais (BATES *et al.*, 1988b; D’ANGELO *et al.*, 1989 e KOCHI *et al.*, 1988a, 1988b). A soma de ΔP_1 e ΔP_2 fornece a variação total de pressão (ΔP_{tot}).

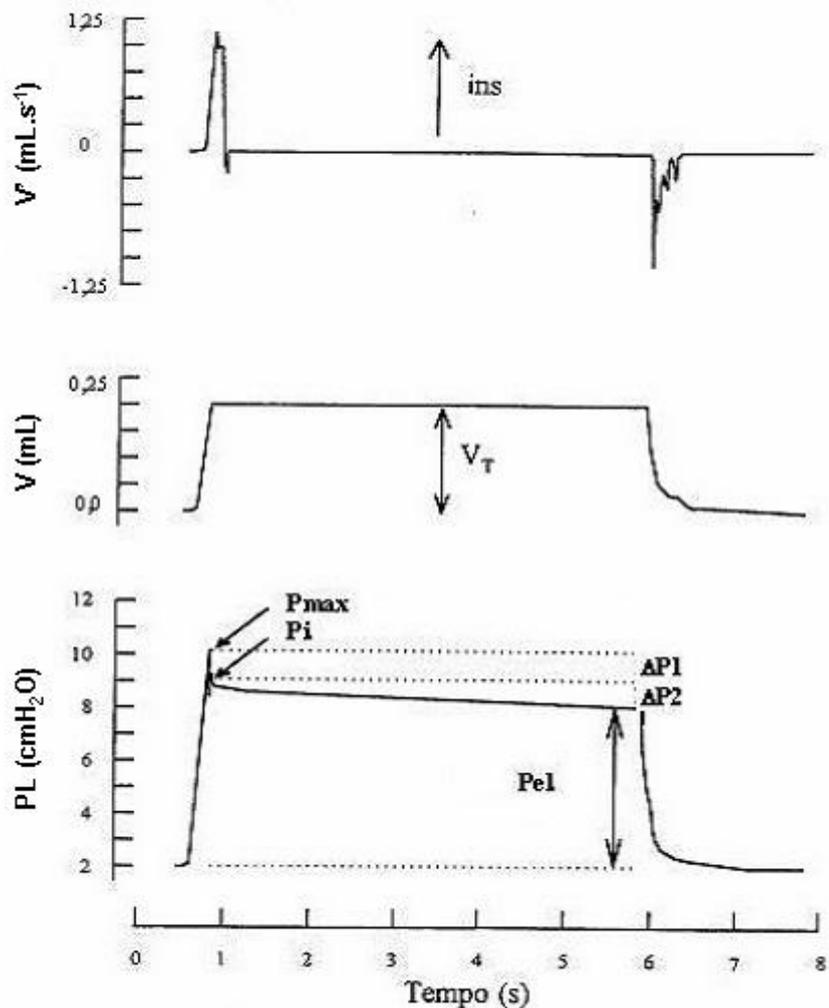


Figura 7. Método de Oclusão ao Final da Inspiração. Representação esquemática dos traçados de fluxo (V'), volume (V) e pressão transpulmonar (PL) em função do tempo, obtidos a partir da oclusão da via aérea ao final da inspiração. Os pulmões foram ventilados com volume corrente de 0,2 mL e fluxo aéreo de 1 mL/s. O platô foi alcançado após uma pausa inspiratória de 5 s. Após a oclusão das vias aéreas, há uma queda rápida na PL ($\Delta P1$) que corresponde à $P_{max} - P_i$, pressão dissipada para vencer o componente viscoso do pulmão, seguida por uma queda lenta ($\Delta P2$), pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão, até um ponto de equilíbrio elástico, representada pela pressão de retração elástica pulmonar ($Pe1$). A linha de base do registro de pressão corresponde à pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH₂O (neste animal). V_T , volume corrente; ins, inspiração.

As elastâncias estáticas (Est) e dinâmica (Edyn) do pulmão podem, então, ser obtidas dividindo-se P_{el} e P_i , respectivamente, pelo volume corrente. ΔE é a diferença entre Edyn e Est.

As seguintes fórmulas foram utilizadas na análise da mecânica pulmonar:

$$\Delta P1 = Pm \text{ áx} - P_i$$

$$\Delta P2 = P_i - P_{el}$$

$$\Delta P_{tot} = \Delta P1 + \Delta P2$$

$$Est = P_{el}/V_T$$

$$Edyn = P_i/V_T$$

$$\Delta E = Edyn - Est$$

$$T_I = V_T/V'$$

Onde:

$\Delta P1$ = variação de pressão utilizada para vencer o componente viscoso

$\Delta P2$ = variação de pressão relativa ao componente viscoelástico e/ou inhomogêneo

ΔP_{tot} = variação de pressão total $P_{m\acute{a}x}$ = pressão máxima atingida

P_i = pressão no ponto de inflexão P_{el} = pressão de retração elástica

Est = elastância estática Edyn = elastância dinâmica

V_T = volume corrente ΔE = variação de elastância

T_I = tempo inspiratório V' = fluxo inspiratório

Para a realização da oclusão, o aparelho utiliza uma válvula com tempo de fechamento definido (10 ms). Como este fechamento não é instantâneo, o volume nunca cai a zero imediatamente após a oclusão, propiciando, assim, a existência de um pequeno fluxo. Este fluxo será responsável pelo aumento do volume pulmonar e, conseqüentemente, de $P_{máx}$, P_i e P_{el} . Por isso, foi feita correção de acordo com Kochi e colaboradores (KOCHI *et al.*, 1988a).

A resistência do equipamento (R_{eq}), incluindo a cânula traqueal, foi previamente aferida através da aplicação de fluxos de ar no sistema, com concomitante registro das variações de pressão (ΔP). Uma vez que $R = \Delta P / V'$, a resistência do equipamento corresponde ao coeficiente angular da curva $\Delta P \times V'$. A R_{eq} , constante até fluxos de 26 mL/s, foi de 0,8 cmH₂O/mL/s. A variação de pressão determinada pelo equipamento ($\Delta P_{eq} = R_{eq} \cdot V'$) foi subtraída de ΔP_{tot} e ΔP_1 , de forma que os resultados refletem propriedades mecânicas intrínsecas.

Foram registrados de 10 ciclos respiratórios em cada animal. A resposta de freqüência do sistema de registro da PL foi estável até 20 Hz. Os dados foram analisados usando o software para análise de dados ANADAT (RHT-InfoData Inc., Montreal, Quebec, Canadá).

IV.5 - ANÁLISE DA HISTOLOGIA DO PARÊNQUIMA PULMONAR

IV.5.1 - Fixação e Preparo das Lâminas para Microscopia Óptica

Após a determinação da mecânica pulmonar, a aorta abdominal e a veia cava foram seccionadas, gerando uma hemorragia maciça, que rapidamente levou os animais ao óbito. A traquéia foi ocluída com linha de algodão ao final da expiração, quando a capacidade residual funcional (CRF) pulmonar é atingida. A porção

abdominal do esôfago foi identificada e isolada, sendo presa por uma pinça hemostática. As estruturas do pescoço foram dissecadas com liberação das vias aéreas. A pinça que prendia o esôfago era suavemente tracionada para cima, permitindo separá-lo das estruturas aderidas à parede torácica posterior. Com todas as estruturas individualizadas, a traquéia foi seccionada acima do local ligado pelo fio e, posteriormente, o esôfago foi separado do conjunto por leve tração.

Os brônquios principais direito e esquerdo foram ocluídos com fio de algodão e os pulmões, separados. O pulmão esquerdo foi rapidamente congelado por meio de imersão em nitrogênio líquido, por aproximadamente 3 minutos, retirado e mantido em solução de Carnoy (etanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%, por volume) a -70° C por 24 h. Após este período, o material foi desidratado progressivamente por meio de imersão em soluções com concentrações crescentes de etanol, como discriminado abaixo:

- MC-1: Etanol 70%, clorofórmio 22,5% e ácido acético 7,5%, a -20° C durante 1 h;
- MC-2: Etanol 80%, clorofórmio 15% e ácido acético 5%, a -20° C durante 1 h;
- MC-3: Etanol 90%, clorofórmio 7,5% e ácido acético 2,5%, a -20° C durante 1 h;
- Etanol 100%, a -20° C por 1 h.

Posteriormente, o pulmão foi mantido a -4° C por 24 h. Após a fixação, o material foi embebido em parafina, obtendo-se cortes histológicos com 4 μ m de espessura.

As lâminas contendo os cortes pulmonares foram coradas com hematoxilina e eosina (HE).

IV.5.2 - Análise Histológica e Morfométrica

As lâminas com os cortes pulmonares montados foram analisadas por microscopia óptica (microscópio Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) tanto qualitativa quanto quantitativamente. Para a análise descritiva, toda a superfície da lâmina foi observada com todas as estruturas pulmonares representadas, em aumento de 200 e 1000x.

A análise quantitativa foi realizada utilizando-se a técnica convencional de contagem de pontos (“point-counting”) (GUNDERSEN *et al.*, 1988), utilizando uma ocular acoplada ao microscópio contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 linhas dispostos em paralelo (Figura 8).

A fração de área ocupada por alvéolos normais, colapsados e hiperinsuflados (maior que 120 μm) foi quantificada, em um aumento na ocular do microscópio óptico de 200x. Foram avaliados cinco a dez campos aleatórios e não coincidentes por lâmina. A soma dos pontos que caem em área de alvéolo colapsado, normal ou hiperdistendido foi dividida pelo número total de pontos em cada campo analisado.

As células polimorfonucleares (neutrófilos + eosinófilos) e células mononucleares (macrófagos + linfócitos + monócitos) e tecido pulmonar foram quantificados em um aumento de 1000x. Foram avaliados cinco a dez campos aleatórios e não coincidentes. O tecido pulmonar foi avaliado através do número de pontos do campo que recaem sobre áreas de tecido e não sobre espaços aéreos. No caso das células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN), foi quantificado o número total de cada tipo celular presente no septo alveolar, bem como a celularidade total (PMN + MN). Os pontos que caem sobre células PMN e MN foram contados e divididos pelo número total dos pontos que caem na área do

tecido em cada campo microscópico.

Os valores finais foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

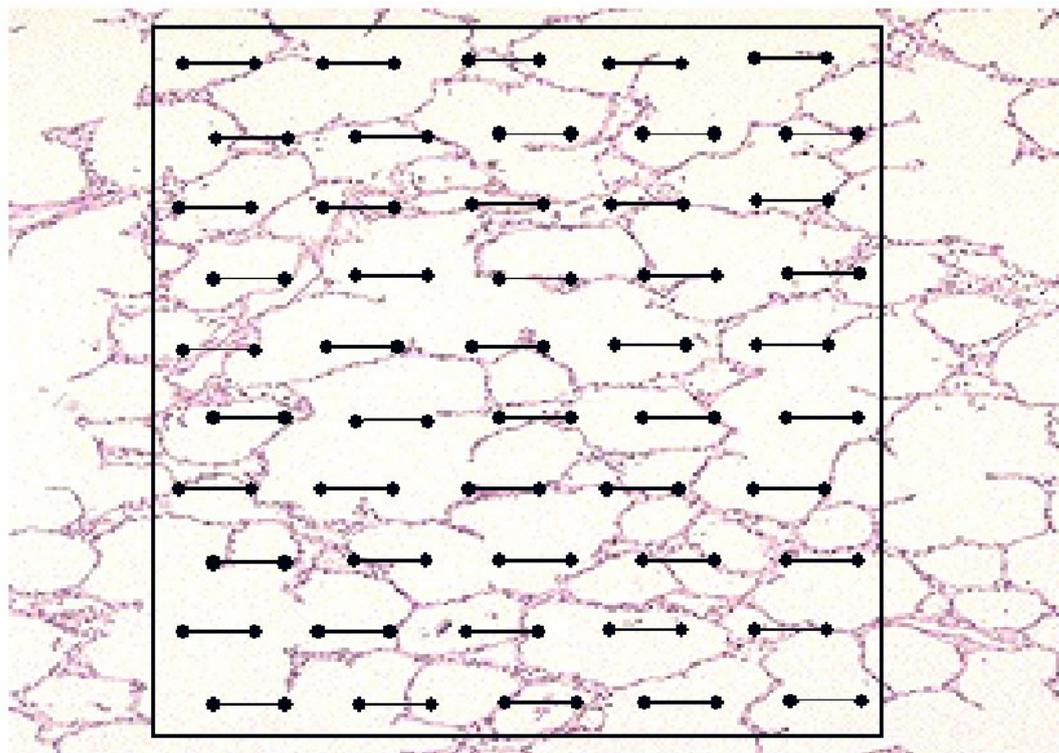


Figura 8. Representação esquemática do retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos.

IV.6 - ANÁLISE DO FLUIDO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR (BALF) E DO SANGUE

Um outro grupo de trinta e cinco camundongos (CTRL = 10 animais, CIANO = 25 animais) foi submetido ao mesmo protocolo previamente descrito para obter as alíquotas de sangue e do BALF. Com esse propósito, 2, 8, 24, 48 e 96 h após a injeção i.p. de salina ou MCYST-LR, as amostras de sangue (20 μ L) foram obtidas da veia da cauda para confecção das lâminas com esfregaço sanguíneo (10 μ L) e

análise dos leucócitos totais (10 μ L). Os animais foram, então, anestesiados e sacrificados com Sevoflurane, foi feita uma incisão no abdômen de forma a expor a veia cava, sendo coletado todo o sangue possível (cerca de 1 mL). A traquéia foi canulada, da forma já descrita, e a coleta do BALF foi realizada lavando-se os pulmões duas vezes com 1,0 mL de solução salina (NaCl a 0,9%) estéril. O fluido do lavado (volume recuperado de cerca de 90% do volume instilado) foi centrifugado a 1000 rpm por 10 min, e o pellet celular foi ressuscitado em 250 μ L de salina.

A contagem total de leucócitos foi realizada usando um hemocítômetro (câmara de Neubauer), sob microscopia óptica, após a diluição das amostras em solução de Türk (2% ácido acético em água destilada, tingido com cristal violeta). Para contagem diferencial de células do BALF, 250 μ L do material foi preparado em uma citocentrífuga a 500 rpm por 3 min (Cytospin 3, Shandon Inc., Pittsburgh, PA, EUA). As lâminas foram coradas com Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil). Um total de 100 células em cada lâmina foi contado por microscopia óptica, diferenciado-se mononucleares, neutrófilos e eosinófilos.

IV.7 - ANÁLISE DA ATIVIDADE DE PROTEÍNAS FOSFATASES 1 E 2A

O pulmão direito foi utilizado para as análises da atividade das proteínas fosfatases pelo método descrito por RUNNEGAR et al. (1993). Logo após a retirada, o pulmão era homogeneizado (0,1 g de tecido/mL) em solução tampão contendo EDTA (0,1 mM), DTT (1 mM), Tris-HCl a pH = 7,0 (50 mM) e o inibidor de protease PMSF (0,1 mM) em banho de gelo, utilizando-se homogeneizador Tissuemiser (Fisher Scientific, Hampton, NH, USA). O homogenato resultante foi centrifugado a 10000 g e o sobrenadante (citosol) obtido armazenado em freezer a -20°C até o momento da análise.

