



**VINÍCIUS ROSA DE OLIVEIRA**

**EVOLUÇÃO TEMPORAL DA FUNÇÃO PULMONAR DE  
CAMUNDONGOS EXPOSTOS À CILINDROSPERMOPSINA**

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).

Orientadora: Débora Souza Faffe



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
Julho, 2010

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

# **EVOLUÇÃO TEMPORAL DA FUNÇÃO PULMONAR DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS À CILINDROSPERMOPSINA**

**VINÍCIUS ROSA DE OLIVEIRA**

ORIENTADORA: DÉBORA SOUZA FAFFE

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

APROVADA POR:

---

Prof. Emiliano Horacio Medei  
Prof. Adjunto UFRJ

---

Prof. Valéria Freitas de Magalhães  
Prof. Adjunta UFRJ

---

Prof. Vania Maria Correa da Costa  
Prof. Adjunta UFRJ

---

Prof. Tania Maria Ortiga Carvalho  
Prof. Adjunta UFRJ  
Suplente interna

---

Prof. Raquel Moraes Soares  
Prof. Adjunta UFRJ – Pólo Xerém  
Revisora / Suplente externa

Rio de Janeiro  
Julho de 2010

Oliveira, Vinícius Rosa de

Evolução temporal da função pulmonar de camundongos expostos à cilindropermopsina / Vinícius Rosa de Oliveira

Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2010.

Orientadora: Débora Souza Faffe

Dissertação (mestrado) – UFRJ/Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), 2010.

Referências bibliográficas: p. 85–95.

1. Cianobactérias. 2. Cilindropermopsina. 3. Inflamação 4. Mecânica respiratória. 5. Fisiologia. 6. Estresse oxidativo.

I. Faffe, Débora Souza. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF, Programa de Pós-graduação Ciências Biológicas (Fisiologia). III. Evolução temporal da função pulmonar de camundongos expostos à cilindropermopsina.

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 pais**

## AGRADECIMENTOS

Apesar de uma dissertação ser um processo solitário a que qualquer pesquisador está destinado, reúne contribuições de várias pessoas e a elas registro minha gratidão.

À Professora Débora Souza Faffe, minha orientadora desde os tempos da iniciação científica, agradeço pelos ensinamentos, conselhos e sugestões, fundamentais não somente para a realização deste trabalho, mas para minha formação de modo geral.

Ao Professor Walter Araújo Zin, referência para nós alunos, pelo importante trabalho que realiza como pesquisador, professor e orientador. A ele dedico meu respeito e admiração.

Parte deste trabalho foi realizada no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, por isso, meus agradecimentos às Professoras Raquel Soares e Sandra Azevedo, pela imensa ajuda e paciência ao responder minhas dúvidas, e à aluna de mestrado Luana Mattos, pelo fundamental auxílio em alguns experimentos.

Também agradeço muito ao Professor Samuel Valença, por todo o auxílio e imensa paciência ao responder meus questionamentos, além de ceder espaço no Laboratório de Reparo Tecidual, no Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Agradeço também a alguns de seus alunos que colaboraram para a concretização deste trabalho, os quais devo citar Thiago Ferreira e Alan Lopes.

Devo especial agradecimento às minhas companheiras do laboratório, que participaram integralmente deste trabalho, Giovanna Carvalho, pelo grande carinho, dedicação e prestatividade, e Mariana Avila, pelo imenso brilho, alegria e sucesso que sempre contagia todos ao seu redor. Meninas, vocês são pessoas admiráveis, de excelente caráter. Sem vocês ao meu lado, este trabalho não seria concluído. Muito obrigado por tudo!

Agradeço também ao auxílio técnico do Sr. Antônio Carlos Quaresma e do amigo João Luiz Alves.

Aos queridos colegas do Laboratório de Fisiologia da Respiração, pela preocupação, compreensão, paciência, carinho e, também, pelos momentos de

descontração. Com certeza, nesses quatro anos de convivência no laboratório, foram criados laços de amizade que perdurarão para o resto da vida.

Às alunas de doutorado, Viviane Cagido e Flavia Mazzoli, por passarem suas experiências do laboratório. Agradeço também ao amigo Douglas Riva, pela amizade e companheirismo fora do laboratório; e não poderia deixar de agradecer à Clarissa Magalhães, sempre fazendo o sucesso acontecer nas festas e viagens, além de dar bons conselhos nos momentos de seriedade.

Às pequenas mestrandas do laboratório, Natália Vasconcelos e Mariana Machado. Pequenas no tamanho, porém gigantes na competência. Que vocês cresçam sem limites neste rumo que a vida tomou.

Existem outras pessoas que não fazem parte do laboratório, mas participaram da minha vida de mestrando. Alguns amigos que fiz durante a graduação, mesmo não sabendo ao certo como era o meu trabalho, sempre se preocuparam e torceram por mim. Meus agradecimentos em especial à Alessandra do Valle, Fernanda Mello e Andrei Lima. Também agradeço aos amigos que dividiram casa comigo nos períodos de graduação e mestrado, são eles: Douglas Fonseca, João Vítor Ayres, Antônio Salvador, Joaquim Leles, Manuel Neto e Jader Melo.

E, acima de tudo, agradeço o apoio de toda minha família, que mesmo à distância, sempre me apoiou na busca de independência e crescimento profissional. Apesar de passar longe de casa alguns finais de semana, feriados e férias trabalhando no laboratório, sei que valeu a pena tanto sacrifício. Em especial, agradeço ao meu pai por toda confiança e à minha mãe, pelo amor incondicional. Também deixo expresso meu afeto à minha avó Dulce, tia Judith, meus padrinhos César William e Valéria Borges, e ao meu irmão Rudson Rosa.

Finalmente, agradeço à Deus pelas bênçãos derramadas em minha vida.



## RESUMO

### EVOLUÇÃO TEMPORAL DA FUNÇÃO PULMONAR DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS À CILINDROSPERMOPSINA

*Vinícius Rosa de Oliveira*

Orientadora: Débora Souza Faffe

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), do 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 em Ciências.

**Introdução:** Cilindropermopsina (CYN), toxina de ação citotóxica, é produzida por cianobactérias que crescentemente desenvolvem florações nos reservatórios de água brasileiros. O objetivo deste estudo foi verificar temporalmente alterações pulmonares induzidas por cilindropermopsina.

**Métodos:** Camundongos BALB/c receberam injeção intratraqueal de salina (50  $\mu$ L, grupo SAL, n=12) ou dose subletal (70  $\mu$ g/kg) de extrato semi-purificado de CYN (grupos CYN, n=52). A mecânica pulmonar [elastância estática (Est), componente viscoelástico da elastância ( $\Delta E$ ) e pressões resistiva ( $\Delta P1$ ), viscoelástica ( $\Delta P2$ ) e total ( $\Delta Ptot$ )] foi determinada 2, 8, 24, 48 e 96 h após a instilação. Os pulmões foram preparados para análise histológica (H-E) e bioquímica (homogenato pulmonar), e a presença de CYN foi determinada no pulmão e fígado por ELISA.

**Resultados:** Houve aumento significativo de Est,  $\Delta E$  e  $\Delta P2$  após 24 e 48 h de exposição à CYN. O colapso alveolar aumentou nos grupos CYN a partir de 8 h em relação ao grupo SAL. Observamos aumento significativo de influxo de polimorfonucleares no parênquima pulmonar e aumento da atividade de MPO nos grupos CYN24, 48 e 96 em relação a SAL. A exposição à CYN induziu estresse e dano oxidativos, caracterizados por aumento de peroxidação lipídica (TBA) e da atividade de superóxido dismutase, e redução da atividade de catalase nos grupos CYN em relação a SAL. Presença de CYN foi detectada no pulmão e no fígado, em todos os tempos analisados.

**Conclusão:** A cilindropermopsina provocou aumento dos componentes elásticos e viscoelásticos da mecânica pulmonar, precedidos por inflamação e estresse oxidativo do parênquima pulmonar.

**Palavras-chave:** cianobactérias, cilindropermopsina, mecânica pulmonar, inflamação pulmonar, estresse oxidativo.

Rio de Janeiro  
Julho de 2010

## ABSTRACT

### TEMPORAL EVOLUTION OF MICE LUNG FUNCTION AFTER EXPOSURE TO CYLINDROSPERMOPSIN

*Vinícius Rosa de Oliveira*

Orientadora: Débora Souza Faffe

*Abstract* da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), do 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 em Ciências.

**Introduction:** Cylindrospermopsin, toxin of cytotoxic action, is produced by cyanobacteria which develop increasing blooms at Brazilian water reservoirs. The aim of this study was to verify CYN-induced pulmonary changes along time.

**Methods:** BALB/c mice received intratracheal injection of either saline (50  $\mu$ L, SAL group, n=12) or a sublethal dose (70  $\mu$ g/kg) of semi-purified extract of CYN (CYN groups, n=52). Lung mechanics pulmonary [static elastance (Est) and viscoelastic component of elastance ( $\Delta E$ ), resistive ( $\Delta P1$ ), viscoelastic ( $\Delta P2$ ), and total ( $\Delta P_{tot}$ ) pressures] were determined 2, 8, 24, 48, and 96 hours after CYN instillation. Lungs were prepared for histological (H-E) and biochemical (lung homogenate) analysis. CYN presence in lungs and liver was determined by ELISA.

**Results:** There was a significant increase in Est,  $\Delta E$ , and  $\Delta P2$  at 24 and 48 h after CYN exposure. Alveolar collapse increased in CYN groups after 8 h in relation to SAL group. CYN24, CYN48 and CYN96 showed significant increase in polymorphonuclear influx in lung parenchyma, as well as higher MPO activity compared with SAL. CYN exposure induced oxidative stress and damage, characterized by increase in lipid peroxidation (TBA) and superoxide dismutase activity, and reduction in catalase activity in CYN groups compared with SAL. CYN was detected in the lungs and liver, at all studied time points.

**Conclusion:** Cylindrospermopsin exposure yielded increased elastic and viscoelastic components of lung mechanics, which were preceded by lung parenchyma inflammation and oxidative stress.

**Key-words:** cyanobacteria, cylindrospermopsin, lung mechanics, pulmonary inflammation, oxidative stress.

Rio de Janeiro  
Julho de 2010

## ÍNDICE

<b>FICHA CATALOGRÁFICA</b> .....	iii
<b>AGÊNCIAS FINANCIADORAS</b> .....	iv
<b>DEDICATÓRIA</b> .....	v
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	vi
<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>ÍNDICE</b> .....	x
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xiii
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	xiv
<b>ABREVIATURAS</b> .....	xv
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 CIANOBACTÉRIAS .....	2
1.2 CILINDROSPERMOPSINA .....	6
1.2.1 Estrutura química .....	7
1.2.2 O mistério de Palm Island .....	8
1.2.3 Considerações toxicológicas .....	9
1.3 NOÇÕES BÁSICAS DE MECÂNICA RESPIRATÓRIA .....	13
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO .....	16
1.4.1 Noções básicas .....	16
1.4.2 Radicais livres .....	17
1.4.2.1 Reações de Fenton e de Haber-Weiss .....	19
1.4.3 Sistemas de defesa antioxidante .....	20
1.4.3.1 Superóxido dismutase (SOD) .....	22
1.4.3.2 Catalase (CAT) .....	22
1.4.3.3 Glutathione .....	23
1.4.4 Estresse oxidativo .....	25
1.4.5 Peroxidação lipídica .....	25
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	28
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	30
3.1 OBJETIVO GERAL .....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	32
4.1 ANIMAIS UTILIZADOS .....	33
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	33
4.3 MECÂNICA RESPIRATÓRIA .....	34
4.3.1 Método de oclusão ao final da inspiração .....	38
4.4 ESTUDO HISTOLÓGICO .....	41
4.4.1 Fixação e preparo das lâminas para microscopia óptica .....	41
4.4.2 Análise histológica .....	43
4.5 ENSAIOS BIOQUÍMICOS DE ESTRESSE E DANO OXIDATIVO .....	44
4.5.1 Dosagem de proteínas .....	45

4.5.2 Medida do dano oxidativo .....	46
4.5.3 Superóxido dismutase (SOD) .....	47
4.5.4 Catalase (CAT) .....	47
4.5.5 Mieloperoxidase (MPO) .....	48
4.6 ANÁLISE DE CYN POR ELISA .....	48
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	49
<b>5 RESULTADOS</b> .....	50
5.1 MECÂNICA RESPIRATÓRIA .....	51
5.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA .....	56
5.2.1 Análise qualitativa .....	56
5.2.2 Análise quantitativa .....	58
5.2.3 Atividade da mieloperoxidase .....	61
5.3 ENSAIOS BIOQUÍMICOS DE ESTRESSE E DANO OXIDATIVO .....	63
5.4 QUANTIFICAÇÃO DE CYN POR ELISA .....	67
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	69
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	80
<b>8 PERSPECTIVAS</b> .....	82
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	84
<b>ANEXOS</b> .....	96
Anexo A - Parâmetros da mecânica pulmonar em cada animal .....	97
Anexo B - Percentual de alvéolos normais e colapsados em cada animal .....	99
Anexo C - Celularidade total e diferencial em cada animal .....	101
Anexo D – Atividade da mieloperoxidase (MPO) em cada animal .....	103
Anexo E – Níveis de superóxido dismutase (SOD) em cada animal .....	105
Anexo F - Níveis de catalase (CAT) em cada animal .....	108
Anexo G – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em cada animal .....	110
Anexo H – Concentração de CYN nos homogenatos de pulmão de cada animal .....	112
Anexo I – Concentração de CYN nos homogenatos de fígado de cada animal .....	114

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Floração tóxica de cianobactéria .....	3
<b>Figura 2.</b> Estrutura química da cilindrospermopsina .....	7
<b>Figura 3.</b> Geração de espécies reativas de oxigênio .....	17
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de defesa antioxidante .....	24
<b>Figura 5.</b> Montagem experimental .....	37

<b>Figura 6.</b> Método de oclusão ao final da inspiração .....	39
<b>Figura 7.</b> Retículo com 100 pontos e 50 linhas .....	43
<b>Figura 8.</b> Elastância estática do pulmão e componente viscoelástico da elastância .....	54
<b>Figura 9.</b> Pressões necessárias para vencer o componente resistivo viscoelástico/ inomogêneo e total do pulmão .....	55
<b>Figura 10.</b> Fotomicrografias de parênquima pulmonar .....	57
<b>Figura 11.</b> Percentual de alvéolos colapsados .....	59
<b>Figura 12.</b> Percentual de células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN).....	60
<b>Figura 13.</b> Atividade da mieloperoxidase (MPO) .....	62
<b>Figura 14.</b> Atividade da superóxido dismutase (SOD) .....	64
<b>Figura 15.</b> Atividade da catalase (CAT) .....	65
<b>Figura 16.</b> Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	66
<b>Figura 17.</b> Análise quantitativa de CYN no pulmão e fígado .....	68

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Fluxo e volume dos animais utilizados nos grupos experimentais .....	52
---	----

## ABREVIATURAS

$\Delta E$  – componente elástico da viscoelasticidade

$\Delta P$  – variação de pressão

$\Delta P_1$  – variação de pressão relativa ao componente viscoso pulmonar

$\Delta P_2$  – variação de pressão relativa ao componente viscoelástico e/ou inhomogêneo pulmonar

$\Delta P_{tot}$  – variação de pressão total pulmonar

$\Delta V$  – variação de volume gasoso mobilizado

ANOVA – análise de variância

CAT – catalase

CEUA – comissão de ética na utilização de animais

CYN – cilindropermopsina

CYP450 – citocromo P450

$DL_{50}$  – dose letal 50

DNA – ácido desoxirribonucleico

E – elastância

EDTA - ácido etilanolamino tetra-acético

Edyn – elastância dinâmica do pulmão

ELISA – ensaio de imunoabsorbância da enzima ligada

ERO – espécie reativa de oxigênio

Est – elastância estática do pulmão

Est,L – componente elástico do pulmão

Est,w – componente elástico da parede torácica

GSH – glutathiona

HE – hematoxilina e eosina

i.p. – intraperitoneal

i.t. – intratraqueal

MCYST-LR – microcistina-LR

MDA – malondialdeído

MN – células mononucleares

MPO – mieloperoxidase

P – pressão

PEEP – pressão positiva ao final da expiração

PEF – pico de fluxo expiratório

Pel – pressão de retração elástica do pulmão

Pi – pressão pulmonar no ponto de inflexão

PL – pressão transpulmonar

Pmáx – pressão máxima ou de pico inspiratório

PMN – células polimorfonucleares

Pres – pressão resistiva

Ptr – pressão traqueal

R – resistência do sistema respiratório

Raw – resistência de vias aéreas

Req – resistência do equipamento

Rinit,L – resistência intrínseca do pulmão

Rinit,w – resistência intrínseca da parede torácica

Rinit,rs – resistência intrínseca do sistema respiratório

RMN – ressonância magnética nuclear

RNA – ácido ribonucleico

$R_{tis}$  – resistência tecidual

$R_{tot}$  – resistência pulmonar total

$R_{rs}$  – resistência do sistema respiratório

SAL – salina

SOD – superóxido dismutase

TBA – ácido tiobarbitúrico

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

$T_I$  – tempo inspiratório

$V'$  – fluxo aéreo

$V_T$  – volume corrente



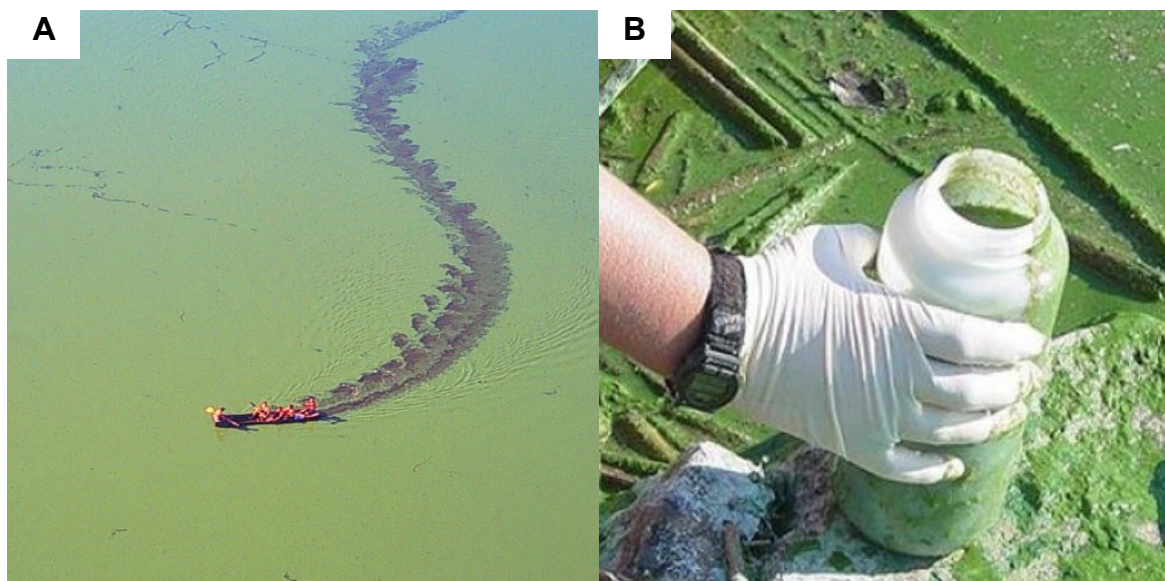
# INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias, também conhecidas como cianofíceas ou algas-azuis, são microrganismos procariontes e fotossintetizantes com organização bioquímica e celular bastante semelhante às bactérias. Possuem larga variabilidade morfológica e geralmente suas células são envolvidas por uma camada mucilaginosa, que aumenta a possibilidade de sobrevivência, mesmo em condições ambientais adversas (LEAL & SOARES, 2004; FUNARI & TESTAI, 2008). Acredita-se que tenham sido os primeiros produtores primários de matéria orgânica a liberarem oxigênio elementar na atmosfera, tendo sua origem datada em 3,5 bilhões de anos. Possuem ampla distribuição geográfica devido à grande diversidade genotípica e fenotípica que apresentam (AZEVEDO, 1998; LEAL & SOARES, 2004).

Os habitats com maior ocorrência de cianobactérias são os ecossistemas de água doce, naturais ou artificiais, mares e águas salobras (HUMM & WICKS, 1980; CODD *et al.*, 2005; ANDRINOLO *et al.*, 2008). No entanto, tais organismos também habitam ambientes de condições extremas como fontes termais, regiões geladas ou até mesmo regiões desérticas, e podem se apresentar em relações simbióticas com fungos. Sob condições favoráveis para o crescimento, tais como alta temperatura, alta intensidade de luz e abundância de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, pode ocorrer o fenômeno conhecido como floração (YOO *et al.*, 1995; FUNARI & TESTAI, 2008). Neste contexto, floração significa 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).



**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>).

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. Há relatos pré-históricos de mortalidade de animais atribuídas à intoxicação por cianobactérias, como a floração de *Planktothrix* no Rio Nilo, descrita no Antigo Testamento da Bíblia. A partir destes achados, conclui-se que tais florações já ocorrem há tempos (STEWART *et al.*, 2008).

Algumas espécies de cianobactérias são potencialmente produtoras de toxinas, as chamadas de cianotoxinas (DAWSON, 1998; FUNARI & TESTAI, 2008). O primeiro relato de intoxicação e morte de animais relacionados à cianobactéria foi publicado em 1878, por George Francis na revista *Nature* (*apud* LEAL & SOARES, 2004; STEWART *et al.*, 2008), no qual a floração de *Nodularia spumigena* e o consumo acidental da água por ovelhas, cavalos, cachorros e porcos, resultou em

morte dos mesmos em até 24 horas após a exposição. Desde então, florações tóxicas foram descritas em vários países, incluindo o Brasil (YOO *et al.*, 1995; STEWART *et al.*, 2008).

No Brasil, a intensa eutrofização dos ecossistemas aquáticos continentais tem favorecido a proliferação 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 principalmente liberadas quando há o rompimento celular. Por este motivo, a tentativa de controlar as florações com o uso de algicidas agrava o problema, uma vez que provoca a lise desses organismos, liberando as toxinas para a água. Uma das características 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, citotoxinas, neurotoxinas e hepatotoxinas, sendo as duas últimas as mais frequentemente encontradas em corpos d'água (CARMICHAEL, 1997; FUNARI & TESTAI, 2008).

As principais vias de exposição às cianotoxinas são: dérmica e oral, pelo uso recreativo da água e o consumo de água, peixes, alimentos e suplementos à base de microalgas. Porém, outras vias devem ser consideradas, como a inalatória e, no caso de hemodiálise, a via endovenosa (FITZGEORGE *et al.*, 1994; RESSOM *et al.*, 1994; LEAL & SOARES, 2004; FUNARI & TESTAI, 2008; ANDRINOLO *et al.*, 2008).

Atividades aquáticas, tais como, nado, mergulho e esqui aquático envolvem um alto risco de exposição, por via inalatória, quando realizadas em corpos d'água contendo mais de 15.000 - 20.000 células de cianobactérias tóxicas/mL (RESSOM *et al.*, 1994).

A intoxicação causada por hepatotoxinas representa o tipo mais comum de injúria causada por cianobactérias. Os sinais observados após ingestão dessas toxinas incluem prostração, anorexia, vômitos, diarreia, gastroenterite, febre, dores de garganta, cabeça, musculares, articulares e abdominais, vertigem, irritações de pele e da mucosa ocular, tosse seca e pneumonia atípica (CARMICHAEL & SCHWARTZ, 1984; BEASLEY *et al.*, 1989; CARMICHAEL *et al.*, 2001; AZEVEDO *et al.*, 2002; CODD *et al.*, 2005).

Há alguns relatos, de diferentes regiões do mundo, sobre intoxicação humana devido à ingestão de cianobactérias tóxicas (BILLINGS *et al.*, 1981; FALCONER, 1989; CODD *et al.*, 2005; FUNARI & TESTAI, 2008). Teixeira e colaboradores (1993) descreveram a ocorrência de florações de cianobactérias no reservatório de Itaparica (Bahia), com a intoxicação de 2000 pessoas pelo consumo de água do reservatório, em um período de 42 dias no ano de 1988. Carmichael e colaboradores (2001) relataram um surto de insuficiência hepática aguda ocorrido em pacientes de uma clínica de diálise de Caruaru (Pernambuco), culminando com a morte de 76, dos 131 pacientes no ano de 1996.

