

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

**VIVIANE RAMOS CAGIDO**

**ANÁLISE TEMPORAL DA LESÃO PULMONAR INDUZIDA POR INSTILAÇÃO  
INTRATRAQUEAL DE MICROCISTINA-LR EM CAMUNDONGOS**

Rio de Janeiro  
Agosto de 2010

# **Livros Grátis**

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

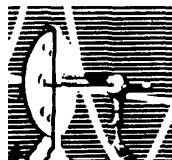
Milhares de livros grátis para download.



**VIVIANE RAMOS CAGIDO**

**ANÁLISE TEMPORAL DA LESÃO PULMONAR INDUZIDA POR INSTILAÇÃO  
INTRATRAQUEAL DE MICROCISTINA-LR EM CAMUNDONGOS**

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



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

## FICHA CATALOGRÁFICA

Cagido, Viviane Ramos.

Análise temporal da lesão pulmonar induzida por instilação intratraqueal de microcistina-LR em camundongos / Viviane Ramos Cagido. – Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2010.

xviii, 144 f. : il. ; 31 cm

Orientador: Walter Araújo Zin.

Tese (doutorado) -- UFRJ, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-graduação em Fisiologia, 2010.

Referências bibliográficas: f. 108-127.

1. Lesão pulmonar - induzido quimicamente. 2. Microcistinas - toxicidade. 3. Mecânica respiratória - efeitos de drogas. 4. Pulmão - anatomia & histologia. 5. Fígado - anatomia & histologia. 6. Estresse oxidativo - efeitos de drogas. 7. Oxirredução - efeitos de drogas. 8. Fatores de tempo. 9. ELISA. 10. Camundongo. 11. Fisiologia - Tese.  
I. Zin, Walter Araújo. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-graduação em Fisiologia. III. Título.

**ANÁLISE TEMPORAL DA LESÃO PULMONAR INDUZIDA POR INSTILAÇÃO  
INTRATRAQUEAL DE MICROCISTINA-LR EM CAMUNDONGOS**

VIVIANE RAMOS CAGIDO

ORIENTADOR: WALTER ARAÚJO ZIN

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

APROVADA POR:

---

Prof. Walter Araújo Zin – Orientador  
Prof. Titular UFRJ

---

Prof. Paulo Hilário Nascimento Saldiva  
Prof. Titular USP

---

Prof<sup>a</sup>. Cristiane Bandeira de Melo  
Prof<sup>a</sup>. Adjunta UFRJ

---

Prof. Jackson Souza Menezes  
Prof. Adjunto UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Denise Pires de Carvalho - Revisora  
Prof<sup>a</sup>. Associada UFRJ

---

Prof. Marcelo Einicker Lamas - Suplente Interno  
Prof. Adjunto UFRJ

---

Prof. Antônio Galina – Suplente Externo  
Prof. Adjunto UFRJ

Rio de Janeiro  
Agosto de 2010

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

*Aos meus avós Amália Ester e Ubiracy,  
pais dedicados na minha criação e os maiores  
entusiastas das minhas vitórias.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Walter Araújo Zin, por mais de oito anos de orientação e incentivo desde os tempos de iniciação científica no Laboratório de Fisiologia da Respiração, pela confiança no meu trabalho e pelo exemplo profissional que tanto admiro. Sem dúvida minha busca pelo conhecimento foi imensamente enriquecida sob sua supervisão.

À Prof<sup>a</sup>. Débora Souza Faffe, por sua prestatividade, conselhos e auxílios em momentos decisivos da minha formação.

Ao Prof. Samuel dos Santos Valença e seus alunos Renata, Manuela, Marco Aurélio, Thiago, Eduardo, Karla, pelos seus esforços para que eu obtivesse resultados valorosos a tempo desta defesa e ajuda com a interpretação e discussão dos dados.

Aos queridos colegas do Laboratório de Fisiologia da Respiração, Clarissa Magalhães, Douglas Riva, Flavia Mazzoli, Giovanna Cavalcante, Mariana Ávila, Mariana Machado e Vinícius de Oliveira, pela preocupação, compreensão, paciência, carinho e, também, pelos momentos de descontração. Agradeço especialmente à Natália Vasconcelos e Douglas Fonseca, pela parceria neste trabalho. Com certeza, nesses muitos anos de convivência foram criados laços de amizade que perdurarão para o resto da vida.

Às colaboradoras e amigas do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, Prof<sup>a</sup> Sandra Azevedo e Prof<sup>a</sup> Raquel Soares por todo o auxílio e imensa paciência para responder às minhas dúvidas.

Aos técnicos do Laboratório de Fisiologia da Respiração Sr. Antônio Carlos de Souza Quaresma e João Luiz Alves, sempre dispostos a ajudar.



Às minhas queridas mãe e irmã e aos meus padrinhos, Ronaldo e Ivone, pelo amor, amizade e torcida para que tudo desse certo. Amo vocês.

Ao meu amor, Michael, por estar sempre por perto, mesmo quando a distância de um oceano nos afastava.

E, finalmente, a Deus, por tudo e todos que pôs em meu caminho até hoje.

## RESUMO

CAGIDO, Viviane Ramos. **Análise temporal da lesão pulmonar induzida por instilação intratraqueal de microcistina-LR em camundongos.** Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Ciências - Fisiologia) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010

Cianotoxinas presentes na água utilizada pela população podem causar graves problemas à saúde. O objetivo deste trabalho foi avaliar temporalmente os efeitos da cianotoxina hepatotóxica microcistina-LR (MC-LR) sobre a mecânica pulmonar, histologia e inflamação pulmonar e hepática e analisar indicadores de estresse oxidativo no pulmão de camundongos. Para isso, camundongos Swiss machos (n=149) foram divididos em dois grupos: controle (CT), no qual os animais receberam solução salina estéril intratraquealmente (*i.t.*, 50  $\mu$ L), e MC, no qual uma dose subletal de MC-LR (40  $\mu$ g/kg, *i.t.*) foi instilada. Em animais do grupo CT (n=13) e após 2 (n=16), 8 (n=13), 24 (n=24), 48 (n=15) e 96 horas (n=17) da instilação de MC-LR foi avaliada a mecânica pulmonar. O pulmão esquerdo e o fígado seguiram para análise histológica, sendo computados no pulmão a fração de área de colapso alveolar e conteúdo de células polimorfonucleares (PMN), além da análise qualitativa de ambos os tecidos. A quantificação de MC-LR por ELISA foi realizada no pulmão direito e no fígado. Do restante dos animais (CT=10 e MC=41) foram realizados os ensaios bioquímicos para detecção de estresse e dano oxidativos no pulmão. Houve um aumento do colapso alveolar nos grupos MC em 2, 8, 24 e 48 h comparados ao CT, com elevação da pressão necessária para vencer o componente viscoelástico e/ou inomogêneo do pulmão ( $\Delta P_2$ ), da elastância estática (Est) e do componente viscoelástico da Est ( $\Delta E$ ) nos mesmos tempos, exceto em 24 h, quando a mecânica pulmonar foi normalizada. O montante de células PMN no pulmão foi maior em todos os grupos MC até as 96 h estudadas, assim como a atividade da mieloperoxidase, indicando que este infiltrado de células inflamatórias foi essencialmente neutrofílico. A histologia hepática evidenciou necrose e desestruturação dos hepatócitos a partir de 8 h, com inflamação a partir de 24 h. A presença de MC-LR livre no pulmão e no fígado foi detectada desde 2 h até o final do tempo experimental em 96 h, sendo observado aumento da toxina no fígado de forma tempo-dependente. A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase no pulmão se mostrou alterada em diferentes tempos experimentais, sendo também observado dano oxidativo pelo aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em 2, 24, 48 e 96 h. A administração *i.t.* de MC-LR levou a um comprometimento bifásico da mecânica pulmonar, caracterizado por um aumento precoce (2 h e 8 h) e outro tardio (48 h) de parâmetros da mecânica (Est,  $\Delta E$ ,  $\Delta P_2$ ). Também foram identificados colapso alveolar, inflamação pulmonar e hepática, desequilíbrio nos níveis de enzimas antioxidantes e presença de dano oxidativo celular. Este trabalho reforça a importância da via inalatória como uma potencial via de intoxicação por MC-LR.

## ABSTRACT

CAGIDO, Viviane Ramos. **Análise temporal da lesão pulmonar induzida por instilação intratraqueal de microcistina-LR em camundongos.** Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Ciências - Fisiologia) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010

Cyanotoxins present in the water for human use may yield serious health conditions. The aim of this study was to evaluate the temporal effects of the hepatotoxic cyanotoxin microcystin-LR (MC-LR) on lung mechanics, lung and liver histology and inflammation, and the pulmonary oxidative stress in mice. For that purpose, male Swiss mice (n=149) were randomly divided in 2 groups: control (CT), which received sterile saline intratracheally (*i.t.*, 50  $\mu$ L), and MC, in which a sublethal dose of MC-LR (40  $\mu$ g/kg, *i.t.*) was instilled. Animals from CT group (n=13), and 2 (n=16), 8 (n=13), 24 (n=24), 48 (n=15) e 96 h (n=17) after the instillation with MC-LR were used for lung mechanics analysis. The left lung and liver underwent histological analysis, with the fractional area of alveolar collapse, and amount of polymorphonuclear cells (PMN) being computed in the lungs, as well as qualitative analyses of both tissues. The amount of MC-LR was determined in the right lung and liver by ELISA. In the remaining animals (CT=10 and MC=41) biochemical analyses were done to detect oxidative stress and damage. Alveolar collapse increased in the MC groups in 2, 8, 24 and 48 h compared to CT, with increase in the pressure variation necessary to overcome lung viscoelastic and/or inhomogeneous component ( $\Delta P_2$ ), static elastance (Est), and viscoelastic component of Est ( $\Delta E$ ) on the same experimental time points, except for 24 h, when pulmonary mechanics was normalized. The amount of PMN in lung augmented in all MC groups until 96 h, as well as myeloperoxidase activity, indicating that the inflammatory cell infiltrate was essentially neutrophilic. Hepatic histology has shown necrosis and hepatocytes disarrangement beginning at 8 h, with inflammation starting at 24 h. The presence of free MC-LR on lung and liver homogenates was detected from 2 h to the end of experimental time on 96 h, with a time-dependent accumulation of the toxin in liver. Antioxidative enzymes activity, such as superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase were altered at different time points, and oxidative damage detected by increase of thiobarbituric acid reactive substances was also observed at 2, 24, 48 and 96 h. The *i.t.* administration of MC-LR led to a biphasic compromise of pulmonary mechanics, characterized by an early deterioration (2 h and 8 h), followed by normalization at 24 h, and a later worsening (48 h) of mechanical parameters (Est,  $\Delta E$ ,  $\Delta P_2$ ). Also, alveolar collapse, lung and liver inflammation, imbalance of antioxidants enzymes, and oxidative damage were identified. This work reinforces the airways as an important route of intoxication by MC-LR.

## SUMÁRIO

Agências Financiadoras .....	iii
Resumo .....	vii
Abstract .....	viii
Sumário .....	ix
Sumário das Figuras .....	xii
Sumário das Tabelas .....	xv
Símbolos, Abreviaturas e Fórmulas .....	xvi
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
1.1 Características gerais das cianobactérias .....	02
1.2 Microcistinas .....	05
1.2.1 Estrutura Química .....	06
1.2.2 Farmacocinética .....	07
1.2.3 Mecanismo de Ação e Efeitos .....	09
1.2.4 Metabolização, Detoxificação e Eliminação .....	14
1.2.5 Efeitos no Pulmão .....	15
1.2.6 Considerações Finais sobre as Microcistinas .....	18
1.3 Noções Básicas sobre Estresse Oxidativo e Balanço Redox .....	19
1.3.1 Radicais livres .....	19
1.3.2 Sistemas de Defesa Antioxidante .....	21
1.3.2.1 Superóxido Dismutase (SOD) .....	22
1.3.2.2 Catalase (CAT) .....	22
1.3.2.3 Glutathiona Peroxidase (GPx) .....	23
1.3.3 Estresse Oxidativo .....	24

1.3.4 Peroxidação Lipídica .....	24
1.4 Noções Básicas sobre o Sistema Respiratório .....	26
1.4.1 Histofisiologia pulmonar .....	26
1.4.2 Mecânica Respiratória .....	29
1.4.3 Estudo da Mecânica Respiratória .....	31
<b>2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO .....</b>	<b>36</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
3.1 Objetivo Geral .....	37
3.2 Objetivos Específicos .....	37
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
4.1 Animais utilizados .....	40
4.2 Caracterização dos Grupos Experimentais .....	41
4.3 Protocolo Experimental .....	42
4.4 Estudo da Mecânica Respiratória .....	46
4.5 Análise da Histologia do Parênquima Pulmonar .....	50
4.5.1 Fixação e Preparo das Lâminas para Microscopia Óptica .....	50
4.5.2 Análise Histológica e Morfométrica .....	51
4.6 Análise da Histologia do Parênquima Hepático .....	54
4.7 Quantificação de Microcistina-LR por ELISA .....	54
4.8 Ensaio Bioquímicos .....	55
4.8.1 Dosagem de Proteínas .....	56
4.8.2 Atividade da MPO .....	57
4.8.3 Atividade da SOD .....	57
4.8.4 Atividade da CAT .....	58

4.8.5 Atividade da GPx .....	59
4.8.6 TBARS.....	59
4.8.7 Carbonilação de Proteínas .....	60
4.9 Análise Estatística .....	60
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>62</b>
5.1 Análise Histopatológica do fígado .....	63
5.2 Quantificação de MC-LR no Fígado .....	67
5.3 Quantificação de MC-LR no Pulmão .....	68
5.4 Mecânica Pulmonar .....	69
5.5 Análise Histopatológica e Morfométrica .....	73
5.5.1 Análise Qualitativa do pulmão .....	73
5.5.2 Análise Quantitativa no pulmão .....	77
5.6 Análise da Atividade da Mieloperoxidase .....	80
5.7 Análise da Atividade das Enzimas Antioxidantes .....	81
5.8 Análise de Dano Oxidativo .....	83
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>104</b>
7.1 Resumo dos Resultados .....	105
7.2 Conclusões .....	106
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>107</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>128</b>

**SUMÁRIO DAS FIGURAS**

Figura 1. Floração de cianobactéria .....	3
Figura 2. Uso recreativo da água .....	5
Figura 3. Desenho esquemático da molécula de microcistina-LR .....	7
Figura 4. Desenho esquemático do efeito de microcistinas sobre hepatócitos e capilares sinusóides .....	11
Figura 5. Reações catalisadas pelas enzimas antioxidantes .....	23
Figura 6. Modelo de molas e amortecedores para interpretação da mecânica do sistema respiratório .....	33
Figura 7. Organograma experimental .....	40
Figura 8. Montagem experimental da mecânica <i>in vivo</i> .....	46
Figura 9. Método de Oclusão ao Final da Inspiração .....	48
Figura 10. Retículo para quantificação dos parâmetros morfométricos .....	52
Figura 11. Retículo para quantificação da celularidade .....	53
Figura 12. Efeito da instilação intratraqueal de microcistina-LR sobre a histologia hepática nos grupos CT e MC 2 h .....	64
Figura 13. Efeito da instilação intratraqueal de microcistina-LR sobre a histologia hepática nos grupos MC 8 h e MC 24 h .....	65
Figura 14. Efeito da instilação intratraqueal de microcistina-LR sobre a histologia hepática nos grupos MC 48 h e MC 96 h .....	66
Figura 15. Quantificação de microcistina-LR no homogenato do fígado .....	67
Figura 16. Quantificação de microcistina-LR no homogenato pulmonar .....	68
Figura 17. Efeito da instilação intratraqueal de microcistina-LR sobre a periferia pulmonar .....	71

Figura 18. Efeito da instilação intratraqueal de microcistina-LR sobre as propriedades elásticas do pulmão .....	72
Figura 19. Efeito da instilação intratraqueal de microcistina-LR sobre a histologia pulmonar nos grupos CT e MC 2 h .....	74
Figura 20. Efeito da instilação intratraqueal de microcistina-LR sobre a histologia pulmonar nos grupos MC 8 h e MC 24 h .....	75
Figura 21. Efeito da instilação intratraqueal de microcistina-LR sobre a histologia pulmonar nos grupos MC 48 h e MC 96 h .....	76
Figura 22. Efeito da instilação intratraqueal de microcistina-LR sobre o percentual de colapso alveolar .....	78
Figura 23. Efeito da instilação intratraqueal de microcistina-LR sobre o influxo de células polimorfonucleares no parênquima pulmonar .....	79
Figura 24. Efeito da instilação intratraqueal de microcistina-LR sobre a atividade da mieloperoxidase .....	80
Figura 25. Efeito da instilação intratraqueal de microcistina-LR sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) .....	81
Figura 26. Efeito da instilação intratraqueal de microcistina-LR sobre a atividade da catalase (CAT) .....	82
Figura 27. Efeito da instilação intratraqueal de microcistina-LR sobre a atividade da glutatona peroxidase (GPx) .....	83
Figura 28. Efeito da instilação intratraqueal de microcistina-LR sobre a peroxidação lipídica .....	84
Figura 29. Efeito da instilação intratraqueal de microcistina-LR sobre a oxidação de proteínas .....	84



Figura 30. Reações catalisadas pela glutathiona peroxidase (GPx) .....	102
--	-----

**SUMÁRIO DAS TABELAS**

Tabela 1. Fluxo, volume e número de animais nos diferentes grupos experimentais .....	69
--	----

## SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E FÓRMULAS

$\Delta E$  – variação de elastância

$\Delta P$  – variação de pressão

$\Delta V$  – variação de volume

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

CAT – catalase

CoQ – coenzima Q

CRF – capacidade residual funcional

Csr – complacência do sistema respiratório

CT – grupo controle

D-Ala – D-alanina

D-Glu – D-glutamato ou ácido glutâmico

D-MeAsp – D-eritro- $\beta$ -ácido metilaspártico

DL<sub>50</sub> – dose letal para 50% da população

DNPH – dinitrofenilhidrazina, do inglês dinitrophenylhydrazine

DTNB – 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico)

Edyn – elastância dinâmica

ERO – espécies reativas de oxigênio

Est – elastância estática

GPx – glutathione peroxidase

GR – glutathione reductase

GSH – glutathione reduzida

GSSG – glutathione oxidada

GST – glutathione S-transferase

HClO – ácido hipocloroso

HE – hematoxilina e eosina

HO<sub>2</sub> – hidroperoxila

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio

HTAB – brometo de hexadeciltrimetilamônio, do inglês hexadecyl-trimethylammonium bromide

IL – interleucina

*i.p.* – intraperitoneal

*i.t.* – intratraqueal

L• – radical alquila

LO• – radical alcoxila

LOO• – radical peroxila

LOOH – hidroperóxido

MC – microcistina / grupo microcistina

MC-LR – microcistina-LR

MDA – malondialdeído

Mdha – *N*-metildehidroalanina

MPO – mieloperoxidase

NADH/NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato

O<sub>2</sub><sup>-</sup> – ânion superóxido

OATP/oatp – polipeptídeos transportadores de anions orgânicos, do inglês organic anion transporting protein

OH<sup>-</sup> – hidroxila

PEEP – pressão positiva ao final da expiração, do inglês positive end-expiratory pressure

Pel – pressão de retração elástica

Pi – pressão pulmonar no ponto de inflexão

Ptp – pressão transpulmonar

Pmáx – Pressão máxima ou de pico inspiratória

PP – proteína fosfatase, do inglês protein phosphatase

Pres – pressão resistiva

Ptr – pressão traqueal

Rva – resistência das vias aéreas

Req – resistência do equipamento

R – resistência

sr – sistema respiratório

Rtec – resistência tecidual

SOD – superóxido dismutase

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês thiobarbituric acid reactive substances

T<sub>i</sub> – tempo inspiratório

TNB – 2-nitro-5-tiobenzoato, do inglês 5-thio-2-nitrobenzoic acid

TNF – fator de necrose tumoral, do inglês tumor necrosis factor

V' – fluxo

V<sub>T</sub> – volume corrente



# INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

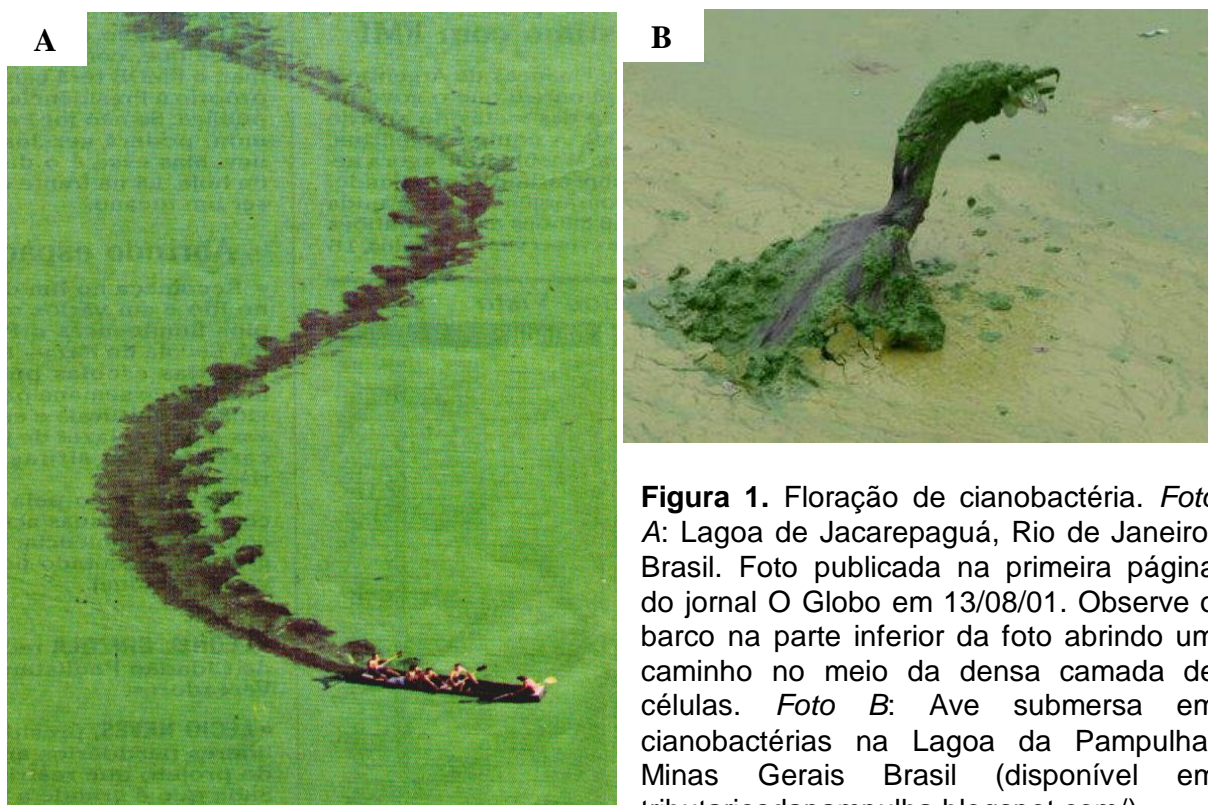
### 1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias, também conhecidas como cianofíceas ou algas-azuis, são microorganismos procariontes com características de algas, já que são aeróbicos e fotoautotróficos, porém bioquímica e estruturalmente bastante semelhantes às bactérias (STANIER *et al.*, 1971; AZEVEDO, 1998). Estima-se que tenham sido os primeiros produtores primários de matéria orgânica a liberarem oxigênio elementar na atmosfera, tendo sua origem datada há 3,5 bilhões de anos. A ampla distribuição geográfica que apresentam reflete a capacidade adaptativa deste grupo de microorganismos com grande diversidade genotípica e fenotípica (AZEVEDO, 1998; LEAL & SOARES, 2004).

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

O processo de eutrofização caracterizado pelo aumento na quantidade de nutrientes na água é intensificado, principalmente, pela atividade humana ligada ao desenvolvimento urbano, agrícola e industrial, com despejo de esgoto nos corpos d'água. Em todo o mundo, a eutrofização tem favorecido a ocorrência de florações,

gerando uma enorme preocupação já que algumas espécies são potenciais produtoras de toxinas, conhecidas como cianotoxinas (VOLTERRA, 1993; FUNARI & TESTAI, 2008). O primeiro relato de intoxicação de animais relacionado à cianotoxinas foi publicado em 1878, por George Francis na revista Nature e, desde então, florações tóxicas foram descritas em vários países, incluindo o Brasil (*apud* YOO *et al.*, 1995; LEAL & SOARES, 2004).



**Figura 1.** Floração 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:* Ave submersa em cianobactérias na Lagoa da Pampulha, Minas Gerais Brasil (disponível em [tributariosdapampulha.blogspot.com/](http://tributariosdapampulha.blogspot.com/)).

No Brasil, a intensa eutrofização dos ecossistemas aquáticos tem favorecido a dominância desses organismos, com o agravante que grande parte das cepas de cianobactérias isoladas de corpos d'água brasileiros mostrou-se produtora de toxinas (COSTA & AZEVEDO, 1994; DOMINGOS *et al.*, 1999; SANT'ANNA &

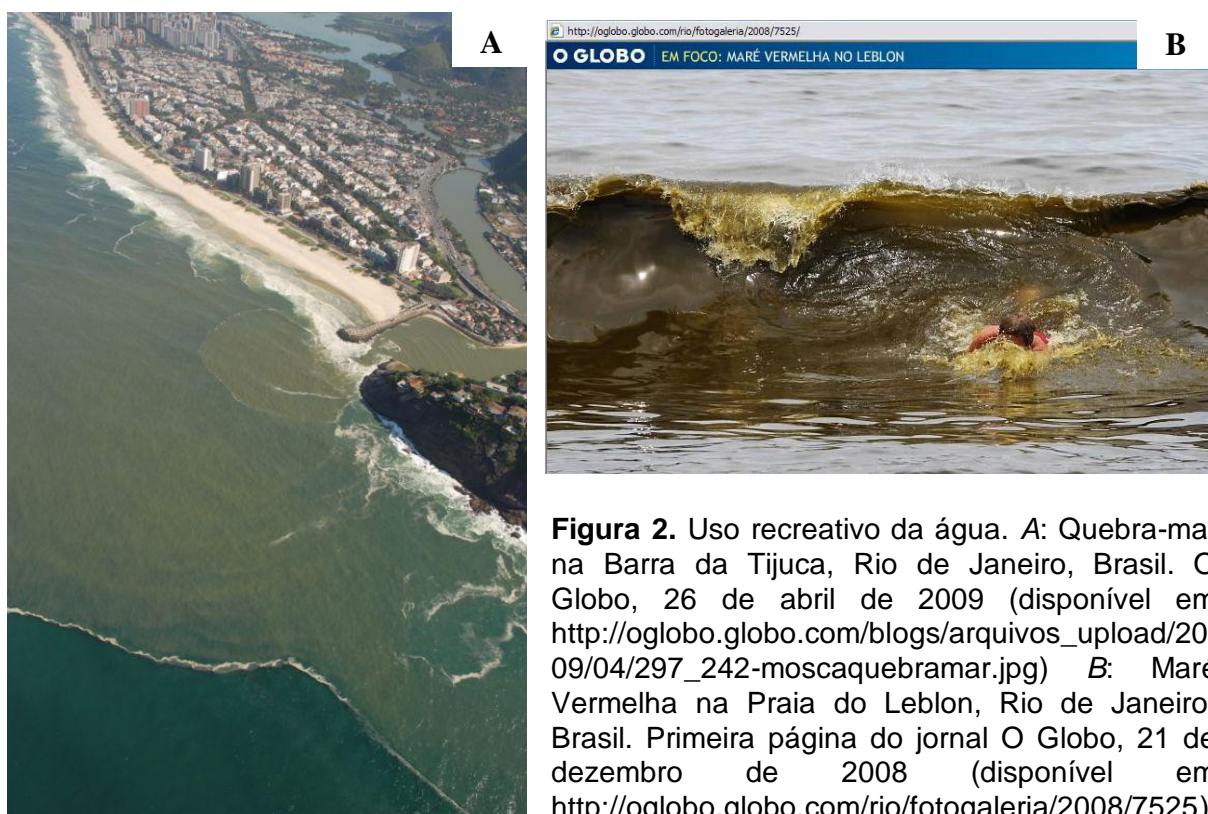


AZEVEDO, 2000). Muitos desses mananciais nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Sul abastecem a rede pública, sendo a liberação dessas toxinas na água representativa de um risco relevante para a saúde pública (LEAL & SOARES, 2004).

As toxinas produzidas pelas cianobactérias são endotoxinas liberadas, principalmente, quando há o rompimento celular, sendo encontrada também no meio extracelular. Alguns autores sugerem um papel ecológico para as cianotoxinas, que podem exercer funções semelhantes a moléculas mensageiras, podendo estar relacionadas à comunicação intra-específica, ou armas biológicas (CHORUS & BARTRAM, 1999; SCHATZ *et al.*, 2007; JANG *et al.*, 2008). A tentativa de controlar as florações com o uso de algicidas, na verdade, só agrava o problema, uma vez que provoca a lise desses organismos, liberando as toxinas para a água. Uma importante característica desse grupo reside no fato de uma mesma espécie de cianobactéria ter a capacidade de produzir mais de um tipo de toxina, assim como podem existir cepas produtoras e cepas não produtoras de toxinas. Os principais grupos de cianotoxinas são as dermatotoxinas, as neurotoxinas e as hepatotoxinas, sendo as duas últimas as mais freqüentemente encontradas em corpos d'água (CARMICHAEL, 1997; FUNARI & TESTAI, 2008).

As principais vias de exposição a cianotoxinas são: dérmica e oral, pelo uso recreativo da água e o consumo de água e alimentos a base de microalgas. Porém, outras vias devem ser consideradas, como a inalatória e, no caso de hemodiálise, a via endovenosa (RESSOM *et al.*, 1994; LEAL & SOARES, 2004). Atividades aquáticas, tais como, nado, mergulho e esqui aquático envolvem um alto risco de exposição quando realizadas em corpos d'água com presença de mais de 15.000 – 20.000 células de cianobactérias/mL, caso seja uma floração tóxica (RESSOM *et al.*, 1994) (Figura 2).

A intoxicação causada por hepatotoxina constitui-se no tipo mais comum e os sinais observados após ingestão dessas toxinas em doses sub-letais incluem prostração, anorexia, vômitos, dor abdominal, diarréia, tosse seca e pneumonia atípica (CARMICHAEL & SCHWARTZ, 1984; BEASLEY *et al.*, 1989).



**Figura 2.** Uso recreativo da água. A: Quebra-mar na Barra da Tijuca, Rio de Janeiro, Brasil. O Globo, 26 de abril de 2009 (disponível em [http://oglobo.globo.com/blogs/arquivos\\_upload/2009/04/297\\_242-moscaquebramar.jpg](http://oglobo.globo.com/blogs/arquivos_upload/2009/04/297_242-moscaquebramar.jpg)) B: Maré Vermelha na Praia do Leblon, Rio de Janeiro, Brasil. Primeira página do jornal O Globo, 21 de dezembro de 2008 (disponível em <http://oglobo.globo.com/rio/fotogaleria/2008/7525/>).

## 1.2 MICROCISTINAS

Microcistinas (MCs) são cianotoxinas principalmente hepatotóxicas, produzidas por algumas espécies de cianobactérias dos generos *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria* e *Nostoc*, estando entre as cianotoxinas mais freqüentemente encontradas (CARMICHAEL, 1994; CHORUS & BARTRAM, 1999).

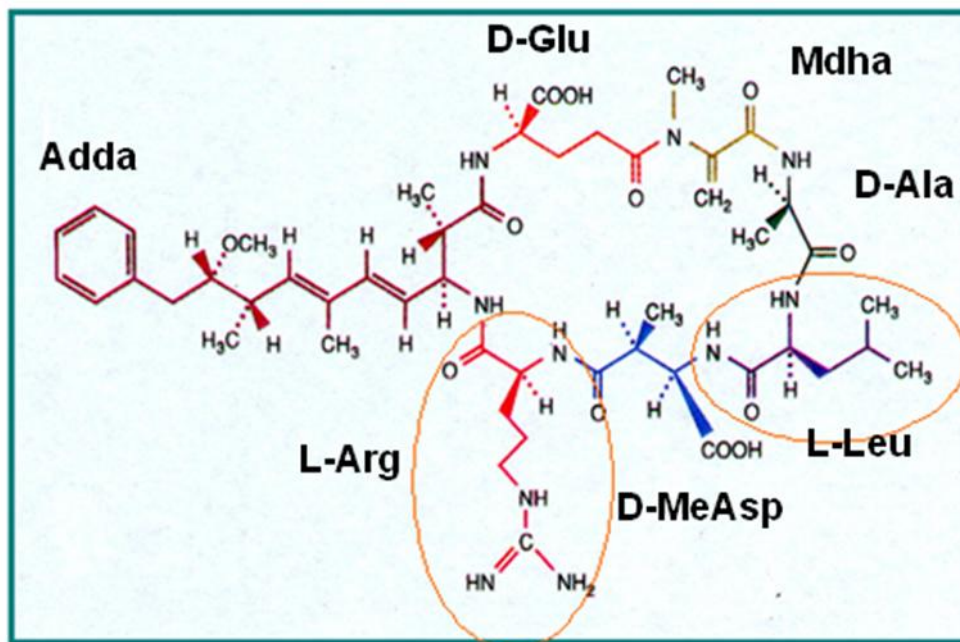
### 1.2.1 Estrutura Química

A estrutura química das MCs foi elucidada por Botes *et al.* (1984, 1985) como heptapeptídeos cíclicos contendo 2 L-aminoácidos variáveis e cinco D-aminoácidos: D-alanina (D-Ala); D-eritro- $\beta$ -ácido metilaspártico (D-MeAsp); D-glutamato (D-Glu); *N*-metildehidroalanina (Mdha) e (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetildeca-4,6-ácido dienóico (Adda). Esses dois últimos são tidos como aminoácidos não-usuais (FUNARI & TESTAI, 2008).

A estrutura das MCs pode variar nos grupos metil e na natureza de seus dois L-aminoácidos, gerando cerca de 80 variantes (PRIETO *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2008). Tais modificações trazem conseqüências para a estrutura terciária da molécula, resultando em diferenças significativas de toxicidade e de suas propriedades hidrofóbicas/hidrofílicas (RINEHART *et al.*, 1994; GULLEDGE *et al.*, 2002). Na figura 3 estão destacados os dois L-aminoácidos da molécula de baixo peso molecular microcistina-LR (MC-LR), no caso a leucina (L) e a arginina (R), tendo 994 Dalton de peso molecular (HARADA *et al.*, 1996). A estrutura química das MCs possibilita a sua solubilidade e estabilidade em água, podendo resistir a grandes variações de temperatura e de pH. A meia-vida da molécula em reservatórios é de cerca de uma semana, sendo prolongada para três semanas numa solução com água deionizada de pH 1 e temperatura de 40°C (WATANABE *et al.*, 1996; SAINIS *et al.*, 2010).

O aminoácido Adda é essencial para a atividade biológica e hepatotoxicidade das MCs, além de conferir hidrofobicidade à molécula (HARADA *et al.*, 1990a,b; CHOI *et al.*, 1993). Dahlem (1989) demonstrou que a remoção ou saturação deste aminoácido reduz muito a toxicidade da MC-LR. Outra importante característica

para a toxicidade das MCs é conferida pela presença de um ácido carboxílico livre na unidade D-Glu (STOTTS *et al.*, 1993).