A produção do substrato específico para PP1 e 2A foi feita seguindo o procedimento descrito por SHENOLIKAR & INGEBRITSEN (1984), com pequenas modificações: 5 mg de fosforilase *b* (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) foram incubados por 1 hora, em banho termostático a 30°C, com 400 µL de solução contendo 0,08 mg de fosforilase cinase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), 300 µM de ATP e 5000 cpm/pmol de [γ -³²P] ATP (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), 2 mM de acetato de magnésio, 125 µM de CaCl₂, 60 mM de glicerofosfato de sódio (pH 8,2), 50 mM de Tris-HCl (pH = 8,2). A reação foi interrompida com solução de sulfato de amônio 90% saturada e transferida para banho de gelo, onde foi mantida por mais 1 hora. Em seguida, após centrifugação a 15000 g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em 0,4 mL de solução contendo Tris-HCl (5,0 mM, pH = 7,0), EDTA (1,0 mM), 2-mercaptoetanol (0,3% v/v). Os cristais de [³²P] fosforilase *a* formados foram, então, diafiltrados em Microcon YM-10 (Millipore, Bedford, MA, EUA) por meio de centrifugação a 14000 g por aproximadamente 2 horas a 4°C. O filtrado foi descartado, o material retido no filtro foi ressuspensão na solução citada anteriormente, diafiltrado, sendo este processo repetido ainda mais uma vez e o precipitado final ressuspensão em solução contendo Tris-HCl (50 mM, pH = 7,0), NaCl (250 mM), 2-mercaptoetanol (0,3% v/v).

Este processo permitiu a remoção de grande parte do ATP radioativo residual. No entanto, resulta em um rendimento máximo de 65% na produção de fosforilase *a*. A concentração final da mesma foi determinada por meio de diluição de uma pequena alíquota e determinação de sua absorvância em 280 nm (λ 1,31 = 1 mg/mL, de acordo com o protocolo de SHENOLIKAR & INGEBRITSEN, 1984).

A determinação da atividade de PP 1 e 2A no pulmão foi realizada, misturando-se 10 µL do sobrenadante do homogenato (citosol pulmonar), 10 µL de

solução de reação (50 mM de Tris-HCL, pH = 7,0 e 1 mM de DTT) e 10 μ L de solução [32 P] fosforilase a (3 mg/mL) por 10 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 0,1 mL de ácido tricloroacético a 10%, e a liberação de fosfato radioativo foi determinada através de cintilação líquida.

IV.8 - ANÁLISE DE MICROCISTINA-LR POR ELISA

As mesmas amostras de citosol pulmonar utilizadas para a análise da atividade fosfatásica foram, também, analisadas por ELISA para a detecção de MCYST-LR, de acordo com o método descrito por CHU *et al* (1990), An & Carmichael (1994) e Carmichael & An (1999). O método utiliza anticorpos policlonais de coelho anti-MCYST-LR, com reatividade cruzada também contra vários congêneres de microcistina.

O método de ELISA competitivo direto, utilizado para estas análises, identifica o antígeno (a microcistina) através de anticorpos específicos fixos a uma placa. Simplificadamente, a placa é incubada com a amostra contendo o antígeno e posteriormente com um conjugado composto de antígeno ligado a uma enzima, neste caso a peroxidase. O antígeno ligado à enzima e o não ligado (a amostra) competem pela ligação com os anticorpos, sendo que a amostra tem a vantagem de ter entrado antes em contato com os anticorpos. Após a reação, lava-se a placa, somente restando, por conseguinte, o material ligado aos anticorpos. O substrato da enzima é adicionado e a reação é colorimétrica. O resultado é lido como valores de densidade óptica das amostras, e assim, quanto mais intensa a cor, menos toxina existe na amostra. Cabe ressaltar que este método consegue detectar somente microcistinas livres, ou seja, microcistinas conjugadas com proteínas fosfatases, ou com qualquer outro peptídeo, não são reconhecidas pelos anticorpos.

Os anticorpos e o conjugado MCYST-aminoetil-tio-peroxidase (MCYST-HRP) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Wayne Carmichael (Wright State University, EUA). Assim, placas de 96 poços com volume de 200 μL (Nunc-Maxisorb) foram incubadas por 24 h com anticorpos policlonais de coelho anti-MCYST LR-BSA (5 $\mu\text{g/mL}$) e armazenadas em geladeira por até 1 semana. Para a análise de amostras, a placa, após lavagem com solução tampão fosfato (PBS)-Tween 20 0,05%, foi incubada por 60 minutos com solução tampão bloqueadora (caseína 1% em PBS), sendo, em seguida, lavada novamente com PBS-Tween. Diferentes concentrações de padrão de MCYST-LR e controle negativo (para obtenção da curva padrão), assim como as amostras, foram adicionadas aos poços em duplicata, sendo incubadas por 30 minutos. Após este período, o conjugado MCYST-HRP (12,5 nM) foi adicionado à placa e incubado pelo mesmo período. Em seguida, a placa foi lavada com a solução de lavagem descrita anteriormente e recebeu a solução de substrato preparada no momento com 4-*fenilenodiamina* (OPD) (0,4 mg/mL), tampão citrato (50 mM de ácido cítrico e 0,1 M de NaH_2PO_4 , pH = 5,0) e peróxido de hidrogênio a 30%, sendo incubada novamente por 10 minutos, observando-se o desenvolvimento de cor. A reação foi interrompida com solução de HCL 1 N e a densidade óptica foi determinada em leitora de placas (Vmax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) em 490 nm. A partir da curva padrão de MCYST-LR obtida, calculou-se as concentrações nas amostras. O limite de quantificação corresponde a 0,16 ppb.

IV.9 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores finais foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

Inicialmente os dados foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov (com correção de Lilliefors) para avaliar a normalidade de suas distribuições. A seguir foi aplicado o teste da mediana de Levene para verificar a igualdade de variâncias. Se ambas as condições fossem satisfeitas, era aplicada one-way ANOVA, seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas, quando necessário. Em caso negativo, o teste não-paramétrico Kruskal Wallis ANOVA on Ranks era empregado.

Os parâmetros de morfometria e celularidade foram submetidos à transformada arco-seno, para posteriormente serem comparados.

Em todos os testes, o nível de significância foi 5%. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Sigma Stat 3.1 (Jandel Scientific, San Rafael, CA, EUA).

RESULTADOS

V – RESULTADOS

V.1 - MECÂNICA RESPIRATÓRIA

No intuito de avaliar temporalmente os efeitos da injeção i.p. de MCYST-LR sobre a função pulmonar de camundongos, foram medidos os parâmetros da mecânica respiratória *in vivo*.

Os valores de volume e fluxo utilizados durante o experimento estão mostrados na tabela 1 e não variaram significativamente nos grupos estudados.

Tabela 1. Fluxo e Volume nos animais dos grupos controle e cianobactéria nos diferentes tempos.

	Fluxo (mL/s)	Volume (mL)
CTRL	1,00 ± 0,01	0,20 ± 0,01
CIANO 2 h	1,01 ± 0,01	0,20 ± 0,01
CIANO 8 h	1,00 ± 0,01	0,19 ± 0,01
CIANO 24 h	1,01 ± 0,01	0,20 ± 0,01
CIANO 48 h	1,01 ± 0,01	0,20 ± 0,01
CIANO 96 h	1,00 ± 0,01	0,20 ± 0,01

Os valores representam média ± EPM de seis animais em cada grupo. CTRL, animais injetados com solução salina (0,9% NaCl) i.p.; CIANO, camundongos que receberam injeção i.p. de microcistina-LR (40 µg/kg). As medidas foram realizadas 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a injeção.

As diferenças entre os parâmetros de mecânica respiratória (Est, ΔE , $\Delta P1$, $\Delta P2$ e ΔP_{tot}) observadas entre os animais do grupo CTRL e dos grupos CIANO

estão representadas nas figuras 9 e 10. Os camundongos injetados com a dose sub-letal de MCYST-LR apresentaram alterações de início precoce nos componentes resistivo, elástico e viscoelástico do pulmão, que perduraram até 96 horas. Já 2 horas após a injeção i.p. de toxina, as médias dos valores de ΔP_1 , ΔP_2 e ΔP_{tot} no grupo CIANO foram 63%, 16% e 20% maiores do que no grupo CTRL, respectivamente (Figura 9). A análise estatística indicou que esses parâmetros permaneceram igualmente alterados das duas primeiras horas até o quarto e último dia de experimento.

A Figura 10 mostra que os animais injetados com MCYST-LR apresentaram valores de ΔE maiores do que aqueles do grupo CTRL já em 2 horas pós-administração da toxina, e, além disso, os valores permaneceram nesse novo nível até o tempo final de experimentação. Por outro lado, a elastância estática foi maior do que no grupo controle em 2 horas, alcançou seu valor de pico em 8 horas, e diminuiu progressivamente até 96 horas, no entanto, sem retornar ao normal. Portanto, houve um comprometimento agudo da função pulmonar, que não foi restabelecida ao final de 96 horas.

Os dados da mecânica respiratória de cada animal separadamente estão apresentados no anexo I.

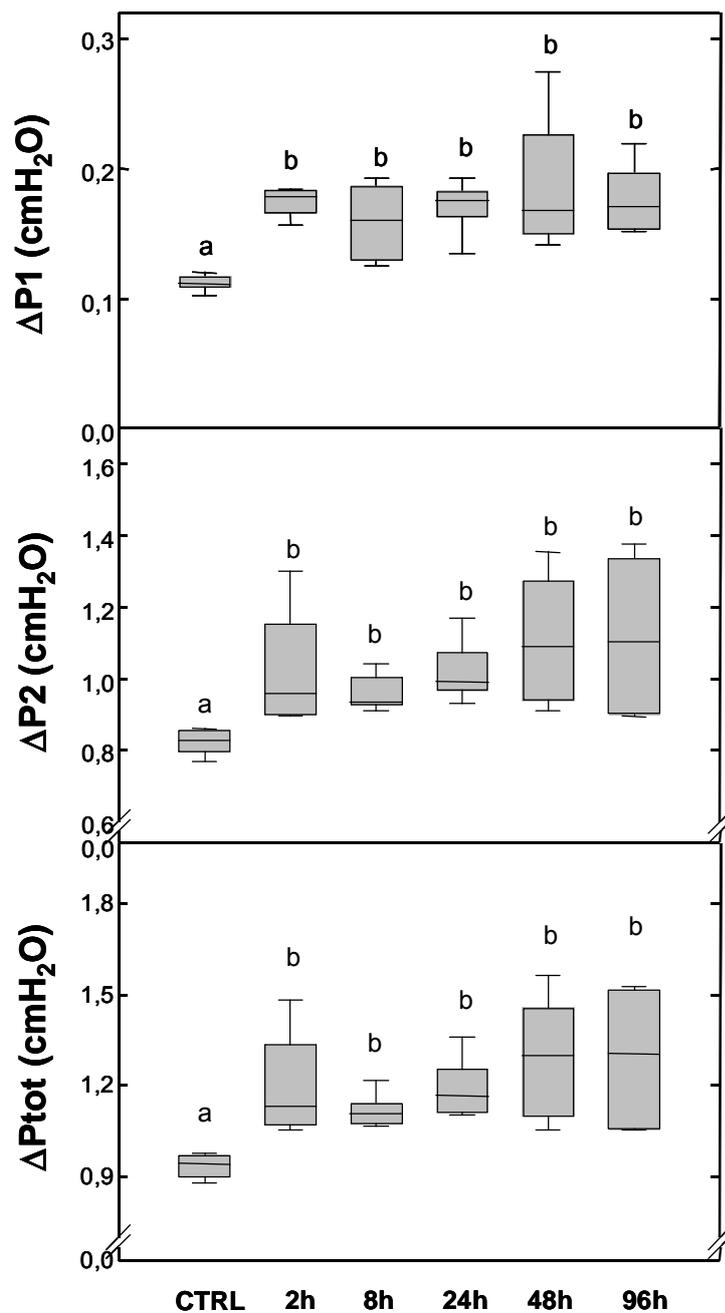


Figura 9. Variações de pressão necessárias para vencer os componentes resistivo ($\Delta P1$), viscoelásticos/inomogêneos pulmonares ($\Delta P2$) e pressão total exercida contra os componentes viscosos e viscoelásticos do pulmão (ΔP_{tot}). Os valores são expressos em mediana com os limites do interquartil 25-75 e os valores máximo e mínimo de animais injetados com solução salina (CTRL) ou microcistina-LR (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, CIANO) i.p. ($n=6$ em cada grupo). As medidas foram feitas 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a injeção. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

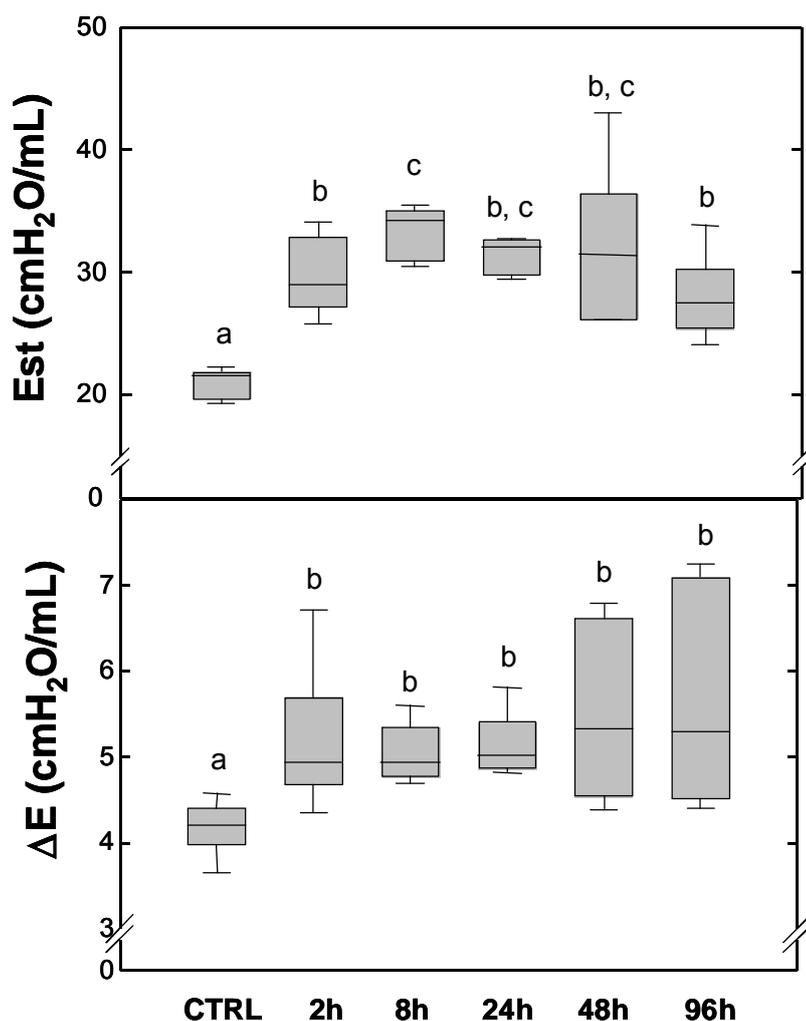


Figura 10. Elastância estática (Est) e diferença entre as elastâncias estática e dinâmica do pulmão (ΔE). Os valores são expressos em mediana com os limites do interquartil 25-75 e os valores máximo e mínimo de animais injetados com solução salina (CTRL) ou microcistina-LR [40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (CIANO)] i.p. ($n=6$ em cada grupo). As medidas foram feitas 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a injeção. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($p<0,05$).

