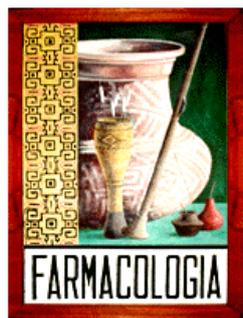


Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal

**ESTUDO DA ATIVIDADE CARDIOTÓXICA DA MICROCISTINA-LR EM  
CORAÇÃO ISOLADO DE CAMUNDONGOS.**

Rio de Janeiro  
2013



Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Ciências Biomédicas

**Fernanda de Siqueira Lece**

## **ESTUDO DA ATIVIDADE CARDIOTÓXICA DA MICROCISTINA-LR EM CORAÇÃO ISOLADO DE CAMUNDONGOS.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas/ Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia).

Orientador: Prof. Dr. Paulo de Assis Melo.

Rio de Janeiro

Janeiro 2013

**Fernanda de Siqueira Lece**

**“ESTUDO DA ATIVIDADE CARDIOTÓXICA DA MICROCISTINA-LR  
EM CORAÇÃO ISOLADO DE CAMUNDONGOS”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas / Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (Farmacologia).

Aprovada por:

---

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Raquel Moraes Soares

---

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>.Carlos Alberto Manssour Fraga

---

Prof.Dr. Luís Eduardo Menezes Quintas

---

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup> Valéria do Monti Nascimento Cunha (Revisora)

---

Prof.Dr. Paulo de Assis Melo (Orientador)

Rio de Janeiro

Janeiro 2013

Lece, Fernanda Siqueira.

Estudo da Atividade Cardiotóxica da Microcistina-LR em Coração Isolado de Camundongos/ Fernanda de Siqueira Lece. –Rio de Janeiro: UFRJ/ICB, 2012.

Orientador: Paulo de Assis Melo

Dissertação (mestrado)- UFRJ /ICB/ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia), 2012.

Referências Bibliográficas:

1. Cardiotoxicidade. 2. Coração Isolado de Camundongo. 3. Microcistina-LR. I. Melo, Paulo de Assis. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Farmacologia Básica e Clínica. III. Título.

## **Agradecimentos:**

É sempre uma tarefa difícil declinar os participantes ligados diretamente ou indiretamente ao objetivo alcançado no final de um trabalho. Portanto tentarei expressar, a minha gratidão no conjunto de nomes.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Melo de Assis, inalcançável pelo exemplo, seriedade, dedicação, confiança e humanidade. Minha gratidão a ele pelo crescimento ao me permitir fazer parte de seu grupo de pesquisa. Pela “injeção” de ânimo e entusiasmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos do laboratório Farmacologia das Toxinas, Marcelo Amorim Tomaz; Marcelo Strauch; Hilmar Dias Ricardo; Marcos Machado; Matheus Tavares; Vinícius Martins Vieira; José Roberto Rocha; Jonathan Mota; Fernando Patrão; Jair Neto; Tatiana Gonçalves com os quais, além de farmacologia e assuntos interdisciplinares, muito me ensinaram sobre convivências, relacionamentos e expectativas.

Aos amigos não citados, mas não menos importantes do Laboratório Farmacologia das Toxinas, que me apoiaram em um ambiente descontraído e animador.

À Profa Raquel Moraes Soares pela orientação, disponibilidade e parceria ao longo dessa jornada e junto com a Profa Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC), por acreditarem na realização desta dissertação e pela expertise na produção e fornecimento da toxina alvo do meu estudo.

Ao Prof Samuel Valença do Laboratório LabioRedox, que me ajudou na etapa final do meu trabalho com experimentos de estresse oxidativo.

Aos Profs do Departamento de Farmacologia...

Às Agências Financiadoras Capes e Faperj pelas bolsas e auxílios concedidos.

Um agradecimento especial à minha família pelos inúmeros momentos de compreensão quando eu estava ausente, ocupada nos meus afazeres e por todos os momentos que passamos juntos.

Por fim agradeço aos animais que nos permitiu intervir em suas vidas em prol da ciência.

“Generalizações sobre o desconhecido, embora satisfaçam a mente organizada, não devem ser interpretadas como explicações ou avanços de conhecimento” (Dukes-Elder, 1962).

## RESUMO

LECE, Fernanda de Siqueira. **Biblioteca e memória**: preservação do limiar do ano de 2013: subsídio à partir da análise conceitual de bibliotecas nacionais. Rio de Janeiro, 2013. Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

Investigamos a cardiotoxicidade da microcistina-LR (MC-LR) em coração de camundongo isolado, em condições fisiológicas basais e sob condições de estresse induzido, tais como a exposição à menadiona e a isquemia/reperfusão (I/R). A cardiotoxicidade foi avaliada pela preparação de Langendorff, pela atividade enzimática de creatina kinase (CK) no perfusato cardíaco e pela avaliação macroscópica por cloridrato de trifetil tetrazolium (TTC). A tensão cardíaca e o eletrocardiograma (ECG) foram gravados continuamente. Os corações após perfusão com solução nutritiva por 30 minutos foram expostos a diferentes concentrações de MC-LR (0,1-1.0 µg/mL; n=4). A MC-LR induziu efeito inotrópico negativo progressivo e concentração dependente, levou o aumento da pressão de perfusão e alterou os parâmetros ECG, com cronotropismo negativo e diminuição da amplitude do complexo QRS. A exposição à menadiona (50,0 µM; n=4) neste protocolo, revelou citotoxicidade cardíaca e esta alteração cardíaca foi aumentada quando associada MC-LR. O protocolo I/R não apresentou alterações nos registros mecânicos e elétricos do controle, bem como as análises do CK. Entretanto a exposição a (0,1 -0,3 µg/mL de MC-LR; n=4) após I/R, mostrou redução em 50% da tensão cardíaca. Por fim a associação destas duas ferramentas citotóxicas com a exposição à MC-LR revelou aumento da citotoxicidade cardíaca. O estudo mostrou os efeitos diretos da MC-LR na função cardíaca e estes foram aumentados em condições de estresses.

Palavras-chaves: cardiotoxicidade; coração isolado camundongo; microcistina-LR.

## ABSTRACT

LECE, Fernanda de Siqueira. **Biblioteca e memória**: preservação do limiar do ano de 2013: subsídio à partir da análise conceitual de bibliotecas nacionais. Rio de Janeiro, 2013. Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

We investigated the cardiotoxicity of microcystin-LR (MC-LR) in isolated mouse heart both in basal condition and after stress-inducing protocols, such as exposure to menadione and to ischemia/reperfusion (I/R). Cardiotoxicity was studied in Langendorff preparation, where the amplitude of heart tension and the electrocardiogram (EKG) were continuously recorded. Creatine kinase (CK) activity and macroscopic evaluation by triphenyl tetrazolium chloride (TTC) were performed as well. The isolated hearts were allowed to stabilize for 30 minutes in nutritional solution, and after stabilization MC-LR was added to the solution in different concentrations (0.1-1.0  $\mu\text{g/mL}$ ,  $n=4$ ). MC-LR induced progressive and concentration-dependent negative inotropic effect, increased the perfusion pressure, and changed EKG parameters, reducing the heart rate and the amplitude of the QRS complex. Menadione (50.0  $\mu\text{M}$ ,  $n=4$ ) in this same protocol, has been shown to be directly cytotoxic, but when menadione-treated hearts were further exposed to MC-LR, this one's effects were increased. The protocol of I/R alone caused no changes in mechanical, electrical and enzymatic parameters. However the exposure of hearts to MC-LR (0.1 -0.3  $\mu\text{g/mL}$ ,  $n=4$ ) after I/R resulted in up to 50% reduction in the cardiac tension. Finally, the combination of these two stress-inducing protocols caused a further increase in MC-LR cardiotoxicity. The present study showed the direct effects of MC-LR in cardiac function and its effects under stress conditions.

Keywords: cardiotoxicity; isolated mouse heart; microcystin-LR.

**Lista de Siglas**

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| °C                               | Graus Celsius   |
| CaCl <sub>2</sub>                | Cloreto de cálcio   |
| CEUA                             | Comissão de Ética no Uso de Animais                             |
| CK                               | Creatino kinase   |
| CO <sub>2</sub>                  | Monóxido de carbono   |
| DHPRs                            | Receptores dihidroperidina                                      |
| DTNB                             | 2- ácido nitrobenzóico  |
| EKG                              | Eletrocardiograma   |
| EPM                              | Erro padrão da média  |
| GR                               | Glutaciona redutase   |
| GSH                              | Glutaciona reduzida   |
| GSSG                             | Glutaciona oxidada  |
| KCl                              | Cloreto de potássio   |
| KPE                              | Tampão fosfato de potássio                                      |
| MC-LR                            | Microcistina-LR   |
| MDA                              | Malondialdeído  |
| MgCl <sub>2</sub>                | Cloreto de magnésio   |
| NaCl                             | Cloreto de sódio  |
| NADH                             | Dinucleotído de nicotinamida e adenina                          |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | Fosfato de sódio  |
| NaHCO <sub>3</sub>               | Bicarbonato de sódio  |
| NCXs                             | Trocador Na <sup>+</sup> /Ca <sup>+2</sup>                      |
| O <sub>2</sub>                   | Oxigênio  |
| pH                               | Potencial hidrogênioônico                                       |
| PMCA <sub>s</sub>                | Ca <sup>2+</sup> ATPase da membrana plasmática                  |
| RPM                              | Rotação por minuto  |
| RyRs                             | Receptores de rianodina   |
| SERCA2a                          | Ca <sup>+2</sup> ATPase da membrana do retículo sarcoplasmático |
| TBA                              | Ácido tiobarbitúrico  |
| TTC                              | Trifenil tetrazolium  |

## Sumário

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>  | <b>01</b> |
|          | 1.1 As Cianobactérias: Importância e suas toxinas  | 01        |
|          | 1.2 As Microcistinas   | 05        |
|          | 1.3 A Inibição das Fosfatases pela Microcistina  | 08        |
|          | 1.4 Os Miócitos Cardíacos como alvo da Microcistina  | 10        |
|          | 1.5 Modelos Geradores de espécies reativas de oxigênio (ROS)   | 12        |
|          | 1.5.1 Isquemia-Reperfusão e Hipóxia no Miocárdio   | 12        |
|          | 1.5.2 Menadiona  | 13        |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b>   | <b>17</b> |
|          | 2.1 Objetivo Geral   | 17        |
|          | 2.2 Objetivos Específicos  | 17        |
| <b>3</b> | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>   | <b>18</b> |
|          | 3.1 Animais  | 18        |
|          | 3.2 Isolamento da microcistina-LR e reagentes  | 18        |
|          | 3.3 Preparação do coração isolado de camundongos   | 18        |
|          | 3.4 Determinação da atividade enzimática da creatina kinase  | 20        |
|          | 3.5 Avaliação morfológica do tecido cardíaco pelo trifetil tetrazolium   | 20        |
|          | 3.6 Avaliação do desequilíbrio oxidativo   | 21        |
|          | 3.6.1 Glutathiona Reduzida (GSH) e Malondialdeído (MDA)  | 21        |
|          | 3.7 Procedimentos Experimentais  | 22        |
|          | 3.8 Estatística  | 23        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS</b>  | <b>24</b> |
|          | 4.1 Efeito de diferentes concentrações de microcistina-LR na atividade mecânica, elétrica e enzimática de corações isolados de camundongos | 24        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>4.2</b> | <b>Efeito da pressão de perfusão após exposição à microcistina-LR--</b><br>-----   | <b>31</b> |
| <b>4.3</b> | <b>Efeito da microcistina-LR associada a diferentes concentrações</b><br><b>de menadiona na atividade mecânica, elétrica e enzimática de</b><br><b>corações isolados de camundongos-----</b>                 | <b>33</b> |
| <b>4.4</b> | <b>Efeito da pressão de perfusão após exposição a menadiona</b><br><b>associada à microcistina-LR-----</b>   | <b>41</b> |
| <b>4.5</b> | <b>Efeito de diferentes concentrações da microcistina-LR na</b><br><b>atividade mecânica, elétrica e enzimática de corações isolados de</b><br><b>camundongos expostos à isquemia-----</b>                   | <b>43</b> |
| <b>4.6</b> | <b>Efeito da pressão de perfusão após isquemia e exposição a</b><br><b>microcistina-LR-----</b>  | <b>50</b> |
| <b>4.7</b> | <b>Efeito de diferentes concentrações de microcistina-LR associada</b><br><b>a menadiona e após isquemia na atividade mecânica, elétrica e</b><br><b>enzimática de corações isolados de camundongos-----</b> | <b>52</b> |
| <b>4.8</b> | <b>Efeito do desequilíbrio oxidativo dos corações de camundongos</b><br><b>expostos a diferentes concentrações de microcistina-LR-----</b>   | <b>63</b> |
| <b>5</b>   | <b>DISCUSSÃO-----</b>  | <b>66</b> |
| <b>6</b>   | <b>CONCLUSÃO-----</b>  | <b>72</b> |
| <b>7</b>   | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----</b>   | <b>73</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 As Cianobactérias: Importância e suas Toxinas.

As toxinas em geral constituem um grande problema de saúde pública em diversos países nos diferentes continentes. Neste sentido, o estudo das toxinas continua sendo alvo de pesquisas científicas que objetivam o tratamento sintomático ou a cura clínica de indivíduos que apresentam intoxicações. As toxinas também são estudadas por auxiliarem a revelar aspectos desconhecidos das funções celulares e de diversos tecidos. Sendo assim, podem ser usadas como ferramentas para o estudo de diferentes mecanismos de sinalização e função intracelular. (CHANGEAUX et al, 1970; RAPPOLI e MONTECUCCO, 1997; BENTON et al, 1998; AKTORIES, 2006; LOPES et al, 2012).

As cianobactérias pertencem a um antigo grupo de microorganismos, presentes no planeta há cerca de 3,5 bilhões de anos. São também chamadas de cianofíceas, algas-azuis ou cianoprocariontes. São microorganismos procariontes, fotossintetizantes com características biológicas que se assemelham às algas e, concomitantemente, às bactérias (GOVINDJEE e SHEVELA, 2011). Estes procariontes apresentam ampla distribuição geográfica, sendo encontrados em ambientes aquáticos, planctônicos ou bentônicos, terrestres e em simbiose com plantas e animais, revelando diversidade genotípica e fenotípica (AZEVEDO, 1998). Podem habitar ambientes com condições extremas de salinidade, fontes termais com temperatura de aproximadamente 74°C e lagos antárticos com temperaturas próximas de 0°C. Entretanto, é relevante ressaltar que o habitat de maior ocorrência destes microorganismos são os ecossistemas de água doce (naturais ou artificiais), mares, águas salobras e mesmo fontes de água para consumo (HUMM e WICKS, 1980; KONDO et al, 1992).

Morfologicamente, as cianobactérias podem ser encontradas na forma unicelular, como nos gêneros *Synechococcus* e *Aphanothece*, em colônias de seres unicelulares, como *Microcystis*, *Gomphospheria*, *Merispmopedium* ou podem se apresentar como células organizadas em forma de filamentos, como *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Nostoc*. Além disso, as cianobactérias

podem apresentar diferentes tamanhos celulares que variam de 2.0  $\mu\text{m}$  a 40.0  $\mu\text{m}$  de diâmetro (KAEBERNICK e NEILAN, 2001).

Em condições naturais, as cianobactérias vivem em equilíbrio com os demais grupos de algas. No entanto, em situações de eutrofização, que é o enriquecimento por nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo) dos corpos d'água continentais e costeiros, há o favorecimento de cianobactérias, que muitas vezes podem se apresentar como espessas camadas de células na superfície do corpo d'água (HUMM e WICKS, 1980).

Atualmente, a maior preocupação quanto ao surgimento das florações de cianobactérias é o fato de que as elas são potencialmente produtoras de vários metabólitos secundários, entre eles as toxinas. Estas toxinas possuem efeito nocivo sobre tecidos e células de organismos da biota aquática e de outros animais que vivem e consomem a água deste meio (CARMICHAEL, 1997). Entretanto, ainda não está bem elucidado na literatura o motivo pelo qual as cianobactérias produzem toxinas, bem como o real papel fisiológico e ecológico destas toxinas (KAEBERNICK e NEILAN, 2001).

Em ambientes aquáticos, as cianotoxinas normalmente permanecem contidas nas células das cianobactérias e são liberadas em quantidade considerável após a lise celular. Esta liberação ocorre em algumas situações, como por exemplo, durante a fase de senescência (morte natural), ou em situações que levam ao estresse celular, ou mesmo devido ao uso de algicidas como sulfato de cobre (ESTEVES, 1998; DUY et al, 2000).

A presença da grande biomassa de cianobactérias nas superfícies de rios e lagos geram alterações na coloração da água com aumento da turbidez e odor desagradável, alterando o sabor da água mesmo tratada (KLAPPER, 1991). A decomposição das florações de algas leva a desoxigenação, que ocasiona o comprometimento da sobrevivência de vários organismos aquáticos. A elevada produção de toxinas afeta diretamente e indiretamente a saúde de animais, inclusive do homem (CARMICHAEL et al, 1996; YUNES, 1998).

Atualmente, existe uma preocupação mundial quanto aos riscos impostos pela ocorrência de cianobactérias em fontes de água utilizada para o abastecimento público. No Brasil, grande parte das cepas de cianobactérias, isoladas de corpos d'água se mostraram produtoras de toxinas (COSTA e AZEVEDO, 1994; SANT'ANNA e AZEVEDO, 2000). Sabe-se que muitos destes mananciais são utilizados para o abastecimento público, o que torna a liberação dessas toxinas na água de consumo, um risco para a saúde pública. (FUNARI e TESTAI, 2008).

Uma espécie de cianobactéria pode produzir mais de um tipo de toxina, bem como dentro de uma mesma espécie, pode ainda existir cepas não produtoras de toxinas. Em geral as toxinas são classificadas em três classes principais: dermatoxinas, neurotoxinas e hepatotoxinas. Os mecanismos que geram os efeitos tóxicos das cianotoxinas são diferentes devido ao fato de que as toxinas possuem diferenças em suas estruturas químicas (CARMICHAEL, 1997).

As neurotoxinas têm sido isoladas dos seguintes gêneros de cianobactérias: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Trichodesmium*, *Lyngbya* e *Cylindrospermopsis*. Dentro desta classe estão as anatoxina-a e anatoxina-a(s), que atuam como bloqueadores neuromusculares pós-sinápticos, uma vez que agem como agonistas de receptores nicotínicos, e dificilmente são degradadas pela ação das acetilcolinesterases. Outra neurotoxina, de origem marinha produzida por cianobactérias é a saxitoxina, que é um alcalóide carbamato e sua presença está fortemente relacionada a episódios conhecidos como as marés vermelhas. São também conhecidas como “toxinas paralisantes de mariscos” e seu mecanismo de ação é através da inibição do impulso no nervo por bloqueio de canais de sódio, levando a morte de animais e seres humanos por paralisia (CARMICHAEL et al, 1997; GEOFFREY, 2000).

As hepatotoxinas têm sido isoladas dos principais gêneros: *Microcystis*, *Nodularia*, *Cylindrospermopsis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Anabaenopsis*. Dentro desta classe estão as microcistinas (conhecidas como heptapeptídeos cíclicos), as nodularinas (conhecidas como pentapeptídeos cíclicos) e o alcaloide cilindrospermopsina (CHORUS e BARTRAM, 1999). As microcistinas bem como as nodularinas, possuem mecanismo de ação muito semelhante. Isto se faz devido à

presença do mesmo aminoácido, chamado de 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienóico (Adda), que é o responsável em grande parte pela atividade biológica destas toxinas. A presença deste aminoácido induz alterações celulares, devido à inibição de enzimas intracelulares conhecidas como fosfatases. Estas enzimas estão envolvidas na regulação de vias metabólicas, como as vias de sinalização genética (ZOLNIEROWICZ et al, 1996). Portanto, a disfunção e lesão hepática ocasionada por estas toxinas, levam a hemorragia e morte. A terceira hepatotoxina é chamada cilindroespermopsina e é conhecida como um alcalóide tricíclico guanidínico (HAWKINS et al, 1985). Apesar de frequentemente serem denominadas como hepatotoxina, apresenta efeitos bem mais amplos, que envolvem outros órgãos além do fígado. A cilindroespermopsina é conhecida como inibidora da síntese de proteínas e também depleta glutathiona, levando a danos renais, danos em outros órgãos como baço, intestino, coração, timo além dos danos hepáticos (RUNNEGAR et al, 1995). Outros sinais de intoxicação das hepatotoxinas frequentemente encontrados são fraqueza muscular, respiração ofegante, vômito, diarreia e hipotermia de extremidades o que leva ao colapso respiratório e morte. Particularmente é também descrito que a exposição crônica à microcistina em baixas concentrações leva à tumorigênese (SIVONEN et al, 1990; CARMICHAEL, 1997; CHORUS e BARTRAM, 1999).

A Tabela 1 a seguir descreve algumas toxinas de cianobacterias e as principais espécies produtoras.

**Tabela 1.** Cianotoxinas produzidas por gêneros de cianobactérias. Retirado e modificado de (KAEBERNICK e NEILAN, 2001).

| Toxinas                                       | Gêneros de Cianobactérias   |
|---|---|
| <b>Hepatotóxica</b>                           |   |
| Microcistinas                                 | <i>Microcistis, Oscillatoria, Nostoc, Anabaena, Anabaenopsis</i>  |
| Nodularina<br>Cilindrospermopsina             | <i>Nodularia<br/>Cilindrospermopsis, Aphanizomenona, Umezakia</i>   |
| <b>Neurotóxica</b>                            |   |
| Anatoxina-a<br>Anatoxina-a (s)<br>Saxitoxinas | <i>Anabaena, Oscillatoria, Aphanizomenona<br/>Anabaena<br/>Anabaena, Aphanizomenona, Lingbia<br/>Cilindrospermopsis, Planktothrix</i> |
| <b>Dermatotóxicas</b>                         |   |
| Aplisiatoxinas<br>Lingbiatoxina-a             | <i>Lingbia, Schizothrix, Oscillatoria<br/>Lingbia</i>   |

## 1.2 As Microcistinas:

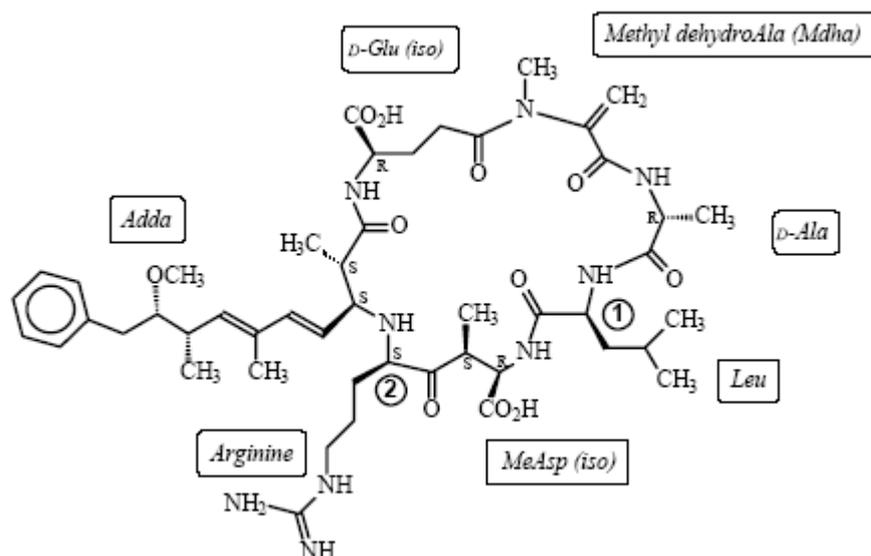
Historicamente o primeiro envenenamento de animais através da ingestão de cianobactérias foi registrado em 1878 no Lago de Alexandrina no Sul da Austrália. Este episódio foi marcado pelo envolvimento da toxina nodularina (FALCONER e YEUNG, 1992). Desde então tem sido reportadas frequentemente, intoxicações de aves, peixes e outros animais pelas toxinas de cianobacterias especialmente pelas microcistinas (DAWSON, 1998).

No Brasil foi descrito em 1996, na cidade de Caruaru, Pernambuco o episódio marcante de exposição de humanos à microcistina. Estes pacientes eram renais crônicos submetidos à hemodiálise, onde a soroterapia dialítica estava contaminada com as microcistinas (CARMICHAEL et al, 2001; AZEVEDO et al, 2002). Nesta exposição os pacientes apresentaram cefaléia, distúrbios visuais, náuseas, vômitos, fraqueza muscular e hepatomegalia. Esta exposição e intoxicação resultaram em morte de mais de 60 pacientes. (SHIDEH POURIA et al, 1998; AZEVEDO et al, 2002).

Constatou-se quimicamente que a contaminação da água usada na clínica, apresentava elevada concentração de microcistinas. (JOCHIMSEN et al, 1998; CARMICHAEL et al, 2001; AZEVEDO et al, 2002).

As microcistinas (MC) são as cianotoxinas mais frequentemente encontradas nos ambientes aquáticos (SAHIN et al, 1995). São produzidas principalmente por espécies de cianobactérias do gênero *Planktothrix*, *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Nostoc* e *Anabaena* (APELDOORN et al, 2007), que são encontrados frequentemente em águas doces.

As MC são heptapeptídeos monocíclicos de estrutura química conhecida como ciclo-(D-alanina<sup>1</sup>-X<sup>2</sup>-D-MeAsp<sup>3</sup>-Z<sup>4</sup>-Adda<sup>5</sup>-D-glutamato<sup>6</sup>-Mdha<sup>7</sup>) onde X e Z são L-aminoácidos variáveis, D-MeAsp<sup>3</sup> representa D-eritro-β-ácido metilaspártico, Adda que é o aminoácido representado pelo 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienóico e Mdha que representa o N-metildehidroalanina (APELDOORN et al, 2007) (Figura 1). Estudos de radiomarcagem de microcistinas têm demonstrado que o fígado é o principal sítio de acumulação desta toxina após administração oral, intraperitoneal ou por via intravenosa (HUDNELL, 2008).



**Figura 1-** Estrutura proposta para a microcistina. É possível observar em destaque os dois L-aminoácidos variáveis da molécula. Neste caso representado pela microcistina-LR. Onde o 1 representa L-Leucina e o 2 representa o L-Arginina. Retirado de Harada, 1996.

Atualmente já foram identificadas mais de 80 variações de microcistina, principalmente através da variabilidade dos L-aminoácidos (FEURSTEIN et al, 2009). Entretanto a presença de diferentes combinações dos aminoácidos leucina (L), arginina (R) ou tirosina (Y) formam as mais frequentes formas de microcistina, sendo MC-LR, MC-RR, MC-YR. A forma MC-LR é a mais estudada, devido sua presença abundante em diversos ambientes, além de possuir importante toxicidade (PRIETO et al, 2009). Propõe-se que a atividade biológica desta substância deve-se ao aminoácido Adda, presente em todas as moléculas variantes de MCs (SONG et al, 2006). Sua presença é tão fundamental que uma diferença estereoquímica em uma ligação dupla conjugada, por exemplo, resulta na perda da sua toxicidade. (AN e CARMICHAEL, 1994; LUUKAINEN et al, 1994; TROGEN et al, 1996). Neste sentido, a isomerização ou a oxidação do aminoácido Adda, reduz a toxicidade da molécula de forma drástica. (TSUJI et al, 1994).

As MC apresentam alta peso molecular, variando entre 900 a 1.100 Daltons, e por serem moléculas hidrofílicas, têm baixa capacidade de ultrapassar as membranas lipídicas. Quando no meio intracelular são potentes inibidores enzimáticos. Inibem as fosfatases, levando a fosforilação excessiva de outras proteínas e causam alterações no citoesqueleto de células. No fígado, as alterações do citoesqueleto levam a perda do formato celular e subsequente destruição celular. Além da lesão dos hepatócitos, ocorre lesão capilar. Desta forma a toxicidade aguda das MCs pode estar relacionada aos danos hepáticos (VAN APELDOORN et al, 2007), entretanto, *in vitro* e *in vivo* a toxina já mostrou capacidade de afetar outros órgãos como rins, cérebro, gônadas, pulmão e coração (ZEGURA et al, 2008; DIAS et al, 2009).