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

### 1.2.2 Farmacocinética

As MCs são moléculas hidrofílicas e não há indícios de que essas toxinas atravessem a membrana celular por simples difusão, requerendo um mecanismo de captação ativo, através dos polipeptídeos transportadores de anions orgânicos (OATP humano/oatp roedor) (RUNNEGAR *et al.*, 1991; FEURSTEIN *et al.*, 2009; SAINIS *et al.*, 2010). A distribuição sistêmica das MCs irá depender, portanto, do

grau de perfusão sanguínea e da quantidade e tipo de OATP/oatp presente em determinado órgão, já que a afinidade de diferentes transportadores por estas cianotoxinas varia (FEURSTEIN *et al.*, 2009). No fígado, a MC-LR é transportada principalmente pelos OATP1B1, OATP1B3 e oatp1b2, considerados específicos do fígado, e também pelo OATP1A2 expresso em um número maior de tecidos/células como rim, células endoteliais e epiteliais, da barreira hemato-encefálica e neurônios (FISCHER *et al.*, 2005; FEURSTEIN *et al.*, 2009; SAINIS *et al.*, 2010). Camundongos knock-out para o oatp1b2 não sofrem de hepatotoxicidade aguda induzida por MC-LR, porém a toxina ainda é detectada no homogenato hepático, indicando que o transporte de MC-LR na célula ocorre por outros mecanismos em uma taxa baixa e/ou por outros oatps (LU *et al.*, 2008; FEURSTEIN *et al.*, 2009).

Estudos *in vitro* mostraram que a MC-LR é capaz de gerar o mesmo grau de lesão em hepatócitos, células epiteliais renais e fibroblastos, após 4 minutos, 1 e 8 horas, respectivamente (KHAN *et al.*, 1995). Alterações semelhantes na morfologia do citoesqueleto desses três tipos celulares ocorrem se maior tempo de incubação e maiores concentrações de MC-LR forem utilizados para as células renais e fibroblastos (WICKISTROM *et al.*, 1995). Esses dados sugerem que a MC-LR é capaz de entrar na célula por pinocitose e que as diferenças observadas *in vivo* e *in vitro* se devem ao mecanismo de captação mais demorado em outros tipos celulares, em relação aos hepatócitos (RUNNEGAR *et al.*, 1993).

Outra importante característica é a rapidez do transporte dessa toxina. Em experimentos *in vivo*, utilizando camundongos, foi administrada uma variedade não especificada de MC [<sup>14</sup>C] intraperitonealmente (*i.p.*). Após 1 minuto, 70% da MC marcada já se localizava no fígado, aumentando para 90% após 3 horas (BROOKS & CODD, 1987). Em estudos posteriores onde [<sup>3</sup>H]-MC-LR foi injetada também *i.p.*,

foi verificado que 60-70% da toxina já se encontrava no fígado 1 hora após a injeção (ROBINSON *et al.*, 1989, 1991a). Embora a diferença entre os tempos observados nos estudos de Brooks & Codd (1987) e de Robinson *et al.* (1989, 1991a) seja grande, ainda assim, os resultados indicam uma chegada rápida da MC no fígado e distribuição da toxina em outros órgãos, sendo encontrada também nos pulmões, rins, coração e intestino.

A dose letal para 50% dos camundongos injetados com MC-LR (DL<sub>50</sub>) varia de 32,5 a 100 µg/kg de peso corpóreo e a morte ocorre entre 1 e 3 horas após a administração *i.p.* de MC-LR (WATANABE *et al.*, 1996). A DL<sub>50</sub> intratraqueal (*i.t.*, 75 µg/kg) (ITO *et al.*, 2001) ou intranasal (250 µg/kg) (FITZGEORGE *et al.*, 1994) é semelhante à *i.p.* nos poucos estudos que avaliam a exposição pela via respiratória. Já a DL<sub>50</sub> oral apresenta valores de 50 a 170 vezes mais altos que a DL<sub>50</sub> *i.p.*. Não há evidências de que a MC-LR seja hidrolisada por peptidases gástricas e há absorção gastrointestinal desta toxina em maior ou menor escala nas diferentes porções do intestino (DAHLEM *et al.*, 1989; CHORUS & BARTRAM, 1999; ITO *et al.*, 1997, 2000). Através da utilização de técnicas de imunohistoquímica, foi verificado que a absorção da toxina após administração oral ocorre, principalmente, no intestino delgado, onde foi observada erosão das células epiteliais de superfície e da lâmina própria (ITO *et al.*, 1997).

### 1.2.3 Mecanismo de Ação e Efeitos

Diversos autores demonstraram os efeitos tóxicos das MCs em variados grupos de organismos, incluindo peixes e mamíferos (BURY *et al.*, 1997; MIURA *et al.*, 1989). Sua bioacumulação também já foi bem caracterizada em zooplâncton,

peixes, crustáceos e moluscos (FERRÃO-FILHO *et al.*, 2002b; MAGALHÃES *et al.*, 2003; SOARES *et al.*, 2004).

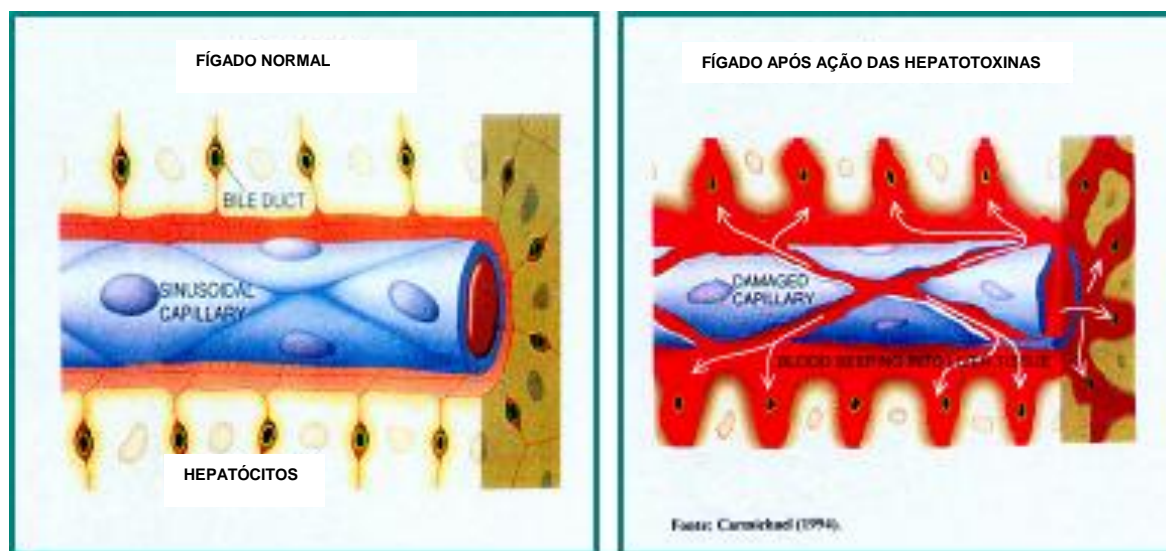
No fígado, essas moléculas inibem as proteínas fosfatases (PP) da família serina/treonina, especialmente as PP1, PP2A dos hepatócitos, podendo levar ao óbito ou intoxicação crônica, inclusive induzindo o aparecimento de tumores hepáticos (FUGIKI, 1992; NISHIWAKI-MATSUHIMA *et al.*, 1992). A ligação MC-PP ocorre em duas etapas principais: inicialmente, o aminoácido hidrofóbico Adda das MCs ocupa o sítio ativo das PP através de ligação não-covalente, o que produz o efeito inibitório da toxina. Em seguida, o aminoácido Mdha liga-se covalentemente ao resíduo de cisteína 273 da PP1 ou cisteína 266 da PP2A (CAMPOS *et al.*, 1996; HONKANEN & GOLDEN, 2002).

A inibição de PP por MCs aumenta o grau de fosforilação de diversos alvos subcelulares, inclusive proteínas do citoesqueleto e proteínas associadas ao mesmo, provocando o seu desarranjo. Conseqüentemente, as células hepáticas tendem a se arredondar, se separam e perdem sua estrutura normal. Também ocorre rompimento dos capilares sinusoidais, com extravasamento de sangue para o espaço intersticial. Não há evidências de que o rompimento dos capilares sinusoidais esteja relacionado aos efeitos das MCs nas células endoteliais. Considera-se que o rompimento dos sinusóides seja uma conseqüência das alterações provocadas por essas toxinas na estrutura dos hepatócitos (FALCONER *et al.*, 1981; HOOSER *et al.*; 1990; WICKSTROM *et al.*, 1996) (Figura 4).

Dependendo do tempo de exposição e da dose de MC podem ocorrer efeitos agudo e crônicos, em animais e humanos (CHORUS & BARTRAM, 1999). Na intoxicação aguda, observa-se necrose hemorrágica extensa, desestruturação dos sinusóides e mudanças no formato celular, peroxidação lipídica, estresse oxidativo,



apoptose e morte em poucas horas (MIURA *et al.*, 1989; WENG *et al.*, 2007). Há hemorragia intra-hepática e o sangue retido no fígado faz com que o órgão duplique de peso, levando à morte por choque hipovolêmico ou falência hepática (CARMICHAEL, 1994). A intoxicação crônica promove dois desfechos principais: lesão hepática progressiva e tumor hepático pré-neoplásico (GUPTA *et al.*, 2003, FUNARI & TESTAI, 2008). Gehringer *et al.* (2004) afirma que doses mais altas de MC levam à apoptose e doses mais baixas promovem proliferação celular. Portanto, a exposição prolongada a doses baixas de MCs pode favorecer o surgimento de câncer hepático.



**Figura 4.** Desenho esquemático do efeito de microcistinas sobre hepatócitos e capilares sinusóides. Retirado de CARMICHAEL (1994).

As MCs também ativam enzimas que participam da via metabólica do ácido aracídônico, como fosfolipase  $A_2$  e cicloxigenase, que, por sua vez, induzem a produção dos mediadores inflamatórios tromboxano  $A_2$  (indutor de agregação



plaquetária) e prostaglandina I<sub>2</sub> (NOBRE *et al.*, 2001). Além disso, alguns estudos demonstraram que MCs têm a capacidade de estimular macrófagos peritoniais a produzirem fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1 (IL-1) (NAKANO *et al.*, 1991; ROCHA *et al.*, 2000; SHI *et al.*, 2004). Desta forma, é possível que macrófagos hepáticos (células de Kupffer) respondam às MCs, produzindo mediadores inflamatórios, e que esse processo inflamatório no fígado contribua para a patogênese e letalidade (WATANABE *et al.*, 1996).

De acordo com Watanabe *et al.* (1996), embora a ação clássica das MCs seja através da inibição das PP, há evidências demonstrando que o dano oxidativo é outro fator importante para sua toxicidade. As MCs podem induzir a formação intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO), lesão celular e peroxidação lipídica, causando lesão ao fígado por meio do estresse oxidativo (DING, 1998a,b; GEHRINGER *et al.*, 2004; SICINSKA *et al.*, 2006; JAYARAJ *et al.*, 2006; WENG *et al.*, 2007). O estresse oxidativo, por sua vez, via JNK (c-Jun N-terminal protein kinase), estimula Bid e AP-1 (substratos da JNK) levando à disfunção mitocondrial e apoptose do hepatócito (WEI *et al.*, 2008).

Em 2005, Moreno e colaboradores mostraram redução da atividade das enzimas anti-oxidantes (superóxido dismutase-SOD, catalase-CAT, glutational peroxidase-GPx e glutational redutase-GR) e um aumento da peroxidação lipídica no fígado e rim de ratos após administração aguda de MC-LR *i.p.*. Resultados semelhantes foram obtidos em camundongos, peixes e eritrócitos humanos (JAYARAJ *et al.*, 2006; SICINSKA *et al.*, 2006; WENG *et al.*, 2007; ATENCIO *et al.*, 2008).

O estudo histopatológico do fígado demonstra desarranjo hepatocelular, perda da arquitetura hepática, alto grau de hepatócitos binucleados ou

multinucleados, vacuolização citoplasmática, esteatose hepática, hepatócitos hipertróficos, cariomegalia, inflamação, necrose, apoptose, fibrose centro-lobular e colestase (RUNNEGAR *et al.*, 1987; THEISS *et al.*, 1988; DAWSON, 1998; GUPTA *et al.*, 2003; ANDRINOLO *et al.*, 2008).

O rim parece ser o segundo órgão mais afetado pelas MCs. Em estudos de distribuição da toxina após injeção *i.p.*, foi verificado que este é o órgão que mais concentra MC, depois do fígado (FALCONER *et al.*, 1986; RUNNERGAR *et al.*, 1986). Lovell *et al.* (1989) conduziram um estudo com camundongos no qual uma dose letal de MC-LR era administrada *i.p.*. Eles observaram que quanto maior a sobrevivência do animal, maior a chance do rim ter seu peso aumentado, e que esse efeito, assim como as lesões renais, poderiam estar relacionados com a hipóxia, edema e diminuição do ritmo de filtração glomerular, bem como a presença de debris hepático-embólicos (ASHWORTH & MASON, 1946; HOOSER *et al.*, 1989). Nobre *et al.* (2001) relataram alterações no funcionamento de rins de ratos perfundidos com MC-LR, talvez relacionadas a lesões vasculares e glomerulares. Em 2003, este mesmo grupo utilizou o sobrenadante de macrófagos estimulados *in vitro* com MC-LR para perfundir rins isolados de ratos, e mostraram que essas células liberam mediadores inflamatórios capazes de promover nefrotoxicidade (NOBRE *et al.*, 2003).

A absorção da toxina após administração oral ocorre, principalmente, no intestino delgado (ITO *et al.*, 1997). Também já foram relatadas alterações de atividades enzimáticas (sucrase, fosfatase ácida e succinato desidrogenase) e aumento da peroxidação lipídica na mucosa intestinal de ratos, assim como apoptose em quase todo o trato gastrointestinal de camundongos injetados com MC-LR *i.p.* (MORENO *et al.*, 2003; BOTHA *et al.*, 2004).

#### 1.2.4 Metabolização, Detoxificação e Eliminação

A glutathiona reduzida (GSH) constitui a principal via de metabolização e detoxificação das MCs no fígado (RUNNEGAR *et al.*, 1987). Até determinada concentração, as MCs podem ser biotransformadas por meio de ligação não-enzimática com GSH ou através da ação da glutathiona S-transferase (GST). O conjugado MC-SG, além de ser um composto mais facilmente excretável, também ficaria impossibilitado de estabelecer a ligação covalente com as fosfatases (WIEGAND *et al.*, 2002). No entanto, já foi observado que este conjugado, apesar de muito menos tóxico, ainda tem potencial lesivo, pois o aminoácido Adda das MCs continua disponível para a ligação com o sítio ativo das fosfatases (KONDO *et al.*, 1992).

A importância da GSH e da GST na proteção do fígado contra os efeitos deletérios da MC-LR foi estudada por Gehringer *et al.* (2004). Foi verificado um aumento da peroxidação lipídica, o que resulta de estresse oxidativo, seguido de aumento na atividade de glutathiona peroxidase (GPX), após a injeção de camundongos com 75% da DL<sub>50</sub> de MC-LR. Também foi observado um decréscimo inicial de GSH total, relacionado ao aumento da atividade da GST. Os níveis de GSH voltaram ao normal 24 horas após a administração da toxina, claramente devido ao aumento da atividade da glutathiona sintetase. Esse grupo mostrou que o aumento da atividade enzimática foi regulado em nível transcripcional.

A avaliação da excreção de MC-LR em camundongos injetados com uma dose sub-letal via *i.v.* demonstrou que aproximadamente 24% da toxina administrada foi eliminada através da urina (9%) e das fezes (15%), ao longo de seis dias de estudo (ROBINSON *et al.*, 1991a). Falconer *et al.* (1986) também

observaram em ratos que, após 120 minutos da injeção *i.v.* de uma variedade não especificada de MC, 9,4% da dose administrada estava presente no conteúdo intestinal e que 2,9% estava presente na urina, sugerindo que a excreção biliar tem um importante papel na eliminação de MCs.

Poucos estudos foram realizados em humanos para avaliar a eliminação dessa toxina do organismo. Através do acompanhamento de pacientes em diálise expostos a MCs via *i.v.*, em dois incidentes ocorridos no Brasil, foi observado que mais de cinquenta dias após a exposição, ainda havia toxina no soro destes pacientes (HILBORN *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2006).

#### 1.2.5 Efeitos no Pulmão

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

Sabe-se que as MCs podem alcançar o pulmão, sendo absorvidas de forma rápida por via direta (ITO *et al.*, 2001). Uma única administração de dose sub-letal de MC-LR via *i.t.* em camundongos levou à permanência desta toxina no tecido pulmonar por 7 horas, como evidenciado por técnicas de imunohistoquímica. Após

esse período, a toxina foi identificada fagocitada no interior de macrófagos. Outros estudos experimentais e relatos de doenças em humanos fornecem fortes indícios de que a via aérea é uma importante porta de entrada para as MCs. Em um estudo sobre a exposição por inalação, Fitzgeorge *et al.* (1994) comprovaram que a DL<sub>50</sub> de MC-LR para camundongos por administração intranasal foi igual à DL<sub>50</sub> por injeção *i.p.*. Os autores verificaram necrose extensa do epitélio da mucosa, tanto da via respiratória quanto olfatória, o que teria facilitado a absorção da toxina pela ampla rede de capilares presentes na região. Outro trabalho, utilizando aerosol contendo MC-LR, também mostrou necrose ou inflamação das células epiteliais respiratórias da cavidade nasal, com presença de infiltrado neutrofílico e degeneração, necrose e atrofia das células epiteliais olfatórias em camundongos. No entanto, nenhuma alteração pulmonar foi encontrada (BENSON *et al.*, 2005).

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

Em um dos primeiros trabalhos a citar os efeitos da MC no pulmão, Slatkin *et al.* (1983) observaram que camundongos injetados *i.p.* com altas doses de MC-LR

apresentaram trombose pulmonar atípica. Falconer *et al.* (1988), em um longo estudo de intoxicação crônica, ofereceu a camundongos água contendo extratos de *Microcystis aeruginosa* produtora de MCs, em cinco doses diferentes que variavam de 750 a 12.000 µg/kg/dia, e verificaram broncopneumonia naqueles animais submetidos a doses mais altas.

A injeção *i.p.* de 1 LD<sub>50</sub> de MC-LR ocasiona danos na histologia pulmonar, com lesões predominantemente nos brônquios e parênquima pulmonar, além de inflamação, congestão e hemorragia (GUPTA *et al.*, 2003). Recentemente, foi descrito pelo nosso grupo um processo inflamatório no pulmão de camundongos, causado pela injeção *i.p.* de dose sub-letal (40 µg/kg) do extrato aquoso obtido de uma linhagem tóxica da *Microcystis aeruginosa*. A inflamação teve como característica um início rápido (2 horas após a injeção), que persistiu mesmo após 96 horas de estudo, caracterizada na histologia pulmonar por edema intersticial e recrutamento de células inflamatórias, além de colapso alveolar (PICANÇO *et al.*, 2004). No entanto, a presença de metabólitos secundários no extrato poderia ter contribuído para os resultados observados. Nesse contexto, utilizou-se a toxina purificada no mesmo modelo de exposição *i.p.* para melhor avaliar seus efeitos sobre os pulmões. Foram evidenciadas piora da função pulmonar e da resposta inflamatória no tecido pulmonar, fluido do lavado broncoalveolar e sangue, com pico de resposta após 8 horas da injeção de MC-LR (SOARES *et al.*, 2007). Também foram propostos tratamentos para as lesões observadas no pulmão e no fígado de camundongos através da administração de dexametasona ou LASSBio 596, tendo sido demonstrada a maior eficácia do LASSBio 596 em relação a dexametasona no processo inflamatório no pulmão, evitando as alterações bioquímicas e na mecânica pulmonar e minimizando as modificações histológicas. Porém a histologia hepática

não evidenciou padrão de melhora do tecido com nenhum dos tratamentos propostos (CARVALHO *et al.*, 2010).

#### 1.2.6 Considerações Finais sobre as Microcistinas

Há alguns relatos, de diferentes regiões do mundo, sobre intoxicação humana devido à ingestão de cianobactéria tóxica, levando inclusive ao óbito (BILLINGS, 1981; FALCONER, 1989). Teixeira *et al.* (1993) descreveram evidência de correlação entre a ocorrência de florações de cianobactérias no reservatório de Itaparica (Bahia) e a morte de 88 pessoas, entre 200 intoxicadas, pelo consumo de água do reservatório, nos meses de março e abril de 1988.

O primeiro caso confirmado de morte humana por intoxicação por MCs ocorreu na cidade de Caruaru (1996), onde mais de cem pacientes renais crônicos foram intoxicados e 52 morreram devido à exposição do circuito de hemodiálise à água contendo MCs (JOCHIMSEN *et al.*, 1998; CARMICHAEL *et al.*, 2001; AZEVEDO *et al.*, 2002). A região sofria de uma forte seca naquela época, os reservatórios que abasteciam a cidade estavam com volumes reduzidos e apresentavam intensa floração de cianobactérias. A intermitência no abastecimento de água levou as clínicas de hemodiálise da cidade a buscar água diretamente dos reservatórios, transportada por caminhões-pipa. Entretanto, a adição de cloro nesses caminhões-pipa para tratar a água resultou em lise das cianobactérias e liberação da toxina na água. Na clínica, o tratamento dado à água mostrou-se inadequado, já que os sistemas de colunas de troca iônica e carvão ativado não estavam em condições adequadas de uso e, assim, não puderam reter as toxinas.

A preocupação mundial com os riscos impostos pela ocorrência de cianobactérias em corpos d'água utilizados para o abastecimento público se reflete na criação de legislações específicas, visando ao aperfeiçoamento do controle da qualidade da água, incluindo o monitoramento de cianotoxinas. A Organização Mundial de Saúde estabeleceu em 1 µg/L/dia o máximo de MCs na água para consumo. O Brasil foi o primeiro país a estabelecer tal medida, por meio da portaria 1469 de 29 de dezembro do Ministério da Saúde (2000), posteriormente substituída pela portaria 518 (2004).

Revisadas as principais características da MC-LR, mostrando que o estresse oxidativo é um fator importante para sua toxicidade no fígado, e sendo o pulmão o principal objeto de estudo desta tese, algumas noções básicas sobre estresse oxidativo e sistema respiratório são introduzidas a seguir.

### 1.3 NOÇÕES BÁSICAS SOBRE ESTRESSE OXIDATIVO E BALANÇO REDOX

#### 1.3.1 Radicais Livres

Radicaís livres são átomos ou moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados na sua órbita externa, o que os torna altamente reativos, podendo interagir com importantes componentes celulares, como a membrana celular ou o DNA mitocondrial, levando ao dano da função celular ou até mesmo a morte da célula (CIENCEWICKI *et al.*, 2008). Entretanto, os radicaís livres e outras substâncias a eles relacionadas também têm sido apontados como importantes mecanismos de 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; HII & FERRANTE, 2007).

Os radicais livres de oxigênio superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxila (OH) e hidroperoxila ( $HO_2$ ) são os que possuem uma maior relevância biológica, não só devido à sua elevada toxicidade, mas, também, por serem os mais prevalentes nos organismos vivos que utilizam o oxigênio como comburente (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Existem, contudo, outras moléculas altamente reativas e potencialmente tóxicas para o organismo, as quais, por não conterem nenhum elétron desemparelhado nos seus orbitais, não se enquadram na definição de radical livre. É o caso do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e do ácido hipocloroso (HClO), potenciais geradores 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, a denominação “espécies reativas de oxigênio” (ERO) para englobar, além dos radicais, estas moléculas tornou-se mais adequada (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

O balanço redox em líquidos biológicos, organelas, células ou tecidos é determinado pela presença de pares redox responsáveis pelo fluxo de elétrons. Esses sofrem freqüentes interconversões entre o estado reduzido (ganho de elétrons) e o oxidado (perda de elétrons) (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Portanto, quando no metabolismo normal ocorrer uma redução do oxigênio molecular ( $O_2$ ), este ganhará um elétron, formando o radical  $O_2^-$ , considerado instável por possuir número ímpar de elétrons na última camada.

ERO são encontradas em todos os sistemas biológicos, sendo as fontes geradoras a cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, o retículo endoplasmático e as nicotinamida-adenina nucleotídeo (NADH/NADPH) oxidases

associadas à membrana. São formados os radicais  $O_2^-$ ,  $HO_2$ ,  $OH^-$  e  $H_2O_2$ . Este é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, uma vez que participa da reação que produz o  $OH^-$ , é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao ferro, mostrando-se altamente tóxico para as células.

### 1.3.2 Sistemas de Defesa Antioxidante

Um antioxidante é qualquer substância que atrasa significativamente, ou inibe, a oxidação de potenciais substratos oxidáveis pelas ERO (HALLIWELL, 1991; SIES, 1997; DROGE, 2002). Os mecanismos de defesa antioxidante nos diferentes tecidos compreendem sistemas enzimáticos e não enzimáticos e podem ser classificados em função da sua localização orgânica (antioxidantes intracelulares e extracelulares) e da sua origem, seja da dieta (antioxidantes exógenos), ou da síntese endógena (antioxidantes endógenos) (GOLDFARB, 1999).

Na 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 (GPx) e a glutathione redutase (GR) e 2) sistemas não-enzimáticos, tais como glutathione reduzida (GSH), coenzima Q (CoQ), ácido úrico, vitaminas E e C, flavonóides, carotenóides, proteínas de transporte de metais de transição, transferrina e ceruloplasmina (BECKMAN & AMES, 1998; SEN, 2001). Destes, os agentes que apresentam um papel mais preponderante dentro dos sistemas intracelulares de defesa antioxidante são a SOD, a CAT e a GPx (LEE *et al.*, 2004; MORENO *et al.*, 2005). Em situações de produção exagerada de ERO,

cada uma destas enzimas possui a capacidade de catalisar reações que conduzem à produção de espécies menos reativas (FERREIRA *et al.*, 2006).

#### 1.3.2.1 Superóxido Dismutase (SOD)

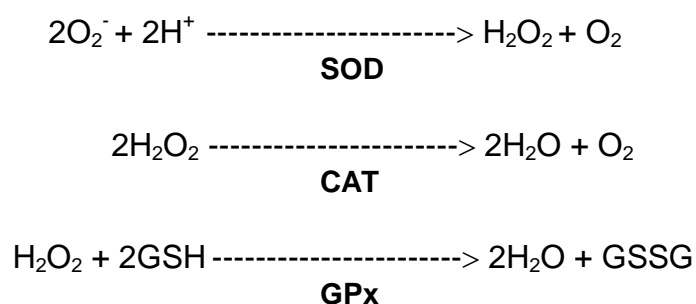
A SOD metaboliza o  $O_2^-$  com formação de  $H_2O_2$  (Figura 5). Nos mamíferos existem três isoenzimas da SOD, codificadas e reguladas de forma independente: a citosólica (Cu,Zn-SOD ou SOD1), a mitocondrial (Mn-SOD ou SOD2) e uma forma extracelular da Cu,Zn-SOD ou (SOD3). A atividade total da SOD está presente principalmente no fígado, rim, eritrócitos, cérebro, coração e pâncreas (HALLIWELL, 1991; FERREIRA *et al.*, 2006).

#### 1.3.2.2 Catalase (CAT)

A CAT é uma enzima presente na maioria dos organismos aeróbios e é responsável pela conversão do  $H_2O_2$  intracelular em água e oxigênio (Figura 5), estando a maior parte da atividade desta enzima localizada nos peroxissomas. Na maioria dos animais, a CAT está presente em praticamente todos os órgãos, estando particularmente concentrada no fígado e nos eritrócitos. As mitocôndrias e o retículo endoplasmático contêm também alguma atividade da CAT, embora muito reduzida. O encéfalo, o coração e os músculos esqueléticos contêm pequenas quantidades desta enzima. (HALLIWELL, 1991; FERREIRA *et al.*, 2006).

### 1.3.2.3 Glutathione Peroxidase (GPx)

A GPx é considerada a enzima mais importante para a oxidação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  a água. A GPx dos mamíferos tem maior afinidade pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  do que a CAT, o que significa que em concentrações baixas de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a GPx apresenta um papel muito mais ativo na sua remoção celular. Apresenta-se sob quatro formas: GPx 1 ou clássica, encontrada no citosol de todas as células do corpo; a GPx 2 ou gastrointestinal, específica do trato gastrointestinal; GPx 3 ou plasmática ou extracelular, encontrada no fluido do revestimento interno do pulmão e no leite materno, além do plasma em mamíferos, e a GPx 4, que atua sobre peróxidos de resíduos de ácidos graxos na membrana e lipoproteínas (BAST *et al.*, 1991). O seu correto funcionamento está dependente 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 GSH como doador de elétrons, formando a glutathione oxidada (GSSG) e água (Figura 5). Este funcionamento atribui à GPx um papel importante na proteção celular das membranas lipídicas, proteínas e ácidos nucleicos contra as ERO (HALLIWELL, 1991; FERREIRA *et al.*, 2006).



**Figura 5.** Reações catalisadas pelas enzimas antioxidantes. SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GPx: glutathione peroxidase; GSH: glutathione reduzida; GSSG: glutathione oxidada.

### 1.3.3 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre a ação dos agentes oxidantes e antioxidantes, com predomínio dos oxidantes, com conseqüente dano tanto aos lipídeos quanto ao DNA (HALLIWELL, 1991). Em termos gerais, o estado de estresse oxidativo orgânico parece variar com a concentração de oxigênio, o tipo de tecido analisado, dieta e a idade do indivíduo, ingestão de fármacos, exposição a condições ambientais impróprias, tais como radiação ultravioleta, poluição, umidade relativa, temperatura ambiente e estresse emocional.

Esta situação de estresse oxidativo traduz-se na incapacidade de impedir ou reparar as repercussões das ERO sobre as estruturas celulares e já foi descrito que ocorre em todos os seres biológicos, mesmo em situações de funcionalidade basal, isto é, em repouso (MOTA *et al.*, 2004). Um incremento do estresse oxidativo pode dever-se não só ao aumento na produção de ERO, mas, também, a redução da capacidade antioxidante ou, ainda, à conjugação destes dois fatores.

### 1.3.4 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 ( $L^{\bullet}$ ), alcóxila ( $LO^{\bullet}$ ) e peróxila ( $LOO^{\bullet}$ ), levando à destruição de sua estrutura (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Todos os componentes celulares são suscetíveis a ação das ERO, porém a membrana é um dos mais atingidos, havendo perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas,

e formação de produtos citotóxicos, como o malondialdeído. Todas essas modificações oxidativas causam mudanças nas propriedades físicas e químicas das membranas, culminando com a morte celular. Porém, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos atuam significativamente na reação em cascata a partir do ácido aracdônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória (HALLIWELL, 1991). Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (LIMA & ABDALLA, 2001; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (HALLIWELL, 1991; LIMA & ABDALLA, 2001; VASCONCELOS *et al.*, 2007). A etapa de iniciação 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 (LIMA & ABDALLA, 2001). Sob condições aeróbicas, o carbono radicalar 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 é capaz de abstrair hidrogênio de moléculas de lipídeos adjacentes, cujo carbono radicalar 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 (HALLIWELL, 1991). O radical peroxila combina-se então com o hidrogênio abstraído, gerando o lipídeo hidroperóxido (LOOH) que, ao sofrer quebra, forma aldeídos como malonaldeído, entre outros. Na decomposição dos hidroperóxidos lipídicos são gerados radicais peroxila e alcóxila. A terceira e última etapa da peroxidação lipídica, a etapa de terminação, instala-se com a neutralização dos radicais formados por ação de antioxidantes lipossolúveis

ou pela reação de dois radicais lipídicos, formando produtos não radicalares (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

## 1.4 NOÇÕES BÁSICAS SOBRE O SISTEMA RESPIRATÓRIO

### 1.4.1 Histofisiologia Pulmonar

Os pulmões tem a função primordial de permitir as trocas gasosas entre o ar ambiente e a circulação pulmonar. Essa troca acontece, majoritariamente, em nível alveolar num processo chamado de hematose, que consiste na captação do O<sub>2</sub> do ar, que é levado ao sangue venoso dos capilares pulmonares, e na eliminação do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), resultante dos processos do metabolismo celular.

A traquéia se divide em dois brônquios principais que penetram o pulmão direito e o esquerdo. A partir daí, os brônquios se ramificam por dicotomia no pulmão em brônquios lobares e segmentares, bronquíolos e bronquíolos terminais, que são as menores vias aéreas sem alvéolos. Da traquéia até os bronquíolos terminais encontramos um epitélio pseudo-estratificado ciliado com células mucosecretoras e células de Clara, que secretam proteínas que protegem o revestimento bronquiolar contra certos poluentes do ar inspirado e contra inflamações. Cada brônquiólo terminal dá origem a diversas gerações de bronquíolos respiratórios que, por sua vez, dão origem aos ductos alveolares inteiramente revestidos de alvéolos (WEST, 2002; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). A estrutura dos bronquíolos respiratórios é semelhante à dos bronquíolos terminais, mas suas paredes já apresentam alvéolos, onde já pode haver troca gasosa.

Os alvéolos pulmonares constituem pequenas evaginações em forma de saco, com aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  de diâmetro, localizados nos bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e sacos alveolares. Eles representam a unidade funcional e estrutural primária do sistema respiratório, sendo suas delgadas paredes ideais para a troca de  $\text{CO}_2$  por  $\text{O}_2$ . Embora cada alvéolo seja uma estrutura pequena, seu número total se aproxima de 300 milhões. Os espaços aéreos de dois alvéolos podem se comunicar entre si através dos poros de Kohn, que executam a função de equilibrar a pressão do ar dentro dos segmentos pulmonares. A região entre os alvéolos adjacentes é conhecida como septo alveolar, que é composto pelo endotélio capilar, membrana basal e tecido intersticial adjacente. Este último é rico em fibras elásticas e fibras de colágeno, fibroblastos, mastócitos e raros linfócitos e monócitos (STEVENS & LOWE, 1995).

As paredes alveolares são compostas por dois tipos de células: os pneumócitos tipo I e pneumócitos tipo II (WEST, 2002). Aproximadamente 90% da superfície alveolar é revestida por epitélio pavimentoso simples, cujas células são conhecidas como pneumócitos do tipo I. Eles formam junções oclusivas prevenindo o escape do líquido extracelular (líquido tecidual) para dentro da luz alveolar. Os pneumócitos do tipo II ocupam somente 5-10% da superfície alveolar, são responsáveis pela produção do surfactante, que reduz a tensão superficial dos alvéolos e, conseqüentemente, reduz a força necessária para a inspiração, facilitando a respiração. Além disso, impedem o colapso dos alvéolos durante a expiração (WEST, 2002; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Na superfície interna dos alvéolos (lúmen) encontram-se os macrófagos alveolares. Eles se movem lentamente por toda parte dentro da camada de surfactante, mantendo-a limpa e estéril. As partículas de poeira que alcançam os



alvéolos pulmonares são fagocitadas por estes macrófagos. Quando estimulados por agentes infecciosos, os macrófagos alveolares iniciam uma resposta imunológica secretando fatores quimiotáticos para leucócitos, particularmente neutrófilos. Estes invadem o alvéolo e se unem ao ataque contra os organismos estranhos. Os macrófagos alveolares também fagocitam o surfactante e, deste modo, são importantes na sua renovação. Os macrófagos alveolares contendo fragmentos migram para os brônquios e são levados para fora dos pulmões pela ação ciliar (MCLENNAN & DEYOUNG, 1984).