V.2 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

Visando a fundamentar os achados funcionais e avaliar o comprometimento tecidual seguido à administração de MCYST-LR, foram realizadas análises qualitativas e quantitativas no tecido pulmonar.

V.2.1 - Análise qualitativa

A figura 11 retrata fotomicrografias do parênquima pulmonar dos grupos CTRL e CIANO. Podemos notar que a administração de MCYST-LR via i.p. gerou danos ao parênquima pulmonar, evidenciados pela presença de espessamento de septo alveolar, com aumento de celularidade, em todos os grupos que receberam a toxina. Além disso, esses animais apresentaram áreas de colapso alveolar e discreto edema em comparação com o grupo controle. Esses achados histológicos se alinham com os achados funcionais previamente descritos.

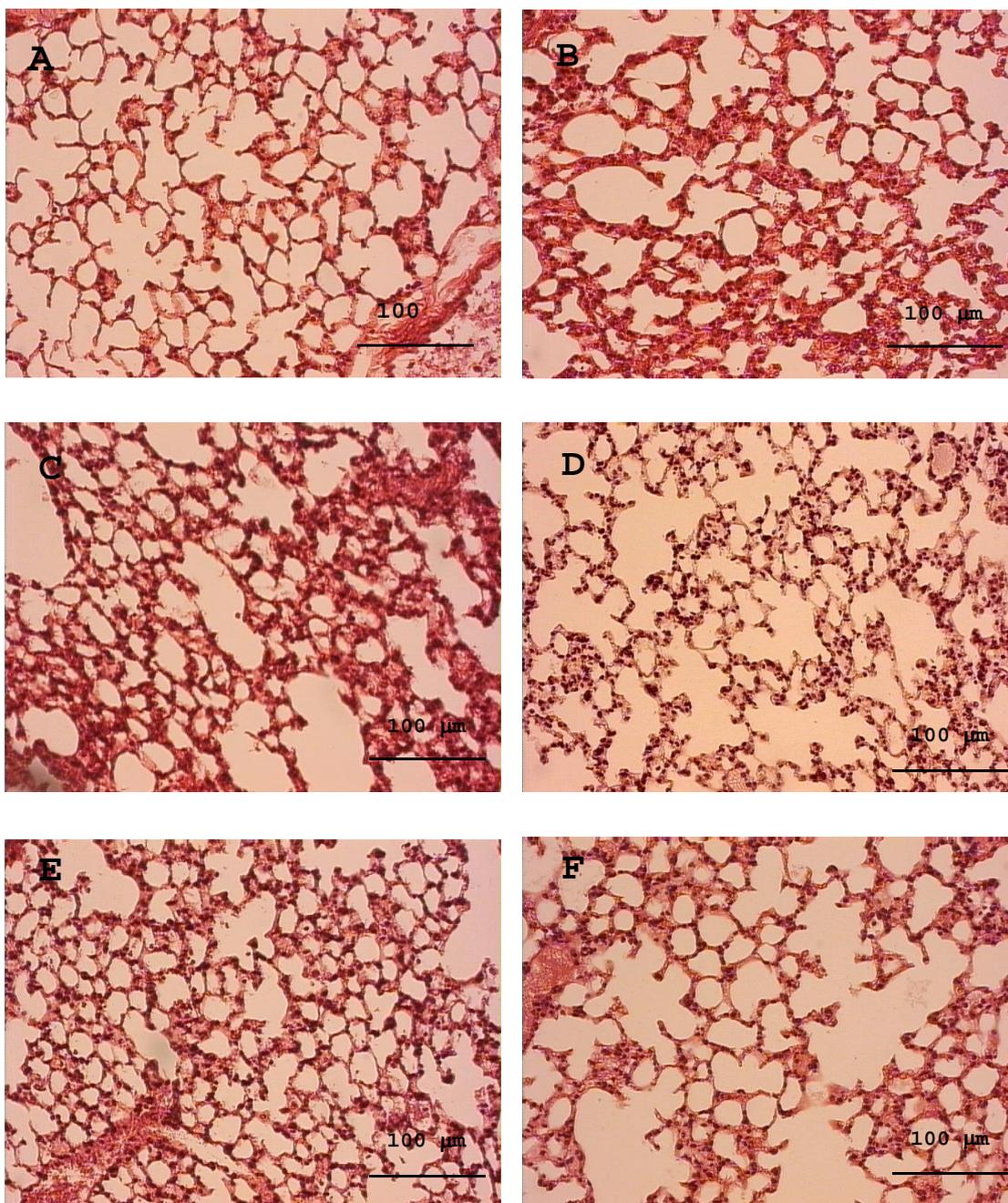


Figura 11. Fotomicrografias de parênquima pulmonar (200x) coradas com hematoxilina-eosina. As fotos são representativas de 6 animais por grupo. A, grupo controle; B, C, D, E, F, pulmões retirados 2, 8, 24, 48 e 96 horas, respectivamente, após a injeção intraperitoneal de microcistina-LR (40 µg/kg). Barras = 100 µm.

V.2.2 - Análise quantitativa

A análise quantitativa permitiu avaliar a extensão dos danos provocados ao pulmão pela injeção i.p. de MCYST-LR. Os valores obtidos nesta análise para os grupos CTRL e CIANO nos diferentes tempos são apresentados nas tabelas 2 e 3.

A tabela 2 apresenta a análise morfométrica do parênquima pulmonar dos animais controle e cianobactéria. Duas horas após a injeção i.p. de MCYST-LR, já se observa um aumento significativo de colapso alveolar com pico em 8 horas. De 8 a 96 horas houve diminuição gradual do colapso, porém sem retornar aos níveis de CTRL. O aumento das áreas de colapso foi acompanhado por redução do percentual de áreas normais. Os dados de cada animal separadamente estão apresentados no anexo II.

Tabela 2. Morfometria Pulmonar.

GRUPO	Área normal (%)	Colapso alveolar (%)
CTRL	94,7 ± 0,9 ^a	5,2 ± 0,9 ^a
CIANO 2 h	76,3 ± 1,7 ^{b,c}	23,6 ± 1,7 ^{b,c}
CIANO 8 h	70,3 ± 1,5 ^b	29,0 ± 1,2 ^b
CIANO 24 h	75,5 ± 2,4 ^{b,c}	24,5 ± 2,4 ^{b,c}
CIANO 48 h	78,4 ± 2,0 ^c	21,2 ± 2,1 ^c
CIANO 96 h	81,5 ± 1,3 ^c	18,5 ± 1,3 ^c

Fração de área de alvéolos normais e colapsados no parênquima pulmonar dos camundongos injetados com salina (CTRL) ou microcistina-LR [40 µg/kg i.p. (CIANO)] e analisados 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a injeção. Os valores correspondem à média ± EPM de 5 a 10 campos por lâmina, em um aumento de 200x (6 animais por grupo). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (p<0,05).

Visando a avaliar o efeito da MCYST-LR na resposta inflamatória, quantificamos a celularidade total e diferencial no parênquima pulmonar (Tabela 3). Foi observado aumento significativo da celularidade total no grupo CIANO, já em 2 horas, determinado por influxo de células PMN. O aumento de PMN persistiu até 96 horas. Houve redução do percentual de células MN no grupo CIANO que começou 2 horas após a injeção i.p. de microcistina-LR e persistiu ao longo dos quatro dias de experimento. No entanto, a redução percentual de MN foi secundária ao aumento relativo de PMN, uma vez que não houve queda do número absoluto de MN por campo. Os dados de cada animal separadamente estão apresentados no anexo III.

Tabela 3. Celularidade total e diferencial no parênquima pulmonar.

GRUPO	% TOT	% PMN	% MN
CTRL	29,6 ± 1,9 a	10,0 ± 1,4 a	19,7 ± 1,0 a
CIANO 2h	38,0 ± 2,7 b	28,9 ± 2,4 b	9,1 ± 0,8 b
CIANO 8h	39,7 ± 1,8 b	29,0 ± 1,0 b	10,7 ± 1,3 b
CIANO 24h	37,6 ± 2,0 b	25,2 ± 2,9 b,c	12,4 ± 1,6 b
CIANO 48h	39,0 ± 0,7 b	25,8 ± 0,6 b,c	13,2 ± 0,7 b
CIANO 96h	33,5 ± 2,1 a	22,1 ± 1,3 c	11,4 ± 0,9 b

Percentual de células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN) e celularidade total (TOT) em relação à área de tecido total no pulmão dos camundongos injetados com salina (CTRL) ou microcistina-LR [40 µg/kg i.p. (CIANO)] e analisados 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a injeção. Os valores correspondem à média ± EPM de 5 a 10 campos por lâmina, em um aumento de 1000x (6 animais por grupo). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

V.3 - ANÁLISE DO NÚMERO DE LEUCÓCITOS NO FLUIDO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR (BALF)

A análise de celularidade total e diferencial do BALF, apresentada na figura 12, mostrou um aumento rápido e pronunciado do número total de células nos animais desafiados com a MCYST-LR. Duas horas após a injeção da MCYST-LR esse número já representava um valor 7 vezes maior do que àquele observado nos animais do grupo CTRL. Esse aumento foi devido, principalmente, ao recrutamento de células mononucleares e de neutrófilos. Em 96 horas, todos os tipos celulares e, conseqüentemente, a celularidade total, retornaram a valores semelhantes ao CTRL.

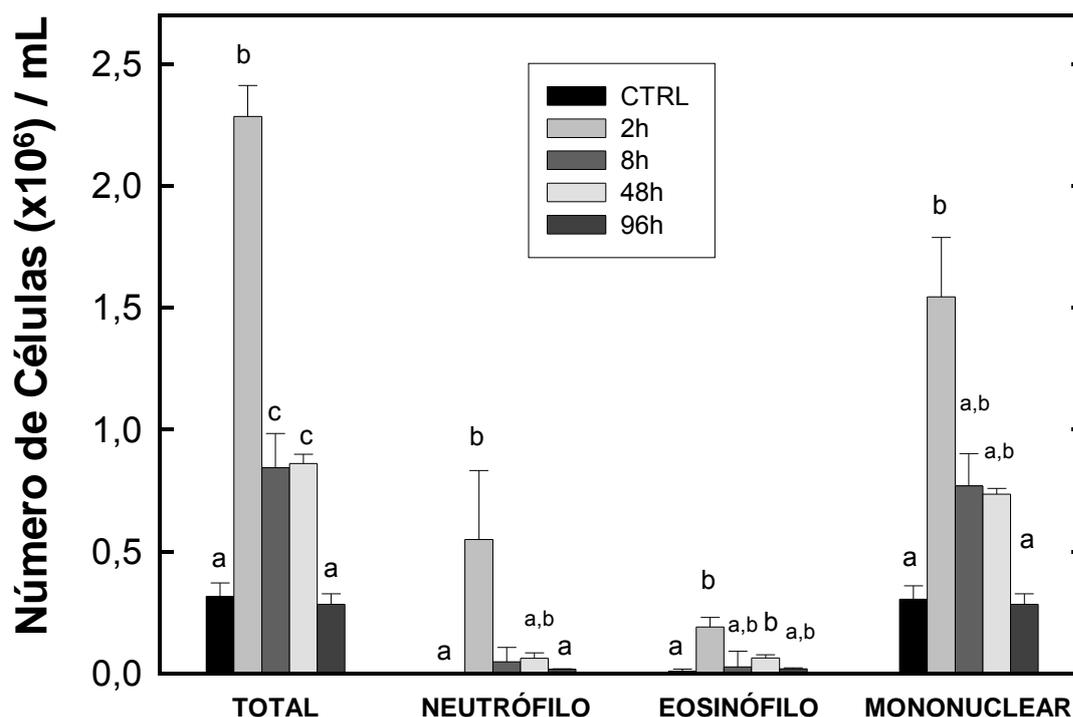


Figura 12. Número de células totais e diferenciais no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF). Os valores correspondem à média \pm EPM de animais adultos do grupo CTRL (n=8) e do grupo CIANO (n=5) analisados 2, 8, 48 e 96 horas após a injeção i.p. de microcistina-LR (40 μ g/kg de peso corporal). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

V.4 - ANÁLISE DO NÚMERO DE LEUCÓCITOS NO SANGUE

Visando a avaliar os tipos celulares de maior representatividade na corrente sanguínea no curso de uma intoxicação i.p. por MCYST-LR, amostras de sangue foram coletadas e analisadas para contagem celular total e diferencial. As mudanças observadas na celularidade total e diferencial do sangue estão representadas na figura 13. Houve um aumento significativo do número de células totais no sangue apenas 8 horas após a injeção de MCYST-LR, não tendo sido observado aumento significativo nos outros tempos experimentais. Esse aumento na celularidade total foi reflexo principalmente da mobilização de neutrófilos, tipo celular que já se mostrou elevado significativamente nas primeiras duas horas após a administração da toxina, e permaneceu assim até o último tempo experimental.