Dados da literatura revelam que a exposição crônica às baixas concentrações de microcistina, como por exemplo, consumo frequente de água e alimentos contaminados por esta toxina e mesmo a exposição dérmica ou inalatória em atividades recreativas em águas contaminadas por esta toxina, pode gerar problemas de saúde pública (CAMPOS e VASCONCELOS, 2010). Neste sentido, a exposição crônica a microcistina leva a intoxicações como gastroenterite, doenças alérgicas e podem também induzir a formação de tumores, uma vez que também são conhecidas como agentes promotores de tumores (HUMPAGE et al, 2000; LANKOFF et al,

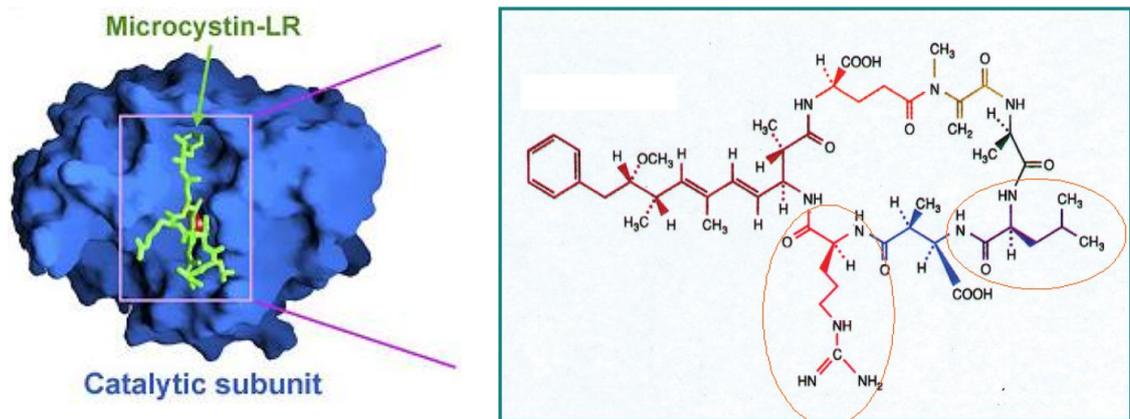
2008; SVIRCEV et al, 2009). Estudos revelam que a DL50 da MC-LR administrada por via intraperitoneal (ip), em camundongos, em 24h é em média 60  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (HUDNELL, 2008).

### **1.3 A Inibição das Fosfatases pela Microcistina:**

Pelo fato das microcistinas não serem permeáveis à membrana plasmática, devido a peculiaridades de sua estrutura química e elevado peso molecular, elas são carregadas para o interior da célula através de transportadores de ânions orgânicos polipeptídeos (OATPs) (RUNNEGAR; GERDES e FALCONER, 1991; FISCHER et al, 2010). Esses OATPs fazem parte do sistema de transporte multiespecífico que estão presentes em diversos tipos celulares tais como hepatócitos, enterócitos, células do epitélio renal e órgãos como pulmão, baço, pâncreas, cérebro e coração. A distribuição sistêmica da MC nos órgãos é possivelmente dependente da concentração, do nível de perfusão sanguínea, dos níveis de expressão e dos tipos de OATPs existentes (FEURSTEIN et al, 2009).

A microcistina uma vez no interior da célula inibe as fosfatases (PPs) do tipo serina/treonina, principalmente PP1 e PP2A através de sua ligação covalente e irreversível com estas enzimas. (MACKINTOSH et al, 1990; GULLEDGEA et al, 2002). As fosfatases estão inseridas em grupo diverso de proteínas que são classificadas de acordo com a especificidade em desfosforilar certas fosfoproteínas em resíduos como serina, treonina e tirosina (BARFORD, 1995). Nas células eucariontes, a fosforilação reversível é o mecanismo chave para a alteração da atividade biológica de diversas proteínas estruturais e proteínas regulatórias, envolvidas em funções como o transporte através da membrana celular, a contratilidade, a divisão celular, a transcrição e tradução celular. Mais de 98% de todas as fosforilações protéicas ocorrem em resíduos de serina e treonina e o estado de fosforilação de qualquer proteína é o processo dinâmico que reflete a ação combinada de proteínas kinases e proteínas fosfatases (HONKANEN e GOLDEN, 2002).

A interação entre a MC e as fosfatases foi possível ser observada através de estudos estruturais de cristalografia (YOSHIZAWA et al, 1990; HONKANEN et al, 1990; GOLDBERG, 1995). A inibição da atividade enzimática é resultado da interação não covalente, que é mediada pela MC através da cadeia lateral do aminoácido Adda. A interação adicional do tipo ligação covalente ocorre através da carbonila alfa e beta insaturada eletrofílica do resíduo metildehidroalanina da microcistina, com o grupamento sulfidríla (-SH) da cisteína-273 da fosfatase tipo1 (DAWSON, 1998).



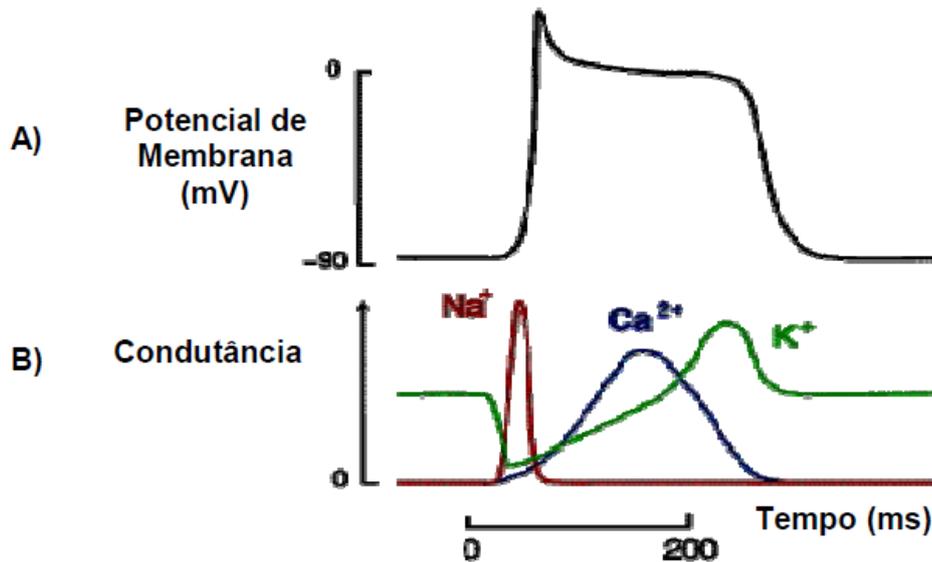
**Figura 2-** Estrutura geral do núcleo enzimático da enzima PP2A ligada à toxina indutora tumoral (microcistina-LR). Retirado de (XING et al, 2006).

A inibição de fosfatases induz a fosforilação de outras proteínas do citoesqueleto e proteínas associadas, e como consequência gera redistribuição destas proteínas. Alterações na inibiçãooatividade das fosfatases foram evidenciadas por gerarem colapso dos microfilamentos de actina do citoesqueleto em hepatócitos de ratos expostos a microcistina (GHOSH et al,1995). Outras alterações em hepatócitos também têm sido investigadas, como o aumento dos níveis de cálcio citoplasmático (RUNNEGAR; GERDES e FALCONER, 1991).

#### **1.4 Os Miócitos Cardíacos Como Alvos da Microcistina:**

O coração é constituído por vários tipos de células, onde temos: músculo atrial, músculo ventricular, e fibras musculares especializadas na excitação e condução. É descrito que os miócitos do tipo atrial e ventricular contraem de forma semelhante ao músculo esquelético, exceto que a duração da contração é muito maior podendo chegar a 400 ms. Inversamente, as fibras excitatórias e as especializadas em condução contraem-se somente fracamente porque contêm poucas fibras contráteis. Em vez disso, elas apresentam atividade elétrica rítmica automática na formação dos potenciais de ação ou na propagação dos potenciais através do coração, promovendo o controle do ritmo e da frequência do coração (GUYTON, 2006; KATZ, 2006).

O potencial de ação cardíaco é resultado de ativação e inativação de canais iônicos gerando um complexo evento elétrico com diferentes fases denominadas, fase 0, fase 1, fase 2, fase 3 e fase 4. Em cada fase estão envolvidas diferentes correntes iônicas, e predomina nas fases 2 e 3 elevadas correntes de cálcio. A fase 2 é denominada de plateau do potencial de ação cardíaco (figura 3). A abertura dos canais rápidos causa o pico do potencial de ação, e a abertura prolongada dos canais lentos de cálcio permite principalmente que os íons cálcio entrem na fibra, sendo estes os responsáveis pela maior parte do aparecimento do platô do potencial de ação. Um segundo fator que pode ser em parte, responsável pela formação do platô, são os canais de potássio voltagem-dependente que têm uma abertura mais lenta. Essa abertura permite o retorno do potencial da membrana para seu valor negativo normal em cerca de menos 80 milivolts (KATZ, 2006).



**Figura 3-** Registro de um potencial de membrana de cardiomiócito e, simultaneamente, representadas as condutâncias dos íons  $\text{Na}^{+2}$  (sódio),  $\text{Ca}^{+2}$  (cálcio) e  $\text{K}^{+}$  (potássio) ao longo do tempo do potencial. O início e o pico do potencial de membrana são simultâneos ao período de maior condutância do  $\text{Na}^{+2}$ . O platô do potencial é simultâneo à máxima condutância do  $\text{Ca}^{+2}$ . Já o retorno do potencial ao valor de base é dado pela condutância do  $\text{K}^{+}$ . Retirado de (KATZ, 2006).

A cada despolarização do miócito cardíaco, íons  $\text{Na}^{+}$  e  $\text{Ca}^{+2}$  adentram para o espaço intracelular. O  $\text{Ca}^{+2}$  que atravessa a célula pelo canal de  $\text{Ca}^{+2}$  tipo L durante a despolarização desencadeia a liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular armazenado do retículo por intermédio do receptor de rianodina (RyR). A liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  induzida pelo próprio íon aumenta o nível de  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico disponível para interagir com as proteínas contráteis do miócito, finalmente aumentando a força da contração. Durante a repolarização e o relaxamento do miócito, o  $\text{Ca}^{+2}$  celular é ressequestrado pela  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPase (SERCAS) do retículo sarcoplasmático, e é removido da célula pelo permutador de  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$  (NCX) e, em muito menor extensão, pela SERCAS sarcolêmica (MARON e ROCCO, 2012). O bombeamento e preenchimento da câmara cardíaca requerem ciclos de excitação- contração/relaxamento que são mediados pelo controle fino dos íons cálcio (BERS, 2001). A contração do músculo é criticamente dependente de cálcio intracelular e hidrólise do ATP (ASHLEY, 1991). Isto é causado pelas forças geradas pela interação das pontes-cruzadas dos filamentos da miosina com os filamentos de actina. Durante o relaxamento, estas forças estão inativas, mas quando um potencial de ação se propaga ao longo do miócito cardíaco esta faz com que o retículo sarcoplasmático libere elevadas concentrações dos íons do cálcio para o sarcoplasma onde se encontram as miofibrilas.

É proposto na literatura, que a intoxicação pela microcistina leva a morte, devido a alterações hepáticas que culminam na morte por choque hipovolêmico (BEASLEY et al, 2000). Entretanto, estudos recentes sugerem que esta morte, poderia também envolver o coração (QIU et al, 2009). É descrito que a exposição à microcistina em doses letais, promove redução da frequência cardíaca e pressão arterial em ratos. A MC-LR ainda, mostrou ser capaz de induzir danos ao miocárdio em intoxicação aguda e crônica (LECLAIRE; PARKER e FRANZ, 1995; ZHANG et al, 2002; MILUTINOVIC et al, 2006; QIU et al, 2009).

Adiciona-se a estes dados as observações de Qiu e outros (2009) que demonstraram desorganização das estruturas celulares e perda da aderência entre os cardiomiócitos em ratos expostos a  $87 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de MC-LR. Outros estudos, realizados em tilápias revelaram que a administração intraperitoneal de  $500 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de MC-LR, levou a disfunção cardíaca como a bradicardia, provavelmente devido a danos em cardiomiócitos. Tais alterações foram relacionadas aos efeitos da MC-LR no tecido cardíaco (ATENCIO et al, 2008).

Apesar de existirem estudos investigando as atividades da MC-LR em diversos órgãos, há poucos trabalhos voltados para a investigação do efeito direto da microcistina em órgãos isolados como o coração de pequenos animais (DAWSON, 1998; QIU et al., 2009; MARTINS et al, 2011). Muitas das observações da citotoxicidade da MC-LR indicam que ela pode ser geradora de radicais livres, além do seu efeito inibidor de fosfatases. (BOTHÁ et al, 2004; DING et al, 1998; DING; SHEN e ONG, 2001; MORENO et al, 2003, 2005). O estudo do efeito da MC-LR em coração isolado de camundongo poderia ser uma oportunidade de investigar-se a influência de radicais livres, como o ânion superóxido, na citotoxicidade da MC-LR.

## **1.5 Modelos Geradores de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)**

### **1.5.1 Isquemia-Reperfusão e Hipóxia no Miocárdio**

A disfunção contrátil do coração é um fenômeno frequentemente observado após episódios de injúria cardíaca, como exemplo, infarto do miocárdio, cirurgia de revascularização cardíaca, transplante cardíaco e angioplastia coronariana (BOLLI,

1992). Adicionalmente, quando há período prolongado de isquemia e em seguida a reperfusão do tecido cardíaco, pode haver disfunção contrátil, danos estruturais e alterações no metabolismo do miocárdio (DHALLA et al, 1988). A redução da oferta de oxigênio (hipóxia) afeta criticamente a função cardíaca e é causador de várias doenças agudas e crônicas, como por exemplo, doença isquêmica do coração, infarto do miocárdio e hipertrofia cardíaca. A hipóxia prolongada ou isquemia além de um limite crítico resulta na morte celular por necrose ou apoptose, pois leva à falta de O<sub>2</sub>, leva a distúrbios do íon cálcio, alteração do pH, lesão mitocondrial, o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), e dano oxidativo ao DNA.

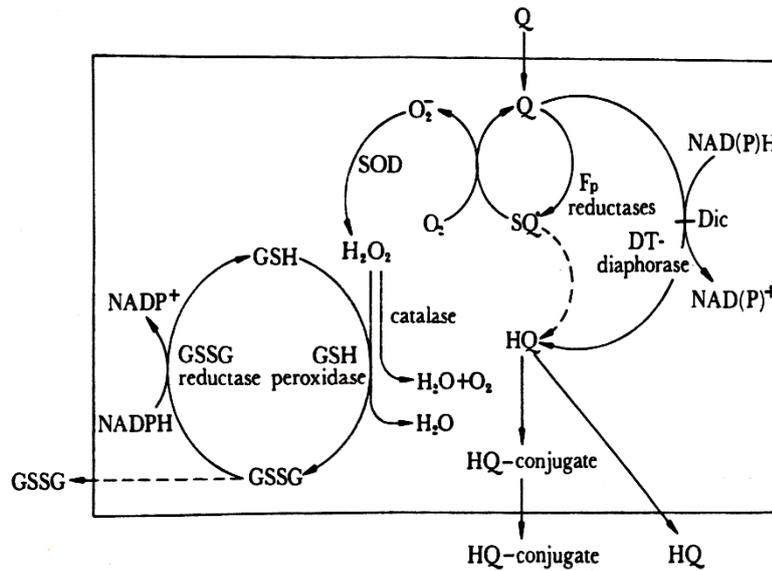
A reperfusão ou reoxigenação é essencial para a sobrevivência dos cardiomiócitos. Em contrapartida, a reperfusão está associada a danos significativos na célula uma vez que ela participa em parte, dos mecanismos formadores de ROS (ZWEIER e TALUKDER, 2006). Guatimosim e outros (2002) postularam que durante a isquemia e reperfusão (I/R), a disfunção contrátil cardíaca é atribuída à sinalização prejudicada do íon cálcio nos cardiomiócitos. Anormalidades na cinética do cálcio levam a sobrecarga deste íon no sarcoplasma e esta abordagem tem sido sugerida para explicar a disfunção contrátil no coração sobre isquemia e reperfusão (I/R). Além da abordagem relacionada à homeostase do cálcio prejudicada, o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), dentro dos primeiros minutos de reperfusão, tem sido proposta para explicar as alterações contráteis do coração apresentadas após isquemia e reperfusão (ZWEIER, 1988). Estudos experimentais têm demonstrado que o processo como, a duração da isquemia, e principalmente a existência de patologia prévia, aumenta a concentração de ROS (WANG et al, 2004; 2008; 2010). Entretanto, os mecanismos pelos quais as alterações cardíacas ocorrem após a I/R ainda não estão inteiramente detalhados (TANG et al, 2010).

### **1.5.2 Menadiona**

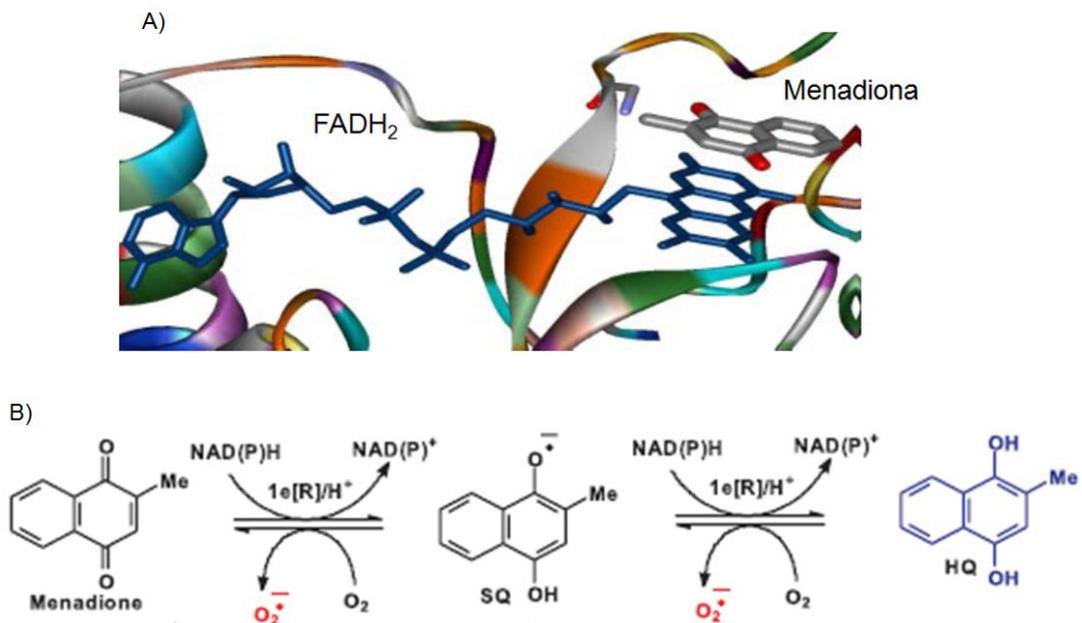
A menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) faz parte do grupo das quinonas conhecida como Vitamina K3 sintética. As quinonas estão inseridas como agentes tóxicos que podem gerar vários efeitos *in vivo*, incluindo citotoxicidade aguda, imunotoxicidade e cardiotoxicidade. Os mecanismos pelos quais as quinonas causam esses efeitos são complexos e envolvem diferentes vias (BOLTON et al, 2000). São

substâncias comuns de vários produtos naturais, ou do metabolismo endógeno, geradas através do metabolismo das hidroquinonas ou catecóis. São derivados de anéis aromáticos, por exemplo: são benzoquinonas, derivados de benzeno, naftoquinonas a partir do naftaleno e antraquinonas a partir de antraceno (O'BRIEN, 1991; MONKS et al, 1992). A menadiona ou vitamina K3 (2-metil-1,4-naftoquinona) é uma quinona exógena, com estrutura similar a ubiquinona, um carreador de elétrons presente na membrana interna mitocondrial (HEART et al, 2011). Como outras quinonas, a menadiona pode sofrer um ciclo redox, que envolve redução enzimática pelas oxidoredutases dos diferentes tipos celulares, à custa de substratos conhecidos como NADH e NAD(P)H (figura 5). Consecutivamente a auto-oxidação pode ocorrer na presença de molécula de oxigênio, gerando ânion superóxido e posteriormente peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (BOLTON et al, 2000).

A menadiona é uma substância largamente usada como ferramenta experimental para induzir estresse oxidativo em células e tecidos. No interior da célula esta pode se transformar no radical semiquinona de alta toxicidade. Por apresentar baixa estabilidade o radical semiquinona pode ser reoxidado, na presença do oxigênio, e gerar a formação de espécies reativas de oxigênio como exemplo: ânion superóxido ( $O_2^-$ ) (IYANAGI e YAMAZAKI, 1969). Através das reações com a participação da superóxido dismutase (SOD), outras moléculas altamente tóxicas poderão ser formadas, como exemplo o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ou ainda o radical hidroxil (OH) altamente tóxico (GOLDSTEIN et al, 1993). Além da via de transformação do radical semiquinona (altamente reativo), a menadiona, poderá ser reduzida a um radical hidroquinona, pelos aceptores oxidoredutase NAD(P)H, também conhecido como DT-diaforase (figura 4). (IYANAGI e YAMAZAKI, 1970). Neste sentido a hidroquinona, um derivado relativamente estável, apresenta menor toxicidade, constituindo desta forma uma importante via de detoxificação, demonstrado *in vivo* e *in vitro* por Floreani e outros (2000).



**Figura 4.** Representação esquemática do metabolismo da quinona em hepatócitos isolados. Q, quinona; SQ, radical semiquinona; HQ, hidroquinona; Fp, flavoproteína; Dic, dicoumarol; SOD, superóxido dismutase; GSH, glutatona reduzida; GSSG, glutatona disulfido. Retirado de ORRENIUS, 1985.



**Figura 5-** Modificação estrutural da molécula da menadiona. A) Modelo de interação entre a menadiona e o FADH<sub>2</sub>. B) Metabolismo da menadiona pela redução enzimática de um elétron ( $1e/H^+$ ), gerando um radical instável semiquinona, e seguinte redução à hidroquinona estável. A auto-redução gera ROS ( $O_2^-$ ) quando a molécula de oxigênio está presente. Este processo redutor utiliza NAD(P)H como cofator. Retirado de CRIDDLE et al, 2006.

É descrito que a citotoxicidade gerada pela menadiona tem mecanismos intracelulares como a geração de estresse oxidativo devido à formação de ROS e a reações de arilação em determinados nucleófilos. Em hepatócitos isolados de ratos a menadiona têm sido estudada, permitindo evidenciar a alteração da homeostase celular do íon cálcio, além de alterações do citoesqueleto e morte celular (BELLOMO et al, 1983; DI MONTE et al, 1984a; ORRENIUS, 1985; MIRABELLI; SALIS e MARINONI, 1998).

Em cardiomiócitos, a menadiona na concentração de 20  $\mu\text{M}$  induziu aumento na força de contração de átrio isolado de ratos e cobaia (*guinea pig*), obtendo efeitos mais significativos em cobaia do que nos ratos, e efeitos estritamente relacionados com o aumento das espécies reativas de oxigênio (FLOREANI; NAPOLI e PALATINI, 2002). A cardiocitotoxicidade induzida pela menadiona também envolve a alteração da homeostase do íon cálcio, em cardiomiócitos neonatais de ratos (TZENG et al, 1992).

Paradoxalmente, diversos trabalhos têm demonstrado o efeito benéfico da menadiona quando utilizada em baixas concentrações. Foi observado que a menadiona (3,0  $\mu\text{M}$ ) mimetiza o efeito benéfico do pré-condicionamento cardíaco, que gera cardioproteção em corações isolados de ratos (YUE et al, 2001). Para tal entendimento, os autores propuseram dois possíveis mecanismos da ação protetora da menadiona: a restauração do fluxo de elétrons na cadeia respiratória e/ou o aumento da defesa antioxidante mitocondrial (YUE et al, 2001). Tais mecanismos são baseados no fato de que a vitamina K tem sido utilizada no tratamento de pacientes com defeitos da fosforilação oxidativa, desta forma a menadiona possui o papel de transportador de elétrons do NADH para receptores de elétrons, a exemplo da coenzima Q (ubiquinona) ou citocromo c (ELEFF et al, 1984; MARRIAGE et al, 2004).

O estudo da MC-LR em coração isolado sugere que seu efeito em mamíferos possa ser semelhante àqueles evidenciados em hepatócitos, gerando ROS, acelerando e induzindo apoptose (GERASIMENKO et al, 2001). Ainda não foi proposto expor corações isolados de mamíferos à microcistina em concentrações citotóxicas, ou mesmo condições onde existam previamente fatores que aumentem a produção de ROS.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral:**

Investigar o efeito cardiotoxico da microcistina-LR em modelo de coração isolado de camundongo em condições basais e sob condições de estresse experimental induzida, como e exposição á menadiona e a isquemia.

### **2.2 Objetivos específicos:**

- 1)** Investigar a função elétrica, mecânica de corações de camundongos expostos à MC-LR.
- 2)** Investigar a função elétrica, mecânica de corações de camundongos expostos à MC-LR e sob condições de estresse como (isquemia e menadiona)
- 3)** Investigar a atividade enzimática cardíaca através da liberação da creatina kinase e desidrogenase láctica
- 4)** Investigar o desequilíbrio oxidativo.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

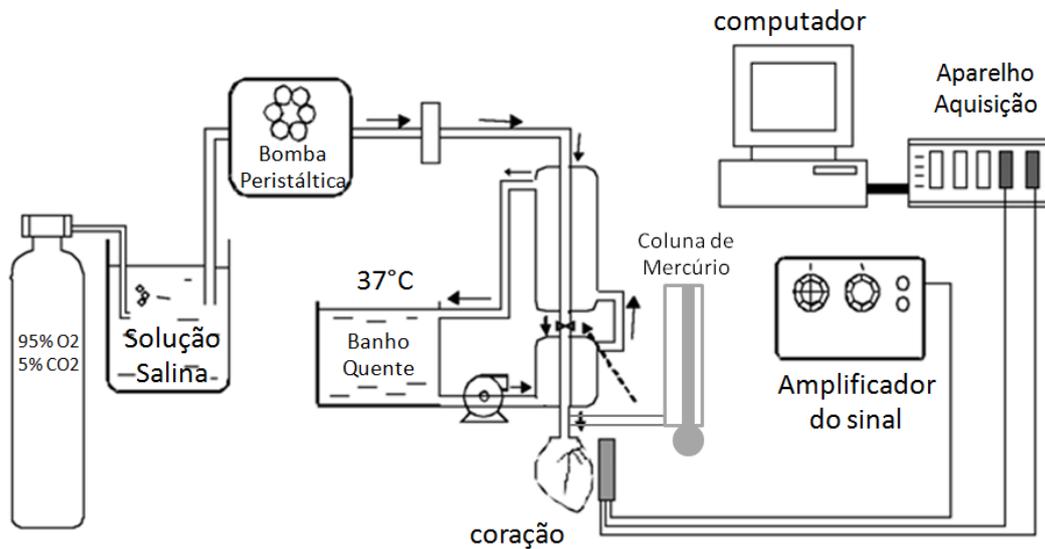
Nos experimentos realizados foram utilizados camundongos adultos (20–25 g), suíços, albinos, machos e fêmeas. Os animais foram abrigados no biotério de experimentação animal do Laboratório de Farmacologia/UFRJ-CCS receberam água e ração “*ad libitum*” e foram mantidos em ciclo diário de 12 horas de exposição à luz. A manipulação e procedimentos com os animais obedeceram aos princípios da Comissão de Avaliação do Uso de Animais (CEUA-CCS) segundo o protocolo número DFBI CB 033.

#### 3.2 Isolamento da Microcistina-LR e Reagentes

A toxina (microcistina-LR) isolada e purificada da cepa NPJB-1 de *Microcystis aeruginosa* foi obtida pelo grupo da professora Dra Sandra Maria Azevedo da UFRJ- Instituto de Biofísica, laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia das Cianobactérias seguindo-se por metodologias estabelecidas no laboratório. A partir da floração de cianobactérias *Microcystis aeruginosa* da cepa NPJB-1, foi realizada a liofilização, seguida de adição de solução de extração (H<sub>2</sub>O 75%; MeOH 20%; Butanol 20%). O material formado foi centrifugado a 2000 rpm durante 40 minutos e ao final da centrifugação o sobrenadante foi retirado e filtrado pela fase sólida através do cartucho C18. Logo após a filtração o extrato semi-purificado foi analisado e purificado em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), seguido da avaliação por espectrofotometria de massas. Estas duas técnicas garantiram a detecção e caracterização da toxina em questão, entretanto, mesmo apresentando especificidade molecular, a determinação do grau de pureza da amostra de microcistina-LR não foi estabelecida. Os demais reagentes e substâncias, bem como os “kits” para determinação da atividade enzimática (CK MB) foram adquiridos de fornecedores como BIOCLIN, sendo todos os sais e reagentes utilizados de grau analítico.