Algumas diferenças são descritas entre a histologia pulmonar humana e de camundongos. No caso dos camundongos, estes respiram obrigatoriamente pelo nariz e a maioria de suas células epiteliais nasais é olfatória, com poucos cílios. Assim, podem ter menor eficiência na capacidade de filtrar partículas inaladas (SHAPIRO, 2000). Nestes animais, o pulmão esquerdo é compreendido por um único lobo e o pulmão direito por quatro (superior, médio e caudal e acessório) (COOK, 1965). A árvore brônquica do camundongo tem um menor número de ramificações que a de seres humanos e não apresenta bronquíolos respiratórios, sendo os ductos alveolares originados diretamente dos bronquíolos terminais (BAL & GHOSHAL, 1988). Ainda, possuem poucas glândulas submucosas, localizadas exclusivamente na traquéia, e não tem verdadeiras células caliciformes, mas apresentam células de clara e células epiteliais ciliadas em toda a via aérea (SHAPIRO, 2000).

### 1.4.2 Mecânica Respiratória

A respiração é um processo cíclico que envolve certo trabalho mecânico por parte dos músculos respiratórios para a movimentação do sistema respiratório. O sistema respiratório é formado por dois componentes: o pulmão e a parede torácica. Como parede torácica subentende-se todas as estruturas que se movem durante o ciclo respiratório à exceção dos pulmões. A pressão motriz, gerada pela contração muscular durante a inspiração, precisa vencer forças de oposição, tais como: a) forças elásticas dos tecidos pulmonares e parede torácica; b) forças resistivas resultantes do fluxo de gás pelas vias aéreas e movimentação das moléculas constituintes do tecido pulmonar e dos tecidos da parede torácica (MOUNT, 1955); c) forças viscoelásticas dos tecidos pulmonares e da parede torácica (MOUNT, 1955; HILDEBRANDT, 1970); d) forças plastoelásticas responsáveis pela histerese (HILDEBRANDT, 1970); e) forças inerciais, dependentes da massa dos tecidos e dos gases (MEAD & WHITTENBERGER, 1954); f) forças gravitacionais, incluídas nas forças elásticas (MILIC-EMILI, 1977); g) forças de distorção da parede torácica. Contudo, durante a respiração basal, as forças inerciais e de distorção da parede são consideradas desprezíveis (RODARTE & REHDER, 1986).

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

Os tecidos pulmonares e da parede torácica possuem propriedades elásticas e, logo, obedecem à lei de Hooke, de modo que quanto maior a pressão motriz,

maior o volume de gás inspirado. A inclinação da curva volume-pressão, ou a relação entre a variação de volume gasoso mobilizado ( $\Delta V$ ) e a pressão motriz necessária para manter o sistema respiratório insuflado, é conhecida como complacência do sistema respiratório ( $C_{sr}$ ). Logo,  $C_{sr} = \Delta V / P_{el, sr}$ , onde  $P_{el, sr}$  corresponde à pressão de retração elástica do sistema respiratório (MEAD, 1961; HILDEBRANDT, 1970).

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 (WEST, 2002).

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 ( $R_{sr}$ ) pode ser calculada dividindo-se a pressão resistiva ( $P_{res, sr}$ ) pelo fluxo aéreo (MEAD & WHITTENBERGER, 1954).

A resistência pulmonar pode ser subdividida em dois subcomponentes: a resistência das vias aéreas ( $R_{va}$ ), que depende do fluxo de ar no interior dos pulmões, e a resistência tecidual ( $R_{tec}$ ), que é determinada pelas perdas energéticas geradas pela viscosidade (isto é, atrito) pertinente à movimentação do pulmão (MEAD & WHITTENBERGER, 1954). 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 (WEST, 2002).

Além dos componentes elásticos e resistivos, o sistema respiratório apresenta também propriedades viscoelásticas, que atuam no tecido pulmonar e na parede torácica. A viscoelasticidade foi descrita a partir do comportamento de fios de seda, por Wilhem Weber em 1835. Substâncias viscoelásticas, quando mantidas sob deformação constante, apresentam uma queda de tensão, chamada de “*stress relaxation*”, ou relaxamento de tensão. Por outro lado, sob uma tensão constante, o corpo tende a se deformar continuamente com o decorrer do tempo, fenômeno chamado “*creep*” (DORRINGTON, 1980). É importante notar que esta deformação não é irreversível, mas sim reprodutível, podendo ser repetida desde que seja precedida por um período no qual o material permaneça em condições de repouso, a fim de apagar a memória do evento anterior. Do ponto de vista morfofuncional, a viscoelasticidade ocorre ao nível de tecido pulmonar e de parede torácica, permitindo o intercâmbio de energia (pressão) entre o componente elástico e o resistivo. Por exemplo, durante uma pausa inspiratória, a energia potencial (pressão) acumulada no componente elástico pode ser dissipada na forma de calor pelo componente resistivo.

#### 1.4.3 Estudo da Mecânica Respiratória

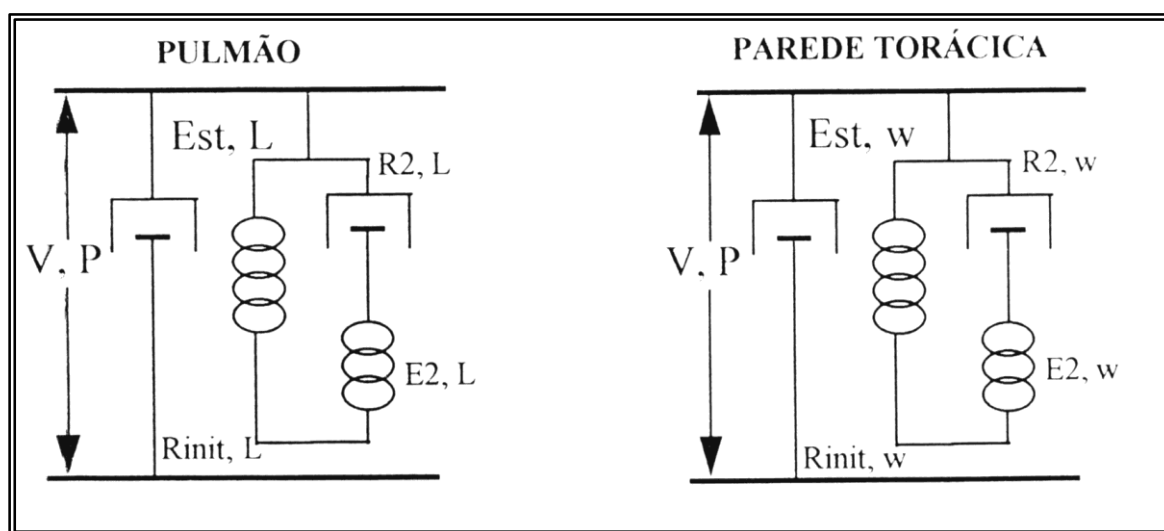
A complexidade do sistema respiratório estimulou a busca de modelos matemáticos, relativamente simples, capazes de mimetizar o seu comportamento mecânico.

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

Em 1985, Bates *et al.* expandiram o modelo, originalmente proposto por Mount, na forma de um modelo físico composto por elementos elásticos representados por molas e os resistivos expressos por amortecedores (BATES *et al.*, 1985b). Os autores realizaram uma análise teórica do comportamento não homogêneo do sistema respiratório submetido a ventilação mecânica com fluxo inspiratório constante, seguida por oclusão súbita das vias aéreas. Imediatamente após a oclusão, ocorre uma queda rápida da pressão traqueal ( $\Delta P_1$ , sr), indo do seu valor máximo ( $P_{max}$ , sr) até um ponto de inflexão ( $P_i$ , sr), seguida por uma queda lenta ( $\Delta P_2$ , sr) até atingir um platô, que corresponde à pressão de retração elástica do sistema respiratório ( $P_{el}$ , sr).

O modelo de Bates *et al.* (1985b) é constituído por dois submodelos, pulmão e parede torácica, apresentando um arranjo em paralelo, uma vez que são submetidos à mesma variação de volume (Figura 6). A subunidade pulmonar consiste de um amortecedor, representando a resistência das vias aéreas ( $R_{init,L}$ ), em paralelo com um corpo de Kelvin, que consiste de uma mola representando a elastância estática ( $E_{st,L}$ ) em paralelo com um corpo de Maxwell, caracterizado por uma mola, componente elástico ( $E_{2,L}$ ), e um amortecedor, componente resistivo ( $R_{2,L}$ ), dispostos em série.  $E_{2,L}$ ,  $R_{2,L}$  e a constante de tempo correspondente ( $\tau_2 = R_{2,L}/E_{2,L}$ ) estimam as propriedades viscoelásticas do pulmão. Já a subunidade da parede torácica é representada por uma resistência ( $R_{init,w}$ ) e pelo corpo de Kelvin,

caracterizado pela elastância estática da parede torácica ( $E_{st,w}$ ) e dos parâmetros que correspondem à viscoelasticidade ( $E_{2,w}$ ,  $R_{2,w}$  e  $\tau_{2,w}$ ).



**Figura 6.** Modelo de molas e amortecedores para interpretação da mecânica do sistema respiratório com a técnica de interrupção do fluxo, proposto por Bates *et al.* (1985b). Pulmão e parede torácica apresentam um componente resistivo ( $R_{init,L}$  e  $R_{init,w}$ , respectivamente) em paralelo com um corpo de Kelvin; composto por componente elástico ( $E_{st,L}$  e  $E_{st,w}$ , respectivamente), representando a elastância estática dos dois compartimentos em paralelo com um corpo de Maxwell, conjunto de amortecedor e mola em série ( $R_{2,L} - E_{2,L}$ , e  $R_{2,w} - E_{2,w}$ , respectivamente), o qual representa o comportamento viscoelástico. A distância entre as duas barras horizontais é análoga do volume pulmonar ( $V$ ) e a tensão entre elas é análoga da pressão de abertura das vias aéreas ( $P$ ).

Quando esse modelo é alongado (afastamento das duas barras horizontais) a uma velocidade constante ( $v$ ), a carga da mola  $E_2$  aumenta com o tempo ( $T_i$ ) e a velocidade do amortecedor  $R_2$  se aproxima da velocidade de alongamento ( $v$ ), assim, a força exercida pela mola  $E_2$  aproxima-se de  $R_2.v$ . Se uma manobra de “interrupção de fluxo” for realizada, o movimento relativo das duas barras horizontais cessa. Com isso, o comprimento da mola  $E_2$  diminui gradualmente até atingir seu comprimento de equilíbrio. Logo, nesse modelo, o decaimento pressórico

lento ( $\Delta P_2$ ), observado após a interrupção do fluxo, é interpretado como o equivalente ao relaxamento da mola E2, resultando em dissipação resistiva de energia no amortecedor R2.

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

*Stress relaxation* é a capacidade do pulmão de se adaptar a uma insuflação mantida, apresentando redução da pressão em função do tempo. Quando permanece sob um comprimento constante (volume), a tensão pulmonar se altera com o tempo; logo, o gradiente de pressão diminui progressivamente. O *stress relaxation* depende do realinhamento da matriz extracelular e de perdas de energia nos tecidos pulmonares e na interface ar-líquido (HORIE & HILDEBRANDT, 1971). Já o *pendelluft* é a transferência de um pequeno volume de gás dos compartimentos pulmonares de maior pressão para os compartimentos de menor pressão, representando o reajuste estático das diferenças regionais de volume pulmonar resultantes de desigualdades de constante de tempo (BATES *et al.*, 1985b; OTIS *et al.*, 1956).

O método de oclusão das vias aéreas após insuflação com fluxo constante não é capaz de determinar a contribuição relativa do *pendelluft* (desigualdades de

constantes de tempo) e do *stress relaxation* (componente viscoelástico) para o desenvolvimento da queda lenta observada na pressão traqueal (BATES *et al.*, 1985b e 1988a; KOCHI *et al.*, 1988a). No entanto, vários autores acreditam ser a maior contribuição representada provavelmente pelo *stress relaxation* (BATES *et al.*, 1988b; KOCHI *et al.*, 1988a; SIMILOWSKI *et al.*, 1991).

Em 1988, o modelo de oclusão ao final da inspiração foi validado através de estudos experimentais utilizando cápsulas posicionadas em pontos diferentes da superfície pleural. Ao medir diretamente a pressão alveolar, comprovou-se ser esta homogênea através dos pulmões, apresentando pico de pressão coincidente com o ponto de inflexão ( $P_i$ ) observado na curva de pressão traqueal. Logo, a pressão alveolar mostrava comportamento semelhante ao encontrado na segunda fase da pressão traqueal, a de queda lenta. Tal observação indica que a variação de pressão responsável pela queda lenta ( $\Delta P_2$ ) ocorre em consequência a um fenômeno distal ao alvéolo, ou seja, no tecido pulmonar. Logo,  $\Delta P_2$  é uma manifestação do comportamento tecidual de adaptação ao stress (BATES *et al.*, 1988b; SALDIVA *et al.*, 1992).

O método da oclusão ao final da inspiração é bastante utilizado, a fim de estudar a mecânica respiratória tanto em animais quanto em humanos anestesiados (AULER *et al.*, 1987; BATES *et al.*, 1985b; D'ANGELO *et al.*, 1989 e 1994; SOARES *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2010). Este método foi utilizado no presente trabalho, por fornecer informações individualizadas sobre o componente pulmonar e permitir a análise de suas propriedades elástica, viscosa e viscoelástica.



## 2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A compreensão dos efeitos de doses sub-letais de MCs torna-se relevante, pelo fato de populações humanas estarem mais expostas a pequenas doses do que a doses letais da toxina. Embora o órgão alvo da ação da MC seja o fígado, alguns estudos com animais e relatos de intoxicação em humanos dão conta do aparecimento de alterações no sistema respiratório, como trombose pulmonar atípica, broncopneumonia, necrose extensa do epitélio da mucosa, tanto da via respiratória quanto olfatória, e pneumonia (CARMICHAEL & SCHWARTZ, 1984; BEASLEY *et al.*, 1989; TURNER *et al.*, 1990; FITZGEORGE *et al.*, 1994; ITO *et al.*, 2000, 2001; WANG *et al.*, 2008). O nosso grupo demonstrou que a administração *i.p.* de extrato tóxico de cianobactérias contendo MC-LR causa efeitos deletérios no pulmão, evidenciados por meio de análise histológica (PICANÇO *et al.*, 2004). Ademais, a administração *i.p.* de MC-LR purificada acarretou alteração da mecânica respiratória, recrutamento de células inflamatórias e edema intersticial ao longo do tempo (SOARES *et al.*, 2007).

No entanto, as informações sobre lesão no sistema respiratório ainda são escassas na literatura, tendo a maior parte dos estudos avaliado a histologia pulmonar e de vias aéreas apenas de forma qualitativa. Além disso, nenhum estudo sobre como as alterações encontradas no sistema respiratório afetam a função pulmonar após a instilação *i.t.* de MC-LR, ou sobre os mecanismos envolvidos nesse tipo de lesão, foi encontrado. Cabe ressaltar que o estudo dos efeitos causados pela MC-LR tendo a via aérea como porta de entrada torna-se muito mais relevante socialmente, uma vez que esta é uma forma de contato muito mais comum do que a via *i.p.* ou *i.v.*.

Os estudos experimentais representam uma importante ferramenta na avaliação dos riscos das cianotoxinas para a população humana. Sendo as MCs as toxinas mais comumente encontradas nos ambientes aquáticos, seus efeitos subletais no pulmão foram escolhidos como objeto de estudo desta tese. Ainda, como o estresse oxidativo é um dos mecanismos de lesão por MC-LR no fígado, este poderia também ser um dos mecanismos responsáveis pela lesão pulmonar.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste trabalho foi avaliar temporalmente os efeitos de uma dose subletal de MC-LR administrada intratraquealmente sobre a mecânica pulmonar, histologia e inflamação pulmonar e hepática e análise de indicadores de estresse oxidativo no pulmão de camundongos saudáveis.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Nesses animais, pretendemos:

1. Avaliar, pelo método da oclusão ao final da inspiração, as propriedades resistivas, elásticas e viscoelásticas e/ou inomogêneas do pulmão;
2. Estudar, pelo método de contagem de pontos, as alterações morfométricas e a celularidade total e diferencial no parênquima pulmonar;
3. Analisar qualitativamente a histologia hepática por microscopia ótica;
4. Quantificar a MC-LR nos tecidos pulmonar e hepático por ELISA;

5. Avaliar a atividade da mieloperoxidase no tecido pulmonar;
6. Identificar a presença de estresse e dano oxidativos no pulmão por meio de ensaios bioquímicos para avaliação da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas.



# MATERIAIS E MÉTODOS

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Cento e quarenta e nove camundongos Swiss machos normais adultos, oriundos do Biotério Central da UNICAMP em Campinas, pesando 25-35 g, foram utilizados neste trabalho. Os animais receberam cuidados conforme o guia preparado pelo Comitê de Cuidados e Uso dos Animais de Laboratório do Conselho Nacional de Pesquisas dos Estados Unidos (U.S. Department of Health and Humane Services, 1985). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética com Uso de Animais (CEUA), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob o número IBCCF 012.

Inicialmente, os animais (n=98) foram submetidos à avaliação da mecânica respiratória *in vivo*, histologia pulmonar para análise da morfometria e quantificação da celularidade total, histologia hepática, e detecção de MC no pulmão e no fígado. Para os ensaios bioquímicos foram utilizados outros 51 animais.

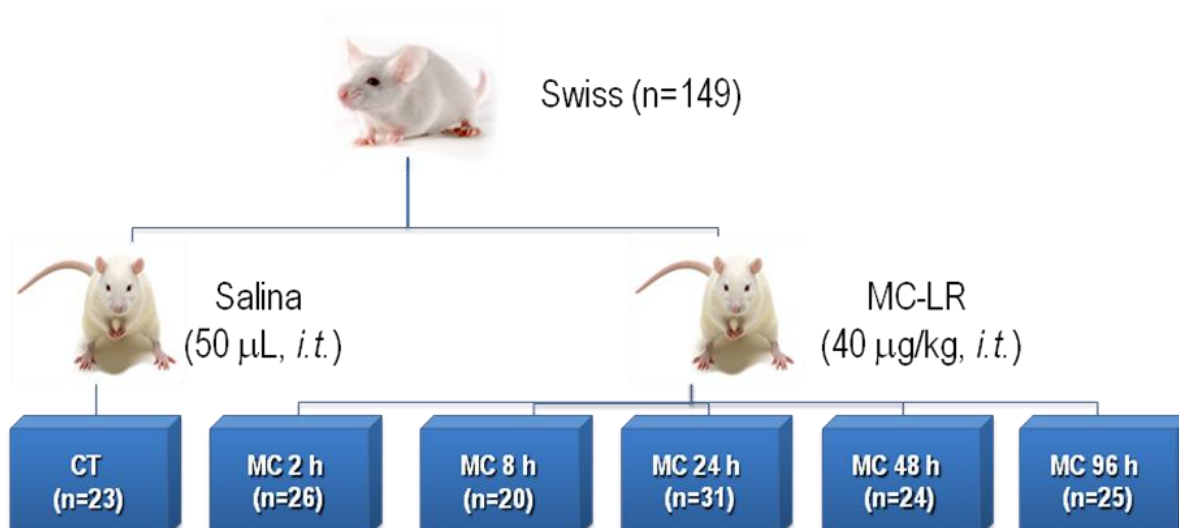
A medida da mecânica respiratória e a análise da histologia pulmonar por microscopia óptica foram realizadas no Laboratório da Fisiologia da Respiração, enquanto a quantificação de MC por ELISA foi feita no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactéria, ambos do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (UFRJ). Os ensaios bioquímicos foram conduzidos em colaboração com o Laboratório de Inflamação, Estresse Oxidativo e Câncer, Instituto de Ciências Biomédicas (UFRJ). A análise histológica do fígado foi realizada no Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP).

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

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

- Grupo controle (CT) – 50  $\mu$ L de salina (NaCl a 0,9%) foram instilados *i.t.*.
- Grupo microcistina (MC) – foi instilada uma dose sub-letal (40  $\mu$ g/kg *i.t.*) de MC-LR (padrão diluído em metanol 50% e salina cedido pelo Prof. Wayne Carmichael, Wright State University, EUA).

Ambos os grupos foram subdivididos em 5 grupos, com base no tempo pós-instilação em que foram realizadas as análises, em 2, 8, 24, 48 e 96 horas (Figura 7). No entanto, o grupo CT não apresentou diferença entre os tempos pós-instilação, sendo reunidos em um único grupo.



**Figura 7.** Organograma experimental. Grupo CT - animais submetidos à instilação intratraqueal (*i.t.*) de 50  $\mu$ L de solução salina. Grupo MC - animais submetidos à instilação *i.t.* de 40  $\mu$ g/kg de microcistina-LR (MC-LR) diluídos em solução salina. Os experimentos foram realizados 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a instilação.

Cabe ressaltar que os 98 camundongos utilizados inicialmente tiveram a mecânica pulmonar avaliada em duas levadas distintas de animais para todos os grupos, tendo sido realizada uma terceira leva de experimentos apenas para o grupo MC 24 h a fim de confirmar os resultados da mecânica. Daí, a diferença observada no número de animais entre a análise da mecânica e as análises histológicas e a quantificação de MC-LR por ELISA refletem perdas devido à conservação, armazenamento ou processamento do material.

#### 4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para a realização da instilação *i.t.* os camundongos foram sedados com Sevoflurano (Sevorane<sup>®</sup>, Abbott, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) na concentração alveolar mínima de 2. Uma incisão de 3 mm foi feita na linha média do pescoço, os tecidos adjacentes foram divulsionados até que a traquéia ficasse exposta e a solução salina ou toxina eram instilados *i.t.* através de uma seringa de insulina com agulha (BD Ultra-Fine II<sup>®</sup> 0,3 mL, São Paulo, SP, Brasil). Em seguida o corte foi suturado com fio de Nylon 5-0 e, após uma pronta recuperação, os animais foram colocados em gaiolas até o momento do experimento.

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

Depois de anestesiados, os animais foram colocados em uma pequena mesa sob foco cirúrgico, em decúbito dorsal, sendo seus membros fixados com esparadrapo. Os membros superiores foram mantidos estendidos a 90 graus em relação ao corpo e os membros inferiores abduzidos em diagonal. Após o posicionamento cirúrgico, foi realizada traqueotomia com introdução de jelco 20G com 32 mm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno, sendo a cânula fixada à traquéia por meio de fios de algodão. Os animais foram paralisados com injeção intravenosa de brometo de pancurônio (0,1 mg/kg).

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

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



diafragma, que foi perfurado e seccionado segundo a mesma orientação da abertura da parede abdominal.

Antes da perfuração do diafragma, entretanto, foi determinada a pressão de retração elástica do pulmão ( $P_{el}$ ) ao nível da capacidade residual funcional (CRF). O valor da  $P_{el}$  foi determinado da seguinte forma: justo antes da perfuração do diafragma as vias aéreas foram ocluídas ao final da expiração (i.e., CRF). Quando o diafragma foi, então, perfurado, houve um aumento na pressão transpulmonar ( $P_{tp}$ ) correspondente à  $P_{el}$ . Esse mesmo valor de pressão (cerca de 2 cmH<sub>2</sub>O) foi instalado no linha expiratória do ventilador artificial como pressão positiva ao final da expiração (PEEP) (SALDIVA *et al.*, 1992), mantendo-se, por conseguinte, o volume pulmonar ao nível da CRF. A utilização da PEEP evita o colapso alveolar e o desenvolvimento de atelectasias resultantes da retirada da parede torácica (RODRIGUES *et al.*, 1993). Após a retirada do diafragma, a parede torácica foi removida por cortes longitudinais bilaterais ao nível da linha axilar anterior, em toda sua extensão, e corte superior, transversal, abaixo da clavícula.

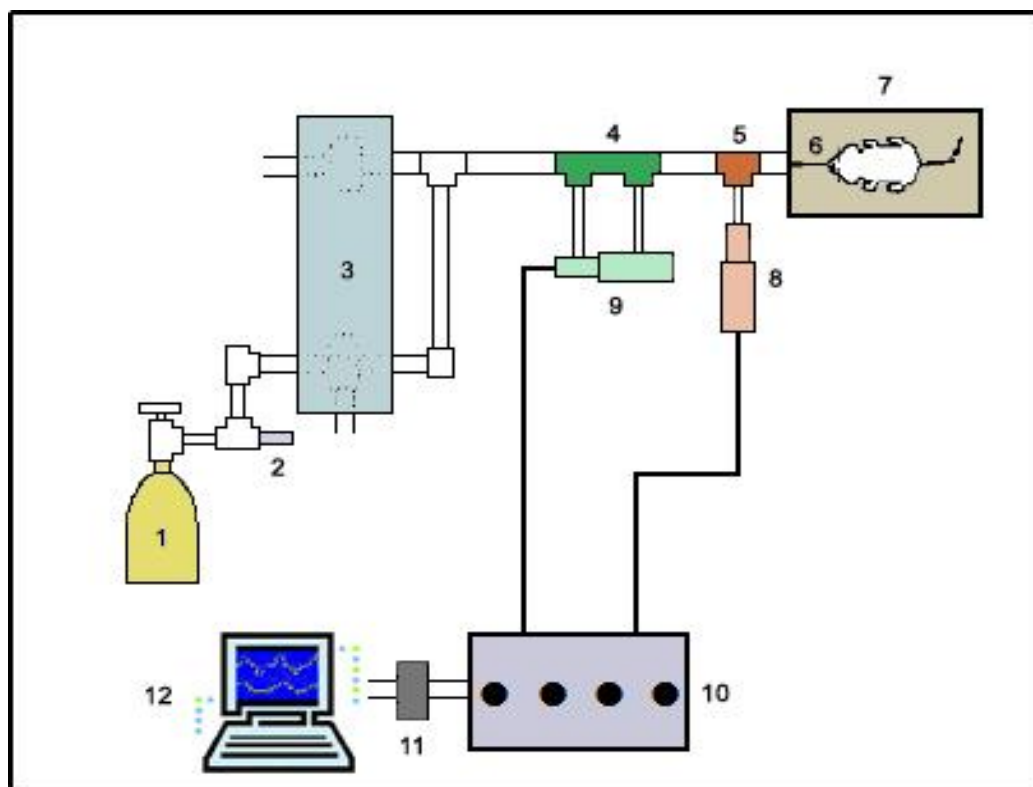
A cânula traqueal do animal foi conectada a um pneumotacógrafo para pequenos animais, como descrito por Mortola & Noworaj (1983), sendo o ventilador acoplado à outra extremidade do pneumotacógrafo. O pneumotacógrafo utilizado consiste de uma cânula metálica com duas saídas laterais com as seguintes características: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

Validyne MP45-2 (Engeneering Corp, Northridge, CA, EUA) para medida da PL (Figura 8).

Uma vez que não houve modificações abruptas no diâmetro do circuito, os erros de medida da resistência ao fluxo foram provavelmente evitados (CHANG & MORTOLA, 1981; LORING *et al.*, 1979). A resistência ao fluxo imposta pelo equipamento ( $R_{eq}$ ), incluindo a cânula traqueal, era constante até fluxos de 26 mL/s, e correspondem a 0,8 cmH<sub>2</sub>O/mL/s. O espaço morto do equipamento foi de 0,3 mL.

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

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



**Figura 8.** Montagem experimental da mecânica *in vivo*, consistindo de:

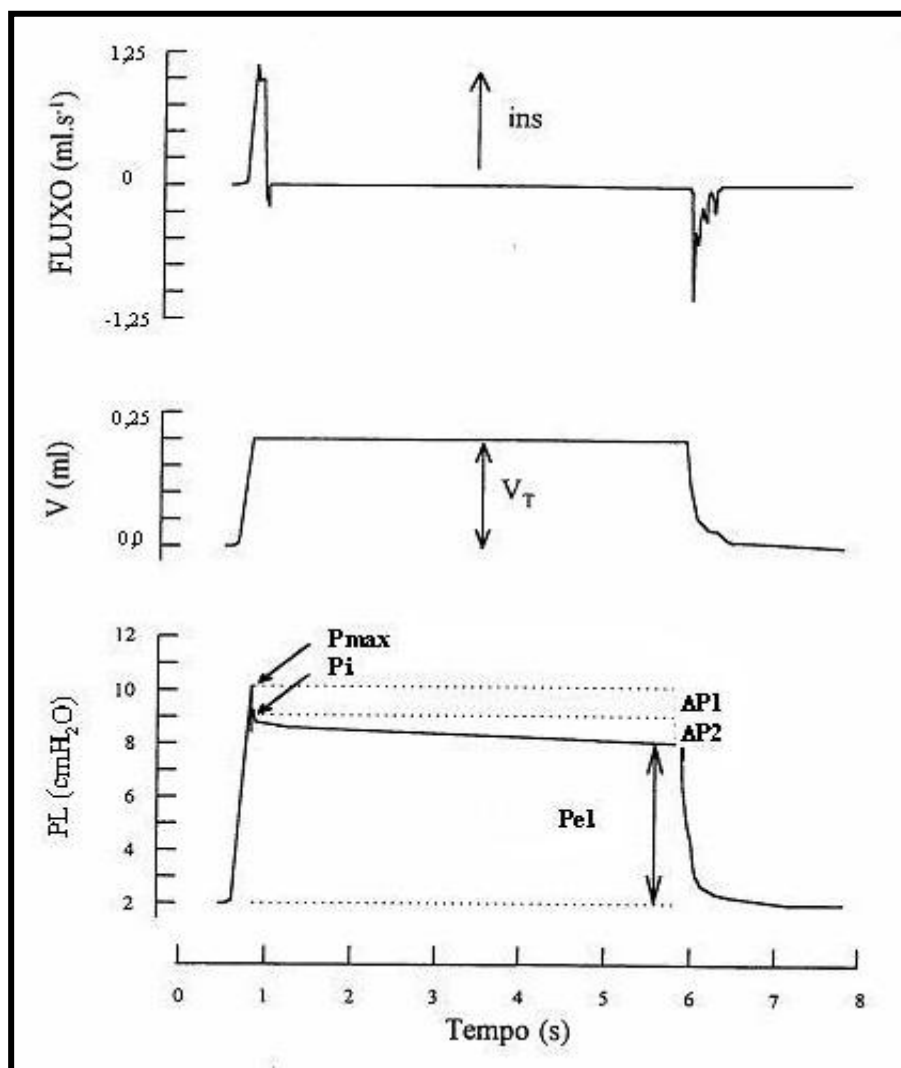
- 1 - Cilindro de ar comprimido.
- 2 - Válvula redutora de pressão.
- 3 - Ventilador de fluxo inspiratório constante composto por duas válvulas solenóides.
- 4 - Pneumotacógrafo.
- 5 - Peça em "T" para medição de pressão na abertura das vias aéreas.
- 6 - Cânula traqueal.
- 7 - Mesa cirúrgica.
- 8 -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

#### 4.4 ESTUDO DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA

A mecânica respiratória foi avaliada pelo método de oclusão ao final da inspiração após insuflação com fluxo constante (BATES *et al.*, 1985a, 1988b, 1989;

KOCHI *et al.*, 1988a, 1988b), que permite analisar separadamente os componentes elástico, viscoso e viscoelástico e/ou inomogêneo do pulmão (Figura 9).

Em um experimento com a parede aberta, a pressão na abertura das vias aéreas representa a PL. Após a oclusão das vias aéreas ao final da inspiração, ocorre uma queda súbita da PL ( $\Delta P_1$ ) até um ponto de inflexão ( $P_i$ ), a partir do qual o decaimento da pressão assume caráter mais lento ( $\Delta P_2$ ), atingindo um platô em sua porção terminal. Esta fase de platô corresponde à  $P_{el}$  (Figura 9). A diferença de pressão que caracteriza a queda rápida inicial ( $\Delta P_1$ ), representada pela diferença entre a pressão máxima inicial ( $P_{m\acute{a}x}$ ) e o ponto a partir do qual a queda se torna mais lenta ( $P_i$ ), corresponde à pressão dissipada para vencer o componente viscoso do pulmão, ou seja, reflete a pressão necessária para sobrepujar a resistência de vias aéreas centrais (BATES *et al.*, 1988b, 1989; KOCHI *et al.*, 1988a, 1988b). A segunda variação de pressão ( $\Delta P_2$ ), representada pela queda lenta, do  $P_i$  ao platô ( $P_{el}$ ), reflete a pressão dissipada para vencer o componente viscoelástico (“stress relaxation”) e/ou inomogêneo (“pendelluft”) do tecido pulmonar e vias aéreas terminais (BATES *et al.*, 1988b; D’ANGELO *et al.*, 1989 e KOCHI *et al.*, 1988a, 1988b). A soma de  $\Delta P_1$  e  $\Delta P_2$  fornece a variação total de pressão ( $\Delta P_{tot}$ ).



**Figura 9.** Método de Oclusão ao Final da Inspiração. Representação esquemática dos traçados de fluxo ( $V'$ ), volume ( $V$ ) e pressão transpulmonar (PL) em função do tempo, obtidos a partir da oclusão da via aérea ao final da inspiração. Os pulmões foram ventilados com volume corrente de 0,2 mL e fluxo aéreo de 1 mL/s. O platô foi alcançado após uma pausa inspiratória de 5 s. Após a oclusão das vias aéreas, há uma queda rápida na PL ( $\Delta P1$ ) que corresponde à  $P_{max} - P_i$ , pressão dissipada para vencer o componente viscoso do pulmão, seguida por uma queda lenta ( $\Delta P2$ ), pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão, até um ponto de equilíbrio elástico, representada pela pressão de retração elástica pulmonar ( $P_{el}$ ). A linha de base do registro de pressão corresponde à pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH<sub>2</sub>O (neste animal).  $V_T$ , volume corrente; ins, inspiração (BATES *et al.*, 1988b).

As elastâncias estáticas ( $E_{st}$ ) e dinâmica ( $E_{dyn}$ ) do pulmão podem, então, ser obtidas dividindo-se  $P_{el}$  e  $P_i$ , respectivamente, pelo volume corrente.  $\Delta E$  é a diferença entre  $E_{dyn}$  e  $E_{st}$ .

As seguintes fórmulas foram utilizadas na análise da mecânica pulmonar:

$$\Delta P1 = P_{\text{máx}} - P_i$$

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

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

$$E_{\text{st}} = P_{el} / V_T$$

$$E_{\text{dyn}} = P_i / V_T$$

$$\Delta E = E_{\text{dyn}} - E_{\text{st}}$$

$$T_i = V_T / V'$$

Onde:

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

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

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

$P_{\text{máx}}$  = pressão máxima atingida

$P_i$  = pressão no ponto de inflexão

$P_{el}$  = pressão de retração elástica

$E_{\text{st}}$  = elastância estática

$E_{\text{dyn}}$  = elastância dinâmica

$V_T$  = volume corrente

$\Delta E$  = variação de elastância

$T_i$  = tempo inspiratório

$V'$  = fluxo inspiratório

Para a realização da oclusão, o aparelho utiliza uma válvula com tempo de fechamento definido (10 ms). Como este fechamento não é instantâneo, o volume nunca cai a zero imediatamente após a oclusão, propiciando, assim, a existência de um pequeno fluxo. Este fluxo será responsável pelo aumento do volume pulmonar e,

conseqüentemente, de  $P_{\text{máx}}$ ,  $P_i$  e  $P_{el}$ . Por isso, foi feita correção de acordo com Kochi e colaboradores (KOCHI *et al.*, 1988a).