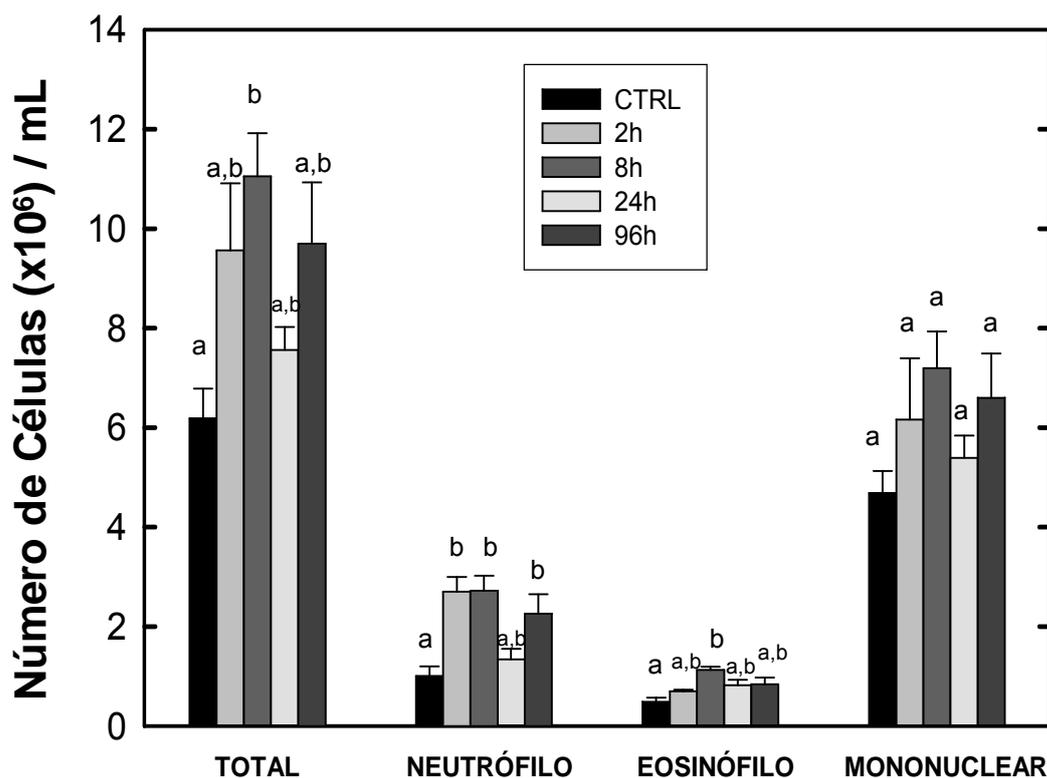


Figura 13. Número de células totais e diferenciais no sangue. Os valores correspondem à média \pm EPM de animais do grupo CTRL (n=8) e do grupo CIANO (n=5) analisados 2, 8, 24 e 96 horas após a injeção i.p. de microcistina-LR (40 μ g/kg de peso corporal). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

V.5 - ANÁLISE DA ATIVIDADE DE PROTEÍNAS FOSFATASE 1 E 2A

Como já foi previamente demonstrado que a MCYST-LR tem a capacidade de inibir a atividade de proteínas fosfatase 1 e 2A no fígado (Runnergär *et al.*, 1993), decidimos avaliar a atividade destas proteínas no homogenato pulmonar. A atividade das proteínas fosfatase 1 e 2A permaneceu inalterada no grupo CIANO, não sendo inibida pela injeção i.p. de MCYST-LR (Figura 14).

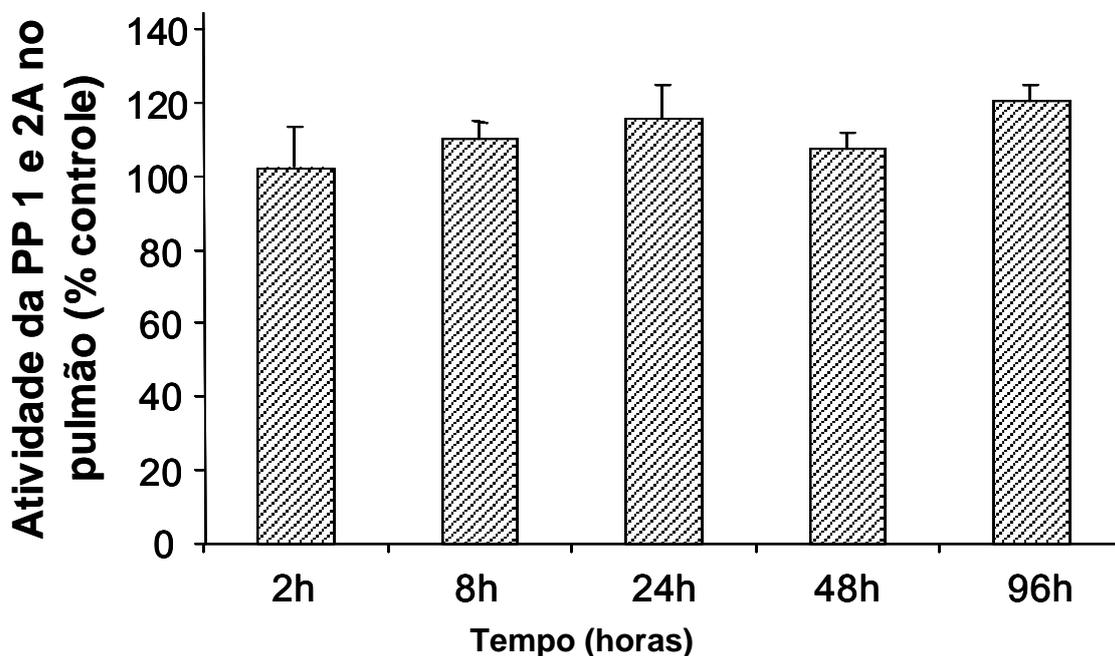


Figura 14. Atividade de proteínas fosfatase (PP) 1 e 2A (mU/g de tecido) no pulmão de camundongos. Os valores estão expressos em porcentagem da atividade de PP do grupo CTRL, e foram avaliados 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a injeção i.p. de MCYST-LR (40 μ g/kg de peso corporal). Os valores correspondem à média + EPM.

V.6 - QUANTIFICAÇÃO DE MCYST-LR POR ELISA

Visando a avaliar a presença de MCYST-LR nos pulmões dos camundongos, utilizamos um método imunoenzimático sensível e específico. A análise por ELISA não detectou a presença de MCYST livre no homogenato do pulmão de animais controle ou injetados com a toxina (limite de quantificação: 0,16 ppb).

DISCUSSÃO

VI – DISCUSSÃO

A MCYST é uma cianotoxina hepatotóxica, cujos efeitos deletérios no fígado são extensamente conhecidos. Outros órgãos também podem ser afetados por esta toxina, no entanto, pouco se sabe sobre seus efeitos no sistema respiratório. No presente estudo, a avaliação dos efeitos agudos da MCYST-LR sobre o pulmão de camundongos mostrou modificações histológicas no parênquima pulmonar com áreas de colapso alveolar, espessamento do septo, presença de edema e aumento da celularidade total. Essas modificações foram associadas a alterações da mecânica pulmonar com aumento da elastância e das pressões resistivas e viscoelásticas e/ou inhomogêneas. Além disso, também foram vistas alterações precoces na composição celular do BALF e do sangue, evidenciando um processo inflamatório rápido provocado por essa toxina.

Uma parte importante da interpretação dos resultados de uma pesquisa biológica é a cuidadosa seleção da espécie a ser utilizada. Existe uma enorme variedade de espécies animais disponíveis e, como regra geral, a espécie filogeneticamente mais próxima à humana possui a melhor correlação clínica. Os modelos experimentais auxiliam na compreensão dos fenômenos naturais e possibilitam o estudo de estruturas e órgãos de difícil acesso em humanos. Ainda, a possibilidade de controlar as variáveis ambientais, sociais e patológicas em animais de experimentação justificou, no nosso experimento, a escolha de pequenos animais. Diversas espécies de camundongo e rato têm sido utilizadas para avaliar os efeitos da MCYST nos diferentes sistemas, sendo facilmente encontrado os valores da DL50 desta toxina de acordo com sexo e espécie do animal. Sendo assim, escolhemos camundongos Suíços machos adultos, os quais são largamente utilizados para estudos com MCYST e não necessitam de um período muito longo

de tempo para se encontrarem em condições de uso, após seu nascimento. Um aspecto que deve ser ressaltado quanto ao uso de animais dessa linhagem diz respeito ao fato desta não ser isogênica. Para alguns estudos esta pode ser uma característica que compromete a correta interpretação dos resultados, uma vez que o padrão de resposta observado poderá apresentar grande variabilidade. Neste estudo, a utilização de seis camundongos por grupo foi suficiente pra detectar diferenças significativas entre os mesmos.

Existem poucos grupos de pesquisa no mundo se dedicando a investigar os efeitos de MCYSTs no pulmão. Entretanto, os resultados obtidos com esta dissertação e outros estudos já citados demonstram que este é um órgão claramente afetado por estas cianotoxinas, mesmo em doses sub-letais, por diferentes via de exposição. Deve-se ter em mente que a exposição de animais e humanos a pequenas concentrações de MCYST na água é certamente muito mais freqüente do que a intoxicação letal. Como tanto o grupo controle, injetado com salina, como o grupo experimental, injetado com MCYST-LR, estavam expostos às mesmas condições cirúrgica e ventilatória, podemos admitir que as alterações encontradas foram decorrentes exclusivamente da administração da toxina e não de uma interferência causada pelo tipo de preparação.

No presente estudo, observou-se aumento significativo dos parâmetros de função pulmonar nos grupos injetados com MCYST-LR em relação ao CTRL (Figuras 9 e 10). Há várias técnicas desenvolvidas para a análise da mecânica respiratória, porém o método de oclusão das vias aéreas ao final da inspiração difundiu-se por apresentar a vantagem de individualizar variações de pressões em seus componentes resistivos, elásticos e viscoelásticos e/ou inhomôgeneos (BATES *et al.*, 1985a). Avanços importantes ocorreram clínica e experimentalmente a partir

desse conhecimento. Utilizando este método, detectamos um aumento nas variações de pressão (ΔP_{tot} , ΔP_1 e ΔP_2) (Figura 9), na elastância estática (Est) e variação de elastância (ΔE) do pulmão no grupo CIANO em relação ao CTRL (Figura 10). Em um animal destituído de sua parede torácica e, considerando-se o volume corrente e o fluxo aéreo constantes, as alterações observadas em ΔP_{tot} refletem as modificações nos componentes resistivos e viscoelásticos e/ou inomogêneos do pulmão. ΔP_1 reflete a pressão dissipada para vencer a resistência de vias aéreas centrais (SIMILOWSKI *et al.*, 1989). ΔP_2 está relacionada ao relaxamento por tensão (*stress relaxation*) do tecido pulmonar, juntamente com pequena contribuição do *pendelluft* (BATES *et al.*, 1988b; D'ANGELO *et al.*, 1989; SALDIVA *et al.*, 1992).

Portanto, o aumento das pressões resistivas (ΔP_1) no pulmão de camundongos injetados com a toxina, sugere que as vias aéreas são afetadas de alguma forma, fato este que precisa ser melhor investigado. O aumento das pressões necessárias para vencer os componentes elásticos (Est) e viscoelástico e/ou inomogêneos (ΔP_2), indicam um enrijecimento pulmonar. Tais achados funcionais podem ser explicados pelas alterações morfológicas do parênquima pulmonar evidenciadas na microscopia óptica (Figura 11 e Tabelas 2 e 3).

O colapso alveolar (Figura 11 e Tabela 2) acarreta heterogeneidade do parênquima pulmonar e contribui para o aumento de ΔP_2 , ΔE e da Est. Outros fatores também podem ter contribuído para esse aumento, como distorção dos alvéolos patentes, o processo inflamatório desencadeado e disfunção do surfactante pulmonar. O processo inflamatório evidenciado pelo espessamento do septo alveolar, aumento da celularidade total devido ao recrutamento de células polimorfonucleares e presença de edema no tecido pulmonar (Figura 11 e Tabela

3), pode, potencialmente, comprometer a síntese e/ou armazenamento do surfactante pulmonar, elevando a tensão superficial, gerando, assim, áreas de colapso com conseqüente aumento da Est. GUPTA *et al.* (2003), ao avaliar em camundongos injetados com uma dose letal de MCYST i.p., também constataram a presença de efeitos pulmonares, tais como, congestão, necrose e hiperplasia do epitélio brônquico, edema e hemorragia, entre 30 e 60 minutos após a injeção. Um estudo anterior conduzido pelo nosso grupo de pesquisa mostrou que a injeção i.p. de extrato de cianobactérias contendo MCYST-LR também leva a um processo inflamatório rápido, com presença de colapso alveolar, influxo de células inflamatórias no parênquima pulmonar e edema intersticial (PICANÇO *et al.*, 2004). No entanto, como o extrato contém outros metabólitos secundários, era de fundamental importância estudar os efeitos da toxina purificada. Neste trabalho, foi utilizada MCYST-LR padrão, com grau de pureza > 95% e resultados semelhantes ao estudo anterior foram obtidos, evidenciando que os efeitos encontrados haviam sido provocados pela toxina.

A presença de MCYSTs no pulmão após a administração da toxina via i.p. já foi demonstrada em vários trabalhos utilizando-se MCYST marcada de diferentes formas (BROOKS & CODD, 1987; ROBINSON *et al.*, 1989; NISHIWAKI *et al.*, 1994; STOTTS *et al.*, 1997a,b). ITO *et al.* (2001) demonstraram que a MCYST-LR é capaz de alcançar a corrente sanguínea e outros órgãos, a partir do pulmão. A toxina foi detectada no pulmão, fígado e rins após a instilação intratraqueal (i.t.). Embora os autores relatem que não houve danos ao tecido pulmonar, nenhuma avaliação histopatológica detalhada foi realizada. As fotomicrografias pulmonares apresentadas no artigo mostram áreas de colapso alveolar (ITO *et al.*, 2001).

Outro trabalho utilizando MCYST-LR mostrou que a exposição de camundongos via aerosol gerou necrose ou inflamação das células epiteliais respiratórias da cavidade nasal, com presença de infiltrado neutrofílico, e degeneração, necrose e atrofia das células epiteliais olfatórias (BENSON *et al.*, 2005). Entretanto, nenhuma lesão foi observada no parênquima pulmonar. Cabe ressaltar que já foi demonstrado que a DL50 da MCYST-LR por via nasal é similar àquela da via intravenosa ou intraperitoneal - 50 µg/kg (ITO *et al.*, 2001; FITZGEORGE *et al.*, 1994). BENSON *et al.* (2005) utilizaram a MCYST-LR numa dose máxima de 12,5 µg/kg de peso corpóreo, talvez por isso não tenham encontrado efeitos pulmonares ou em outros órgãos.

Em 1990, TURNER *et al.* relataram o caso de soldados britânicos que faziam exercícios de canoagem em um reservatório contendo floração tóxica de cianobactéria produtora, principalmente, de MCYST-LR. Esses recrutas apresentaram, dentre outros sintomas, tosse seca, dor pleurítica e febre. Baseado em estudos prévios de FALCONER *et al.*, 1981 e SLATKIN *et al.*, 1983, os autores atribuíram a pneumonia à exposição a MCYST. Em outro estudo, PILOTTO *et al.* (1997) relatam o aparecimento de sintomas semelhantes aos da gripe em indivíduos que fizeram recreação em água contaminada por cianobactérias na Austrália, em até uma semana após o contato com a água. No entanto, os sintomas foram associados a uma resposta alérgica pelo contato com as células e não às toxinas. Nenhum estudo animal sobre os efeitos agudos da MCYST conseguiu detectar danos pulmonares por ingestão de cianotoxina via oral (FAWELL *et al.*, 1999; YOSHIDA *et al.*, 1997; FITZGEORGE *et al.*, 1994). No entanto, um estudo crônico conduzido por FALCONER *et al.* (1988) detectou broncopneumonia de forma dose-dependente com a ingestão de extrato de cianobactérias.