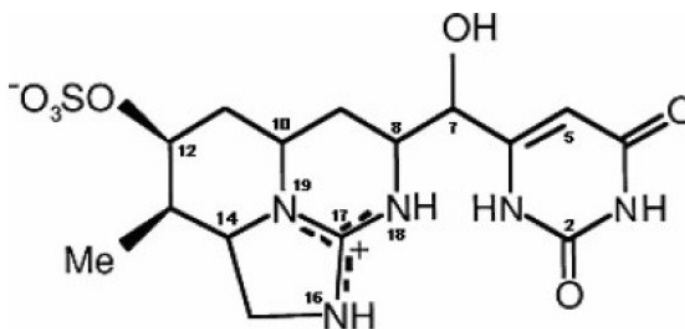
## 1.2 CILINDROSPERMOPSINA

A cilindropermopsina (CYN) é uma toxina produzida por diferentes espécies de cianobactérias, tais como *Umezakia natans* (HARADA *et al.*, 1994), *Aphanizomenon ovalisporum* (BANKER *et al.*, 1997), *Raphidiopsis curvata* (LI *et al.*, 2001) e, principalmente, *Cylindropermopsis raciborskii* (HAWKINS *et al.*, 1985; OHTANI *et al.*, 1992). A *Cylindropermopsis raciborskii*, originalmente descrita como prevalente em regiões tropicais, tem apresentado florações também em ambientes temperados, com presença crescente em reservatórios de água brasileiros (TUCCI & SANT'ANNA, 2003). Sua alta capacidade de formar florações e produzir toxinas faz desta espécie uma das cianobactérias mais estudadas. Quando tóxicas, podem produzir dois tipos de toxinas: as saxitoxinas, um grupo de potentes toxinas paralisantes com ação no sistema nervoso ("paralytic shellfish poisoning"); e a cilindropermopsina, um alcalóide com acúmulo primariamente hepático, capaz de induzir necrose hepatocelular. No entanto, graus variados de lesão em outros órgãos, como rins, glândulas adrenais, timo, coração, pulmões e intestinos, também são descritos após exposição à CYN (HAWKINS *et al.*, 1985; STUCKEN *et al.*, 2009).

Estudos direcionados à bioacumulação da CYN têm sido realizados por grupos de pesquisadores do mundo inteiro. Evidências sugerem que a CYN pode se acumular nos componentes da cadeia alimentar dos corpos d'água, geralmente, em algumas espécies de invertebrados, como lagostas, mariscos e moluscos (SAKER & EAGLESHAM, 1999; SAKER *et al.*, 2004; WHITE *et al.*, 2006). Isto torna-se preocupante, visto que estes organismos aquáticos são consumidos pela população humana.

### 1.2.1 Estrutura química

A estrutura química da CYN foi elucidada por Ohtani e colaboradores (1992) e consiste de um alcalóide tricíclico guanidínico combinado com uma hidroximetiluracila (Figura 2), cuja fórmula molecular é  $C_{15}H_{21}N_5O_7S$ . Trata-se de um composto químico que possui cargas elétricas positivas e negativas, portanto, com característica polar e consequente alta solubilidade em água e baixa solubilidade na maioria dos solventes orgânicos (OHTANI *et al.*, 1992). Além disso, é quimicamente estável à radiação solar, altas temperaturas e grandes variações de pH (CHISWELL *et al.*, 1999).



**Figura 2.** Estrutura química da cilindrospermopsina.

O composto 7-deoxiCYN, um análogo da CYN, no qual o radical hidroxila foi removido do átomo de carbono  $C_7$ , foi isolado da *Cylindrospermopsis raciborskii* (NORRIS *et al.*, 1999) e *Raphidiopsis curvata* (LI *et al.*, 2001), mostrando-se não-tóxico em camundongos, sugerindo que a presença da hidroxila na ponte de uracila seja crítica para a hepatotoxicidade da CYN.

Outra variável estrutural, a 7-epiCYN, isolada da *Aphanizomenon ovalisporum*, mostrou toxicidade equivalente à CYN em camundongos (BANKER *et al.*, 2001). Nesta variável, a hidroxila de  $C_7$  assume orientação oposta à da molécula

de CYN. Esta observação também confirma a essencialidade do anel pirimidínico de uracila para a toxicidade.

### **1.2.2 O Mistério de Palm Island**

Um dos casos mais graves de contaminação humana por toxinas de cianobactérias ocorreu em Palm Island, Queensland, Austrália, em novembro de 1979 (BYTH, 1980; GRIFFITHS & SAKER, 2003). Nesta data, houve um surto de gastroenterite em 148 habitantes da comunidade aborígene, sendo 138 crianças e 10 adultos. A maioria dos casos deste surto, chamado “O Mistério de Palm Island” necessitou de hospitalização, e os pacientes apresentaram sintomas como febre, cefaléia, vômitos, diarreia sanguinolenta, hepatomegalia, desidratação, perda de eletrólitos e insuficiência renal.

Alguns dias antes do surto, o principal reservatório de água da ilha foi tratado com doses não relatadas de sulfato de cobre para controlar a intensa floração de microalgas. Um estudo epidemiológico posterior ao incidente confirmou a relação com o fornecimento de água, já que apenas os domicílios abastecidos pelo reservatório foram atingidos pela doença (BOURKE *et al.*, 1983). O papel do sulfato de cobre no incidente foi relacionado ao seu modo de ação algicida, levando à lise celular, acarretando a liberação de CYN e outras moléculas tóxicas na água (GRIFFITHS & SAKER, 2003).

Um estudo ecológico do reservatório compreendendo o período de 1981-1984 (HAWKINS, 1986) mostrou que o corpo d'água sofria periódicas florações de cianobactérias, cujos componentes mais frequentes eram duas variedades de *Anabaena circinalis* e uma outra, até então não conhecida nos reservatórios



australianos, a *Cylindrospermopsis raciborskii*. Estudos toxicológicos, isolando culturas destas cianobactérias, revelaram que as duas cepas de *Anabaena* não apresentavam toxicidade quando injetadas intraperitonealmente em camundongos, porém a espécie *C. raciborskii* mostrou-se altamente tóxica, causando danos ao fígado, rins e outros órgãos (HAWKINS *et al.*, 1985). Este constituiu o primeiro caso bem documentado de contaminação ocorrida pela toxina desta espécie de cianobactéria, que tardiamente foi identificada e quimicamente caracterizada como a potente citotóxina cilindrospermopsina (CYN) (OHTANI *et al.*, 1992).

Desde os relatos dos estudos acima mencionados, muito tem sido descrito sobre essa toxina, incluindo que cepas diferentes da mesma espécie podem variar bastante os seus níveis de toxicidade, e especial cuidado tem sido tomado quanto ao monitoramento da qualidade da água utilizada para o abastecimento público.

### 1.2.3 Considerações toxicológicas

A análise da estrutura molecular da CYN levou Moore e colaboradores (1993) a sugerirem que sua biossíntese pode ocorrer a partir de uma molécula precursora composta de aminoácidos, como a glicociamina ou a 4-guanidino-3-ácido oxibutírico. Análises de ressonância magnética nuclear (RMN) da CYN produzida por culturas de *Cylindrospermopsis raciborskii*, supridas com acetato de sódio marcado com carbono radioativo, mostraram que esta molécula possui origem policetídea derivada de cinco unidades contíguas de acetato aderidas crânio-caudalmente aos átomos de C<sub>4</sub> a C<sub>13</sub> (BURGOYNE *et al.*, 2000).

O principal efeito metabólico exercido pela CYN é a inibição irreversível da síntese protéica, que ocorre na fase de tradução. Terao e colaboradores (1994), em

seus estudos com camundongos tratados com CYN purificada (0,2 mg/kg de peso corpóreo) e administrada intraperitonealmente (i.p.), observaram a hepatotoxicidade da CYN em quatro fases: 1) desprendimento dos ribossomos da superfície do retículo endoplasmático rugoso e acúmulo no citoplasma dos hepatócitos; 2) redução considerável dos níveis enzimáticos de citocromo P450 (CYP450), geralmente após 24 horas decorridas da administração de CYN; 3) acúmulo de gotículas de gordura na porção central dos lóbulos hepáticos; 4) necrose hepática grave.

A  $DL_{50}$  da CYN indica uma toxicidade que varia temporalmente de acordo com a dose i.p. em camundongos: 2,0 mg/kg de peso corpóreo, em 24 horas e 0,2 mg/kg de peso corpóreo em 5-6 dias (OHTANI *et al.*, 1992). É provável que a toxicidade precoce deva-se à ativação dependente da CYP450, enquanto que a toxicidade tardia resulte da inibição da síntese protéica ou a combinação dos dois efeitos (FROSCIO *et al.*, 2008).

A implicação do sistema enzimático citocromo P450 na toxicidade da CYN foi sugerida por Shaw e colaboradores (2000), que observaram que o efeito tóxico primário da CYN é exercido na região periácinar do fígado, onde ocorre o metabolismo xenobiótico envolvendo a CYP450. É provável que um metabólito derivado da CYN, formado a partir de uma reação catalisada pela CYP450, seja responsável por aumentar sua toxicidade. Runnegar e colaboradores (1995) observaram que o pré-tratamento dos hepatócitos com  $\alpha$ -naftoflavona, um bloqueador conhecido da CYP450, fornece proteção parcial contra a toxicidade *in vitro* da CYN. O mesmo grupo também observou que a CYN causa a redução da concentração de glutatona (GSH) em culturas de hepatócitos de ratos, sendo mais

provavelmente devido à inibição da síntese de GSH do que o seu consumo (RUNNEGAR *et al.*, 1994).

A estrutura nucleotídica da CYN e a presença de grupos guanidinos e sulfatos potencialmente reativos sugerem que a toxina possa exercer efeito no DNA ou RNA (REISNER *et al.*, 2004). A ligação covalente da CYN, ou de seus metabólitos, com o DNA pode ser capaz de quebrar os filamentos de DNA (SHAW *et al.*, 2000; SHEN *et al.*, 2002). Algumas anormalidades citogenéticas foram observadas também em células linfoblastóides humanas expostas à CYN (HUMPAGE *et al.*, 2000). Os efeitos cromossomais observados *in vitro* sugeriram que a CYN pode causar danos à função do centrômero, embora os mecanismos envolvidos não tenham sido ainda determinados (HUMPAGE *et al.*, 2005; HUMPAGE, 2007).

Rogers e colaboradores (2007) relataram que a CYN é capaz de induzir toxicidade fetal em camundongos, caracterizada por baixo peso fetal, hepatomegalia e hemorragia intestinal, após exposição tardia na gestação. A contaminação aguda por CYN resulta em acumulação lipídica no fígado, seguida de necrose hepatocelular (TERAO *et al.*, 1994; SEAWRIGHT *et al.*, 1999). Os efeitos não hepáticos incluem destruição dos túbulos proximais dos rins, redução do fluxo sanguíneo glomerular, bem como efeitos citotóxicos e trombóticos em outros tecidos (FALCONER *et al.*, 1999; HUMPAGE & FALCONER, 2003; PEGRAM *et al.*, 2007). Norris e colaboradores (2001) observaram que injeção intraperitoneal de CYN radioativa leva à distribuição predominantemente hepática e, em menor grau, a uma distribuição renal da toxina. Há evidências sugerindo a formação de metabólitos, porém estes ainda não foram caracterizados. Já foi descrito que a exposição oral subcrônica resulta principalmente em efeitos hepáticos e renais. Apesar de o fígado

ser o órgão de detoxificação e de acúmulo de CYN, os rins são particularmente sensíveis à ação dessa cianotoxina (HUMPAGE & FALCONER, 2003).

Além dos efeitos hepáticos e renais, alguns relatos da literatura mostram que os pulmões também podem ser afetados após exposição à CYN. Hawkins e colaboradores (1985) reportaram que camundongos injetados com dose letal (i.p.) de CYN evoluíram para óbito 6 a 9 horas após exposição, apresentando sinais de congestão e hemorragia pulmonares. A análise histopatológica do fígado mostrou formação de trombos de fibrina na veia porta, com material embólico em pequenas artérias e capilares pulmonares, semelhante ao observado nas veias hepáticas. Bernard e colaboradores (2003), utilizando dose letal de extrato liofilizado de *Cylindrospermopsis raciborskii* via i.p. em camundongos, observaram hemorragia intra-alveolar, sem evidência de fagocitose dos eritrócitos por macrófagos alveolares.

A maioria dos estudos na literatura avalia o efeito de doses letais de cianotoxinas, com a finalidade de melhor entender os mecanismos que levam ao óbito em eventos acidentais isolados (CARMICHAEL *et al.*, 2001). A contaminação crônica de reservatórios de água leva à exposição continuada da população a pequenas doses de cianotoxinas, tornando-se esse fenômeno, uma preocupação de saúde pública. Uma vez que a *Cylindrospermopsis raciborskii* vem formando florações cada vez mais frequentes em reservatórios brasileiros, isto demonstra sua alta capacidade de adaptação e vantagem competitiva (PADISÁK, 1997; PALMER, 1969; BRANCO & SENNA, 1991; SANT'ANNA & AZEVEDO, 2000; BOUVY *et al.*, 2000). Portanto, esta cianotoxina e seus efeitos subletais em mamíferos foram escolhidos como objeto de estudo desta dissertação.

### 1.3 NOÇÕES BÁSICAS DE MECÂNICA RESPIRATÓRIA

A respiração constitui um processo cíclico que envolve um 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 ( $\Delta V$ ) 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.

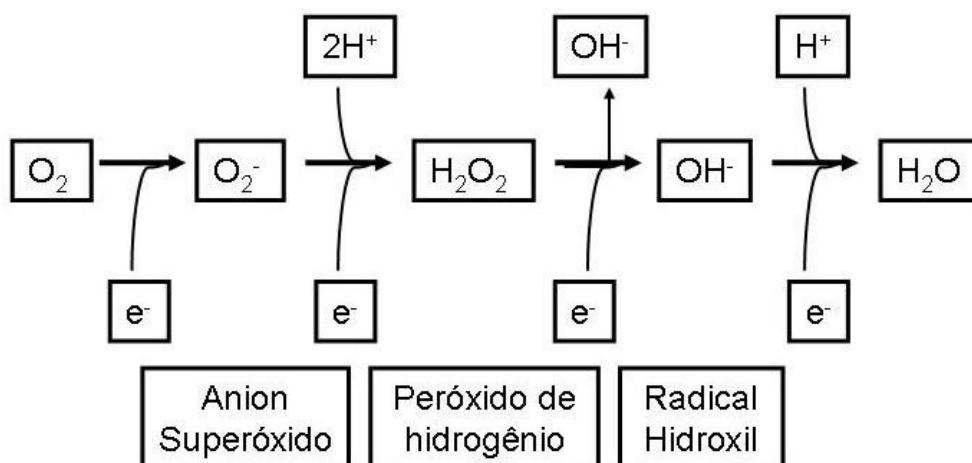
Além dos componentes elásticos e resistivos, o sistema respiratório apresenta também propriedades viscoelásticas, que atuam no tecido pulmonar e na parede torácica. A viscoelasticidade foi descrita a partir do comportamento de fios de seda, por Wilhem Weber em 1835. Substâncias viscoelásticas, quando 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 reproduzível, 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.

## 1.4 ESTRESSE OXIDATIVO

### 1.4.1 Noções Básicas

A bioquímica celular do oxigênio ( $O_2$ ) é reconhecida pelos seus pontos positivos e negativos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990). Os aspectos positivos incluem numerosas reações catalisadas, essenciais para a vida e função celular normal. Por outro lado, incluem a possibilidade de formação de espécies reativas de oxigênio, exercendo um efeito deletério (LI *et al.*, 2003). O principal papel do  $O_2$  no metabolismo normal é o processo de fosforilação oxidativa, um evento que ocorre na mitocôndria e responsável pela produção de adenosina trifosfato (ATP). Para a fosforilação oxidativa, faz-se necessário que o oxigênio esteja apto a receber elétrons. Normalmente, quatro elétrons são necessários para formar a  $H_2O$  (Figura 3). A adição de um único elétron resulta na formação do radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), enquanto que a adição de dois ou três elétrons leva à gênese de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ou radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), respectivamente (Figura 3). Sob condições normais, essas espécies reativas formam-se em número reduzido. No entanto, mostram-se muito eficazes para reagir com proteínas, lipídios e DNA, levando ao dano celular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990, GRIFFITHS, 2000).





**Figura 3.** Geração de espécies reativas de oxigênio durante fosforilação oxidativa. Nesse processo  $\text{O}_2$  recebe quatro elétrons para formar  $\text{H}_2\text{O}$ . Ocasionalmente a adição de um elétron resulta na formação de  $\text{O}_2^-$ , que pode ser convertido para  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou  $\text{OH}^\cdot$ . Adaptada de Li *et al.*, 2003.

#### 1.4.2 Radicais livres

Em circunstâncias normais, os elétrons orbitam em volta do núcleo do átomo em pares, com oposição dos “spins”. Quando um átomo possui um elétron não pareado, se torna instável e sua reatividade aumenta, sendo, então, definido como um radical livre. Esses radicais livres são constantemente produzidos e eliminados no organismo.

Em condições normais, os radicais livres e outras substâncias reativas a eles relacionadas também são responsabilizados pela regulação de importantes mecanismos fisiológicos, tais como: sinalização celular, regulação da expressão de alguns genes, mediação de reações inflamatórias e potencialização dos mecanismos de defesa orgânica, uma vez que fazem parte do arsenal de armas letais leucocitárias (PRYOR, 1986; DROGE, 2002; HIL & FERRANTE, 2007). Por serem muito instáveis e normalmente produzidos em pequenas quantidades, sua depuração celular é rápida, geralmente decorrente do decaimento espontâneo ou por ação de antioxidantes naturais. Porém, quando presentes em grandes

quantidades, causam lesões à célula através de dano a macromoléculas como lipídios, proteínas, carboidratos e DNA, levando a dano da função celular ou até mesmo à morte da célula (CIENCEWICKI *et al.*, 2008).

Os radicais livres podem ser encontrados em grande quantidade na natureza, associados aos átomos de oxigênio, nitrogênio, hidrogênio, carbono, enxofre, sendo classificados em função do átomo portador dos elétrons desemparelhados (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Todavia, os radicais livres de oxigênio [radical superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxila ( $OH^\cdot$ ) e hidroperoxila ( $HO_2^\cdot$ )] são os que possuem maior relevância biológica, não só devido à sua elevada toxicidade, mas, também, pelo fato de serem os mais prevalentes nos organismos vivos que utilizam o oxigênio como comburente. Existem, contudo, outras moléculas altamente reativas e potencialmente tóxicas para o organismo, as quais, por não apresentarem nenhum elétron desemparelhado nos seus orbitais, não se enquadram na definição de radical livre. Apesar de não serem verdadeiros radicais, estas moléculas, que incluem o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o ácido hipocloroso ( $HClO$ ), são potenciais geradoras de radicais livres, e, por esta razão, as suas repercussões orgânicas, fisiológicas ou tóxicas, devem ser igualmente consideradas (PRYOR, 1986; SHAN *et al.*, 1989; HALLIWELL, 1991; LEE *et al.*, 2004). Logo, ao invés da denominação “radicais livres”, passou-se a utilizar “espécies reativas”, para englobar, além dos radicais, estas moléculas. Como em sua maioria tais espécies são derivadas do metabolismo do  $O_2$ , normalmente utiliza-se o termo espécies reativas de oxigênio (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

A presença de pares redox responsáveis pelo fluxo de elétrons determina o equilíbrio redox em líquidos biológicos, organelas, células ou tecidos. Esses sofrem frequentes interconversões entre os estados reduzido e oxidado (VASCONCELOS

*et al.*, 2007). Cabe recordar que reações de redução implicam em ganho de elétrons, e as de oxidação em perda dos mesmos. Portanto, quando no metabolismo normal ocorrer uma redução do oxigênio molecular ( $O_2$ ), este ganhará um elétron, formando o radical superóxido ( $O_2^-$ ), considerado instável por possuir número ímpar de elétrons na última camada (Figura 3).

As espécies reativas de oxigênio são encontradas em todos os sistemas biológicos. As fontes geradoras são: cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, retículo endoplasmático e nicotinamida-adenina nucleotídeo (NADH/NADPH) oxidase associada à membrana. Durante o processo de fosforilação oxidativa, formam-se intermediários reativos, como os radicais superóxido ( $O_2^-$ ), hidroperoxila ( $HO_2$ ) e hidroxila ( $OH^\cdot$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Figura 3). Este último, apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, se constitui em um metabólito do oxigênio extremamente deletério, uma vez que participa da reação que produz o  $OH^\cdot$ , atravessa camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao ferro, mostrando-se altamente tóxico para as células. A entrada de quatro elétrons no processo de redução do  $O_2$  neutraliza a reatividade das espécies reativas de oxigênio.

#### **1.4.2.1 Reações de Fenton e de Haber-Weiss**

Os metais de transição participam em um grande número de funções biológicas, como resultado de suas interações com o oxigênio e suas ações na formação de complexos doador-receptor (coordenação). Estes metais são micronutrientes essenciais, utilizados em vários aspectos da função celular normal. As mesmas propriedades químicas que permitem a estes metais atuarem em

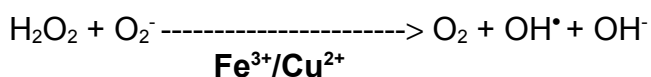
numerosas reações do oxigênio molecular nas funções homeostática e de síntese de  $O_2^-$ , o  $H_2O_2$  e o  $OH^\bullet$  gerados a partir de reações celulares de Fenton e de Haber-Weiss (DUNFORD, 1987; ARUOMA *et al.*, 1989; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990), também fazem dos metais uma ameaça à vida, pela geração de espécie reativa de oxigênio (GHIO *et al.* 1998).

As reações são:

Reação de Fenton:



Reação de Haber-Weiss:



Consequentemente, os metais de transição devem ser transportados e estocados de forma a prevenir a formação de espécie reativa de oxigênio (GHIO *et al.* 1998).

Embora o cobre possa, também, catalisar a reação de Haber-Weiss, o ferro é o metal pesado mais abundante no organismo e está biologicamente mais capacitado para catalisar as reações de oxidação de biomoléculas (AUST & MILLER, 1991).

### 1.4.3 Sistemas de defesa antioxidante

Devido ao elevado potencial de toxicidade do oxigênio e à sua grande utilização pelos organismos aeróbios, torna-se necessário que estes estejam suficientemente munidos de uma diversidade de sistemas antioxidantes para proteger suas células dos efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio (EVANS, 2000; BANERJEE *et al.*, 2003; LAMBERTUCCI *et al.*, 2007).

Um antioxidante é, por definição, qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação às dos potenciais substratos oxidáveis, retarda significativamente, ou inibe, a oxidação desses substratos pelas espécies reativas de oxigênio (HALLIWELL, 1991; SIES, 1997; DROGE, 2002). Estas substâncias possuem a propriedade de fornecer elétrons/átomos de hidrogênio às espécies reativas de oxigênio sem se transformarem em moléculas instáveis. Os mecanismos de defesa antioxidante nos diferentes tecidos compreendem sistemas enzimáticos e não enzimáticos, que atuam convertendo a espécie reativa de oxigênio para espécies menos tóxicas, tendo, assim, um importante papel na proteção sistêmica contra espécies reativas de oxigênio (GOLDFARB, 1999, LI *et al.*, 2003). Podem ser classificados em função da sua localização tecidual (antioxidantes intracelulares e extracelulares) e da sua origem: seja da dieta (antioxidantes exógenos) ou da síntese endógena (antioxidantes endógenos).

No interior da célula, a eliminação dos compostos reativos constitui um pré-requisito para a sobrevivência celular, sendo normalmente efetuada por: 1) sistemas enzimáticos, tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase e a glutathione reductase; e 2) sistemas não-enzimáticos, tais como glutathione reduzida (GSH), coenzima Q (CoQ), ácido úrico, vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), flavonóides, carotenóides, proteínas de transporte de metais de transição, ferritina, transferrina e ceruloplasmina (Figura 4) (BECKMAN & AMES, 1998; SEN, 2001, LI *et al.*, 2003). Destes, os agentes que apresentam o papel preponderante dentro dos sistemas intracelulares de defesa antioxidante são a SOD, a CAT e a glutathione peroxidase (LEE *et al.*, 2004; MORENO *et al.*, 2005; FORONJY *et al.*, 2006). Quando as espécies reativas de oxigênio alcançam níveis que superam a capacidade de ação deste sistema de

defesa, durante um estado fisiopatológico como em um evento toxicológico, ocorrem alterações químicas resultantes de processos biológicos moleculares de estresse oxidativo lesivo (FERREIRA *et al.*, 2006; ESPEY *et al.*, 2000).

As ações deflagradas pelos radicais livres, por sua vez, também induzem reações auto-catalíticas, pelas quais moléculas com as quais eles interagem são convertidas a radicais livres, propagando e perpetuando a cadeia de danos. As lesões secundárias ao estresse oxidativo contribuem para o aparecimento de doenças degenerativas e inflamatórias como câncer, doenças cardiovasculares e pulmonares, declínio do sistema imune, disfunção cerebral e catarata, podendo agravar doenças pré-existentes e levar ao óbito (LI *et al.*, 2003, KELLY, 2003).

#### **1.4.3.1 Superóxido dismutase (SOD)**

A SOD metaboliza o  $O_2$  com formação de  $H_2O_2$  (Figura 4). Nos mamíferos existem três isoenzimas da SOD, codificadas e reguladas de forma independente: a citosólica (Cu,Zn-SOD ou SOD1), a mitocondrial (Mn-SOD ou SOD2) e uma forma extracelular da Cu,Zn-SOD ou SOD3. A atividade total da SOD é percebida principalmente no fígado, rim, eritrócitos, cérebro, coração e pâncreas (HALLIWELL, 1991; FERREIRA *et al.*, 2006).