A variação de pressão determinada pelo equipamento ( $\Delta P_{eq} = R_{eq} \cdot V'$ ) foi subtraída de  $\Delta P_{tot}$  e  $\Delta P_1$ , de forma que os resultados refletem propriedades mecânicas intrínsecas.

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

#### 4.5 ANÁLISE DA HISTOLOGIA DO PARÊNQUIMA PULMONAR

##### 4.5.1 Fixação e Preparo das Lâminas para Microscopia Óptica

Após a determinação da mecânica pulmonar, a aorta abdominal e a veia cava foram seccionadas, gerando uma hemorragia maciça, que rapidamente levou os animais ao óbito. A traquéia foi ocluída com linha de algodão ao final da expiração, quando a capacidade residual funcional (CRF) pulmonar é atingida. A porção abdominal do esôfago foi identificada e isolada, sendo presa por uma pinça hemostática. As estruturas do pescoço foram dissecadas com liberação das vias aéreas. A pinça que prendia o esôfago era suavemente tracionada para cima, permitindo separá-lo das estruturas aderidas à parede torácica posterior. Com todas as estruturas individualizadas, a traquéia foi seccionada acima do local ligado pelo fio e, posteriormente, o esôfago foi separado do conjunto por leve tração.

Os brônquios principais direito e esquerdo foram ocluídos com fio de algodão

e os pulmões, separados. O pulmão esquerdo foi rapidamente congelado por meio de imersão em nitrogênio líquido, por aproximadamente 3 minutos, retirado e mantido em solução de Carnoy (etanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%, por volume) a  $-70^{\circ}$  C por 24 h. Após este período, o material foi desidratado progressivamente por meio de imersão em soluções com concentrações crescentes de etanol, como discriminado abaixo:

- MC-1: Etanol 70%, clorofórmio 22,5% e ácido acético 7,5%, a  $-20^{\circ}$  C durante 1 h;
- MC-2: Etanol 80%, clorofórmio 15% e ácido acético 5%, a  $-20^{\circ}$  C durante 1 h;
- MC-3: Etanol 90%, clorofórmio 7,5% e ácido acético 2,5%, a  $-20^{\circ}$  C durante 1 h;
- Etanol 100%, a  $-20^{\circ}$  C durante 1 h.

Posteriormente, o pulmão foi mantido a  $-4^{\circ}$  C por 24 h. Após a fixação, o material foi embebido em parafina, obtendo-se cortes histológicos com 4  $\mu$ m 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.

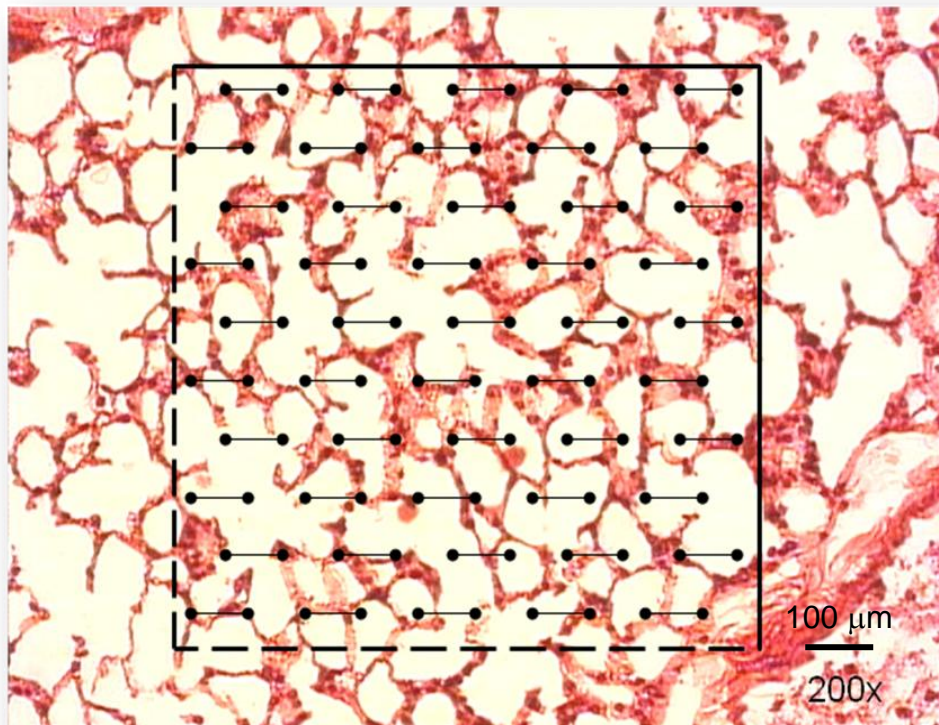
#### 4.5.2 Análise Histológica e Morfométrica

Para a análise descritiva, toda a superfície da lâmina foi observada com todas as estruturas pulmonares representadas, em aumento de 200 e 1000x.

A análise quantitativa foi realizada utilizando-se a técnica convencional de contagem de pontos (“point-counting”) (GUNDERSEN *et al.*, 1988), utilizando uma ocular acoplada ao microscópio contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 linhas dispostos em paralelo (Figuras 10 e 11).



A fração de área ocupada por alvéolos normais, colapsados e hiperinsuflados (maior que  $120\ \mu\text{m}$ ) foi quantificada, em um aumento na ocular do microscópio óptico de 200x. Foram avaliados cinco a dez campos aleatórios e não coincidentes por lâmina. A soma dos pontos que caíam em área de alvéolo colapsados, normais ou hiperinsuflados foi dividida pelo número total de pontos em cada campo analisado e expresso sob a forma de percentual (Figura 10).

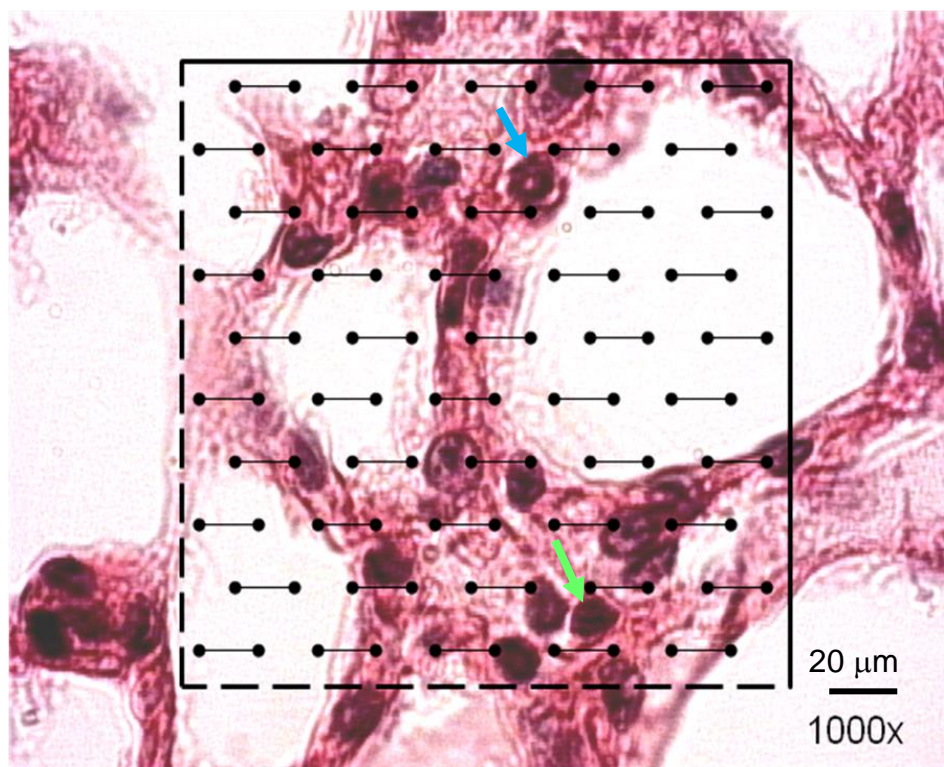


**Figura 10.** Retículo para quantificação dos parâmetros morfométricos. Representação esquemática do retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para quantificação dos alvéolos normais, colapsados ou hiperinsuflados em um aumento de 200x.

As células polimorfonucleares [PMN (neutrófilos + eosinófilos)], células mononucleares [MN (macrófagos + linfócitos + monócitos)] e tecido pulmonar foram quantificados em um aumento de 1000x. Foram avaliados cinco a dez campos

aleatórios e não coincidentes. O tecido pulmonar foi avaliado através do número de pontos do campo que recaiam sobre áreas de tecido e não sobre espaços aéreos. Como a área total do retículo é de  $10000 \mu\text{m}^2$ , cada ponto cobre uma área de  $100 \mu\text{m}^2$ ; logo, a área de tecido corresponde ao número de pontos que recaem sobre tecido  $\times 100 \mu\text{m}^2$ . No caso das células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN), foi quantificado o número total de cada tipo celular presente nos septos alveolares contidos no retículo, bem como a celularidade total (PMN + MN). O resultado foi expresso em número de células/  $\mu\text{m}^2$  (Figura 11).

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



**Figura 11.** Retículo para quantificação da celularidade. Representação esquemática do retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para quantificação de células polimorfo- e mononucleares no tecido pulmonar em um aumento de 1000x. Seta azul: Célula polimorfonuclear. Seta verde: Célula mononuclear.

#### 4.6 ANÁLISE DA HISTOLOGIA DO PARÊNQUIMA HEPÁTICO

O padrão de toxicidade aguda por MC-LR no fígado é bem descrito, sendo este o órgão mais severamente afetado. Para confirmar que através da via respiratória a toxina consegue atingir e gerar dano característico da intoxicação por MC-LR ao seu órgão alvo principal foi realizado o estudo histopatológico do fígado.

O fígado foi retirado do animal imediatamente após o término do experimento, mergulhado em formol a 10% tamponado - Millionig (100 mL de formol 40%, 18,6 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 4,2 g de NaOH e 300 mL de água destilada) e, em seguida, processado e corado com HE. Um patologista, que desconhecia a origem do material, analisou as lâminas em aumentos de 100 e 400x.

#### 4.7 QUANTIFICAÇÃO DE MICROCISTINA-LR POR ELISA

O fígado e o pulmão direito de cada animal foram separados para a análise do conteúdo de MC-LR por ELISA. Os órgãos foram homogeneizados em solução tampão (0,1 g de tecido/mL) contendo EDTA (0,1 mM), DTT (1 mM), Tris-HCl a pH = 7,0 (50 mM) e o inibidor de protease PMSF (0,1 mM) em banho de gelo, utilizando-se homogeneizador Tissuemiser (Fisher Scientific, Hampton, NH, USA). O homogenato resultante foi centrifugado a 10000 g e o sobrenadante (citosol) obtido armazenado em freezer a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento da análise.

O método utiliza anticorpos policlonais de coelho anti-MC-LR, com reatividade cruzada também contra vários congêneres de MC. O método ELISA competitivo direto, utilizado para estas análises, identifica o antígeno (a MC) através de uma combinação de anticorpos secundários (anti – IgG) e anticorpos primários

anti-MC-LR. Entretanto, este método consegue detectar somente MCs livres. Foram utilizados kits de ELISA comerciais da Beacon Analytical Systems (Portland-ME, EUA), seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. Para corrigir o efeito de falso positivo, todas as amostras foram decrescidas do maior valor detectado nos animais do grupo CT. O limite mínimo de quantificação deste método corresponde a 0,1 ppb e o máximo a 2,0 ppb.

#### 4.8 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

Para análise do desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes sofrido pelos diferentes tecidos foram realizados ensaios bioquímicos que medem a atividade das enzimas antioxidantes ou de marcadores de estresse e dano oxidativo. Outros animais CT (n=10) e MC (n=41) foram subdivididos nos mesmos grupos descritos anteriormente para estas análises.

O estresse oxidativo foi mensurado por meio da atividade de enzimas antioxidantes como a SOD, a CAT e a GPx. Já o dano oxidativo foi avaliado pelo método de estudo das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e pela carbonilação de proteínas. Foi analisada ainda a atividade da mieloperoxidase (MPO), enzima lisossomal envolvida na atividade bactericida de PMN.

Para estas análises, o pulmão esquerdo foi removido e mantido a  $-70^{\circ}$  C até o preparo da amostra. Em seguida, foi homogeneizado (Tissuemiser, Fisher Scientific, Hampton, NH, USA) com solução tampão (fosfato de potássio 100 mM + EDTA 5 mM, solução final 1000 mL) e centrifugado (centrífuga modelo 243M, FANEM, São Paulo, Brasil) a 3000 g durante dez minutos. O sobrenadante foi coletado e o volume final de todas as amostras foi ajustado para 1,5 mL com tampão

fosfato de potássio. Essas amostras foram armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises.

#### 4.8.1 Dosagem de Proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), que utiliza o corante coomassie brilliant blue G-250 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para a determinação de proteínas totais em uma amostra. Tal método consiste na interação entre o corante G-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. 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 em azul, de acordo com a concentração da proteína. G-250 ligado à proteína tem sua absorvância alterada de 465 nm para 595 nm. Em uma placa de 96 poços, foi preparada a curva padrão com albumina (1 mg/mL) em triplicata e, em seguida, o poço teste (199  $\mu\text{L}$  de reagente Bradford e 1  $\mu\text{L}$  da amostra). Após completa mistura, foi observado se o tom de azul do poço teste estava entre o menor e o maior valor da curva padrão. Uma vez estabelecido o valor da amostra (1  $\mu\text{L}$ ), distribuiu-se os diferentes grupos nos poços em duplicata com volume final de 200  $\mu\text{L}$ , colocando-se primeiramente o reagente Bradford (199  $\mu\text{L}$ ) e por último a amostra. Com auxílio de uma pipeta fez-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.

#### 4.8.2 Atividade da MPO

A MPO é uma enzima lisossomal presente em leucócitos PMN, sendo usada como um marcador de inflamação neutrofílica. Para melhor caracterizar o perfil do processo inflamatório após a instilação de MC-LR, alíquotas do homogeneizado pulmonar (100  $\mu$ L) foram extraídas pela adição de 900  $\mu$ L de HTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio) em temperatura ambiente por 20 minutos. 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 com refrigeração (4°C). O sobrenadante (600  $\mu$ L) foi adicionado a 450  $\mu$ L de TMB (3,4,5-ácido trimetoxibenzóico, 8-dietilamina-octil éster) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM. O produto foi lido em leitor de ELISA (Modelo 550, Bio-Rad, Hércules, CA, USA) a 655 nm. Os resultados foram referenciados com base em uma curva padrão de MPO vs. neutrófilos. Para a curva padrão, foi utilizada MPO purificada. O resultado foi dado como atividade de MPO (mU/mg proteína) (SUZUKI *et al.*, 1983).

#### 4.8.3 Atividade da SOD

A SOD constitui a primeira linha de defesa enzimática contra a produção intracelular de radicais livres, estando presente na matriz mitocondrial, no citosol e no meio extracelular. A análise bioquímica que avalia a atividade da enzima antioxidante SOD foi feita a partir da inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente no comprimento de onda de 480 nm (BANNISTER & CALABRESE, 1987). A adrenalina quando oxidada forma um produto róseo. A inibição na formação do cromógeno é proporcional à atividade de

SOD presente na amostra. Homogenatos pulmonares dos seis grupos experimentais (diferentes volumes: 10, 20 e 30  $\mu\text{L}$ ) foram diluídos em 1.920  $\mu\text{L}$  de tampão glicina (ácido amino acético 3,75 mg/mL + 200 mL de água destilada, pH= 10,2), 20  $\mu\text{L}$  de catalase (2,4 mg/mL de água destilada) e 40  $\mu\text{L}$  de adrenalina (2  $\mu\text{M}$ ). A mistura foi homogeneizada na cubeta e a absorvância mensurada a 480 nm (Amersham - Biosciences mod Ultrospec 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer, Inglaterra) em um tempo de 180 segundos, com intervalos de 10 segundos. Uma inibição de 50% da reação é definida como uma (1) unidade (U) de SOD. Os valores de SOD foram corrigidos pelo valor da proteína de cada amostra (U/mg proteína).

#### 4.8.4 Atividade da CAT

A análise bioquímica que avalia a atividade da enzima antioxidante CAT, uma hemoproteína encontrada no sangue, citoplasma e, principalmente, nos peroxissomos, foi mensurada em resposta ao decaimento na concentração de peróxido de hidrogênio (AEBI, 1984). O ensaio foi realizado a partir da mistura de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,3) + peróxido de hidrogênio 30% (1940  $\mu\text{L}$ ) com adição de 60  $\mu\text{L}$  de amostra. O consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  gera diferença de cor medida em espectrofotômetro. A mistura foi homogeneizada na cubeta e a absorvância mensurada a 240 nm em um tempo total de 60 segundos, com intervalos de 10 segundos. Uma inibição de 50% da reação é definida como 1U de CAT. Os valores de CAT foram corrigidos pelo valor de proteína de cada amostra (U catalase/mg proteína).

#### 4.8.5 Atividade da GPx

Esse ensaio mede a taxa de decaimento do NADPH (FLOHE & GUNZLER, 1984). A amostra (100  $\mu$ L) é adicionada a uma mistura contendo NADPH, GSH, GR, EDTA e tampão fosfato, sendo mantidos em banho-maria a 37° C durante 1 min. Em seguida é adicionado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para iniciar a reação. A GPx catalisa a oxidação da GSH, gerando H<sub>2</sub>O e GSSG. A GR presente na solução converte imediatamente a GSSG em GSH através da oxidação do NADPH a NADP<sup>+</sup>. Essa reação é acompanhada em espectrofotômetro a 340 nm, sendo a atividade expressa em  $\mu$ M/min/mg proteína.

#### 4.8.6 TBARS

O dano oxidativo foi mensurado pelo método de estudo das TBARS (DRAPER & HADLEY, 1990). O ácido tiobarbitúrico reage com lipídios de membrana oxidados gerando um subproduto da lipoperoxidação (malondialdeído, MDA). O MDA reage com o TBA, gerando um produto colorido róseo lido em espectrofotômetro (Ultrospec 2100 pro, Amersham-Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra). Alíquotas do homogeneizado pulmonar (200  $\mu$ L) foram desproteinizadas com 800  $\mu$ L de 10% de ácido tricloroacético e centrifugadas a 900 g por 10 min. O sobrenadante (500  $\mu$ L) foi misturado com 500  $\mu$ L de TBA 0,67%. A mistura foi aquecida por trinta minutos 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 absorvância de 532 nm mensurada usando o espectrofotômetro (Ultrospec 2100 pro, Amersham-Biosciences, Buckinghamshire,



Inglaterra). Os valores de TBARS (nM/mg proteína) foram expressos com base em uma curva padrão de MDA.

#### 4.8.7 Carbonilação de Proteínas

O conteúdo carbonílico de proteínas é amplamente utilizado como marcador de dano oxidativo em proteínas. A técnica utilizada se baseia na reação de dinitrofenilhidrazona (DNPH) com o grupo carbonila que forma a hidrazona da proteína, cuja leitura é feita em 380 nm (LEVINE *et al.*, 1990). Para esta técnica, cada amostra é feita em duplicata (100 µL/cada). Uma série de lavagens com ácidos [HCl-acetona (1000 µL), ácido tricloroacético 10%, 20% e 30%, etanol-acetato de etila (500 µL)], são realizadas seguidas de centrifugação a 1800 g (exceto a centrifugação com HCl-acetona feita a 9000 g) por 3 min e descarte do sobrenadante. A diferença entre as duplicatas se faz pela adição de 500 µL de HCl 2M ou DNPH nas amostras, sendo o resultado dado pela diferença entre as absorvâncias e expresso em nM/mg proteína.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi aplicada one-way ANOVA seguida do teste de Holm-Sidak para comparações múltiplas, nos dados com distribuição normal. Para as análises de mecânica pulmonar, celularidade no parênquima pulmonar, quantificação de MC-LR no fígado, atividade das enzimas SOD e GPx e carbonilação de proteínas o teste não-paramétrico Kruskal Wallis ANOVA on Ranks seguido do teste de Dunn foi empregado. Os parâmetros de morfometria foram submetidos à transformada

arcoseno, para posteriormente serem comparados pelo teste paramétrico. Em todos os testes, o nível de significância foi de 5%. A análise estatística foi realizada através do software SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc., 2008).

# RESULTADOS

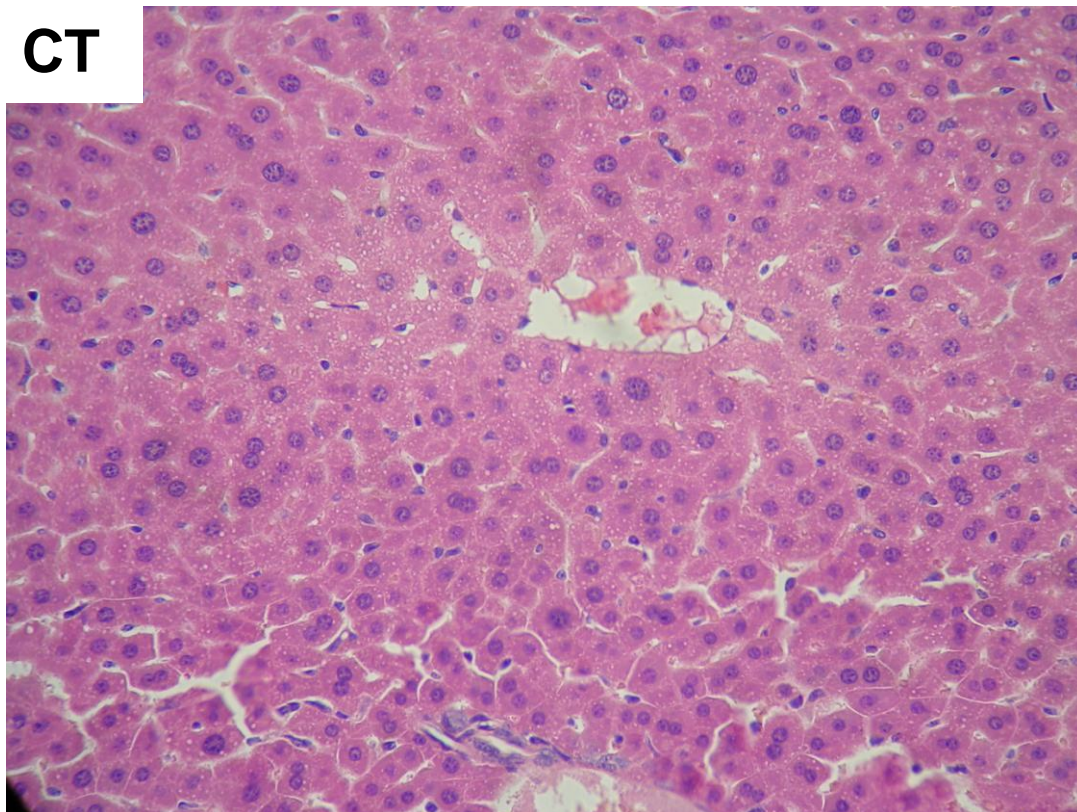
## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO

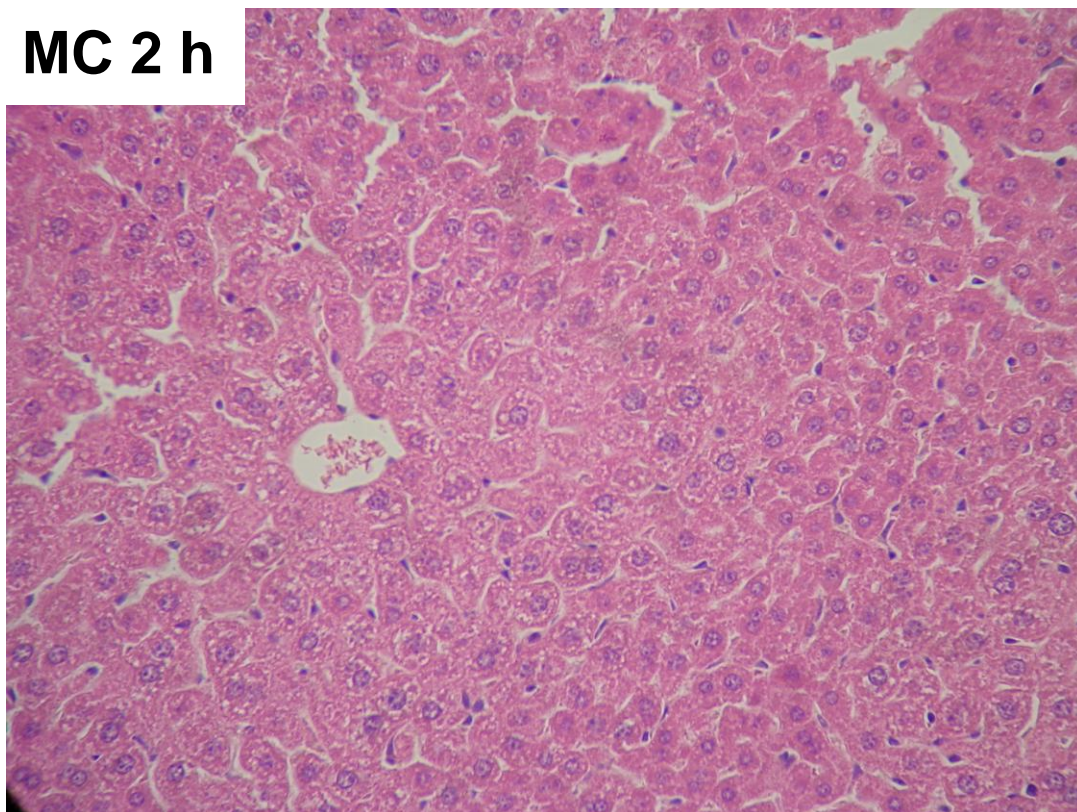
Para confirmar que através da via respiratória a toxina consegue atingir e gerar dano característico da intoxicação por MC-LR ao seu órgão alvo principal foi realizado o estudo histopatológico do fígado.

As Figuras 12, 13 e 14 mostram fotomicrografias do parênquima hepático nos diferentes grupos experimentais. Os danos ao fígado não são evidentes no grupo MC 2 h, porém 8 h após a instilação *i.t.* de MC-LR o fígado apresenta desestruturação dos sinusóides, com dilatação e congestão desses vasos (setas amarelas), presença de regiões de necrose e vacuolização hepática (setas brancas) seguida de dissociação e arredondamento dos hepatócitos. Em 24 h nota-se a presença de focos de necrose com inflamação aguda insipiente (setas pretas) e a formação de duplas placas (setas verdes), que representam células em divisão celular na tentativa de regeneração tecidual. No grupo MC 48 h são identificados infiltrados inflamatórios (setas pretas), vacuolização (setas brancas) e duplas placas (setas verdes), que também estão presentes no grupo MC 96 h, onde se observa necrose submaciça, isto é necrose do parênquima hepático com preservação de algumas áreas. Em 96 h há presença de processo de reparação (seta laranja), porém não é possível determinar se o fígado evolui para recuperação funcional ou para um processo cirrótico. O padrão histopatológico observado nos grupos intoxicados por MC-LR está de acordo com os achados da literatura.

CT

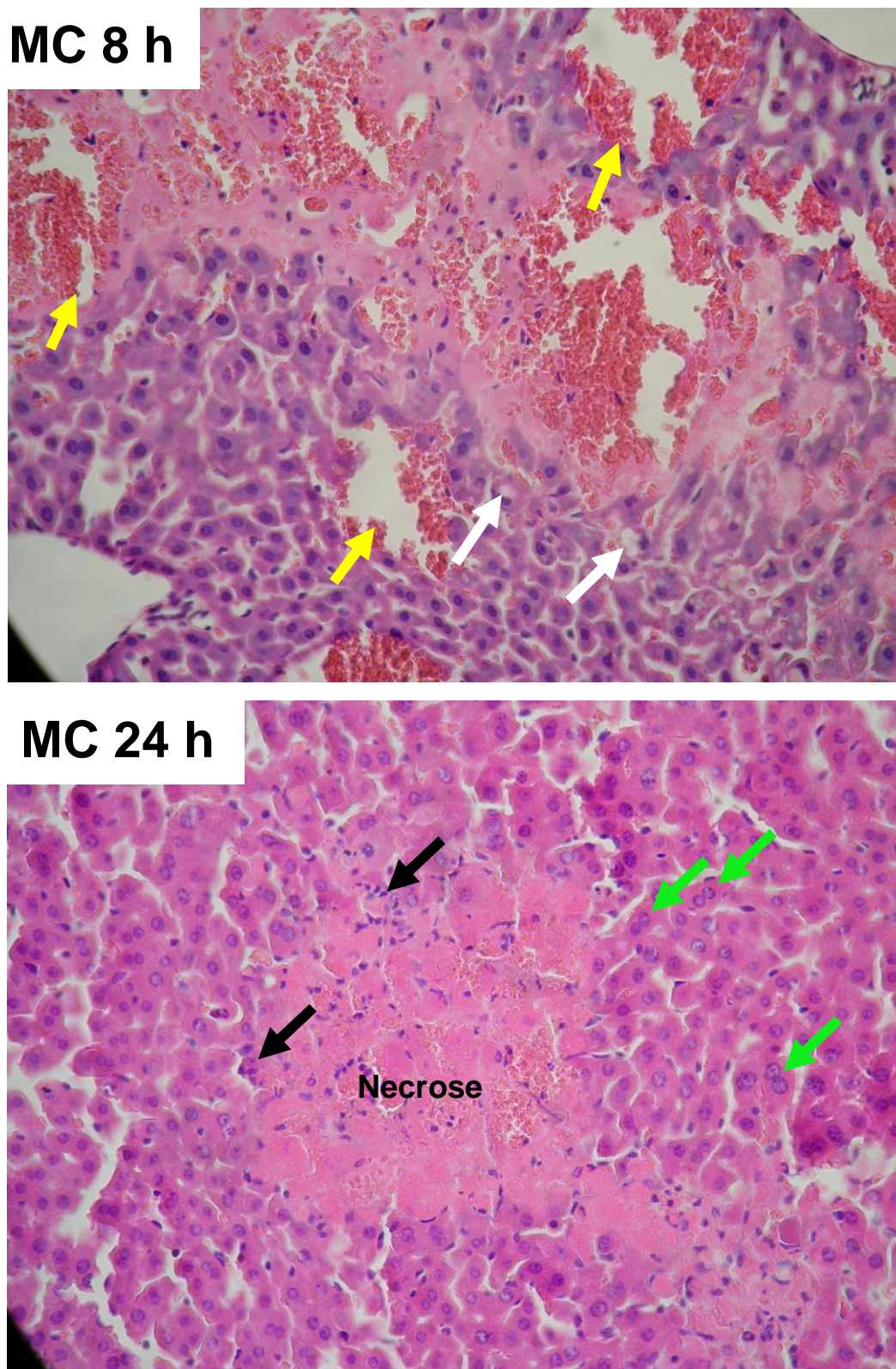


MC 2 h



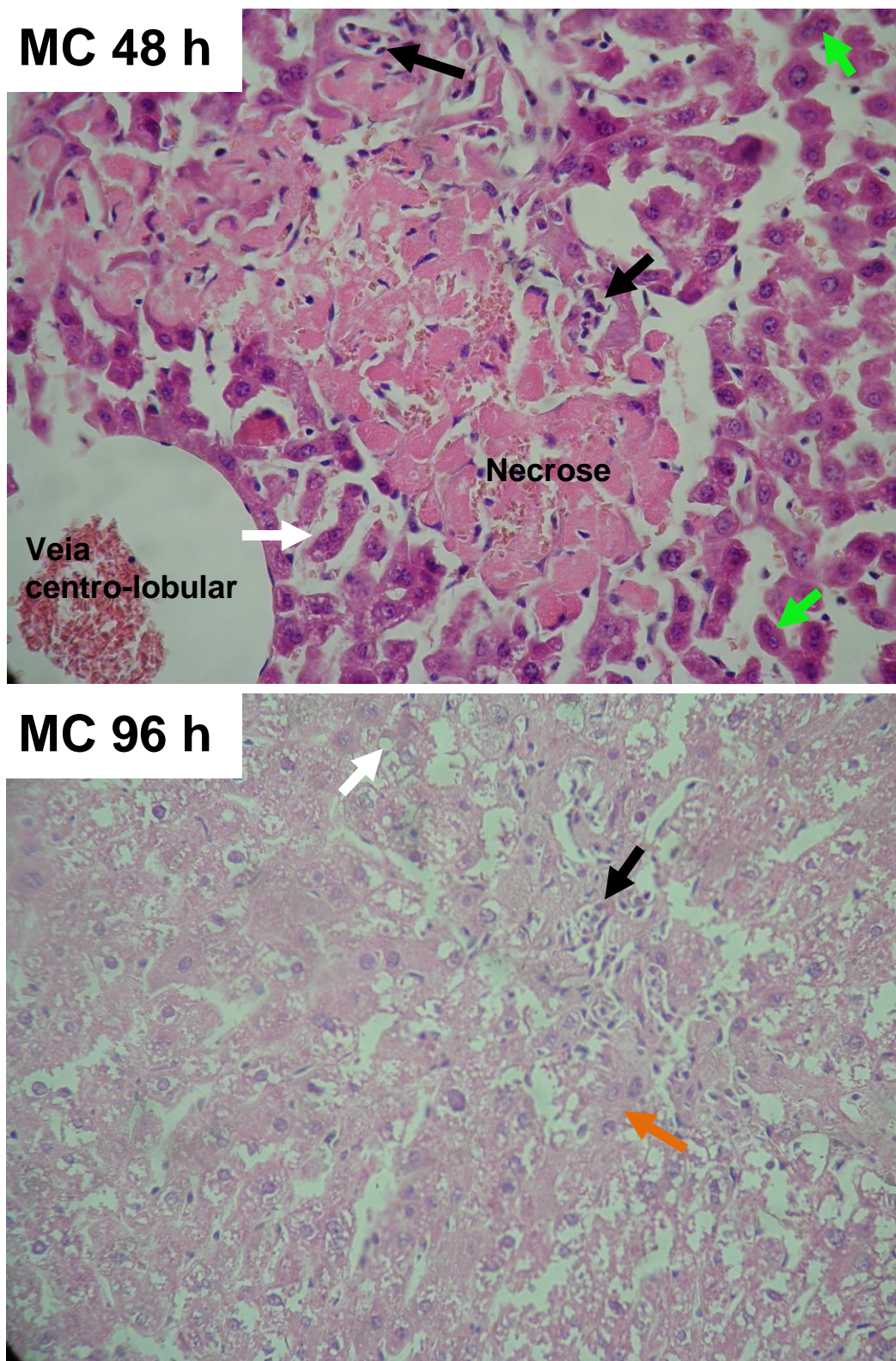
**Figura 12.** Não foi observado dano estrutural ao fígado 2 h após a instilação intratraqueal de microcistina-LR. Fotomicrografias de parênquima hepático (400x) coradas com hematoxilina-eosina, representativas de 5 animais/grupo. CT, grupo controle; MC 2 h, grupo microcistina 2 h após a instilação intratraqueal de microcistina-LR (40 µg/kg).