O método de ELISA não identificou MCYST-LR livre no tecido pulmonar. A provável explicação para este fato reside na especificidade da toxina pelo fígado, já que é rapidamente captada pelos transportadores de sais biliares presentes no hepatócito (ROBINSON *et al.*, 1991; CARMICHAEL, 1994). Quando a toxina é injetada no peritônio, ela alcança a corrente sangüínea, inicialmente pela circulação portal, facilitando a sua chegada ao fígado. Esse transporte ocorre de forma rápida, sendo descrito tempos entre 1 e 60 minutos para a chegada de mais de 60% de MCYST no fígado após injeção i.p. (BROOKS & CODD, 1987; ROBINSON *et al.*, 1989). Ao entrar no hepatócito, a MCYST forma ligação covalente com as PP 1 e 2A, inibindo a atividade dessas enzimas e iniciando um processo de desestruturação do citoesqueleto dos hepatócitos, que culmina com a morte celular, principalmente pelo mecanismo de apoptose (DING *et al.*, 1998a,b). Quando o hepatócito rompe, as MCYSTs entram novamente na circulação sangüínea, só que agora, possivelmente conjugadas a uma PP ou parte dela, através do aminoácido Mdha. Ainda no fígado, as MCYSTs podem ser detoxificadas pela GSH e formar conjugados MCYST-SG, também através do aminoácido Mdha (KONDO *et al.*, 1996). Esses conjugados são menos tóxicos do que a forma livre da toxina, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, já que não podem mais formar ligação covalente com a PP (ITO *et al.*, 2002; KONDO *et al.*, 1992; METCALF *et al.*, 2000). Esse comportamento das MCYSTs nos leva a pensar que a toxina que chega ao pulmão pelo sangue não se encontra na sua forma livre, não sendo, portanto, detectada pelo ELISA.

De fato, estudos indicam que as MCYSTs circulam no sangue ligadas às proteínas, muito mais do que na sua forma livre (HILBORN *et al.*, 2005). Sendo assim, ao analisar a presença de MCYST por ELISA pode-se subestimar suas concentrações no sangue ou nos tecidos. Além disso, a hipótese de que a forma

livre da toxina tenha alcançado o pulmão em concentrações muito baixas não pode ser descartada.

A maior parte da fosforilação protéica nas células eucarióticas ocorre em resíduos de serina e treonina, sendo as PP1 e PP2A as maiores contribuintes da atividade fosfatásica geral (HONKANEN & GOLDEN, 2002; PEIRCE *et al.*, 1998). Sabe-se que PP1 está diretamente ligada ao controle de funções celulares, como metabolismo do glicogênio, contração muscular e progressão do ciclo celular, enquanto a PP2A é descrita como crucial no controle da proliferação celular, além de estar envolvida em sinalizações e controle do ciclo celular (BARFORD *et al.*, 1998). No presente trabalho, os efeitos observados no pulmão dos animais poderiam estar relacionados à possível inibição dessas enzimas presentes nas células pulmonares. Já foi visto que mastócitos pulmonares apresentam PP 1 e 2A (PEACHELL *et al.*, 1998; PEIRCE *et al.*, 1998). No entanto, não foi detectado efeito inibitório destas fosfatases nos tempos experimentais descritos nesta dissertação, após injeção de MCYS-LR i.p. nos animais (Figura 14). Uma possível explicação reside no fato de que em duas horas, a lesão já se encontra instalada e que, portanto, é plausível que haja inibição destas proteínas em tempos inferiores ao estudado. Além disso, como o mecanismo de hepatotoxicidade das MCYSTs não se dá somente pela inibição das PP, mas também pela indução de estresse oxidativo, então, esse poderia ser um possível mecanismo de lesão pulmonar.

A injeção i.p. de MCYST-LR é capaz de estimular os macrófagos peritoniais a produzir mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1). Este achado foi observado por NAKANO *et al.* (1991) após a administração i.p. de MCYST-LR e de extratos tóxicos de *Microcystis aeruginosa* a camundongos. IL-1 é um importante estimulador da migração de PMN para o

parênquima pulmonar (WAGNER & ROTH, 2000) e TNF- α age preparando o endotélio para a migração celular. Logo, caso a MCYST-LR não tenha alcançado os pulmões, é possível que o processo inflamatório tenha sido desencadeado por citocinas produzidas por macrófagos peritoniais e carregadas pela corrente sanguínea, o que levaria a ativação de células em diferentes tecidos, inclusive o pulmão. Experimentos *in vitro* demonstraram que MCYSTs são capazes de estimular macrófagos alveolares a produzir prostaglandinas F2 e PGE2, além de tromboxano B2 e ácido aracônico (NASEEM *et al.*, 1989). O reconhecimento da MCYST-LR pelos macrófagos não está caracterizado. Uma hipótese é que a MCYST-LR seja um ligante de receptores da imunidade como os receptores Toll-like (TLR). Estes receptores são fundamentais no reconhecimento de diversas moléculas de microrganismos (AKIRA & TAKEDA, 2004). Caso a MCYST-LR livre tenha de fato atingido o pulmão, mesmo em concentrações muito pequenas, é possível que tenha promovido a resposta inflamatória também de forma direta. Ou ainda, mesmo os conjugados MCYST-SG podem ser capazes de estimular diretamente a resposta inflamatória pulmonar.

Foi observado um aumento significativo de neutrófilos, a partir de 2 horas, e de eosinófilos, em 8 horas, no sangue após a administração de MCYST-LR (Figura 13). Os neutrófilos, juntamente com os eosinófilos e basófilos, são células da imunidade inata que possuem grânulos especializados para defesa imunológica e, portanto, constituem a primeira linha de defesa do organismo. Em geral, as células da imunidade inata respondem aos sinais inflamatórios, sendo ativadas para localização do tecido danificado e para comunicação intercelular através do contato célula-célula ou através de citocinas (LUSTER *et al.*, 2005). Os neutrófilos expressam moléculas de adesão abundantes para uma rápida ligação com os

receptores endoteliais ativados pelo processo inflamatório, acumulando-se em poucas horas nos sítios de inflamação aguda.

Esse aumento no número de neutrófilos e eosinófilos é também observado de forma precoce, já em 2 horas, nas células extravasadas no BALF (Figura 12). De fato, foi previamente observado que a MCYST aumenta a adesão espontânea de leucócitos PMN em humanos, o que poderia influenciar a capacidade migratória destas células (HERNANDEZ *et al.*, 2000). No entanto, o achado que mais surpreende é o número elevado de mononucleares num tempo tão curto pós-exposição à toxina. Modelos conhecidos de inflamação pulmonar, como o LPS, geram um aumento de MN apenas em 12 horas após a indução da lesão (PENIDO *et al.*, 1997). Essa rapidez de resposta observada nos leva a pensar que a MCYST-LR injetada no peritônio estimula também outras células da imunidade inata, além dos macrófagos, que já possuem citocinas estocadas para que possam ser liberadas instantaneamente sob estímulos inflamatórios repetidos, como neutrófilos, eosinófilos, células T citotóxicas e mastócitos (GIBBS *et al.*, 2001; ROT & VON ANDRIAN, 2004).

No parênquima pulmonar, foi evidente o recrutamento de células PMN, sendo o maior acúmulo observado 8 horas após a injeção de MCYST-LR (Tabela 3). O maior percentual de células MN observados no BALF não se repetiu no parênquima pulmonar, sugerindo que estas células não se fixaram ao tecido pulmonar. Uma possibilidade para esta discrepância seria a maior dificuldade em diferenciar as células mononucleares no tecido, subestimando sua quantificação total.

Já foi visto que a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) também está envolvida na fisiopatologia das lesões hepáticas induzidas pela MCYST (DING *et al.*, 2001) e que, *in vitro*, os hepatócitos expostos à MCYST desenvolvem apoptose (MCDERMOTT *et al.*, 1998). Outros tipos celulares de humanos e ratos

também apresentaram apoptose quando expostos a concentrações elevadas de MCYST-LR por período prolongado (MCDERMOTT *et al.*, 1998). O pulmão também pode ser danificado pelo processo inflamatório, através da produção de ROS pelas células de defesa ativadas, como neutrófilos, monócitos e macrófagos. Esse fenômeno explicaria o aumento do colapso alveolar nos camundongos injetados com MCYST-LR, já que pneumócitos tipo II danificados não produzem surfactante em quantidades adequadas.

Modelos de lesão indireta ao pulmão, através da injeção i.p. de LPS, veneno de cobra e paraquat, por exemplo, são bastante conhecidos e largamente utilizados para estudos de lesão pulmonar aguda / Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (FAFFE *et al.*, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2004; ROCCO *et al.*, 2004). Esta é, portanto, uma via de relevância para o estudo dos efeitos indiretos da MCYST-LR no pulmão. A administração da MCYST-LR via i.p. poderia mimetizar o que ocorre após administração intravenosa da toxina, sendo os resultados observados, potencialmente, um reflexo do que ocorreria com o pulmão em contato com a toxina através da corrente sanguínea, como é o caso de exposição em pacientes em hemodiálise. Apesar dos tratamentos de água recomendados para uso em hemodiálise se mostrarem potencialmente eficientes para remoção dessa toxina, como a osmose reversa, se os mesmos não forem rigidamente empregados a eficiência desta remoção pode ficar comprometida. De fato, alguns relatos de pacientes renais crônicos que tiveram contato com MCYST, sendo um deles seguido de morte, são encontrados na literatura (JOCHIMSEN *et al.*, 1998; POURIA *et al.*, 1998; CARMICHAEL *et al.*, 2001; AZEVEDO *et al.*, 2002; SOARES *et al.*, 2006). Portanto, um paciente renal crônico, exposto a MCYST, poderia vir a sofrer também com efeitos pulmonares decorrentes desta toxina.

Podemos concluir que uma dose sub-letal de MCYST-LR injetada via i.p. é capaz de gerar uma resposta inflamatória aguda no pulmão de camundongos, acompanhada de alterações funcionais. A mecânica pulmonar *in vivo* demonstrou alterações proporcionadas às modificações histopatológicas, caracterizadas por influxo de células PMN no parênquima pulmonar, no BALF e no sangue.

CONCLUSÕES

VII – CONCLUSÕES

- A administração de uma dose sub-letal de MCYST-LR via i.p. foi capaz de gerar alterações funcionais no pulmão, caracterizadas pelo aumento das propriedades resistivas, elásticas e viscoelásticas e/ou inomogêneas pulmonares.
- O processo inflamatório se instalou rapidamente após a injeção com MCYST-LR, evidenciado pelo aumento do percentual de áreas colapsadas e influxo de células PMN no parênquima pulmonar.
- O processo inflamatório gerado pela toxina cursou com mobilização de neutrófilos para o sangue e BALF.
- Como não foi detectada a presença de MCYST-LR livre no tecido pulmonar pelo método de ELISA, acreditamos que esta toxina possa ter chegado aos pulmões em sua forma conjugada, ou na sua forma livre em quantidades inferiores àquelas detectáveis pelo ELISA.
- Os efeitos observados na função e histologia pulmonares sugerem um mecanismo indireto de ação da MCYST-LR no pulmão após injeção i.p.. No entanto, uma potencial ação direta da MCYST-LR conjugada, ou mesmo, de pequenas quantidades de sua forma livre, não pode ser descartada.

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology** 4:499-511, 2004.

AN, J.; CARMICHAEL, W.W. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. **Toxicon** 32(12):1495-507, 1994.

ASHWORTH, C.T.; MASON, M.F. Observations on the pathological changes produced by a toxic substance present in blue-green algae (*Microcystis aeruginosa*). **Am J Pathol**, 22(2):369-383, 1946.

AULER-JR, J.O.; ZIN, W.A.; CALDEIRA, M.P.; CARDOSO, W.V.; SALDIVA, P.H. Pre- and postoperative inspiratory mechanics in ischemic and valvular heart disease. **Chest** 92:984-990, 1987.

AZEVEDO, S.M.F.O. Toxinas de cianobactérias: causas e conseqüências para a saúde pública. **Medicina on line** 1(3), 1998.

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

BARFORD, D.; DAS, A.K.; EGLOFF, M.P. The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. **Annu Rev Biophys Biomol Struct** 27:133-64, 1998.

BARNAS, G.M.; YOSHINO, K.; LORING, S.H.; MEAD, J. Impedance and relative displacement of relaxed chest wall up to 4 Hz. **J Appl Physiol** 62:71-81, 1987.

BATES, J.H.T.; ROSSI, A.; MILIC-EMILI, J. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiration flow. **J Appl Physiol** 58:1840-1848, 1985a.

BATES, J.H.T.; DECRAMER, M.; CHARTRAND, D.; ZIN, W.A.; BÖDDENER, A.; MILIC-EMILI, J. Volume-time profile during relaxed expiration in the normal dog. **J Appl Physiol** 59:732-737, 1985b.

BATES, J.H.T.; BACONNIER, P.; MILIC-EMILI, J. A theoretical analysis of interrupter technique for measuring respiratory mechanics. **J Appl Physiol** 64(5):2204-2214, 1988a.

BATES, J.H.T.; LUDWIG, M.S.; SLY, P.D.; BROWN, K.; MARTIN, J.G.; FREDBERG, J.J. Interrupter resistance elucidated by alveolar pressure measurement in open-chest normal dogs. **J Appl Physiol** 65:408-414, 1988b.

BATES, J.H.T.; ABE, T.; ROMERO, P.V.; SOTO, J. Measurement of alveolar pressure in closed-chest dogs during flow interruption. **J Appl Physiol** 67:488-492, 1989.

BEASLEY, V.R.; COOK, W.O.; DAHLEM, A.M.; HOOSER, S.B.; LOVELL, R.A.; VALENTINE, W.M. Intoxication in livestock and water fowl. *Clinical Toxicology - Veterinary Clinics of North America*. **Food Animal Practice** 5:345-361, 1989.

BENSON, J.M.; HUTT, J.A.; REIN, K.; BOGGS, S.E.; BARR, E.B.; FLEMING, L.E. The toxicity of microcystin LR in mice following 7 days of inhalation exposure. **Toxicol** 45(6):691-698, 2005.

BILLINGS, W.H. Water-associated human illness in north-east Pennsylvania and its suspected association with blue-green algal bloom. In: **The water Environment: algal toxins and health**. Carmichael WW, Ed Plenum press, New York, 243, 1981.

BOTES, D.P.; TUIMAN, A.A.; WESSELS, P.L.; VILJOEN, C.C.; KRUGER, H.; WILLIAMS, D.H.; SANTIKARN, S.; SMITH, R.J.; HAMMOND, S.J. The structure of cyanoginosin-LA, a cyclic peptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **J Chem Soc Perkin Trans** 1:2311-2318, 1984.

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

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

BROOKS, W.P.; CODD, G.A. Distribution of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin and interactions with hepatic microsomes in mice. **Pharmacol Toxicol** 60(3):187-191, 1987.

BRUSASCO, V.; WARNER, D.O.; BECK, K.C.; RODARTE, J.R.; REHDER, K. Partitioning of pulmonary resistance in dogs: effect of tidal volume and frequency. **J Appl Physiol** 66:1190-1196, 1989.