#### **1.4.3.2 Catalase (CAT)**

A CAT é uma enzima presente na maioria dos organismos aeróbios, responsável pela conversão do  $H_2O_2$  intracelular em água e oxigênio (Figura 4). Grande parte da atividade desta enzima localiza-se nos peroxissomas. Na maioria dos animais, há CAT em praticamente todos os órgãos, estando particularmente concentrada no fígado e nos eritrócitos. As mitocôndrias e o retículo endoplasmático

contêm, também, alguma atividade de CAT, embora muito reduzida. O encéfalo, o coração e os músculos esqueléticos contêm pequenas quantidades desta enzima (HALLIWELL, 1991; FERREIRA *et al.*, 2006).

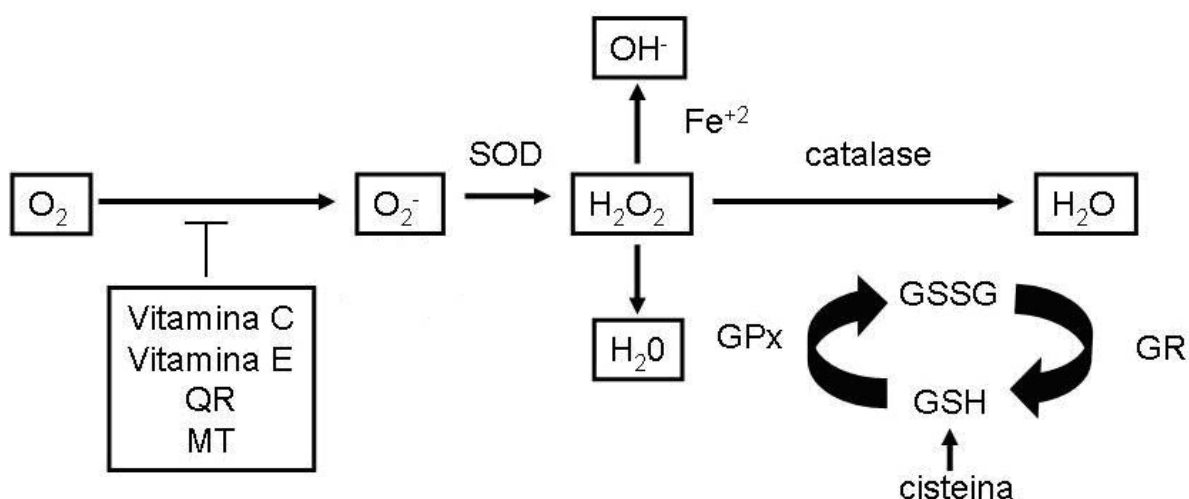
#### 1.4.3.3 Glutathione

A glutathione reduzida (GSH) está presente na maioria das células e é o composto orgânico tiol mais abundante no meio intracelular (MEISTER & ANDERSON, 1983). Pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante celular (VAN ASBECK *et al.*, 1985), protegendo a célula contra lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro (GALLEANO & PUNTARULO, 1995). Além disto, atua como transportadora e reservatório de aminoácidos e participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação (DENEKE & FANBURG, 1989).

Após exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação à GSSG (Figura 4). A recuperação da GSH é feita pela enzima glutathione redutase, uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular (HEBBEL, 1986).

A glutathione peroxidase é considerada a enzima mais importante para a oxidação do  $H_2O_2$  a água. A glutathione peroxidase dos mamíferos tem maior afinidade pelo  $H_2O_2$  do que a CAT, significando que, em concentrações baixas de  $H_2O_2$ , a glutathione peroxidase tem um papel muito mais ativo na sua remoção celular. Apresenta-se sob quatro formas: glutathione peroxidase 1 ou clássica, encontrada no citosol de todas as células do corpo; a glutathione peroxidase 2 ou gastrointestinal, específica do trato gastrointestinal; a glutathione peroxidase 3, plasmática ou extracelular, encontrada no fluido do revestimento interno do pulmão e no leite materno, além do plasma em mamíferos; e a glutathione peroxidase 4, que

atua sobre peróxidos de resíduos de ácidos graxos na membrana e lipoproteínas (BAST *et al.*, 1991). O correto funcionamento da glutathiona peroxidase depende da presença de selênio (nutriente antioxidante) na sua constituição e da disponibilidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e de outros hidroperóxidos, utilizando a glutathiona reduzida (GSH) como doador de elétrons, formando a glutathiona oxidada (GSSH) e água (Figura 4). Este mecanismo atribui à glutathiona peroxidase um papel importante na proteção celular das membranas lipídicas, proteínas e ácidos nucleicos contra as espécies reativas de oxigênio (HALLIWELL, 1991; FERREIRA *et al.*, 2006).



**Figura 4.** Mecanismo de defesa antioxidante. Enquanto a superóxido dismutase (SOD) catalisa a reação de  $\text{O}_2^-$  para  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a catalase catalisa a decomposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para  $\text{H}_2\text{O}$ . A glutathiona peroxidase (GPx) reduz hidroperóxidos pela oxidação de GSH em GSSG. A ferritina libera  $\text{Fe}^{+2}$ , que tem papel importante na prevenção da formação de  $\text{OH}^-$  tóxico pela prevenção da reação de Fenton. Além disso, outras substâncias antioxidantes como as vitaminas C e E, quinona redutase (QE), e metalotioneína (MT) podem efetivamente bloquear a geração de  $\text{O}_2^-$  pela redução dos compostos cíclicos. Adaptada de Li *et al.*, 2003.



#### 1.4.4 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é uma condição biológica em que ocorre desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e sua degradação através de sistemas biológicos de remoção ou de reparo dos danos causados. O predomínio de substâncias oxidantes, com estresse oxidativo de grandes proporções, provoca dano tanto de lipídeos quanto de DNA.

A situação de estresse oxidativo traduz-se na incapacidade de impedir ou reparar as repercussões das espécies reativas de oxigênio sobre as estruturas celulares e ocorre mesmo em situações basais (MOTA *et al.*, 2004). O aumento do estresse oxidativo pode ser secundário à maior produção de espécies reativas de oxigênio, redução da capacidade antioxidante ou, ainda, à conjugação destes dois fatores.

#### 1.4.5 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, gerando principalmente radical alquila, alcóxila e peróxila, levando à destruição de sua estrutura. Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das espécies reativas de oxigênio, porém a membrana é um dos mais atingidos, apresentando perda da seletividade na troca iônica e liberação de conteúdo das organelas (como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos), e formação de produtos citotóxicos (como o malondialdeído e isoprostanos). Todas essas modificações oxidativas causam mudanças nas propriedades físicas e químicas das membranas, culminando com a morte celular. A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, câncer e a exacerbação da

toxicidade de xenobióticos. Nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos atuam significativamente na reação em cascata a partir do ácido araquidônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990). Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (ROSS & MOLDEUS, 1991, VASCONCELOS *et al.*, 2007).

A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e finalização. A etapa de iniciação, como já descrito, compreende o ataque de uma espécie reativa (geralmente  $\text{OH}^\cdot$ ), que abstrai um átomo de hidrogênio de um grupo metileno, normalmente de um ácido graxo poli-insaturado, deixando um elétron desemparelhado no carbono. Este radical é comumente estabilizado por rearranjo molecular, formando um dieno conjugado. Sob condições aeróbicas, o radical de carbono do dieno conjugado reage com  $\text{O}_2$  (que é uma molécula hidrofóbica e, portanto, se concentra no interior das membranas) e forma o radical peroxila. Este radical peroxila pode capturar prótons de moléculas de lipídeos adjacentes, cujo radical de carbono sofre novo rearranjo, reage com  $\text{O}_2$  e forma outro radical peroxila e, assim, sucessivamente, caracterizando a reação em cadeia da etapa de propagação. O radical peroxila combina-se, então, com o hidrogênio abstraído, gerando o lipídeo hidroperóxido que, ao sofrer quebra, forma aldeídos como malondialdeído entre outros. A decomposição dos hidroperóxidos lipídicos gera radicais peroxila e alcoxila pela reação de Fenton. A terceira e última etapa da peroxidação lipídica, a etapa de finalização, instala-se com a neutralização dos radicais formados por ação de antioxidantes lipossolúveis ou pela reação de dois radicais lipídicos, formando produtos sem radicais.

Atualmente, os mecanismos envolvidos na toxicidade da CYN ainda não são bem conhecidos. Há relatos na literatura que apontam ser o estresse oxidativo um possível indutor desta toxicidade no fígado, sugerindo uma associação entre a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e apoptose dos hepatócitos (DING *et al.*, 1998; 2003). Já foi reportado por nosso grupo que outra importante cianotoxina, a microcistina-LR, é capaz de causar alterações bioquímicas no tecido pulmonar, caracterizadas pela produção de ERO e dano oxidativo à membrana celular (CARVALHO *et al.*, 2010). Deste modo, a análise bioquímica de estresse e dano oxidativos torna-se uma importante ferramenta para a investigação dos mecanismos de toxicidade relacionados com a exposição à CYN neste estudo.

# **JUSTIFICATIVA**

## 2 JUSTIFICATIVA

Embora um dos principais órgãos afetados pela ação da CYN 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. No entanto, informações sobre lesão no sistema respiratório ainda são escassas na literatura, tendo alguns 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 lesão, foi encontrado.

A compreensão dos efeitos de doses subletais de CYN torna-se relevante, pelo fato de populações humanas estarem mais expostas a pequenas doses do que a doses letais da toxina. Os estudos experimentais representam uma importante ferramenta na avaliação dos riscos das cianotoxinas para a população humana. Sendo a CYN uma toxina com potencial citotóxico e crescente frequência nos ambientes aquáticos, seus efeitos subletais no pulmão foram escolhidos como objeto de estudo desta dissertação.

# OBJETIVOS

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Analisar temporalmente o comportamento da mecânica e da histologia pulmonares de camundongos, bem como os aspectos da resposta bioquímica do pulmão, em resposta a dose subletal de cilindrospermopsina administrada intratraquealmente.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Avaliar, através do método de oclusão ao final da inspiração, as propriedades elástica, resistiva e viscoelástica e/ou inomogênea do pulmão;
- b) Estudar as alterações morfométricas no parênquima pulmonar;
- c) Investigar a ocorrência de processo inflamatório por meio da análise do influxo de células inflamatórias no parênquima pulmonar e ensaios bioquímicos de estresse e dano oxidativo.

# **MATERIAIS E MÉTODOS**



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Os animais utilizados, oriundos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), São Paulo, foram 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). Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética com Uso de Animais (CEUA), do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob o número IBCCF 012.

As análises funcionais e histológicas foram realizadas no Laboratório da Fisiologia da Respiração, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, bem como o imunoensaio do tipo ELISA para cilindropermopsina, realizado no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, no mesmo instituto, na UFRJ. Os ensaios bioquímicos de estresse oxidativo foram realizados no Laboratório de Reparo Tecidual, do Departamento de Histologia e Embriologia, na UERJ.

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

O desenho experimental foi proposto com base em trabalho prévio de nosso grupo, analisando os efeitos temporais da intoxicação por microcistina-LR (MCYST-LR), outra cianotoxina hepatotóxica. No presente estudo, trinta e quatro camundongos BALB/c machos, pesando entre 20 a 28 g, foram divididos aleatoriamente em 2 grupos experimentais:

- I - Grupo salina (SAL, n=7): os camundongos receberam instilação intratraqueal de solução salina 50 µL (NaCl 0,9%);

II - Grupos cilindropermopsina (CYN, n=27): os camundongos receberam dose subletal de extrato semi-purificado de cilindropermopsina (70 µg/kg de peso corpóreo, i.t.), obtido a partir da cultura de *C. raciborskii*, cepa CYP 011K, gentilmente cedida pelo Dr. Peter Baker (Australian Water Quality Centre, Adelaide – Austrália). Os animais deste grupo foram subdivididos em 5 subgrupos, de acordo com o tempo em que foram realizadas as análises, após administração da toxina:

- CYN2 (2 horas), n=5
- CYN8 (8 horas), n=5
- CYN24 (24 horas), n=5
- CYN48 (48 horas), n=5
- CYN96 (96 horas), n=7

Para a instilação intratraqueal, os camundongos foram anestesiados com sevofluorane, colocados sobre uma mesa cirúrgica e submetidos à incisão cervical de aproximadamente 1 cm, por onde a traquéia era exposta. Salina ou extrato de cilindropermopsina foram instilados com uma seringa de insulina de 27-G. A incisão cervical era fechada com fio de sutura 5,0 e o animal retornava para a gaiola. Os animais se recuperavam rapidamente após a cirurgia e nenhum óbito resultou deste procedimento.

#### 4.3 MECÂNICA RESPIRATÓRIA

Decorridas 2, 8, 24, 48 ou 96 horas da instilação intratraqueal de salina ou CYN, os animais foram sedados com diazepam (1 mg, i.p.), pesados (balança Filizola, modelo BR, Indústrias Filizola SA, SP, Brasil) e, então, anestesiados com

pentobarbital sódico (20 mg/kg de peso corpóreo, 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 por esparadrapo. Os membros superiores foram mantidos horizontalmente abduzidos a 90 graus em relação ao corpo e os membros inferiores estendidos 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 (0,1 mg/kg).

Os camundongos foram, então, acoplados à prótese ventilatória e ventilados por um ventilador de fluxo constante (Samay VR15, Universidad de la Republica, Montevideu, Uruguai) com frequência de 100 incursões respiratórias por minuto e um volume corrente ( $V_T$ ) de 0,2 mL.

Após a adaptação ao respirador, procedeu-se a tricotomia e a abertura da pele e do tecido subcutâneo dos animais, na linha mediana, do manúbrio ao púbis. A seguir, esses planos foram separados da musculatura por tração lateral. O plano muscular e o peritônio foram, então, seccionados bilateralmente, seguindo o bordo inferior das costelas, até atingir a linha axilar anterior. 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 foi instalada pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de aproximadamente 2 cmH<sub>2</sub>O, a fim de evitar o desenvolvimento de colapso pulmonar (POWERS *et al.*, 1973; SALDIVA *et al.*, 1992).

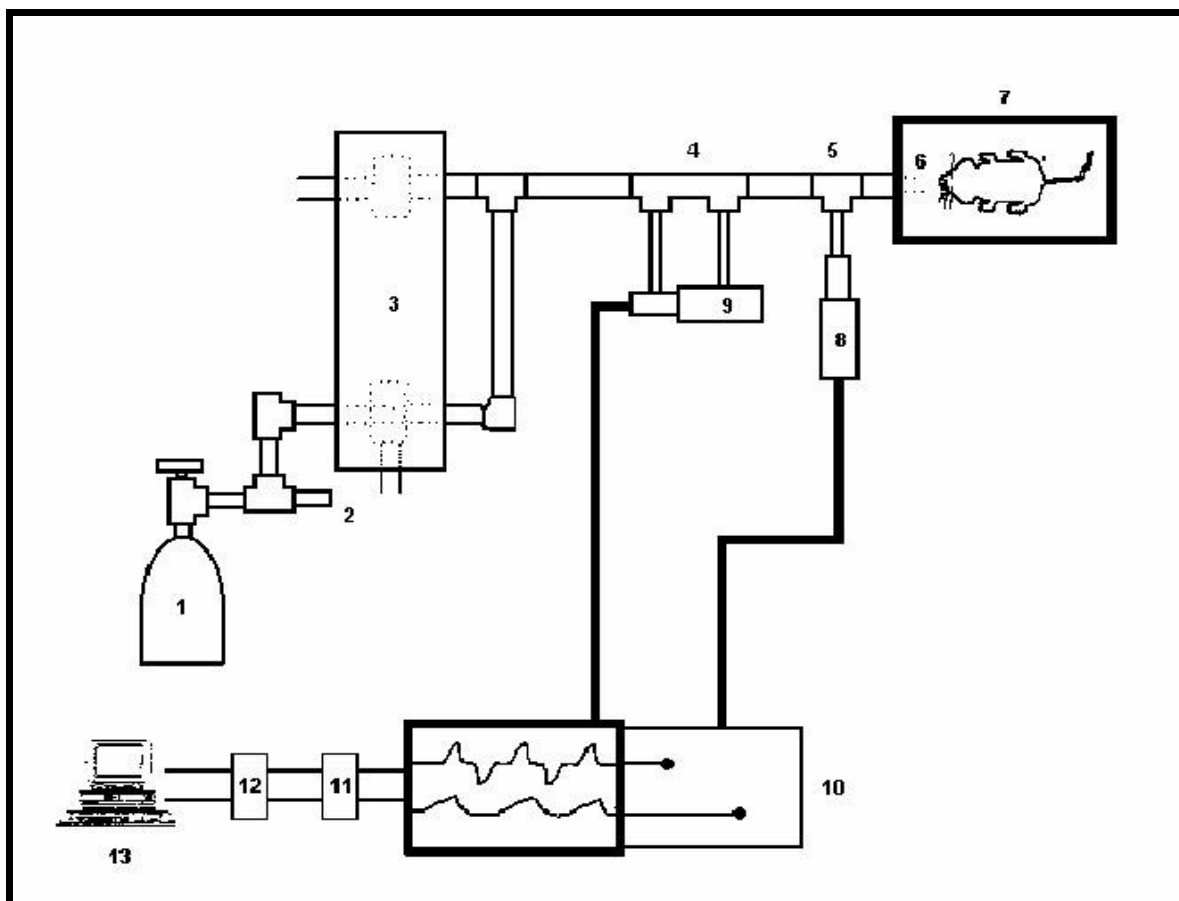
Após a retirada do diafragma, a parede torácica anterior foi removida por incisões longitudinais bilaterais ao nível da linha axilar anterior, em toda sua extensão, e incisão transversal superior, abaixo das clavículas.

O ventilador foi ajustado previamente para gerar uma pausa de 5 segundos ao final da inspiração. Foram tomados cuidados especiais para a manutenção de volume ( $V_T = 0,2$  mL) e fluxo ( $V' = 1$  mL/s) constantes em todos os animais, a fim de evitar os efeitos de diferentes fluxos, volumes e tempo inspiratório nas variáveis medidas (KOCHI *et al.*, 1988a,b; SIMILOWSKI & MILIC-EMILI, 1989).

O tubo traqueal foi conectado a um pneumotacógrafo para pequenos animais, como descrito por Mortola e Noworaj (1983), para medida de fluxo aéreo ( $V'$ ), sendo o respirador acoplado à outra extremidade do pneumotacógrafo. Este é constituído por uma cânula metálica com duas saídas laterais ligadas a um transdutor diferencial de pressão, Validyne MP 45-2 (Engineering Corp, Northridge, CA, EUA), para medida de fluxo aéreo, sendo o volume corrente obtido por integração do sinal de fluxo. Através de outra saída lateral, a via aérea foi conectada a um transdutor diferencial de pressão Validyne MP45-2 (Engineering Corp, Northridge, CA, EUA) para medida da pressão traqueal ( $P_{tr}$ ).

Uma vez que não houve modificações abruptas no diâmetro do circuito, provavelmente foram evitados erros de medida da resistência ao fluxo (CHANG & MORTOLA, 1981; LORING *et al.*, 1979). O espaço morto do equipamento foi de 0,3 mL. Os sinais de  $V'$  e  $P_{tr}$  foram condicionados e amplificados em um polígrafo Beckman tipo R (Beckman Instruments, Schiller Park, IL, EUA). Os sinais foram, então, passados através de filtros Bessel de 8 pólos (902LPF, Frequency Devices, Haverhill, MA, EUA), convertidos de analógicos para digitais em conversor de 12 bits (DT-2801A, Data Translation, Malboro, MA, EUA) e armazenados em computador.

Todos os dados foram coletados usando o software LABDAT (RHT-InfoData Inc., Montreal, QC, Canadá) Uma representação da montagem experimental encontra-se na Figura 5.



**Figura 5. Montagem experimental consistindo de:**

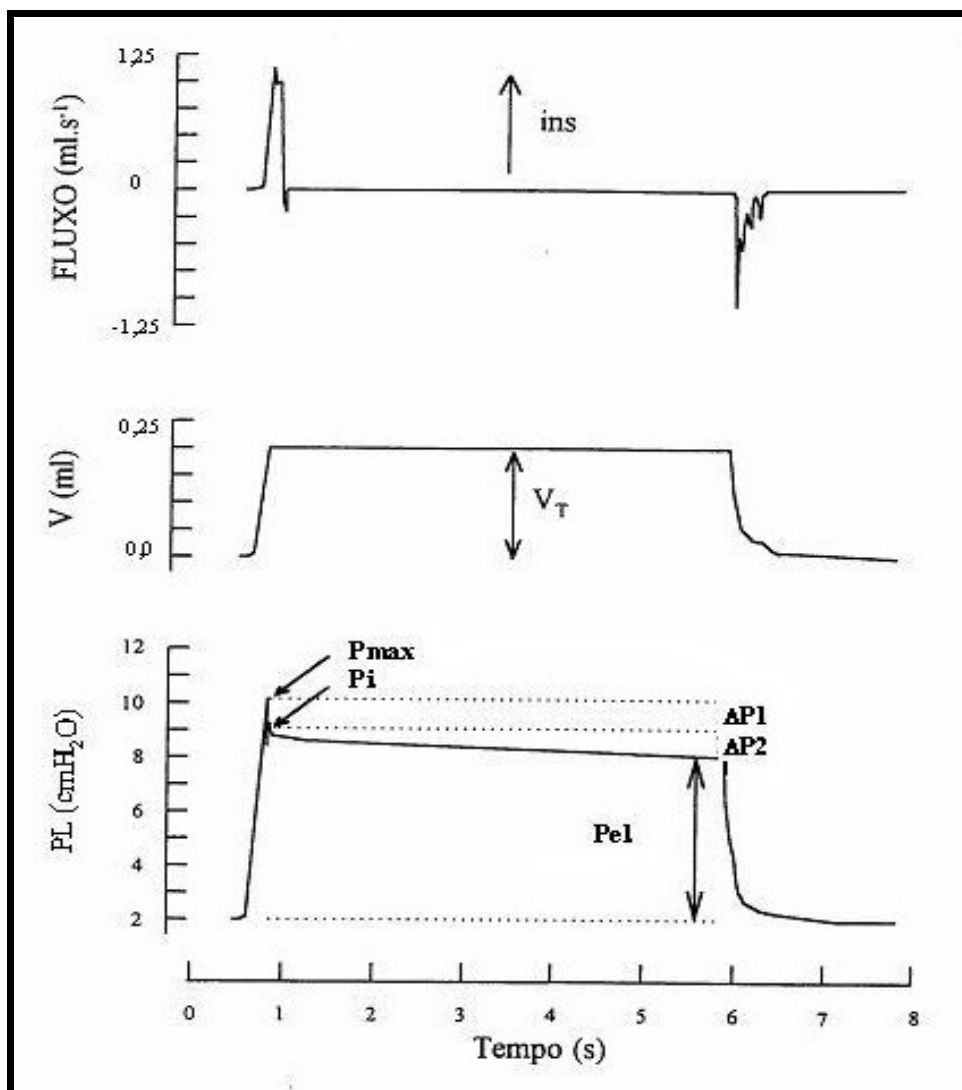
- 1 - Cilindro de ar comprimido.
- 2 - Válvula redutora de pressão.
- 3 - Ventilador de fluxo inspiratório constante composto por duas válvulas solenóides.
- 4 - Pneumotacógrafo.
- 5 - Peça em "T" para medida de pressão na abertura das vias aéreas.
- 6 - Cânula traqueal.
- 7 - Mesa cirúrgica.
- 8 - Transdutor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

13 - Microcomputador.

Os parâmetros da mecânica respiratória foram determinados 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a instilação intratraqueal de salina ou CYN. Para tanto, 10 ciclos respiratórios por animal foram captados e a análise efetuada pelo método de oclusão ao final da inspiração.

#### 4.3.1 Método de oclusão ao final da inspiração

O método de oclusão ao final da inspiração (BATES *et al.*, 1985a,b) permite analisar separadamente os componentes elástico, resistivo e viscoelástico e/ou inomogêneo do sistema respiratório. No animal com o tórax aberto, a  $P_{tr}$  é, na realidade, a pressão transpulmonar (PL), logo, todos os parâmetros medidos correspondem à mecânica pulmonar. Após a oclusão das vias aéreas ao final da inspiração, sob fluxo constante, ocorre uma queda súbita da PL até um ponto de inflexão ( $P_i$ ), a partir do qual o decaimento da pressão assume caráter mais lento, atingindo um platô em sua porção terminal. Esta fase de platô corresponde à pressão de retração elástica do pulmão ( $P_{el}$ ). A diferença de pressão, que caracteriza a queda rápida inicial ( $\Delta P_1$ ), é representada pela diferença entre a pressão máxima inicial ( $P_{max}$ ) e o ponto a partir do qual a queda se torna mais lenta ( $P_i$ ) e corresponde ao componente viscoso pulmonar. A segunda variação de pressão ( $\Delta P_2$ ), representada pela queda lenta, do  $P_i$  ao platô ( $P_{el}$ ), reflete a pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico (“*stress relaxation*”) e/ou inomogêneo (“*pendelluft*”) do tecido pulmonar. A soma de  $\Delta P_1$  e  $\Delta P_2$  fornece a variação total de pressão no pulmão ( $\Delta P_{tot}$ ) (Figura 6).