### 3.3 Preparação do Coração Isolado de Camundongos

O protocolo experimental consistiu na preparação de Langendorff modificada (CHORRO et al, 2009), no qual corações de camundongos saudáveis foram perfundidos por período de 2 horas. Após anestesia e eutanásia com éter etílico, a região torácica foi exposta para a retirada do coração e seus vasos sanguíneos, este órgão foi imerso em solução nutritiva contendo NaCl: 135; KCl: 5; CaCl<sub>2</sub>: 2; MgCl<sub>2</sub>: 1; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1; NaHCO<sub>3</sub>: 15 e dextrose: 11, em mM) a 4° C. A aorta ascendente foi canulada com agulha 25 G conectada ao aparelho de perfusão retrógrada (Langendorff). Cada coração foi inicialmente perfundido a uma pressão de 30-50 mm Hg (2,5 ml/min), através de uma bomba peristáltica de fluxo constante. A solução foi continuamente oxigenada através de um balão de mistura carbogênica contendo 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, White Martins, o pH foi ajustado para 7,4 ± 0,02. Após um período de 30 minutos (período controle), foi iniciada a perfusão da toxina, por um período de 90 minutos. O coração foi acoplado, por clipe fixado em seu ápice, a um transdutor de tensão GRASS (force-displacement FT03D) para ser registrada a tensão desenvolvida, a qual foi analisada através do programa WINDDAQ (Serial Acquisition – Versão 2.66). A atividade elétrica do tecido cardíaco foi monitorada através do registro de eletrocardiograma (EKG), usando eletrodos conectados às agulhas inseridas na aorta e no ápice. Todas essas atividades foram registradas em arquivos do programa WINDAQ. Antes do registro foi aplicada ao coração uma tensão de estiramento diastólica de 1,0 g. Esta técnica também permite a avaliação da pressão de perfusão coronariana, através da leitura em (mm Hg) em uma coluna de mercúrio.



**Figura 6-** Esquema do Langendorff modificado. Figura adaptada de (CHORRO et al, 2009).

### 3.4 Determinação da atividade enzimática da creatina kinase

Foi coletada durante um minuto, a solução nutritora da perfusão cardíaca em diferentes tempos ao longo do experimento. As amostras coletadas em 15 e 30 minutos corresponderam aos períodos controles, onde foram obtidos valores basais de liberação de creatina kinase. Em seguida foram coletadas amostras em 60, 90 e 120 minutos, as quais corresponderam respectivamente a 30, 60 e 90 minutos de exposição à microcistina-LR. Todas as amostras foram mantidas em geladeira ao longo do experimento, armazenadas e posteriormente foram avaliadas em espectrofotometria, em comprimento de onda a 340 nm. Os valores foram expressos em  $U \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ .

### **3.5 Avaliação morfológica do tecido cardíaco pelo trifenil tetrazolium (TTC)**

Esta técnica teve o objetivo de caracterizar áreas macroscópicas de infarto no tecido cardíaco pós-morte, através da utilização do sal de trifenil tetrazolium (TTC) (NINEHAM, 1955). Esta técnica foi utilizada nesse estudo por ser importante na avaliação de regiões de infarto do miocárdio (DOERR, 1950; SANDRITTER e JESTAEDT, 1958). Os corações ao final do experimento foram retirados da montagem de Langendorff e seccionados em três fragmentos transversais de 0,5 cm cada e em seguida imersos em uma solução de TTC a 5 % por um período de 5 minutos em temperatura de 37°C. Em seguida os fragmentos foram retirados da solução e acondicionados em solução de formaldeído 10% por um período de 24 horas, para depois serem escaneados. O mecanismo pelo qual o TTC reage com os cardiomiócitos foi descrito por diversos autores (NACHLAS; SHNITKA e 1963; RAMKISSON, 1966; KLEIN et al, 1981; PICH et al, 1988). Basicamente, o TTC marca em vermelho o miocárdio, devido à atividade da enzima desidrogenase láctica. A ausência da atividade desta enzima caracteriza infarto do miocárdio, na qual não há marcação tecidual.

### **3.6 Avaliação do Desequilíbrio Oxidativo**

#### **3.6.1 Glutationa Reduzida (GSH) e Malondialdeído (MDA)**

A razão GSH/GSSG é considerada um marcador de desequilíbrio oxidativo (JONES, 2006). Esse ensaio foi baseado na reação da GSH com 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) que produz o 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB) (RAHMAN; KODE e BISWAS, 2006). A taxa de formação de TNB, mensurada espectrofotometricamente, é proporcional à concentração de GSH na amostra. A concentração da amostra é determinada pelo cálculo realizado após regressão linear gerada a partir de uma curva padrão de GSH.

Alíquotas de homogeneizado de coração foram tratadas com ácido sulfossalicílico na proporção de 1:1, e centrifugadas a 2000 rpm por 10min. Os

ensaios foram realizados separadamente e utilizaram 200  $\mu$ l do sobrenadante para leitura da GSH. Após o preparo das amostras, as leituras foram realizadas adicionando-se 1.400 $\mu$ l tampão fosfato de potássio (KPE), 200  $\mu$ l de amostra, 120  $\mu$ l de DTNB, 120  $\mu$ l de glutathione redutase (GR) e 120  $\mu$ l de nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato (NADPH). A mistura foi homogeneizada e a absorbância mensurada em espectrofotômetro (Amersham - Biosciences mod Ultrospec 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer, Inglaterra) a 412 nm, em um tempo de 120 s, com intervalos de 30 s.

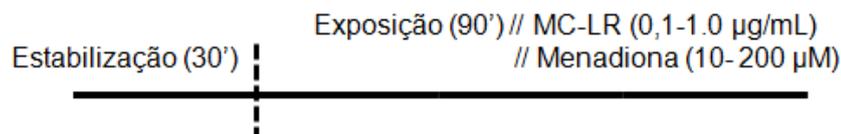
Para a análise da peroxidação lipídica, foi utilizado o método de quantificação de ROS com ácido tiobarbitúrico (TBARS, a sigla em inglês) descrito por Draper e Hadley (1990). Este método consiste na capacidade do subproduto da lipoperoxidação, o malondialdeído (MDA), reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA) a temperatura de 100 °C. Ou seja, quanto mais lipídios oxidados, maior concentração de MDA, maior reação com o TBA, maior absorbância no comprimento de onda de 532 nm. Uma curva padrão com o MDA em diversas concentrações foi produzida. A concentração de TBARS foi normalizada com a concentração protéica da amostra. Os resultados são expressos em nM (GSH) e  $\mu$ M (MDA).

### **3.7 Procedimentos experimentais**

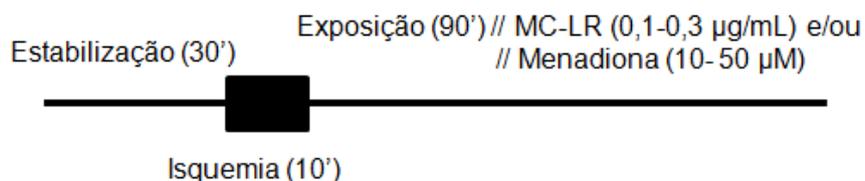
O coração foi perfundido por um período controle de 30 minutos, logo em seguida a solução nutritiva fisiológica, foi trocada por uma solução nutritiva contendo a substância (MC-LR ou/e menadiona) e avaliado por 90 minutos. O protocolo experimental foi dividido em cinco grupos, (n=4) sendo estes: a) perfusão de microcistina-LR nas concentrações (0,1; 0,3 e 1.0  $\mu$ g/mL), b) perfusão de menadiona nas concentrações (10; 50 e 200  $\mu$ M), c) perfusão de menadiona nas concentrações (10 e 50  $\mu$ M) associada à microcistina-LR nas concentrações (0,1 e 0,3  $\mu$ g/mL), d) isquemia por 10 minutos e perfusão de microcistina-LR nas concentrações (0,1 e 0,3  $\mu$ g/mL), e) isquemia por 10 minutos e perfusão da microcistina-LR nas concentrações (0,1 e 0,3  $\mu$ g/mL) associada a menadiona nas concentrações (10 e 50  $\mu$ M), f) perfusão de microcistina-LR nas concentrações (0,1 -0,3  $\mu$ g/mL). Em todos os

protocolos experimentais foram avaliados os parâmetros elétricos e mecânicos, as amostras de perfusato cardíaco foram coletadas a cada 30 minutos de reperfusão e armazenadas em tubos de ensaios contendo, inibidor de proteases como albumina 2% e armazenados em temperatura de 10°C, para posterior análise enzimática. Ao final dos experimentos todos os corações foram retirados do Langendorff e seccionados para avaliação morfológica da atividade da desidrogenase láctica. Exceto o (grupo f) (n=3) que ao final do experimento, os corações foram retirados do Langendorff homogenizados e armazenados em freezer -70°C para posterior avaliação do desequilíbrio oxidativo.

#### PROTOCOLO I



#### PROTOCOLO II



### 3.8 Estatística

Os resultados obtidos são expressos como média  $\pm$  EPM e foram analisados estatisticamente usando o teste ANOVA com pós-teste Tukey com  $p < 0,05$  sendo considerado significativo.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Efeito de diferentes concentrações da MC-LR na atividade mecânica, elétrica e enzimática de corações isolados de camundongos.

Os corações de camundongos foram perfundidos com a solução nutritiva por um período de estabilização de 30 minutos. Em todo período de estabilização, ou seja, período controle, não foram identificados valores de tensão de contração, frequência cardíaca e amplitude do complexo QRS estatisticamente diferentes dos valores normais esperados.

A avaliação da atividade mecânica cardíaca, ou seja, a tensão cardíaca expressa em percentual do controle mostrou que a exposição à microcistina-LR gerou citotoxicidade cardíaca, uma vez que apresentou redução da tensão cardíaca ao longo de 90 minutos de exposição à toxina (figura 7). A MC-LR na concentração 0,1 µg/mL de MC-LR apesar de apresentar redução média de 25% (figura 8), não mostrou diferença significativa no percentual de tensão cardíaca em relação ao controle. Entretanto, a MC-LR nas concentrações 0,3 µg/mL e 1,0 µg/mL apresentou  $42 \pm 8,0\%$  ( $p < 0,05$ ) e  $58 \pm 5,0\%$  ( $p < 0,05$ ) (figura 8) de redução do percentual da tensão cardíaca respectivamente em relação ao controle. Estes resultados mostraram que os efeitos são dependentes da concentração de MC-LR testada e do tempo de perfusão avaliado.

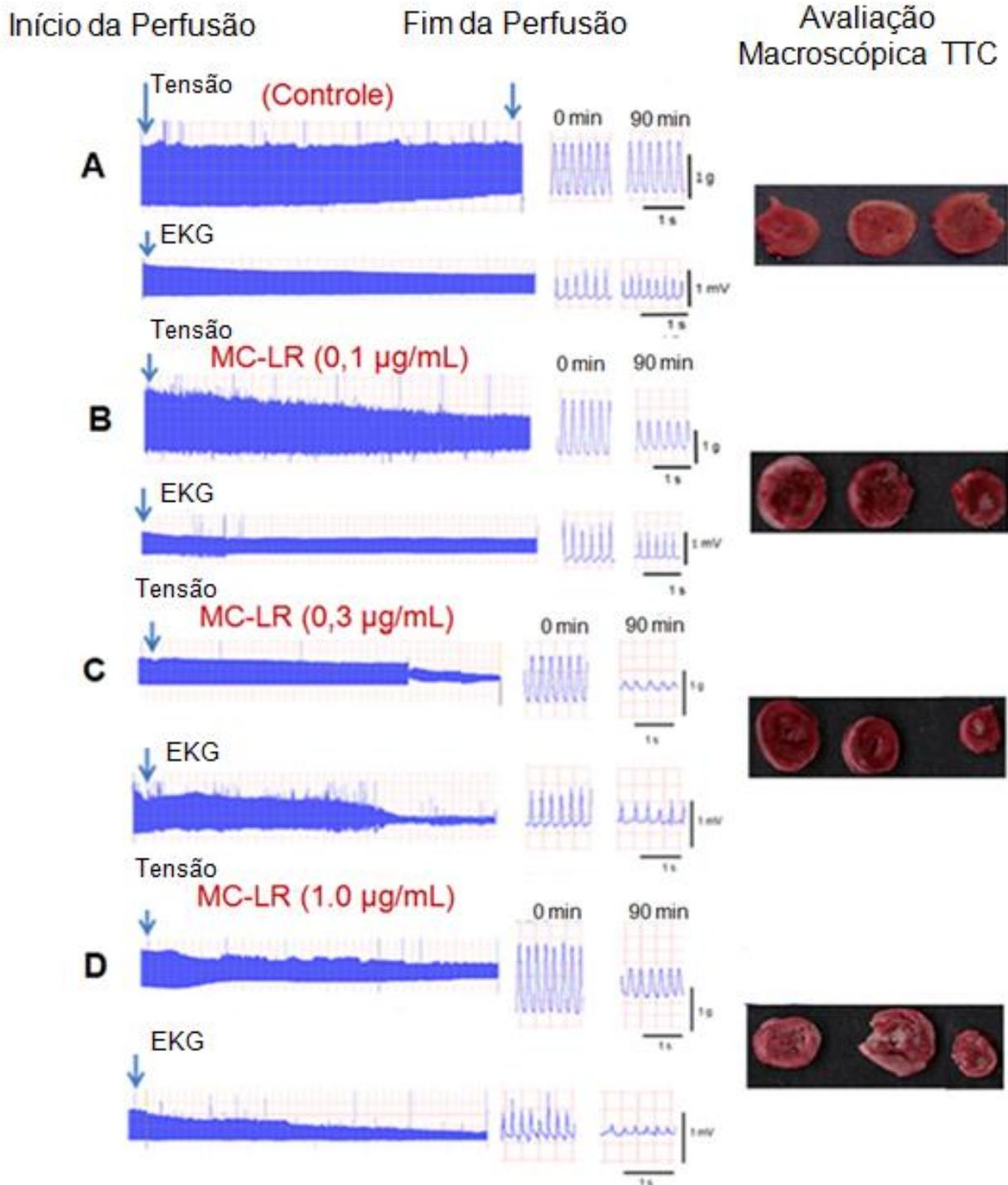
Em todos os experimentos de exposição à MC-LR, os registros de tensão cardíaca não apresentaram perda total em 100% da tensão cardíaca desenvolvida. Ou seja, é possível afirmar que a exposição à MC-LR nas concentrações (0,1; 0,3 e 1,0 µg/mL) em coração isolado de camundongo não causou contratatura miocárdica. As concentrações (0,3 e 1,0 µg/mL) revelaram ao longo do tempo, perfis similares de tensão cardíaca, marcado pelo aumento da linha de base e incapacidade de desenvolver tensão cardíaca máxima basal, quando comparado com o controle (figura 7). Tais características podem indicar que a citotoxicidade pela exposição à MC-LR ao longo do tempo, pode ser capaz de gerar uma possível incapacidade de contração e relaxamento adequado dos cardiomiócitos, levando a queda da função contrátil.

As análises bioquímicas do conteúdo de creatina kinase liberada no perfusato cardíaco, revelaram aumento de mais de 100% quando comparado aos níveis basais. A MC-LR na concentração 0,1 µg/mL não apresentou diferença significativa na quantidade de creatina kinase liberada ao longo dos 90 minutos de perfusão, quando comparado com o controle (figura 9). Entretanto, a MC-LR nas concentrações 0,3 µg/mL e 1,0 µg/mL apresentaram os valores de  $1.295,00 \pm 96,10$  e  $1.009,37 \pm 713,82$  U.g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> de creatina kinase, respectivamente, ou seja, aumentos que superaram cerca de 500,00 U.g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, no final de 90 minutos de perfusão.

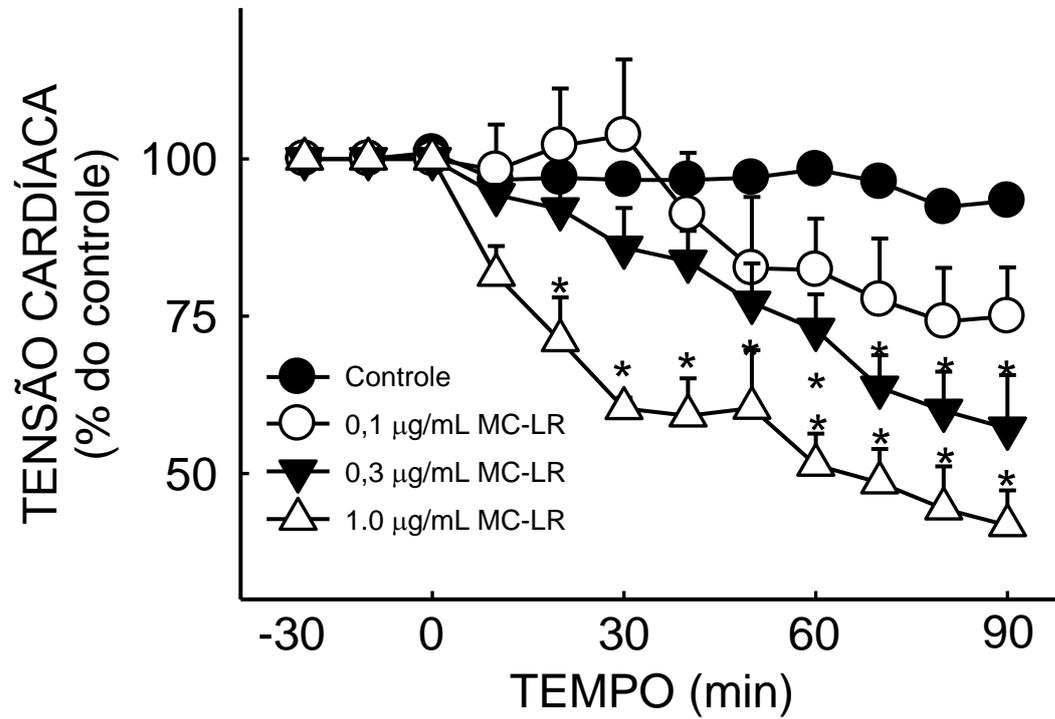
O aumento da liberação de creatina kinase no perfusato cardíaco, acima descrito, e a avaliação enzimática macroscópica por TTC do tecido miocárdico após processamento, revelaram imagens sugestivas de danos teciduais (figura 7). A MC-LR nas concentrações (0,1 e 0,3 µg/mL) apresentaram área total corada em vermelho de forma homogênea, enquanto a MC-LR na concentração 1,0 µg/mL apresentou reduzida impregnação a este corante quando comparado ao controle.

Após o período de estabilização os corações expostos às concentrações 0,1 µg/mL e 0,3 µg/mL de MC-LR não apresentaram diferença significativa no percentual de frequência cardíaca. Entretanto, a MC-LR na concentração 1,0 µg/mL apresentou cerca de  $70\% \pm 2,48$  ( $p < 0,05$ ) de redução do percentual da frequência cardíaca, em relação ao controle no final de 90 minutos de avaliação (figura 10).

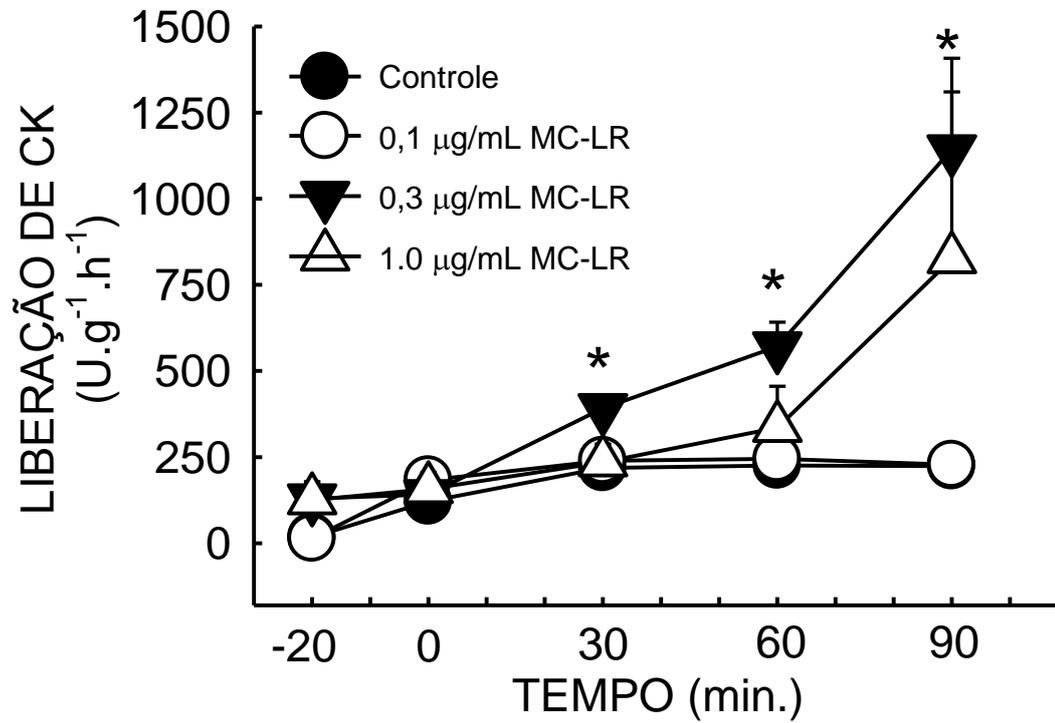
A MC-LR em todas as concentrações testadas houve redução do percentual da amplitude do complexo QRS após 90 minutos de perfusão. Ou seja, reduções de  $48 \pm 5,0\%$ ;  $58 \pm 10,0\%$  e  $74 \pm 5,0\%$  ( $p < 0,05$ ) nas concentrações de 0,1; 0,3 e 1,0 µg/mL de MC-LR respectivamente (figura 11).



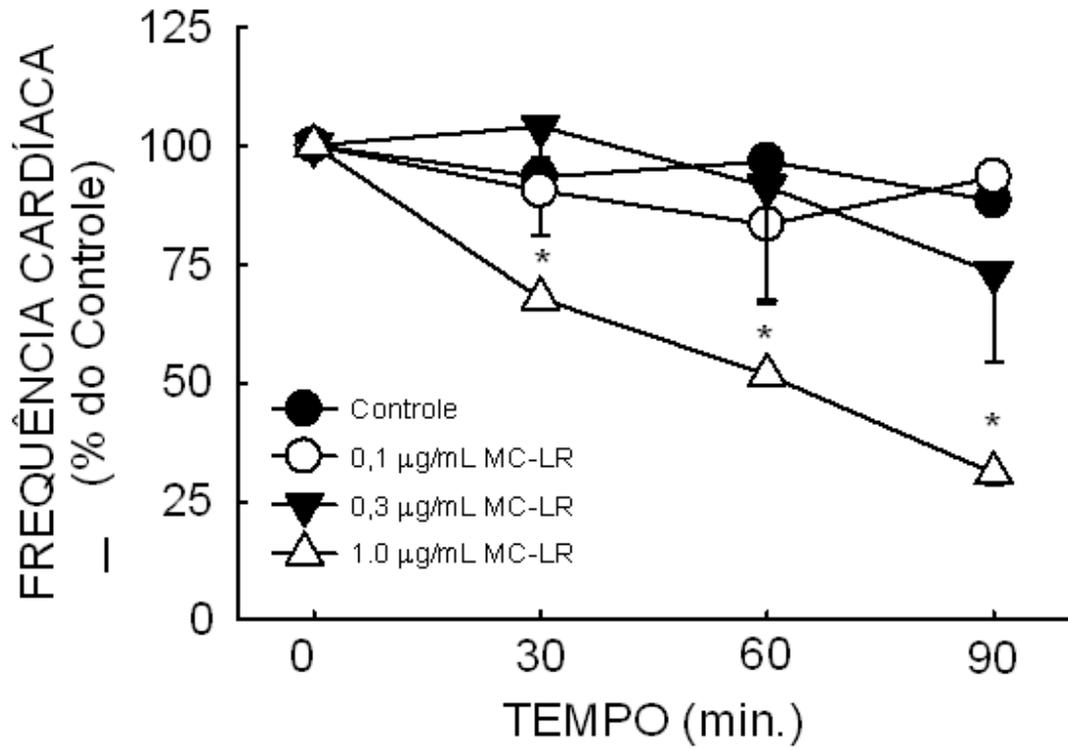
**Figura 7- Registros da tensão cardíaca e eletrocardiograma dos corações isolados de camundongos.** Exposição à MC-LR por 90 minutos concentrações utilizadas (0,1; 0,3 e 1.0  $\mu\text{g/mL}$ ). Nos registros de tensão cardíaca, cada quadrado na ordenada corresponde a 0,33 gramas e na abcissa 0,33 segundos. Nos registros do EKG na ordenada corresponde 0,4 mV e na abcissa 0,33 segundos. **(A)** Registro de Tensão e Eletrocardiograma (EKG) Controle **(B)** Registro de Tensão e Eletrocardiograma (EKG) de 0,1  $\mu\text{g/mL}$  de MC-LR. **(C)** Registro de Tensão e Eletrocardiograma (EKG) de 0,3  $\mu\text{g/mL}$  de MC-LR. **(D)** Registro de Tensão e Eletrocardiograma (EKG) de 1.0  $\mu\text{g/mL}$  de MC-LR. A, B, C, D observam-se os cortes transversais (0,5 cm) de coração de camundongo na presença de trifetil tetrazolium. A marcação em vermelho indica preservação tecidual, e áreas esbranquiçadas indicam lesão tecidual.



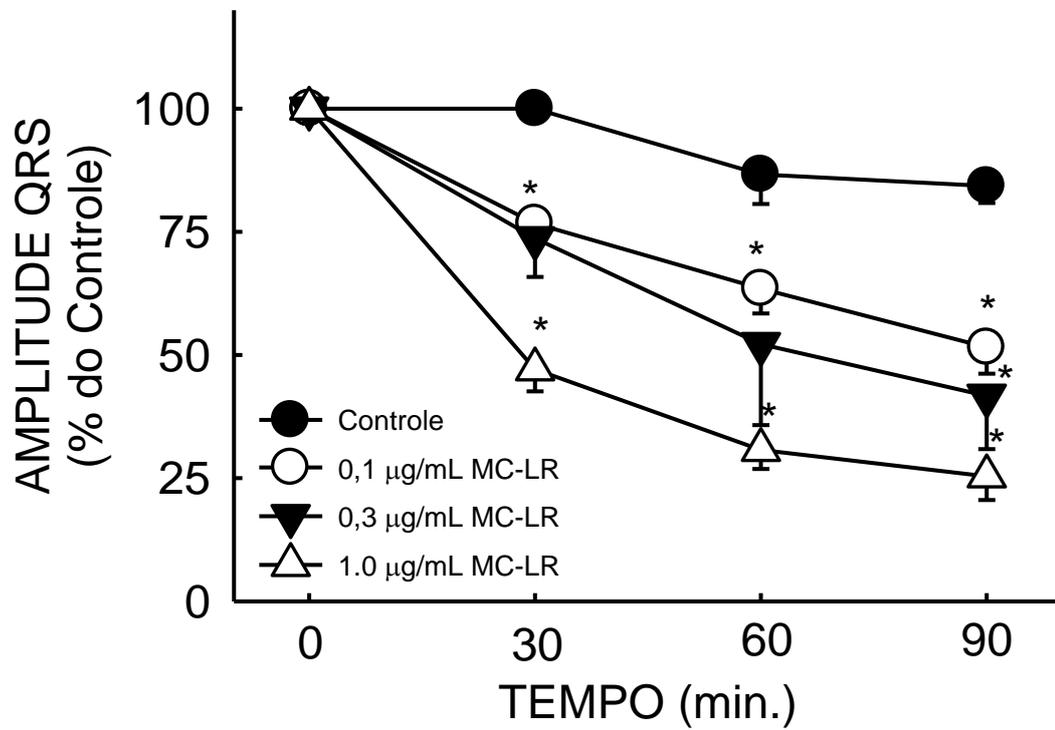
**Figura 8- Efeito na tensão cardíaca de corações isolados de camundongos expostos à toxina microcistina-LR.** Ordenada: Tensão cardíaca. Abcissa: tempo de perfusão nas diferentes concentrações de MC-LR (0,1 µg/mL; 0,3 µg/mL e 1.0 µg/mL). Os dados estão expressos como % da tensão controle. Os valores expressam a média ± EPM (n=4, \*p< 0.05).



**Figura 9- Avaliação do conteúdo de creatina kinase liberado no perfusato cardíaco de corações de camundongo isolado expostos à microcistina-LR.** Os resultados são expressos em  $\text{U.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$  de perfusato coronariano. Os corações perfundidos com a MC-LR nas concentrações (0,1; 0,3; 1,0  $\mu\text{g/mL}$ ). Os valores encontrados foram crescentes na avaliação temporal e expressam a média  $\pm$  EPM ( $n=4$ ,  $*p<0,05$ ).