**Figura 13.** A instilação intratraqueal de microcistina-LR gerou danos hepáticos característicos de intoxicação por MC-LR. Note a perda da estrutura parenquimatosa com afastamento dos hepatócitos. Fotomicrografias de parênquima hepático (400x) coradas com hematoxilina-eosina, representativas de 5 animais/grupo. Grupos microcistina (MC) 8 e 24 horas após a instilação intratraqueal de microcistina-LR (40 µg/kg). Setas amarelas: sinusóides dilatados e congestão; setas brancas: vacuolização; setas pretas: células inflamatórias; setas verdes: formação de dupla placa.



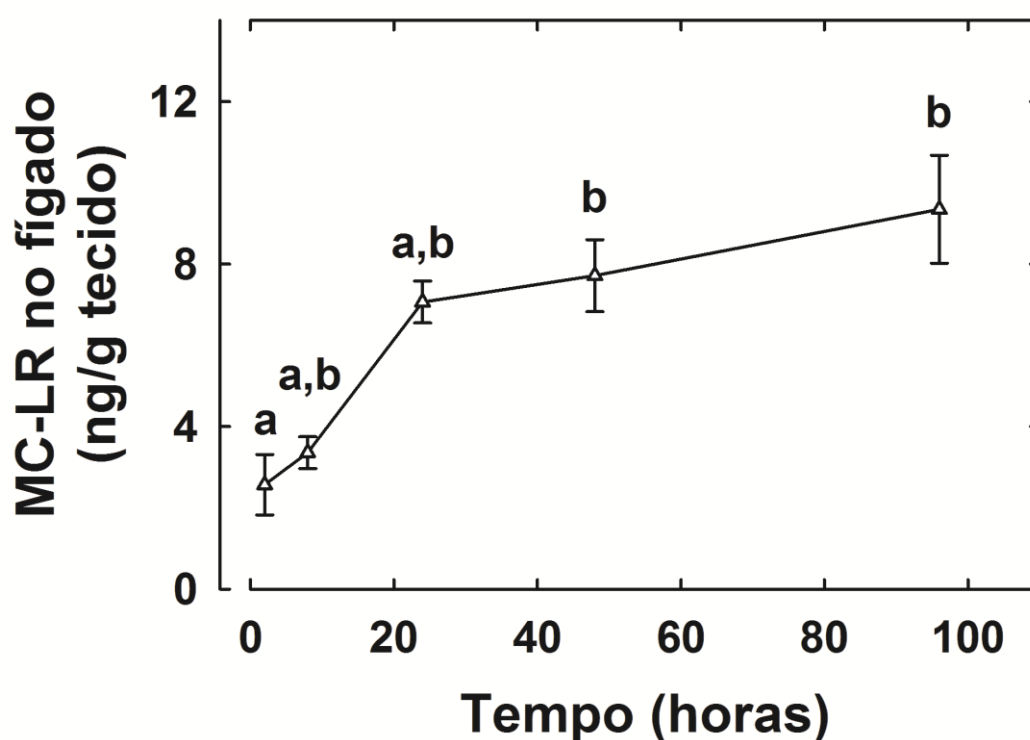


**Figura 14.** Danos hepáticos característicos de intoxicação por MC-LR foram observados até o último tempo experimental. Note a perda da estrutura parenquimatosa com afastamento dos hepatócitos. Fotomicrografias de parênquima hepático (400x) coradas com hematoxilina-eosina, representativas de 5 animais/grupo. Grupos microcistina (MC) 48 e 96 horas após a instilação intratraqueal de microcistina-LR (40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Setas brancas: vacuolização; setas pretas: células inflamatórias; setas verdes: formação de dupla placa; seta laranja: processo de reparação.

## 5.2 QUANTIFICAÇÃO DE MC-LR NO FÍGADO

Visando a avaliar a presença de MC-LR no fígado dos camundongos, utilizamos um método imunoenzimático sensível e específico. No fígado, a toxina é detectada já em 2 h e seu acúmulo no órgão foi tempo-dependente, sendo observada quantidade significativamente maior de MC-LR nos animais dos grupos MC 48 h e MC 96 h em relação ao MC 2 h (Figura 15).

Os dados da quantificação de MC-LR livre em cada animal estão apresentados no Anexo (pg. 141).

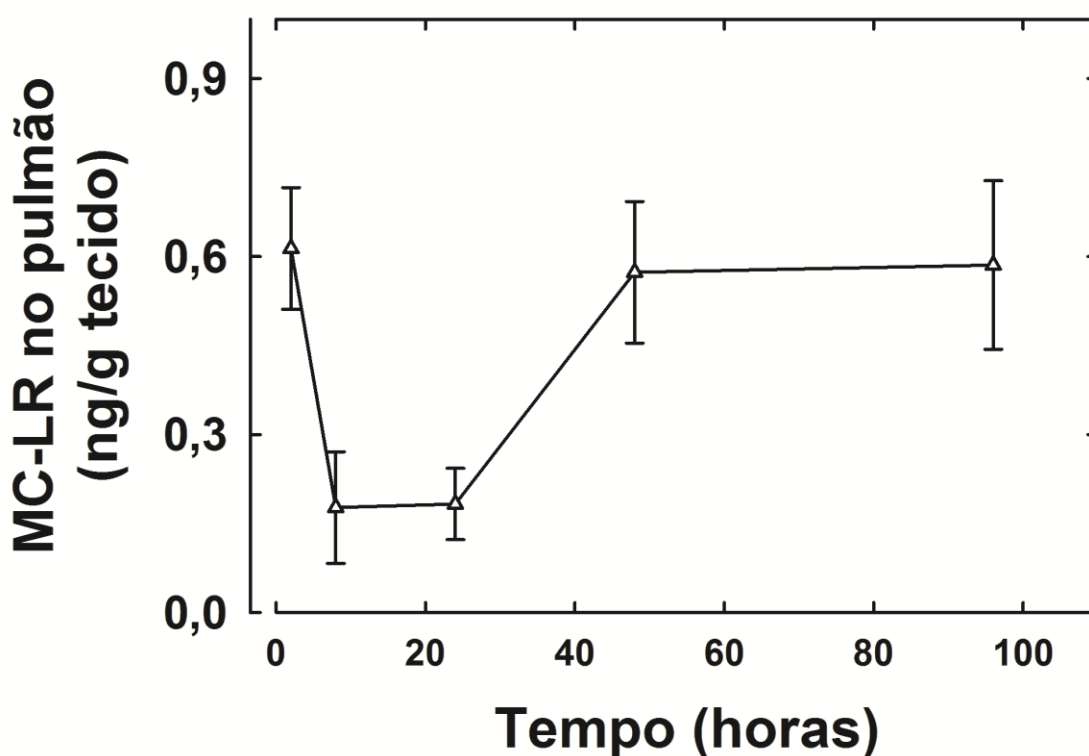


**Figura 15.** Quantificação de microcistina-LR no homogenato do fígado, descontado o valor encontrado no CT (falso positivo). Análise feita por ELISA no homogenato hepático dos camundongos ( $n=4-6$ /grupo) instilados *i.t.* com microcistina-LR ( $40 \mu\text{g}/\text{kg}$ , MC) e analisados 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a instilação. Os valores correspondem à média  $\pm$  EPM. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ( $p<0,05$ ).



### 5.3 QUANTIFICAÇÃO DE MC-LR NO PULMÃO

Visando a avaliar a presença de MC-LR nos pulmões dos camundongos, utilizamos um método imunoenzimático sensível e específico. A análise por ELISA detectou a presença de MC livre no homogenato do pulmão em todos os grupos MC, sem diferença entre os tempos experimentais ( $p > 0,115$ ) (Figura 16).



**Figura 16.** Quantificação de microcistina-LR no homogenato pulmonar, descontado o valor encontrado no CT (falso positivo). Análise feita por ELISA no homogenato pulmonar dos camundongos ( $n=3-5$ /grupo) instilados *i.t.* com microcistina-LR ( $40 \mu\text{g/kg}$ , MC) e analisados 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a instilação. Os valores correspondem à média  $\pm$  EPM. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

## 5.4 MECÂNICA PULMONAR

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

Os valores de volume e fluxo utilizados durante o experimento são apresentados na tabela 1 e não variaram significativamente nos grupos estudados conforme estipulado, permitindo, portanto, a comparação dos parâmetros de mecânica respiratória entre os grupos experimentais.

**Tabela 1.** Fluxo, volume e número de animais nos diferentes grupos experimentais.

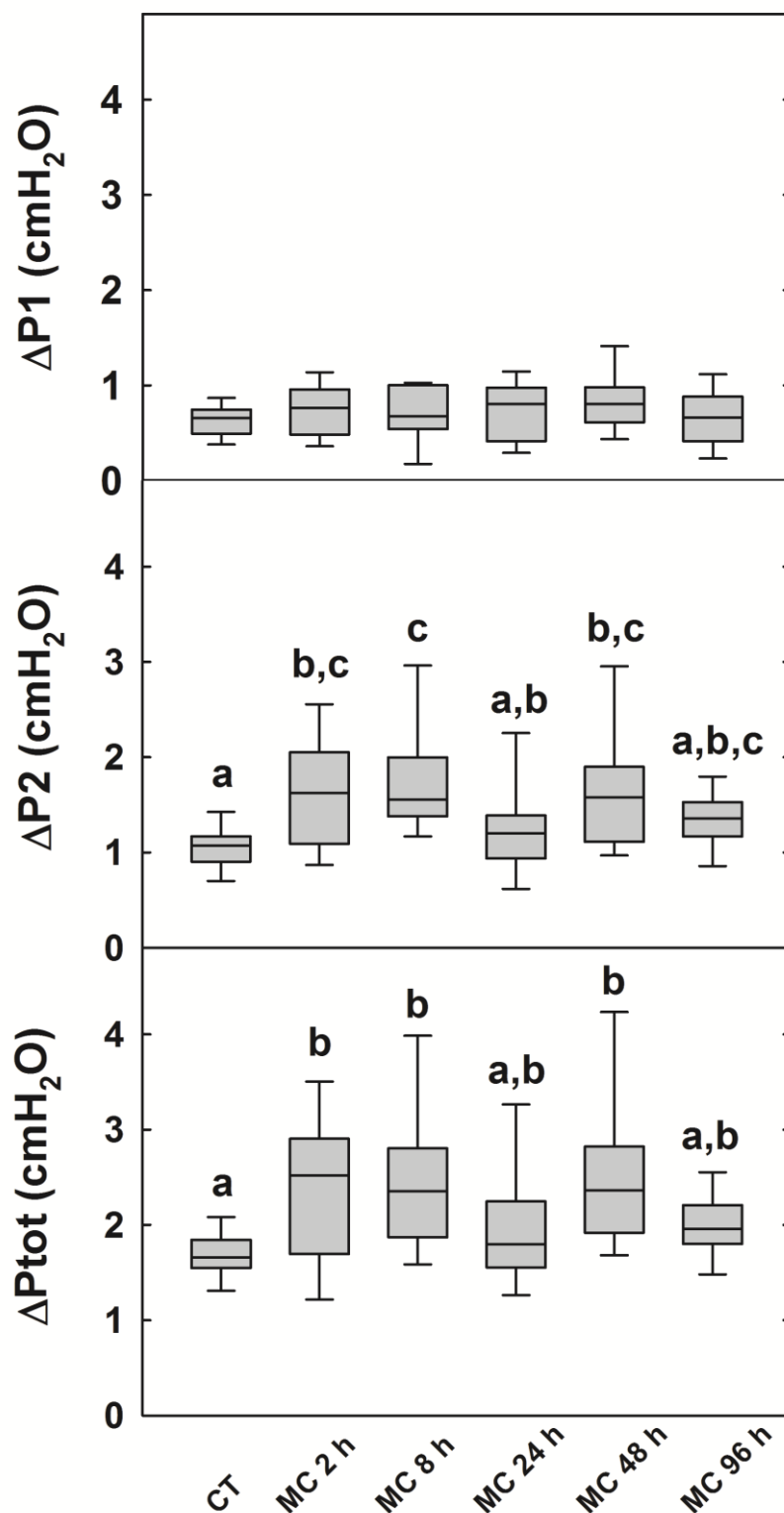
Grupo	Fluxo (mL/s)	Volume (mL)	n
CT	1,00 ± 0,01	0,20 ± 0,01	13
MC 2 h	0,99 ± 0,02	0,19 ± 0,01	16
MC 8 h	1,00 ± 0,00	0,20 ± 0,01	13
MC 24 h	1,01 ± 0,05	0,20 ± 0,01	24
MC 48 h	1,01 ± 0,01	0,20 ± 0,01	15
MC 96 h	1,00 ± 0,01	0,20 ± 0,01	17

Os valores representam a média ± desvio padrão. CT, camundongos que receberam instilação *i.t.* de solução salina (0,9% NaCl, 50 µL); MC, camundongos que receberam instilação *i.t.* de microcistina-LR (40 µg/kg). As medidas foram realizadas 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a instilação.

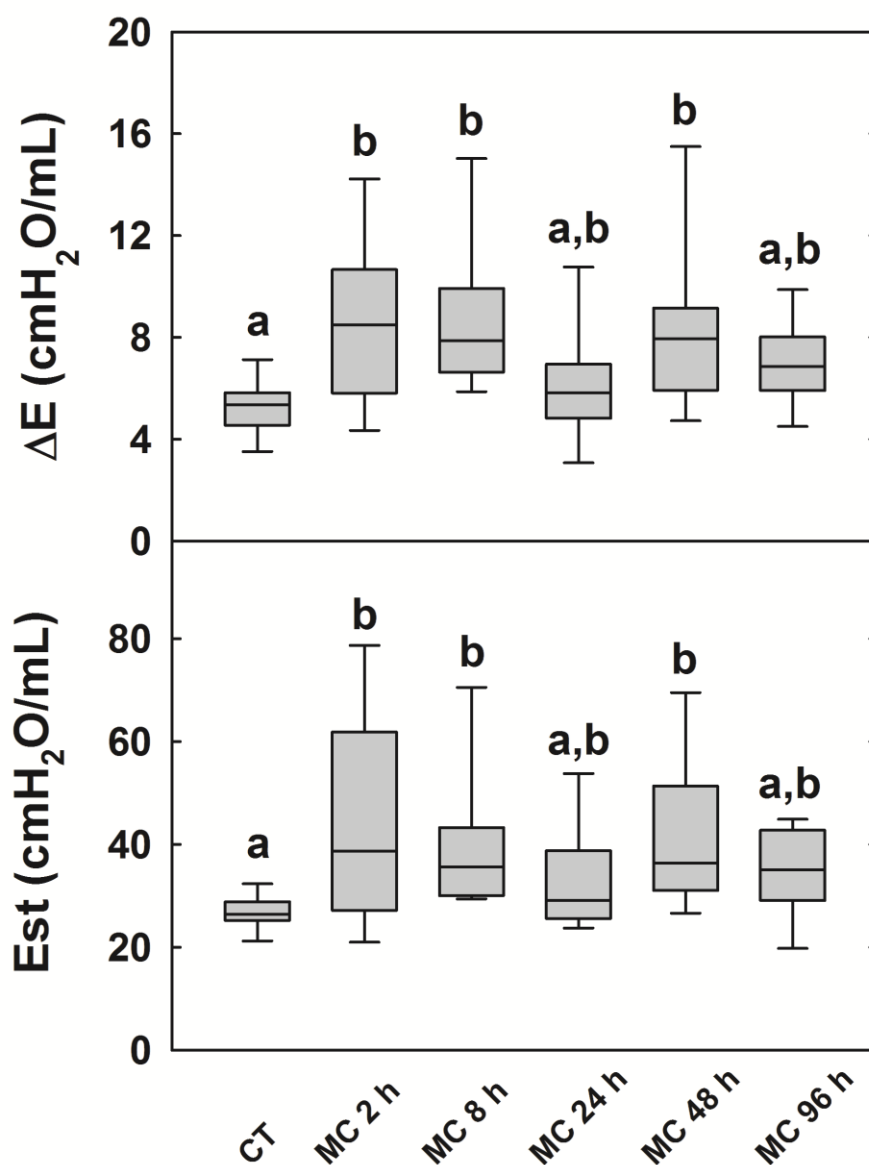
As diferenças entre os parâmetros de mecânica respiratória observadas entre os animais do grupo CT e dos grupos MC estão representadas nas figuras 17 e 18. Não houve alteração no componente resistivo pulmonar relacionado às vias aéreas centrais ( $\Delta P_1$ ) em nenhum dos tempos experimentais (Figura 17). No entanto, os

camundongos instilados com a dose sub-letal de MC-LR apresentaram alterações de início precoce (MC 2h e MC 8 h) nos componentes elástico e viscoelástico relacionados com a periferia pulmonar (Est,  $\Delta E$ ,  $\Delta P_2$ ), seguidas de normalização da mecânica pulmonar em 24 h, novo acometimento em 48 h e retorno aos valores basais em 96 h. Poucas horas após a instilação *i.t.* de toxina, os valores de  $\Delta P_2$ ,  $\Delta P_{tot}$ , Est e  $\Delta E$  no grupo MC 2 h foram 59%, 43%, 71% e 66% maiores do que no grupo CT, respectivamente (Figuras 17 e 18). Portanto, houve um comprometimento agudo em 2 h e 8 h e outro tardio em 48 h da função pulmonar, que foi restabelecida ao final de 24 h e em 96 h.

Os dados da mecânica respiratória de cada animal separadamente estão apresentados no Anexo (pg. 130-135).



**Figura 17.** A instilação intratraqueal de microcistina-LR levou a um comprometimento da periferia pulmonar. Variações de pressão necessárias para vencer os componentes resistivo ( $\Delta P1$ ), viscoelásticos/inomogêneos pulmonares ( $\Delta P2$ ) e pressão total exercida contra os componentes viscosos e viscoelásticos do pulmão ( $\Delta P_{tot}$ ). Os valores são expressos em mediana com os limites do interquartil 25-75 e os valores máximo e mínimo de animais ( $n=13-24$  em cada grupo) instilados *i.t.* com solução salina (CT) ou microcistina-LR ( $40 \mu\text{g}/\text{kg}$ , MC). As medidas foram feitas 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a instilação. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).



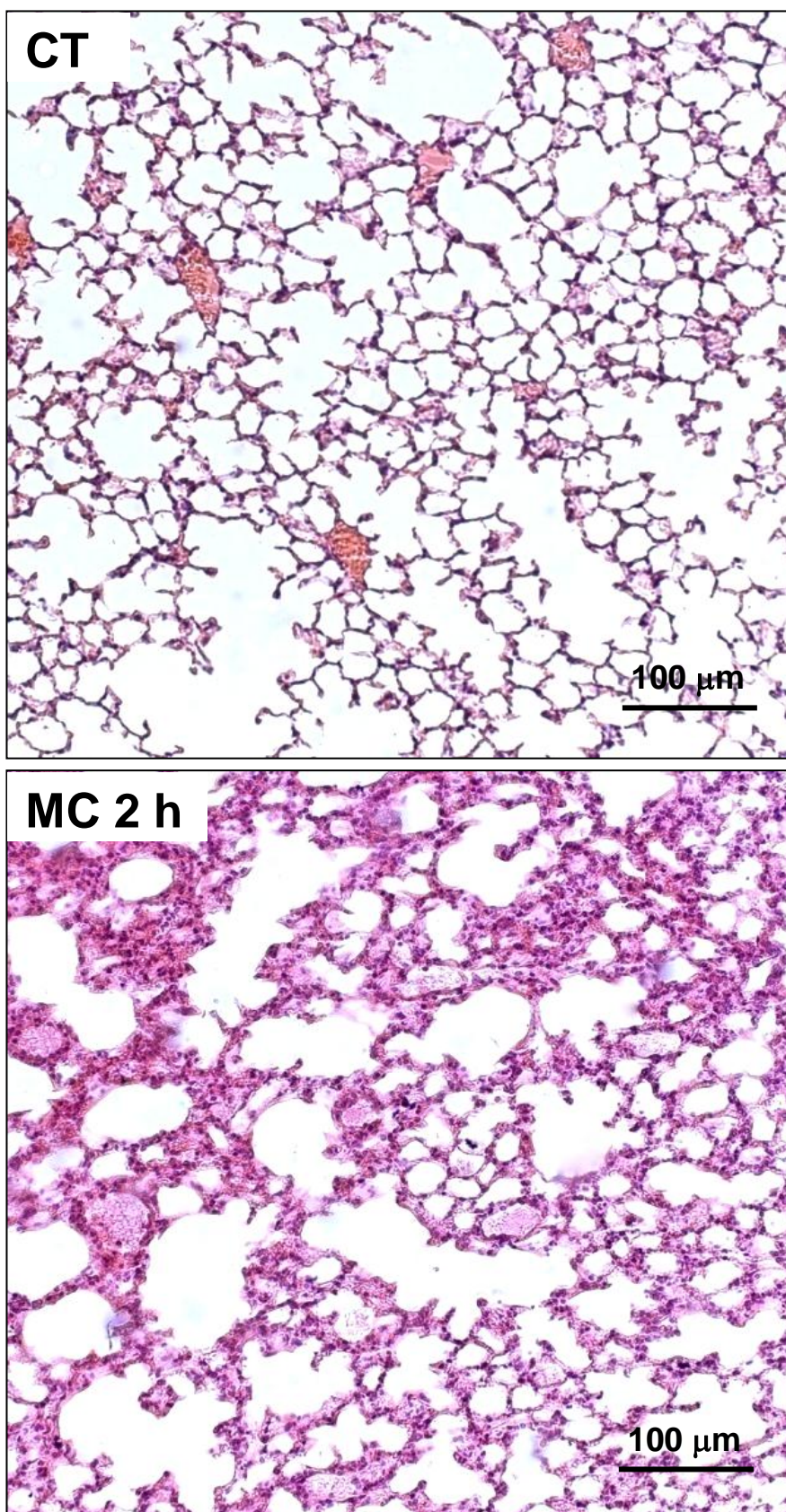
**Figura 18.** A instilação intratraqueal de microcistina-LR alterou as propriedades elásticas do pulmão. Elastância estática ( $\text{Est}$ ) e componente viscoelástico da elastância ( $\Delta E$ ). Os valores são expressos em mediana com os limites do interquartil 25-75 e os valores máximo e mínimo de animais ( $n=13-24/\text{grupo}$ ) instilados *i.t.* com solução salina (CT) ou microcistina-LR ( $40 \mu\text{g/kg}$ , MC). As medidas foram feitas 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a instilação. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

## 5.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

Visando a obtenção de fundamentos para os achados funcionais e uma avaliação do comprometimento tecidual seguido à administração de MC-LR, foram realizadas análises qualitativas e quantitativas no tecido pulmonar. Também foi avaliada a histologia hepática a fim de confirmar a hepatotoxicidade da MC-LR pós-administração *i.t.*

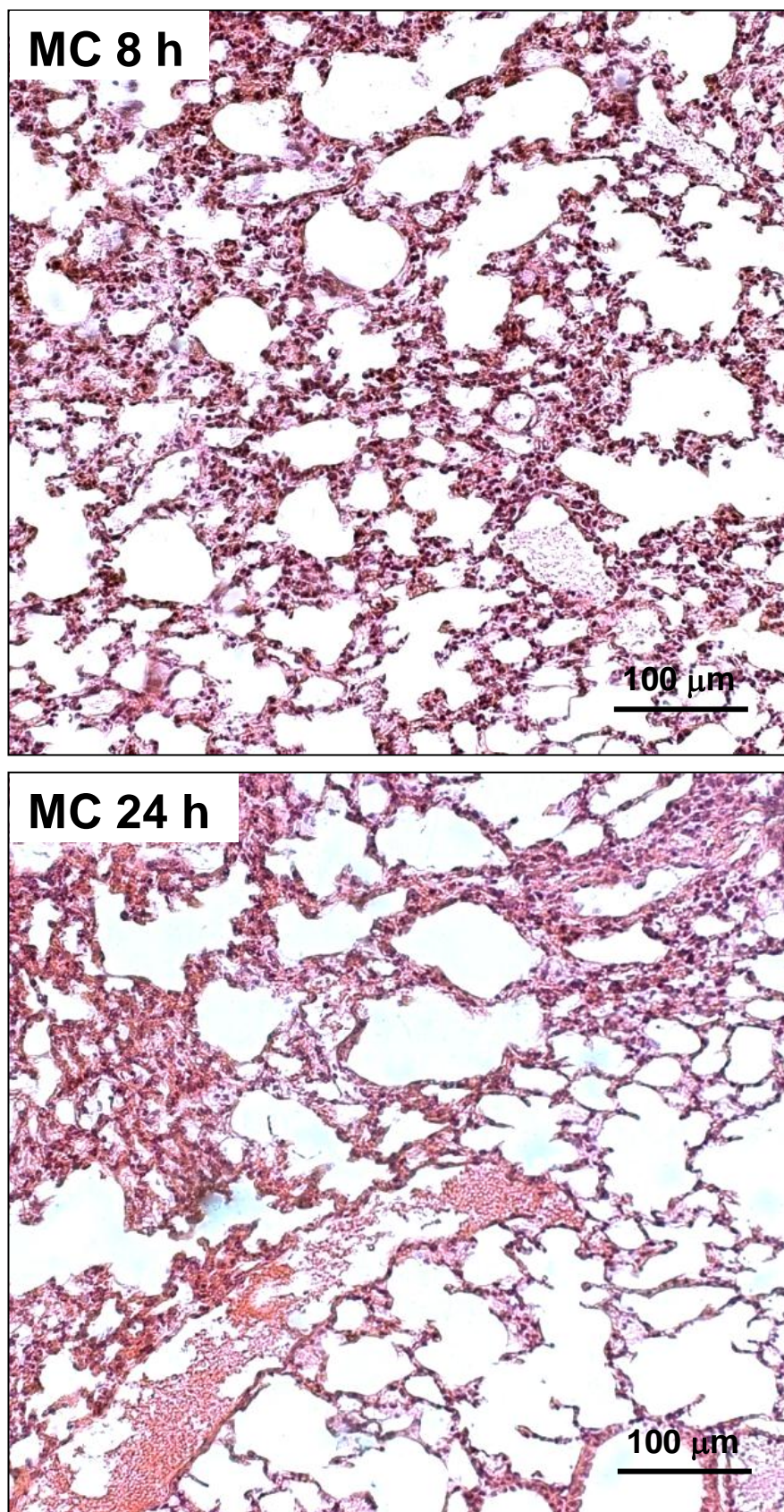
### 5.5.1 Análise qualitativa do pulmão

As Figuras 19, 20 e 21 retratam fotomicrografias do parênquima pulmonar dos grupos CT e MC. Nota-se que a administração de MC-LR via *i.t.* gerou danos ao parênquima pulmonar, evidenciados pelo espessamento do septo alveolar e presença de células inflamatórias, em todos os grupos que receberam a toxina. Além disso, os animais dos grupos MC 2 h, MC 8h, MC 24 h e MC 48 h apresentaram áreas de colapso alveolar e discreto edema em comparação com o grupo controle. Esses achados histológicos se alinham com os achados funcionais previamente descritos.



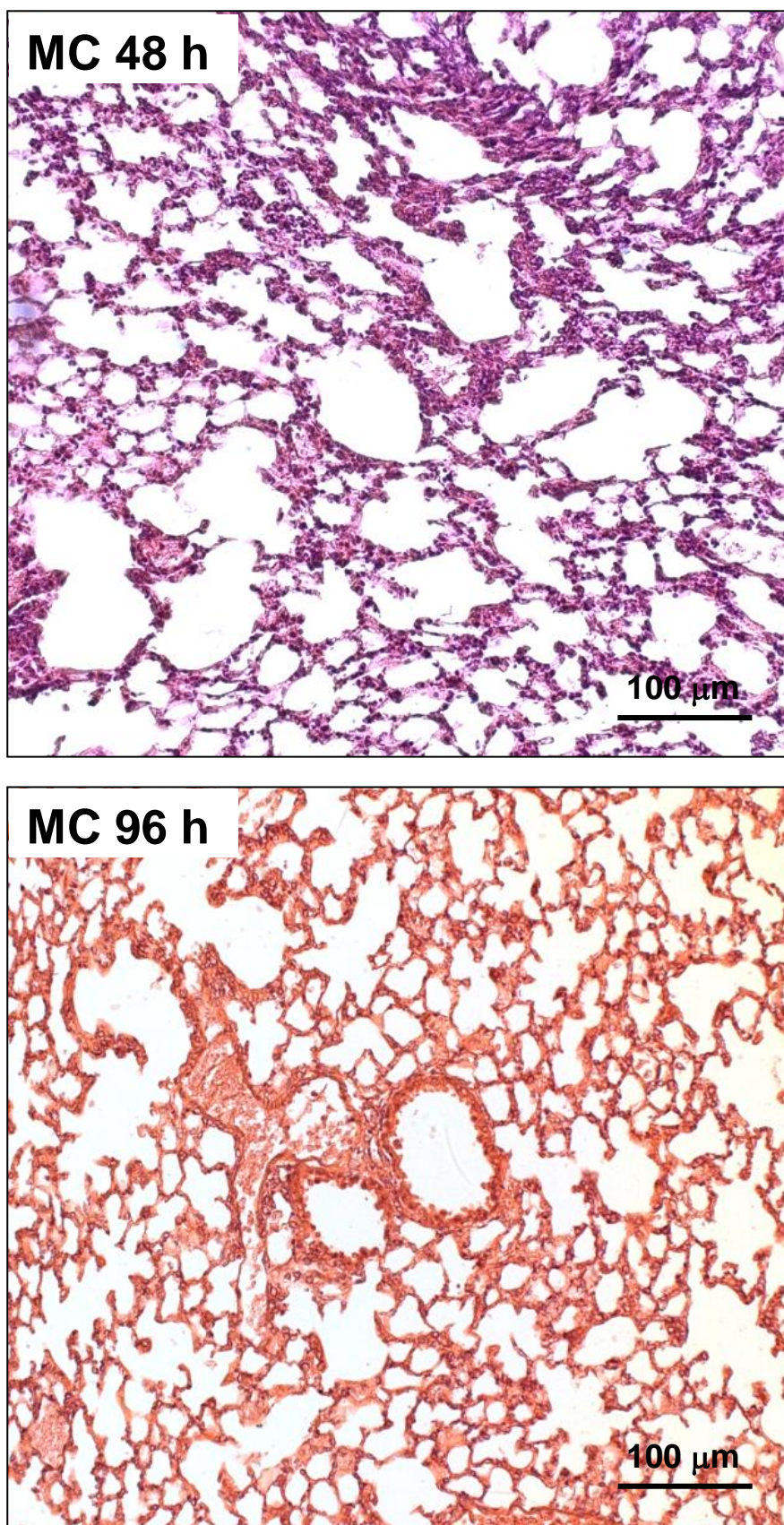
**Figura 19.** A instilação intratraqueal de microcistina-LR gerou danos no tecido pulmonar. Fotomicrografias de parênquima pulmonar (200x) coradas com hematoxilina-eosina. As fotos são representativas do grupo controle (CT, n=7) e 2 h após a instilação intratraqueal de microcistina-LR (40 µg/kg, MC 2 h, n=5). Barras = 100 µm.





**Figura 20.** A instilação intratraqueal de microcistina-LR gerou danos no tecido pulmonar. Fotomicrografias de parênquima pulmonar (200x) coradas com hematoxilina-eosina. As fotos são representativas dos grupos após 8 h (MC 8 h, n=8) e 24 h (MC 24 h, n=9) da instilação intratraqueal de microcistina-LR (40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Barras = 100  $\mu\text{m}$ .



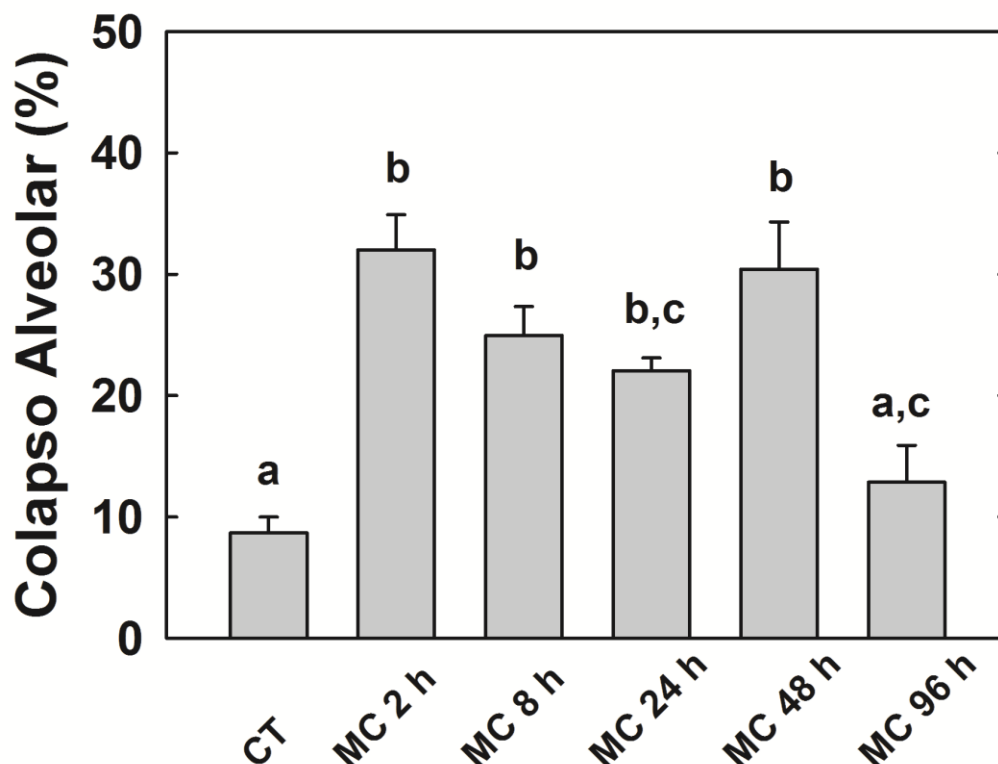


**Figura 21.** A instilação intratraqueal de microcistina-LR gerou danos no tecido pulmonar. Fotomicrografias de parênquima pulmonar (200x) coradas com hematoxilina-eosina. As fotos são representativas dos grupos após 48 h (MC 48 h, n=8) e 96 h (MC 96 h, n=9) da instilação intratraqueal de microcistina-LR (40 μg/kg). Barras = 100 μm.