**Figura 6. Método de oclusão ao final da inspiração.** Registros dos sinais de fluxo aéreo, volume (V) e pressão transpulmonar (PL) em função do tempo. 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 de seu valor máximo ( $P_{\text{max}}$ ) até um ponto de inflexão ( $P_i$ ),  $\Delta P_1$ , que corresponde à pressão dissipada para vencer o componente viscoso do pulmão. Segue-se uma queda lenta ( $\Delta P_2$ ), pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico e/ou inomogêneo do pulmão, até um ponto de equilíbrio elástico, representado pela pressão de retração elástica pulmonar ( $P_{\text{el}}$ ). A linha de base do registro de pressão corresponde à pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2  $\text{cmH}_2\text{O}$ . Ins, inspiração.  $V_T$ , volume corrente.

As elastâncias estática (Est) e dinâmica (Edyn) do pulmão foram obtidas dividindo-se  $P_{el}$  e  $P_i$ , respectivamente, pelo volume corrente. O componente viscoelástico da elastância ( $\Delta E$ ) foi, então, obtido pela diferença entre Edyn e Est.

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

As seguintes fórmulas foram utilizadas na análise da mecânica pulmonar:

$$\Delta P_1 = P_{\max} - P_i$$

$$\Delta P_2 = P_i - P_{el}$$

$$\Delta P_{\text{tot}} = \Delta P_1 + \Delta P_2$$

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

$$Edyn = P_i / V_T$$

$$\Delta E = Edyn - Est$$

$$T_i = V_T / V'$$

Onde:

$\Delta P_1$  = variação de pressão utilizada para vencer o componente viscoso

$\Delta P_2$  = variação de pressão relativa ao componente viscoelástico e/ou inhomogêneo

$\Delta P_{\text{tot}}$  = variação de pressão total

$P_{\max}$  = pressão máxima atingida

$P_i$  = pressão no ponto de inflexão

$P_{el}$  = pressão de retração elástica

Est = elastância estática



$E_{dyn}$  = elastância dinâmica

$\Delta E$  = componente viscoelástico da elastância

$V_T$  = volume corrente

$T_I$  = tempo inspiratório

$V'$  = fluxo inspiratório

A resistência total do equipamento ( $R_{eq}$ ), incluindo a cânula traqueal, foi previamente aferida através da aplicação de fluxos de ar ao sistema, com concomitante registro das variações de pressão ( $\Delta P$ ). 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 (bem acima da faixa de fluxo utilizada no presente experimento), foi de 0,12 cmH<sub>2</sub>O/mL/s. A variação de pressão determinada pelo equipamento ( $\Delta P_{eq} = R_{eq} \cdot V'$ ) foi subtraída das pressões resistivas do pulmão, de tal forma que os resultados representam propriedades mecânicas intrínsecas.

Os parâmetros de mecânica pulmonar foram medidos 10 a 15 vezes em cada animal, sendo cada animal representado pela média de 10 a 15 ciclos respiratórios coletados. Os valores finais foram expressos como média + erro padrão da média (EPM) de 5-7 animais por grupo nos grupos SAL e CYN.

#### 4.4 ESTUDO HISTOLÓGICO

##### 4.4.1 Fixação e preparo das lâminas para microscopia óptica

Após a determinação da mecânica pulmonar, os animais foram heparinizados (1000 IU de heparina injetados na veia cava inferior) e, em seguida, sacrificados por seção da aorta abdominal e da veia cava inferior. A traquéia foi ocluída ao final da expiração com fio de algodão. 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 foi 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 pulmões dos animais foram congelados por imersão rápida em nitrogênio líquido (aproximadamente 3 min), retirados e mantidos em solução de Carnoy (etanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%) a -70° C por 24 h. Após esse período, o material foi desidratado progressivamente através de imersão em soluções com concentração crescente de etanol:

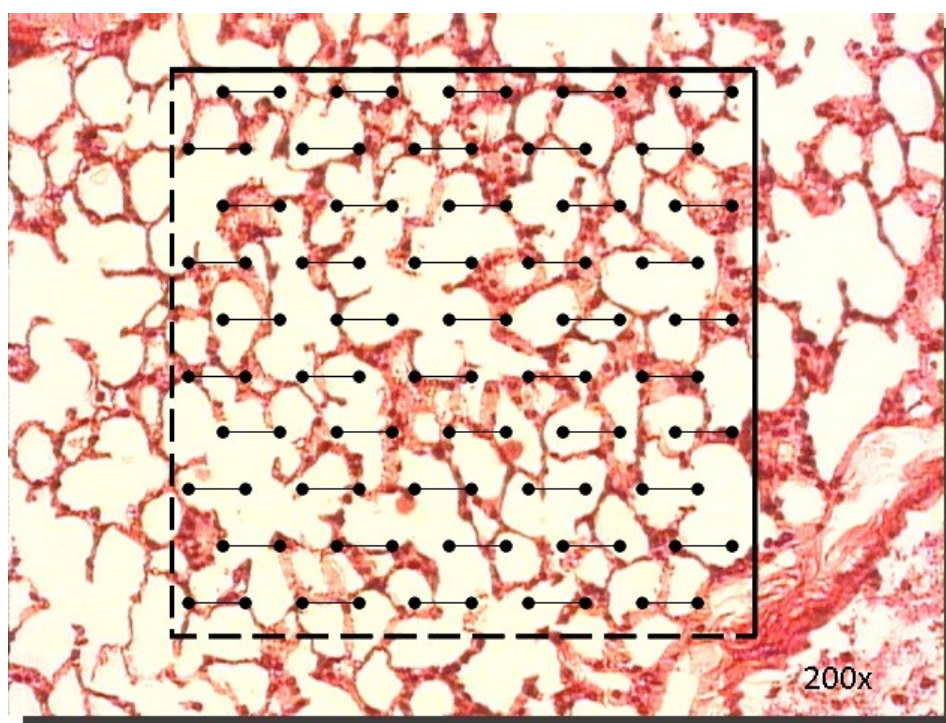
- MC-1: etanol 70%, clorofórmio 22,5% e ácido acético 7,5%, a -20°C durante 1 h;
- MC-2: etanol 80%, clorofórmio 15% e ácido acético 5%, a -20°C durante 1 h;
- MC-3: etanol 90%, clorofórmio 7,5% e ácido acético 2,5%, a -20°C durante 1 h;
- etanol a 100%, a -20°C durante 1 h e, em seguida, a -4°C durante 24 h;
- formol a 10% tamponado- Millonig (100 mL de formol 40%, 18,6 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 4,2 g de NaOH e 900 mL de água destilada) até a obtenção dos cortes pulmonares em parafina.

Depois da fixação, o material foi processado como de rotina para estudo histológico e emblocado em parafina, obtendo-se, então, cortes histológicos com 4 µm de espessura.

As lâminas contendo os cortes pulmonares foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e analisadas por microscopia óptica (Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Alemanha), segundo seus aspectos qualitativos e quantitativos.

#### 4.4.2 Análise histológica

Para a análise qualitativa, toda a superfície da lâmina foi observada com todas as estruturas pulmonares representadas em aumento de 200x. A análise quantitativa morfométrica e de celularidade, nas lâminas coradas com HE, foi realizada por meio da técnica convencional de contagem de pontos (*"point-counting"*) (GUNDERSEN *et al.*, 1988), utilizando uma ocular contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 linhas dispostos em paralelo (Figura 7).



**Figura 7.** Retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para análise histológica de morfometria e celularidade pulmonar.

Para a análise morfométrica do parênquima pulmonar, foram avaliados dez campos aleatórios e não coincidentes por lâmina, em aumento de 200x. Foi quantificado o número de pontos que caíam sobre alvéolos normais e colapsados, sendo o resultado expresso em percentual do número total de pontos analisados.

Para quantificação da celularidade total e do número de células polimorfonucleares e mononucleares no tecido pulmonar, foram avaliados, em um aumento de 1000x, dez campos aleatórios e não coincidentes por lâmina. Primeiramente, foi contabilizado o número de pontos que caíam sobre o tecido, de modo a ser calculada a área total de tecido. Em seguida, células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN) foram contabilizadas no septo alveolar em todo o campo, sendo o valor final expresso em número de células/área de tecido em  $\mu\text{m}^2$ .

Para cada parâmetro histológico, um único observador foi responsável pela análise cega dos dados. Em todas as análises os valores apresentados são média + erro padrão da média (EPM) de 5-7 lâminas por grupo, sendo cada animal representado por apenas uma lâmina.

#### 4.5 ENSAIOS BIOQUÍMICOS DE ESTRESSE E DANO OXIDATIVO

Para esta análise, bem como para a análise do conteúdo de CYN por ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”), 30 camundongos ( $25 \pm 5$  g) adicionais foram submetidos a protocolo experimental igual ao descrito anteriormente, e analisados 2, 8, 24, 48 e 96 h após a instilação ( $n=5$  por grupo). O pulmão esquerdo de cada animal foi separado para as medidas de estresse e dano oxidativo e o pulmão direito, bem como o fígado, foram separados para a análise do conteúdo de CYN por ELISA.

As análises de estresse oxidativo no pulmão foram realizadas no Laboratório de Reparo Tecidual, Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Para análise do desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes foram realizados ensaios bioquímicos que medem a atividade das enzimas antioxidantes ou de

marcadores de estresse e dano oxidativo. O estresse oxidativo foi mensurado por atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Já o dano oxidativo foi avaliado pela determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Analisamos, ainda, a atividade da mieloperoxidase (MPO), enzima lisossomal envolvida na atividade bactericida de polimorfonucleares.

Para estas análises, os brônquios principais direito e esquerdo foram ocluídos com fio de algodão e os pulmões separados. O pulmão esquerdo foi removido e homogeneizado (homogeneizador modelo NT 136, Novatécnica, São Paulo, Brasil) com solução tampão (fosfato de potássio 100 mM + EDTA 5 mM, solução final 1 mL) e centrifugado (centrífuga modelo 243M, FANEM, São Paulo, Brasil) a 7000 g durante dez minutos. O material precipitado foi descartado e o sobrenadante utilizado para análise. Ao final, foi medida a quantidade de proteína em cada amostra.

#### **4.5.1 Dosagem de proteínas**

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), que consiste na interação entre o corante *coomassie brilliant blue* G-250 e macromoléculas de proteínas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante estabiliza a forma aniônica do mesmo, causando uma visível mudança de coloração inicialmente castanha para tons de azul, de acordo com a concentração de proteína. G-250 ligado à proteína tem sua absorbância alterada de 465 nm para 595 nm. Em uma placa de 96 poços, prepara-se a curva padrão com albumina (1 mg/mL) em triplicata e, em seguida, o poço teste (200 µL de reagente Bradford e amostra). Após completa mistura, observa-se se o tom de azul do poço teste está entre o menor ou o maior valor da curva padrão. Uma vez

estabelecido o valor da amostra, distribui-se os diferentes grupos nos poços em duplicata com volume final de 200  $\mu$ L, colocando-se primeiramente o reagente Bradford (maior quantidade) e por último a amostra (menor quantidade). Com auxílio de uma pipeta faz-se a homogeneização. A leitura da placa foi realizada com leitor de ELISA (Modelo 550, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) no comprimento de onda de 595 nm.

#### **4.5.2 Medida de dano oxidativo**

O dano oxidativo foi mensurado através da peroxidação lipídica, a qual é avaliada pela concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA) (DRAPER & HADLEY, 1990). O ácido tiobarbitúrico reage com lipídios de membrana oxidados, gerando um subproduto da lipoperoxidação (malondialdeído, MDA). O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), gerando um produto de cor rosa analisado em espectrofotômetro (Ultrospec 2100 pro, Amersham-Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra). Alíquotas do homogeneizado pulmonar dos grupos SAL e CYN, nos respectivos tempos (200  $\mu$ L), foram desproteinizadas com 800  $\mu$ L de 10% de ácido tricloroacético e centrifugadas a 900 g por dez minutos. O sobrenadante (500  $\mu$ L) foi misturado com 500  $\mu$ L de TBA 0,67%. A mistura foi aquecida por 30 min em água fervente e, então, resfriada em temperatura ambiente por 5 min. A fase orgânica, contendo o cromógeno rosa, foi extraída com 750  $\mu$ L de n-butanol e a absorbância em 532 nm mensurada utilizando-se o espectrofotômetro (Ultrospec 2100 pro, Amersham-Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra). A concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbiturico (nmol/mg proteína) foram expressos com base em uma curva padrão de malondialdeído purificado.

#### **4.5.3 Superóxido dismutase (SOD)**

A análise bioquímica que avalia a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) foi feita a partir da inibição da auto-oxidação da adrenalina. Homogenatos pulmonares dos seis grupos experimentais (diferentes volumes: 10, 20 e 30  $\mu$ L) foram diluídos em tampão glicina (ácido amino acético 3,75 mg/mL + 200 mL de água destilada, em pH = 10,2), catalase (2,4 mg/mL de água destilada) e adrenalina (60 mM). Foi realizada uma curva cinética desta enzima, mensurada a cada 10 segundos, durante 3 minutos para cada amostra. A mudança de cor na mistura foi detectada por espectrofotômetro, através da absorbância em 480 nm. Os valores de SOD foram corrigidos pelo valor da proteína de cada amostra (U SOD/mg proteína) (BANNISTER & CALABRESE, 1987).

#### **4.5.4 Catalase (CAT)**

A análise bioquímica que avalia a atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) foi realizada através da mensuração do consumo de peróxido de hidrogênio (AEBI, 1984). Os produtos gerados pela catálise liberam energia e apresentam absorbância de 240 nm, sendo determinados através de um espectrofotômetro. Assim, misturou-se 60  $\mu$ L do homogenato pulmonar dos seis grupos experimentais com tampão fosfato e peróxido de hidrogênio 1,4  $\mu$ L/mL. Os valores de CAT foram corrigidos pelo valor de proteína de cada amostra (U CAT/mg proteína).

#### 4.5.5 Mieloperoxidase (MPO)

Alíquotas do homogenato pulmonar (100 µL) foram submetidas à adição de 0,5 mL de HTBA (brometo de cetildimetiletilamônio) em temperatura ambiente por 20 min. Após esse período, as amostras foram acondicionadas em estufa a 60°C por 2 horas. O material foi, então, centrifugado a 14000 g por 15 min. O sobrenadante (600 µL) foi adicionado a 450 µL de TMB (3,4,5-ácido trimetoxibenzóico, 8-dietilamina-octil éster) e o substrato foi lido em leitor de ELISA (Modelo 550, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) a 655 nm. Os resultados foram referenciados com base em uma curva padrão de mieloperoxidase vs. neutrófilos. Para a curva padrão, foi utilizada mieloperoxidase purificada. O resultado foi expresso como atividade de MPO (U/mg proteína) (SUZUKI *et al.*, 1983).

#### 4.6 ANÁLISE DE CYN POR ELISA

Para esta análise, o pulmão direito e o fígado foram homogeneizados (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 inibidor de protease PMSF (0,1 mM) em banho de gelo, utilizando-se homogeneizador Tissue Miser (Fisher Scientific, Hampton, NH, USA). O homogenato resultante foi centrifugado a 10000 g e o sobrenadante (citossol) obtido armazenado em freezer a – 20°C até o momento da análise.

Amostras de citossol pulmonar e hepático foram analisadas por ELISA para a detecção de CYN. O método utiliza anticorpos policlonais de coelho anti-CYN, com reatividade cruzada também contra os congêneres de cilindropermopsina. O método ELISA competitivo direto, utilizado para estas análises, identifica o antígeno (cilindropermopsina) através de uma combinação de anticorpos secundários (anti-IgG) e anticorpos primários anti-CYN. Foram utilizados kits de ELISA comerciais



(Beacon Analytical Systems, Portland-ME, EUA), seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. O limite de quantificação deste método corresponde a 15 µg/L.

A quantificação do conteúdo CYN no pulmão e no fígado foi realizada no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Sigma Stat 3.11 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA). Os valores finais foram expressos como média + 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. Caso ambas as condições fossem satisfeitas, era aplicada análise de variância para um fator (one-way ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas, quando necessário. Caso contrário, era utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ANOVA “on Ranks”, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas.

Os parâmetros de morfometria foram submetidos inicialmente à transformada arcoseno para torná-los aproximadamente normais e posteriormente comparados, utilizando-se os métodos descritos acima.

Em todos os testes, o nível de significância considerado foi de 5%.

# RESULTADOS

## 5 RESULTADOS

### 5.1 MECÂNICA RESPIRATÓRIA

No intuito de avaliar temporalmente os efeitos decorrentes da instilação i.t. de CYN sobre a função pulmonar de camundongos, foram medidos os parâmetros da mecânica pulmonar *in vivo*.

Foi realizado um estudo piloto prévio somente com animais instilados com 50 µL de solução salina fisiológica (0,9 % NaCl). Estes foram subdivididos em 2, 8, 24, 48 e 96 horas, de acordo com o tempo decorrido entre a instilação i.t. e a realização dos experimentos. Como não foi observada diferença significativa nos parâmetros de mecânica pulmonar entre os tempos analisados nos experimentos seguintes, optamos por escolher os animais expostos a 96 h para representar o grupo SAL (n=7).

Os valores de volume e fluxo utilizados durante o experimento são mostrados na Tabela 1 e não variaram significativamente entre os grupos estudados.

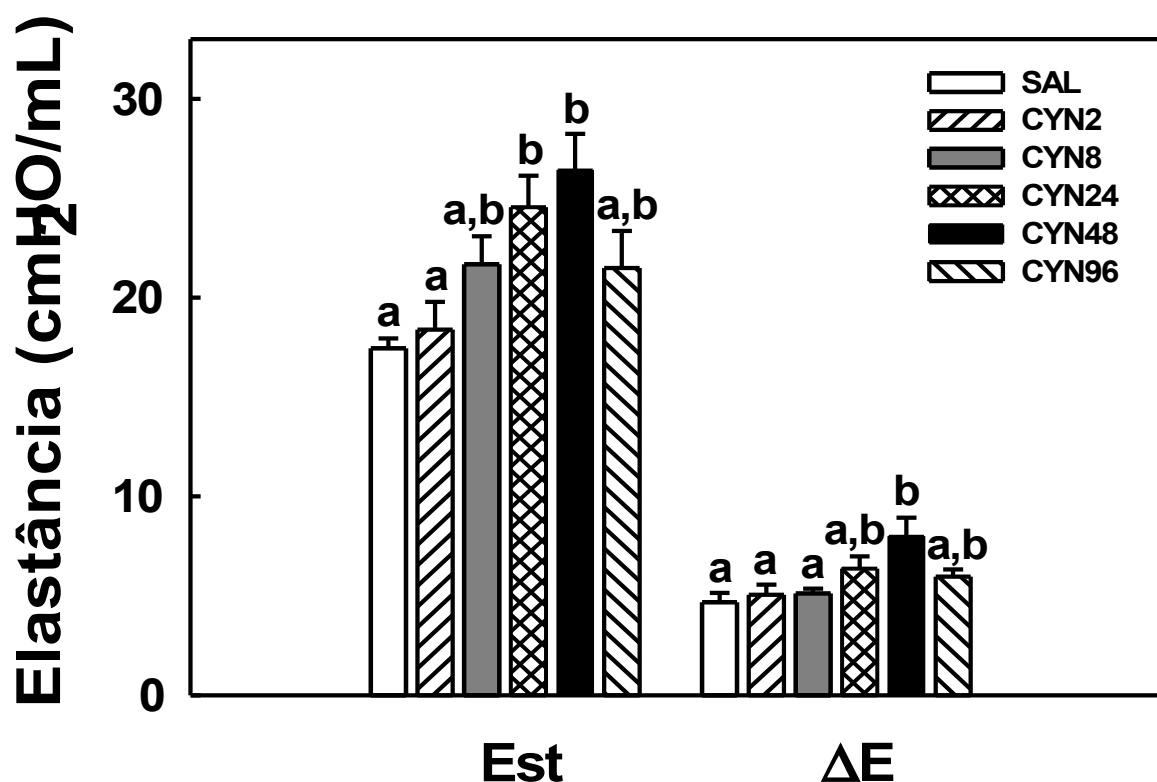
**Tabela 1:** Fluxo e volume nos animais estudados.

	Fluxo (mL/s)	Volume (mL)
SAL	1,00 ± 0,01	0,20 ± 0,01
CYN2	1,01 ± 0,01	0,20 ± 0,01
CYN8	1,00 ± 0,01	0,19 ± 0,01
CYN24	1,01 ± 0,01	0,20 ± 0,01
CYN48	1,01 ± 0,01	0,20 ± 0,01
CYN96	1,00 ± 0,01	0,20 ± 0,01

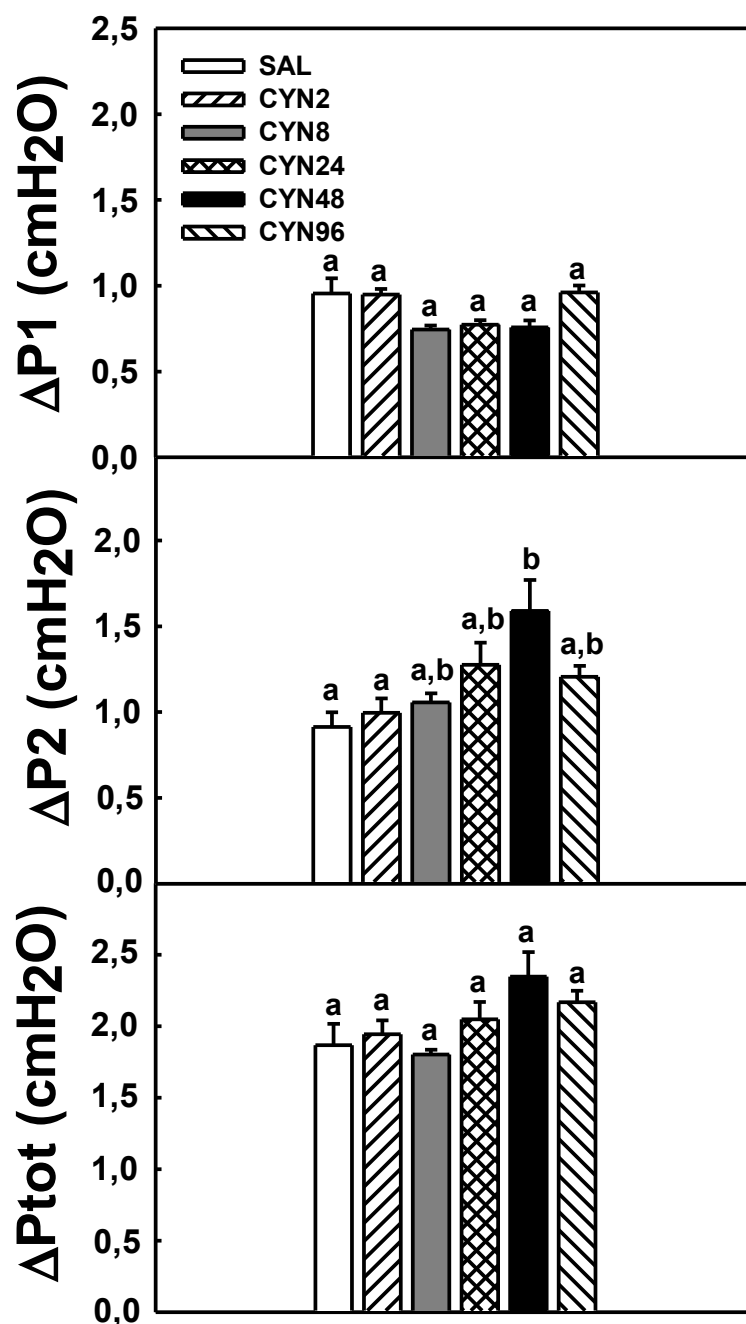
Os valores representam média ± EPM de 5-7 animais por grupo (10 determinações por animal). Os animais receberam instilação intratraqueal de salina (SAL; 0,9 % NaCl - 50 µL), ou de extrato semi-purificado de cilindrospermopsina (CYN; 70 µg/kg de peso corpóreo). As análises foram realizadas 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a instilação i.t. SAL (n=7), CYN2 (n=5), CYN8 (n=5), CYN24 (n=5), CYN48 (n=4) e CYN96 (n=7) (p<0,05).

Os parâmetros de mecânica pulmonar ( $Est$ ,  $\Delta E$ ,  $\Delta P1$ ,  $\Delta P2$  e  $\Delta P_{tot}$ ) observados nos animais dos grupos SAL e CYN, nos respectivos tempos, estão representados nas Figuras 8 e 9. A Figura 8 mostra a elastância ( $Est$ ) e o componente viscoelástico da elastância ( $\Delta E$ ).  $Est$  foi significativamente maior nos animais dos grupos CYN24 e CYN48, quando comparados com SAL, demonstrando que a lesão provocada pela CYN fez com que os pulmões ficassem mais rígidos após 24 horas, ocorrendo o pico deste efeito em 48 horas de exposição à toxina. Da mesma forma, o grupo CYN48 mostrou aumento significativo de  $\Delta E$  em relação ao SAL.