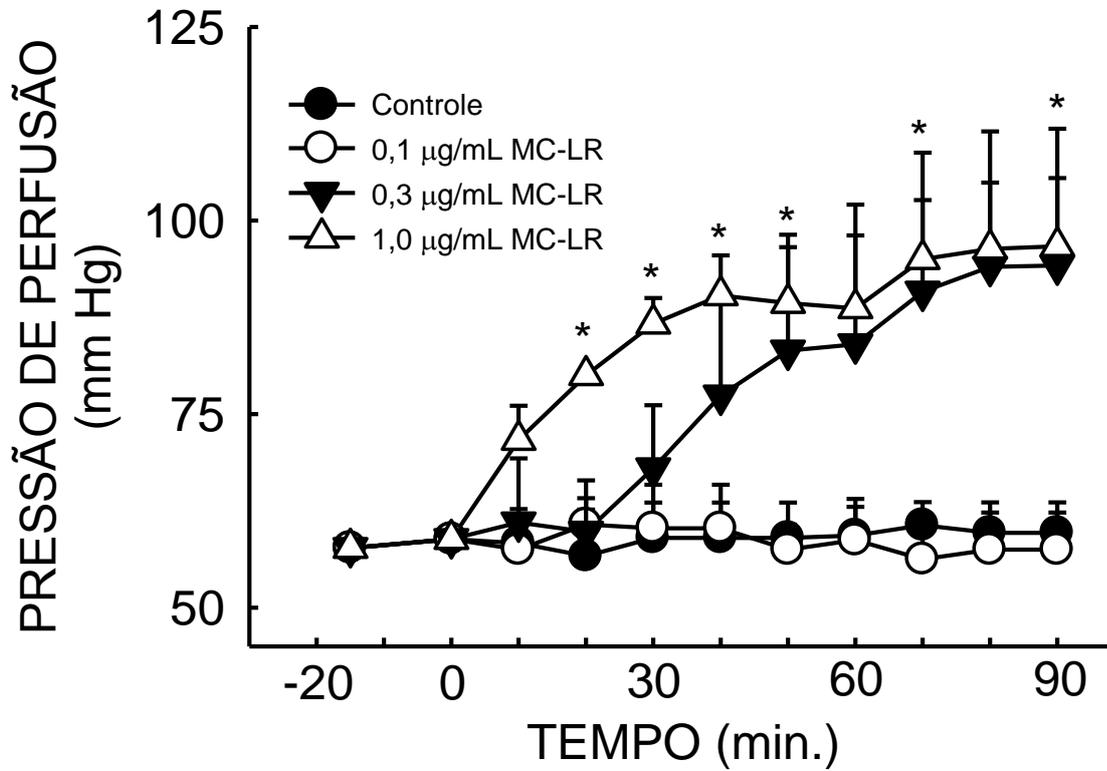
**Figura 10 - Avaliação da Frequência Cardíaca.** Os valores são expressos em % da redução dos valores do controle ao longo dos 90 minutos de avaliação de perfusão pela toxina microcistina-LR nas concentrações (0,1; 0,3 e 1,0 µg/mL). Os valores expressam a média  $\pm$  EPM (n=4, \* p<0,05).



**Figura 11 - Avaliação da Amplitude do complexo QRS.** Os valores são expressos em % da redução dos valores do controle ao longo dos 90 minutos de avaliação de perfusão pela toxina microcistina-LR nas concentrações (0,1; 0,3 e 1.0 µg/mL). Os valores expressam a média  $\pm$  EPM ( $n=4$ , \*  $p<0,05$ ).

#### **4.2 Efeito da pressão de perfusão após exposição à MC-LR.**

Os corações de camundongos controles perfundidos com a solução nutritiva, em todo período de estabilização, não apresentaram valores estaticamente diferentes de pressão de perfusão coronariana. De forma semelhante, os corações expostos à concentração de 0,1 µg/mL de MC-LR também não apresentaram modificações na pressão de perfusão coronariana após 90 minutos de exposição. Entretanto, a MC-LR nas concentrações de 0,3 e 1.0 µg/mL, apresentou aumento de 30 mm Hg aproximadamente, ao longo dos 90 minutos de avaliação (figura 12). Os resultados mostraram também que a concentração 1.0 µg/mL de MC-LR desencadeou o aumento da pressão de perfusão em menor tempo quando comparado com a concentração 0,3 µg/mL de MC-LR. Tais resultados sugerem que possivelmente o aumento da pressão de perfusão coronariana pode estar relacionado à exposição a microcistina-LR.



**Figura 12- Avaliação da pressão de perfusão coronariana de corações expostos à microcistina-LR.** Ordenada: Pressão de perfusão em (mm Hg) nas concentrações (0,1; 0,3 e 1,0 µg/mL de MC-LR) ao longo de 90 minutos de avaliação. Os valores expressam a média  $\pm$  EPM (n=4, \*p< 0.05).

### **4.3 Efeito da MC-LR associada a diferentes concentrações de menadiona na atividade mecânica, elétrica e enzimática de coração isolado de camundongos.**

Após o período de estabilização, no qual não foram identificados valores de tensão de contração, frequência cardíaca e amplitude do complexo QRS estatisticamente diferentes, conforme o esperado, os corações dos camundongos foram perfundidos com a solução nutritora contendo menadiona nas concentrações (10, 50 e 200  $\mu\text{M}$ ).

Foram observados valores estatisticamente diferentes nos protocolos de exposição a menadiona a partir das concentrações de 50 e 200  $\mu\text{M}$ . Os valores de percentual de tensão cardíaca chegaram à zero no final de 90 minutos, mostrando que a citotoxicidade da menadiona nos cardiomiócitos é dependente da concentração e do tempo (figura 13).

Com base nos perfis de injúria cardíaca, gerados pelas concentrações crescentes de menadiona (figura 15a), foi escolhida as concentrações de 10 e 50  $\mu\text{M}$  para ser testada em associação à microcistina-LR.

Na avaliação da tensão cardíaca, a administração da microcistina-LR nas concentrações 0,1 e 0,3  $\mu\text{g/mL}$  associada a 50  $\mu\text{M}$  de menadiona, mostrou aumento da citotoxicidade da menadiona, quando comparado aos efeitos da menadiona sozinha (figura 15b). Os resultados mostraram que após 40 minutos de exposição, a menadiona 50  $\mu\text{M}$  sozinha apresentou 25% de redução do percentual de tensão cardíaca, entretanto, este mesmo tempo de exposição à menadiona 50  $\mu\text{M}$  em associação a 0,3  $\mu\text{g/mL}$  de MC-LR, apresentou 75% de redução do percentual de tensão cardíaca. Desta forma é possível indicar que a microcistina-LR em associação a menadiona foi capaz de gerar efeito aditivo, sendo este concentração e tempo dependente (figura 15b).

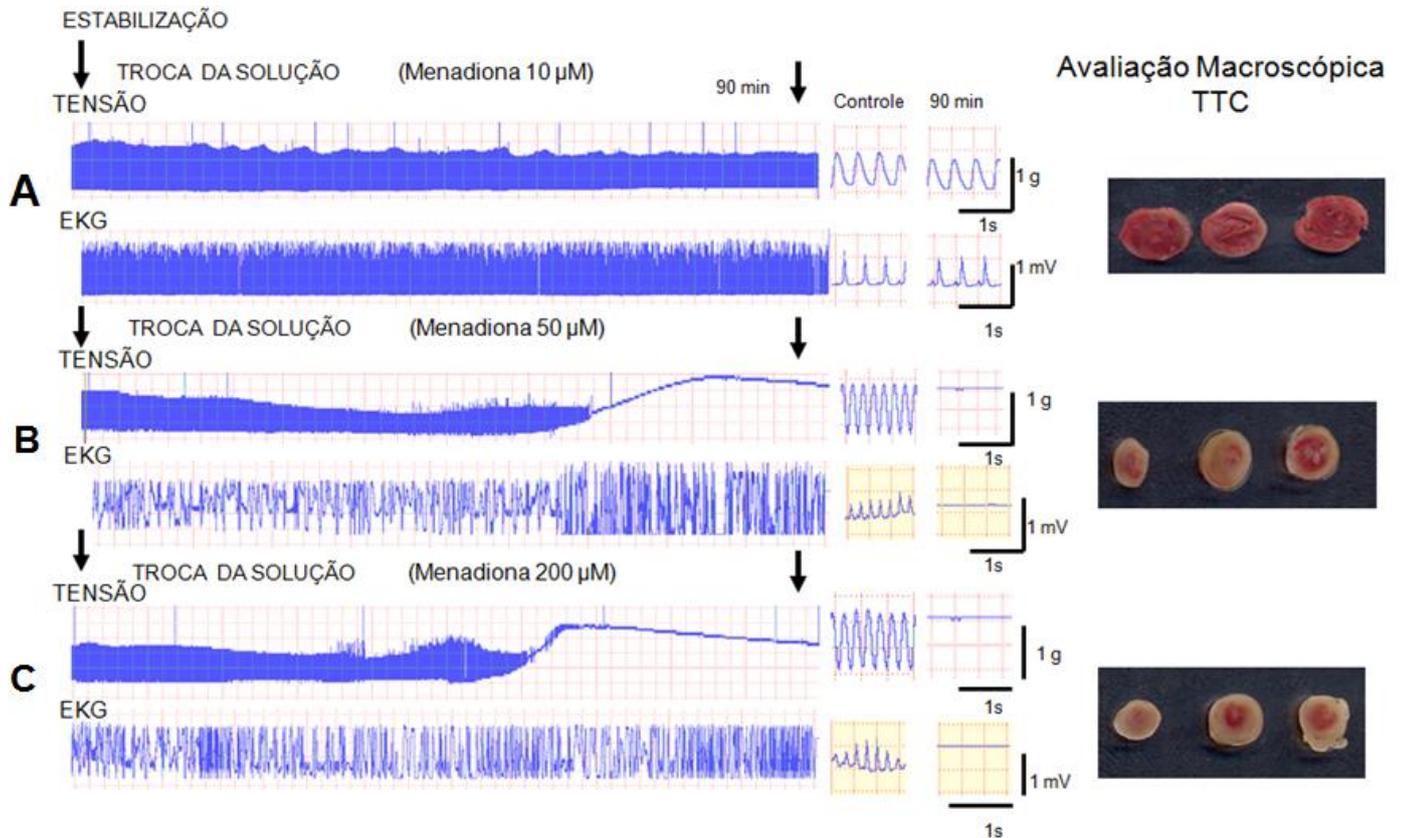
A análise bioquímica do conteúdo de creatina kinase liberada no perfusato cardíaco, pela exposição à menadiona (50  $\mu\text{M}$ ) revelou aumento de mais de 100% quando comparado aos níveis basais do controle (figura 16). A adição de 0,1  $\mu\text{g/mL}$  de MC-LR neste protocolo não apresentou diferença significativa na quantidade de

creatina kinase liberada ao longo dos 90 minutos de perfusão. Entretanto, a adição de 0,3 µg/mL de MC-LR apresentou o aumento na liberação enzimática de  $1.791,16 \pm 559,05$  para  $3.093,75 \pm 6,25$  U.g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, ou seja, aumentos que superaram cerca de 1.000,00 U.g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> no final de 90 minutos de perfusão (figura 16).

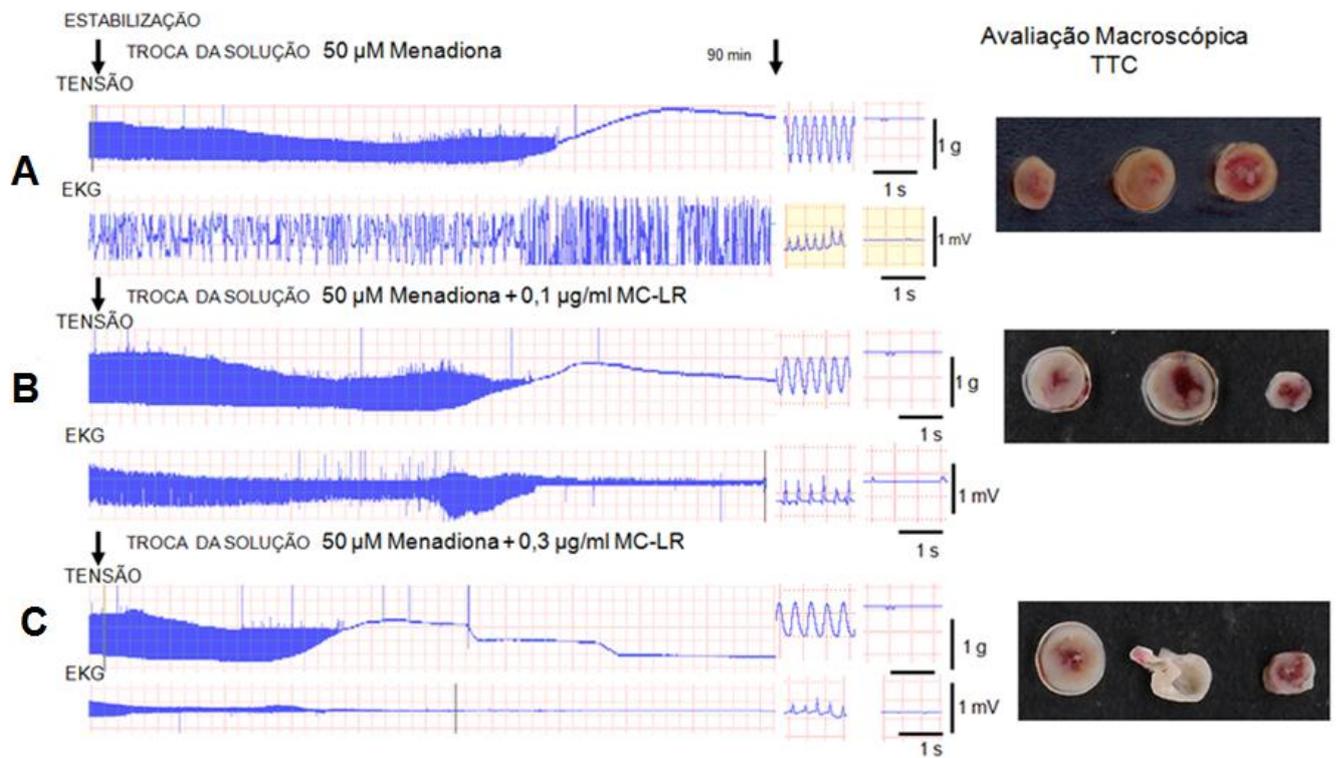
Paralelamente a este achado, a avaliação enzimática macroscópica por TTC do tecido miocárdico após processamento mostrou que os corações de camundongos expostos à infusão de solução contendo menadiona (50 µM) e microcistina-LR apresentaram intensificação de danos teciduais, quando comparados ao controle (figura 14).

Na avaliação elétrica cardíaca, a exposição à menadiona na concentração 10 µM, não revelou alteração no percentual de frequência cardíaca nem mesmo no percentual da amplitude do complexo QRS. Entretanto, as concentrações 50 e 200 µM de menadiona causaram em 30 minutos de exposição redução de 60% e 100% respectivamente ( $p < 0,05$ ) para ambos os parâmetros (figura 17a) e (figura 18a).

A adição de 0,1 ou 0,3 µg/mL de MC-LR em 50 µM de menadiona, não resultou em alteração significativa na atividade elétrica, no que diz respeito à frequência cardíaca e amplitude do complexo QRS (figura 17b,c) e (figura 18b,c).



**Figura 13- Registros da tensão cardíaca dos corações isolado de camundongos expostos a diferentes concentrações de menadiona.** Exposição à menadiona por 90 minutos concentrações utilizadas (10, 50 e 200 µg/mL). Nos registros de tensão cardíaca, cada quadrado na ordenada corresponde a 0,33 gramas e na abcissa 0,33 segundos. **(A)** Registro de Tensão e EKG após 10 µM de menadiona **(B)** Registro de Tensão e EKG após 50 µM de menadiona. **(C)** Registro de Tensão e EKG após 200 µM de menadiona. A, B e C observam-se os cortes transversais (0,5 cm) de coração de camundongo na presença de trifetil tetrazolium. A marcação em vermelho indica preservação tecidual, e áreas esbranquiçadas indicam lesão tecidual.



**Figura 14- Registros da tensão cardíaca dos corações isolado de camundongos expostos à concentração de 50  $\mu$ M de menadiona e diferentes concentrações de MC-LR.** Exposição à microcistina-LR nas concentrações (0,1 e 0,3  $\mu$ g/mL), associada à concentração de 50  $\mu$ M de menadiona, durante 90 minutos. Nos registros de tensão cardíaca, cada quadrado na ordenada corresponde a 0,33 gramas e na abcissa 0,33 segundos. **(B)** Registro de Tensão e EKG após 50  $\mu$ M de menadiona **(A)** Registro de Tensão e EKG após 50  $\mu$ M de menadiona e 0,1  $\mu$ g/mL de MC-LR. **(C)** Registro de Tensão e EKG após 50  $\mu$ M de menadiona e 0,3  $\mu$ g/mL de MC-LR. A, B e C observam-se os cortes transversais (0,5 cm) de coração de camundongo na presença de trifetil tetrazolium. A marcação em vermelho indica preservação tecidual, e áreas esbranquiçadas indicam lesão tecidual.

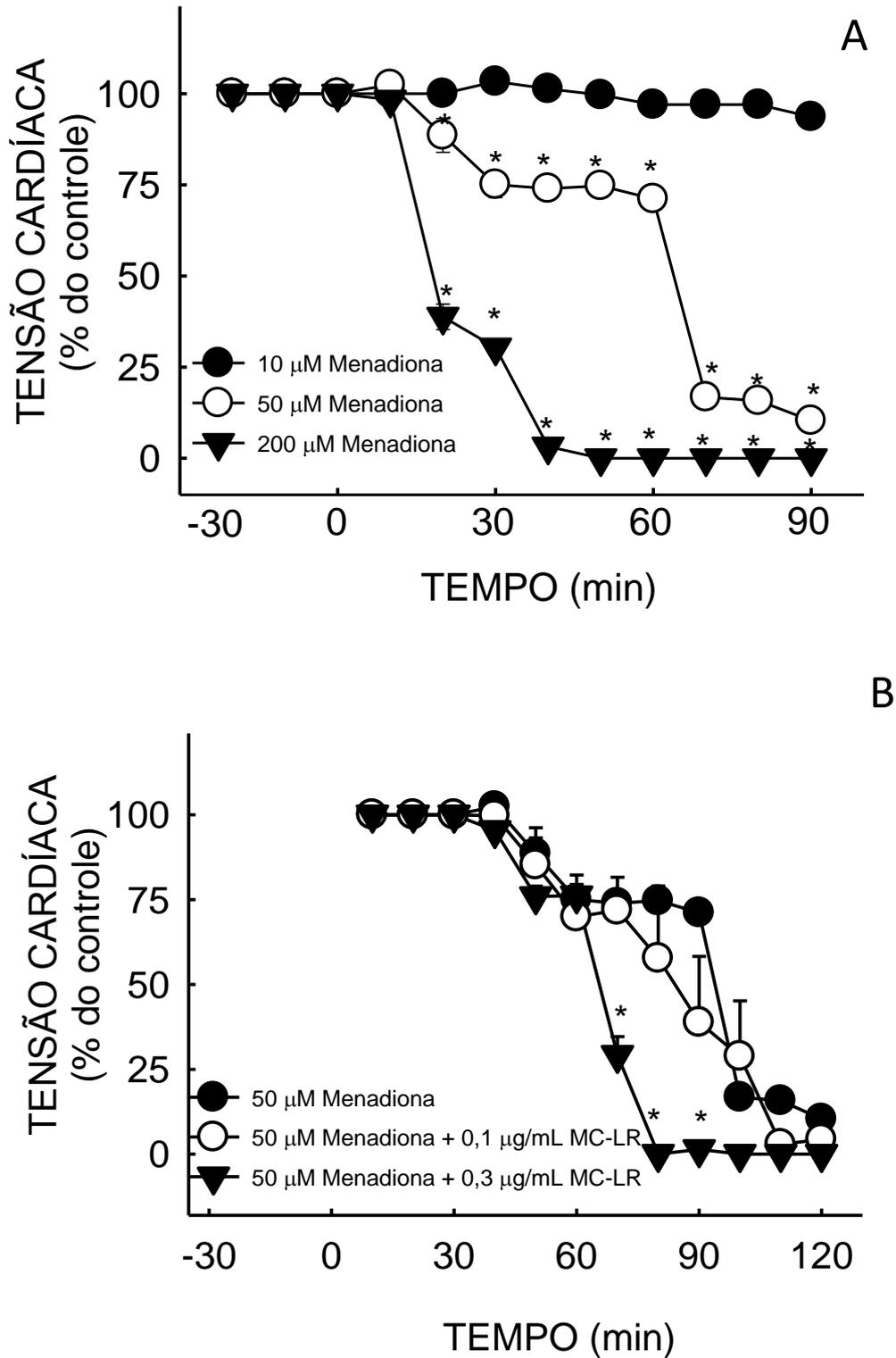
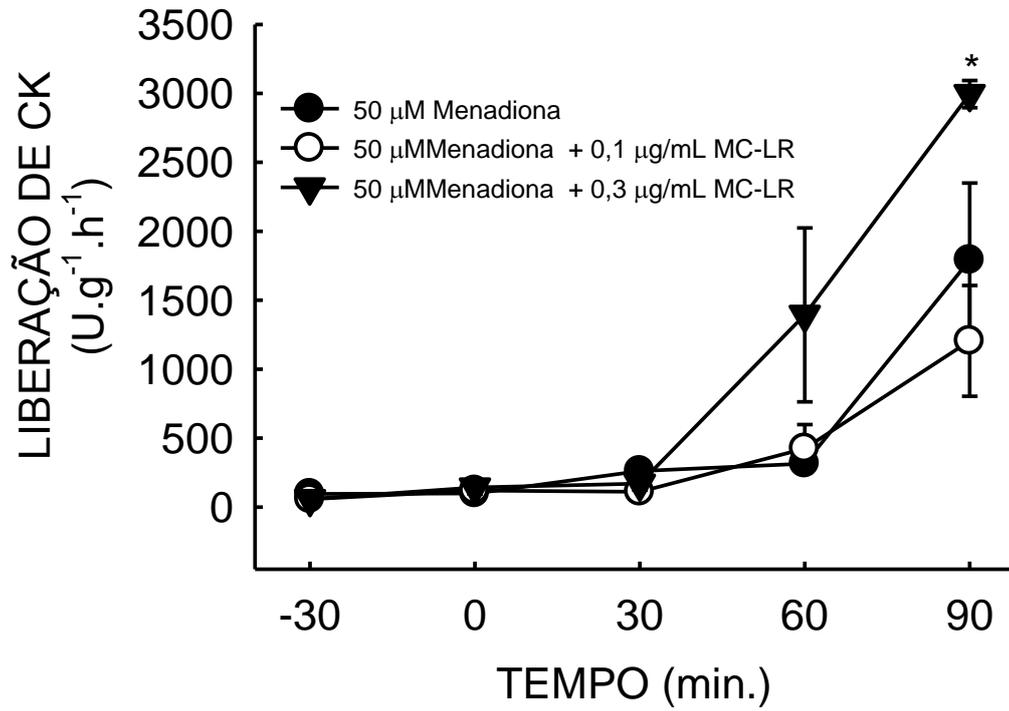


Figura 15 A) Avaliação do percentual de tensão cardíaca de corações expostos diferentes concentrações de menadiona. B) percentual de tensão cardíaca de corações expostos a diferentes concentrações de microcistina-LR associado a 50  $\mu\text{M}$  de menadiona. Ordenada: Tensão cardíaca. Abcissa: tempo de perfusão nas diferentes concentrações de MC-LR em associação a 50  $\mu\text{M}$  de menadiona. Os dados estão expressos como % da tensão controle. Os valores expressam a média  $\pm$  EPM ( $n=4$ ,  $*p < 0.05$ ).



**Figura 16- Avaliação da liberação de creatina kinase no perfusato cardíaco de corações expostos a microcistina-LR em associação a menadiona.** Ordenada: Liberação de creatina kinase após exposição de microcistina-LR nas concentrações (0,1 e 0,3 μg/mL de MC-LR) + 50 μM de menadiona ao longo do tempo. Os valores expressam a média ± EPM (n=4, \*p< 0.05).

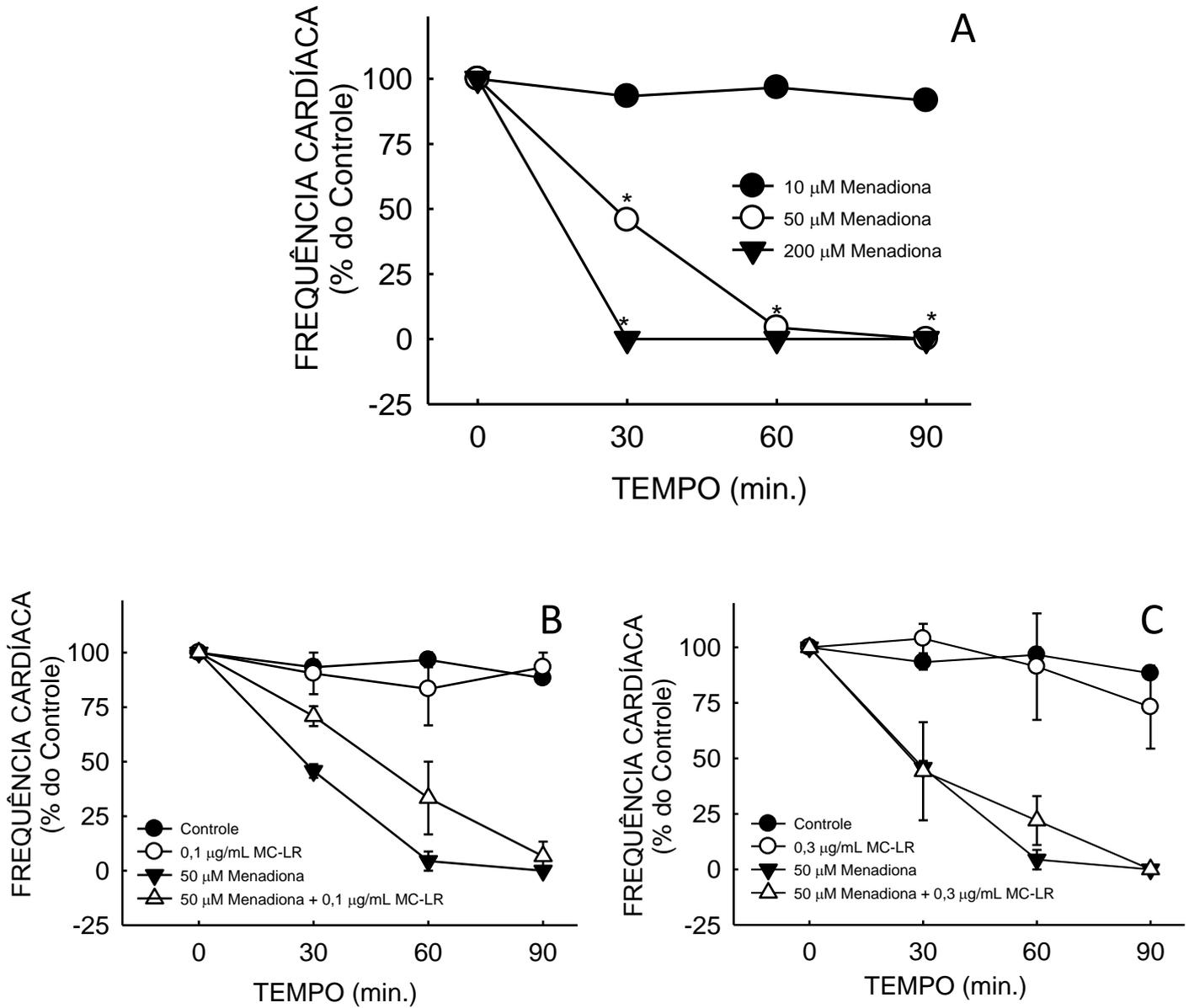
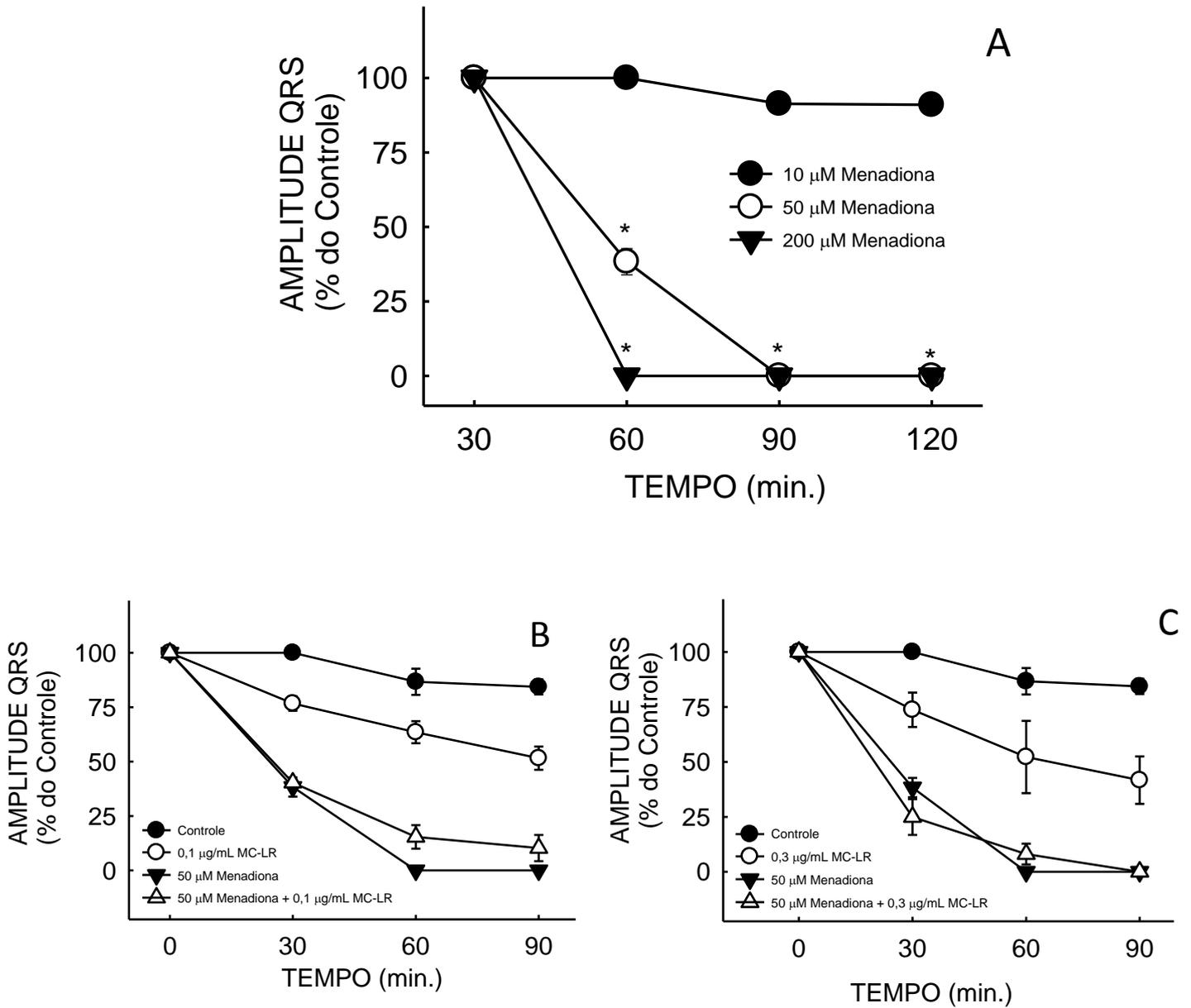