### 5.5.2 Análise quantitativa no pulmão

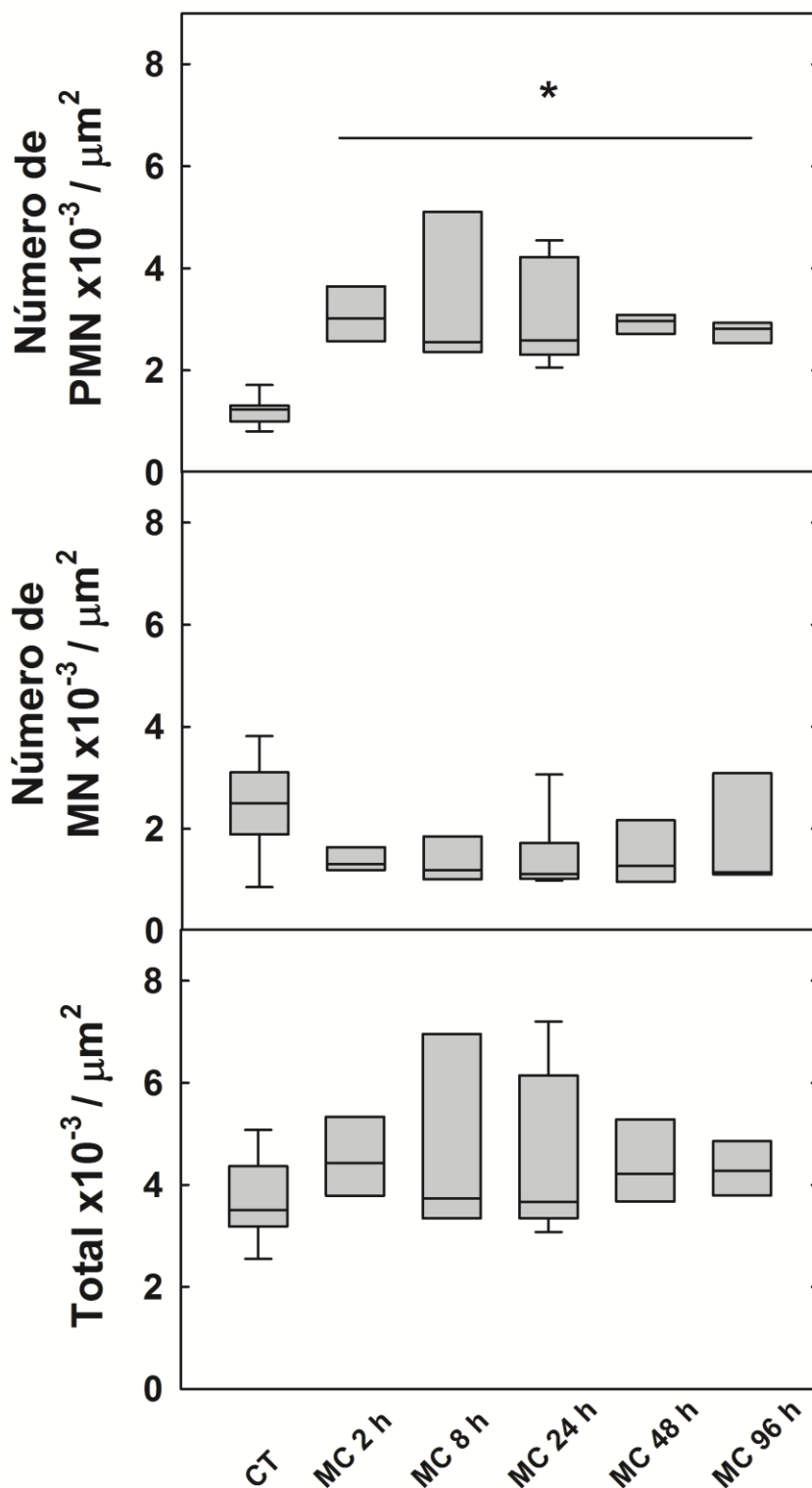
A análise quantitativa dos cortes histológicos permitiu avaliar a extensão dos danos provocados ao pulmão pela instilação *i.t.* de MC-LR. Os valores obtidos nesta análise para os grupos CT e MC nos diferentes tempos são apresentados nas Figuras 22 e 23.

A Figura 22 apresenta a análise morfométrica do parênquima pulmonar dos animais controle e MC. Duas horas após a instilação *i.t.* de MC-LR, já se observa um aumento significativo de colapso alveolar, que permanece até 48 h após a exposição à toxina. Em 96 h o percentual de colapso dos animais instilados com a toxina retoma os níveis de CT. O aumento das áreas de colapso foi acompanhado por diminuição no percentual de áreas normais. Embora não tenha sido detectada diferença significativa no percentual de alvéolos hiperinsuflados ( $p > 0,110$ ), alguns camundongos dos grupos MC 2 h, MC 8 h, MC 24 h e MC 48 h apresentaram hiperinsuflação alveolar, ao contrário dos animais dos grupos CT e MC 96 h, onde o percentual de hiperinsuflação foi nulo em todas as lâminas analisadas. Os dados de cada animal separadamente estão apresentados no Anexo (pg. 139-140).



**Figura 22.** A instilação intratraqueal de microcistina-LR levou ao aumento no percentual de colapso alveolar. Fração de área de alvéolos colapsados no parênquima pulmonar dos camundongos ( $n=5-9/\text{grupo}$ ) instilados *i.t.* com salina (CT) ou microcistina-LR ( $40 \mu\text{g}/\text{kg}$ , MC) e analisados 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a instilação. Os valores correspondem à média + EPM de 5 a 10 campos por lâmina, em um aumento de 200x. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

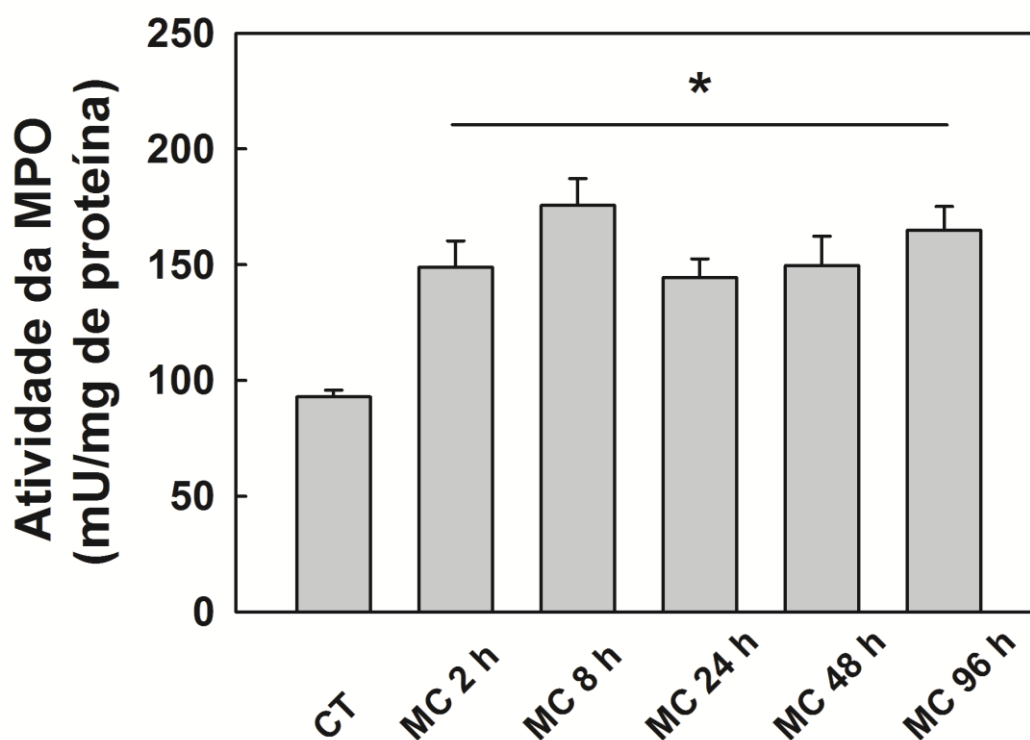
Visando a avaliar o efeito da MC-LR na resposta inflamatória, foi quantificada a celularidade total e diferencial no parênquima pulmonar (Figura 23). Foi observado influxo de células PMN significativo já 2 h após a instilação de MC-LR, persistindo ao longo dos quatro dias de experimento. Não foi visto aumento no número de células MN por área de tecido pulmonar nem de celularidade total em nenhum dos grupos MC em relação ao CT. Os dados de cada animal separadamente são apresentados no Anexo (pg. 136-138).



**Figura 23.** A instilação intratraqueal de microcistina-LR levou ao influxo de células polimorfonucleares no parênquima pulmonar. Número de células polimorfo- (PMN) e mononucleares (MN) e celularidade total por área de tecido pulmonar nos camundongos (n=5-9/grupo) instilados *i.t.* com salina (CT) ou microcistina-LR (40 μg/kg, MC) e analisados 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a instilação. Os valores são expressos em mediana com os limites do interquartil 25-75 e os valores máximo e mínimo. Foram analisados de 5 a 10 campos por lâmina, em um aumento de 1000x. \* significativamente diferente em relação ao grupo CT (p<0,05).

## 5.6 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE

Para melhor caracterizar o perfil do processo inflamatório após a instilação de MC-LR, foi avaliada a atividade da mieloperoxidase no homogenato pulmonar (Figura 24). Houve um aumento significativo da atividade desta enzima, utilizada como marcador de inflamação neutrofílica, em todos os tempos pós-exposição a MC-LR. Portanto, a instilação *i.t.* de MC-LR foi capaz de levar ao recrutamento de neutrófilos para o tecido pulmonar de forma aguda (MC 2 h), mantendo o processo inflamatório até o último tempo estudado (MC 96 h).

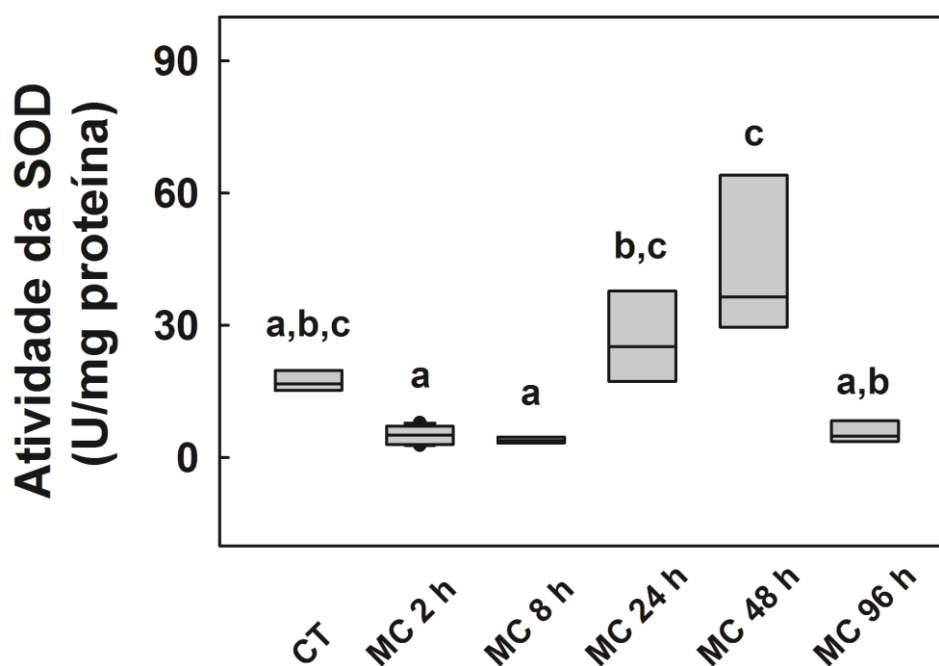


**Figura 24.** A instilação intratraqueal de microcistina-LR levou ao aumento da atividade da mieloperoxidase. Atividade da enzima mieloperoxidase no homogenato pulmonar dos camundongos (n=4-10/grupo) instilados *i.t.* com salina (CT) ou microcistina-LR (40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , MC) e analisados 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a instilação. \* significativamente diferente em relação ao grupo CT ( $p < 0,05$ ).

## 5.7 ANÁLISE DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

A avaliação do balanço redox no tecido pulmonar foi realizada através da análise da atividade das três principais enzimas anti-oxidantes (SOD, CAT e GPx), como mostram as Figuras 25, 26 e 27.

Não houve diferença estatística da atividade da SOD em nenhum grupo MC em relação ao CT, sendo observada apenas uma tendência à diminuição da atividade desta enzima nos grupos MC 2 h, MC 8 h e MC 96 h e ao aumento da atividade nos grupos MC 24 h e MC 48 h. Já entre os grupos instilados *i.t.* com MC-LR foi observado aumento da atividade nos grupos MC 24 h e MC 48 h quando comparada MC 2 h e MC 8 h, sendo MC 48 h também diferente de MC 96 h (Figura 25).

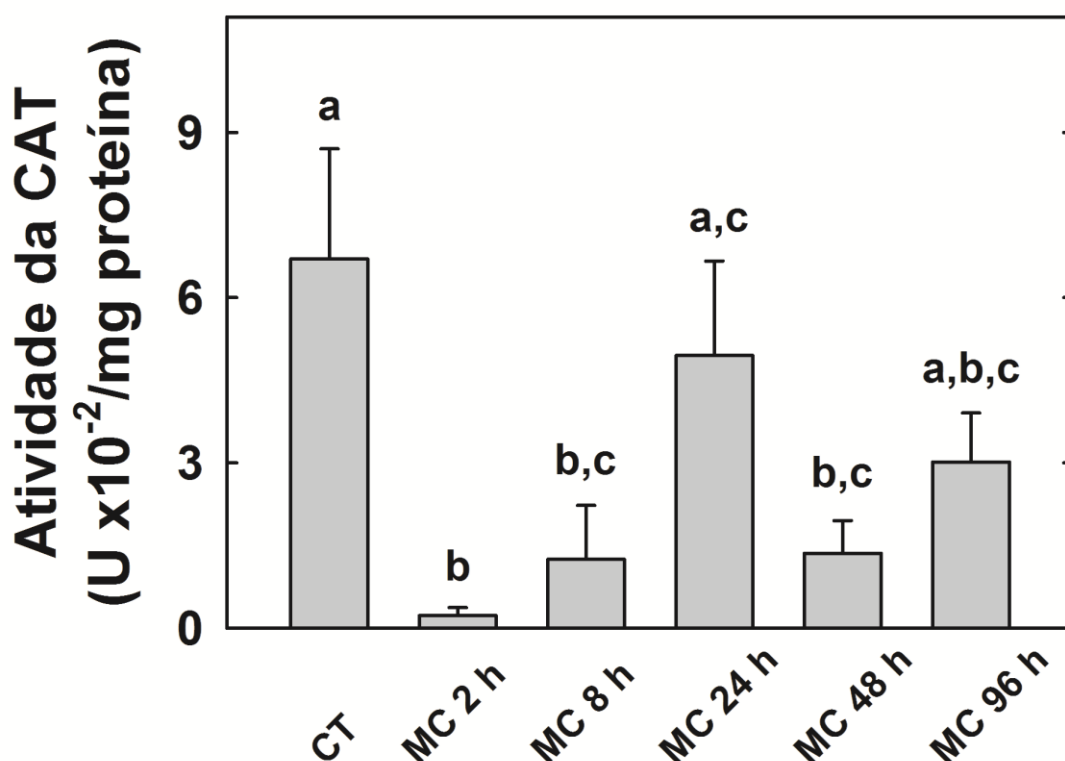


**Figura 25.** A instilação intratraqueal de microcistina-LR alterou a atividade da superóxido dismutase (SOD). Atividade da SOD no homogenato pulmonar dos camundongos ( $n=4-10$ /grupo) instilados *i.t.* com salina (CT) ou microcistina-LR ( $40 \mu\text{g}/\text{kg}$ , MC) e analisados 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a instilação. Uma unidade (U) de atividade da SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe 50% da reação. Os valores são expressos em mediana com os limites do interquartil 25-75 e os valores máximo e mínimo. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

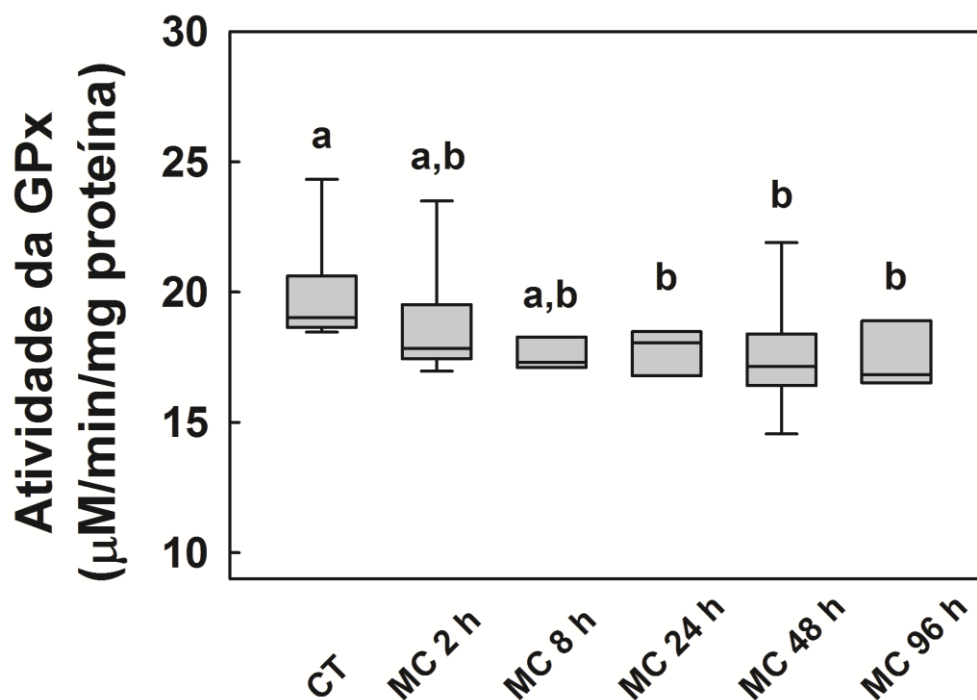


A atividade da CAT está representada na figura 26, onde se observa redução rápida e pronunciada da atividade da CAT nos grupos MC 2 h e MC 8 h em relação ao CT, seguida de recuperação no grupo MC 24 h, e nova diminuição da atividade em 48 h.

A Figura 27 mostra que a atividade da GPx no pulmão foi afetada mais tardiamente nos animais desafiados com MC-LR, apresentando redução da atividade nos grupos MC 24 h, MC 48 h e MC 96 h comparados ao CT.



**Figura 26.** A instilação intratraqueal de microcistina-LR diminuiu precocemente a atividade da catalase (CAT). Atividade da CAT no homogenato pulmonar dos camundongos (n=3-5/grupo) instilados *i.t.* com salina (CT) ou microcistina-LR (40 µg/kg, MC) e analisados 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a instilação. Uma unidade (U) de atividade da CAT é definida como a quantidade de enzima requerida para o consumo de 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 1 minuto. Os valores correspondem à média + EPM. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (p<0,05).

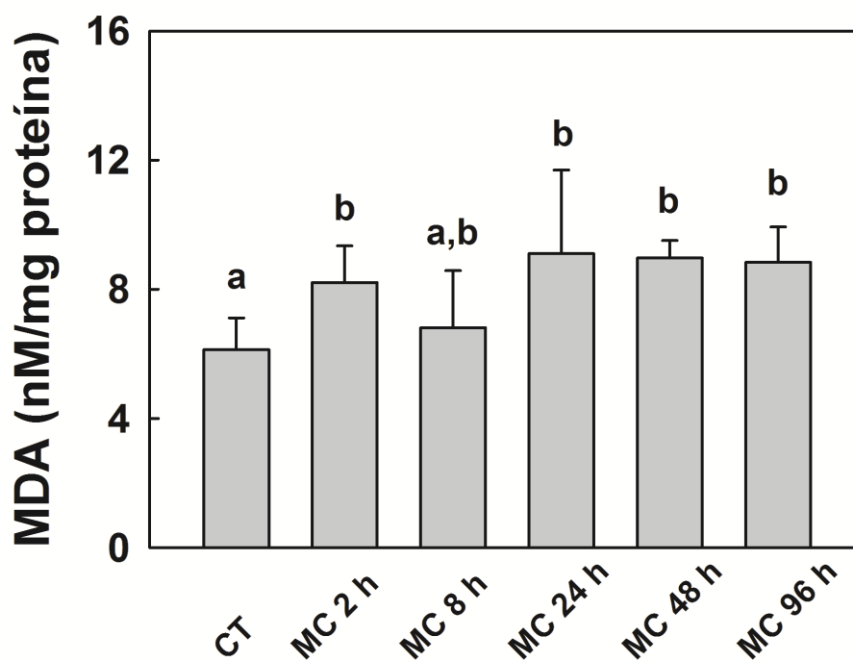


**Figura 27.** A instilação intratraqueal de microcistina-LR diminuiu tardiamente a atividade da glutatona peroxidase (GPx). Atividade da GPx no homogenato pulmonar dos camundongos (n=7-10/grupo) instilados *i.t.* com salina (CT) ou microcistina-LR (40 µg/kg, MC) e analisados 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a instilação. Os valores são expressos em mediana com os limites do interquartil 25-75 e os valores máximo e mínimo. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (p<0,05).

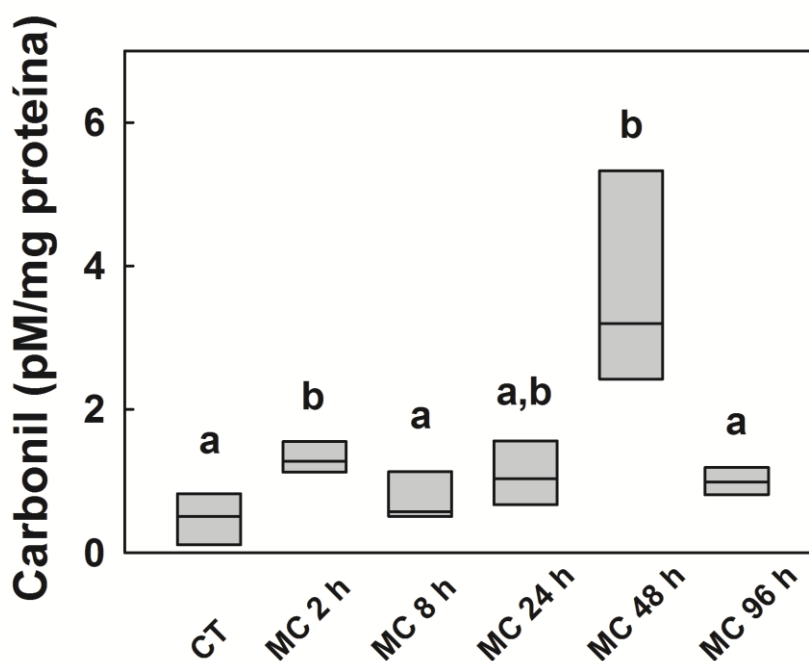
## 5.8 ANÁLISE DE DANO OXIDATIVO

A análise de dano oxidativo em componentes celulares lipídicos e protéicos está expressa nas Figuras 28 e 29. Houve aumento da peroxidação lipídica medida pelo MDA já em 2 h e a partir de 24 h em relação ao CT, permanecendo assim até o último tempo experimental (Figura 28). Já o dano oxidativo em proteínas só foi significativamente maior comparado ao CT nos grupos MC 2 h e MC 48 h (Figura 29).





**Figura 28.** A instilação intratraqueal de microcistina-LR levou a um aumento da peroxidação lipídica. Peroxidação lipídica medida através da formação de malondialdeído (MDA) no homogenato pulmonar dos camundongos ( $n=5-7/\text{grupo}$ ) instilados *i.t.* com salina (CT) ou microcistina-LR ( $40 \mu\text{g}/\text{kg}$ , MC) e analisados 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a instilação. Os valores correspondem à média + EPM. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).



**Figura 29.** A instilação intratraqueal de microcistina-LR gerou oxidação de proteína. Oxidação protéica medida através da presença do grupo carbonila em proteínas do homogenato pulmonar dos camundongos ( $n=5-8/\text{grupo}$ ) instilados *i.t.* com salina (CT) ou microcistina-LR ( $40 \mu\text{g}/\text{kg}$ , MC) e analisados 2, 8, 24, 48 e 96 horas após a instilação. Os valores são expressos em mediana com os limites do interquartil 25-75 e os valores máximo e mínimo. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

# DISCUSSÃO

## 6 DISCUSSÃO

A MC é uma cianotoxina hepatotóxica, cujos efeitos deletérios no fígado são extensamente conhecidos. Outros órgãos também podem ser afetados por esta toxina, inclusive o pulmão, tendo sido demonstrado pelo nosso grupo que o sistema respiratório pode ser atingido tanto estrutural quanto funcionalmente (PICANÇO *et al.*, 2004; SOARES *et al.*, 2007). Há relatos na literatura de intoxicação e morte de animais e seres humanos, assim como promoção de tumores, associados com exposição às MCs (FALCONER, 1989; NISHIWAKI-MATSUSHIMA *et al.*, 1992; AZEVEDO *et al.*, 2002; GUPTA *et al.*, 2003). Ademais, o aumento da ocorrência de florações tóxicas de cianobactéria em todo o mundo justifica o esforço na tentativa de compreender melhor os efeitos globais dessa toxina, até mesmo para instituição de propostas terapêuticas (CARVALHO *et al.*, 2010).

O presente estudo é inédito no que diz respeito à análise da função e parâmetros relacionados ao estresse oxidativo pulmonares, morfometria, perfil do recrutamento de células inflamatórias, quantificação da toxina nos tecidos pulmonar e hepático e análise histológica do fígado em um modelo de lesão pulmonar aguda induzida por instilação *i.t.* de MC-LR. Os efeitos da exposição direta à esta cianotoxina sobre o pulmão de camundongos previamente saudáveis mostrou modificações histológicas no parênquima pulmonar com áreas de colapso alveolar, espessamento do septo e recrutamento de células inflamatórias no pulmão. Também foi observada maior atividade da enzima mieloperoxidase em todos os grupos lesados. As alterações na mecânica pulmonar exibiram um padrão bifásico, com aumento da elastância e das pressões viscoelásticas e/ou inomogêneas em dois momentos distintos ao longo do experimento; inicialmente, em 2 h e 8 h e,

posteriormente, em 48 h. Além disso, também foram vistas alterações na atividade das enzimas antioxidantes no pulmão, sugerindo que o estresse oxidativo possa ser um dos mecanismos de lesão provocados por essa toxina. A MC-LR foi quantificada no fígado já após 2 h da exposição *i.t.* com acúmulo temporal neste órgão, sendo observadas lesões histológicas características de intoxicação por MC-LR, de acordo com os achados da literatura, o que confirma a via respiratória como uma potencial porta de entrada para a toxina no organismo.

Uma parte importante da interpretação dos resultados de uma pesquisa biológica é a cuidadosa seleção da espécie a ser utilizada. Existe uma enorme variedade de espécies animais disponíveis e, como regra geral, a espécie filogeneticamente mais próxima à humana possui a melhor correlação clínica. Os modelos experimentais auxiliam na compreensão dos fenômenos naturais e possibilitam o estudo de estruturas e órgãos de difícil acesso em humanos. Ainda, a possibilidade de controlar as variáveis ambientais, sociais e patológicas em animais de experimentação justificou, no nosso experimento, a escolha de pequenos animais. Diversas espécies de camundongo e rato têm sido utilizadas para avaliar os efeitos da MC nos diferentes sistemas, sendo facilmente encontrado os valores da  $DL_{50}$  desta toxina de acordo com sexo e espécie do animal. Sendo assim, escolhemos camundongos Swiss machos adultos, os quais são largamente utilizados para estudos com MC 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 Swiss diz respeito ao fato desta linhagem não ser isogênica. Para alguns estudos esta pode ser uma característica que compromete a correta interpretação dos resultados, uma vez que o padrão de resposta observado poderá apresentar grande variabilidade. Neste

estudo, acredita-se que o número de camundongos utilizados para as análises foi suficiente para detectar diferenças significativas entre os mesmos e superar tal inconveniente.

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

A administração intranasal da toxina é a que mais se aproxima da exposição pela via respiratória a que os seres humanos estão sujeitos. No entanto, apesar das evidências de que camundongos tem menor eficiência na capacidade de filtrar partículas inaladas (SHAPIRO, 2000), o que aproximaria a dose intranasal daquela que de fato chega aos pulmões, é necessário considerar que a exposição de agentes por esta via deve contar com as perdas pela filtração e pela cavidade oral. Há diminuição/perda na eficiência de um modelo quando a mesma dose de xenobionte é administrada intranasal comparada à instilação *i.t* (LACHER *et al.*, 2010). O modelo de instilação intratraqueal é bem aceito na literatura para simular a exposição à agentes nocivos pela via respiratória, além de assegurar a dose administrada (ITO *et al.*, 2001; FAFFE *et al.*, 2001; MAGALHÃES *et al.*, 2010).

Já foi demonstrado que a DL<sub>50</sub> da MC-LR via *i.p.* ou *i.v.* é similar a encontrada via *i.t.* (FITZGEORGE *et al.*, 1994; ITO *et al.*, 2001). Com base nisso, a dose escolhida para induzir lesão pulmonar direta, assim como o desenho experimental deste estudo, foram os mesmos utilizados previamente pelo nosso grupo em um modelo de lesão indireta por MC-LR (40 µg/kg) analisado temporalmente (SOARES *et al.*, 2007).

O estudo de parâmetros da função pulmonar em animais tão pequenos quanto os camundongos representa um desafio, sendo a utilização de equipamentos adequados, como foi o caso do presente estudo, de extrema importância para tornar as medidas mais fidedignas e fornecer informações importantes para a compreensão dos mecanismos envolvidos nas doenças pulmonares (IRVIN & BATES, 2003). Uma vez que o interesse do estudo era observar alterações ocorridas na mecânica pulmonar, optamos pela retirada da parede torácica ântero-lateral, pois, assim, a medida da pressão na abertura das vias aéreas representa a PL, isto é, aquela utilizada para movimentar o pulmão, simplificando a preparação. Ademais, evita-se o ruído mecânico introduzido nas medidas pelo batimento cardíaco, levando, assim, à maior precisão nos dados obtidos.

Em função da retirada da parede torácica, foi necessária a aplicação de uma PEEP para evitar o colapso das vias aéreas e manter a CRF fisiológica. Além disso, durante a anestesia, há formação de áreas de atelectasia com maior redução da CRF (POWERS, 1973; HEDENSTIERNA, 1990). A aplicação de PEEP leva a manutenção do número de alvéolos ventilados, queda do débito cardíaco e redistribuição do fluxo sanguíneo pulmonar, sendo os dois últimos evitados pela remoção do plastrão esternal, caso do presente estudo, pois evita a compressão da

veia cava e da aorta (POWERS, 1973). O valor da PEEP aplicada foi medida em cada animal correspondendo em média a 2 cmH<sub>2</sub>O, como descrito em ratos por Saldiva e colaboradores (1992).

No presente estudo, observou-se aumento significativo dos parâmetros que representam os componentes elástico e viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão nos grupos injetados com MC-LR em relação ao CT, em dois momentos distintos. (Figuras 17 e 18). Há várias técnicas desenvolvidas para a análise da mecânica respiratória, porém o método de oclusão das vias aéreas ao final da inspiração difundiu-se por apresentar como vantagem a individualização das variações de pressões em seus componentes resistivos, elásticos e viscoelásticos e/ou inhomogêneos (BATES *et al.*, 1985a). Avanços importantes ocorreram clínica e experimentalmente a partir desse conhecimento. Utilizando este método, detectamos um aumento nas variações de pressão ( $\Delta P_{tot}$  e  $\Delta P_2$ ) (Figura 17), na elastância estática (Est) e no componente viscoelástico da elastância ( $\Delta E$ ) (Figura 18) do pulmão já 2 h após a instilação de MC-LR. Essas alterações foram normalizadas no grupo MC 24 h, porém um novo acometimento do sistema respiratório foi detectado nos animais MC 48 h, com nova normalização dos parâmetros da mecânica em 96 h.

Em um animal destituído de sua parede torácica, e considerando-se o volume corrente e o fluxo aéreo constantes, as alterações observadas em  $\Delta P_{tot}$  refletem as modificações nos componentes resistivos ( $\Delta P_1$ ) e viscoelásticos e/ou inhomogêneos ( $\Delta P_2$ ) do pulmão. Neste caso, o aumento da  $\Delta P_{tot}$  acompanhou o perfil de modificações na  $\Delta P_2$ , que está relacionada ao relaxamento por tensão (*stress relaxation*) do tecido pulmonar, juntamente com pequena contribuição do *pendelluft* (BATES *et al.*, 1988b; D'ANGELO *et al.*, 1989; SALDIVA *et al.*, 1992) (Figura 17).

Embora a toxina tenha sido administrada via *i.t.*, não houve comprometimento detectável na mecânica pulmonar no que diz respeito à pressão dissipada para vencer a resistência de vias aéreas centrais ( $\Delta P_1$ ) (SIMILOWSKI *et al.*, 1989). Portanto, a MC-LR atuou na periferia pulmonar, alterando as propriedades elásticas e viscoelásticas e/ou inomogêneas do tecido pulmonar, mas não as propriedades resistivas.

O aumento das pressões necessárias para vencer os componentes elásticos (Est) e viscoelástico e/ou inomogêneos ( $\Delta P_2$ ), indicam um enrijecimento pulmonar. Parte desses achados funcionais pode ser explicada pelas alterações morfológicas e de celularidade no parênquima pulmonar evidenciadas na microscopia óptica (Figuras 19-23). Outros trabalhos na literatura indicam alterações na mecânica pulmonar como resultado do processo inflamatório gerado por veneno de cobra, lipopolissacarídeo e pela própria MC-LR (SILVEIRA *et al.*, 2004; FAFFE *et al.*, 2000; SOARES *et al.*, 2007).

O colapso alveolar (Figuras 19-22) acarreta heterogeneidade do parênquima pulmonar e contribui para o aumento de  $\Delta P_2$ ,  $\Delta E$  e da Est. Apenas no grupo MC 24 h o maior percentual de colapso não foi suficiente para comprometer a função pulmonar significativamente. Outros fatores também podem ter contribuído para a piora dos parâmetros da mecânica, como distorção dos alvéolos patentes, o processo inflamatório desencadeado e disfunção do surfactante pulmonar (LIU *et al.*, 1996). O processo inflamatório evidenciado pelo espessamento do septo alveolar, recrutamento de células polimorfonucleares e presença de edema no tecido pulmonar em todos os grupos MC (Figuras 19-21 e 23) pode, potencialmente, comprometer a síntese e/ou armazenamento do surfactante pulmonar, elevando a



tensão superficial, gerando, assim, áreas de colapso com conseqüente aumento da Est.

O aumento da atividade da MPO, enzima lisossomal usada como marcador de neutrófilos, corrobora os achados histológicos, mostrando que o infiltrado de células PMN ocorreu devido ao recrutamento de neutrófilos para o pulmão (Figura 24). Os neutrófilos, juntamente com os eosinófilos e basófilos, são células da imunidade inata que possuem grânulos especializados para defesa imunológica e, portanto, constituem a primeira linha de defesa do organismo. Em geral, as células da imunidade inata respondem aos sinais inflamatórios, sendo ativadas para localização do tecido danificado e para comunicação intercelular através do contato célula-célula ou através de citocinas (LUSTER *et al.*, 2005). Os neutrófilos expressam moléculas de adesão abundantes para uma rápida ligação com os receptores endoteliais ativados pelo processo inflamatório, acumulando-se em poucas horas nos sítios de inflamação aguda. Já foi previamente observado que a MC aumenta a adesão espontânea de leucócitos PMN em humanos, o que poderia influenciar a capacidade migratória destas células (HERNANDEZ *et al.*, 2000).