O grupo CYN48 apresentou, ainda, aumento significativo de pressão necessária para vencer os componentes viscoelásticos e/ou inomogêneos ( $\Delta P2$ ) em relação ao grupo SAL (Figura 9), indicando alteração da função relacionada à periferia pulmonar 48 h após a instilação de CYN. Não houve diferença significativa entre os grupos CYN2 e SAL, nem entre CYN8, CYN24 e CYN96 em relação a SAL e CYN48. Para os valores de pressão necessária para vencer o componente resistivo, relacionado às vias aéreas mais centrais ( $\Delta P1$ ), e variação de pressão total no pulmão do pulmão ( $\Delta P_{tot}$ ), não foi observada diferença significativa entre os grupos analisados. Os dados de mecânica pulmonar de cada animal, separadamente, são apresentados no anexo A.



**Figura 8.** Elastância estática (Est) do pulmão e componente viscoelástico da elastância ( $\Delta E$ ). Os valores representam média + EPM de 5-7 animais por grupo (10 determinações por animal). Os animais receberam instilação intratraqueal de salina (SAL; 0,9 % NaCl - 50  $\mu$ L), ou de extrato semi-purificado de cilindrospermopsina (CYN; 70  $\mu$ g/kg de peso corpóreo). As análises foram realizadas 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a instilação i.t. SAL (n=7), CYN2 (n=5), CYN8 (n=5), CYN24 (n=5), CYN48 (n=4) e CYN96 (n=7). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).



**Figura 9.** Pressões necessárias para vencer o componente resistivo ( $\Delta P_1$ ), viscoelástico/inomogêneo ( $\Delta P_2$ ) e total ( $\Delta P_{tot}$ ) do pulmão. Os valores representam média + EPM de 5-7 animais por grupo (10 determinações por animal). Os animais receberam instilação intratraqueal de salina (SAL; 0,9 % NaCl - 50  $\mu$ L), ou de extrato semi-purificado de cilindrospermopsina (CYN; 70  $\mu$ g/kg de peso corpóreo). As análises foram realizadas 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a instilação i.t. SAL (n=7), CYN2 (n=5), CYN8 (n=5), CYN24 (n=5), CYN48 (n=4) e CYN96 (n=7). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

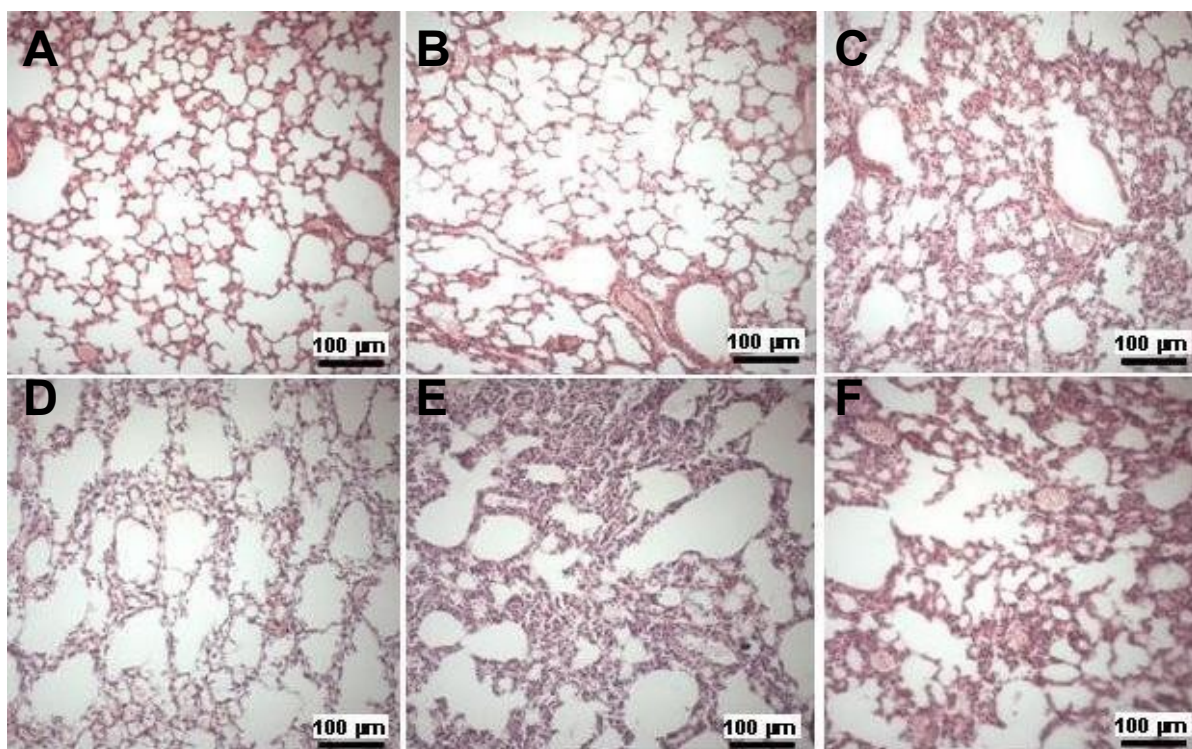
## 5.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Visando a fundamentar os achados funcionais e avaliar o comprometimento tecidual decorrente da administração intratraqueal de CYN, foram realizadas análises qualitativas e quantitativas no tecido pulmonar.

### 5.2.1 Análise qualitativa

A Figura 10 apresenta fotomicrografias do parênquima pulmonar dos grupos SAL e CYN, nos respectivos tempos. Podemos notar que a administração i.t. de CYN provocou inflamação do parênquima pulmonar, evidenciada pela presença de espessamento de septo e edema alveolar nos grupos CYN. Além disso, os animais do grupo CYN48 apresentaram maior área de colapso alveolar em comparação com os demais.





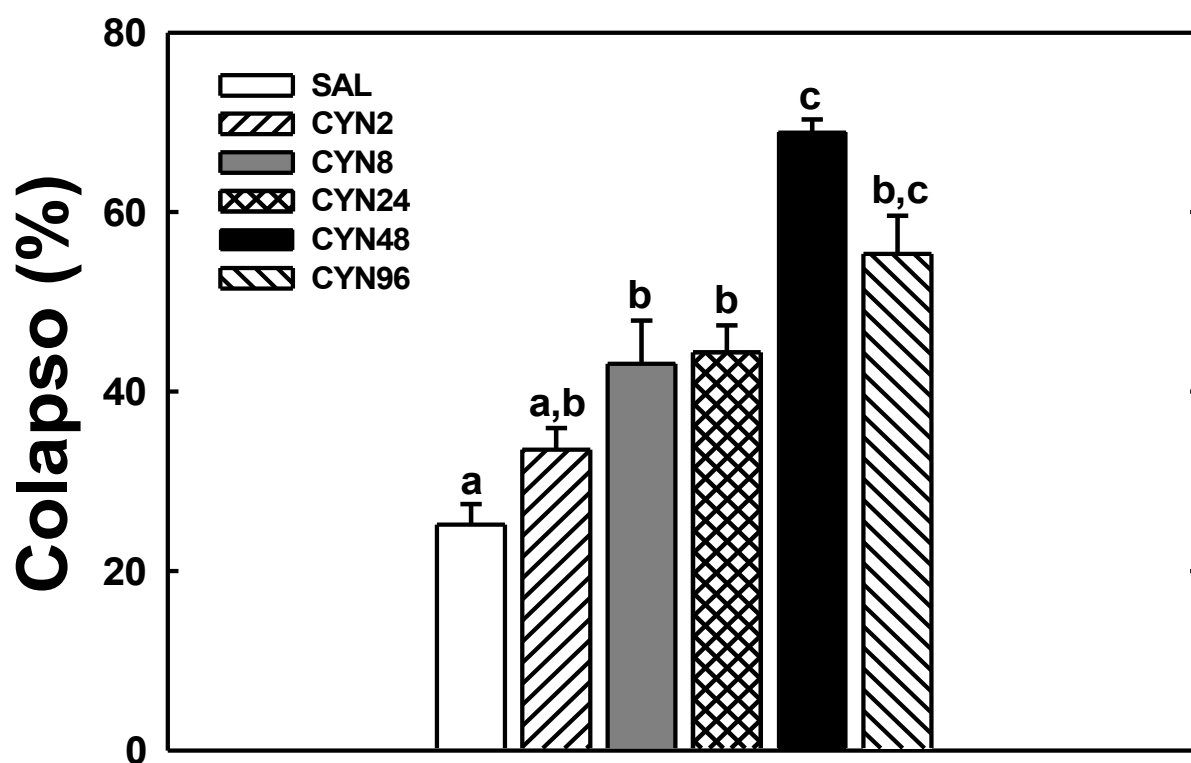
**Figura 10.** Fotomicrografias de parênquima pulmonar (200x) corada com hematoxilina-eosina. A) SAL, B) CYN2, C) CYN8, D) CYN24, E) CYN48 e F) CYN96. As análises foram realizadas 2, 8, 24, 48 e 96 h após a instilação i.t. de salina ou extrato semi-purificado de cilindrospermopsina (CYN; 70 µg/kg de peso corpóreo).

### 5.2.2 Análise quantitativa

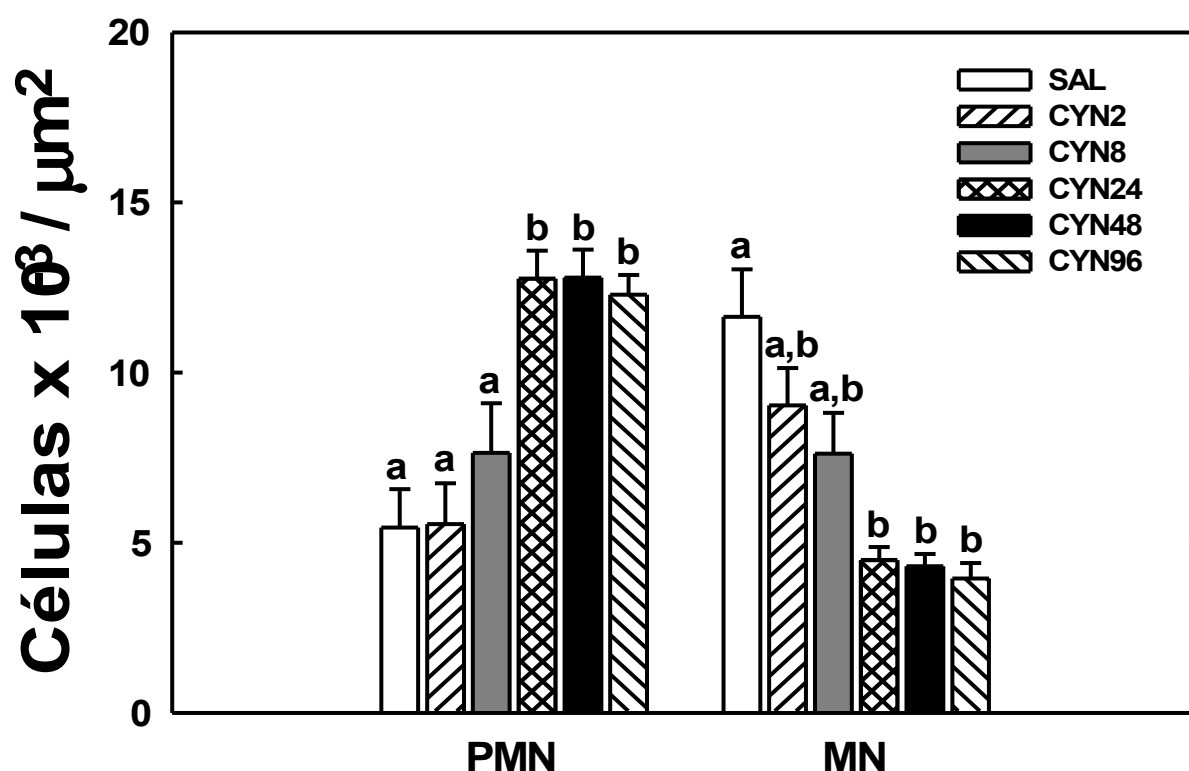
As Figuras 11 e 12 apresentam as análises histológicas quantitativas do parênquima pulmonar dos animais dos grupos SAL e CYN, nos respectivos tempos.

A partir de 8 horas após a instilação intratraqueal de CYN, observou-se aumento gradual de colapso alveolar, alcançando o pico do efeito em 48 horas. Logo após, houve redução do mesmo em 96 horas, porém sem retornar ao nível de SAL (Figura 11). A fração de área de alvéolos normais foi significativamente menor nos grupos CYN em comparação ao SAL.

Além disso, foi observado um aumento significativo do número de células inflamatórias polimorfonucleares (PMN) nos alvéolos e septos alveolares a partir de 24 horas após instilação i.t. de CYN, sem retornar ao nível de SAL (Figura 12). Os dados de cada animal individualmente são apresentados nos anexos B e C.



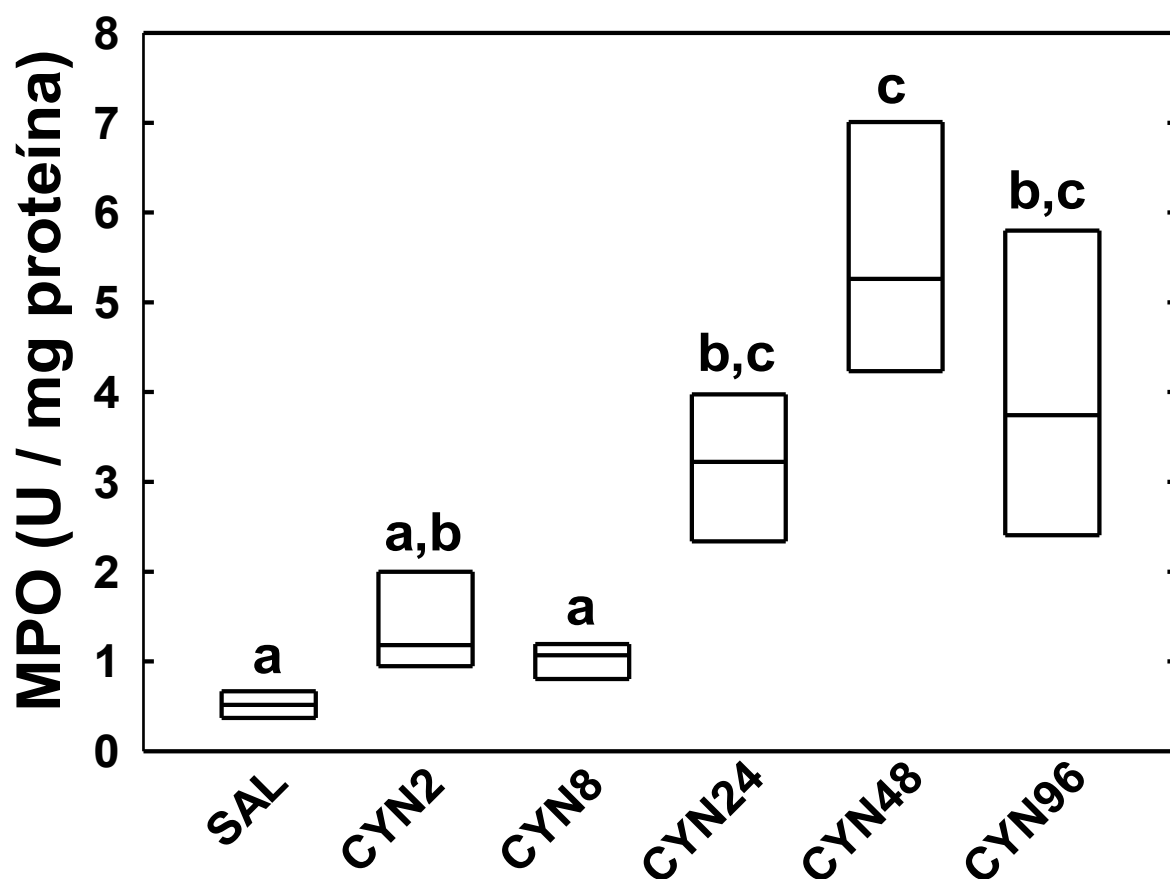
**Figura 11.** Percentual de alvéolos colapsados, sendo 100% o número total de alvéolos de cada campo. Os valores representam média + EPM de 5-7 animais por grupo (10 campos não-coincidentes por animal). Os animais receberam instilação intratraqueal de salina (SAL; 0,9 % NaCl - 50  $\mu$ L), ou de extrato semi-purificado de cilindrospermopsina (CYN; 70  $\mu$ g/kg de peso corpóreo). As análises foram realizadas 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a instilação i.t. SAL (n=7), CYN2 (n=5), CYN8 (n=5), CYN24 (n=5), CYN48 (n=4) e CYN96 (n=7). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).



**Figura 12.** Percentual de células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN). Os valores representam média + EPM de 7-9 animais por grupo (10 campos não-coincidentes por animal). Os animais receberam instilação intratraqueal de salina (SAL; 0,9 % NaCl - 50  $\mu$ L), ou de extrato semi-purificado de cilindrospermopsina (CYN; 70  $\mu$ g/kg de peso corpóreo). As análises foram realizadas 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a instilação i.t. SAL (n=7), CYN2 (n=5), CYN8 (n=5), CYN24 (n=5), CYN48 (n=4) e CYN96 (n=7). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

### **5.2.3 Atividade da mieloperoxidase**

Visando a avaliar a resposta inflamatória induzida por CYN, quantificamos a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), importante indicadora da presença de neutrófilos nos tecidos. Notamos que os grupos que receberam CYN apresentaram maior atividade de MPO em relação ao grupo SAL, a partir de 24 h (Figura 13). Os valores de cada animal encontram-se no anexo D.



**Figura 13.** Atividade da mieloperoxidase (MPO) no pulmão de animais que receberam instilação intratraqueal de salina (SAL; 0,9 % NaCl - 50  $\mu$ L) ou extrato semi-purificado de cilindrospermopsina (CYN; 70  $\mu$ g/kg de peso corpóreo). As análises foram realizadas 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a instilação i.t. SAL (n=5), CYN2 (n=5), CYN8 (n=5), CYN24 (n=4), CYN48 (n=5) e CYN96 (n=5). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

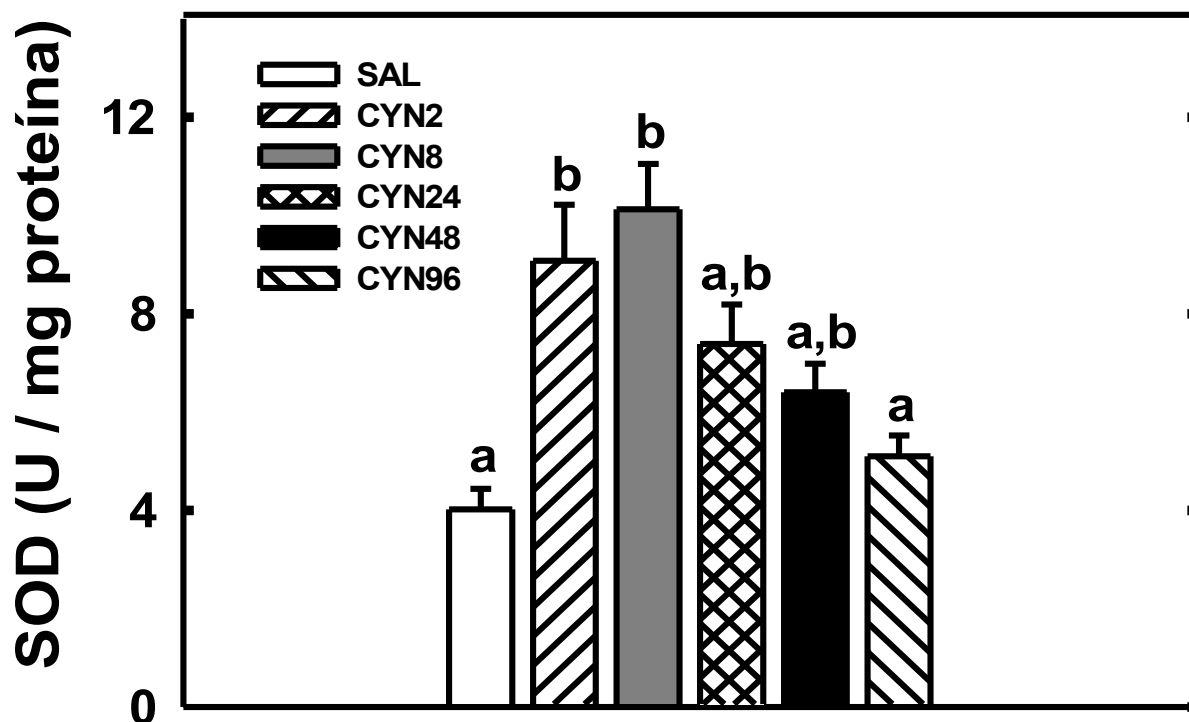
### 5.3 ENSAIOS BIOQUÍMICOS DE ESTRESSE E DANO OXIDATIVO

Visando a avaliar o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes sofrido pelo pulmão após exposição à CYN, foram realizados ensaios bioquímicos que medem a atividade das enzimas antioxidantes ou de marcadores de estresse e dano oxidativo.

A figura 14 mostra a atividade da superóxido dismutase (SOD). A atividade desta enzima aumentou significativamente em 2 e 8 horas após exposição à CYN, comparados com SAL e os demais tempos decorridos da exposição. Foi possível observar que a atividade desta enzima retorna ao nível de SAL 24 h após exposição à toxina. Os dados de cada animal separadamente são apresentados no anexo E.

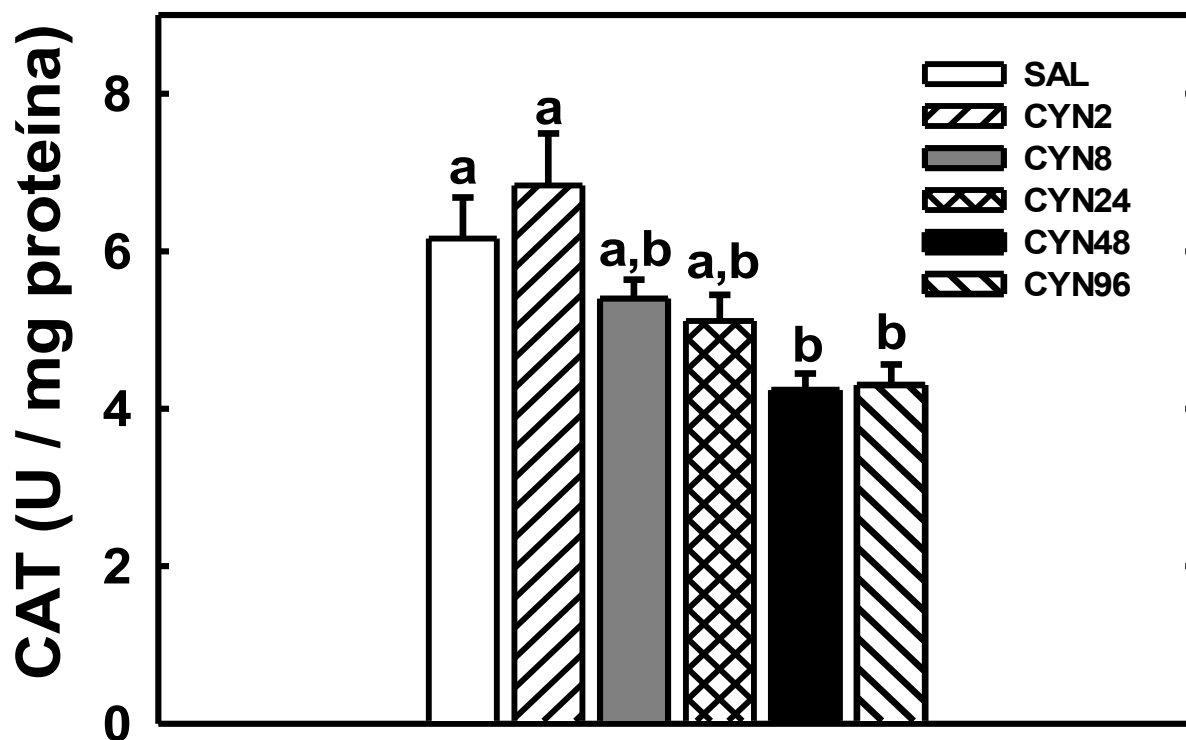
A figura 15 apresenta a atividade de catalase (CAT) no pulmão. A atividade da catalase diminuiu significativamente após 48 horas de exposição à CYN, comparada com SAL. Os valores de cada animal encontram-se no anexo F.

Na figura 16, observa-se maior dano oxidativo a partir de 8 horas, representado por uma maior concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este dano perdura até 48 horas após a administração i.t. de CYN. Os valores de cada animal encontram-se no anexo G.