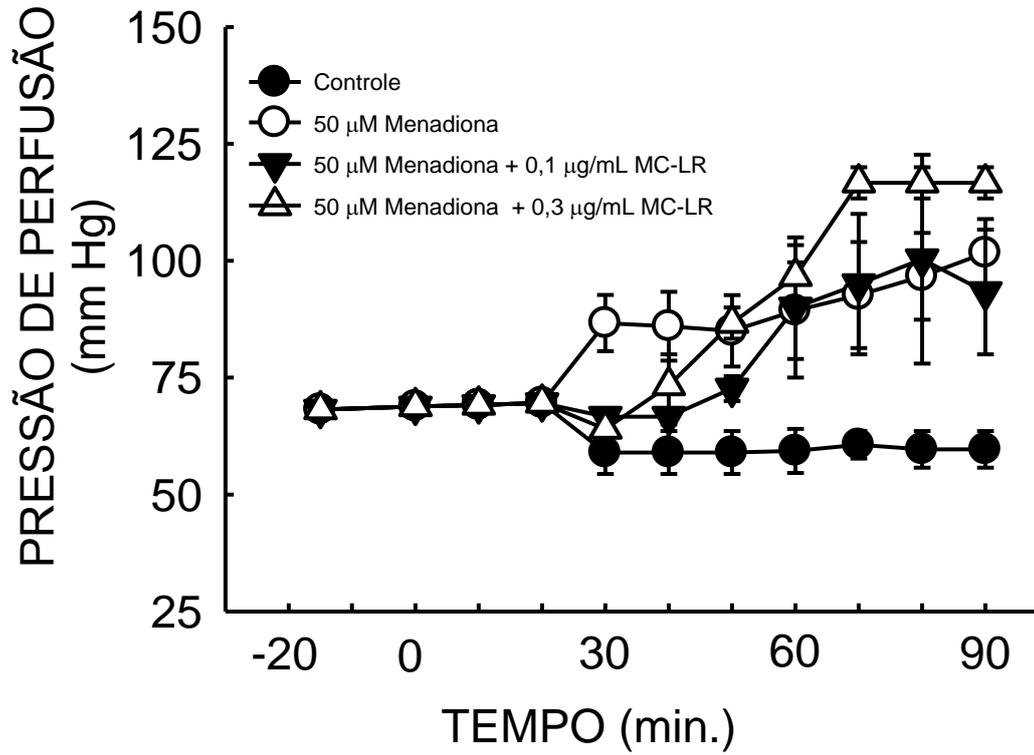
Figura 17 A) Avaliação da frequência cardíaca de corações expostos a diferentes concentrações de menadiona. B) Avaliação da frequência cardíaca de corações expostos 50  $\mu$ M de menadiona associado a 0,1  $\mu$ g/mL de MC-LR. C) Avaliação da frequência cardíaca de corações expostos 50  $\mu$ M de menadiona associado a 0,3  $\mu$ g/mL de MC-LR. Ordenada: Percentual da frequência cardíaca ao longo do tempo. Os valores expressam a média  $\pm$  EPM (n=4, \*p< 0.05).



**Figura 18** A) Avaliação da amplitude do complexo QRS de corações expostos a diferentes concentrações de menadiona. B) Avaliação da amplitude do complexo QRS de corações expostos 50  $\mu$ M de menadiona associado a 0,1  $\mu$ g/mL de MC-LR. c) Avaliação da amplitude do complexo QRS de corações expostos 50  $\mu$ M de menadiona associado a 0,3  $\mu$ g/mL de MC-LR. Ordenada: Percentual da frequência cardíaca ao longo do tempo. Os valores expressam a média  $\pm$  EPM (n=4, \*p< 0.05).

#### **4.4 Efeito da pressão de perfusão após exposição à menadiona associado à MC-LR .**

Após o período de estabilização, os corações de camundongos expostos à solução nutritiva contendo microcistina-LR (0,1 e 0,3  $\mu\text{g/mL}$ ), em associação a menadiona (50  $\mu\text{M}$ ), não apresentaram, de forma significativa, potencialização dos efeitos na pressão de perfusão coronariana quando comparados aos efeitos gerados pela menadiona sozinha na concentração de 50  $\mu\text{M}$  (figura 19).



**Figura 19- Avaliação da pressão de perfusão coronariana de corações expostos à microcistina-LR.** Ordenada: Pressão de perfusão em (mm Hg) nas concentrações (0,1 e 0,3  $\mu$ g/mL de MC-LR) em associação a 50  $\mu$ M ao longo do tempo. Os valores expressam a média  $\pm$  EPM (n=4, \*p< 0.05).

#### **4.5 Efeito de diferentes concentrações da MC-LR na atividade mecânica, elétrica e enzimática de coração isolado de camundongos expostos à isquemia.**

Os corações de camundongos foram perfundidos com a solução nutritora por um período de estabilização de 30 minutos. Em todo período de estabilização, ou seja, período controle, os valores de tensão de contração, frequência cardíaca e amplitude do complexo QRS não foram estatisticamente diferentes, como esperado para o controle.

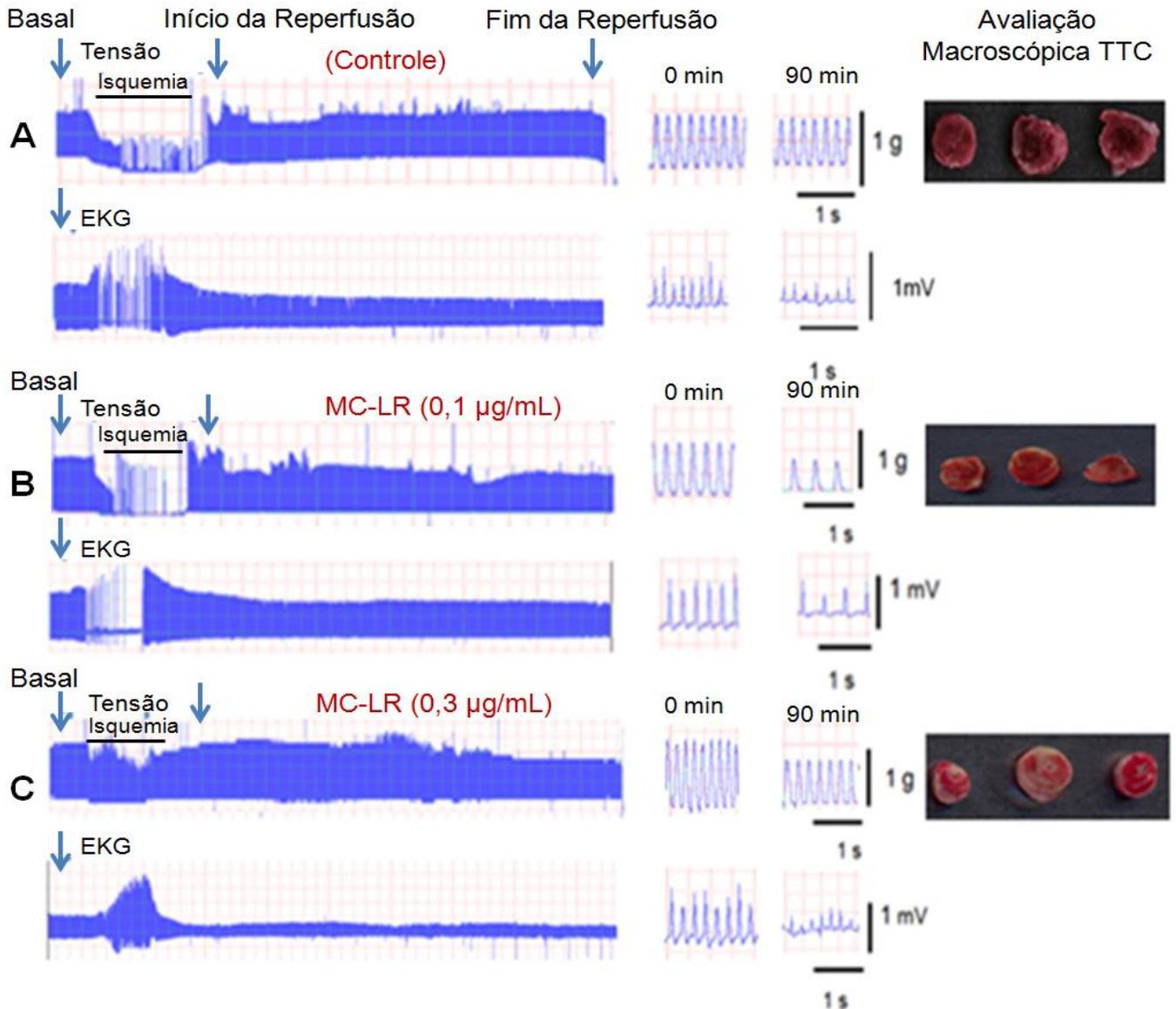
Os resultados do percentual de tensão cardíaca dos corações expostos à MC-LR, após o período de isquemia, ou seja, reperfusão mostraram valores estatisticamente diferentes, nas concentrações de MC-LR testadas, quando comparado ao controle, sendo  $56 \pm 5,0\%$  ( $p < 0,05$ ) e  $55 \pm 12,0\%$  ( $p < 0,05$ ), para 0,1 e 0,3  $\mu\text{g/mL}$  MC-LR, respectivamente. Neste sentido, apresentaram redução de aproximadamente 50 % do percentual da tensão cardíaca no final de 90 minutos de avaliação (figura 21). Ambas as concentrações de MC-LR após a isquemia causaram reduções no percentual da tensão cardíaca de forma semelhante.

Os valores de creatina kinase após o período de isquemia foram cerca de 200,00  $\text{U.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (figura 22). Entretanto, esta liberação basal ao longo da avaliação, não teve diferença significativa em relação ao período controle. A concentração 0,1  $\mu\text{g/mL}$  de MC-LR apesar de gerar um aumento de  $143,75 \pm 93,75$  para  $511,25 \pm 276,25$   $\text{U.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , após 90 minutos de perfusão, também não foi significativamente em relação ao controle. No entanto, a concentração de 0,3  $\mu\text{g/mL}$  de MC-LR provocou o aumento de  $95,83 \pm 13,05$  para  $828,21 \pm 176,99$   $\text{U.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , ou seja, aumento em torno de 760% ao final de 90 minutos de perfusão, com  $p < 0,05$  (figura 22).

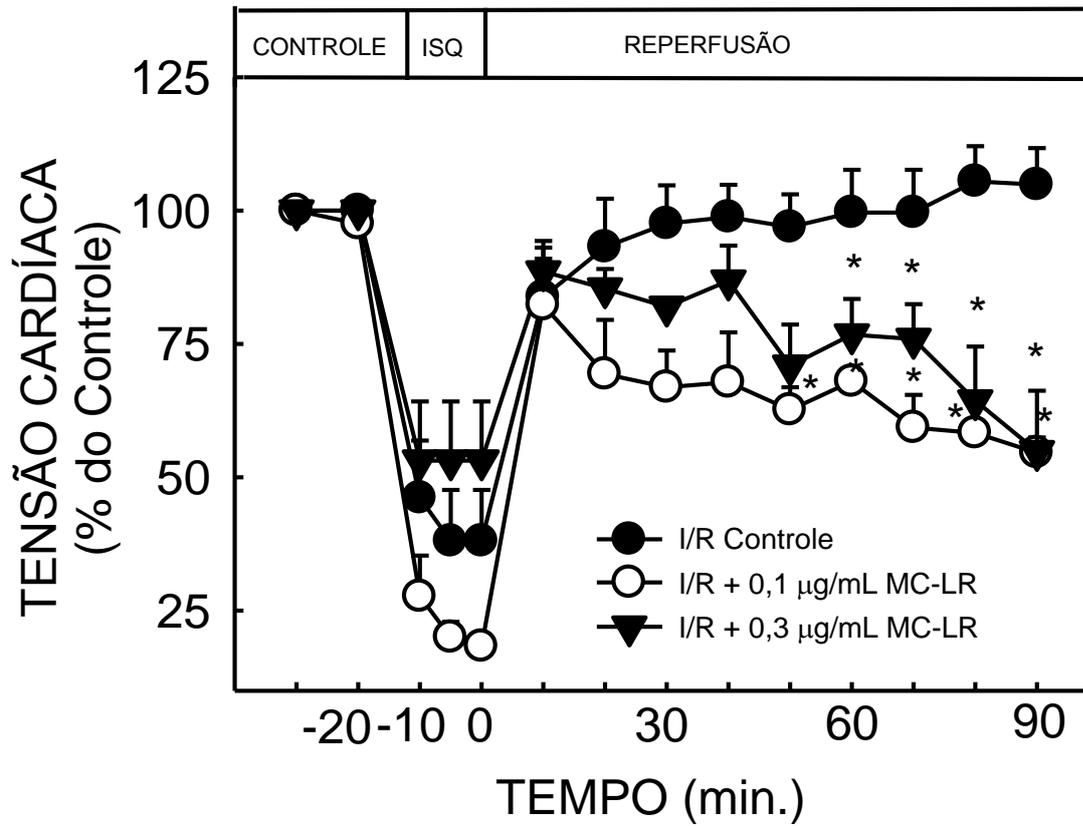
Apesar do aumento na liberação de creatina kinase no perfusato cardíaco na concentração 0,1  $\mu\text{g/mL}$  de MC-LR, este não foi significativo quando comparado ao controle. Similarmente, esta mesma concentração, não provocou alterações que gerassem danos teciduais, após a avaliação enzimática macroscópica por impregnação do TTC no tecido miocárdico (figura 14). Diante deste fato, é possível afirmar que qualitativamente não foram observadas diferenças significativas na morfologia miocárdica ao final do experimento, nesta concentração, quando

comparada ao controle. Entretanto, a concentração de 0,3 µg/mL de MC-LR, neste protocolo de isquemia, mesmo apresentando valores enzimáticos semelhantes a protocolos anteriores (sem isquemia), revelou de forma qualitativa sinais de danos celulares, uma vez que a área total miocárdica apresentou regiões não coradas pelo TTC, (figura 20), tais regiões esbranquiçadas, sinalizam a ausência da enzima desidrogenase láctica sendo esta um indicativo de morte celular.

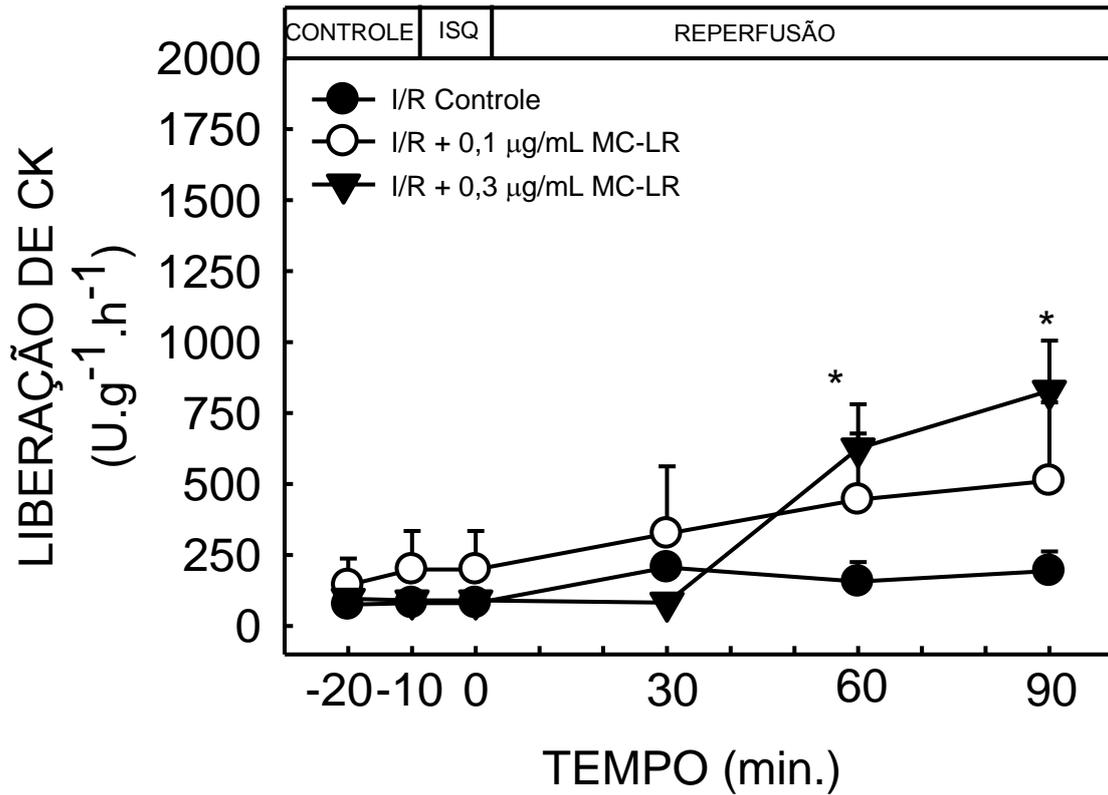
Na avaliação elétrica cardíaca, o período de 10 minutos de isquemia global, suprimiu o aparecimento de intervalos cardíacos regulares, com predomínio de bradicardia e episódios de arritmia. Além disso, houve o acentuado aumento da amplitude do complexo QRS. Após o período de isquemia os valores percentuais tanto da frequência cardíaca, como da amplitude do complexo QRS, não revelaram diferenças significativas quando comparados com o controle (figura 23 e figura 24).



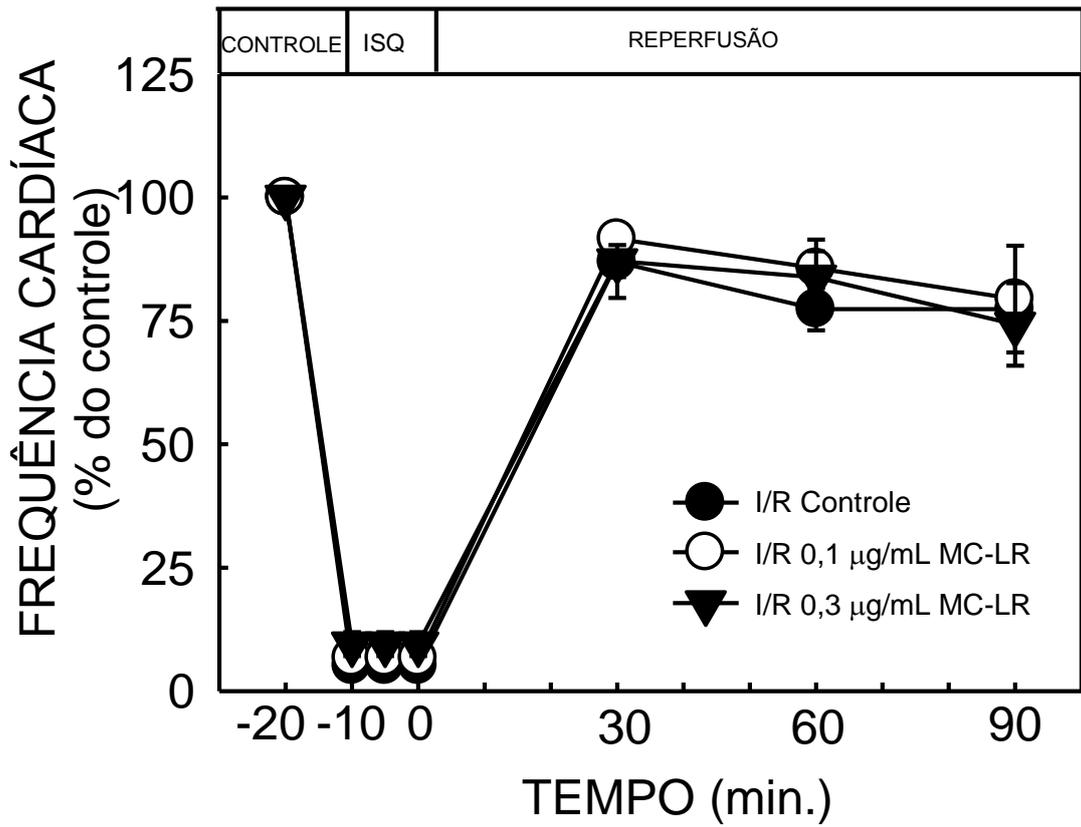
**Figura 20- Registros da tensão cardíaca e o eletrocardiograma dos corações isolado de camundongos após isquemia e exposição a MC-LR.** Após período de isquemia global de 10 minutos, os corações isolados de camundongos foram expostos à MC-LR por 90 minutos nas concentrações (0,1; 0,3; 1,0  $\mu\text{g/mL}$ ). Nos registros de tensão cardíaca, cada quadrado na ordenada corresponde a 0,33 gramas e na abcissa 0,33 segundos. Nos registros do EKG na ordenada corresponde 0,4 mV e na abcissa 0,33 segundos. **(A)** Registro de Tensão e EKG (Controle). **(B)** Registro de Tensão e EKG (0,1  $\mu\text{g/mL}$  de MC-LR). **(C)** Registro de Tensão e EKG (0,3  $\mu\text{g/mL}$  de MC-LR). **Avaliação enzimática macroscópica por trifetil tetrazolium.** A, B e C, observam-se os cortes transversais (0,5 cm) de coração de camundongo na presença de trifetil tetrazolium. A marcação em vermelho indica preservação tecidual, e áreas esbranquiçadas indicam lesão tecidual.



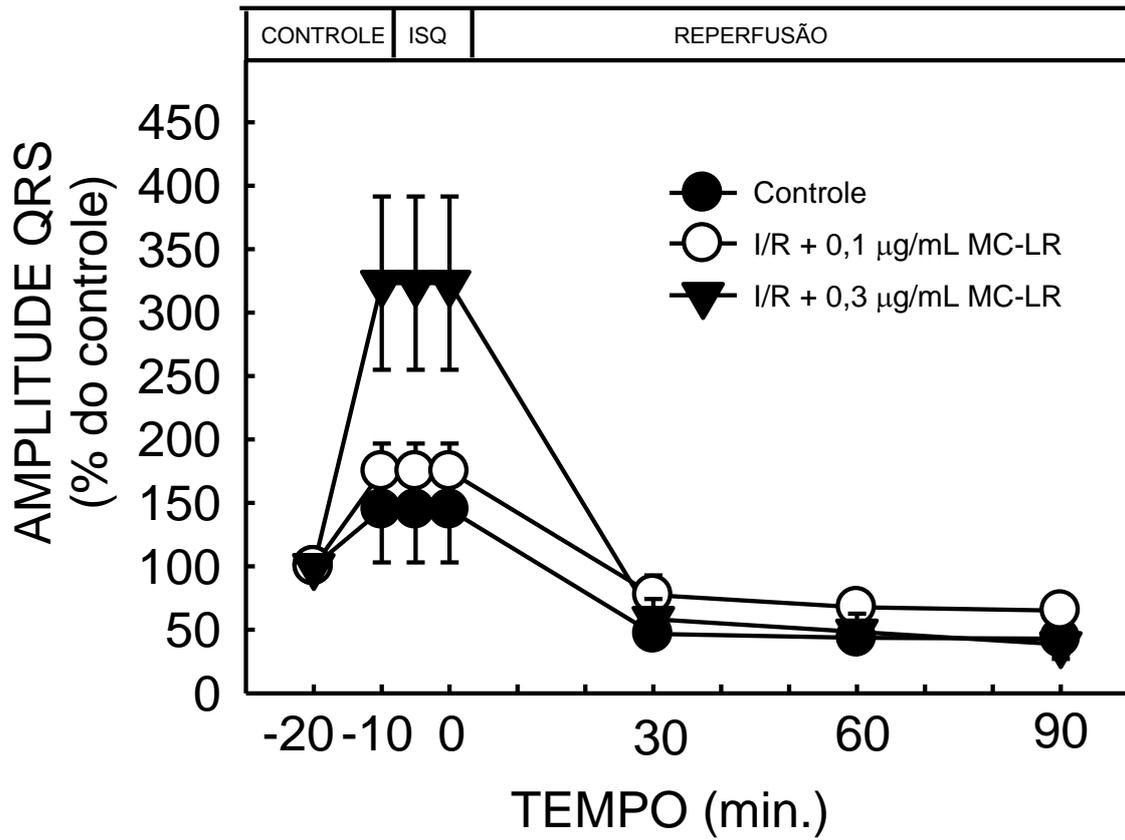
**Figura 21- Efeito na tensão em coração isolado de camundongo expostos à isquemia e a microcistina-LR.** Ordenada: Tensão cardíaca. Abcissa: tempo de perfusão nas diferentes concentrações de MC-LR (0,1 µg/mL; 0,3 µg/mL). Os dados estão expressos como % da tensão controle. Os valores expressam a média ± EPM (n=4, \*p< 0.05).



**Figura 22- Avaliação do conteúdo de creatina kinase liberado no perfusato cardíaco de corações de camundongo isolado expostos à isquemia e microcistina-LR.** Os resultados são expressos em  $\text{U.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$  de perfusato cardíaco. Os corações perfundidos com a MC-LR nas concentrações (0,1 e 0,3  $\mu\text{g/mL}$ ) após protocolo de I/R. Os valores encontrados foram crescentes na avaliação temporal e expressam a média  $\pm$  EPM ( $n=4$ ,  $*p<0,05$ ).