BURY, N.R.; MCGEER, J.C.; EDDY, F.B.; CODD, G.A. Liver damage in brown trout, *Salmo trutta* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) following administration of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR via the dorsal aorta. **J Fish Dis** 20:209-215, 1997.

CARMICHAEL, W.W.; SCHWARTZ, L.D. Preventing livestock deaths from blue-green algae poisoning. **Farmers Bulletin 2275**, Washington, DC: US Dept. of Agriculture, 1984.

CARMICHAEL, W.W. The toxins of cyanobacteria. **Sci Am** 270:78-86, 1994.

CARMICHAEL, W.W. The cyanotoxins. **Adv Bot Res** 27:211-212, 1997.

CARMICHAEL, W.W.; AN, J. Using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and a protein phosphatase inhibition assay (PPIA) for the detection of microcystins and nodularins. **Nat Toxins** 7(6):377-385, 1999.

CARMICHAEL, W.W.; AZEVEDO, S.M.; AN, J.S.; MOLICA, R.J.; JOCHIMSEN, E.M.; LAU, S.; RINEHART, K.L.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environ Health Perspect** 109(7):663-668, 2001.

CHANG, H.K.; MORTOLA, J.P. Fluid dynamics factors in tracheal pressure measurement. **J Appl Physiol**, 51:218-225, 1981.

CHOI, B.W.; NAMIKOSHI, M.; SUN, F.; RINEHART, K.L.; CARMICHAEL, W.W.; KAUP, A.M.; EVANS, W.R.; BEASLEY, V.R. Isolation of linear peptides related to the hepatotoxins nodularin and microcystins. **Tetrahedron Lett** 34:7881-7884, 1993.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water** – A guide to their public health consequences, monitoring and management. London: E & FN Spon. 416 pp. 1999.

CHU, F.F.; ESWORTHY, R.S.; AKMAN, S.; DOROSHOW, J.H. Modulation of glutathione peroxidase expression by selenium: effect on human MCF-7 breast cancer cell transfectants expressing a cellular glutathione peroxidase cDNA and doxorubicin-resistant MCF-7 cells. **Nucleic Acids Res** 18(6):1531-9, 1990.

COSTA, S.M.; AZEVEDO, S.M.F.O. Implantação de um Banco de Culturas de Cianofíceas Tóxicas. **Iheringia - Série Botânica** 45, 5^o artigo, 1994.

D'ANGELO, E.; SANT'AMBROGIO, G.; AGOSTONI, E. Effect of diaphragm activity or paralysis on distribution of pleural pressure. **J Appl Physiol** 37:311-315, 1974.

D'ANGELO, E.; CALDERINI, E.; TORRI, G.; ROBATTO, F.M.; BONO, D.; MILIC-EMILI, J. Respiratory mechanics in anesthetized paralyzed humans: effects of flow, volume, and time. **J Appl Physiol** 67:2556-2564, 1989.

D'ANGELO, E.; PRANDI, E.; TAVOLA, M.; CALDERINI, E.; MILIC-EMILI, J. Chest wall interrupter resistance in anesthetized paralyzed humans. **J Appl Physiol** 77:883-887, 1994.

DAHLEM, A.M. **Structure/toxicity relationships and fate of low molecular weight peptide toxins from cyanobacteria**. Ph.D. Thesis, University of Illinois, 1989.

DIAS, C.M.; PASSARO, C.P.; CAGIDO, V.R.; EINICKER-LAMAS, M.; LOWE, J.; NEGRI, E.M.; CAPELOZZI, V.L.; ZIN, W.A.; ROCCO, P.R. Effects of undernutrition on respiratory mechanics and lung parenchyma remodeling. **J Appl Physiol** 97(5):1888-1896, 2004.

DING, W.X.; SHEN, H.M.; ZHU, H.G.; ONG, C.N. Studies on oxidative damage induced by cyanobacteria extract in primary cultured rat hepatocytes. **Environ Res** 78(1):12-18, 1998a.

DING, W.X.; SHEN, H.M.; SHEN, Y.; ZHU, H.G.; ONG, C.N. Microcystic cyanobacteria causes mitochondrial membrane potential alteration and reactive oxygen species formation in primary cultured rat hepatocytes. **Environ Health Perspect** 106(7):409-413, 1998b.

DING, W.X.; SHEN, H.M.; ONG, C.N. Critical role of reactive oxygen species formation in microcystin-induced cytoskeleton disruption in primary cultured hepatocytes. **J Toxicol Environ** 64(6):507-519, 2001.

DOMINGOS, P.; RUBIM, K.T.; MOLICA, R.J.R.; AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W. First report of microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from a northeast Brazilian drinking water supply. **Environ Toxicol** 14:31-35, 1999.

DON, H.F.; ROBSON, J.G. The mechanics of the respiratory system during anesthesia. **Anesthesiology** 26:68-178, 1965.

DORRINGTON, K.L. The theory of viscoelasticity in biomaterials. **Symp Soc Exp Biol** 34:289-314, 1980.

DYBING, E.; DOE, J.; GROTEN, J.; KLEINER, J.; O'BRIEN, J.; RENWICK, A.G.; SCHLATTER, J.; STEINBERG, P.; TRITSCHER, A.; WALKER, R.; YOUNES, M. Hazard characterisation of chemicals in food and diet. dose response, mechanisms and extrapolation issues. **Food Chem Toxicol** 40(2-3):237-282, 2002.

ERIKSSON, J.E.; GRÖNBERG, L.; NYGARD, S.; SLOTTE, J.P.; MERILUOTO, J.A.O. Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR a cyclic peptide toxin. **Biochim biophys Acta** 1025(1):60-66, 1990.

FAFFE, D.S.; SEIDL, V.R.; CHAGAS, P.S.; GONÇALVES DE MORAES, V.L.; CAPELOZZI, V.L.; ROCCO, P.R.; ZIN, W.A. Respiratory effects of lipopolysaccharide-induced inflammatory lung injury in mice. **Eur Respir J** 15(1):85-91, 2000.

FALCONER, I.R.; JACKSON, A.R.B.; LANGLEY, J.; RUNNEGAR M.T.C. Liver pathology in mice in poisoning by blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Aust J Biol Sci** 34:179-187, 1981.

FALCONER, I.R.; BUCKLEY, T.; RUNNEGAR, M.T. Biological half-life, organ distribution and excretion of 125-I-labelled toxic peptide from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Aust J Biol Sci** 39(1):17-21, 1986.

FALCONER, I.R.; SMITH, J.V.; JACKSON, A.R.B.; JONES, A.; RUNNEGAR M.T.C. Oral toxicity of a bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* administered to mice over periods up to 1 year. **J Toxicol Environ Health** 24:291-305, 1988.
FALCONER, I.R. Effects on human health of some cyanobacteria (blue-green algae) in reservoirs, lakes, and rivers. **Toxicity assessment** 4:175, 1989.

FAWELL, J.K.; MITCHELL, R.E.; EVERETT, D.J.; HILL, R.E. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I microcystin-LR. **Hum Exp Toxicol** 18(3):162-167, 1999.

FERNANDES, FC; FERREIRA, H.C.; CAGIDO, V.R.; CARVALHO, G.M.; PEREIRA, L.S.; FAFFE, D.S.; ZIN, W.A.; ROCCO, P.R. Effects of dexmedetomidine on respiratory mechanics and control of breathing in normal rats. **Respir Physiol Neurobiol** 154:342-350, 2006.

FERRÃO-FILHO, A.S.; SUZUKI, K.B.; AZEVEDO, S.M.F.O. Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community. **Aquat Toxicol** 59:201-208, 2002(b).

FITZGEORGE, R.B.; CLARK, S.A.; KELVIN, C.W. Routes of intoxication. In: Codd GA, Jeffries TM, Kelvin CW & Potter E (Editors), **Detection Methods for Cyanobacterial (Blue-Green Algae) Toxins**. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1994.

FRANCIS, G. Poisonous Australian lake. **Nature** 18, 11-12, 1878.

FUGIKI, H. Is the inhibition of protein phosphatase 1 and 2A activities a general mechanism of tumor promotion in human cancer development? **Mol Carcinog** 5(2):91-94, 1992.

GEHRINGER, M.M.; SHEPHARD, E.G.; DOWNING, T.G.; WIEGAND, C.; NEILAN, B.A. An investigation into the detoxification of microcystin-LR by the glutathione pathway in Balb/c mice. **Int J Biochem Cell Biol** 36(5):931-941, 2004.

GIBBS, B.F.; WIERECKY, J.; WELKER, P.; HENZ, B.M.; WOLFF, H.H.; GRABBE, J. Human skin mast cells rapidly release preformed and newly generated TNF-alpha and IL-8 following stimulation with anti-IgE and other secretagogues. **Exp Dermatol** 10(5):312-320, 2001.

GULLEDGE, B.M.; AGGEN, J.B.; HUANG, H.-B.; NAIRN, A.C.; CHAMBERLIN, A.R. The microcystins and nodularins: cyclic polypeptide inhibitors of PP1 and PP2A. **Curr Med Chem** 9:1991-2003, 2002.

GUNDERSEN, H.J.G.; BENDTSEN, T.F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MOLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J.R.; PAKKENBERG, B.; SORENSEN, F.B.; VESTERBY, A.; WEST, M.J. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand** 96:379-394, 1988.

GUPTA, N.; PANT, S.C.; VIJAYARAGHAVAN, R.;RAO, P.V. comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. **Toxicology** 188(2-3):285-296, 2003.

HANTOS, Z.; DAROCZY, B.; SUKI, B.; GALGOCZY, G.; CSENDES, T. Forced oscillatory impedance of the respiratory system at low frequencies. **J Appl Physiol** 60:123-132, 1986.

HANTOS, Z.; DAROCZY, B.; SUKI, B.; NAGY, S. Low frequency respiratory mechanical impedance in the rat. **J Appl Physiol** 63:36-43, 1987.

HARADA, K.-I.; MATSUURA, K.; SUZUKI, M.; WATANABE, M.F.; OISHI, S.; DAHLEM, A.M.; BEASLEY, V.R.; CARMICHAEL, W.W. Isolation and characterization of the minor components associated with microcystins LR and RR in the cyanobacterium (blue-green algae). **Toxicon** 28:55-64, 1990a.

HARADA, K.-I.; OGAWA K.; MATSUURA, K.; MURATA, H.; SUZUKI, M.; WATANABE, M.F.; ITEZONO, Y.; NAKAYAMA, N. Structural determination of geometrical isomers of microcystins LR and RR from cyanobacteria by two-dimensional NMR spectroscopic techniques. **Chem Res Toxicol** 3:473-481, 1990b.

HERNANDEZ, M.; MACIA, M.; PADILLA, C.; DEL CAMPO, F.F. Modulation of human polymorphonuclear leucocyte adherence by cyanopeptide toxins. **Environ Res** 84(1):64-68, 2000.

HILBORN, E.D.; CARMICHAEL, W.W.; YUAN, M.; AZEVEDO, S.M. A simple colorimetric method to detect biological evidence of human exposure to microcystins. **Toxicon** 46(2):218-221, 2005.

HILDEBRANDT, J. Pressure-volume data of cat lung interpreted by a plastoelastic, linear viscoelastic model. **J Appl Physiol** 28:365-372, 1970.

HITZFIELD BC, HOGER SJ, DIETRICH DR. Cyanobacterial toxins:Removal during Drinking water treatment, and human risk assessment. **Environ Health Perspect** 108:113–122, 2000.

HONKANEN, R.E.; GOLDEN, T. Regulators of serine/threonine protein phosphatases at the dawn of a clinical era? **Curr Med Chem** 9:2055-2075, 2002.

HOOSER, S.B.; BEASLEY, V.R.; LOVELL, R.A.; CARMICHAEL, W.W.; HASCHEK, W.M. Toxicity of microcystin LR, a cyclic heptapeptide hepatotoxin from *Microcystis aeruginosa*, to rats and mice. **Vet Pathol** 26(3):246-252, 1989.

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

HORIE, T.; HILDEBRANDT, J. Dynamic compliance, limit cycles, and static equilibrium of excised cat lung. **J Appl Physiol** 31:423-430, 1971.

HUMM, H.J.; WICKS, S.R. **Introduction and guide to the marine blue-green algae**. John Wiley & Sons, New York, 194p, 1980.

ITO, E.; KONDO, F.; HARADA, K. Hepatic necrosis in aged mice by oral administration of microcystin-LR. **Toxicol** 35(2):231-239, 1997.

ITO, E.; KONDO, F.; HARADA, K.-I. First report on the distribution of orally administered microcystin-LR in mouse tissue using an immunostaining method. **Toxicol** 38:37-48, 2000.

ITO, E.; KONDO, F.; HARADA, K. Intratracheal administration of microcystin-LR and its distribution. **Toxicol** 39:265-271, 2001.

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

KHAN, S.A.; GHOSH, S.; WICKSTROM, M.; MILLER, L.A.; HESS, R.; HASCHEK, W.M.; BEASLEY, V.R. Comparative pathology of microcystin-LR in cultured hepatocytes, fibroblasts, and renal epithelial cells. **Nat Toxins** 3(3):119-128, 1995.
KIDD, P.M. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. **Altern Med Rev** 2(3):155-176, 1997.

KOCHI, T.; OKUBO, S.; ZIN, W.A.; MILIC-EMILI, J. Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats. **J Appl Physiol**, 64:441-450, 1988a.

KOCHI, T.; OKUBO, S.; ZIN, W.A.; MILIC-EMILI, J. Chest wall and respiratory system mechanics in cats: effects on flow and volume. **J Appl Physiol.**, 64:2636-2646, 1988b.

KONDO, F.; IKAI, Y.; OKA, H.; OKAMURA, M.; ISHIKAWA, N.; HARADA, K.; MATSUURA, K.; MURATA, H.; SUZUKI, M. Formation, characterization, and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. **Chem Res Toxicol** 5(5):591-596, 1992.

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

LEAL, A.C.; SOARES, M.C.P. Hepatotoxicidade da cianotoxina microcistina. **Rev Soc Bras Med Trop** 37 (supl II): 84-89, 2004.

LIU, M.; WANG, L.; LI, E.; ENHORNING, G. Pulmonary surfactant given prophylactically alleviates an asthma attack in guinea-pigs. **Clin Exp Allergy** 26(3):270-275, 1996.

LORING, S.H.; ELLIOT, E.A.; DRAZEN, J.M. Kinetic energy loss and convective acceleration in respiratory resistance measurements. **Lung** 156:33-42, 1979.

LOVELL, R.A.; SCHAEFFER, D.J.; HOOSER, S.B.; HASCHEK, W.M.; DAHLEM, A.M.; CARMICHAEL, W.W.; BEASLEY, V.R. Toxicity of intraperitoneal doses of microcystin-LR in two strains of male mice. **J Environ Pathol Toxicol Oncol** 9(3):221-237, 1989.

LUSTER, A.D.; ALON, R.; VON ANDRIAN, U.H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nat Immunol** 6(12):1182-1190, 2005.