Gupta *et al.* (2003), ao avaliar camundongos injetados com a DL<sub>50</sub> de MC *i.p.*, também constataram a presença de efeitos pulmonares, tais como, congestão, necrose e hiperplasia do epitélio brônquico, edema e hemorragia, entre 30 e 60 minutos após a injeção. Anteriormente, nosso grupo mostrou que a injeção *i.p.* de extrato de cianobactérias contendo MC-LR, assim como a toxina purificada, também desencadeia um processo inflamatório rápido, com presença de colapso alveolar, influxo de células inflamatórias no parênquima pulmonar e edema intersticial, que perdura, pelo menos, 96 horas (PICANÇO *et al.*, 2004; SOARES *et al.*, 2007).

Outro trabalho utilizando MC-LR mostrou que a exposição de camundongos via aerossol gerou necrose ou inflamação das células epiteliais respiratórias da cavidade nasal, com presença de infiltrado neutrofílico, e degeneração, necrose e atrofia das células epiteliais olfatórias (BENSON *et al.*, 2005). Entretanto, nenhuma lesão foi observada no parênquima pulmonar. Foi utilizada a MC-LR numa dose máxima de 12,5 µg/kg de peso corpóreo, talvez por isso não tenham encontrado efeitos pulmonares ou em outros órgãos.

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

A presença de MCs no pulmão após a administração da toxina via *i.p.* ou *i.t.* já foi demonstrada em vários trabalhos utilizando-se MC marcada ou imunohistoquímica (BROOKS & CODD, 1987; ROBINSON *et al.*, 1989; STOTTS *et*

*al.*, 1997b; ITO *et al.*, 2001). Esta toxina é capaz de alcançar a corrente sanguínea e outros órgãos, a partir do pulmão, sendo detectada no pulmão, fígado, rins e intestino após a instilação *i.t.*, tanto com doses letais (100 µg/kg) quanto sub-letais (50 µg/kg) (ITO *et al.*, 2001). A instilação com a dose sub-letal permitiu observar que a MC-LR está presente nos alvéolos 7 horas após sua administração, decrescendo proeminentemente a marcação em 24 h. A partir daí, a toxina só foi detectada no interior de macrófagos alveolares, mesmo após 10 dias da exposição. Embora os autores relatem que não houve danos ao tecido pulmonar, nenhuma avaliação histopatológica detalhada foi realizada. As fotomicrografias pulmonares apresentadas pelos autores mostram áreas de colapso alveolar que poderiam ser atribuídas à técnica para retirada do tecido ou ao dano gerado pela toxina. Outro dado importante do trabalho é o fato do fígado e outros órgãos já terem marcação, embora fraca, para MC-LR 7 h após a instilação *i.t.* (ITO *et al.*, 2001). No presente trabalho, a quantificação de MC-LR no tecido pulmonar e hepático, assim como o estudo histológico do fígado suportam os achados da literatura (Figuras 12-16).

No fígado, a toxina já foi detectada em 2 h, sendo observado acúmulo significativamente maior a partir de 48 h (Figura 15). Este resultado está de acordo com os achados de Ito *et al.* (2001), onde a marcação para MC-LR no tecido hepático foi fortemente positiva em 24 h. A explicação para este fato reside na especificidade da captação da toxina pelo fígado, já que é rapidamente captada pelos transportadores de sais biliares (OATP/oatps), presentes no hepatócito (ROBINSON *et al.*, 1991a; CARMICHAEL, 1994). Ao entrar no hepatócito, a MC forma ligação covalente com as PP1, PP2A, PP3A e PP6, inibindo a atividade dessas enzimas e iniciando um processo de desestruturação do citoesqueleto dos hepatócitos, que culmina com a morte celular (HONKANEN & GOLDEN, 2002; DING *et al.*, 1998a,b).

O estudo histopatológico do fígado demonstrou dilatação e congestão dos sinusóides, desarranjo hepatocelular, perda da arquitetura hepática, alto grau de hepatócitos binucleados ou multinucleados, vacuolização citoplasmática e necrose a partir do grupo MC 8 h (Figuras 13 e 14). O processo inflamatório começou a ser observado em 24 h. Todas estas alterações são bem descritas na literatura (RUNNEGAR *et al.*, 1987; THEISS *et al.*, 1988; DAWSON, 1998; GUPTA *et al.*, 2003; GEHRINGER *et al.*, 2004; ANDRINOLO *et al.*, 2008).

Quando o hepatócito rompe, as MCs entram novamente na circulação sangüínea, só que agora, possivelmente conjugadas a uma PP ou parte dela, através do aminoácido Mdha. Ainda, as MCs podem ser detoxificadas pela GSH e formar conjugados MC-SG, também através do aminoácido Mdha (KONDO *et al.*, 1996). Esses conjugados são menos tóxicos do que a forma livre da toxina, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, já que não podem mais formar ligação covalente com a PP (KONDO *et al.*, 1992; METCALF *et al.*, 2000). Esse comportamento das MCs pode explicar o perfil da quantificação da MC-LR no pulmão. Pelo método de ELISA foi detectada MC-LR livre no tecido pulmonar em todos os tempos experimentais, não havendo diferença entre eles. No entanto, chama atenção o perfil encontrado, onde há uma queda da quantificação nos grupos MC 8 h e MC 24 h seguido de restauração dos níveis encontrados após 2 horas nos grupos MC 48 h e MC 96 h (Figura 16). Tal comportamento nos leva a pensar que a toxina que está no pulmão, ou que chega até ele pelo sangue, se encontra na forma de compostos conjugados de MC-SG e MC-cisteína nos tempos de 8 h e 24 h, apresentando um baixo limite de detecção pelo ELISA. De fato, estudos indicam que as MCs circulam no sangue ligadas às proteínas, muito mais do que na sua forma livre (HILBORN *et al.*, 2005). Em pacientes dependentes de diálise, a MC foi detectada no sangue mesmo após

dois meses da exposição, apresentando um padrão de picos e reduções periódicas da MC livre detectada (SOARES *et al.*, 2006). Sendo assim, analisar a presença de MC por ELISA pode subestimar suas concentrações no sangue ou nos tecidos.

A captação da MC-LR pelas células estruturais do pulmão está condicionada a existência de transportadores específicos. Sabe-se que a MC requer um transporte ativo através dos OATP/oatp para alcançar o meio intracelular dos hepatócitos, sendo os OATP1B1, OATP1B3 e OATP1A2 humanos e o oatp1b2 de roedores importantes nesse processo (FISCHER *et al.*, 2005; LU *et al.*, 2008; FEURSTEIN *et al.*, 2009). Nem todos OATP/oatps (OATP2B1, oatp1a1, oatp1a4) são capazes de transportar a MC-LR, mas a participação menos expressiva do oatp3a1 é sugerida (FISCHER *et al.*, 2005), assim como a difusão passiva ou outros mecanismos de captação lenta (LU *et al.*, 2008). A expressão dos OATP/oatps ao nível protéico e sua localização celular no pulmão humano ou de roedores não é descrita, porém é sabido que nenhum dos transportadores importantes para a captação da MC-LR descritos acima é expresso, a exceção do oatp3a1, no pulmão de ratos (BOSQUILLON, 2010). Ao que tudo indica, portanto, a captação da MC-LR pelas células estruturais do pulmão não é facilitada, podendo uma parte da toxina penetrar a célula em pequena escala pelo oatp3a1 e/ou por outros transportadores ainda não descritos.

Cabe lembrar que existem macrófagos alveolares que, como já demonstrado para os macrófagos peritoneais, poderiam captar a MC-LR e disparar respostas inflamatórias (NAKANO *et al.*, 1991). A injeção *i.p.* de MC-LR e de extratos tóxicos de *Microcystis aeruginosa* em camundongos é capaz de estimular os macrófagos peritoneais a produzir mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1 (IL-1). IL-1 é um importante estimulador da migração

de PMN para o parênquima pulmonar (WAGNER & ROTH, 2000) e TNF- $\alpha$  age preparando o endotélio para a migração celular. Logo, caso a MC-LR não tenha alcançado o meio intracelular dos pneumócitos, é possível que o processo inflamatório tenha sido desencadeado por citocinas produzidas por macrófagos alveolares, o que levaria a migração e ativação de células no pulmão. Experimentos *in vitro* demonstraram que MCs são capazes de estimular macrófagos alveolares a produzir prostaglandinas F2 e PGE2, além de tromboxano B2 e ácido aracdônico (NASEEM *et al.*, 1989). O reconhecimento da MC-LR pelos macrófagos não está caracterizado. Uma hipótese é que a MC-LR seja um ligante de receptores da imunidade como os receptores Toll-like (TLR). Estes receptores são fundamentais no reconhecimento de diversas moléculas de microorganismos (AKIRA & TAKEDA, 2004). Outra possibilidade que não deve ser descartada é que mesmo os conjugados MC-SG poderiam ser capazes de estimular diretamente a resposta inflamatória pulmonar e em outros tecidos. De qualquer maneira, a piora na função pulmonar observada nos tempos iniciais, i.e., MC 2 h e MC 8 h, parece ser resultado de uma resposta local no pulmão.

Em suma, a cinética dos dados observados sugere um mecanismo de lesão inicial direto, seguido de um acometimento indireto resultante da ação da toxina no fígado, liberação de citocinas e mediadores inflamatórios (NAKANO *et al.*, 1991; ROCHA *et al.*, 2000; NOBRE *et al.*, 2001; SHI *et al.*, 2004) e recirculação da própria MC (SOARES *et al.*, 2006).

Confrontando este resultado com o achado anterior de Soares *et al.* (2007), no qual a mecânica pulmonar permaneceu alterada mesmo após 96 horas da injeção *i.p.*, pode-se dizer que as alterações funcionais pulmonares se resolvem mais precocemente na exposição *i.t.*, quando comparadas com a exposição *i.p.* à

mesma dose. Os possíveis mecanismos para esta resposta devem ser melhor investigados. Uma possibilidade é que a primeira passagem da toxina pelo pulmão reduz e/ou lentifica a chegada da toxina no fígado, o que poderia resultar em uma lesão indireta de menor intensidade.

Já foi visto que a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) também está envolvida na fisiopatologia das lesões hepáticas induzidas pela MC em diferentes espécies, como camundongos (GEHRINGER *et al.*, 2004), ratos (MORENO *et al.*, 2003) e peixes (PRIETO *et al.*, 2006), e no dano a neutrófilos e eritrócitos humanos (SICINSKA *et al.*, 2006; KUJBIDA *et al.*, 2006, 2009). Esse poderia ser um possível mecanismo de lesão pulmonar, através da produção de ERO pelas células de defesa ativadas, como neutrófilos, monócitos e macrófagos. Esse fenômeno explicaria o aumento do colapso alveolar nos camundongos injetados com MC-LR, já que pneumócitos tipo II danificados não produzem surfactante em quantidades adequadas.

O pulmão é uma estrutura vulnerável a uma grande variedade de agentes oxidantes, dado o seu contato com o meio externo. Para se proteger dos danos oxidativos, o epitélio respiratório é coberto por uma fina camada de fluido onde é encontrada grande quantidade de substâncias antioxidantes, incluindo o surfactante pulmonar, altas concentrações de GSH, ácido ascórbico, taurina, ácido úrico,  $\alpha$ -tocoferol, enzimas, dentre outras (HALLIWELL, 1991; VALLYATHAN, 2004). Ainda, os macrófagos alveolares e o pequeno número de neutrófilos e linfócitos pulmonares interagem com partículas e microorganismo inalados, produzindo ERO; porém também possuem defesa antioxidante para se protegerem do dano oxidativo. No intuito de verificar se há estresse oxidativo no pulmão em resposta à instilação *i.t.* de MC-LR, foi analisada a atividade das principais enzimas antioxidantes (SOD,

CAT e GPx), bem como o dano oxidativo, por meio da análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da carbonilação de proteínas.

O sistema SOD-CAT constitui a primeira linha de defesa contra as ERO (FORONJY *et al.*, 2006). A SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido a oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (Figura 5), sendo os níveis de  $O_2^-$  em repouso *in vivo* de aproximadamente zero (VALLYATHAN, 2004). O  $H_2O_2$ , por sua vez, pode ser depurado pela atividade da CAT e da GPx (Figura 5). Como SOD-CAT formam um sistema complementar de defesa antioxidante, em geral, estas enzimas respondem igualmente após exposição a um contaminante (PANDEY *et al.*, 2003). Neste trabalho foi observada uma redução pronunciada na atividade da CAT nos grupos MC 2 h e MC 8 h, recuperação no MC 24 h e nova diminuição em 48 h, comparado ao CT (Figura 26). Esses foram os mesmos tempos em que foi observada piora da mecânica pulmonar (Figuras 17 e 18). Até 24 h após a instilação com MC-LR, a atividade da SOD acompanhou a atividade da CAT, apresentando uma tendência à diminuição nos tempos iniciais (MC 2 h e MC 8 h), com recuperação em 24 h. No entanto, o grupo MC 48 h tendeu ao aumento da atividade da SOD, ao contrário da CAT (Figura 25). A queda na atividade da SOD observada em 96 h pode indicar que ocorreu falência da enzima, o que pode estar relacionada a manutenção do processo inflamatório (Figuras 23 e 24).

Muitos trabalhos mostram que há redução da atividade das enzimas antioxidantes no fígado e no rim de diversas espécies em situação de estresse oxidativo proporcionada pela MC-LR (MORENO *et al.*, 2005; SICINSKA *et al.*, 2006; JAYARAJ *et al.*, 2006; PRIETO *et al.*, 2006, WENG *et al.*, 2007; ATENCIO *et al.*, 2008), confirmando os nossos achados no pulmão. Os resultados obtidos com eritrócitos humanos também indicam redução na atividade de SOD e CAT quando



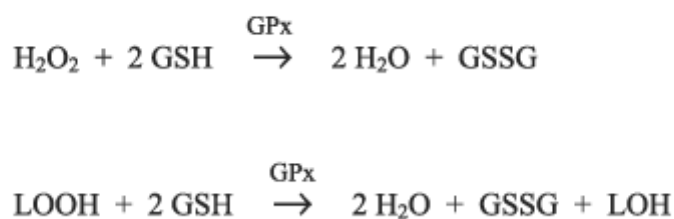
incubados, principalmente, com altas doses (1000 nM) de MC-LR (SICINSKA *et al.*, 2006). O mecanismo proposto pelos autores para a inativação da CAT seria a ligação covalente da MC-LR com os resíduos tiol da enzima, o que resultaria em acúmulo de  $H_2O_2$ . O  $H_2O_2$  em altas concentrações age como um potente inibidor da SOD. Além disso, a inatividade da SOD poderia estar relacionada a um dano direto na sua estrutura protéica pela MC-LR. Outros autores também relatam o aumento na produção do  $O_2^-$  em resposta à MC-LR e, como a reação de dismutação dessa ERO é catalisada pela SOD, sua atividade diminui como reflexo da degradação desta enzima (JOS *et al.*, 2005; CAZENAVE *et al.*, 2006). Desta maneira, a atividade de CAT também estaria diminuída pelo excesso do radical  $O_2^-$ . Ainda, é descrito que o aumento do radical  $O_2^-$  provoca dano adicional à SOD (ÖZTÜRK & GÜMÜSLÜ, 2004; SICINSKA *et al.*, 2006).

O aumento das ERO oferece o estímulo necessário para a síntese de mais enzimas para auxiliar na proteção do sistema. A recuperação da atividade tanto da SOD quanto da CAT em 24 h poderia ser, portanto, reflexo desse processo (Figuras 25 e 26). Os achados no grupo MC 48 h sugerem que o aumento na produção de SOD foi suficiente para manter a atividade desta enzima elevada. Por outro lado, a CAT continuaria sendo mais degradada do que sintetizada, resultando na redução de sua atividade. Vale lembrar que o  $H_2O_2$  é uma ERO mais estável que o  $O_2^-$  e, por isso, sua detoxificação não exigiria a mesma rapidez necessária para remover o  $O_2^-$ . Ademais, o  $H_2O_2$  também é substrato para outras enzimas, como a GPx (Figura 5), cuja atividade é reduzida significativamente no grupo MC 24 h, provavelmente como reflexo da sua degradação (Figura 27), a MPO, a peroxidase de eosinófilo (EPO) e a lactoperoxidase (LPO).

A MPO compõe o sistema “peróxido de hidrogênio-MPO-hialida”, que constitui o sistema mais eficiente e mais importante antimicrobiana presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos. Esta converte o  $H_2O_2$  em presença de uma hialida como o cloreto ( $Cl^-$ ) em ácido hipocloroso ( $HClO$ ), que é um poderoso oxidante. Nossos resultados mostram um aumento da atividade da MPO como reflexo do recrutamento e ativação de neutrófilos no tecido pulmonar (Figura 24). Não podemos descartar que outras hemeperoxidases, i.e. EPO e LPO, não avaliadas neste trabalho tenham contribuído para a atividade peroxidase no pulmão após a instilação com MC-LR. A LPO parece ser responsável pela maior parte da atividade peroxidase nas vias aéreas, havendo grande quantidade de RNAm para LPO nas vias aéreas de condução, com grande redução da expressão no parênquima pulmonar, onde é quase nula (GERSON *et al.*, 2000). Isto sugere que a LPO não contribui significativamente com a atividade peroxidase encontrada na periferia pulmonar (CONNER *et al.*, 2002). A atividade da EPO e MPO são diferenciados nos ensaios pelos valores de pH das soluções utilizadas, dado que cada enzima possui seu pH específico de ação. Trabalhos anteriores demonstraram que a reatividade cruzada de EPO/MPO foi menor que 1% (COLLINS *et al.*, 1995). Com isso, pode-se considerar que o ensaio utilizado neste trabalho reflete unicamente a atividade da MPO no tecido pulmonar.

A GPx catalisa a redução de  $H_2O_2$  e hidroperóxidos, a água e alcoóis respectivamente, através da glutathiona reduzida (GSH) para formar glutathiona oxidada (GSSG) (Figura 30). Normalmente, a GPx dos mamíferos tem maior afinidade pelo  $H_2O_2$  do que a CAT. No entanto, a conjugação de MC e GSH ocorrida no processo de detoxificação da MC-LR representaria uma queda no nível de GSH intracelular, com comprometimento da atividade da GPx e aumento no estresse

oxidativo. Isso ajudaria a explicar a diminuição drástica na atividade da CAT nos grupos MC 2 h e MC 8 h, por um aumento na degradação da enzima, e a atividade da GPx mantida no nível dos animais CT nos mesmo tempos (Figuras 26 e 27). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que, logo após exposição à MC-LR, ocorre um decréscimo rápido da GSH intracelular nos hepatócitos, seguido de um aumento gradual pela síntese de mais GSH, cujo tempo de recuperação irá depender da dose de toxina administrada (GEHRINGER *et al.*, 2004; ZEGURA *et al.*, 2006). Assim, pode-se inferir que a GPx aumenta o auxílio dado à CAT e MPO na depuração do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos grupos MC 24 h, MC 48 h e MC 96 h, havendo degradação da enzima e queda da atividade nestes tempos (Figura 27 e 30).



**Figura 30.** Reações catalisadas pela glutathiona peroxidase (GPx). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; GSH: glutathiona reduzida; GSSG: glutathiona oxidada; LOOH: hidroperóxido lipídico; LOH: produto de redução correspondente.

Na verdade, outro fator tem importância adicional na redução da atividade da GPx. Tanto o aumento, quanto a redução, na atividade de enzimas antioxidantes indica o aumento da produção de ERO e indução de estresse oxidativo (MORENO *et al.*, 2005; PRIETO *et al.*, 2006). Como resultado do desequilíbrio redox, pode ocorrer oxidação de proteínas e peroxidação lipídica. Nosso estudo mostrou aumento da peroxidação lipídica nos grupos MC 2 h, MC24 h, MC 48 h e MC 96 h (Figura 28) e carbonilação de proteínas no MC 2 h e MC 48 h (Figura 29). A peroxidação lipídica resulta da ação dos radicais livres sobre os lipídios insaturados

das membranas celulares, levando a transtornos da permeabilidade, perda da seletividade, alterações do DNA e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Durante a peroxidação lipídica, a reação do radical peroxila com o hidrogênio gera um hidroperóxido lipídico (LOOH). A GPx também utiliza LOOH como substrato, o que a sobrecarrega ainda mais, podendo, de fato, haver degradação da enzima maior que sua produção nos tempos indicados.

Moreno e colaboradores (2005) injetaram 100 e 150 µg/kg MC-LR *i.p.* em ratos e analisaram as enzimas antioxidantes, entre elas SOD e CAT, bem como a peroxidação lipídica no fígado e no rim dos animais. Aqueles autores observaram redução de todas as enzimas e aumento da peroxidação lipídica em ambos os órgãos, corroborando nossos achados no pulmão. A injeção *i.p.* de MC-LR também aumentou a peroxidação lipídica e gerou redução na atividade da SOD no homogenato pulmonar em oito horas da injeção (CARVALHO *et al.*, 2010).

A carbonilação de proteínas resulta da clivagem de ligação peptídica por ERO, reação de oxidação com a cadeia lateral da lisina, prolina, arginina e treonina, reação com produtos da peroxidação lipídica, como o MDA, ou reação com açúcares redutores ou seus produtos de oxidação (VALLYATHAN, 2004). Neste trabalho, foi observado aumento significativo da oxidação de proteínas apenas nos grupos MC 2 h e MC 48 h (Figura 29). Analisando esse resultado em conjunto com a atividade das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica, podemos inferir que MC 48 h foi o grupo em que foi observado maior desequilíbrio redox, seguido do MC 2 h, após instilação *i.t.* de MC-LR.

# CONCLUSÕES

## 7 CONCLUSÕES

### 7.1 RESUMO DOS RESULTADOS

Foi detectada a presença de MC-LR livre nos tecidos pulmonar e hepático durante as 96 horas estudadas, sendo evidente o acúmulo temporal da toxina no fígado. Esse acúmulo gerou alterações características de intoxicação por MC-LR na histologia hepática, observadas a partir de 8 horas, com indícios de regeneração tecidual em 96 horas, não sendo possível determinar se o fígado evolui para recuperação funcional ou para um processo cirrótico.

A administração de uma dose sub-letal de MC-LR via *i.t.* foi capaz de gerar alterações funcionais no pulmão em dois momentos distintos, inicialmente em 2 e 8 horas e mais tardiamente em 48 horas, caracterizadas pelo aumento das propriedades elásticas e viscoelásticas e/ou inomogêneas pulmonares.

Comparando com resultados anteriores (mesma dose *i.p.*), as alterações funcionais pulmonares se resolvem mais precocemente na exposição *i.t.*.

O processo inflamatório se instalou rapidamente após a instilação com MC-LR, evidenciado pelo influxo de células PMN no parênquima pulmonar e aumento da atividade da mieloperoxidase. A presença e a atividade de neutrófilos no tecido pulmonar foram observadas até o final das 96 horas estudadas.


O aumento do percentual de áreas colapsadas foi identificado logo após 2 horas da administração de MC-LR com retorno aos valores do controle ao final do tempo experimental, sendo o colapso alveolar observado em 24 h insuficiente para comprometer a função pulmonar.

Foi observado desequilíbrio na atividade das enzimas antioxidantes no pulmão, o que sugere falência dos mecanismos de defesa pulmonar contra espécies reativas de oxigênio, e subsequente dano oxidativo em lipídios e proteínas.

## 7.2 CONCLUSÕES

Podemos concluir que a administração *i.t.* de MC-LR levou a um comprometimento bifásico da mecânica pulmonar, caracterizado por um aumento precoce (2 h e 8 h) e outro tardio (48 h) de parâmetros da mecânica (Est,  $\Delta E$ ,  $\Delta P_2$ ,  $\Delta P_{tot}$ ). Também foram identificados colapso e inflamação pulmonares, desequilíbrio nos níveis de enzimas antioxidantes e presença de dano oxidativo celular. Ainda, comparando com resultados anteriores (mesma dose *i.p.*), as alterações funcionais pulmonares se resolvem mais precocemente na exposição *i.t.*

A cinética dos dados observados sugere um mecanismo inicial de lesão pulmonar direto, seguido de um indireto, provavelmente resultante da ação da toxina no fígado, liberação de agentes pró-inflamatórios e recirculação da própria MC livre ou conjugada, já que uma potencial ação da MC-LR conjugada não pode ser descartada.



**REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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 sub-chronic intoxication with the cyanotoxin microcystin-LR. **Toxicol** 51:457-467, 2008.

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

ATENCIO, L.; MORENO, I.; JOS, A.; PICHARDO, S.; MOYANO, R.; BLANCO, A.; CAMEAN, A.M. Dose-dependent antioxidant responses and pathological changes in tenca (*Tinca tinca*) after acute oral exposure to Microcystins under laboratory conditions. **Toxicol** 52: 1-12, 2008.

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

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

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

BAL, H.S.; GHOSHAL, N.G. Morphology of the terminal bronchiolar region of common laboratory mammals. **Laboratory Animals** 22:76-82, 1988.

BANNISTER, J.V.; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. **Methods of Biochemical Analysis** 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 inspiration flow. **J Appl Physiol** 58:1840-1848, 1985a.

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

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

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

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

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

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

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

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

BOSQUILLON, C. Drug transporters in the lung – do they play a role in the biopharmaceutics of inhaled drugs? **J Pharm Sci** 99(5):2240-2255, 2010.

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

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

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

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

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

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

CAMPOS, M.; FADDEN, P.; ALMS, G.; QIAN, Z.; HAYSTEAD T, A.J. Identification of protein phosphatase-1-binding proteins by microcystin- biotin affinity chromatography. **J Biol Chem** 271:278-284, 1996.

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

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

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

CARMICHAEL, W.W.; 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.

CARVALHO, G.M.; OLIVEIRA, V.R.; SOARES, R.M.; AZEVEDO, S.M.; LIMA, L.M.; BARREIRO, E.J.; VALENÇA, S.S.; SALDIVA, P.H.; FAFFE, D.S.; ZIN, W.A. Can LASSBio 596 and dexamethasone treat acute lung and liver inflammation induced by microcystin-LR? **Toxicol** 56(4):604-612, 2010.

CAZENAVE, J.; BISTONI, M.D.E.L.; ZWIRNMANN, E.; WUNDERLIN, D.A.; WIEGAND, C. Attenuating effects of natural organic matter on microcystin toxicity in zebra fish (*Danio rerio*) embryos -- benefits and costs of microcystin detoxication. **Environ Toxicol** 21(1):22-32, 2006.

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

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

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

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

COLLINS, P.D.; MARLEAU, S.; GRIFFITHS-JOHNSON, D.A.; JOSE, P.J.; WILLINS, T.J. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. **J Exp Med** 182:1169-1174, 1995.

CONNER, G.E.; SALATHE, M.; FORTEZA, R. Lactoperoxidase and hydrogen peroxide metabolism in the airway. **Am J Respir Crit Care Med** 166:s57-s61, 2002.

COOK, M.J. **The anatomy of the laboratory mouse**. Laboratory Animals Centre Carshalton, Surrey, England, 1965. Adaptado para web em 2005, disponível em <http://www.informatics.jax.org/cookbook/contents.shtml> , acesso em julho de 2010.

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

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

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

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

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

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

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

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 Enzymol** 186:421-431, 1990.

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

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

FAFFE, D.S.; SILVA, G.H.; KURTZ, P.M.; NEGRI, E.M.; CAPELOZZI, V.L.; ROCCO, P.R.; ZIN, W.A. Lung tissue mechanics and extracellular matrix composition in a murine model of silicosis. **J Appl Physiol** 90(4):1400-1406, 2001.

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

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

FALCONER, I.R.; SMITH, J.V.; JACKSON, A.R.B.; JONES, A.; RUNNEGAR M.T.C. Oral toxicity of a bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* administered to mice over periods up to 1 year. **J Toxicol Environ Health** 24:291-305, 1988.

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

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

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

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. Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. **Rev Port Cien Desp** 7(2):257-275, 2006.

FEURSTEIN, D.; HOLST, K.; FISCHER, A.; DIETRICH, D.R. Oatp-associated uptake and toxicity of microcystins in primary murine whole brain cells. **Toxicology an Applied Pharmacology** 234:247-255, 2009.

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.

FISCHER, W.J.; ALTHEIMER, S.; CATTORI, V.; MEIER, P.J.; DIETRICH, D.R.; HAGENBUCH, B. Organic Anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. **Toxicology an Applied Pharmacology** 203:257-263, 2005.

FLOHE, L.; GUNZLER, W.A. Assay of glutathione peroxidase. **Meth Enzymol** 105: 114-120, 1984.

FORONJY, R.F.; MIROCHNITCHENKO, O.; PROPOKENKO, O.; LEMAITRE, V.; JIA, Y.; INOUE, M.; OKADA, Y.; D'ARMIENTO, J.M. Superoxide dismutase expression attenuates cigarette smoke- or elastase-generated emphysema in mice. **Am J Respir Crit Care Med** 173(6):623-31, 2006.

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

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

FUNARI, E.; TESTAI, E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. **Critical Reviews in Toxicology** 38:97-125, 2008.

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

GERSON, C.; SABATER, J.; SCURI, M; TORBATI, A.; COFFEY, R.; ABRAHAM, J.W.; LAUREDO, I.; FORTEZA, R.;WANNER, A.; SALATHE, M.; ABRAHAM, W.; CONNER, G.E. The lactoperoxidase system functions in bacterial clearance of airways. **Am J Respir Cell Mol Biol** 22:665-671, 2000.

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

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

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

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

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

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

HARADA, K.; MURATA, H.; QIANG, Z.; SUZUKI M.; KONDO, F. Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria. **Toxicon** 34(6):701-710, 1996.

HEDENSTIERNA, G. Gas exchange during anaesthesia. **Br J Anaesth** 64(4):507-514, 1990.



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

JANG, M.H.; HA, K.; TAKAMURA, N. Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* exposed to different stages of herbivorous zooplankton. **Toxicon** 51(5):882-889, 2008.

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. **Toxicology** 220:136-146, 2006.

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

JOS, A.; PICHARDO, S.; PRIETO, A.I.; REPETTO, G.; VÁZQUEZ, C.M.; MORENO, I.; CAMEÁN, A.M. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) under laboratory conditions. **Aquat Toxicol** 72(3):261-271, 2005.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Guanabara Koogan, 2004.

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

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

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

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

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

KUJBIDA, P.; HATANAKA, E.; CAMPA, A.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Effects of microcystin on human polymorphonuclear leukocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 341:273-277, 2006.

KUJBIDA, P.; HATANAKA, E.; VINOLO, M.A.; WAISMAM, K.; CAVALCANTI, D.M.; CURTI, R.; FARSKY, S.H.; PINTO, E. Microcystins -LA, -YR, and -LR action on neutrophil migration. **Biochem Biophys Res Commun** 382(1):9-14, 2009.

LACHER, S.E.; JOHNSON, C.; JESSOP, F.; HOLIAN, A.; MIGLIACCIO, C.T. Murine pulmonary inflammation model: a comparative study of anesthesia and instillation methods. **Inhal Toxicol** 22(1):77-83, 2010.

LEAL, A.C.; SOARES, M.C.P. **Hepatotoxicidade da cianotoxina microcistina**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 37 (suplemento II), 84p, 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.

LEVINE, R.L.; GARLAND, D.; OLIVER, C.N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.G.; AHN, B.W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol** 186:464-478, 1990.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Ver Bras Cienc Farmac** 37(3):293-303, 2001.

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

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

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

LU, H.; CHOUDHURI, S.; OGURA, K.; CSANAKY, I.L.; LEI, X.; CHENG, X.; SONG, P.; KLAASSEN, C.D. Characterization of organic anion transporting polypeptide 1b2-null mice: essential role in hepatic uptake/toxicity of phalloidin and microcystin-LR. **Toxicol Sci** 103:35-45, 2008.

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

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

MAGALHÃES, C.B.; RIVA, D.R.; DEPAULA, L.J.; BRANDO-LIMA, A.C.; KOATZ, V.L.; LEAL-CARDOSO, J.H.; ZIN, W.A.; FAFPE, D.S. In vivo anti-inflammatory action of eugenol on lipopolysaccharide-induced lung injury. **J Appl Physiol** [Epub ahead of print], 2010.

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

MCLENNAN, G.; DEYOUNG, N. The pulmonary alveolar macrophage. **Aust N Z J Med** 14:721-730, 1984.

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

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

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

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

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

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

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. **Toxicol** 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.

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

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

NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R.; OHTA, T.; NISHIWAKI, S.; SUGUNUMA, M.; KOHYAMA, K.; ISHIKAWA, T.; CARMICHAEL, W.W. & FUJIKI, H. Liver tumor

promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. **J Cancer Res Clin Oncol** 118:420-424, 1992.

NOBRE, A.C.L.; COELHO, G.R.; COUTINHO, M.C.M.; SILVA, M.M.M.; ANGELIM, E.V.; MENEZES, D.B.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S.A. The role of phospholipase A<sub>2</sub> and cyclooxygenase in renal toxicity induced by microcystin-LR. **Toxicol** 39:721-724, 2001.

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

ÖZTÜRK, O.; GÜMÜŞLÜ, S. Age-related changes of antioxidant enzyme activities, glutathione status and lipid peroxidation in rat erythrocytes after heat stress. **Life Sci** 75(13):1551-1565, 2004.

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

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.

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

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

POWERS, S.R.; 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.*). **Aquatic Toxicology** 77:314-321, 2006.

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

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

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

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

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

ROCHA, M.F.G.; SIDRIM, J.J.C.; SOARES, A.M.; JIMENEZ, G.C.; GUERRANT, R.L.; RIBEIRO, R.A.; LIMA, A.A.M. Supernatants from macrophages stimulated with microcystin-LR induce electrogenic intestinal response in rabbit ileum. **Pharmacology & Toxicology** 87:46-51, 2000.

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

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

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

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

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

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

SAINIS, I.; FOKAS, D.; VARELI, K.; TZAKOS A.G.; KOUNNIS V.; BRIASOULIS E. Cyanobacterial cyclopeptides as lead compounds to novel targeted cancer drugs. **Mar Drugs** 8:629-657, 2010.

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

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

SCHATZ, D.; KEREN, Y.; VARDI, A.; SUKENIK, A.; CARMELI, S.; BÖRNER, T.; DITTMANN, E.; KAPLAN, A. Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. **Environ Microbiol** 9(4):965-70, 2007.

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.

SHAPIRO, SD. Animal models do COPD. **Chest** 117:223S-227S, 2000.

SHI, Q.; CUI, J.; ZHANG, J.; KONG, F.X.; HUA, Z.C., SHEN, P.P. Expression modulation of multiple cytokines in vivo by cyanobacteria blooms from taihu lake, China. **Toxicol** 44:871-879, 2004.



SICINSKA, P.; BUKOWSKA, B.; MICHALOWICZ, J.; DUDA, W. Damage of cell membrane and antioxidant system in human erythrocytes incubated with microcystin-LR in vitro. **Toxicol** 47(4):387-397, 2006.

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.

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

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

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

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

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

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

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. **Toxicol** 50:330-338, 2007.

STANIER, R.Y.; KUNISAWA, R.; MANDEL, M.; COHEN-BAZIRE, G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). **Bacteriol Rev** 35(2):171-205, 1971.