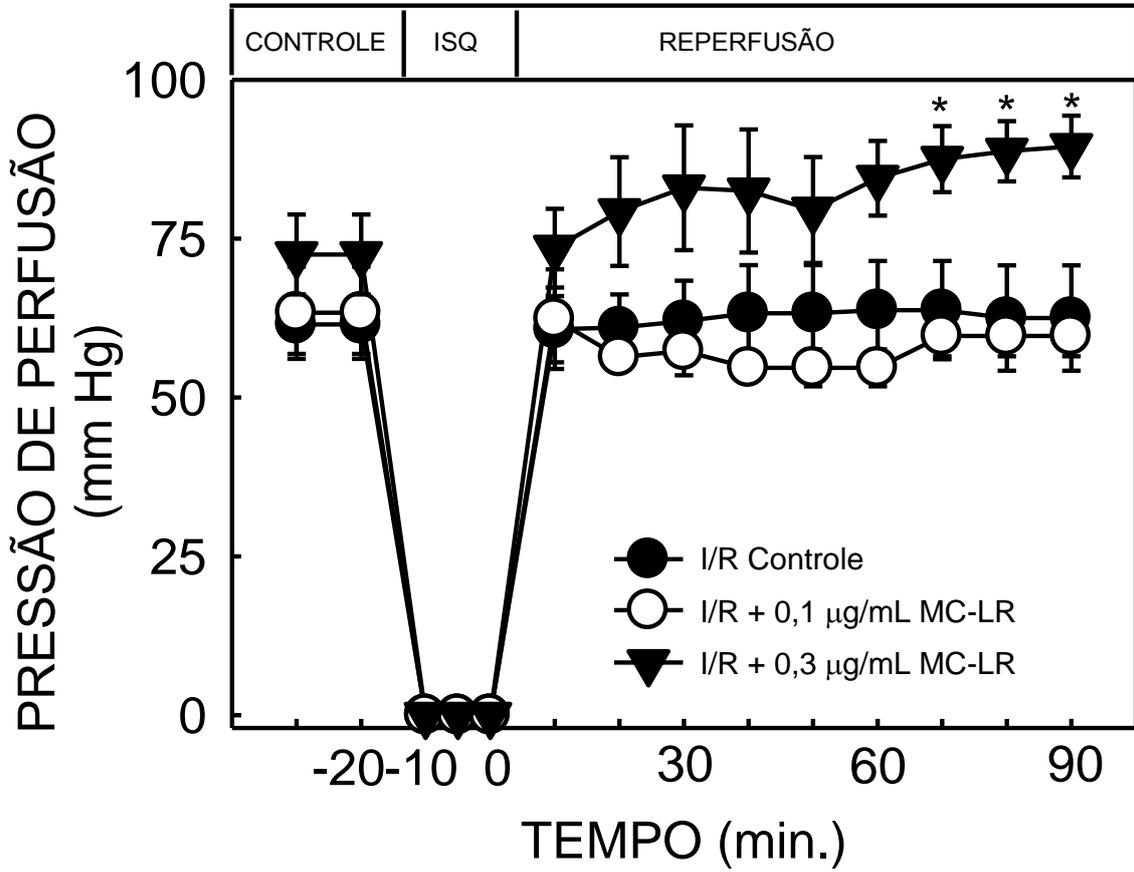
**Figura 23- Avaliação da Frequência Cardíaca após isquemia e exposição a diferentes concentrações de microcistina-LR.** Os valores são expressos em % da redução dos valores do controle ao longo dos 90 minutos de avaliação de reperfusão com microcistina-LR nas concentrações (0,1 e 0,3 µg/mL). Os valores expressam a média ± EPM (n=4, \* p<0,05).



**Figura 24- Avaliação da Amplitude do Complexo QRS cardíaco após isquemia e exposição a diferentes concentrações de microcistina-LR.** Os valores são expressos em % da redução dos valores do controle ao longo dos 90 minutos de avaliação de reperfusão com microcistina-LR nas concentrações (0,1 e 0,3 µg/mL). Os valores expressam a média ± EPM (n=4, \* p<0,05).

#### **4.6 Efeito da pressão de perfusão após isquemia e exposição a MC-LR.**

Os corações de camundongos após o período de estabilização, e exposição isquêmica por 10 minutos, não apresentaram diferença significativa nos valores de pressão de perfusão coronariana durante todo o período de reperfusão. De forma semelhante, após a isquemia, os corações expostos à concentração de 0,1 µg/mL de MC-LR também não apresentaram valores de pressão de perfusão diferentes estatisticamente, durante os 90 minutos de reperfusão, ou seja, manteve a pressão de perfusão coronariana na faixa de  $60 \pm 3,17$  mm Hg. Entretanto, quando os corações de camundongos foram expostos a concentração de 0,3 µg/mL de MC-LR, após o período de isquemia, foi observado o aumento da pressão de perfusão de mais de 25 unidades ( $62,5 \pm 8,29$  mm Hg para  $89,5 \pm 4,8$  mm Hg) no final de 90 minutos de reperfusão (figura 25).



**Figura 25-** Avaliação da pressão de perfusão coronariana de corações expostos à isquemia (10 minutos) e microcistina-LR. Ordenada: Pressão de perfusão em (mm Hg) nas concentrações (0,1 e 0,3 µg/mL de MC-LR) após isquemia de 10 minutos. Os valores expressam a média ± EPM (n=4, \*p< 0.05).

#### **4.7 Efeito de diferentes concentrações de MC-LR associada a menadiona após isquemia na atividade mecânica, elétrica e enzimática de coração isolado de camundongos.**

Em todo período de estabilização, ou seja, período controle, os valores de tensão de contração, frequência cardíaca e amplitude do complexo QRS não foram estatisticamente diferentes, como esperado para o controle.

A reperfusão cardíaca na concentração de 10  $\mu\text{M}$  de menadiona não apresentou influência no percentual de tensão cardíaca, quando comparado com o controle. Entretanto, a reperfusão nas concentrações de 50 e 200  $\mu\text{M}$  de menadiona apresentaram episódios de arritmia e desenvolvimento da contratura miocárdica, como reflexo do marcante aumento da tensão de repouso (linha basal) (figura 26). Houve reduções do percentual de tensão cardíaca de 80% e 100% respectivamente, ou seja,  $23,40 \pm (5,29)$  em 50  $\mu\text{M}$  e  $4,56 \pm (1,59)$  em 200  $\mu\text{M}$  ao final de 90 minutos de avaliação (figura 28a). A partir destes resultados, optou-se por avaliar o efeito aditivo da microcistina-LR nas concentrações (0,1 e 0,3  $\mu\text{g/mL}$ ), em associação a administração de menadiona nas concentrações (10 e 50  $\mu\text{M}$ ) após o período de 10 minutos de isquemia.

Após a isquemia, a adição de 0,1 ou 0,3  $\mu\text{g/mL}$  de MC-LR na solução de reperfusão contendo 10  $\mu\text{M}$  de menadiona, não revelou valores de percentual de tensão cardíaca diferentes estatisticamente em relação ao controle, ou seja, não foi observada intensificação dos efeitos cardíacos, quando comparados com os efeitos obtidos somente pela exposição de MC-LR (figura 28b; figura 28c). Neste sentido, é possível dizer que esta concentração de menadiona revelou-se incapaz de potencializar os efeitos das duas concentrações de MC-LR utilizada após a isquemia. É relevante ressaltar que a concentração 10  $\mu\text{M}$  de menadiona mostrou ser capaz de induzir parcial proteção da tensão cardíaca, principalmente no período inicial da reperfusão, uma vez que atenuou os efeitos da MC-LR após isquemia.

Em contrapartida, após a isquemia, a adição de 0,1 ou 0,3  $\mu\text{g/mL}$  de MC-LR na solução de reperfusão contendo 50  $\mu\text{M}$  de menadiona, provocou aumento da citotoxicidade cardíaca (figura 28d; figura 28e). Os resultados mostraram queda da

função contrátil através da ampla redução do percentual de tensão cardíaca no final de 90 minutos de avaliação. Esta associação mostrou valores finais de  $(0,0 \pm 0,0)$ , ao passo que o valor final encontrado somente pela exposição à menadiona  $50 \mu\text{M}$  foi  $(25 \pm 5,0\%)$ , (figura 28a).

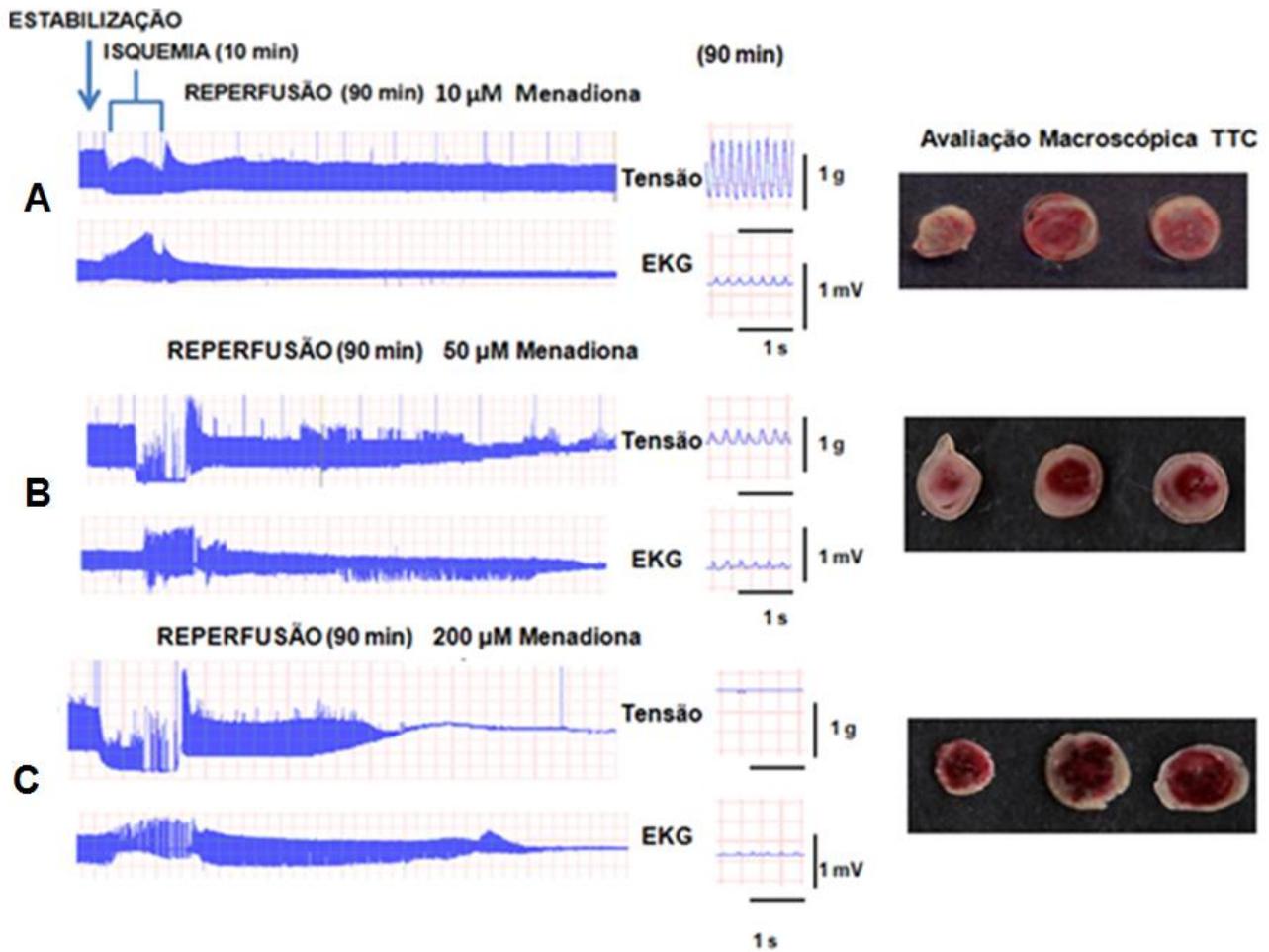
Os resultados das análises bioquímicas revelaram que após a isquemia, a exposição de corações de camundongos à concentração de  $10 \mu\text{M}$  de menadiona, não gerou valores diferentes em relação ao controle. Em contrapartida a reperfusão de menadiona nas concentrações ( $50$  e  $200 \mu\text{M}$ ) mostraram aumentos superiores a  $100\%$  da liberação de creatina kinase quando comparada aos valores basais, no final de 90 minutos de reperfusão (figura 30). Sendo assim os resultados bioquímicos são condizentes com os resultados obtidos da função mecânica cardíaca. Adicionalmente, a liberação de creatina kinase no período de reperfusão, quando adicionado MC-LR ( $0,1 \mu\text{g/mL}$ ) em associação a  $10 \mu\text{M}$  de menadiona, não revelou aumento enzimático, quando comparado aos valores basais. Em contrapartida, a adição de  $0,3 \mu\text{g/mL}$  de MC-LR em associação a  $10 \mu\text{M}$  de menadiona, revelou aumento da liberação de creatina kinase que não superou 500 unidades, mostrando-se significativo (figura 31). Já a adição de MC-LR ( $0,1$  ou  $0,3 \mu\text{g/mL}$ ) em associação a  $50 \mu\text{M}$  de menadiona, apresentou aumentos na liberação enzimática no final de 90 minutos de avaliação. Entretanto, tais resultados não se mostraram diferentes em relação ao controle (figura 32).

Na avaliação morfológica macroscópica, os fragmentos de tecido miocárdico no final do experimento, revelaram que após isquemia e associação a menadiona nas concentrações de  $50$  e  $200 \mu\text{M}$ , apresentaram imagens conclusivas de danos celulares, quando comparadas ao controle (figura 26). Ao passo que a concentração de  $10 \mu\text{M}$ , não foi capaz de caracterizar qualitativamente lesão miocárdica. É possível indicar que a exposição por 10 minutos de isquemia em associação às crescentes concentrações de menadiona, e microcistina-LR criou condições intracelulares no tecido miocárdico, capaz de desarranjar e lesar a membrana celular, permitindo a demasiada liberação do conteúdo de creatina kinase para o perfusato cardíaco. Adiciona-se a avaliação qualitativa dos fragmentos cardíacos ao final do experimento, os quais revelaram através da avaliação macroscópica do tecido, extensas áreas de

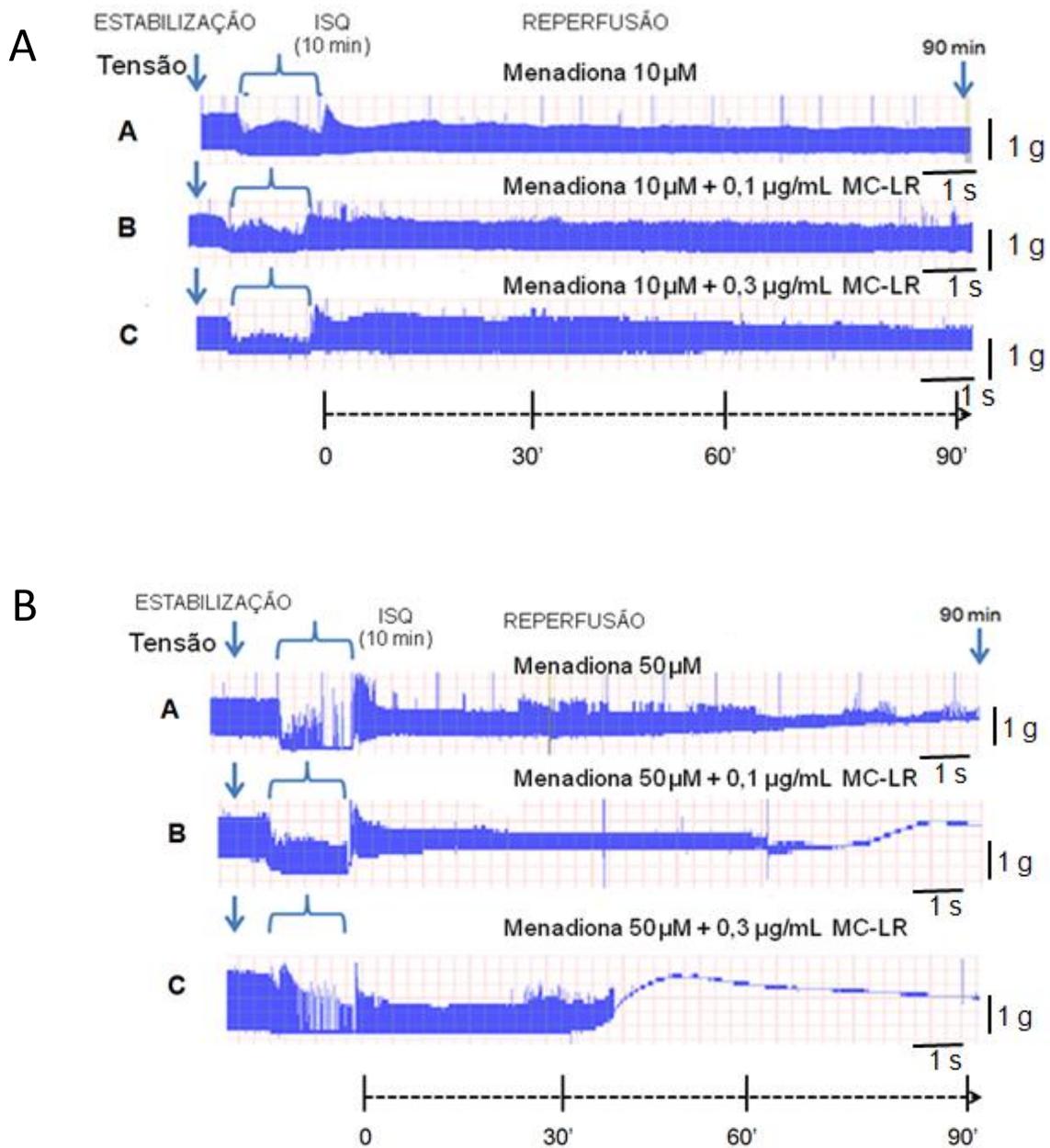
lesão tecidual, (áreas esbranquiçadas), caracterizando a morte celular miocárdica. Entretanto, o protocolo de indução ao estresse oxidativo pela exposição à isquemia, à menadiona e à MC-LR, qualitativamente não foi capaz de distinguir a diferenciação de lesão celular, pela avaliação macroscópica dos fragmentos de coração expostos a 0,1 ou 0,3 de MC-LR em associação a 50  $\mu$ M de menadiona.

Na avaliação da função elétrica, os corações após isquemia e expostos a 50 e 200  $\mu$ M de menadiona apresentaram no final de 90 minutos de avaliação, reduções significativas de 60% e 100% ( $p < 0,05$ ) do percentual da frequência cardíaca em relação ao controle. Fato este, que não foi observado após isquemia e exposição a 10  $\mu$ M de menadiona (figura 33a). Sendo assim, as concentrações 50 e 200  $\mu$ M caracterizaram o efeito inotrópico negativo. Quando se avaliou a amplitude do complexo QRS, observou-se que todas as concentrações testadas causaram redução do percentual da amplitude do complexo QRS a partir dos 30 minutos iniciais de reperfusão (figura 34a). Desta forma, tanto os corações expostos a concentrações de 10 e 50  $\mu$ M de menadiona, quanto os corações que não foram expostos a menadiona (controle) apresentaram redução de 50% da amplitude do complexo QRS. Adicionalmente a exposição à concentração de 200  $\mu$ M de menadiona, apresentou 100% de redução da amplitude, além da presença de episódios de fibrilação e parada cardíaca, observada nos minutos finais de reperfusão. (figura 34a).

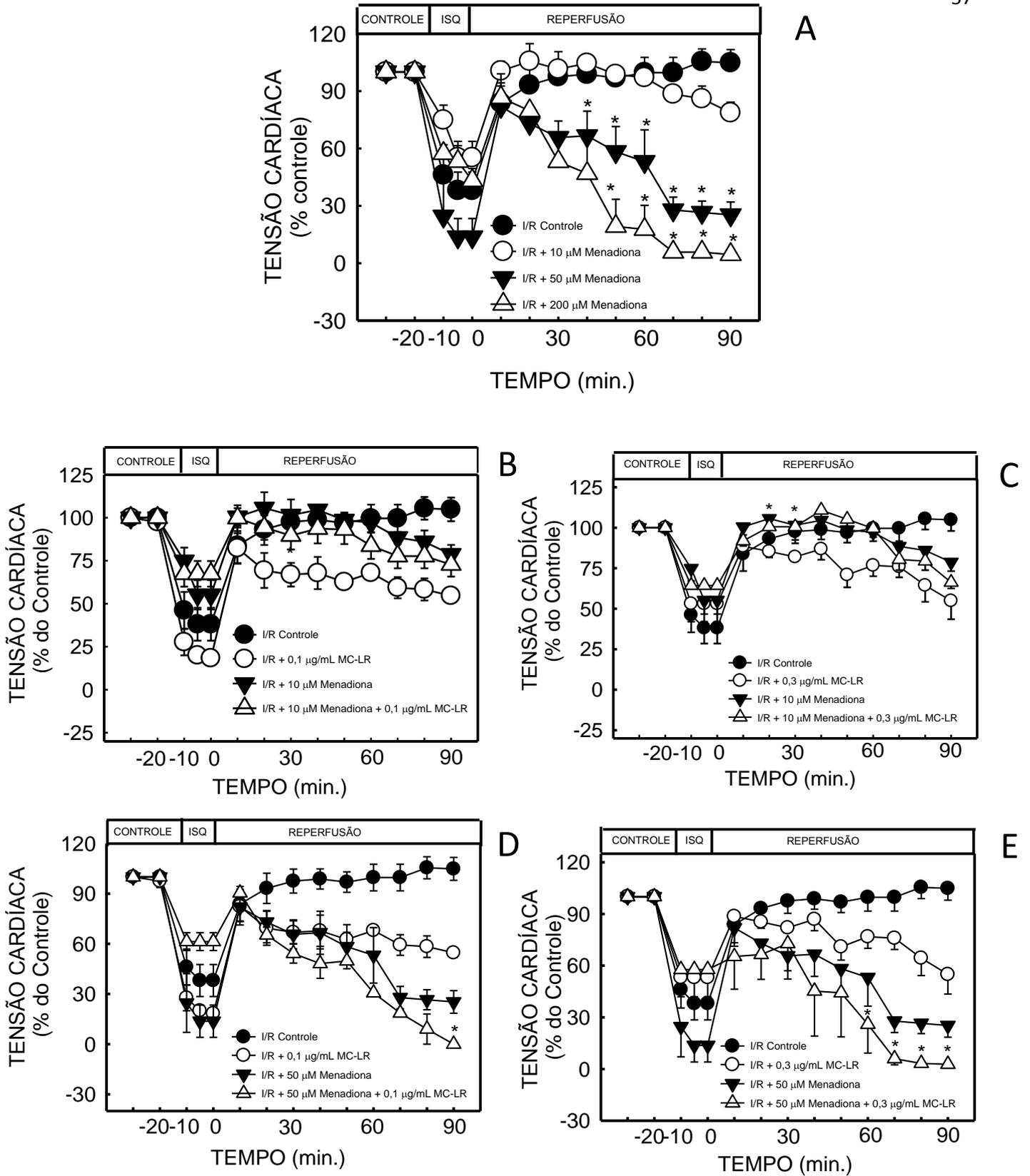
Para todos os parâmetros elétricos, avaliados neste protocolo de indução ao estresse oxidativo a microcistina-LR após isquemia em associação a menadiona, não houve intensificação da citotoxicidade cardíaca de forma significativa. Logo, todos os resultados elétricos referentes a este protocolo não obtiveram  $p < 0,05$  (figura 33b, 33c, 33d, 33e, 34b,c,d,e).



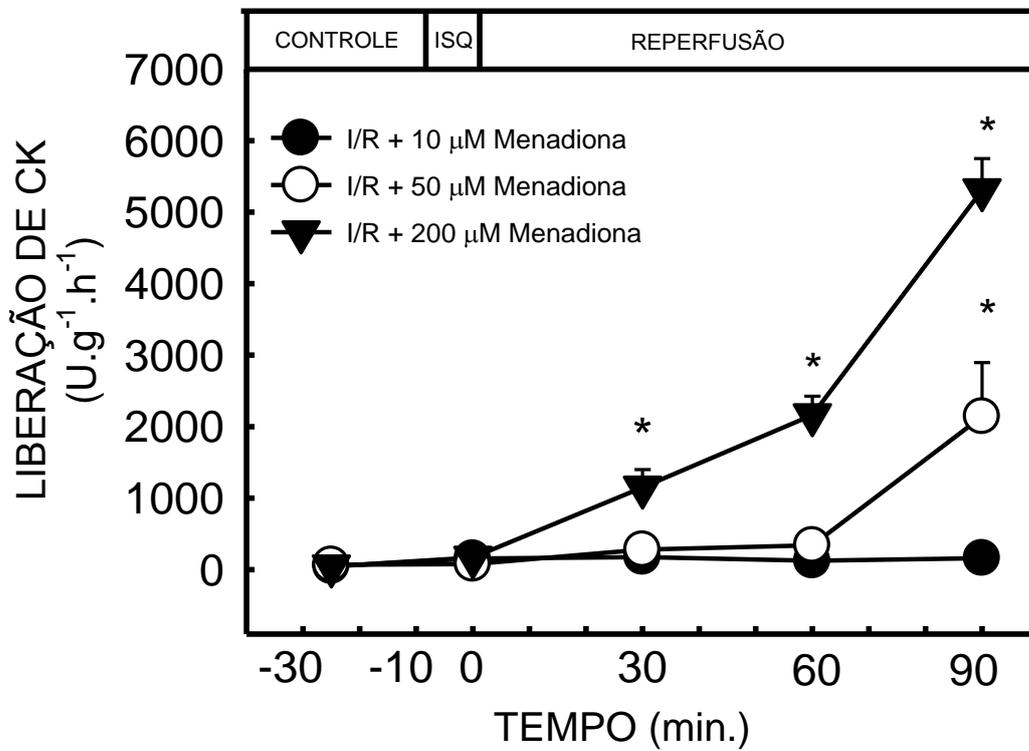
**Figura 26- Efeito na tensão cardíaca em coração isolado de camundongo expostos à isquemia e a menadiona.** Exposição à menadiona nas concentrações (10; 50 e 200  $\mu\text{M}$ ) após o período de isquemia por 10 minutos. Nos registros de tensão cardíaca, cada quadrado na ordenada corresponde a 0,33 gramas e na abcissa 0,33 segundos. Nos registros do EKG na ordenada corresponde 0,4 mV e na abcissa 0,33 segundos. **(B)** Registro de Tensão e EKG (10  $\mu\text{M}$  de menadiona) **(A)** Registro de Tensão e EKG (50  $\mu\text{M}$  de menadiona). **(C)** Registro de Tensão e EKG (200  $\mu\text{M}$  de menadiona). A, B e C, observam-se os cortes transversais (0,5 cm) de coração de camundongo na presença de trifetil tetrazolium. A marcação em vermelho indica preservação tecidual, e áreas esbranquiçadas indicam lesão tecidual.