MAGALHÃES, V.F.; MARINHO, M.M.; DOMINGOS, P.; OLIVEIRA, A.C.; COSTA, S.M.; AZEVEDO, L.O.; AZEVEDO, S.M. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). **Toxicol** 42(3):289-295, 2003.

MALMEZAT, T.; BREUILLE, D.; CAPITAN, P.; MIRAND, P.P.; OBLED, C. Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. **J Nutr** 130(5):1239-1246, 2000.

MARTIN TR. Lung cytokines and ARDS. **Chest** 116 Suppl. 1: 2S-8S, 1999.

MCDERMOTT, C.M.; NHO, C.W.; HOWARD, W.; HOLTON, B. The cyanobacterial toxin, microcystin-LR can induce apoptosis in a variety of cell types. **Toxicon** 36(12):1981-1996, 1998.

MEAD, J.; WHITTENBERGER, J.L. Evaluation of airway interruption technique as a method for measuring pulmonary air-flow resistance. **J Appl Physiol** 6:408-416, 1954

MEAD, J. Contribution of compliance of airway to frequency-dependent behavior of lungs. **J Appl Physiol** 26:670-673, 1969.

MEAD, J.T. Mechanical Properties of Lungs. **Physiol. Rev** 41:281-330, 1961.

METCALF, J.S.; BEATTIE, K.A.; PFLUGMACHER S.; CODD, G.A. Imuno-crossreactivity and toxicity assessment of conjugation products of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. **FEMS Microbiol Lett** 189(2):155-158, 2000.

MILIC-EMILI, J. Ventilation. In: West, J.B. **Regional differences in the lung**. New York: N.Y. Academy, 1977; p. 167-199.

MINH, V.D.; FRIEDMAN, P.J.; KURIHARA, N.; MOSER, K.M. Ipsilateral transpulmonary pressures during unilateral electrophrenic respiration. **J Appl Physiol** 37:505-509, 1974.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 1469, de 29 de dezembro de 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004.

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

MORENO, I.M.; MATE, A.; REPETTO, G.; VAZQUEZ, C.M.; CAMEAN, A.M. Influence of microcystin-LR on the activity of membrane enzymes in rat intestinal mucosa. **J Physiol Biochem** 59(4):293-299, 2003.

MORTOLA, J.P.; NOWORAJ, J.A. Two-sidearm tracheal cannula for respiratory airflow measurements in small animals. **J Appl Physiol** 55:250-253, 1983.

MOUNT, L.E. The ventilation flow - resistance and compliance of rat lungs. **J Appl Physiol** 127:157-167, 1955.

NAKANO, Y.; SHIRAI, M.; MORI, N.; NAKANO, M. Neutralization of microcystin shock in mice by tumor necrosis factor alpha antiserum. **Appl Environ Microbiol** 57(1):327-330, 1991.

NASEEM, S.M.; HINES, H.B.; CREASIA, D.A. Effect of toxins on arachidonic acid metabolism in rat cultured pulmonary alveolar macrophages. **Biochem Inter** 19:583-592, 1989.

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

NISHIWAKI, R.; OHTA, T.; SUEOKA, E.; SUGANUMA, M.; HARADA, K.; WATANABE, M.F.; FUGIKI, H. Two significant aspects of microcystin-LR: specific binding and liver specificity. **Cancer Lett** 15;83(1-2):283-289, 1994.

NOBRE, A.C.L.; COELHO, G.R.; COUTINHO, M.C.M.; SILVA, M.M.M.; ANGELIM, E.V.; MENEZES, D.B.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S.A. The role of phospholipase A₂ and cyclooxygenase in renal toxicity induced by microcystin-LR. **Toxicol** 39:721-724, 2001.

NOBRE, A.C.; MARTINS, A.M.; HAYT, A.; BENEVIDES, C.; LIMA, A.A.; FONTENELES, M.C.; MONTEIRO, H.S. Renal effects of supernatant from rat peritoneal macrophages activated by microcystin-LR: role protein mediators. **Toxicol** 41(3):377-31, 2003.

OTIS, A.B.; MCKERROW, C.B.; BARTLETT, R.A.; MEAD, J.; MCILROY, M.B.; SELVERSTONE, N.J.; RODFORD, E.P. Mechanical factors in distribution of pulmonary ventilation. **J Appl Physiol** 8:427-443, 1956.

PEACHELL, P.T.; PEIRCE, M.J.; MUNDAY, M.R. characterization of calcineurin in human lung mast cells. **FASEB J** 12:A869, 1998.

PEIRCE, M.J.; MUNDAY, M.R.; PEACHELL, P.T. Characterization of protein serine/threonine phosphatase activities in human lung mast cells and basophils. **British J Pharmacol** 125:1095-1101, 1998.

PENIDO, C.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; LARANGEIRA, A.P.; ROSAS, E.C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; BOZZA, P.T.; HENRIQUES, M.G. The role of gamma delta T lymphocytes in lipopolysaccharide-induced eosinophil accumulation into the mouse pleural cavity. **J Immunol** 15;159(2):853-860, 1997.

PESLIN, R.; PAPON, J.; DUVIVER, C.; RICHALET, J. Frequency response of the chest: modeling and parameter estimation. **J Appl Physiol** 39:523-534, 1975.

PICANÇO, M.R.; SOARES, R.M.; CAGIDO, V.R.; AZEVEDO, S.M.F.O.; ROCCO, P.R.M.; ZIN, W.A. Toxicity of a cyanobacterial extract containing microcystins to mouse lungs. **Braz J Med Biol Res** 37(8):1225-1229, 2004.

PILLOTO, L.S.; DOUGLAS, R.M.; BURCH, M.D.; CAMERON, S.; BEERS, M.; ROUCH, G.J.; ROBINSON, P.; KIRK, M.; COWIE, C.T.; HARDIMAN, S.; MOORE, C.; ATTEWELL, R.G. Health effects of exposure to cyanobacteria (blue-green algae) during recreational water-related activities. **Aust N Z J Public Health** 21(6):562-566, 1997.

POURIA, S.; DE ANDRADE, A.; BARBOSA, J.; CAVALCANTI, R.L.; BARRETO, V.T.; WARC, C.J.; PREISER, W.; POON, G.K.; NEILD, G.H.; CODD, G.A. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **Lancet** 352(9121):21-26, 1998.

RESSOM, R.; SAN SOONG, F.; FITZGERALD, J.; TURCZYNOWICZ, L.; EL SAADI, O.; RODER, D.; MAYNARD, T.; FALCONER, I.L. **Health effects of toxic cyanobacteria (blue-green algae)**. National Health and Medical Research Council, Australia, 1994.

RINEHART, K.L.; NAMIKOSHI, M.; CHOI, B.W. Structure and biosynthesis of toxins from bluegreen algae (cyanobacteria). **J Appl Phycol** 6:159-176, 1994.

ROBINSON, N.A.; MIURA, G.A.; MATSON, C.F.; DINTERMAN, R.E.; PACE, J.G. Characterization of chemically tritiated microcystin-LR and its distribution in mice. **Toxicon** 27(9):1035-1042, 1989.

ROBINSON, N.A.; PACE, J.G.; MATSON, C.F.; MIURA, G.A.; LAWRENCE, W.B. Tissue distribution, excretion and hepatic biotransformation of microcystin-LR in mice. **J Pharmacol Exp Ther** 256(1):176-182, 1991a.

ROCCO, P.R.; FACCHINETTI, L.D.; FERREIRA, H.C.; NEGRI, E.M.; CAPELOZZI, V.L.; FAFFE, D.S.; ZIN, W.A. Time course of respiratory mechanics and pulmonary structural remodelling in acute lung injury. **Respir Physiol Neurobiol** 12;143(1):49-61, 2004.

RODARTE, J.R.; REHDER, K. In: MACKLEM, P.T; MEAD, J. (Eds). **Handbook of Physiology**. The respiratory system. Mechanics of breathing. The American Physiological Society, Bethesda 3:131-144, 1986.

RODRIGUES, A.C.M.; MOREIRA, L.F.P.; SOUZA, C.L.; PETTERSEN, P.C.D.; SALDIVA, P.H.N.; ZIN, W.A. Effects of thoracotomy on respiratory system, lung, and chest wall mechanics. **Chest** 104:1882-1886, 1993.

ROT, A.; VON ANDRIAN, U.H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. **Annu Rev Immunol** 22:891-928, 2004.

RUNNEGAR, M.T.; FALCONER, I.R.; BUCKLEY, T.; JACKSON, A.R. Lethal potency and tissue distribution of ¹²⁵I-labelled toxic peptides from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon** 24(5):506-509, 1986.

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

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

RUNNEGAR, M.T.; KONG, S.; BERNDT, N. Protein phosphatase inhibition and in vivo hepatotoxicity of microcystins. **Am J Physiol** 265:G224-230, 1993.

SALDIVA, P.H.; CARDOSO, W.V.; CALDEIRA, M.P.; ZIN, W.A. Mechanics in rats by end-inflation occlusion and single-breath methods. **J Appl Physiol** 63:1711-1718, 1987.

SALDIVA, P.H.; ZIN, W.A.; SANTOS, R.L.; EIDELMAN, D.H.; MILIC-EMILI, J. Alveolar pressure measurement in open-chest rats. **J Appl Physiol** 72:302-306, 1992.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P. Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. **Nova Hedwigia** 71:359-385, 2000.

SHENOLIKAR, S.; INGEBRITSEN, T.S. Protein (serine and threonine) phosphate phosphatases. **Methods Enzymol** 107:102-129, 1984.

SILVEIRA, K.S.; BOECHEM, N.T.; DO NASCIMENTO, S.M.; MURAMAKI, Y.L.; BARBOZA, A.P.; MELO, P.A.; CASTRO, P.; DE MORAES, V.L.; ROCCO, P.R.; ZIN, W.A. Pulmonary mechanics and lung histology in acute lung injury induced by Bothrops jararaca venom. **Respir Physiol Neurobiol** 15;139(2):167-177, 2004.

SIMILOWSKI, T.; LEVY, P.; CORBEIL, C.; ALBALA, M.; PARIENTE, R.; DERENNE, J.P. Viscoelastic behavior of lung and chest wall in dogs determined by flow interruption. **J Appl Physiol** 67:2219-2229, 1989.

SLATKIN, D.N.; STONER, R.D.; ADAMS, W.H.; KYCIA, J.H.; SIEGELMAN, H.W. Atypical pulmonary thrombosis caused by a toxic cyanobacterial peptide. **Science** 220:1383-1385, 1983.

SIMILOWSKI, T.; BATES, J.H. Two-compartment modelling of respiratory system mechanics at low frequencies: gas redistribution or tissue rheology? **Eur Respir J** 4(3):353-358, 1991.

SOARES, R.M.; MAGALHÃES, V.F.; AZEVEDO, S.M. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. **Aquat Toxicol** 70(1):1-10, 2004.

SOARES, R.M.; YUAN, M.; SERVAITES, J.C.; DELGADO, A.; MAGALHAES, V.F.; HILBORN, E.D.; CARMICHAEL, W.W.; AZEVEDO, S.M. Sublethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro, Brazil. **Environ Toxicol** 21(2):95-103, 2006.

STOTTS, R.R.; NAMIKOSHI, M.; HASCHEK, W.M.; RINEHART, K.L.; CARMICHAEL, W.W.; DAHLEM, A.M.; BEASLEY, V.R. Structural modifications imparting reduced toxicity in microcystins from *Microcystis* Spp. **Toxicon** 31:783-789, 1993.

STOTTS, R.R.; TWARDOCK, A.R.; KORITZ, G.D.; HASCHEK, W.M.; MANUEL, R.K.; HOLLIS, W.B.; BEASLEY, V.R. Toxicokinetics of tritiated dihydromicrocystin-LR in swine. **Toxicon** 35(3):455-465, 1997a.

STOTTS, R.R.; TWARDOCK, A.R.; HASCHEK, W.M.; CHOI, B.W.; RINEHART, K.L.; BEASLEY, V.R. Distribution of tritiated dihydromicrocystin in swine. **Toxicon** 35(6):937-953, 1997b.

TEIXEIRA, M.da.G.; COSTA M.daC.; CARVALHO, V.L.P.; PEREIRA, M.S.; HAGE, E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica dam, Bahia, Brazil. **Bulletin of the Pan American Health Organization** 27:244-253, 1993.

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

TURNER, P.C.; GAMMIE, A.J.; HOLLINRAKE, K.; CODD, G.A. Pneumonia associated with cyanobacteria. **Br Med J** 300:1400-1414, 1990.

WAGNER, J.G.; ROTH, R.A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacol Rev** 52(3):349-374, 2000.

WATANABE, M.F.; HARADA, K.-I.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H. **Toxic Microcystis**. CRC Press, Inc., 261p, 1996.

WICKSTROM, M.L.; KHAN, S.A.; HASCHEK, W.M.; WYMAN, J.F.; ERIKSSON, J.E.; SCHAEFFER, D.J.; BEASLEY, V.R. Alterations in microtubules, intermediate filaments, and microfilaments induced by microcystin-LR in cultured cells. **Toxicol Pathol** 23(3):326-337, 1995.

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

WIEGAND, C.; PEUTHERT, A.; PFLUGMACHER, S.; CARMELI, S. Effects of microcin SF608 and microcystin-LR, two cyanobacterial compounds produced by *Microcystis* sp., on aquatic organisms. **Environ Toxicol** 17(4):400-6, 2002.

YOO, R.S.; CARMICHAEL, W.W.; HOEHN, R.C.; HRUDEY, S.E. **Cyanobacterial (blue-green algae) toxins: a resource guide**. AWWA Research Foundation and American Water Works Association, 229 pp, 1995.

YOSHIDA, T.; MAKITA, Y.; NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; YOSHIDA, F.; SEKIJIMA, M.; TAMURA, S.; UENO, Y. Acute oral toxicity of microcystin-LR, a cyanobacterial hepatotoxin, in mice. **Nat Toxins** 5(3):91-95, 1997.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol Ver** 74:139-62, 1994.

ZIN, W.A.; MARTINS, M.A.; SILVA, P.R.; SAKAE, R.S.; CARVALHO, A.L.; SALDIVA, P.H. Effects of abdominal opening on respiratory system mechanics in ventilated rats. **J Appl Physiol** 66:2496-2501, 1989.

ANEXOS

ANEXO I: Parâmetros da mecânica pulmonar em cada animal dos grupos CTRL e CIANO nos diferentes tempos.