STEVENS, A.; LOWE, J.S. **Histologia**. São Paulo: Manole, 1995.

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

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

SUZUKI, K.; OTA, H.; SASAGAWA, S.; SAKATANI, T.; FUJIKURA, T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. **Analytical Biochemistry** 132:345-352, 1983.

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

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

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

VALLYATHAN, V. Oxidative stress/antioxidant status in health and disease. **Lung Biol. Health Dis** 187:35-58, 2004.

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.

VOLTERRA, L. Sanitary implications associated with the use of eutrophic freshwater. **Ann Ist Super Sanita** 29(2):327-333, 1993.

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

WANG, Q.; XIE, P.; CHEN, J.; LIANG, G. Distribution of microcystin in various organs (heart, liver, intestine, gonad, brain, kidney and lung) of wistar rat via intravenous injection. **Toxicol** 52:721-727, 2008.

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

WEI, Y.; WENG, D.; LI, F.; ZOU, X.; YOUNG, D.O.; JI, J.; SHEN, P. Involvement of JNK regulation in oxidative stress-mediated murine liver injury by microcystin-LR. **Apoptosis** 13:1031-1042, 2008.

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. **Toxicology** 232:15-23, 2007.

WEST, J.B. **Fisiologia respiratória**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2002.

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

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

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

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

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

ZEGURA, B.; LAH, T.T.; FILIPIC, M. Alteration of intracellular GSH levels and its role in microcystin-LR-induced DNA damage in human hepatoma HepG2 cells. **Mutat Res** 611(1-2):25-33, 2006.

# ANEXOS

Tabela 1 - Dados de Mecânica Pulmonar

CT

	FLOW (mL/s)	VOLUME (ML)	Est (cmH <sub>2</sub> O/mL)	Edyn (cmH <sub>2</sub> O/mL)	ΔP1 (cmH <sub>2</sub> O)	ΔP2 (cmH <sub>2</sub> O)	ΔPtot (cmH <sub>2</sub> O)	ΔE (cmH <sub>2</sub> O/mL)	Ti
	0,99	0,20	26,62	31,89	0,47	1,07	1,54	5,27	0,20
	1,00	0,19	31,00	39,06	0,69	1,53	2,22	8,06	0,19
	1,00	0,22	28,74	33,55	0,66	1,07	1,73	4,81	0,22
	1,00	0,20	24,40	30,60	0,55	1,26	1,82	6,20	0,20
	1,00	0,20	28,26	31,59	0,92	0,67	1,60	3,33	0,20
	1,01	0,20	28,79	33,40	0,75	0,91	1,66	4,62	0,20
	1,01	0,21	25,24	29,58	0,71	0,89	1,61	4,33	0,20
	0,99	0,20	26,15	32,33	0,52	1,21	1,73	6,18	0,20
	1,00	0,20	33,68	39,24	0,79	1,09	1,88	5,57	0,20
	1,00	0,20	29,07	34,52	0,47	1,09	1,55	5,45	0,20
	1,00	0,20	25,15	29,84	0,32	0,94	1,26	4,69	0,20
	1,01	0,20	18,04	21,74	0,63	0,74	1,38	3,70	0,20
	1,00	0,20	25,83	31,54	0,74	1,13	1,87	5,71	0,20
<b>MÉDIA</b>	1,00	0,20	27,00	32,22	0,63	1,05	1,68	5,22	0,20
<b>DP</b>	0,006	0,007	3,599	4,211	0,155	0,216	0,233	1,171	0,007
<b>EP</b>	0,002	0,002	0,998	1,168	0,043	0,060	0,065	0,325	0,002
<b>n</b>	13	13	13	13	13	13	13	13	13
<b>DP/MÉDIA</b>	0,59%	3,55%	13,33%	13,07%	24,55%	20,63%	13,84%	22,42%	3,51%

## MC 2 h

	FLOW (mL/s)	VOLUME (ML)	Est (cmH <sub>2</sub> O/mL)	Edyn (cmH <sub>2</sub> O/mL)	ΔP1 (cmH <sub>2</sub> O)	ΔP2 (cmH <sub>2</sub> O)	ΔPtot (cmH <sub>2</sub> O)	ΔE (cmH <sub>2</sub> O/mL)	Ti
	0,93	0,17	35,40	43,88	0,38	1,49	1,86	8,48	0,19
	1,00	0,19	47,55	58,43	0,60	2,09	2,69	10,88	0,19
	1,01	0,18	69,46	84,60	0,76	2,72	3,49	15,14	0,18
	1,00	0,18	86,10	100,10	0,69	2,49	3,18	13,99	0,18
	1,00	0,21	27,10	31,64	0,45	0,94	1,38	4,54	0,21
	1,00	0,20	19,61	23,14	0,40	0,72	1,12	3,54	0,20
	0,98	0,19	23,13	27,96	0,33	0,93	1,26	4,84	0,20
	1,01	0,20	76,86	86,77	0,98	1,95	2,92	9,92	0,20
	1,00	0,20	59,62	67,77	0,76	1,59	2,36	8,14	0,20
	0,97	0,18	62,50	72,93	0,91	1,85	2,76	10,44	0,18
	1,01	0,19	21,35	29,97	1,20	1,66	2,86	8,62	0,19
	1,00	0,20	38,71	46,25	0,85	1,49	2,33	7,55	0,20
	1,00	0,19	61,25	73,83	1,11	2,44	3,56	12,58	0,19
	1,00	0,20	50,36	59,27	1,03	1,80	2,83	8,91	0,20
	1,00	0,22	34,11	40,90	0,82	1,48	2,30	6,79	0,22
	0,99	0,21	27,25	31,91	0,68	0,96	1,64	4,66	0,21
<b>MÉDIA</b>	0,99	0,19	46,27	54,96	0,75	1,66	2,41	8,69	0,20
<b>DP</b>	0,020	0,012	20,409	23,236	0,258	0,573	0,744	3,301	0,010
<b>EP</b>	0,005	0,003	5,102	5,809	0,065	0,143	0,186	0,825	0,003
<b>n</b>	16	16	16	16	16	16	16	16	16
<b>DP/MÉDIA</b>	2,00%	6,10%	44,11%	42,28%	34,62%	34,51%	30,90%	38,00%	5,35%

**MC 8 h**

	<b>FLOW</b> (mL/s)	<b>VOLUME</b> (ML)	<b>Est</b> (cmH <sub>2</sub> O/mL)	<b>Edyn</b> (cmH <sub>2</sub> O/mL)	<b>ΔP1</b> (cmH <sub>2</sub> O)	<b>ΔP2</b> (cmH <sub>2</sub> O)	<b>ΔPtot</b> (cmH <sub>2</sub> O)	<b>ΔE</b> (cmH <sub>2</sub> O/mL)	<b>Ti</b>
	1,00	0,20	30,06	36,65	0,43	1,35	1,78	6,59	0,20
	1,00	0,20	43,85	53,87	0,60	2,01	2,61	10,01	0,20
	1,00	0,21	28,93	35,58	0,58	1,37	1,96	6,65	0,21
	1,00	0,19	31,01	38,73	0,62	1,49	2,12	7,73	0,19
	1,00	0,20	32,09	39,58	0,01	1,48	1,49	7,48	0,20
	1,00	0,20	34,37	42,37	0,98	1,56	2,54	7,99	0,20
	1,00	0,21	36,84	43,54	1,00	1,39	2,38	6,69	0,21
	1,00	0,19	41,17	49,85	0,68	1,68	2,36	8,68	0,19
	1,01	0,19	79,67	97,73	1,01	3,37	4,39	18,06	0,19
	1,00	0,20	41,26	50,62	0,50	1,83	2,32	9,36	0,20
	1,00	0,20	61,42	73,40	1,04	2,35	3,39	11,98	0,20
	1,01	0,20	43,07	52,96	1,01	1,99	3,00	9,89	0,20
	1,00	0,20	29,90	35,04	0,68	1,05	1,73	5,14	0,20
<b>MÉDIA</b>	1,00	0,20	41,05	49,99	0,70	1,76	2,47	8,94	0,20
<b>DP</b>	0,003	0,006	14,016	17,087	0,290	0,570	0,745	3,156	0,006
<b>EP</b>	0,001	0,002	3,887	4,739	0,081	0,158	0,207	0,875	0,002
<b>n</b>	13	13	13	13	13	13	13	13	13
<b>DP/MÉDIA</b>	0,31%	2,94%	34,14%	34,18%	41,30%	32,33%	30,22%	35,28%	2,92%



## MC 24 h

	<b>FLOW</b> (mL/s)	<b>VOLUME</b> (ML)	<b>Est</b> (cmH <sub>2</sub> O/mL)	<b>Edyn</b> (cmH <sub>2</sub> O/mL)	<b>ΔP1</b> (cmH <sub>2</sub> O)	<b>ΔP2</b> (cmH <sub>2</sub> O)	<b>ΔPtot</b> (cmH <sub>2</sub> O)	<b>ΔE</b> (cmH <sub>2</sub> O/mL)	<b>Ti</b>
	1,00	0,20	28,74	35,52	0,34	1,37	1,71	6,78	0,20
	1,00	0,20	23,40	28,88	0,30	1,09	1,39	5,48	0,20
	1,00	0,20	24,36	30,53	0,41	1,24	1,65	6,17	0,20
	1,00	0,20	26,18	33,29	0,31	1,40	1,71	7,11	0,20
	1,00	0,20	23,98	25,29	0,47	0,26	0,73	1,31	0,20
	1,00	0,21	32,85	39,18	0,44	1,35	1,79	6,34	0,21
	0,99	0,20	24,98	31,08	0,29	1,24	1,53	6,10	0,21
	1,00	0,21	24,97	29,28	0,27	0,88	1,15	4,31	0,21
	1,00	0,19	59,94	69,26	1,23	1,77	3,00	9,32	0,19
	0,97	0,20	26,55	30,99	0,47	0,90	1,37	4,44	0,21
	1,00	0,20	48,25	60,68	0,99	2,48	3,47	12,43	0,20
	1,01	0,21	31,80	37,62	0,87	1,23	2,10	5,83	0,21
	1,00	0,20	32,79	38,60	0,77	1,17	1,95	5,82	0,20
	1,00	0,20	41,85	49,58	0,87	1,58	2,46	7,73	0,20
	1,00	0,20	53,21	63,11	1,03	2,02	3,06	9,89	0,20
	1,23	0,21	54,58	66,66	0,95	2,52	3,47	12,07	0,18
	1,00	0,20	20,37	23,36	0,91	0,59	1,50	2,98	0,20
	1,00	0,22	29,96	33,09	1,09	0,67	1,76	3,14	0,22
	1,00	0,20	26,88	30,07	0,98	0,64	1,63	3,19	0,20
	1,00	0,20	41,41	46,71	1,21	1,06	2,27	5,30	0,20
	1,00	0,19	29,23	34,91	0,81	1,07	1,88	5,68	0,19
	1,01	0,20	29,08	34,34	0,80	1,03	1,83	5,26	0,20
	1,00	0,20	36,19	42,80	0,88	1,30	2,18	6,60	0,20
	1,00	0,20	27,24	32,43	0,76	1,04	1,80	5,19	0,20
<b>MÉDIA</b>	1,01	0,20	33,28	39,47	0,73	1,25	1,98	6,19	0,20
<b>DP</b>	0,047	0,006	10,692	12,884	0,305	0,529	0,675	2,611	0,007
<b>EP</b>	0,010	0,001	2,183	2,630	0,062	0,108	0,138	0,533	0,001
<b>n</b>	24	24	24	24	24	24	24	24	24
<b>DP/MÉDIA</b>	4,67%	3,09%	32,13%	32,64%	41,89%	42,39%	34,17%	42,21%	3,63%

## MC 48 h

	<b>FLOW</b> (mL/s)	<b>VOLUME</b> (ML)	<b>Est</b> (cmH <sub>2</sub> O/mL)	<b>Edyn</b> (cmH <sub>2</sub> O/mL)	<b>ΔP1</b> (cmH <sub>2</sub> O)	<b>ΔP2</b> (cmH <sub>2</sub> O)	<b>ΔPtot</b> (cmH <sub>2</sub> O)	<b>ΔE</b> (cmH <sub>2</sub> O/mL)	<b>Ti</b>
	1,00	0,20	36,33	44,68	0,41	1,66	2,07	8,35	0,20
	1,00	0,20	32,17	39,30	0,45	1,45	1,90	7,13	0,20
	1,00	0,20	27,37	33,90	0,48	1,28	1,76	6,53	0,20
	1,00	0,20	41,12	48,99	0,79	1,59	2,38	7,87	0,20
	1,00	0,20	34,97	42,99	0,82	1,58	2,39	8,03	0,20
	1,00	0,19	44,36	53,45	0,61	1,75	2,37	9,10	0,19
	1,00	0,19	53,13	64,15	0,76	2,06	2,82	11,02	0,19
	1,00	0,20	67,08	82,69	1,04	3,06	4,10	15,61	0,20
	1,01	0,20	46,04	53,31	0,97	1,44	2,41	7,27	0,20
	1,01	0,19	75,21	90,66	1,55	2,88	4,44	15,45	0,19
	1,01	0,19	30,71	36,44	0,81	1,11	1,92	5,72	0,19
	1,03	0,21	30,52	35,53	0,98	1,04	2,02	5,00	0,20
	1,01	0,20	31,99	37,44	0,83	1,10	1,93	5,46	0,20
	1,02	0,21	58,63	67,80	1,32	1,90	3,22	9,17	0,20
	1,05	0,21	25,00	29,06	0,70	0,87	1,56	4,06	0,20
	1,00	0,20	36,33	44,68	0,41	1,66	2,07	8,35	0,20
<b>MÉDIA</b>	1,01	0,20	42,31	50,69	0,83	1,65	2,49	8,38	0,20
<b>DP</b>	0,015	0,007	14,594	17,694	0,301	0,609	0,810	3,292	0,005
<b>EP</b>	0,004	0,002	3,768	4,569	0,078	0,157	0,209	0,850	0,001
<b>n</b>	15	15	15	15	15	15	15	15	15
<b>DP/MÉDIA</b>	1,47%	3,59%	34,49%	34,91%	36,08%	36,88%	32,57%	39,26%	2,76%

## MC 96 h

	FLOW (mL/s)	VOLUME (ML)	Est (cmH <sub>2</sub> O/mL)	Edyn (cmH <sub>2</sub> O/mL)	ΔP1 (cmH <sub>2</sub> O)	ΔP2 (cmH <sub>2</sub> O)	ΔPtot (cmH <sub>2</sub> O)	ΔE (cmH <sub>2</sub> O/mL)	Ti
	1,00	0,20	42,76	52,64	0,23	1,95	2,18	9,88	0,20
	1,00	0,21	32,15	39,37	0,40	1,50	1,89	7,22	0,21
	1,00	0,20	34,62	41,50	0,68	1,36	2,03	6,88	0,20
	1,00	0,20	34,26	42,21	0,39	1,56	1,96	7,95	0,20
	1,00	0,20	36,54	43,38	0,46	1,37	1,82	6,84	0,20
	1,00	0,19	31,42	37,31	0,43	1,14	1,56	5,89	0,19
	1,00	0,20	44,79	53,01	0,66	1,62	2,28	8,22	0,20
	1,00	0,19	19,18	26,42	0,45	1,39	1,84	7,24	0,19
	1,00	0,21	35,76	42,58	0,60	1,41	2,01	6,82	0,21
	1,00	0,20	35,55	41,52	0,71	1,20	1,91	5,97	0,20
	1,00	0,20	19,82	24,57	0,23	0,92	1,15	4,75	0,20
	0,99	0,19	40,71	47,38	0,96	1,28	2,24	6,67	0,19
	1,02	0,21	30,93	36,86	0,85	1,21	2,07	5,92	0,20
	1,03	0,20	45,70	54,63	1,12	1,76	2,88	8,93	0,19
	0,98	0,19	44,46	51,63	1,12	1,35	2,47	7,17	0,19
	1,04	0,21	21,02	25,02	0,78	0,82	1,60	4,00	0,20
	0,99	0,19	23,62	28,17	0,91	0,87	1,78	4,56	0,19
<b>MÉDIA</b>	1,00	0,20	33,72	40,48	0,65	1,33	1,98	6,76	0,20
<b>DP</b>	0,013	0,006	8,444	9,581	0,274	0,293	0,372	1,479	0,005
<b>EP</b>	0,003	0,001	2,048	2,324	0,067	0,071	0,090	0,359	0,001
<b>n</b>	17	17	17	17	17	17	17	17	17
<b>DP/MÉDIA</b>	1,33%	2,99%	25,04%	23,67%	42,47%	21,92%	18,80%	21,89%	2,45%

Tabela 2 - Dados de Celularidade

<b>CT</b>				
	<b>Tecido (área <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>PMN <math>\times 10^{-3}/\mu\text{m}^2</math></b>	<b>MN <math>\times 10^{-3}/\mu\text{m}^2</math></b>	<b>Total <math>\times 10^{-3}/\mu\text{m}^2</math></b>
	4240	0,99	2,24	3,24
	4513	1,23	2,31	3,54
	7438	0,79	2,69	3,48
	3988	1,37	1,91	3,28
	4160	1,19	1,83	3,02
	4240	1,75	0,75	2,50
<b>MÉDIA</b>	4763	1,22	1,96	3,18
<b>DP</b>	1206	0,301	0,608	0,346
<b>EP</b>	492	0,123	0,248	0,141
<b>n</b>	6	6	6	6
<b>DP/MÉDIA</b>	25,32%	24,67%	31,12%	10,90%
<b>MC 2 h</b>				
	<b>Tecido (área <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>PMN <math>\times 10^{-3}/\mu\text{m}^2</math></b>	<b>MN <math>\times 10^{-3}/\mu\text{m}^2</math></b>	<b>Total <math>\times 10^{-3}/\mu\text{m}^2</math></b>
	6580	3,75	1,66	5,42
	5200	4,24	1,35	5,59
	6520	3,33	1,77	5,09
	6850	3,17	1,56	4,74
	7088	2,86	1,26	4,12
	7150	2,82	1,17	4,00
	7325	2,49	1,23	3,72
<b>MÉDIA</b>	6673	3,24	1,43	4,67
<b>DP</b>	661	0,556	0,216	0,681
<b>EP</b>	250	0,210	0,082	0,257
<b>n</b>	7	7	7	7
<b>DP/MÉDIA</b>	9,90%	17,17%	15,10%	14,58%

**MC 8 h**

	<b>Tecido (área <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>PMN <math>\times 10^{-3}/\mu\text{m}^2</math></b>	<b>MN <math>\times 10^{-3}/\mu\text{m}^2</math></b>	<b>Total <math>\times 10^{-3}/\mu\text{m}^2</math></b>
	6975	4,49	1,77	6,26
	6400	5,31	1,88	7,19
	7275	5,53	2,39	7,93
	7250	2,54	1,27	3,81
	7400	2,47	1,09	3,56
	7350	2,56	1,10	3,66
<b>MÉDIA</b>	7108	3,82	1,58	5,40
<b>DP</b>	344	1,330	0,475	1,790
<b>EP</b>	141	0,544	0,194	0,731
<b>n</b>	6	6	6	6
<b>DP/MÉDIA</b>	4,84%	34,87%	30,01%	33,16%

**MC 24 h**

	<b>Tecido (área <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>PMN <math>\times 10^{-3}/\mu\text{m}^2</math></b>	<b>MN <math>\times 10^{-3}/\mu\text{m}^2</math></b>	<b>Total <math>\times 10^{-3}/\mu\text{m}^2</math></b>
	6875	4,55	1,80	6,35
	5580	4,31	1,63	5,94
	7650	2,14	0,98	3,12
	7013	3,00	1,27	4,27
	7350	2,59	1,08	3,67
	7375	2,55	1,02	3,57
	7375	2,48	1,11	3,59
<b>MÉDIA</b>	7031	3,09	1,27	4,36
<b>DP</b>	638	0,881	0,299	1,180
<b>EP</b>	241	0,333	0,113	0,445
<b>n</b>	7	7	7	7
<b>DP/MÉDIA</b>	9,08%	28,56%	23,50%	27,03%

**MC 48 h**

	<b>Tecido (área <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>PMN x10-3/<math>\mu\text{m}^2</math></b>	<b>MN x10-3/<math>\mu\text{m}^2</math></b>	<b>Total x10-3/<math>\mu\text{m}^2</math></b>
	7212	4,12	2,04	6,16
	5700	3,11	2,21	5,31
	5340	2,96	2,24	5,19
	7387	2,67	0,93	3,60
	7212	2,98	0,91	3,89
	7150	2,85	1,18	4,03
	6987	3,04	1,36	4,40
<b>MÉDIA</b>	6713	3,10	1,55	4,66
<b>DP</b>	768	0,434	0,550	0,858
<b>EP</b>	290	0,164	0,208	0,324
<b>n</b>	7	7	7	7
<b>DP/MÉDIA</b>	11,44%	14,00%	35,45%	18,42%

**MC 96 h**

	<b>Tecido (área <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>PMN x10-3/<math>\mu\text{m}^2</math></b>	<b>MN x10-3/<math>\mu\text{m}^2</math></b>	<b>Total x10-3/<math>\mu\text{m}^2</math></b>
	7813	2,90	3,09	5,98
	5713	0,92	3,94	4,86
	7013	2,93	1,35	4,28
	7188	2,69	1,10	3,79
	7038	3,13	1,15	4,27
	7175	2,81	1,14	3,95
	7438	2,53	0,95	3,48
<b>MÉDIA</b>	6713	2,56	1,82	4,37
<b>DP</b>	768	0,692	1,100	0,770
<b>EP</b>	290	0,262	0,417	0,291
<b>n</b>	7	7	7	7
<b>DP/MÉDIA</b>	11,44%	27,07%	60,74%	17,62%

Tabela 3 - Dados de Morfometria

<b>CT</b>			
	<b>%NORMAL</b>	<b>%COLAPSO</b>	<b>%HIPERINSUFLAÇÃO</b>
	94,3	5,7	0,0
	93,7	6,4	0,0
	88,0	12,0	0,0
	85,9	14,1	0,0
	92,9	7,1	0,0
	94,6	5,4	0,0
	89,9	10,1	0,0
<b>MÉDIA</b>	91,3	8,7	0,0
<b>DP</b>	3,16	3,16	0,00
<b>EP</b>	1,19	1,19	0,00
<b>n</b>	7	7	7
<b>DP/MÉDIA</b>	3,46%	36,36%	0

<b>MC 2 h</b>			
	<b>%NORMAL</b>	<b>%COLAPSO</b>	<b>%HIPERINSUFLAÇÃO</b>
	66,9	33,1	0,0
	62,4	34,2	3,4
	66,1	32,9	1,0
	77,2	21,3	1,4
	51,0	38,6	10,4
<b>MÉDIA</b>	64,7	32,0	3,3
<b>DP</b>	8,44	5,74	3,73
<b>EP</b>	3,78	2,57	1,67
<b>n</b>	5	5	5
<b>DP/MÉDIA</b>	13,04%	17,93%	114,66%

<b>MC 8 h</b>			
	<b>%NORMAL</b>	<b>%COLAPSO</b>	<b>%HIPERINSUFLAÇÃO</b>
	68,7	31,3	0,0
	79,9	20,1	0,0
	86,8	13,2	0,0
	70,2	22,7	7,1
	74,2	25,8	0,0
	77,7	22,3	0,0
	68,7	31,3	0,0
	67,1	32,8	0,0
<b>MÉDIA</b>	74,2	24,9	0,9
<b>DP</b>	6,43	6,31	2,33
<b>EP</b>	2,27	2,23	0,83
<b>n</b>	8	8	8
<b>DP/MÉDIA</b>	8,67%	25,31%	264,58%

**MC 24 h**

	<b>%NORMAL</b>	<b>%COLAPSO</b>	<b>%HIPERINSUFLAÇÃO</b>
	78,4	21,7	0,0
	74,1	25,9	0,0
	82,3	17,7	0,0
	76,6	23,4	0,0
	81,1	18,9	0,0
	73,5	26,5	0,0
	75,6	23,2	1,3
	81,6	18,4	0,0
	73,0	22,6	4,4
<b>MÉDIA</b>	77,3	22,0	0,6
<b>DP</b>	3,43	2,99	1,39
<b>EP</b>	1,14	1,00	0,46
<b>n</b>	9	9	9
<b>DP/MÉDIA</b>	4,43%	13,57%	220,22%

**MC 48 h**

	<b>%NORMAL</b>	<b>%COLAPSO</b>	<b>%HIPERINSUFLAÇÃO</b>
	73,6	26,4	0,0
	60,7	34,1	5,2
	46,6	44,7	8,7
	66,0	31,5	2,5
	52,0	39,5	8,5
	77,8	22,2	0,0
	85,4	14,6	0,0
<b>MÉDIA</b>	66,0	30,4	3,6
<b>DP</b>	12,92	9,50	3,63
<b>EP</b>	4,88	3,59	1,37
<b>n</b>	7	7	7
<b>DP/MÉDIA</b>	19,57%	31,22%	102,30%

**MC 96 h**

	<b>%NORMAL</b>	<b>%COLAPSO</b>	<b>%HIPERINSUFLAÇÃO</b>
	83,3	16,7	0,0
	87,6	12,4	0,0
	94,6	5,4	0,0
	96,3	3,8	0,0
	84,7	15,4	0,0
	76,4	23,6	0,0
<b>MÉDIA</b>	87,1	12,9	0,0
<b>DP</b>	6,78	6,78	0,00
<b>EP</b>	2,77	2,77	0,00
<b>n</b>	6	6	6
<b>DP/MÉDIA</b>	7,78%	52,71%	0



Tabela 4 – Concentração de MC-LR no Pulmão

	CT ng MC/g tecido	MC 2 h ng MC/g tecido	MC 8h ng MC/g tecido	MC 24 h ng MC/g tecido	MC 48 h ng MC/g tecido	MC 96 h ng MC/g tecido
	0,391	0,671	0,794	0,488	1,178	0,473
	0,335	0,822	0,417	0,812	1,215	0,783
		1,087	0,492	0,440	0,656	1,167
		1,127		0,628	0,808	1,387
		1,316		0,501		1,073
<b>MÉDIA</b>	0,363	1,005	0,568	0,574	0,964	0,977
<b>DP</b>	0,0280	0,2295	0,1629	0,1343	0,2387	0,3178
<b>EP</b>	0,0198	0,1026	0,0941	0,0601	0,1194	0,1421
<b>n</b>	2	5	3	5	4	5
<b>DP/MÉDIA</b>	7,71%	22,85%	28,70%	23,41%	24,76%	32,54%

Note em vermelho o valor do falso positivo descontado de todas as amostras.

Tabela 5 – Concentração de MC-LR no Fígado

	CT ng MC/g tecido	MC 2 h ng MC/g tecido	MC 8h ng MC/g tecido	MC 24 h ng MC/g tecido	MC 48 h ng MC/g tecido	MC 96 h ng MC/g tecido
	6,324	6,923	9,878	14,288	17,273	12,334
	6,633	9,757	9,072	16,211	13,963	12,499
		9,010	9,610	12,337	12,499	19,042
		11,472	9,743	13,268	13,657	13,417
		8,839	11,646	13,015		18,957
				13,069		19,642
<b>MÉDIA</b>	6,478	9,200	9,990	13,698	14,348	15,982
<b>DP</b>	0,1546	1,4711	0,8720	1,2624	1,7748	3,2566
<b>EP</b>	0,1093	0,6579	0,3900	0,5154	0,8874	1,3295
<b>n</b>	2	5	5	6	4	6
<b>DP/MÉDIA</b>	2,39%	15,99%	8,73%	9,22%	12,37%	20,38%

Note em vermelho o valor do falso positivo descontado de todas as amostras.

**Tabela 6 - Concentração de Proteínas no Tecido Pulmonar ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )**

	CT	MC 2 h	MC 8 h	MC 24 h	MC 48 h	MC 96 h
	6,529	7,156	6,996	7,658	8,516	7,868
	6,696	6,417	6,989	6,696	7,665	7,630
	6,508	5,190	7,463	7,344	7,470	7,414
	6,710	6,138	7,233	6,696	7,212	6,417
	6,473	6,905	6,640	7,358	7,261	7,491
	6,584	6,996	6,298	6,863	6,633	7,470
	5,782	6,975	7,024	6,780	6,933	6,452
	5,092	6,563			7,317	7,540
	7,324	7,142			5,713	
	6,243	6,940				
<b>MÉDIA</b>	6,394	6,642	6,949	7,057	7,191	7,285
<b>DP</b>	0,5675	0,5769	0,3531	0,3606	0,7182	0,5080
<b>EP</b>	0,1795	0,1824	0,1335	0,1363	0,2394	0,1796
<b>n</b>	10	10	7	7	9	8
<b>DP/MÉDIA</b>	8,88%	8,69%	5,08%	5,11%	9,99%	6,97%

**Tabela 7 - Atividade da SOD no Tecido Pulmonar (U/mg proteína)**

	CT	MC 2 h	MC 8 h	MC 24 h	MC 48 h	MC 96 h
	15,947	5,822	3,434	18,897	53,249	3,486
	20,504	3,066	5,441	25,196	28,109	9,601
	15,031	7,101	3,703	36,919	31,015	4,656
	17,618	2,772	4,355	38,739	36,429	3,524
		7,894	2,925	15,699	74,880	4,261
		6,650	3,923			5,086
		4,344				8,995
		2,920				6,474
		3,505				
		7,204				
<b>MÉDIA</b>	17,275	5,128	3,963	27,099	44,736	5,761
<b>DP</b>	2,0823	1,9125	0,7921	9,3033	17,4062	2,2310
<b>EP</b>	1,0412	0,6048	0,3234	4,1606	7,7843	0,7888
<b>n</b>	4	10	6	5	5	8
<b>DP/MÉDIA</b>	12,05%	37,30%	19,98%	34,34%	38,91%	38,73%

**Tabela 8 - Atividade da CAT no Tecido Pulmonar (U/mg proteína)**

	<b>CT</b>	<b>MC 2 h</b>	<b>MC 8 h</b>	<b>MC 24 h</b>	<b>MC 48 h</b>	<b>MC 96 h</b>
	0,038	0,001	0,041	0,016	0,019	0,045
	0,047	0,002	0,008	0,059	0,028	0,032
	0,104	0,008	0,001	0,073	0,003	0,005
	0,022	0,001	0,001		0,005	0,039
	0,1259	0,001				
<b>MÉDIA</b>	0,06Z	0,002	0,013	0,050	0,014	0,030
<b>DP</b>	0,0401	0,0029	0,0169	0,0242	0,0103	0,0154
<b>EP</b>	0,0179	0,0013	0,0085	0,0140	0,0051	0,0077
<b>n</b>	5	5	4	3	4	4
<b>DP/MÉDIA</b>	59,76%	126,55%	135,53%	48,96%	75,91%	51,24%

**Tabela 9 - Atividade da GPx no Tecido Pulmonar (mM/min/mg proteína)**

	<b>CT</b>	<b>MC 2 h</b>	<b>MC 8 h</b>	<b>MC 24 h</b>	<b>MC 48 h</b>	<b>MC 96 h</b>
	0,0190	0,0173	0,0173	0,0161	0,0146	0,0159
	0,0185	0,0193	0,0173	0,0185	0,0162	0,0164
	0,0190	0,0239	0,0166	0,0168	0,0166	0,0169
	0,0185	0,0202	0,0171	0,0185	0,0172	0,0196
	0,0191	0,0179	0,0183	0,0168	0,0172	0,0168
	0,0188	0,0177	0,0192	0,0180	0,0188	0,0169
	0,0214	0,0178	0,0173	0,0183	0,0180	0,0195
	0,0243	0,0188			0,0171	0,0167
	0,0169	0,0169			0,0219	
	0,0198	0,0175				
<b>MÉDIA</b>	0,0195	0,0187	0,0176	0,0176	0,0175	0,0174
<b>DP</b>	0,0019	0,0020	0,0008	0,0009	0,0019	0,0013
<b>EP</b>	0,0006	0,0006	0,0003	0,0003	0,0006	0,0005
<b>n</b>	10	10	7	7	9	8
<b>DP/MÉDIA</b>	9,83%	10,47%	4,64%	5,09%	10,91%	7,57%

Tabela 10 - Atividade da MPO no Tecido Pulmonar (mU/mg proteína)

	CT	MC 2 h	MC 8 h	MC 24 h	MC 48 h	MC 96 h
	96,4	150,5	133,7	166,3	162,8	176,6
	95,0	178,8	190,3	138,6	165,4	182,5
	91,4	142,0	218,3	127,6	89,8	136,7
	100,1	124,2	178,0	144,9	178,6	163,8
	98,4		161,5		147,2	
	92,5		171,9		153,6	
	79,5					
	78,2					
	108,2					
	89,5					
<b>MÉDIA</b>	93	149	176	144	150	165
<b>DP</b>	9	20	26	14	28	18
<b>EP</b>	3	10	11	7	12	9
<b>n</b>	10	4	6	4	6	4
<b>DP/MÉDIA</b>	9,27%	13,25%	14,72%	9,77%	19,04%	10,70%

Tabela 11 – TBARS no Tecido Pulmonar (nM/mg Proteína)

	CT	MC 2 h	MC 8 h	MC 24 h	MC 48 h	MC 96 h
	7,3754	9,7684	6,1598	10,5801	9,8842	9,6394
	6,5211	5,4050	5,4375	9,4192	9,3081	8,5273
	6,1877	5,7231	6,6748	7,8634	8,8739	9,1291
	7,4810	7,7124	10,1683	12,2041	9,1483	9,7902
	5,2069	6,9853	5,4142	5,4352	8,8586	6,8039
	5,3590	8,5775	7,0199		8,2537	7,0814
	4,9984	7,1891			8,4816	
	7,2855	7,6142				
		9,6253				
<b>MÉDIA</b>	6,3019	7,6223	6,8124	9,1004	8,9726	8,4952
<b>DP</b>	0,9591	1,4397	1,6122	2,3190	0,5007	1,1725
<b>EP</b>	0,3391	0,4799	0,6582	1,0371	0,1893	0,4787
<b>n</b>	8	9	6	5	7	6
<b>DP/MÉDIA</b>	15,22%	18,89%	23,67%	25,48%	5,58%	13,80%

**Tabela 12 - Carbonilação de Proteínas no Tecido Pulmonar (pM/mg proteína)**

	<b>CT</b>	<b>MC 2 h</b>	<b>MC 8 h</b>	<b>MC 24 h</b>	<b>MC 48 h</b>	<b>MC 96 h</b>
	2,30	1,20	3,10	0,40	2,40	3,50
	0,20	1,30	0,90	1,70	5,70	1,10
	0,50	1,50	0,50	0,90	3,50	1,00
	0,70	1,10	0,50	1,00	7,90	1,00
	0,10	1,80	0,60	1,40	2,40	1,20
	0,90	1,10	1,40		5,20	0,70
					1,60	
					2,90	
<b>MÉDIA</b>	0,78	1,33	0,17	1,08	3,95	1,42
<b>DP</b>	0,73	0,25	0,92	0,44	2,00	0,94
<b>EP</b>	0,30	0,10	0,38	0,20	0,71	0,39
<b>n</b>	6	6	6	5	8	6
<b>DP/MÉDIA</b>	93,35%	18,71%	78,82%	41,16%	50,52%	66,64%

# 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](#)