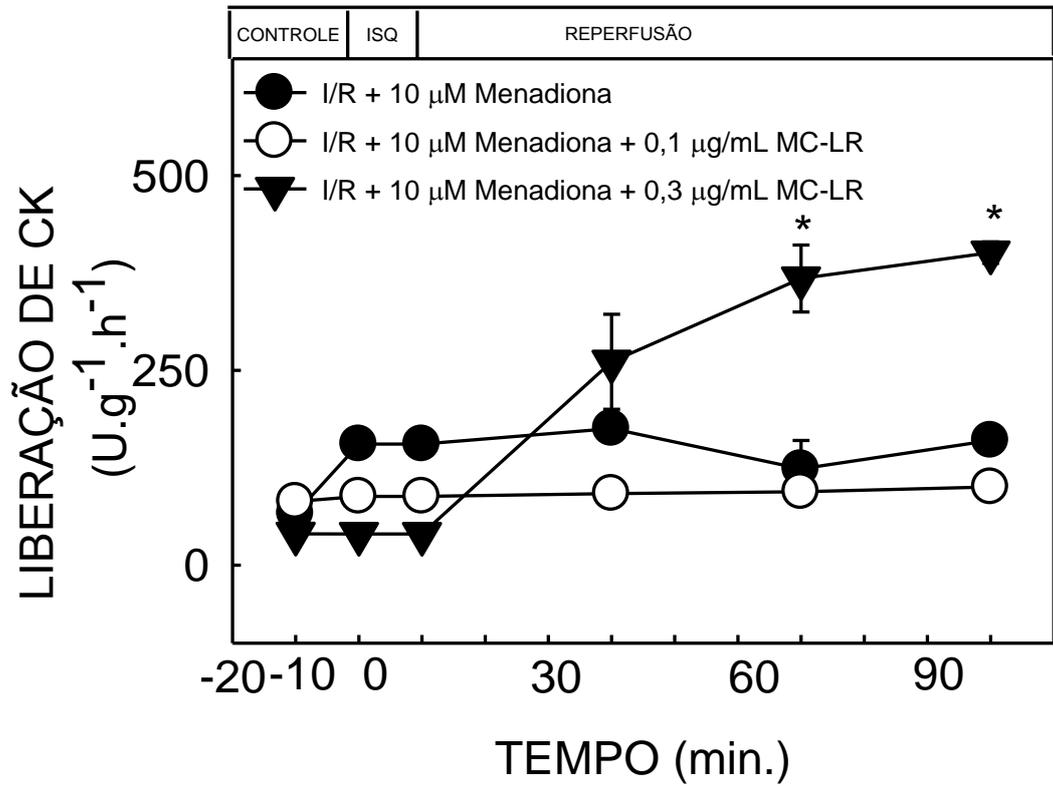
**Figura 27 A) Efeito na tensão cardíaca em coração isolado de camundongo expostos à isquemia e a menadiona associada a MC-LR.** Exposição à isquemia por 10 minutos e exposição a menadiona nas concentrações (10 e 50  $\mu$ M) em associação a MC-LR (0,1 e 0,3  $\mu$ g/mL). Nos registros de tensão cardíaca, cada quadrado na ordenada corresponde a 0,33 gramas e na abcissa 0,33 segundos. Nos registros do EKG na ordenada corresponde 0,4 mV e na abcissa 0,33 segundos. (A) Registro de Tensão (10  $\mu$ M de menadiona) (B) Registro de Tensão (10  $\mu$ M de menadiona associada a 0,1  $\mu$ g/mL de MC-LR). (C) Registro de Tensão (10  $\mu$ M de menadiona associada a 0,3  $\mu$ g/mL de MC-LR). **27 B) (A) Registro de Tensão (50  $\mu$ M de menadiona). (B) Registro de Tensão (50  $\mu$ M de menadiona associada a 0,1  $\mu$ g/mL de MC-LR). (C) Registro de Tensão (50  $\mu$ M de menadiona associada a 0,3  $\mu$ g/mL de MC-LR).**



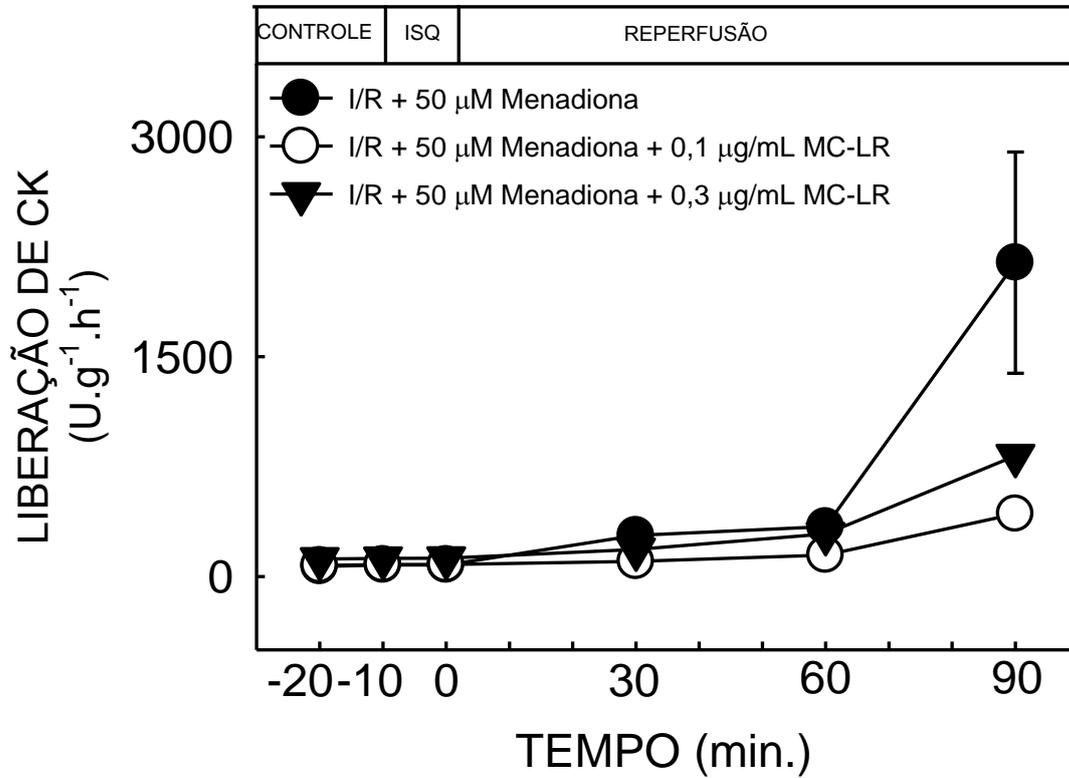
**Figura 28- Efeito na tensão em coração isolado de camundongo expostos à isquemia e a menadiona.** Ordenada: Tensão cardíaca. Abcissa: tempo de reperusão nas diferentes concentrações de menadiona (10; 50 e 200  $\mu$ M) após 10 minutos de isquemia. Os dados estão expressos como % da tensão controle. Os valores expressam a média  $\pm$  EPM (n=4, \*p< 0.05).



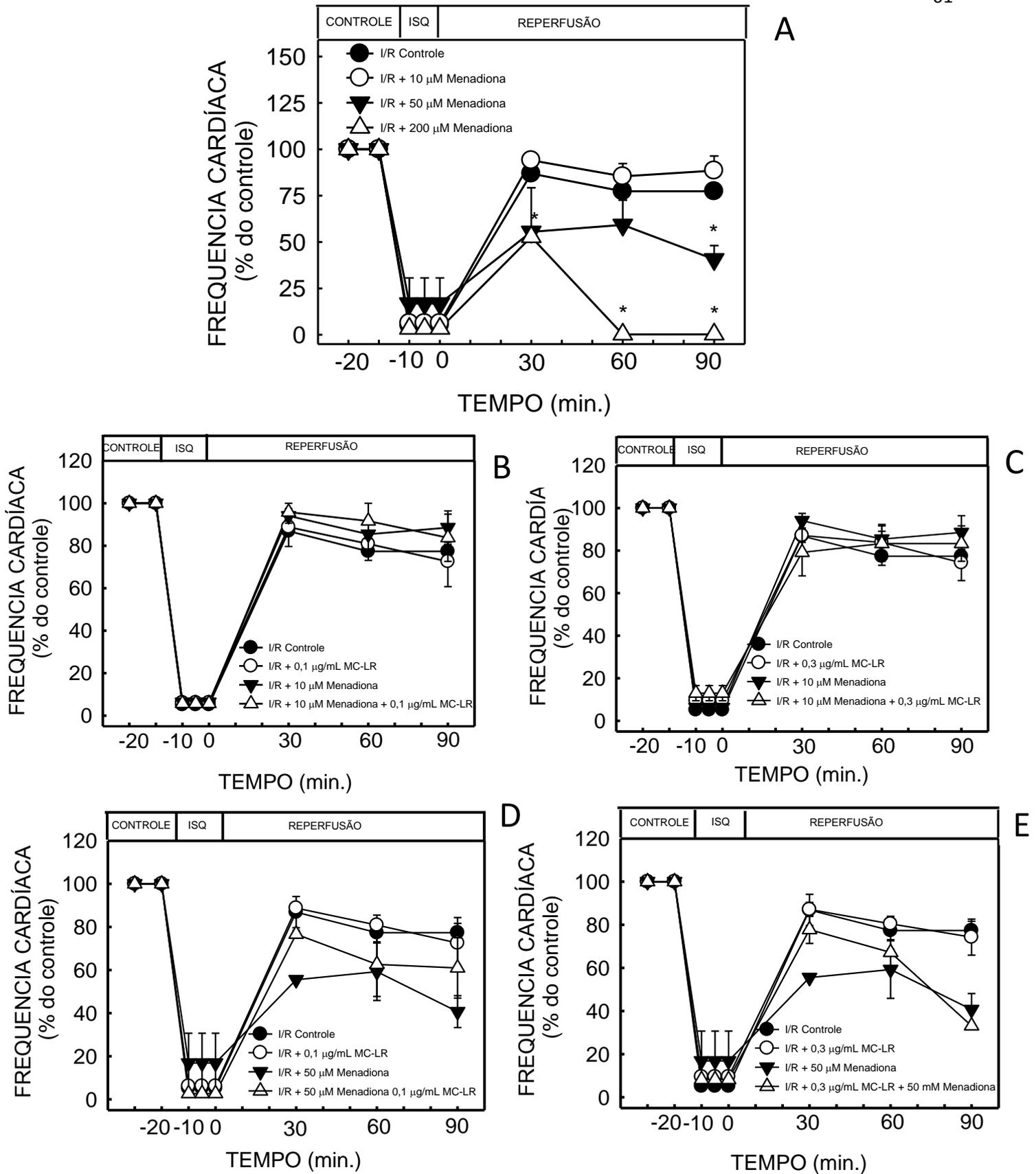
**Figura 30- Avaliação do conteúdo de creatina kinase liberado no perfusato coronariano de corações de camundongo isolado expostos a isquemia e menadiona.** Os resultados são expressos em  $\text{U.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$  de perfusato coronariano. Os corações reperfundidos com menadiona nas concentrações (10; 50 e 200  $\mu\text{M}$ ) após isquemia de 10 minutos. Os valores encontrados foram crescentes na avaliação temporal e expressam a média  $\pm$  EPM ( $n=4$ ,  $*p<0,05$ ).



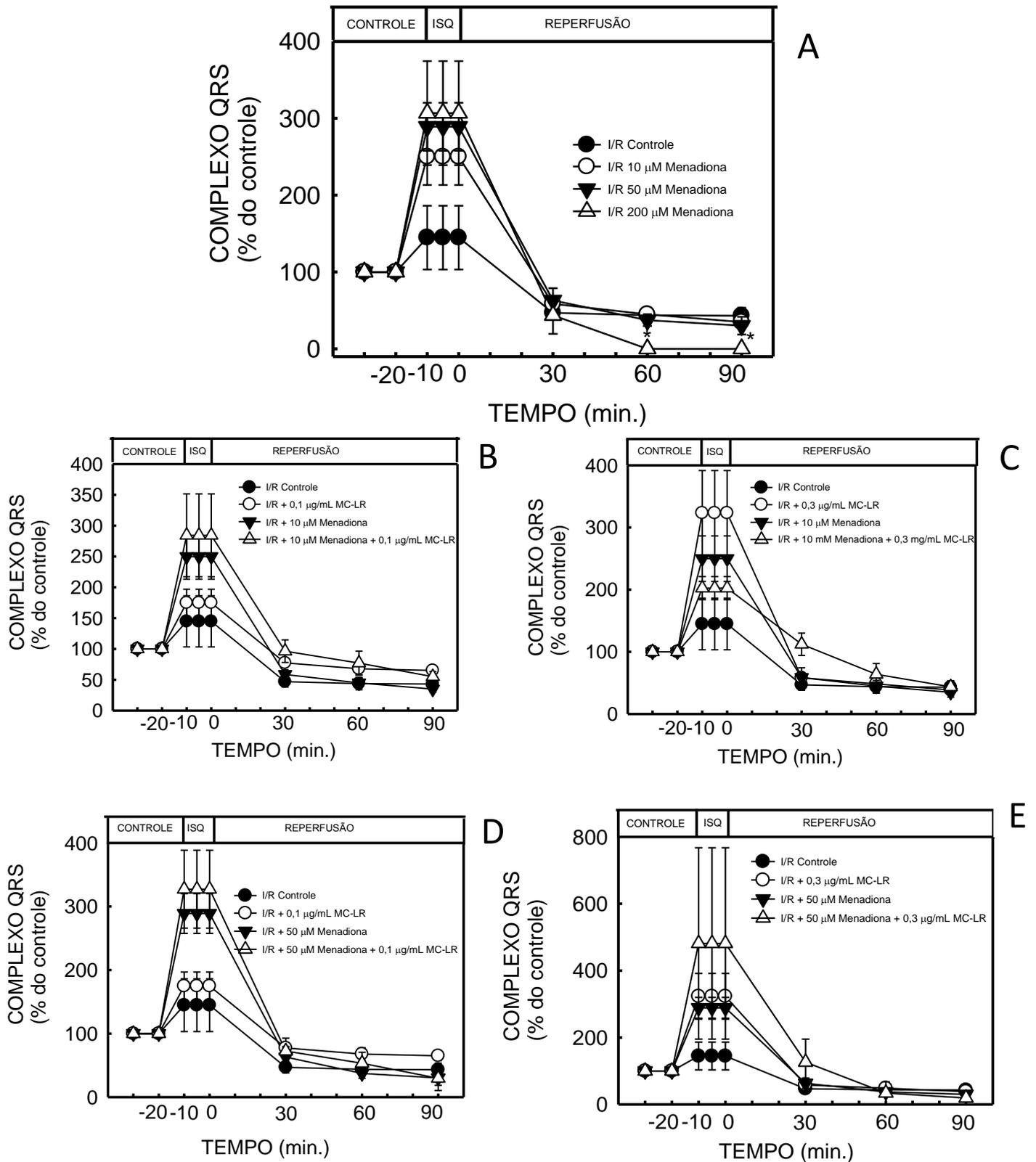
**Figura 31- Avaliação do conteúdo de creatina kinase liberado no perfusato coronariano de corações de camundongo isolado expostos a isquemia e menadiona associada a MC-LR.** Os resultados são expressos em U.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> de perfusato coronariano. Os corações reperfundidos com menadiona na concentração (10  $\mu$ M) após isquemia de 10 minutos em associação a MC-LR (0,1 e 0,3  $\mu$ g/mL). Os valores encontrados foram crescentes na avaliação temporal e expressam a média  $\pm$  EPM (n=4, \*p<0,05).



**Figura 32 - Avaliação do conteúdo de creatina kinase liberado no perfusato coronariano de corações de camundongo isolado expostos a isquemia e menadiona associada a MC-LR.** Os resultados são expressos em  $U.g^{-1}.h^{-1}$  de perfusato coronariano. Os corações reperfundidos com menadiona na concentração ( $50 \mu M$ ) após isquemia de 10 minutos em associação a MC-LR ( $0,1$  e  $0,3 \mu g/mL$ ). Os valores encontrados foram crescentes na avaliação temporal e expressam a média  $\pm$  EPM ( $n=4$ ,  $*p<0,05$ ).



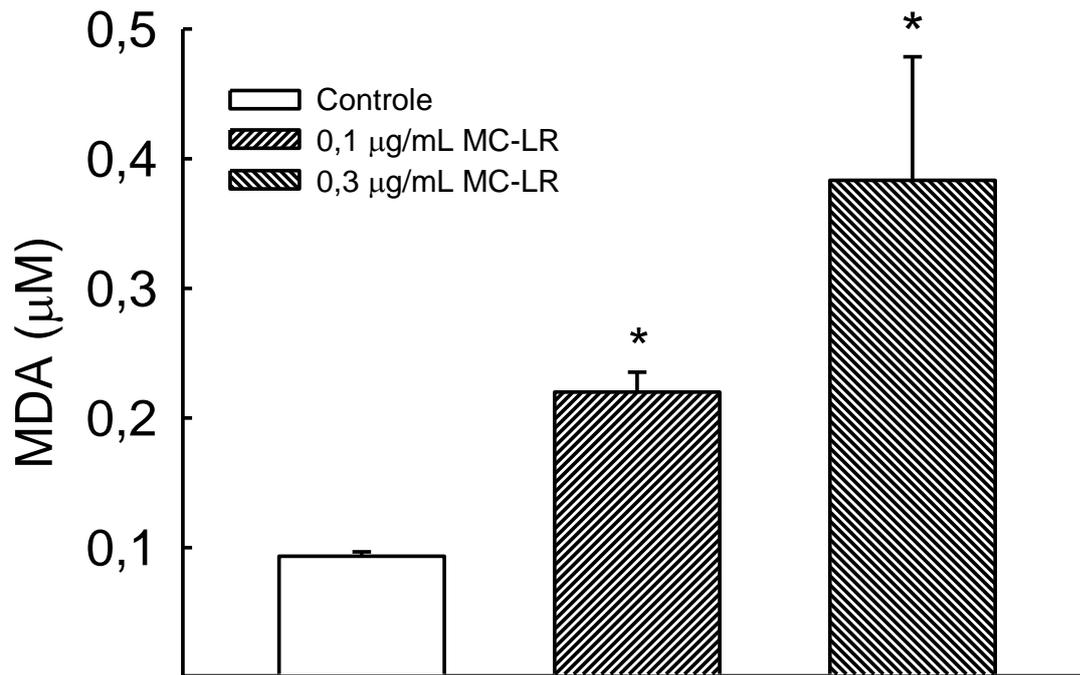
**Figura 33- Avaliação da Frequência Cardíaca após isquemia e exposição a diferentes concentrações de menadiona associada a MC-LR.** Os valores são expressos em % da redução dos valores do controle ao longo dos 90 minutos de avaliação de reperusão com menadiona nas concentrações (10; 50; 200  $\mu$ M). Os valores expressam a média  $\pm$  EPM (n=4, \* p<0,05).



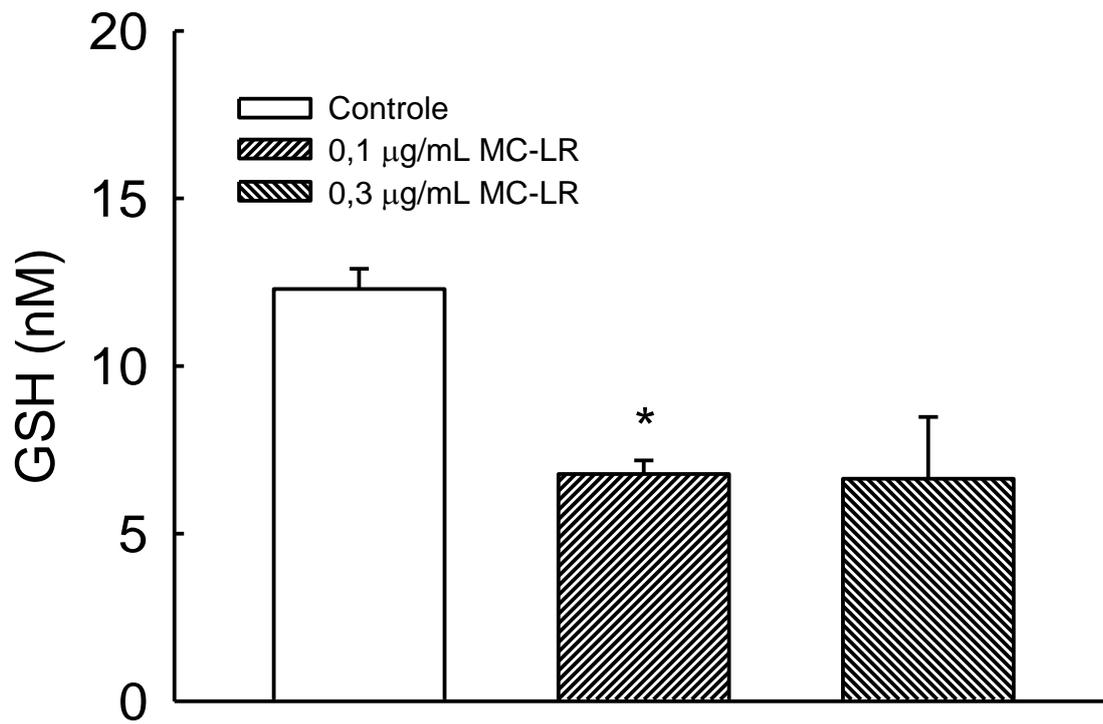
**Figura 34- Avaliação da amplitude do complexo QRS após isquemia e exposição a diferentes concentrações de menadiona associada a MC-LR.** Os valores são expressos em % da redução dos valores do controle ao longo dos 90 minutos de avaliação de reperfusion com menadiona nas concentrações (10; 50; 200  $\mu$ M). Os valores expressam a média  $\pm$  EPM (n=4, \* p<0,05).

#### **4.8 Efeito do desequilíbrio oxidativo dos corações de camundongos expostos a diferentes concentrações de MC-LR.**

Na avaliação bioquímica, através da concentração de GSH (glutathiona reduzida), e a formação do MDA, sendo estes, marcadores do desequilíbrio oxidativo, nossos resultados evidenciaram que a exposição à MC-LR provavelmente levou ao aumento da formação de ROS intracelular. Após a exposição por 90 minutos de MC-LR (0,1 e 0,3  $\mu\text{g/mL}$ ), os valores de MDA apresentaram aumentos que superaram 100% quando comparado com os valores basais. Os resultados foram de 0,25  $\mu\text{M} \pm (0,015)$  para 0,37  $\mu\text{M} \pm (0,095)$ , respectivamente, com  $p < 0,05$  (figura 35). Tais resultados mostraram ser dependentes da concentração de MC-LR utilizada. Concomitantemente a redução da produção de GSH, o período de 90 minutos de perfusão com MC-LR, mostrou a incapacidade de manutenção de moléculas protetoras consideradas antioxidantes endógeno. Sendo assim, a exposição à MC-LR nas concentrações (0,1 e 0,3  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentou de forma significativa a redução em 50 % da quantidade de GSH, quando comparado aos níveis basais (controle) (figura 36).



**Figura 35- Avaliação do nível médio de dano celular por lipoperoxidação, através da formação de MDA em coração de camundongos após exposição a diferentes concentrações de MC-LR.** Os valores são expressos em ( $\mu\text{M}$ ) após exposição de 90 minutos exposição à MC-LR nas concentrações (0,1 e 0,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Os valores expressam a média  $\pm$  EPM ( $n=3$ , \*  $p<0,05$ ).



**Figura 36- Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) presente em corações de camundongos expostos a diferentes concentrações de MC-LR.** Os valores são expressos em (nM) após exposição de 90 minutos exposição à MC-LR nas concentrações (0,1 e 0,3 µg/mL). Os valores expressam a média  $\pm$  EPM (n=4, \* p<0,05).

## 5 DISCUSSÃO

Evidenciamos a citotoxicidade direta da MC-LR nas alterações da atividade mecânica cardíaca de corações isolados de camundongos através da ação cardiodepressora. Esta ação gerou efeito inotrópico negativo, uma vez que foi visualizada a redução da função contrátil, ou seja, a redução da força de contração cardíaca desenvolvida. As concentrações de MC-LR testadas causaram danos cardíacos funcionais e danos teciduais, com aumento da liberação de creatina kinase. Além disso, os danos celulares puderam ser visualizados macroscopicamente e medidos com a coloração pelo TTC.

A citotoxicidade direta da MC-LR em corações de camundongos isolados, também foi evidenciada através dos registros elétricos, que caracterizaram ação cardiodepressora, sobre o ritmo cardíaco, sendo este o efeito cronotrópico negativo, com redução do número de batimentos/ minutos. Adicionalmente os registros elétricos, evidenciaram cardiopressão através de redução da massa cardíaca funcional susceptível ao estímulo elétrico, ou seja, redução da amplitude do complexo QRS. Logo a MC-LR gerou alteração cardíaca funcional, enzimática e morfológica direta nos cardiomiócitos, sendo concentração e tempo dependente, caracterizando sua atividade citotóxica. A MC-LR não foi capaz de impedir completamente a atividade cardíaca, tampouco apresentar episódios de fibrilação ou parada cardíaca total, no entanto, esta toxina isolada de cianobactérias, mundialmente caracterizada como hepatotóxica, revelou ação cardiotóxica direta reduzindo a atividade deste órgão.

Nossos resultados estão de acordo com os apresentados por Leclaire e outros (1995); Zhang e outros (2002); Milutinovic e outros (2006); Qiu e outros (2009). Os autores descrevem alterações cardíacas decorrentes da administração da MC-LR *in vivo*, como redução da frequência cardíaca em ratos expostos a doses letais, bem como aumento de enzimas que caracterizam injúria cardíaca. De acordo com os resultados apresentados é possível que estes efeitos sejam decorrentes da ação direta da MC-LR nos cardiomiócitos.

De acordo com MacLennan e Kranias (2003), o gatilho para a contração cardíaca deve-se a elevada concentração de cálcio no sarcoplasma da célula muscular, que é mediada através dos canais de cálcio presente no sarcolema (receptores diidropiridinas -DHPRs), e dos canais que liberam cálcio localizados na membrana do retículo sarcoplasmático (receptores de rianodina -RyRs). Entretanto, o gatilho para o relaxamento deve-se a redução das concentrações citosólicas de cálcio, no miócito cardíaco este fenômeno ocorre devido a atividade combinada da isoforma SERCA2a ( $\text{Ca}^{+2}$ ATPase da membrana do retículo sarcoplasmático), das PMCA's ( $\text{Ca}^{+2}$ ATPase da membrana plasmática) e dos trocadores NCXs (trocador  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ ), também localizados na membrana plasmática. Sendo a SERCA2a uma enzima importante por reconstituir os estoques de cálcio do retículo sarcoplasmático. Já as PMCA's e os NCXs são importantes, por reconstituir as quantidades de cálcio extracelular.

Os fármacos considerados simpatomiméticos atuam nos canais de cálcio e determinam o aumento do influxo do íon cálcio no citoplasma das células cardíacas. Em contrapartida, os fármacos considerados bloqueadores de canais de cálcio reduzem o influxo deste íon levando a diminuição da contratilidade cardíaca. (KATZUNG, 2010). Sendo assim é possível indicar que a concentração de cálcio citosólica dos corações de camundongos expostos à MC-LR, poderia estar diminuída, bem como os canais de cálcio poderiam estar comprometidos, alterando a dinâmica do fluxo do íon cálcio citoplasmático. Adicionalmente a atividade de certas enzimas cardíacas principalmente a SERCA2a, também poderia estar envolvida nas alterações apresentadas neste modelo.

A capacidade de inibição da proteína fosfatase, pela MC-LR, já descrito na literatura (MACKINTOSH et al, 1990; GULLEDGEA et al, 2002), pode também alterar a dinâmica do cálcio em cardiomiócitos. Uma das funções apresentadas pelas proteínas fosfatases (principalmente PP1) nos cardiomiócitos é a desfosforilação do fosfolambana (PLN) (KIRCHBERGER et al, 1972; LA RAIA; MORKIN, 1974; TADA et al, 1975; KATZ, 1998), sendo esta uma proteína que interage com a SERCA2a afim de inibir sua atividade quando na forma desfosforilada. Entretanto, quando a PLN é fosforilada, por proteínas kinases (PKA) ela é capaz de ativar a SERCA2a (TADA et al, 1975; KATZ, 1998). A inibição das fosfatases (principalmente PP1A) causada pela

MC-LR pode gerar um cenário de fosforilações em diversos alvos cardíacos, incluindo a PLN, promovendo aumento da atividade de proteínas responsáveis pela reposição do cálcio no retículo sarcoplasmático, como a SERCA2a, neste sentido, alterando a dinâmica do cálcio citoplasmático. Este efeito não foi avaliado no presente estudo.

Além da citotoxicidade cardíaca, a presença da MC-LR na solução nutritiva revelou aumento da pressão de perfusão do coração isolado de camundongo. Este aumento foi observado em paralelo às concentrações de MC-LR que apresentaram os efeitos contráteis, mostrando-se assim concentração e tempo dependente. Tais resultados sugerem a possível relação entre as variações do fluxo coronariano (pressão de perfusão) e da contratilidade miocárdica (tensão cardíaca) que poderia ser decorrente de ação direta nos vasos coronarianos. Entretanto este efeito não foi investigado.

A investigação da potencialização da MC-LR com a menadiona, sendo esta uma substância citotóxica, capaz de gerar estresse oxidativo em células e tecidos, mostrou aumento dos efeitos citotóxicos cardíacos funcionais, enzimáticos e morfológicos desta associação. A concentração 50  $\mu\text{M}$  de menadiona, associada à MC-LR em concentração crescente, revelou reduzir a atividade cardíaca mecânica contrátil em até 50%. Não obstante estas alterações foram acompanhadas da intensificação dos danos celulares e macroscópicos, uma vez que apresentou aumento da taxa de liberação de creatina kinase e aumento da área de lesão cardíaca. No entanto, a atividade elétrica cardíaca desta associação, não revelou intensificação dos efeitos citotóxicos. Uma vez que os danos observados pelo uso somente da menadiona (50  $\mu\text{M}$ ), já havia caracterizado queda da frequência cardíaca e da amplitude do complexo QRS, desta vez também marcada pela parada cardiovascular. De forma semelhante, a associação que objetivou a potencialização revelou não haver diferença na pressão de perfusão coronariana.

Os resultados do presente estudo foram de acordo aos observados por Hagane, Akera, Berlin, 1988 em átrios isolados de coelho, perfundidos com doxorubicina, um agente do ciclo redox similar a menadiona. O autor observou a redução de 70% no desenvolvimento da tensão cardíaca. Além disso, Gordon e Saradindu, 1991, mostraram que a menadiona no tecido cardíaco, apresenta dois efeitos opostos na

homeostasia do cálcio. O primeiro efeito é imediatamente após a perfusão de menadiona, onde a reserva citosólica de cálcio é reduzida, já que inicia a depressão da tensão cardíaca de forma acentuada. Em seguida, o trabalho mostra o término do desenvolvimento da tensão cardíaca, evidenciado pela contratatura cardíaca irreversível, mesmo após a interrupção de menadiona. O estudo correlacionou este efeito a uma sobrecarga de cálcio das miofibrilas contráteis e/ ou uma alteração nas estruturas miofibrilas. Nosso trabalho revelou que, concentrações crescentes de MC-LR são capazes de adicionar os efeitos gerados pela menadiona em concentração já estabelecida, capaz de gerar citotoxicidade (50  $\mu$ M). Tais resultados evidenciaram principalmente alterações significativas na atividade cardíaca mecânica funcional.