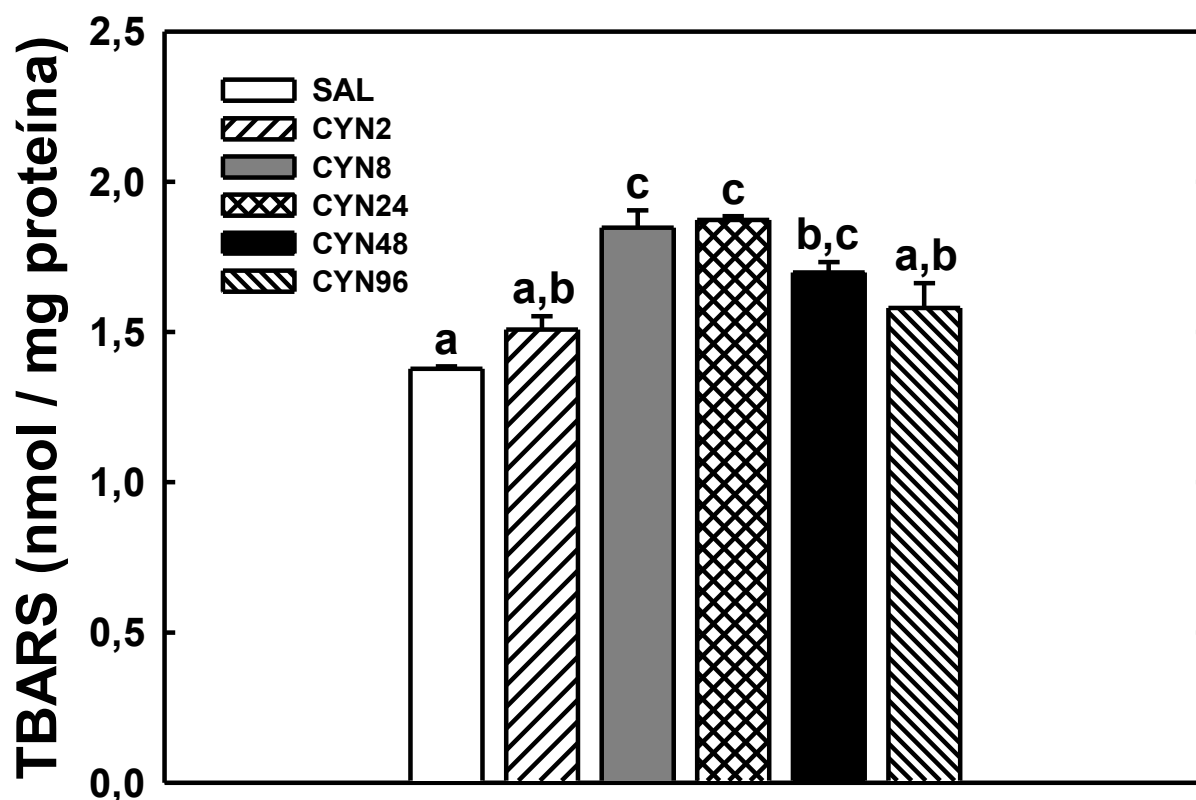


**Figura 14:** Atividade da superóxido dismutase (SOD) no pulmão de animais que receberam instilação intratraqueal de salina (SAL; 0,9 % NaCl - 50  $\mu$ L) ou extrato semi-purificado de cilindrospermopsina (CYN; 70  $\mu$ g/kg de peso corpóreo). As análises foram realizadas 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a instilação i.t. SAL (n=5), CYN2 (n=5), CYN8 (n=5), CYN24 (n=5), CYN48 (n=4) e CYN96 (n=5). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ( $p<0,05$ ).





**Figura 15.** Atividade de catalase no pulmão de animais que receberam instilação intratraqueal de salina (SAL; 0,9 % NaCl - 50  $\mu$ L) ou extrato semi-purificado de cilindropermopsina (CYN; 70  $\mu$ g/kg de peso corpóreo). As análises foram realizadas 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a instilação i.t. SAL (n=5), CYN2 (n=5), CYN8 (n=5), CYN24 (n=4), CYN48 (n=5) e CYN96 (n=5). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

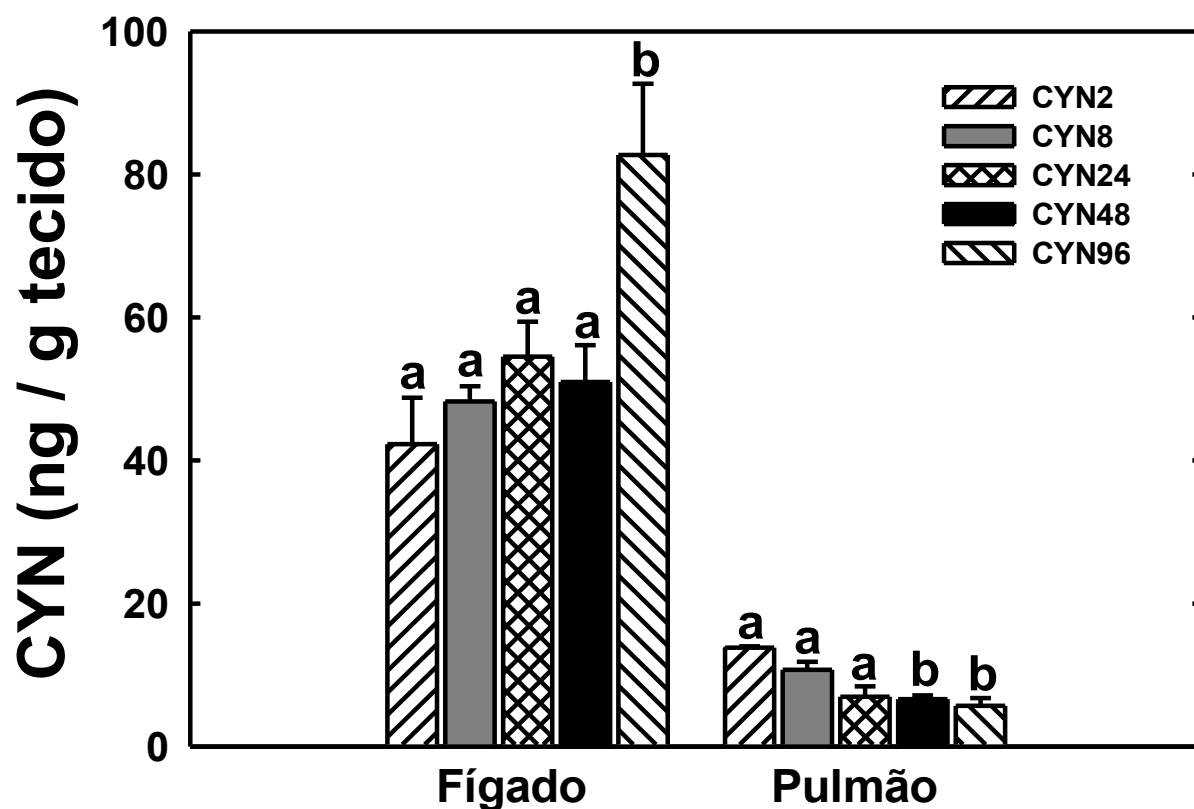


**Figura 16:** Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no pulmão de animais que receberam instilação intratraqueal de salina (SAL; 0,9 % NaCl - 50  $\mu$ L) ou extrato semi-purificado de cilindropermopsina (CYN; 70  $\mu$ g/kg de peso corpóreo). As análises foram realizadas 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a instilação i.t. SAL (n=5), CYN2 (n=5), CYN8 (n=5), CYN24 (n=5), CYN48 (n=4) e CYN96 (n=5). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4 QUANTIFICAÇÃO DE CILINDROSPERMOPSINA POR ELISA

Com o intuito de avaliar a presença de CYN nos pulmões e no fígado dos camundongos, utilizamos um método imunoenzimático sensível e específico. A análise por ELISA detectou a presença de CYN no homogenato dos pulmões e fígado de animais dos seis grupos estudados. No pulmão, foi observada maior concentração de CYN no tempo de 2 horas após a instilação i.t. da toxina. Esta concentração diminuiu gradualmente ao longo dos tempos analisados, sendo significativamente menor nos grupos CYN24, CYN48 e CYN96, comparados com os demais.

A análise do fígado evidenciou a presença de CYN em todos os tempos analisados, sendo significativamente maior 96 horas após a exposição à CYN, em relação aos demais tempos amostrais (Figura 17). Os dados de cada animal para pulmão e fígado são apresentados separadamente nos anexos H e I, respectivamente.



**Figura 17.** Análise quantitativa de CYN no pulmão e fígado pelo método ELISA. O gráfico mostra a concentração da toxina nos tecidos dos animais submetidos à instilação i.t. de extrato semi-purificado de cilindrospermopsina (CYN; 70  $\mu\text{g/kg}$  de peso corpóreo). As análises foram realizadas 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a instilação i.t. CYN2 (n=5), CYN8 (n=5), CYN24 (n=5), CYN48 (n=5) e CYN96 (n=5). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

# DISCUSSÃO

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo é inédito por mostrar as repercussões pulmonares decorrentes da exposição à dose subletal de CYN em camundongos previamente saudáveis. Observamos alteração da função pulmonar, com aumento de elastância e viscoelasticidade, indicando uma maior dificuldade para a insuflação pulmonar. As alterações funcionais foram provavelmente secundárias à presença de colapso alveolar e inflamação do parênquima pulmonar, caracterizada por edema e influxo de células inflamatórias. A exposição à toxina também levou ao aumento da atividade da enzima MPO e produção de espécies reativas de oxigênio, indicando presença de estresse e dano oxidativos no tecido pulmonar.

Os camundongos utilizados neste estudo sofreram randomização no tocante ao efeito da administração de salina ou extrato semi-purificado de CYN, entretanto, alguns animais morreram após anestesia. Não houve óbito após injeção de CYN, uma vez que a dose escolhida está abaixo da  $DL_{50}$ .

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 seres humanos. O fácil manejo e a possibilidade de controlar as variáveis ambientais, sociais e patológicas em animais de experimentação também justificaram, no nosso experimento, a escolha de pequenos animais. Algumas espécies de camundongo e rato têm sido utilizadas para avaliar os efeitos da CYN nos diferentes sistemas, de modo que já são conhecidos os valores da  $DL_{50}$  desta toxina. Sendo assim,

escolhemos camundongos BALB/c machos adultos, os quais são comumente utilizados para estudos com CYN 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 ser isogênica. Para alguns estudos, esta pode ser uma característica importante para a correta interpretação dos resultados, uma vez que o padrão de resposta observado não apresentará grande variabilidade em cada tratamento. Neste estudo, a utilização de cinco a sete camundongos por grupo foi suficiente para detectar diferenças significativas entre os mesmos.

No presente estudo, medidas da função pulmonar foram usadas como instrumentos para analisar os efeitos decorrentes da administração i.t. de CYN. Mensurar parâmetros da função pulmonar em animais tão pequenos quanto os camundongos representa um desafio. Entretanto, está comprovado que, com o equipamento adequado, como foi o caso do presente estudo, as medidas são fiéis e fornecem informações importantes para a compreensão dos mecanismos envolvidos nas doenças pulmonares (IRVIN & BATES, 2003).

Foi observado aumento significativo dos parâmetros de função pulmonar nos grupos CYN após 24 h decorridas da exposição à toxina, em relação ao SAL (Figuras 8 e 9). O método de oclusão das vias aéreas ao final da inspiração apresenta a vantagem de individualizar variações de pressões em seus componentes resistivos, elásticos e viscoelásticos e/ou inomôgeneos (BATES *et al.*, 1985a). Detectamos aumento na elastância estática (Est), componente viscoelástico da elastância ( $\Delta E$ ) e pressão necessária para vencer os componentes viscoelásticos e/ou inomogêneos ( $\Delta P_2$ ), indicando um enrijecimento do pulmão, mais relacionado à periferia. É bem documentado que a mecânica do tecido pulmonar é fortemente

afetada pela estrutura e composição do parênquima pulmonar (SANTOS *et al.*, 2006). Tais achados funcionais podem ser explicados pelas alterações morfológicas do parênquima pulmonar evidenciadas na microscopia óptica e pela análise da enzima MPO, discutidos adiante (Figuras 10, 11, 12 e 13). As alterações funcionais induzidas pela CYN foram progressivas, atingindo significância 48 h após a exposição, com regressão a valores semelhantes aos basais em 96 h, sugerindo uma possível reversão espontânea do processo de lesão.

O colapso alveolar nos grupos CYN, mais marcadamente em CYN48 (Figura 11), acarretou heterogeneidade do parênquima pulmonar, provavelmente contribuindo para o aumento de Est,  $\Delta E$  e  $\Delta P2$ . Os fatores que podem ter influído neste aumento de colapso foram a distorção dos alvéolos patentes, processo inflamatório e disfunção do surfactante pulmonar. O processo inflamatório, evidenciado pelo espessamento do septo alveolar, aumento do montante de células polimorfonucleares, atividade de MPO e presença de edema no tecido pulmonar (Figuras 10, 12 e 13), pode, potencialmente, comprometer a síntese e/ou armazenamento do surfactante pulmonar, elevando a tensão superficial, gerando, assim, áreas de colapso com consequente aumento da Est.

Em nosso trabalho, foi medida a atividade da enzima mieloperoxidase (Figura 13), importante marcadora de leucócitos PMN em um processo inflamatório (SUZUKI *et al.*, 1983). A Figura 16 mostra aumento significativo de MPO a partir de 24 h de exposição nos grupos CYN em comparação ao SAL. Tal dado está de acordo com o montante de células PMN encontrado no parênquima pulmonar dos grupos CYN analisados (Figura 12), corroborando a presença de processo inflamatório pulmonar.



A presença de CYN foi detectada no pulmão e no fígado dos grupos expostos à toxina, porém com características diferentes (Figura 17). O método ELISA foi capaz de detectar a presença de CYN no pulmão em baixas concentrações após a injeção de CYN, apresentando redução significativa a partir de 24 h. Esta diminuição pode ser explicada pelo fato de o pulmão não ser órgão alvo principal, nem armazenador de CYN. No fígado, a concentração de CYN foi consideravelmente maior do que a observada no pulmão, sendo detectada já 2 horas após a exposição, com aumento significativo em 96 h, indicando maior afinidade da CYN pelas células hepáticas. O fígado é o principal órgão do metabolismo xenobiótico, sendo importante armazenador e detoxificador, enquanto os rins são particularmente sensíveis à ação da CYN e participam de seu processo de excreção (NORRIS *et al.*, 2001).

Relatos na literatura reportam que a dose letal necessária para matar 50 % (DL<sub>50</sub>) dos animais em 5 dias é 10 vezes menor do que a necessária para matar os mesmos animais em 24 horas (0,2 µg/kg de peso corpóreo e 2,0 µg/kg de peso corpóreo, respectivamente), indicando, portanto, diferenças no mecanismo de toxicidade ao longo do tempo (NORRIS *et al.*, 2001). A interpretação sugerida para este comportamento é o efeito de metabólitos da CYN formados por reações catalisadas pela citocromo P450. Desta forma, sua toxicidade aguda seria P450-dependente, em consequência da formação de metabólitos mais tóxicos, enquanto que a toxicidade tardia resultaria da inibição da síntese proteica ou uma combinação dos dois efeitos (RUNNEGAR *et al.*, 1995; SHAW *et al.*, 2000; NORRIS *et al.*, 2002). O comportamento temporal das alterações funcionais do pulmão, juntamente com o tempo de detecção da toxina no pulmão e fígado, observados no presente estudo sugere que seu efeito sobre a função pulmonar seja secundário às reações

inflamatórias e de estresse oxidativo induzidas pela CYN. Adicionalmente, não podemos descartar um possível efeito indireto e tardio sobre a função pulmonar, decorrente da recirculação da toxina.

O tipo mais comum de intoxicação envolvendo cianobactérias é causado por hepatotoxinas, sendo os seus efeitos sobre tecidos não-hepáticos pouco investigados. Estudos prévios de nosso grupo (PICANÇO *et al.*, 2004; SOARES *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2010) mostraram que dose subletal (40 µg/kg de peso corpóreo, i.p.) de microcistina-LR (MCYST-LR), a hepatotoxina mais frequente em florações de cianobactérias e a mais estudada, provoca aumento de todos os componentes da mecânica respiratória, com influxo de células polimorfonucleares. As alterações induzidas por MCYST-LR são precoces e duradouras, sendo observadas já após 2 h de exposição e permanecendo até 4 dias. Além disso, o processo inflamatório é capaz de gerar dano ao tecido pulmonar, através da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelas células de defesa ativadas, como neutrófilos, monócitos e macrófagos (MORENO *et al.*, 2005). No presente estudo, CYN, apesar de ter sido injetada por via intratraqueal, *i.e.*, administração pulmonar direta, induziu alterações funcionais mais tardias do que as observadas após exposição à MCYST-LR.

Ainda são bastante escassos os achados na literatura acerca dos efeitos no pulmão decorrentes da exposição à CYN. Alguns estudos reportam alterações histopatológicas apenas de forma qualitativa, tais como congestão e focos hemorrágicos no parênquima pulmonar após administração de dose letal de extrato de *Cylindrospermopsis raciborskii*, produtora de cilindrospermopsina (HAWKINS *et al.*, 1985; HAWKINS *et al.*, 1997; NORRIS *et al.*, 2001; BERNARD *et al.*, 2003; PEGRAM *et al.*, 2007). Em nossa análise histológica qualitativa, evidenciamos

alterações do parênquima pulmonar, com espessamento de septo alveolar, áreas de colapso e edema alveolar nos grupos CYN. Entretanto, não observamos hemorragia intra-alveolar, possivelmente devido à menor dose de toxina utilizada (dose subletal).

Vale ressaltar que administramos dose subletal da toxina por via intratraqueal, *i.e.*, via direta para os pulmões, enquanto os estudos com doses letais utilizaram via intraperitoneal. Como os pulmões são órgãos bem irrigados por capilares, é bastante provável que a toxina administrada *i.t.* seja capaz de circular pela corrente sanguínea e alcançar diversos órgãos, incluindo o fígado, rins, baço e intestinos (SHAW *et al.*, 2000; NORRIS *et al.*, 2001; HUMPAGE & FALCONER, 2003), constituindo uma via de intoxicação indireta. Sendo assim, observamos efeitos diretos e/ou indiretos em todo o período das análises. Isto sugere que a toxina, mesmo em pequenas concentrações no pulmão (Figura 17), estaria presente na circulação durante todo ou grande parte do período analisado, estimulando o sistema imune, cuja resposta inflamatória foi claramente observada no pulmão.

Com o objetivo de melhor entender os mecanismos indutores de óbito decorrentes dos efeitos de cianotoxinas, a maioria dos estudos na literatura avalia doses letais de toxina (HAWKINS *et al.*, 1985; NORRIS *et al.*, 2001). No entanto, há evidências de que populações abastecidas por reservatórios que apresentam extensas florações de cianobactérias podem estar expostas a baixos níveis de toxina por longos períodos (AZEVEDO, 1998; LAMBERT *et al.*, 1994). Deve-se ter em mente que a exposição de animais e humanos a pequenas concentrações de CYN na água é certamente mais frequente do que a intoxicação letal.

Os mecanismos envolvidos na toxicidade e metabolização da CYN ainda não são completamente conhecidos. A captação de CYN pelo hepatócito parece envolver dois sistemas de transporte: sistema de transporte de ácidos biliares,

semelhante à MCYST-LR, e difusão passiva (SUKENIK *et al.*, 2001; CHONG *et al.*, 2002; HEDIGER *et al.*, 2004; FROSCIO *et al.*, 2009). Já foi descrito que a CYN atua na inibição da síntese proteica (TERAO *et al.*, 1994). Inicialmente, um dos mecanismos propostos foi a ligação de um metabólito ativo ao DNA ou RNA, com consequente bloqueio da transcrição ou tradução (SHAW *et al.*, 2000). Estudos em culturas de hepatócitos de ratos mostraram algumas vias de toxicidade, envolvendo a oxidação de um metabólito da CYN através da CYP450 (RUNNEGAR *et al.*, 1995), ou através da inibição da síntese de proteínas, mecanismo que não requer a metabolização da CYN (FROSCIO *et al.*, 2001; 2003).

O envolvimento do sistema enzimático da CYP450 no metabolismo da CYN foi observado através da proteção parcial da citotoxicidade e depleção de glutathiona celular após pré-tratamento com  $\alpha$ -naftoflavona, inibidor de CYP450 (RUNNEGAR *et al.*, 1995; NORRIS *et al.*, 2002). Em 2005, Humpage e colaboradores realizaram estudos *in vitro* com hepatócitos de camundongos e observaram que a redução dos níveis de glutathiona não leva ao aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio, sugerindo não ser este um mecanismo primário de toxicidade da CYN. Além disso, estudos envolvendo o papel da CYP450 na hepatotoxicidade da CYN, mostram que a histopatologia do fígado é mais afetada na região periacinar, onde ocorre o metabolismo xenobiótico catalisado pela CYP450.

Já foi relatado que a citotoxicidade e a genotoxicidade induzida pela CYN pode estar associada com a formação de ERO e apoptose nos hepatócitos (DING *et al.*, 1998; 2003). O pulmão também pode ser danificado pelo processo inflamatório, através da produção de ERO pelas células de defesa ativadas (MORENO *et al.*, 2005). Esse fenômeno explicaria o aumento do colapso alveolar nos camundongos

injetados com CYN, uma vez que pneumócitos tipo II danificados não produzem surfactante em quantidades adequadas.

Como resultado do estresse oxidativo, ocorre ativação do sistema de defesa antioxidante, a fim de reduzir o dano tecidual. Neste estudo, foram avaliadas, pela primeira vez, algumas enzimas envolvidas na cadeia do estresse oxidativo (SOD e CAT), bem como o dano oxidativo, através de indicadores de peroxidação lipídica (TBA), em amostras de tecido pulmonar de camundongos intoxicados com CYN (Figuras 14, 15 e 16, respectivamente).

O sistema SOD-CAT é a primeira linha de defesa contra as ERO (FORONJY *et al.*, 2006). SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido a oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é detoxificado pela atividade da CAT e geralmente ambas respondem após exposição a um contaminante (PANDEY *et al.*, 2003). O presente trabalho identificou aumento na atividade da SOD após 2 e 8 horas de exposição à CYN (Figura 14), confirmando a ocorrência de estresse oxidativo no pulmão. Sugerimos que a toxina é capaz de aumentar a produção do ânion superóxido, e como este é catalisado pela SOD, sua atividade é aumentada imediatamente. A partir de 24 horas de exposição à CYN, esta enzima diminuiu sua atividade, até retornar ao nível de SAL em 96 horas. Associado a este fato, encontramos redução da concentração de CYN no pulmão durante os tempos analisados, sugerindo o envolvimento da SOD como primeira linha de defesa antioxidante, frente ao agente agressor.

Por outro lado, a enzima CAT manteve-se em níveis semelhantes aos do controle até 24 h após exposição à CYN, apresentando redução significativa de atividade mais tardiamente, somente após 48 e 96 horas. Estes dados corroboram os achados descritos no parágrafo anterior. Uma vez que a CAT participa da

catalisação do peróxido de hidrogênio em água, sua atuação depende do substrato de SOD, o peróxido de hidrogênio. Além disso, a diminuição da atividade de CAT em CYN48 e CYN96 condiz com o aumento da atividade de MPO nestes grupos (Figura 13). A MPO também utiliza como substrato o peróxido de hidrogênio, cuja afinidade é maior por MPO, comparado com CAT. Uma vez que o peróxido de hidrogênio é uma ERO estável, foi capaz de reagir mais com a MPO a partir de 24 h após exposição à CYN, formando outra ERO, o ácido hipocloroso, que também possivelmente contribui para o desequilíbrio redox nas células.

Peroxidação lipídica (ou lipoperoxidação) é uma cascata de eventos e cada evento da reação, a partir do radical lipídico, gera um subproduto que pode ser dosado para quantificar dano oxidativo (JAYARAJ *et al.*, 2006; WENG *et al.*, 2007). O TBA está no início dessa cascata de eventos. Produção de espécies reativas de oxigênio no pulmão de camundongos já foi previamente identificada após administração de outras cianotoxinas, como a microcistina-LR (CARVALHO *et al.*, 2010). Para esta, já foi descrito tanto aumento quanto redução de atividade das enzimas antioxidantes em outros tecidos, com consequente aumento da produção de ERO (MORENO *et al.*, 2005; PRIETO *et al.*, 2006). Além disso, o fígado tem sido descrito como o órgão mais importante envolvido na regulação do metabolismo redox; logo, o seu equilíbrio oxidativo pode ser mais significativamente afetado pelas hepatotoxinas (PRIETO *et al.*, 2006). No entanto, não existem estudos relacionando a exposição à CYN com o estresse oxidativo pulmonar, portanto nosso trabalho procurou investigar tal processo. Foi observado aumento significativo da peroxidação lipídica a partir de 8 horas, que perdurou até 48 horas após exposição à CYN, retornando aos níveis de SAL em 96 horas (Figura 16). Podemos afirmar, então, que a condição de dano oxidativo se instalou no pulmão destes animais, como

consequência do desequilíbrio antioxidante observado nos animais expostos à CYN. De modo geral, acreditamos que este desequilíbrio pode ter sido capaz de aumentar a fração de áreas de colapso alveolar a partir de 8 h, bem como levar ao maior número de células inflamatórias para o pulmão, indicado pelo aumento de atividade da enzima MPO e influxo de PMN a partir de 24 h após exposição à CYN. Tais alterações associadas podem ter contribuído para o comprometimento funcional pulmonar após 48 h de exposição à CYN, tornando os pulmões mais rígidos.