CTRL

	Fluxo	Volume	Est	Edyn	ΔE	ΔP1	ΔP2	ΔPtot
CTRL1	0,99	0,18	19,74	24,31	4,57	0,12	0,84	0,96
CTRL2	1,01	0,21	21,62	25,28	3,65	0,11	0,77	0,88
CTRL3	1,01	0,20	21,58	25,93	4,35	0,11	0,86	0,97
CTRL4	1,00	0,20	21,83	25,95	4,11	0,11	0,81	0,93
CTRL5	1,00	0,20	22,26	26,34	4,08	0,10	0,80	0,91
CTRL6	1,01	0,20	19,33	23,62	4,29	0,12	0,86	0,98
Média	1,00	0,20	21,06	25,24	4,18	0,11	0,82	0,94
DP	0,01	0,01	1,11	0,97	0,28	0,01	0,03	0,04
EPM	0,00	0,00	0,45	0,40	0,12	0,00	0,01	0,01
n	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
DP/Média	0,01	0,04	0,05	0,04	0,07	0,05	0,04	0,04

CIANO 2h

	Fluxo	Volume	Est	Edyn	ΔE	ΔP1	ΔP2	ΔPtot
CIANO 2h 1	1,00	0,19	27,60	32,49	4,89	0,17	0,92	1,09
CIANO 2h 2	1,01	0,21	28,08	32,43	4,35	0,16	0,90	1,05
CIANO 2h 3	1,01	0,21	34,12	39,48	5,36	0,18	1,10	1,29
CIANO 2h 4	1,00	0,19	25,82	30,60	4,78	0,18	0,90	1,08
CIANO 2h 5	1,01	0,20	29,97	34,96	4,98	0,18	1,00	1,18
CIANO 2h 6	1,00	0,19	32,47	39,19	6,72	0,18	1,30	1,48
Média	1,00	0,20	29,68	34,86	5,18	0,18	1,02	1,19
DP	0,01	0,01	2,87	3,41	0,75	0,01	0,14	0,15
EPM	0,00	0,00	1,17	1,39	0,31	0,00	0,06	0,06
n	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
DP/Média	0,01	0,04	0,10	0,10	0,14	0,05	0,14	0,13

CIANO 8h

	Fluxo	Volume	Est	Edyn	ΔE	ΔP1	ΔP2	ΔPtot
CIANO 8h 1	1,00	0,19	34,22	39,17	4,95	0,18	0,93	1,12
CIANO 8h 2	1,01	0,19	34,92	39,71	4,79	0,19	0,91	1,10
CIANO 8h 3	1,01	0,19	30,45	36,05	5,60	0,18	1,04	1,22
CIANO 8h 4	1,00	0,19	34,22	39,14	4,93	0,15	0,93	1,08
CIANO 8h 5	0,99	0,20	31,05	35,75	4,70	0,13	0,93	1,07
CIANO 8h 6	0,98	0,19	35,53	40,79	5,26	0,13	0,99	1,12
Média	1,00	0,19	33,40	38,43	5,04	0,16	0,96	1,12
DP	0,01	0,00	1,93	1,88	0,30	0,03	0,05	0,05
EPM	0,00	0,00	0,79	0,77	0,12	0,01	0,02	0,02
n	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
DP/Média	0,01	0,02	0,06	0,05	0,06	0,16	0,05	0,04

CIANO 24h

	Fluxo	Volume	Est	Edyn	ΔE	ΔP1	ΔP2	ΔPtot
CIANO 24h 1	1,02	0,19	32,61	37,43	4,82	0,17	0,93	1,10
CIANO 24h 2	1,01	0,20	32,01	37,08	5,07	0,18	1,00	1,18
CIANO 24h 3	1,01	0,20	32,79	38,07	5,28	0,18	1,04	1,22
CIANO 24h 4	1,00	0,20	29,88	35,69	5,81	0,19	1,17	1,36
CIANO 24h 5	1,00	0,20	29,44	34,41	4,97	0,18	0,98	1,15
CIANO 24h 6	1,01	0,20	32,20	37,08	4,88	0,14	0,98	1,11
Média	1,01	0,20	31,49	36,62	5,14	0,17	1,02	1,19
DP	0,01	0,00	1,32	1,22	0,33	0,02	0,08	0,09
EPM	0,00	0,00	0,54	0,50	0,14	0,01	0,03	0,04
n	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
DP/Média	0,01	0,01	0,04	0,03	0,07	0,10	0,07	0,07

CIANO 48h

	Fluxo	Volume	Est	Edyn	ΔE	ΔP1	ΔP2	ΔPtot
CIANO 48h 1	1,06	0,21	31,51	36,10	4,59	0,16	0,95	1,11
CIANO 48h 2	1,01	0,20	42,97	49,76	6,79	0,21	1,35	1,56
CIANO 48h 3	1,02	0,20	31,37	37,02	5,65	0,27	1,15	1,42
CIANO 48h 4	1,00	0,21	26,14	30,52	4,38	0,14	0,91	1,05
CIANO 48h 5	1,00	0,21	34,26	39,27	5,01	0,17	1,03	1,20
CIANO 48h 6	1,00	0,19	26,19	32,74	6,56	0,15	1,25	1,40
Média	1,01	0,20	32,07	37,57	5,50	0,19	1,11	1,29
DP	0,02	0,01	5,69	6,15	0,92	0,04	0,16	0,18
EPM	0,01	0,00	2,32	2,51	0,38	0,02	0,06	0,07
n	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
DP/Média	0,02	0,03	0,18	0,16	0,17	0,24	0,14	0,14

CIANO 96h

	Fluxo	Volume	Est	Edyn	ΔE	ΔP1	ΔP2	ΔPtot
CIANO 96h 1	1,01	0,22	33,85	38,89	5,04	0,22	1,09	1,31
CIANO 96h 2	1,00	0,20	29,10	33,66	4,56	0,15	0,90	1,06
CIANO 96h 3	1,00	0,20	28,19	32,59	4,40	0,16	0,89	1,05
CIANO 96h 4	1,00	0,18	26,77	34,02	7,25	0,19	1,32	1,51
CIANO 96h 5	1,00	0,20	25,86	31,41	5,55	0,18	1,11	1,30
CIANO 96h 6	0,99	0,20	24,10	31,14	7,04	0,15	1,38	1,53
Média	1,00	0,20	27,98	33,62	5,64	0,18	1,12	1,29
DP	0,01	0,01	3,08	2,58	1,13	0,02	0,18	0,19
EPM	0,00	0,00	1,26	1,05	0,46	0,01	0,08	0,08
n	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
DP/Média	0,01	0,05	0,11	0,08	0,20	0,14	0,17	0,15

ANEXO II: Percentual de áreas normais, hiperinsufladas e colapsadas em cada animal dos grupos CTRL e CIANO nos diferentes tempos.

CTRL

	%NORM.	%HIPER.	%COLAP.
CTRL1	91,63	0,00	8,37
CTRL2	94,95	0,00	5,05
CTRL3	95,42	0,00	4,58
CTRL4	95,69	0,00	4,31
CTRL5	98,14	0,00	1,86
CTRL6	92,52	0,00	7,48
Média	94,73	0,00	5,27
DP	2,14	0,00	2,14
EPM	0,87	0,00	0,87
n	6	6	6
DP/Média	2,26%	0,00%	40,62%

CIANO 2h

	%NORM.	%HIPER.	%COLAP.
CIANO 2h 1	80,11	0,00	19,89
CIANO 2h 2	78,81	0,00	21,19
CIANO 2h 3	70,98	0,40	28,62
CIANO 2h 4	81,47	0,00	18,53
CIANO 2h 5	70,60	0,00	29,40
CIANO 2h 6	75,73	0,50	23,77
Média	76,28	0,15	23,57
DP	4,26	0,21	4,17
EPM	1,74	0,09	1,70
n	6	6	6
DP/Média	5,58%	142,72%	17,69%

CIANO 8h

	%NORM.	%HIPER.	%COLAP.
CIANO 8h 1	66,00	2,46	31,54
CIANO 8h 2	74,01	0,00	25,99
CIANO 8h 3	73,77	0,00	26,23
CIANO 8h 4	65,15	1,00	33,85
CIANO 8h 5	72,50	0,00	27,50
CIANO 8h 6	70,52	0,41	29,07
Média	70,32	0,65	29,03
DP	3,55	0,89	2,86
EPM	1,45	0,36	1,17
n	6	6	6
DP/Média	5,05%	137,66%	9,84%

CIANO 24h

	%NORM.	%HIPER.	%COLAP.
CIANO 24h 1	65,99	0,00	34,01
CIANO 24h 2	71,10	0,00	28,90
CIANO 24h 3	81,72	0,00	18,28
CIANO 24h 4	82,75	0,00	17,25
CIANO 24h 5	74,75	0,00	25,25
CIANO 24h 6	76,71	0,00	23,29
Média	75,50	0,00	24,50
DP	5,82	0,00	5,82
EPM	2,38	0,00	2,38
n	6	6	6
DP/Média	7,71%	0,00%	23,75%

CIANO 48h

	%NORM.	%HIPER.	%COLAP.
CIANO 48h 1	84,72	0,48	14,80
CIANO 48h 2	72,70	0,00	27,30
CIANO 48h 3	81,52	1,12	17,36
CIANO 48h 4	78,96	0,00	21,04
CIANO 48h 5	80,88	1,05	18,08
CIANO 48h 6	71,47	0,00	28,53
Média	78,38	0,44	21,18
DP	4,77	0,49	5,11
EPM	1,95	0,20	2,08
n	6	6	6
DP/Média	6,09%	110,17%	24,11%

CIANO 96h

	%NORM.	%HIPER.	%COLAP.
CIANO 96h 1	81,67	0,00	18,33
CIANO 96h2	77,66	0,00	22,34
CIANO 96h 3	84,79	0,00	15,21
CIANO 96h 4	81,53	0,00	18,47
CIANO 96h 5	77,39	0,00	22,61
CIANO 96h 6	85,93	0,00	14,07
Média	81,49	0,00	18,51
DP	3,22	0,00	3,22
EPM	1,31	0,00	1,31
n	6	6	6
DP/Média	3,95%	0,00%	17,39%

ANEXO III: Celularidade total e diferencial em cada animal dos grupos CTRL e CIANO nos diferentes tempos.

CTRL

	PMN	MN	TECIDO	%PMN	%MN	TOTAL%
CTRL1	4,29	9,00	28,14	10,51	21,62	32,13
CTRL2	6,17	8,33	27,50	15,08	19,90	34,97
CTRL3	5,83	8,00	30,00	13,34	18,23	31,57
CTRL4	4,13	10,00	33,88	8,61	20,86	29,47
CTRL5	2,78	8,11	25,78	7,48	22,10	29,58
CTRL6	1,80	5,60	28,90	4,82	15,31	20,13
Média	4,16	8,17	29,03	9,97	19,67	29,64
DP	1,55	1,34	2,52	3,47	2,32	4,63
EPM	0,63	0,55	1,03	1,42	0,95	1,89
n	6	6	6	6	6	6
DP/Média	37,10%	16,34%	8,68%	34,80%	11,78%	15,63%

CIANO 2h

	PMN	MN	TECIDO	%PMN	%MN	TOTAL%
CIANO 2h 1	23,25	7,63	29,25	38,65	12,78	51,43
CIANO 2h 2	18,50	4,00	32,88	33,51	7,17	40,68
CIANO 2h 3	16,88	4,00	34,75	30,43	7,26	37,69
CIANO 2h 4	11,60	3,40	29,20	26,10	7,62	33,72
CIANO 2h 5	11,10	5,20	33,10	22,52	10,45	32,97
CIANO 2h 6	11,70	5,00	35,80	22,11	9,57	31,67
Média	15,50	4,87	32,50	28,89	9,14	38,03
DP	4,47	1,38	2,51	5,96	2,04	6,72
EPM	1,83	0,56	1,03	2,43	0,83	2,74
n	6	6	6	6	6	6
DP/Média	28,84%	28,29%	7,73%	20,64%	22,29%	17,68%

CIANO 8h

	PMN	MN	TECIDO	%PMN	%MN	TOTAL%
CIANO 8h 1	15,56	8,67	31,89	27,65	15,50	43,16
CIANO 8h 2	14,86	5,29	28,29	30,94	10,87	41,82
CIANO 8h 3	15,83	3,50	32,67	30,56	6,77	37,34
CIANO 8h 4	17,60	7,60	30,60	31,74	13,69	45,43
CIANO 8h 5	15,67	5,11	33,44	28,91	9,46	38,37
CIANO 8h 6	13,11	4,11	36,22	24,40	7,60	32,00
Média	15,44	5,71	32,18	29,04	10,65	39,69
DP	1,33	1,84	2,45	2,47	3,13	4,39
EPM	0,54	0,75	1,00	1,01	1,28	1,79
n	6	6	6	6	6	6
DP/Média	8,63%	32,19%	7,60%	8,51%	29,34%	11,07%

CIANO 24h

	PMN	MN	TECIDO	%PMN	%MN	TOTAL%
CIANO 24h 1	17,43	5,57	28,29	34,06	10,84	44,90
CIANO 24h 2	12,88	4,50	37,88	23,30	8,11	31,41
CIANO 24h 3	13,44	8,11	38,89	22,30	13,54	35,84
CIANO 24h 4	20,83	4,67	32,83	35,47	8,01	43,48
CIANO 24h 5	11,13	7,63	35,75	20,24	14,07	34,30
CIANO 24h 6	6,50	8,13	26,88	15,79	19,55	35,34
Média	13,70	6,43	33,42	25,19	12,35	37,55
DP	4,55	1,57	4,56	7,18	3,98	4,92
EPM	1,86	0,64	1,86	2,93	1,63	2,01
n	6	6	6	6	6	6
DP/Média	33,18%	24,33%	13,64%	28,49%	32,26%	13,11%

CIANO 48h

	PMN	MN	TECIDO	%PMN	%MN	TOTAL%
CIANO 48h 1	14,89	10,22	35,33	24,76	16,95	41,71
CIANO 48h 2	14,63	6,13	31,75	27,98	11,64	39,62
CIANO 48h 3	13,88	6,38	35,25	25,36	11,57	36,93
CIANO 48h 4	14,67	7,33	32,22	27,14	13,49	40,63
CIANO 48h 5	13,38	6,63	32,63	25,33	12,57	37,89
CIANO 48h 6	13,89	7,44	36,11	24,12	13,07	37,19
Média	14,22	7,35	33,88	25,78	13,21	38,99
DP	0,54	1,37	1,72	1,35	1,81	1,79
EPM	0,22	0,56	0,70	0,55	0,74	0,73
n	6	6	6	6	6	6
DP/Média	3,80%	18,61%	5,09%	5,22%	13,70%	4,58%

CIANO 96h

	PMN	MN	TECIDO	%PMN	%MN	TOTAL%
CIANO 96h 1	8,86	6,00	34,71	17,93	12,03	29,97
CIANO 96h 2	9,00	3,83	39,17	17,44	7,36	24,80
CIANO 96h 3	13,75	7,50	37,25	23,69	12,90	36,59
CIANO 96h 4	14,00	7,00	36,83	24,29	12,00	36,29
CIANO 96h 5	16,33	9,00	37,67	26,35	14,12	40,47
CIANO 96h 6	12,67	5,50	37,17	22,87	9,97	32,84
Média	12,43	6,47	37,13	22,09	11,40	33,49
DP	2,71	1,63	1,32	3,29	2,19	5,08
EPM	1,11	0,66	0,54	1,34	0,89	2,07
n	6	6	6	6	6	6
DP/Média	21,79%	25,12%	3,54%	14,91%	19,22%	15,15%

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)