Tendo em vista o grande impacto que a contaminação por cianotoxinas exerce na saúde pública, este estudo foi capaz de contribuir para a compreensão dos efeitos pulmonares funcionais, histológicos e bioquímicos decorrentes da administração intratraqueal única de CYN em camundongos.

# CONCLUSÕES



## 7 CONCLUSÕES

- ➔ A administração de dose subletal de CYN via i.t. provocou alterações funcionais no pulmão, caracterizadas pelo aumento das propriedades elásticas e viscoelásticas e/ou inomogêneas pulmonares.
- ➔ Uma única instilação i.t. de CYN foi capaz de produzir ERO, causando desbalanço das enzimas antioxidantes, com consequente estresse e dano oxidativos no tecido pulmonar.
- ➔ Houve instalação do processo inflamatório após exposição à CYN, caracterizado pelo aumento do percentual de áreas colapsadas, influxo de células PMN no parênquima pulmonar e atividade aumentada da MPO.

# PERSPECTIVAS

## 8 PERSPECTIVAS

- Aumentar o tempo de estudo após instilação de CYN, a fim de avaliar a possibilidade de recirculação da toxina.
- Avaliar se ocorre metabolização da toxina no pulmão, por atividade de glutathione.
- Avaliar a curva dose-resposta após instilação i.t. de CYN.
- Estudar outras vias de exposição à CYN sobre o processo inflamatório no pulmão, tais como intraperitoneal e intranasal.
- Aprofundar os estudos acerca dos fatores que acarretam o processo inflamatório no pulmão após administração de CYN, por imunohistoquímica e dosagem de citocinas.
- Testar o potencial terapêutico do candidato a fármaco LASSBio 596, híbrido da talidomida modificada e do sildenafil, inibidor das fosfodiesterases 4 e 5 e do TNF- $\alpha$ , sobre o processo inflamatório pulmonar induzido pela exposição à CYN.

# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Meth in Enzimol** 105: 121-126, 1984.

ANDRINOLO, D.; SEDAN, D.; TELESE, L.; AURA, C.; MASERA, S.; GIANNUZZI, L.; MARRA, C.A.; ALANIZ, M. J.T. Hepatic recovery after damage produced by subchronic intoxication with the cyanotoxin microcystin-LR. **Toxicon** 51: 457-467, 2008.

ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B.; LAUGHTON, M.J.; QUINLAN, G.J.; GUTTERIDGE, J.M. [The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron\(II\)-iron\(III\) complex.](#) **Biochem J** 258(2):617-620, 1989.

AUST, S.D.; MILLER, D.M. Role of iron in oxygen radical generation and reactions. *In* Probst GS, Vodick MJ, Dorato MA (eds): New horizons in molecular toxicology: a symposium. **Lilly Research Laboratories Symposium/Molecular Toxicology** 29-34, 1991.

AZEVEDO, S.M.F.O. Toxinas de cianobactérias: causas e consequências para a saúde pública. **Med 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. **Toxicol** 181:441-446, 2002.

BANERJEE, A.; MANDAL, A.; CHANDRA, D.; CHAKRABORTI. Oxidant, antioxidant and physical exercise. **Molec Cell Biochem** 253(1-2): 307-312, 2003.

BANKER, R.; CARMELI, S.; HADAS, O.; TELTSCH, B.; PORAT, R.; SUKENIK, A. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. **J Phycol** 33: 613-616, 1997.

BANKER, R.; CARMELI, S.; HADAS, O.; TELTSCH, B.; PORAT, R.; SUKENIK, A. Uracil moiety is required for toxicity of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin. **J Toxicol Environ Health A** 62: 281-288, 2001.

BANNISTER, J.V.; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. **Meth of Biochem Anal** 32: 279-312, 1987.

BAST, A.; HAENEN, G.R.M.M.; DOELMAN, C.J.A. Oxidants and antioxidants: state of the art. **Am J Med** 91: 2-13, 1991.

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

BATES, J.H.; DECRAMER, M.; CHARTRAND, D.; ZIN, W.A.; BODDENER, A.; MILIC-EMILI, J. Volume-time profile during relaxed expiration in the normal dog. **J Appl Physiol** 59(3): 732-737, 1985b.

BEASLEY, V.R.; COOK, W.O.; DAHLEM, A.M.; HOOSER, S.B.; LOVELL, R.A.;

VALENTINE, W.M. Algae intoxication in livestock and water fowl. Clinical Toxicology-Veterinary Clinics of North America. **Food Animal Practice** 5:345-361, 1989.

BECKMAN, K.; AMES, B. The free radical theory of aging matures. **Physiol Rev** 78(2): 547-581, 1998.

BERNARD, C.; HARVEY, M.; BRIAND, J.F.; BIRÉ, R.; KRYS, S.; FONTAINE, J.J. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: Evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. **Environ Toxicol** 18: 176-186, 2003.

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.

BOURKE, A.T.C.; HAWES, R.B.; NEILSON, A.; STALLMAN, N.D. An outbreak of hepato-enteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. **Toxicon** 3: 45-48, 1983.

BOUVY, M.; FALCÃO, D.; MARINHO, M.; PAGANO, M.; MOURA, A. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. **Aquatic Microbial Ecol** 23: 13-27, 2000.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analyt Biochem** 72: 248-254, 1976.

BRANCO, C.W.C.; SENNA, P.A.C. The taxonomic elucidation of the Paranoá Lake (Brasilia, Brazil) problem: *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique** 61: 85-91, 1991.

BURGOYNE, D.L.; HEMSCHIEDT, T.K.; MOORE, R.E.; RUNNEGAR, M.T.C. Biosynthesis of cylindrospermopsin. **J Org Chem** 65: 152-156, 2000.

BYTH, S. Palm Island Mystery Disease. **Med J of Australia** 2: 40-42, 1980.

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

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.

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

CARVALHO, G.M.C.; OLIVEIRA, V.R.; SOARES, R.M.; AZEVEDO, S.M.F.O.; LIMA, L.M.; BARREIRO, E.J.; VALENÇA, S.S.; SALDIVA, P.H.N.; FAFFE, D.S.; ZIN, W.A. Can LASSBio

596 and dexamethasone treat acute lung and liver inflammation induced by microcystin-LR? **Toxicol xxx**: 1-9, 2010.

CHANG, H.K.; MORTOLA, J.P. Fluid dynamic factors in tracheal pressure measurement. **J Appl Physiol** 51(1): 218-225, 1981.

CHISWELL, R.K.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.; SMITH, M.J; NORRIS, R.L.; SEAWRIGHT, A.A.; MOORE, M.R. Stability of cylindrospermopsin, the toxin from cyanobacterium, *Cylindropsermopsis raciborskii*: Effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition. **Environ Toxicol** 14: 155-161, 1999.

CHONG, M.W.K.; WONG, B.S.F.; LAM, P.K.S.; SHAW, G.R.; SEAWRIGHT, A.A. Toxicity and uptake of cylindrospermopsin and lophyrotomin in primary rat hepatocytes. **Toxicol** 40: 205-211, 2002.

CIENCEWICKI, J.; TREVEDI, S.; KLEEBERGER, S.R. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. **J Allergy Clin Immunol** 122(3): 456-468, 2008.

CODD, G.A.; MORRISON, L.F.; METCALF, J.S.; Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. **Toxicol and Appl Pharmacol** 203: 264-272, 2005.

COSTA, S.M.; AZEVEDO, S.M.F.O. Implantação de um Banco de Culturas de Cianofíceas Tóxicas. **Iheringia - Série Botânica** 45, Artigo V, 1994.

DAWSON, R.M. The toxicology of microcystins. **Toxicol** 36(7): 953-962, 1998.

DENEKE, S.M.; FANBURG, B.L. [Regulation of cellular glutathione](#). **Am J Physiol** 257: L163-173, 1989.

DING, W.X.; ONG, C.N. Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacterial-induced apoptosis and hepatotoxicity. **FEMS Microbiology Letters** 220: 1-7, 2003.

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, 1998.

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.

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

DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Meth in Enzimol** 186: 421-431, 1990.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev** 82: 47-95, 2002.

DUNFORD, H.B. Free radicals in iron-containing systems. **Free Radic Biol Med** 3: 405-421, 1987.

ESPEY, M.G.; MIRANDA, K.M.; PLUTA, R.M.; WINK, D.A. Nitrosative capacity of macrophages is dependent on nitric-oxide synthase induction signals. **J Biol Chem** 275 (15): 11341-11347, 2000.

EVANS, W. Vitamin E, vitamin C, and exercise. **Am J Clin Nutr** 72: 647S-657S, 2000.

FALCONER, I.R. Effects on human health of some cyanobacteria (blue-green algae) in reservoirs, lakes, and rivers. **Toxicity assessment** 4: 175, 1989.

FALCONER, I.R.; HARDY, S.J.; HUMPAGE, A.R.; FROSCIO, S.M.; TOZER, G.J.; HAWKINS, P.R. Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male swiss albino mice. **Environ Toxicol** 14: 143-150, 1999.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil** 43(1): 61-68, 1997.

FERREIRA, F.; FERREIRA, R.; DUARTE, J.A. Estresse oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. **Rev Port Cien Desp** 7(2): 257-275, 2006.

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.

FORONJY, R.F.; MIROCHNITCHENKO, O.; PROPOKENKO, O.; LEMAITRE, V.; JIA, Y.; INOUE, M.; OKADA, Y.; DARMIENTO, J.M. Superoxide dismutase expression attenuates cigarette smoke- or elastase-generated emphysema in mice. **Am J of Respir and Crit Care Med** 173: 623-631, 2006.

FROSCIO, S.M.; HUMPAGE, A.R.; BURCHAM, P.C.; FALCONER, I.R. Cell-free protein synthesis inhibition assay for the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. **Environ Toxicol** 16: 408-412, 2001.

FROSCIO, S.M.; HUMPAGE, A.R.; BURCHAM, P.C.; FALCONER, I.R. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. **Environ Toxicol** 18: 243-251, 2003.

FROSCIO, S.M.; HUMPAGE, A.R.; WICKRAMASINGHE, W.; SHAW, G.; FALCONER, I.R. Interaction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin with the eukaryotic protein synthesis system. **Toxicon** 51(2): 191-198, 2008.



FROSCIO, S.M.; CANNON, E.; LAU, H.M.; HUMPAGE, A.R. Limited uptake of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin by Vero cells. **Toxicon** 54(6): 862-868, 2009.

FUNARI, E.; TESTAI, E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. **Crit Rev in Toxicol** 38: 97-125, 2008.

GALLEANO, M.; PUNTARULO, S. [Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats.](#) **Biochim Biophys Acta** 1271(2-3): 321-326, 1995.

GHIO, A.J.; CARTER, J.D.; RICHARDS, J.H.; BRIGHTON, L.E.; LAY, J.C.; DEVLIN, R.B. Disruption of normal iron homeostasis after bronchial instillation of an iron-containing particle. **Am J Physiol** 274(3 Pt 1): L396-403, 1998.

GOLDFARB, A. Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. **Can J Appl Physiol** 24(3): 249-266, 1999.

GRIFFITHS, D.J.; SAKER, M.L. The Palm Island mystery disease 20 years on: A review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. **Environ Toxicol** 18: 78-93, 2003.

GRIFFITHS, H.R. Antioxidants and protein oxidation. **Free Radic Res** 33: S47-S58, 2000.

GUNDERSEN, H.J.; BENDTSEN, T.F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MØLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J.R.; PAKKENBERG, B.; SØRENSEN, F.B.; VESTERBY, A.; *et al.* Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS** 96(5): 379-394, 1988.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol** 186: 1-85, 1990.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **Am J Med** 91(suppl 3C): 14S-22S, 1991.

HARADA, K.I.; OHTANI, I.; IWAMOTO, K.; SUZUKI, M.; WATANABE, M.F.; WATANABE, M.; TERAOKA, K. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. **Toxicon** 32: 143-150, 1994.

HAWKINS, P.R.; RUNNEGAR, M.T.C.; JACKSON, A.R.B.; FALCONER, I.R. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic supply reservoir. **Appl Environ Microbiol** 50: 1992-1995, 1985.

HAWKINS, P.R. Some aspects of the limnology of a small tropical impoundment and an assessment of two techniques for managing water quality, with special reference to the growth of cyanobacteria [PhD thesis]. **Townsville, Australia: James Cook University**, 1986.

HAWKINS, P.R.; CHANDRASENA, N.R.; JONES, G.J.; HUMPAGE, A.R.; FALCONER, I.R. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. **Toxicon** 35: 341-346, 1997.

HEBBEL, R.P. [Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability](#). **J Lab Clin Med** 107(5): 401-404, 1986.

HEDIGER, M.A.; ROMERO, M.F.; PENG, J.B.; ROLFS, A.; TAKANAGA, H.; BRUFORD, E.A. The ABC's of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. **Eur J Physiol** 447: 465-468, 2004.

HII, C.S.; FERRANTE, A. Regulation of the NADPH oxidase activity and antimicrobial function of neutrophils by arachidonic acid. **Arch Immunol Ther Exp** 55(2): 99-110, 2007.

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

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

HUMPAGE, A.R.; FENECH, M.; THOMAS, P.; FALCONER, I.R. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. **Mutat Res** 472: 155-161, 2000.

HUMPAGE, A.R.; FALCONER, I.R. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male swiss albino mice: Determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. **Environ Toxicol** 18: 94-103, 2003.

HUMPAGE, A.R.; FONTAINE, F.; FROSCIO, S.; BURCHAM, P.; FALCONER, I.R. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: Role of cytochrome P-450 and oxidative stress. **J Toxicol Environ Health** 68: 739-753, 2005.

HUMPAGE, A.R. Proceedings of the Interagency, International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms (ISOC-HAB), **H. Kenneth Hudnell (ed.)** 16(3): 389-417, 2007.

IRVIN, C.G.; BATES, J.H. Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size. **Respir Res** 4: 4, 2003.

JAYARAJ, R.; ANAND, T.; LAKSHMANA RAO, P.V. Activity and gene expression profile of certain antioxidant enzymes to microcystin-LR induced oxidative stress in mice. **Toxicol** 220: 136-146, 2006.

KELLY, J.J. Oxidative stress: Its role in air pollution and adverse health effects. **Occup Environ Med** 60: 612-616, 2003.

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.

LAMBERT, T.W.; BOLAND, M.P.; HOLMES, C.F.B.; HRUDEY, S.E. Quantitation of the microcystin hepatotoxins in water at environmentally relevant concentrations with the protein phosphatase bioassay. **Environ Sci and Technol** 28: 753-755, 1994.

LAMBERTUCCI, R.; LEVEDA-PIRES, A.; ROSSONI, L.; PITHON-CURI, T. Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and RNAm levels in soleus muscle from young and aged rats. **Mech Aging Develop** 128(3): 267-275, 2007.

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

LEE, J.; KOO, N.; MIN, D.B. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. **Compre Rev Food Sci Food Safety** 3: 21-33, 2004.

LI, R.H.; CARMICHAEL, W.W.; BRITTAIN, S.; EAGLESHAM, G.K.; SHAW, G.R.; LIU, Y.K.; WATANABE, M.M.. First report of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (cyanobacteria). **J Phycol** 37: 1121-1126, 2001.

LI, N.; SIOUTAS, C.; CHO, A.; SCHMITZ, D.; MISRA, C.; SEMPF, J.; WANG, M.; OBERLEY, T.; FROINES, J.; NEL, A. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. **Environ Health Perspect** 111: 455-460, 2003.

LORING, S.H.; ELLIOTT, E.A.; DRAZEN, J.M. Kinetic energy loss and convective acceleration in respiratory resistance measurements. **Lung** 156(1): 33-42, 1979.

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.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annu Rev Biochem** 52: 711-760, 1983.

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

MOORE, R.E.; OHTANI, I.; MOORE, B.S.; DE KONING, C.B.; YOSHIDA, W.Y.; RUNNEGAR, M.T.C.; CARMICHAEL, W.W. Cyanobacterial toxins. **Gazz Chim Ital** 123: 329-336, 1993.

MORENO, I.M.; PICHARDO, S.; JOS, A.; GOMEZ-AMORES, L.; MATE, A.; VAZQUEZ, C.M.; CAMEAN, A.M. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. **Toxicon** 45: 395-402, 2005.

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

MOTA, M.P.; FIGUEIREDO, P.; DUARTE, J.A. Teorias biológicas do envelhecimento. **Rev Port Cienc Desp** 4(1): 81-110, 2004.

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

NORRIS, R.L., EAGLESHAM, G.K., PIERENS, G., SHAW, G.R., SMITH, M.J., CHISWELL, R.K., SEAWRIGHT, A.A., MOORE, M.R. Deoxycylindrospermopsin, na analog of cylindrospermopsin, from *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Environ Toxicol** 14: 163-165, 1999.

NORRIS, R.L., SEAWRIGHT, A.A., SHAW, G.R., SMITH, M.J., CHISWELL, R.K., MOORE, M.R. Distribution of <sup>14</sup>C cylindrospermopsin *in vivo* in the mouse. **Environ Toxicol** 16: 498-505, 2001.

NORRIS, R.L.; SEAWRIGHT, A.A.; SHAW, G.R.; SENOGLES, P.; EAGLESHAM, G.K.; SMITH, M.J. *et al.* Hepatic xenobiotic metabolism of cylindrospermopsin *in vivo* in the mouse. **Toxicol** 40: 471-476, 2002.

OHTANI, I.; MOORE, R.E.; RUNNEGAR, M.T.C. Cylindrospermopsin: A potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. **J Amer Chem Society** 114: 7941-7942, 1992.

PADISÁK, J. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynnska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. **Archiv für Hydrobiol** 107: 563-593, 1997.

PALMER, C.M. Report on the algae in relation to water quality of Paranoa Lake, Brasília: Relatório de consultoria. **Pan American Health Organization/WHO**, Brasília, 1969.

PANDEY, S.; PARVEZ, S.; SAYEED, I.; HAQUE, R.; BIN-HAFEEZ, B.; RAISUDDIN, S. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu*. **Sci Total Environ** 309: 105-115, 2003.

PEGRAM, R.A.; HUMPAGE, A.R.; NEILAN, B.A.; RUNNEGAR, M.T.; NICHOLS, T.; THACKER, R.W.; PFUNGMACHER, S.; ETHERIDGE, S.M.; LOVE, A.H. Proceedings of the Interagency, International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms **H. Kenneth Hudnell (ed.)** 15: 323-388, 2007.

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.

POWERS, S.R. Jr, MANNAL, R.; NECLERIO, M.; ENGLISH, M.; MARR, C.; LEATHER, R.; UEDA, H.; WILLIAMS, G.; CUSTEAD, W.; DUTTON, R. Physiologic consequences of positive end-expiratory pressure (PEEP) ventilation. **Ann Surg** 178(3): 265-272, 1973.

PRIETO, A.I.; JOS, A.; PICHARDO, S.; MORENO, I.; CAMEAN, A.M. Diferencial oxidative stress response to microcystins LR and RR in intraperitoneal exposure tilapia fish (*Oreochromis sp.*). **Aquat Toxicol** 77: 314-321, 2006.

PRYOR, W. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. **Ann Rev Physiol** 48: 657-667, 1986.

REISNER, M.; CARMELI, S.; WERMAN, M.; SUKENIK, A. The cyanobacterial toxin cylindrospermopsin inhibits pyrimidine nucleotide synthesis and alters cholesterol distribution in mice. **Toxicol Scienc** 82: 620-627, 2004.

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). **Nat Health and Med Res Coun, Australia**, 1994.

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.

ROGERS, E.H.; ZEHR, R.D.; GAGE, M.I.; HUMPAGE, A.R.; FALCONER, I.R.; MARR, M.; CHERNOFF, N. The cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin, induces fetal toxicity after exposure late in gestation. **Toxicol** 49(6): 855-864, 2007.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): **Membrane lipid oxidation** 1th ed. Boca Raton, CRC Press 151-70, 1991.

RUNNEGAR, M.T., KONG, S.M., ZHONG, Y.Z., GE, J.L., LU, S.C. The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. **Biochem Biophys Res Commun** 201: 235-241, 1994.

RUNNEGAR, M.T., KONG, S.M., ZHONG, Y.Z., LU, S.C. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. **Biochem Pharmacol** 49: 219-225, 1995.

SAKER, M.L.; EAGLESHAM, G.K. The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the Redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. **Toxicol** 37(7): 1065-1077, 1999.

SAKER, M.L.; METCALF, J.S.; CODD, G.A.; VASCONCELOS, V.M. Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. **Toxicol** 43(2): 185-194, 2004.

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(1): 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.

- SANTOS, F.B.; NAGATO, L.K.; BOECHEM, N.M.; NEGRI, E.M.; GUIMARÃES, A.; CAPELOZZI, V.L.; FAFTE, D.S.; ZIN, W.A.; ROCCO, P.R. Time course of lung parenchyma remodeling in pulmonary and extrapulmonary acute lung injury. **J Appl Physiol** 100(1): 98-106, 2006.
- SEAWRIGHT, A.A.; NOLAN, C.C.; SHAW, G.R.; CHISWELL, R.K.; NORRIS, R.L.; MOORE, M.R.; SMITH, M.J. The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska). **Environ Toxicol** 14: 135-142, 1999.
- SEN, C.K. Antioxidants in exercise nutrition. **Sports Med** 31(13): 891-908, 2001.
- SHAN, X.Q.; AW, T.Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther** 47(1): 61-71, 1989.
- SHAW, G.R.; SEAWRIGHT, A.A.; MOORE, M.R.; LAM, P.K.S. Cylindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid: Evaluation of its toxicologic activity. **Therap Drug Monit** 22: 89-92, 2000.
- SHEN, X.Y.; LAM, P.K.S.; SHAW, G.R.; WICKRAMASINGHE, W. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. **Toxicon** 40: 1499-1501, 2002.
- SIES, H. Physiological society symposium: impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. **Exp Physiol** 82: 291-295, 1997.
- SIMIŁOWSKI, T.; MILIC-EMILI, J. Evaluation of mechanic characteristics of the respiratory system in artificial ventilation **Presse Med** 18(36): 1791-1796, 1989.
- SOARES, R.M.; CAGIDO, V.R.; FERRARO, R.B.; MEYER-FERNANDES, J.R.; ROCCO, R.M.; ZIN, W.A.; AZEVEDO, S.M.F.O. Effects of microcystin-LR on mouse lungs. **Toxicon** 50: 330-338, 2007.
- STEWART, I.; SEAWRIGHT, A.A.; SHAW, G.R.; Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds-an overview. **Adv Exp Med Biol** 619: 613-637, 2008.
- STUCKEN, K.; MURILLO, A.A.; SOTO-LIEBE, K.; FUENTES-VALDÉS, J.J.; MÉNDEZ, M.A.; VÁSQUEZ, M. Toxicity phenotype does not correlate with phylogeny of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains. **Systemat and Appl Microbiol** 32: 37-48, 2009.
- SUKENIK, A.; BANKER, R.; CARMELI, S.; WERMAN, M.; TELTSCH, B.; PORAT, R. Proposed toxicity mode of cylindrospermopsin (cyanobacterial hepatotoxin) based on its structurally related derivatives. In: **Towards a Global Perspective on Toxic Cyanobacterial, Noosa Queensland, Australia** July 16-20, 2001.
- SUZUKI, K.; OTA, H.; SASAGAWA, S.; SAKATANI, T.; FUJIKURA, T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. **Analyt Biochem** 132: 345-352, 1983.

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

TERAO, K.; OHMORI, S.; IGARASHI, K.; OHTANI, I.; WATANABE, M.F.; HARADA, K.I.; ITO, E.; WATANABE, M. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from the blue-green alga *Umezakia natans*. **Toxicon** 32: 833-843, 1994.

TUCCI, A.; SANT'ANNA, C.L. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação seminal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. **Rev Brasil Bot** 26: 97-112, 2003.

VAN ASBECK, B.S.; HOIDAL, J.; VERCELLOTTI, G.M.; SCHWARTZ, B.A.; MOLDOW, C.F.; JACOB, H.S. [Protection against lethal hyperoxia by tracheal insufflation of erythrocytes: role of red cell glutathione.](#) **Science** 227(4688): 756-759, 1985.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim Nova** 30(5): 1323-1338, 2007.

WENG, D.; LU, Y.; WEI, Y.; LIU, Y.; SHEN, P. The role of ROS in microcystin-LR induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice. **Toxicol** 232: 15-23, 2007.

WHITE, S.H.; DUIVENVOORDEN, L.J.; FABBRO, L.D.; EAGLESHAM, G.K. [Influence of intracellular toxin concentrations on cylindrospermopsin bioaccumulation in a freshwater gastropod \(\*Melanoidea tuberculata\*\).](#) **Toxicon** 47(5): 497-509, 2006.

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.

# ANEXOS



**ANEXO A –** Parâmetros da mecânica pulmonar em cada animal dos grupos SAL, CYN2, CYN8, CYN24, CYN48 e CYN96.

<b>SAL</b>									
	<b>Fluxo</b>	<b>Volume</b>	<b>Est</b>	<b>Edyn</b>	<b>ΔE</b>	<b>ΔP1</b>	<b>ΔP2</b>	<b>ΔPtot</b>	<b>Ti</b>
SAL1	1,01	0,20	18,94	22,38	3,45	1,02	0,71	1,72	0,20
SAL2	1,00	0,20	17,85	22,46	4,62	0,99	0,93	1,92	0,20
SAL3	1,00	0,20	17,18	22,48	5,30	1,18	0,99	2,18	0,20
SAL4	1,00	0,20	19,37	22,71	3,38	0,40	0,65	1,05	0,20
SAL5	0,99	0,20	15,64	18,96	3,33	1,04	0,68	1,72	0,20
SAL6	1,03	0,20	15,81	22,01	6,19	0,95	1,16	2,12	0,19
SAL7	1,02	0,20	17,45	23,91	6,46	1,08	1,27	2,35	0,20
Média	1,01	0,20	17,46	22,13	4,67	0,95	0,91	1,87	0,20
DP	0,01	0,00	1,30	1,40	1,25	0,23	0,22	0,39	0,00
EPM	0,00	0,00	0,49	0,53	0,47	0,09	0,08	0,15	0,00
n	7	7	7	7	7	7	7	7	7
DP/Média	1,29%	1,33%	7,49%	6,35%	26,61%	24,67%	24,89%	21,21%	1,94%

<b>CYN2</b>									
	<b>Fluxo</b>	<b>Volume</b>	<b>Est</b>	<b>Edyn</b>	<b>ΔE</b>	<b>ΔP1</b>	<b>ΔP2</b>	<b>ΔPtot</b>	<b>Ti</b>
CYN2.1	1,01	0,20	18,45	22,87	4,42	0,92	0,91	1,82	0,20
CYN2.2	1,00	0,19	16,64	23,01	6,36	1,08	1,19	2,28	0,19
CYN2.3	1,00	0,20	16,13	19,45	3,33	0,94	0,68	1,62	0,20
CYN2.4	1,01	0,20	16,35	22,54	6,19	0,85	1,16	2,02	0,20
CYN2.5	1,01	0,20	24,38	29,37	4,99	0,94	1,03	1,97	0,19
Média	1,01	0,20	18,39	23,45	5,06	0,95	0,99	1,94	0,20
DP	0,00	0,00	3,10	3,24	1,13	0,07	0,19	0,22	0,00
EPM	0,00	0,00	1,39	1,45	0,50	0,03	0,09	0,10	0,00
n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
DP/Média	0,25%	2,48%	16,89%	13,81%	22,37%	7,89%	19,02%	11,21%	2,44%

<b>CYN8</b>									
	<b>Fluxo</b>	<b>Volume</b>	<b>Est</b>	<b>Edyn</b>	<b>ΔE</b>	<b>ΔP1</b>	<b>ΔP2</b>	<b>ΔPtot</b>	<b>Ti</b>
CYN8.1	1,00	0,20	23,09	30,99	4,78	0,74	1,02	1,76	0,20
CYN8.2	0,97	0,19	22,97	27,71	5,39	0,74	1,08	1,83	0,20
CYN8.3	1,00	0,20	17,29	23,74	4,76	0,76	0,95	1,71	0,20
CYN8.4	1,00	0,20	26,09	35,14	6,05	0,66	1,26	1,93	0,20

CYN8.5	1,00	0,20	18,92	30,83	4,64	0,82	0,95	1,77	0,20
Média	1,00	0,20	21,67	24,55	5,13	0,74	1,05	1,80	0,20
DP	0,01	0,00	3,16	3,52	0,53	0,05	0,11	0,07	0,00
EPM	0,00	0,00	1,41	1,57	0,23	0,02	0,05	0,03	0,00
n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
DP/Média	1,25%	1,90%	14,58%	12,79%	10,32%	6,69%	10,97%	4,15%	1,41%

<b>CYN24</b>									
	<b>Fluxo</b>	<b>Volume</b>	<b>Est</b>	<b>Edyn</b>	<b>ΔE</b>	<b>ΔP1</b>	<b>ΔP2</b>	<b>ΔPtot</b>	<b>Ti</b>
CYN24 1	1,01	0,19	26,21	31,14	8,04	0,75	1,57	2,31	0,19
CYN24 2	1,00	0,20	22,31	29,10	6,14	0,73	1,20	1,94	0,20
CYN24 3	1,00	0,20	18,97	21,31	4,02	0,80	0,77	1,58	0,20
CYN24 4	1,01	0,20	29,09	33,48	7,39	0,71	1,53	2,25	0,19
CYN24 5	1,01	0,20	26,18	25,20	6,28	0,87	1,29	2,16	0,20
Média	1,01	0,20	25,28	28,05	6,37	0,77	1,27	2,05	0,20
DP	0,01	0,00	5,30	4,33	1,37	0,05	0,28	0,26	0,00
EPM	0,00	0,00	1,87	1,93	0,61	0,02	0,13	0,12	0,00
n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
DP/Média	0,57%	1,14%	14,36%	15,43%	21,56%	7,43%	22,39%	13,05%	1,43%

<b>CYN48</b>									
	<b>Fluxo</b>	<b>Volume</b>	<b>Est</b>	<b>Edyn</b>	<b>ΔE</b>	<b>ΔP1</b>	<b>ΔP2</b>	<b>ΔPtot</b>	<b>Ti</b>
CYN48.1	1,01	0,19	29,61	38,16	8,54	0,74	1,68	2,42	0,19
CYN48.2	1,00	0,20	29,86	41,64	11,77	0,68	2,32	3,01	0,20
CYN48.3	1,00	0,20	26,44	32,71	6,28	0,68	1,25	1,93	0,20
CYN48.4	1,01	0,20	27,43	34,83	7,40	0,92	1,44	2,36	0,19
CYN48.5	1,01	0,20	18,78	24,83	6,05	0,76	1,25	2,00	0,20
Média	1,01	0,20	26,42	34,43	8,01	0,76	1,59	2,34	0,20
DP	0,01	0,00	4,03	5,67	2,08	0,09	0,40	0,38	0,00
EPM	0,00	0,00	1,80	2,54	0,93	0,04	0,18	0,17	0,00
n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
DP/Média	0,57%	1,14%	15,27%	16,49%	26,00%	11,85%	25,32%	16,33%	1,43%

<b>CYN96</b>									
	<b>Fluxo</b>	<b>Volume</b>	<b>Est</b>	<b>Edyn</b>	<b>ΔE</b>	<b>ΔP1</b>	<b>ΔP2</b>	<b>ΔPtot</b>	<b>Ti</b>
CYN96.1	1,01	0,19	20,47	25,92	5,45	0,86	1,03	1,90	0,19
CYN96.2	1,00	0,20	17,27	24,48	7,21	0,93	1,43	2,36	0,20
CYN96.3	1,00	0,20	13,67	21,08	7,41	1,06	1,45	2,51	0,20
CYN96.4	1,01	0,20	22,76	27,55	4,78	1,05	1,03	2,08	0,19

CYN96.5	1,01	0,20	22,77	27,83	5,06	0,99	1,04	2,04	0,20
CYN96.6	0,99	0,21	22,88	28,64	5,76	0,77	1,18	1,95	0,21
CYN96.7	1,00	0,20	30,65	36,73	6,08	1,06	1,26	2,32	0,20
Média	1,01	0,20	21,49	27,46	5,97	0,96	1,20	2,16	0,20
DP	0,01	0,00	4,91	4,46	0,94	0,10	0,17	0,21	0,00
EPM	0,00	0,00	1,86	1,68	0,35	0,04	0,06	0,08	0,00
n	7	7	7	7	7	7	7	7	7
DP/Média	0,57%	1,14%	22,87%	16,25%	15,73%	10,86%	14,01%	9,82%	1,43%

**ANEXO B** – Percentual de alvéolos normais e colapsados em cada animal dos grupos SAL, CYN2, CYN8, CYN24, CYN48 e CYN96.

<b>SAL</b>	<b>%NORMAL</b>	<b>%COLAPSO</b>
SAL1	75,52	24,48
SAL2	68,40	31,60
SAL3	81,35	18,65
SAL4	83,93	16,07
SAL5	67,34	32,66
SAL6	69,80	30,20
SAL7	77,39	22,61
Média	74,82	25,18
DP	6,04	6,04
EPM	2,28	2,28
n	7	7
DP/Média	8,0%	24,0%

<b>CYN2</b>	<b>%NORMAL</b>	<b>%COLAPSO</b>
CYN2.1	75,41	24,59
CYN2.2	63,78	36,22
CYN2.3	65,51	34,49
CYN2.4	68,47	31,53
CYN2.5	59,19	40,81
Média	66,47	33,53
DP	5,39	5,39
EPM	2,41	2,41
n	5	5

DP/Média	8,1%	16,1%
----------	------	-------

<b>CYN8</b>		
	<b>%NORMAL</b>	<b>%COLAPSO</b>
CYN8.1	76,70	23,30
CYN8.2	45,64	54,36
CYN8.3	58,68	41,32
CYN8.4	49,68	50,32
CYN8.5	53,90	46,10
Média	56,92	43,08
DP	10,80	10,80
EPM	4,83	4,83
n	5	5
DP/Média	18,9%	25,0%

<b>CYN24</b>		
	<b>%NORMAL</b>	<b>%COLAPSO</b>
CYN24.1	50,72	49,28
CYN24.2	59,30	40,70
CYN24.3	58,70	41,30
CYN24.4	44,20	55,80
CYN24.5	52,48	47,52
Média	55,62	44,38
DP	7,95	7,95
EPM	3,00	3,00
n	5	5
DP/Média	14,3%	17,9%

<b>CYN48</b>		
	<b>%NORMAL</b>	<b>%COLAPSO</b>
CYN48.1	25,94	74,06
CYN48.2	35,46	64,54
CYN48.3	30,06	69,94
CYN48.4	31,01	68,99
CYN48.5	32,90	67,10
Média	31,07	68,93
DP	3,16	3,16
EPM	1,41	1,41
n	5	5

DP/Média	10,2%	4,6%
----------	-------	------

<b>CYN96</b>		
	<b>%NORMAL</b>	<b>%COLAPSO</b>
CYN96.1	51,80	48,20
CYN96.2	37,24	62,76
CYN96.3	37,62	62,38
CYN96.4	60,04	39,96
CYN96.5	36,59	63,41
CYN96.6	52,63	47,37
CYN96.7	71,30	28,70
Média	44,66	55,34
DP	9,56	9,56
EPM	4,28	4,28
n	7	7
DP/Média	21,4%	17,3%

**ANEXO C** – Celularidade total e diferencial em cada animal dos grupos SAL, CYN2, CYN8, CYN24, CYN48 e CYN96.

<b>SAL</b>			
	<b>PMN x 10<sup>-3</sup>/μm<sup>2</sup></b>	<b>MN x 10<sup>-3</sup>/μm<sup>2</sup></b>	<b>TOTAL x 10<sup>-3</sup>/μm<sup>2</sup></b>
SAL1	10,4	2,3	12,8
SAL2	4,3	9,8	14,1
SAL3	4,8	8,5	13,3
SAL4	3,8	8,2	12,0
SAL5	3,9	9,3	13,1
SAL6	5,2	13,3	18,4
SAL7	7,3	12,2	19,4
Média	5,4	7,6	13,1
DP	2,5	2,7	0,2
EPM	1,1	1,2	0,1
n	7	7	7
DP/Média	46,1%	34,5%	5,3%

<b>CYN2</b>			
	<b>PMN x 10<sup>-3</sup>/μm<sup>2</sup></b>	<b>MN x 10<sup>-3</sup>/μm<sup>2</sup></b>	<b>TOTAL x 10<sup>-3</sup>/μm<sup>2</sup></b>
CYN2.1	9,2	4,0	13,2
CYN2.2	5,3	15,1	20,4
CYN2.3	9,5	10,2	19,7

CYN2.4	1,2	16,0	17,2
CYN2.5	1,2	10,8	12,0
Média	5,6	11,6	17,2
DP	3,2	3,7	0,3
EPM	1,2	1,4	1,2
n	5	5	5
DP/Média	56,8%	31,7%	17,9%

<b>CYN8</b>			
	<b>PMN x 10<sup>-3</sup>/μm<sup>2</sup></b>	<b>MN x 10<sup>-3</sup>/μm<sup>2</sup></b>	<b>TOTAL x 10<sup>-3</sup>/μm<sup>2</sup></b>
CYN8.1	6,5	11,0	17,5
CYN8.2	7,9	9,6	17,6
CYN8.3	5,1	9,7	14,7
CYN8.4	4,9	10,7	15,6
CYN8.5	13,8	4,2	18,0
Média	7,6	9,0	16,7
DP	0,3	2,5	1,3
EPM	0,2	1,1	0,6
n	5	5	5
DP/Média	42,7%	27,2%	7,7%

<b>CYN24</b>			
	<b>PMN x 10<sup>-3</sup>/μm<sup>2</sup></b>	<b>MN x 10<sup>-3</sup>/μm<sup>2</sup></b>	<b>TOTAL x 10<sup>-3</sup>/μm<sup>2</sup></b>
CYN24.1	15,8	5,4	21,3
CYN24.2	14,0	3,7	17,6
CYN24.3	11,2	5,6	16,9
CYN24.4	11,6	4,1	15,7
CYN24.5	11,1	3,6	14,8
Média	12,8	4,5	17,2
DP	1,8	0,9	0,22
EPM	0,8	0,4	0,10
n	5	5	5
DP/Média	14,5%	19,1%	12,9%

<b>CYN48</b>			
	<b>PMN x 10<sup>-3</sup>/μm<sup>2</sup></b>	<b>MN x 10<sup>-3</sup>/μm<sup>2</sup></b>	<b>TOTAL x 10<sup>-3</sup>/μm<sup>2</sup></b>
CYN48.1	15,8	5,4	21,3
CYN48.2	14,0	3,7	17,6
CYN48.3	11,9	5,2	17,1
CYN48.4	11,1	3,6	14,8

CYN48.5	11,1	3,6	14,8
Média	12,8	4,3	17,1
DP	1,8	0,8	2,4
EPM	0,8	0,4	1,1
n	5	5	5
DP/Média	14,3%	18,9%	13,9%

<b>CYN96</b>			
	<b>PMN x 10<sup>-3</sup>/μm<sup>2</sup></b>	<b>MN x 10<sup>-3</sup>/μm<sup>2</sup></b>	<b>TOTAL x 10<sup>-3</sup>/μm<sup>2</sup></b>
CYN96.1	11,0	2,9	13,9
CYN96.2	13,0	4,8	17,8
CYN96.3	13,6	3,1	16,7
CYN96.4	14,7	3,0	17,7
CYN96.5	9,7	5,9	15,6
CYN96.6	11,9	5,2	17,1
CYN96.7	12,1	2,7	14,9
Média	12,3	3,9	16,2
DP	1,5	1,2	1,4
EPM	0,6	0,5	0,5
n	7	7	7
DP/Média	12,6%	30,3%	8,4%

**ANEXO D** – Atividade da mieloperoxidase (MPO) em cada animal dos grupos SAL, CYN2, CYN8, CYN24, CYN48 e CYN96.

<b>SAL</b>	
	<b>MPO (U/mg proteína)</b>
SAL1	0,54
SAL2	0,36
SAL3	0,51
SAL4	0,79
SAL5	0,37
Média	0,52
EPM	0,10
n	5

<b>CYN2</b>	
	<b>MPO (U/mg proteína)</b>
CYN2.1	0,86
CYN2.2	1,18
CYN2.3	2,75
CYN2.4	1,25
CYN2.5	1,03
Média	1,42
EPM	0,34
n	5

<b>CYN8</b>	
	<b>MPO (U/mg proteína)</b>
CYN8.1	1,24
CYN8.2	1,03
CYN8.3	1,15
CYN8.4	0,58
CYN8.5	1,07
Média	1,01
EPM	0,11
n	5

<b>CYN24</b>	
	<b>MPO (U/mg proteína)</b>
CYN24.1	3,99
CYN24.2	2,52
CYN24.3	3,93
CYN24.4	2,28
Média	3,18
EPM	0,45
n	4

<b>CYN48</b>	
--------------	--



<b>MPO (U/mg proteína)</b>	
CYN48.1	7,25
CYN48.2	4,47
CYN48.3	6,76
CYN48.4	4,00
CYN48.5	5,26
Média	5,55
EPM	0,63
n	5

<b>CYN96</b>	
<b>MPO (U/mg proteína)</b>	
CYN96.1	3,74
CYN96.2	2,42
CYN96.3	2,40
CYN96.4	5,09
CYN96.5	6,51
Média	4,03
EPM	0,79
n	5

**ANEXO E** – Níveis de superóxido dismutase (SOD) em cada animal dos grupos SAL, CYN2, CYN8, CYN24, CYN48 e CYN96.

<b>SAL</b>	
<b>SOD (U/mg proteína)</b>	
SAL1	4,15
SAL2	4,79
SAL3	5,01
SAL4	2,84
SAL5	3,31
Média	4,02
EPM	0,42
n	5

---

<b>CYN2</b>	
	<b>SOD (U/mg proteína)</b>
CYN2.1	4,61
CYN2.2	4,11
CYN2.3	6,62
CYN2.4	5,02
CYN2.5	5,15
Média	5,10
EPM	0,42
n	5

---



---

<b>CYN8</b>	
	<b>SOD (U/mg proteína)</b>
CYN8.1	11,25
CYN8.2	13,06
CYN8.3	9,52
CYN8.4	7,83
CYN8.5	8,98
Média	10,13
EPM	0,92
n	5

---



---

<b>CYN24</b>	
	<b>SOD (U/mg proteína)</b>
CYN24.1	10,37
CYN24.2	7,75
CYN24.3	6,10
CYN24.4	6,11
CYN24.5	6,59
Média	7,38
EPM	0,81
n	5

---

---

<b>CYN48</b>	
	<b>SOD (U/mg proteína)</b>
CYN48.1	7,66
CYN48.2	5,99
CYN48.3	4,99
CYN48.4	6,34
Média	6,25
EPM	0,55
n	4

---



---

<b>CYN96</b>	
	<b>SOD (U/mg proteína)</b>
CYN96.1	10,01
CYN96.2	5,98
CYN96.3	9,20
CYN96.4	12,66
CYN96.5	7,53
Média	9,08
EPM	1,14
n	5

---

**ANEXO F** – Níveis de catalase (CAT) em cada animal dos grupos SAL, CYN2, CYN8, CYN24, CYN48 e CYN96.

---

<b>SAL</b>	
	<b>CAT (U/mg proteína)</b>
SAL1	5,99
SAL2	5,14

---

SAL3	5,56
SAL4	8,16
SAL5	5,95
Média	6,16
EPM	0,52
n	5

<b>CYN2</b>	
<b>CAT (U/mg proteína)</b>	
CYN2.1	7,63
CYN2.2	6,69
CYN2.3	8,00
CYN2.4	7,50
CYN2.5	5,03
Média	6,97
EPM	0,53
n	5

<b>CYN8</b>	
<b>CAT (U/mg proteína)</b>	
CYN8.1	5,68
CYN8.2	5,54
CYN8.3	4,07
CYN8.4	6,06
CYN8.5	4,74
Média	5,40
EPM	0,24
n	5

<b>CYN24</b>	
<b>CAT (U/mg proteína)</b>	
CYN24.1	4,95

CYN24.2	5,75
CYN24.3	5,55
CYN24.4	4,65
Média	5,22
EPM	0,25
n	4

<b>CYN48</b>	
	<b>CAT (U/mg proteína)</b>
CYN48.1	3,76
CYN48.2	3,82
CYN48.3	4,81
CYN48.4	4,62
CYN48.5	4,18
Média	4,24
EPM	0,21
n	5

<b>CYN96</b>	
	<b>CAT (U/mg proteína)</b>
CYN96.1	3,76
CYN96.2	4,19
CYN96.3	5,21
CYN96.4	4,49
CYN96.5	3,85
Média	4,30
EPM	0,26
n	5

**ANEXO G** – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em cada animal dos grupos SAL, CYN2, CYN8, CYN24, CYN48 e CYN96.

<b>SAL</b>	
	<b>TBARS (nmol/mg proteína)</b>
SAL1	1,39
SAL2	1,39
SAL3	1,37
SAL4	1,35
SAL5	1,37
Média	1,51
EPM	0,03
n	5

<b>CYN2</b>	
	<b>TBARS (nmol/mg proteína)</b>
CYN2.1	1,52
CYN2.2	1,58
CYN2.3	1,51
CYN2.4	1,43
CYN2.5	1,57
Média	1,52
EPM	0,01
n	5

<b>CYN8</b>	
	<b>TBARS (nmol/mg proteína)</b>
CYN8.1	1,86
CYN8.2	1,94
CYN8.3	1,74
CYN8.4	1,76
CYN8.5	1,82
Média	1,82

EPM	0,03
n	5
<hr/>	
<hr/>	
<b>CYN24</b>	
<b>TBARS (nmol/mg proteína)</b>	
CYN24.1	1,86
CYN24.2	1,91
CYN24.3	1,85
CYN24.4	1,86
CYN24.5	1,83
Média	1,86
EPM	0,01
n	5
<hr/>	
<hr/>	
<b>CYN48</b>	
<b>TBARS (nmol/mg proteína)</b>	
CYN48.1	1,48
CYN48.2	1,51
CYN48.3	1,74
CYN48.4	1,60
Média	1,58
EPM	0,06
n	4
<hr/>	
<hr/>	
<b>CYN96</b>	
<b>TBARS (nmol/mg proteína)</b>	
CYN96.1	1,70
CYN96.2	1,76
CYN96.3	1,71

CYN96.4	1,68
CYN96.5	1,65
Média	1,70
EPM	0,02
n	5

**ANEXO H** – Concentração de CYN nos homogenatos de pulmão dos grupos CYN2, CYN8, CYN24, CYN48 e CYN96.

<b>CYN2</b>	
	<b>CYN (ng/g tecido pulmonar)</b>
CYN2.1	14,00
CYN2.2	14,10
CYN2.3	13,28
CYN2.4	14,08
CYN2.5	13,80
Média	13,82
EPM	0,15
n	5

<b>CYN8</b>	
	<b>CYN (ng/g tecido pulmonar)</b>
CYN8.1	10,75
CYN8.2	13,22
CYN8.3	11,49
CYN8.4	7,89
CYN8.5	10,23
Média	10,71
EPM	0,87
n	5

<b>CYN24</b>	
	<b>CYN (ng/g tecido pulmonar)</b>



CYN24.1	8,38
CYN24.2	10,23
CYN24.3	7,14
CYN24.4	7,45
CYN24.5	8,50
Média	8,34
EPM	0,54
n	5

---



---

**CYN48**


---

**CYN (ng/g tecido pulmonar)**


---

CYN48.1	7,14
CYN48.2	7,45
CYN48.3	7,31
CYN48.4	4,57
CYN48.5	6,57
Média	6,61
EPM	0,53
n	5

---



---

**CYN96**


---

**CYN (ng/g tecido pulmonar)**


---

CYN96.1	9,76
CYN96.2	5,66
CYN96.3	3,65
CYN96.4	5,25
CYN96.5	4,06
Média	5,68
EPM	1,08
n	5

---

**ANEXO I** – Concentração de CYN nos homogenatos de fígado dos grupos CYN2, CYN8, CYN24, CYN48 e CYN96.

<b>CYN2</b>	
	<b>CYN (ng/g tecido hepático)</b>
CYN2.1	52,21
CYN2.2	23,17
CYN2.3	46,93
CYN2.4	43,26
CYN2.5	46,77
Média	42,47
EPM	5,03
n	5

<b>CYN8</b>	
	<b>CYN (ng/g tecido hepático)</b>
CYN8.1	43,04
CYN8.2	53,26
CYN8.3	47,72
CYN8.4	48,24
CYN8.5	49,01
Média	48,25
EPM	1,63
n	5

<b>CYN24</b>	
	<b>CYN (ng/g tecido hepático)</b>
CYN24.1	40,00
CYN24.2	49,01
CYN24.3	59,25
CYN24.4	69,06
CYN24.5	55,25
Média	54,51

EPM	4,87
n	5
<hr/>	
<b>CYN48</b>	
<b>CYN (ng/g tecido hepático)</b>	
CYN48.1	61,05
CYN48.2	61,05
CYN48.3	41,63
CYN48.4	42,47
CYN48.5	58,66
Média	52,97
EPM	4,48
n	5
<hr/>	
<b>CYN96</b>	
<b>CYN (ng/g tecido hepático)</b>	
CYN96.1	70,45
CYN96.2	107,90
CYN96.3	63,54
CYN96.4	114,57
CYN96.5	88,95
Média	89,09
EPM	10,00
n	5
<hr/>	

# 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](#)