Na avaliação após a isquemia de 10 minutos, foi possível observar que o insulto isquêmico gerado, exerceu importante efeito cardíaco, capaz de permitir a queda do percentual da tensão cardíaca na reperfusão quando estes corações foram expostos a concentrações crescentes de MC-LR. Estas concentrações de MC-LR que em protocolos anteriores, (sem isquemia prévia) não apresentaram alterações citotóxicas, ou apresentaram alterações na atividade mecânica cardíaca de forma significativa. Após a isquemia as mesmas concentrações induziram alterações com depressão da contratilidade em torno de 50% do percentual de tensão avaliado. Entretanto, na avaliação da citotoxicidade celular, somente em maiores concentrações testadas, a MC-LR associada a isquemia foi capaz de revelar aumento de danos cardíacos através da liberação da taxa de creatina kinase, bem como o aumento das áreas macroscopicamente lesadas e marcadas pelo TTC.

De acordo com Braunwald e Kloner, 1982 e Marban, 1991, o insulto isquêmico breve, é capaz de diminuir a contratilidade do miocárdio por dias e semanas. A disfunção cardíaca reversível gerada é constantemente alvo de estudo. Embora haja um grande consenso de que há o envolvimento dos radicais livres nesta condição patológica (BOLLI, 1990). Além disso, duas importantes vias são caracterizadas na isquemia miocárdica, de acordo com Jiang e outros (1995). A primeira diz respeito à restrição da disponibilidade do íon cálcio, esta restrição pode ser mediada por anormalidades de entrada ou remoção deste íon no sarcoplasma, devido a lesões em uma ou mais vias envolvidas no transporte do cálcio. A segunda via importante é a via

independente da quantidade citosólica de cálcio. Uma vez que a capacidade de resposta do mecanismo contrátil ao cálcio é diminuída devido a menor reatividade dos miofilamentos ao cálcio. Esta diminuição da sensibilidade do miocárdio ao íon cálcio poderia ser consequente à formação de radicais livres, no momento da reperfusão (JIANG et al, 1995; ZHANG; BIESIADECKI e JIN, 2006; FENG et al, 2008; WEI e JIN, 2011).

Os radicais livres levam a formação de peróxido de hidrogênio, que é então decomposto, pelo sistema de catalase e peroxidase, culminando na redução do teor de glutathione reduzida e consecutivamente no aumento dos níveis de glutathione oxidada. Trabalhos mostram que no músculo cardíaco, os altos níveis de glutathione oxidada gera diminuição da sensibilidade ao cálcio (FERRARI et al, 2000a; 2000b). Portanto, é possível indicar que a isquemia de 10 minutos, no presente estudo, foi capaz de gerar radicais livres, que poderiam influenciar na sensibilidade do miocárdio ao cálcio, como por exemplo, promover o desarranjo de proteínas contráteis pelos altos níveis de glutathione oxidada (MELLEGREN; MURACHI, 1990). Tais alterações poderiam estar de acordo com o resultado do presente estudo, uma vez que a depressão da resposta contrátil neste protocolo de indução isquêmica foi visualizada em maior intensidade do que a exposição à MC-LR sem isquemia prévia.

No que diz respeito aos parâmetros elétricos, a exposição isquêmica foi capaz de gerar comprometimento cardíaco elétrico, na frequência cardíaca e na amplitude do complexo QRS, que impossibilitou a distinção dos efeitos gerados somente pela isquemia, ou dos efeitos gerados pela associação da isquemia em concentrações crescentes de MC-LR. Este protocolo ainda revelou que a isquemia prévia foi capaz de elevar a pressão de perfusão somente quando a isquemia foi seguida da maior concentração de MC-LR testada (0,3 µg/mL).

O presente estudo pôde ainda comparar a associação das duas ferramentas geradoras de estresse oxidativo com a exposição de concentrações crescentes de MC-LR. Nossos dados revelam que após o período de isquemia, o uso da MC-LR (0,1 ou 0,3 µg/mL) associado à menadione em concentração cardiotoxica (50 µM), apresentou intensificação da citotoxicidade cardíaca, marcada pela depressão mecânica contrátil no final de 90 minutos de exposição, chegando à zero. Embora os

valores da taxa de liberação de creatina kinase não tenha revelado diferença significativa. No que diz respeito aos parâmetros elétricos, esta associação não obteve intensificação significativa, já que os resultados obtidos foram semelhantes a protocolos anteriores.

De forma antagônica, este mesmo protocolo, a exposição de corações isolados de camundongos à MC-LR, em associação a duas ferramentas geradoras de estresses oxidativo, revelou que baixas concentrações de menadiona como o exemplo a concentração utilizada neste estudo (10,0  $\mu\text{M}$ ), mostrou efeito de proteção cardíaca nos minutos iniciais, sobretudo na tensão cardíaca. Diversos trabalhos têm demonstrado o efeito benéfico da menadiona quando utilizada em baixas concentrações. Foi observado que a menadiona (3,0  $\mu\text{M}$ ) mimetiza o efeito benéfico do pré-condicionamento cardíaco, que gera cardioproteção em corações isolados de ratos (YUE et al, 2001). Sendo assim, é possível afirmar que a ação protetora da menadiona em baixa concentração é capaz de abolir inicialmente os efeitos citotóxicos da MC-LR e esta afirmação poderá estar embasado na restauração do fluxo de elétrons na cadeia respiratória, e/ou o aumento da defesa antioxidante mitocondrial de acordo com (YUE et al, 2001). Tais mecanismos são baseados no fato de que a vitamina K tem sido utilizada no tratamento de pacientes com defeitos da fosforilação oxidativa, desta forma a menadiona parece possuir o papel de transportador de elétrons do NADH para receptores de elétrons, a exemplo da coenzima Q (ubiquinona) ou Citocromo c (ELEFF et al, 1984; MARRIAGE et al, 2004). Logo é possível que a exposição à menadiona (em baixa concentração) apresentada neste estudo tenha mostrado citoproteção através de vias restauradoras da fosforilação oxidativa.

Por fim, a breve investigação do desequilíbrio oxidativo, mostrou que a exposição dos cardiomiócitos à MC-LR (0,1 -0,3  $\mu\text{g/mL}$ ), gerou alterações oxidativas levando ao dano celular, seja através do aumento das reações de lipoperoxidação, ou pela depleção do teor de glutathiona reduzida ao longo da avaliação. Tais resultados estão de acordo com os resultados apresentados por Qiu e colaboradores, 2009. Tal estudo caracterizou o aumento do estresse oxidativo cardíaco, como aumento da lipoperoxidação, em ratos expostos a MC-LR em doses letais e subletais.

No conjunto, os resultados deste estudo indicam que a microcistina somente apresenta citotoxicidade na preparação de coração isolado de camundongo (Langendorff) em elevadas concentrações, comparadas com o estudo da literatura. Adiciona-se que a criação de situações que poderia favorecer a citotoxicidade da MC-LR, reforçou o aumento da sua cardiotoxicidade neste modelo.

## **6 CONCLUSÕES**

1- Pode-se concluir que o presente estudo, caracteriza pela primeira vez os efeitos diretos da microcistina-LR no coração isolado de camundongos. Tais efeitos indicam cronotropismo e inotropismo negativos, sendo todos estes parâmetros dependentes da concentração e tempo de exposição à MC-LR. Adicionalmente, o aumento da liberação de enzimas sarcoplasmática e as alterações morfológicas no tecido cardíaco, bem como alterações na pressão de perfusão enfatizam a cardiotoxicidade direta desta toxina.

2- O estudo também revela que as ações cardiodepressoras da microcistina-LR são potencializadas, uma vez introduzido um cenário desencadeador de estresse oxidativo, sendo este, a presença da substância menadiona, a presença de isquemia/reperfusão, ou ainda a associação de ambas as condições. O aumento de moléculas desencadeadoras de estresse oxidativo, pode estar diretamente associado à intensificação dos danos celulares da microcistina-LR.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKTORIES, KLAUS. Toxins as tools. V. **Clinical, Immunological Aspects and Applications of Bacterial Proteins Toxins**. 2006.
- AN, J.; CARMICHAEL, W.W. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystin and nodularins. **Toxicon**, v.32, n.12, p. 1495-1507, 1994.
- APELDOORN, M.E.; EGMOND, H.P.; SPEIJERS, G.J.A.; BAKKER, G.J.I. Toxins of cyanobacteria. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, n. 7, p. 60, 2007.
- ASHLEY, C. C.; MULLIGAN, I. P.; LEA, T. J.  $Ca^{2+}$  and activation mechanisms in skeletal muscle. **Quartely Reviews of Biophysica**, v. 24, n.1, p. 1-73, 1991.
- 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 *Microcystis* under laboratory conditions. **Toxicon**, v.52, n.1, p.1-12, 2008.
- AZEVEDO, S. M.F.O. Toxinas de Cianobactérias: Causas e consequências para a Saúde Pública. *Medicina On Line*. **Revista Virtual de Medicina**, v.1, n.3, Ano I, 1998.
- AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W.; JOCHIMSEN, E.M.; KRINEHART, E.R.; LAU, S.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru\* Brazil. **Toxicology**, v. 181, p. 441-446, 2002.
- BARFORD, D. Protein phosphatases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 5, n.6, p. 728-734, 1995.
- BEASLEY, V.R.; LOVELL, R.A.; HOLMES, K.R.; WALCOTT, H.E.; SHAEFFER, D.J.; HOFFMANN, W.E.; CARMICHAEL, W.W. Microcystin-LR decreases hepatic and renal perfusion, and cause circulatory shock, severe hypoglycemia, and terminal hyperkalemia in intravascularly dosed swine. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.61, n.4, p.281-303, 2000.
- BELLOMO, G.; MIRABELLI, F.; RICHELMI, P.; ORRENIUS, S. Critical role of sulf hydryl group(s) in the ATP-dependent  $Ca^{2+}$ -sequestration by the plasma membrane fraction from rat liver. **FEBS Letters**, v. 163, p. 136–139, 1983.
- BENTON, B.J.; KELLER, S.A.; SPRIGGS, D.L.; CAPACIO, B.R.; CHANG, F.C. T. Recovery from the Lethal Effects of Saxitoxin: A Therapeutic Window for 4-aminopyridine (4-AP). **Toxicon**, v. 36, n. 4, p. 571-588, 1998.

- BERS, D.M. Excitation-Contraction Coupling of Cardiac Contraction and Force. Major Cellular Structuree Involved in Excitation-contration Coupling. In: **BERS, D.M (Ed) Dordrecht**: Kluwer Academic Publishers, 2001. p. 1-18.
- BOLLI, R. Mechanism of myocardial "stunning". **Circulation**, v.82, p.723-738, 1990.
- BOLLI, R. Myocardial 'stunning' in man. **Circulation**, v. 86, n.6, p.1671–91, 1992.
- BOLTON, J.L.; TRUSH, M.A.; PENNING, T.M.; DRYHURST, G.; MONKS, T.J. Role of quinines 515 in toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, p. 135–160, 2000.
- BOTHA, N.; GEHRINGER, M.M.; DOWNING, T.G.; VENTER, M.V.; SHEPHARD, E.G. The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo2 cells. **Toxicon**, v.43, n.1, p.85-92, 2004.
- BRAUNWALD, E.; KLONER, R.A. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. **Ciculation**, v.66, p.1146-1149, 1982.
- CAMPOS, A.; VASCONCELOS, V. Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 268-287, 2010.
- CARMICHAEL, W. W. The cyanotoxins. **Advances in Botanical Research**, v. 27, p. 211-256, 1997.
- CARMICHAEL, W.W.; AN. J.S.; AZEVEDO, S.M.F.O.; LAU, S.; RINEHART, K.L.; JOCHIMSEN, E.M.; HOLMES, C.E.M & SILVA, J.B. (1996) **Analysis for microcystins involved in outbreak of liver failure and death of humans at a hemodialysis center in Caruaru, Pernambuco, Brazil**. IV Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia.
- CARMICHAEL, W.W.; AZEVEDO, S.M.F.O.; AN, J.S.; MOLICA, R.J.R.; JOCHIMSEN, E.M., LAU, S.; RINEHART, K.L.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental Health Perspectives**, v.109, n.7, p. 663- 668, 2001.
- CARMICHAEL, W.W.; EVANS, W.R.; YIN, Q.Q.; BELL P. & MOCZYDLOWSKI, E. Evidence for paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) comb. nov. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3104-3110, 1997.
- CHANGEUX, J.P.; KASAI, M.; LEE, C.Y. The use of snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.67, n.1241-1247, 1970.

- CHORRO, F.J.; SUCH-BELENGUER, L.; LOPEZ-MERINO, V. Animal models of cardiovascular disease. **Revista Espanola de Cardiologia**, v.62, n.1, p.69-84, 2009.
- CHORUS, I., BARTRAM, J. (eds.), 1999. **Toxic Cyanobacteria in Water**. A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management. E&FN Spon, London, p. 416.
- COSTA, S.M.; AZEVEDO, S.M.F.O. (1994). **Implantação de um Banco de Culturas de Cianofíceas Tóxicas**. Iheringia - Série Botânica, v. 45, 69-74.
- CRIDDLE, D.N.; GILLIES, S.; BAUMGARTNER-WILSON, H.K.; JAFFAR, M.; CHINJE, E.C.; PASSMORE, S.; CHVANOV, M.; BARROW, S.; GERASIMENKO, O.V.; TEPIKIN, A.V.; SUTTON, R.; PETERSEN, O.H. Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 281, p.40485-40492, 2006.
- DAWSON, R.M. The toxicology of microcystins. **Toxicon**, v. 36, n. 7, p. 953 - 962, 1998.
- DHALLA, N.S.; PANAGIA, V.; SINGAL, P.K.; MAKINO, N.; DIXON, I.M.; EYOLFSON, D.A. Alterations in heart membrane calcium transport during the development of ischemia– reperfusion injury. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 20, n.2, p. 3-13, 1988.
- DI MONTE, D.; ROSS, D.; BELLOMO, G.; EKLOW, L.; ORRENIUS, S. Alterations in intracellular thiol homeostasis during the metabolism of menadione by isolated rat hepatocytes. **Archives of Biochemistry Biophys**, v. 235, p. 334–342, 1984a.
- DIAS, E.; ANDRADE, M.; ALVERCA, E.; PEREIRA, P.; BATOREU, M.C.C.; JORDAN, P.; SILVA, M.J. Comparative study of the cytotoxic effect of microcystin-LR and purified extracts from *Microcystis aeruginosa* on a kidney cell line. **Toxicon**. Vol. 53, n.5, p.487-495, 2009.
- DING, W.X.; SHEN, H.M.; ONG, C.N. Pivotal role of mitochondrial Ca(2+) in microcystin-induced mitochondrial permeability transition in rat hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. Vol. 285, n.5, p.1155-1161, 2001.
- DING, W.X.; SHEN, H.M.; ZHU, H.M.; ONG, C.N. Studies on oxidative damage induced by cyanobacteria extract in primary cultured rat hepatocytes. **Environmental Reserch**, v. 78, n. 1, p.12-18, 1998.
- DOERR W., Ueber die Anwendung des Reduktionsindikators Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) in Histologie und Histophysiologie, **Frankfurter Zeitschrift fur Pathologie**, v. 61, 1950.

- DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymology**, v.186, p.421-431. 1990.
- DUY, T.N.; LAM, P.K.S.; SHAW, G.R.; CONNELL, D.W. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. **Reviews of Environmental Contamination & Toxicology**, v.163, p. 113-185, 2000.
- ELEFF, S.; KENNAWAY, N.G.; BUIST, N.R.; DARLEY-USMAR, V.M.; CAPALDI, R.A.; BANK, W.J. <sup>31</sup>P NMR study of improvement in oxidative phosphorylation by vitamins K3 and C in a patient with a defect in electron transport at complex III in skeletal muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.81, n.11, p. 3529-3533, 1984.
- ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos de Limnologia**, Rio de Janeiro: Interciência, 1998.
- FALCONER, I.R.; YEUNG, D.S.K. Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by Microcystis toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins. **Chemico-Biological Interactions**, v. 81, n. 1, p. 181-196, 1992.
- FENG, H.Z; BIESIADECKI, B.J; YU, Z.B; HOSSAIN, M.M; JIN, J.P. Restricted N-terminal truncation of cardiac troponin T: a novel mechanism for functional adaptation to energetic crisis. **The Journal of Physiology**, v. 586, p. 3537-3550, 2008.
- FERRARI, C.K.B. Apoptose: a importância da maquinaria de morte celular no controle e na patogênese de doenças. **Revista Ciência Médica**, v.9, p.21-31, 2000a.
- FERRARI, C.K.B. Free radicals, lipid peroxidation and antioxidante in apoptosis: implication in cancer, cardiovascular and neurological diseases. **Biologia**, v. 55, p.581-590, 2000b.
- FEURSTEIN, D.; HOLST, K.; FISCHER, A.; DIETRICH, D.R. Oatp-associated uptake and toxicity of microcystins in primary murine whole brain cells. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 234, n.2, p.247-255, 2009.
- FISCHER, A.; HOEGER, S.J.; STEMMER, K.; FEURSTEIN, D.J.; KNOBELOCH, D.; NUSSLER, A.; DIETRICH, D.R. The role of organic anion transporting polypeptides (OATPs/SLCOs) in the toxicity of different microcystin congeners *in vitro*: A comparison of primary human hepatocytes and OATP-transfected HEK293 cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 245, n.1, p.9-20, 2010.

- FLOREANI, M.; NAPOLI, E.; PALATINI, P. Protective action of car diac DT-diaphorase against menadione toxicity in guinea pig isolated atria. **Biochemistry and Pharmacology**, v. 60, n.4, p. 601–605, 2000.
- FLOREANI, M.; NAPOLI, E.; PALATINI, P. Role of antioxidant defences in the species-specific response of isolated atria to menadione. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology**, v. 132, n.2, p. 143–151, 2002.
- FUNARI, E.; TESTAI, E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 38, n. 2, p. 97-127, 2008.
- GEOFFREY, A. Codd. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. **Ecological Engineering**, v. 16, n.1, p. 51–60, 2000.
- GERASIMENKO, I.; SHELUDKO, Y.; UNGER, M.; STOCKIGT, J. Development of an efficient system for the separation of indole alkaloids by high performance liquid chromatography and its applications by high performance liquid chromatography and its applications. **Phytochemical Analysis**, v.12, n.2, p.96-103, 2001.
- GHOSH, S.; KHAN, S. A.; WICKSTROM, M.; BEASLEY, V. Effects of microcystin-LR on actin and the actin-associated proteins a-actinin and talin in hepatocytes. **Natural Toxins**, v. 3, n.6, p. 405 - 414, 1995.
- GOLDBERG, J.; HUANG, H.B.; KWON, Y.G.; GREENGARD, P.; NAIRN, A.C.; KURIYAN, J. Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. **Nature**, v.376, n. 6543, p.745-753, 1995.
- GOLDSTEIN, J. L.; BASU, S. K.; BROWN, M. S. Receptor mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. **Methods Enzymology**, v.98, p.241-260, 1983.
- GORDON, F.A.; SARADINDU, D. Electromechanical effects of menadione on isolated rat heart in relation to oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v.11, n.2, p.169-177, 1991.
- GOVINDJEE.; SHEVELA, D. Adventures with cyanobacteria: a personal perspective. **Frontiers in Plant Physiology**, v. 2, n.28, p. 2011-2088, 2011.
- GUATIMOSIM, S.; DILLY, K.; SANTANA, L.F.; SALEET.; JAFRI, M.; SOBIE, E.A.; LEDERER, W.J. Local Ca(2+) signaling and EC coupling in heart: Ca(2+) sparks and the regulation of the [Ca(2+)](i) transient. **Journal Molecular of Cellular Cardiology**, v. 34, n. 8, p. 941–950, 2002.

- GULLEDGEA, B.M.; AGGENA, J.B.; HUANGB, H.B.; NAIRNC, A.C.; CHAMBERLIN, A.R. The microcystins and nodularins: Cyclic polypeptide inhibitors of PP1 and PP2A. **Current. Medicinal Chemistry**, v. 9, n.22, p. 1991-2003, 2002.
- GUYTON, A. C., HALL, J. E. **Textbook of Medical Physiology**. Ed 11th, 2006.
- HAGANE, K.; AKERA, T.; BERLIN, J.R. Doxorubicin: mechanism of cardiodepressant action in guinea pigs. **The Journal of Pharmacology**, v.246, n.2, p. 655-661, 1988.
- HARADA, K. Trace analysis of microcystin. **Phycologia**, v.35, p. 36-41, 1996.
- HAWKINS, P.R.; RUNNEGAR, M.T.; JACKSON, A.R.; FALCONER, I.R. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue green algae) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n5, p. 1292-1295, 1985.
- HEART, E.; PALO, M.; WOMACK, T.; SMITH, P.J.S.; GRAY, J.P. The level of menadione redox-cycling in pancreatic B-cells is proportional to the glucose concentration: Role of NADH and consequences for insulin secretion. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 258, n.2, p.216-225, 2012.
- HONKANEN, R.E.; GOLDEN, T. Regulators of Serine/Threonine Protein Phosphatases at the Dawn of a Clinical Era? **Current Medical Chemistry**, v. 9, n. 22, p. 2055-2075, 2002.
- HONKANEN, R.E.; ZWILLER, J.; MOORE, R.E.; DAILY, S.L.; KHATRA, B.S.; DUKELOW, M.; BOYNTON, A.L. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n.32, p. 19401-19404, 1990.
- HUDNELL. Advances in Experimental Medicine and Biology, v. 619. **Cyanobacterial Harmful Algal Blooms. State of the Science and Research Need**. Edited by H. Kenneth Hudnell. Ano 2008.
- HUMM, H.J.; WICKSS, S.R. 1980 **Introduction and Guide to the Marine Bluegreen Algae**. John Wiley & Sons, New York, 194 pp.
- HUMPAGE, A.R.; HARDY, S.J.; MOORE, E.J.; FROSCIO, S.M.; FALCONER, I.R. Microcystins (cyanobacterial toxins) in drinking water enhance the growth of aberrant crypt foci in the mouse colon. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 61, n.3, p. 155-165, 2000.
- IYANAGI, T.; YAMAZAKI, I. One-electron-transfer reactions in biochemical systems III. One-electron reduction of quinones by microsomal flavin enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v.172, n.3, p.370-381, 1969.

- IYANAGI, T.; YAMAZAKI, I. One-electron-transfer reactions in biochemical systems V. Difference in the mechanism of quinone reduction by the NADH dehydrogenase and the NAD(P)H dehydrogenase (DT-diaphorase). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 216, n.2, p.282-294, 1970.
- JIANG, W.; BLUMENTHAL, J.A.; HAHSON, M.; COLEMAN, E.E.; O'CONNOR, C.M.; FRID, D.; JR MORRIS, J.J.; WAUGH, R.A. Relative importance of electrode placement over number of channels in transient myocardial ischemia detection by Holter monitoring. **The American Journal of Cardiology**, v.76, n.5, p.350-354, 1995.
- JOCHIMSEN, E.M.; CARMICHAEL, W.W.; AN, J.; CARDO, D.; COOKSON, S.T.; HOLMES, C.E.M.; ANTUNES, M.B.C.; MELO FILHO, D.A.; LYRA, T.M.; BARRETO, V.; AZEVEDO, S.M.F.O.; JARVIS, W.R. Liver failure and death following exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n.13, p. 873-878, 1998.
- JONES, D.P. Redefining oxidative stress. **Antioxidant Redox Signal**, v. 8, n. 9-10, p. 1865-79, 2006.
- KAEBERNICK, M.; NEILAN, B.A. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 35, n. 1, p. 1-9, 2001.
- KATZ AM. **Physiology of the Heart**. 4th ed. 2006.
- KATZ, A.M. Discovery of phospholamban. A personal history. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 16, n. 853, p. 9-19, 1998.
- KATZUNG, B. **Farmacologia Básica & Clínica**.10th ed. 2010.
- KIRCHBERGER, M.A.; TADA, M.; REPKE, D.I.; KATZ, A.M. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase stimulation of calcium uptake by canine cardiac microsomes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 4, n.6, p.673-680, 1972.
- KLAPPER, H. 1991. **Control of Eutrophication in Inland Waters**. Ellis Horwood, Chichester, p.337
- KLEIN H.H., PUSCHMANN S., SCHAPER J. E SCHAPER W., The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction, **Klinische Medizin**, v.393,1981.
- KONDO, F.; IKAI, Y.; OKA, H.; OKUMURA, 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. **Chemical Research in Toxicology**, v. 5, n.5, p. 591–596, 1992.

- LA RAIA, P.J.; MORKIN, E. Adenosine 3',5'-monophosphate dependent membrane phosphorylation: a possible mechanism for the control of microsomal calcium transport in heart muscle. **Circulation Research**, v.35, p. 298-306, 1974.
- LANKOFF, A.; SOCHACKI, J.; SPOOF, L.; MERILUOTO, J.; WOJCIK, A.; WEGIEREK, A.; VERSCHAEVE, L. Nucleotide excision repair impairment by nodularin in CHO cell line due to ERCC1/XPF inactivation. **Toxicology Letters**, v. 179, n.2, p.101-107, 2008.
- LECLAIRE, R.D.; PARKER, G.W.; FRANZ, D.R. Hemodynamic and calorimetric changes induced by microcystin-LR in the rat. **Journal of Applied Toxicology**, v.15, n.4, p.303-311, 1995.
- LOPES, V.R.; RAMOS, V.; MARTINS, A.; SOUSA, M.; WELKER, M.; ANTUNES, A.; VASCONCELOS, A.A. Phylogenetic chemical and morphological diversity of cyanobacteria from Portuguese temperate estuaries. **Marine Environmental Research**, v. 73, p. 7-16, 2012.
- LUUKKAINEN, R.; NAMIKOSHI, M.; SIVONEN, K.; RINEHART, K.; NIEMELA, S.I. Isolation and identification of 12 microcystin from four strains and two bloom samples of *Microcystis* spp.: structure of a new hepatotoxin. **Toxicon**, v. 32, n.1, p. 133-139, 1994.
- MACKINTOSH, C.; BEATTIE, K.A.; KLUMP, S.; COHEN, P.; CODD, G.A. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. **FEBS Letters**, v. 264, n. 2, p. 189-192, 1990.
- MACLENNAN, D.H.; KRANIAS, E.G. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. **Nature**, v.4, p.566-577, 2003.
- MARBAN, E. Pathogenetic role for calcium in stunning? **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v.5, p.891-894, 1991.
- MARON, B.A; ROCCO, T.P. Farmacoterapia da insuficiência cardíaca congestiva. In: GOODMAN & GILMAN, Ed.12. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Porto Alegre: AMGH, 2012. p. 789-813.
- MARRIAGE, B.J.; CLANDININ, M.T.; MACDONALD, I.M.; GLERUM, D.M. Cofactor treatment improves ATP synthetic capacity in patients with oxidative phosphorylation disorders. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 81, n. 4, p. 263–272, 2004.
- MARTINS, N.D.; COLVARA, W.A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. Microcystin-LR: How it affects the cardio-respiratory responses to hypoxia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**, v. 84, n.1, p.154-159, 2011.

- MCELHINEY, J.; LAWTON, L. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, n.3, p. 219-230, 2005.
- MILUTINOVIC, A.; ZORC-PLESKOVIC, R.; PETROVIC, D.; ZORC, M.; SUPUT, D. Microcystin-LR induces alterations in heart muscle. **Folia Biologica**, v.52, p.116-118, 2006.
- MIRABELLI, F.; SALIS, A.; MARINONI, V. 1988. Menadione induced bleb formation in hepatocytes is associated with the oxidation of thiol groups in actin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 264, n.1, p.261-269, 1988.
- MONKS, T. J.; HANZLIK, R. P.; COHEN, G. M.; ROSS, D.; GRAHAM, D. G. Contemporary issues in toxicology: Quinone chemistry and toxicity. **Toxicology Applied. Pharmacology**, v. 112, n. 32, p. 2-16, 1992.
- 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. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 59, n.4, p.293-299, 2003.
- MORENO, I.; PICHARDO, S.; JOS, A.; GOMEZ-AMORES, L.; MATE, A.;VAZQUEZ, C.M.; CAMEAN, A.M. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. **Toxicon**, v.45, n.4,p.395-402, 2005.
- NACHLAS M.M. SHNITKA T.K., Macroscopic identification of early myocardial infarcts by alteration in dehydrogenase activity. **The American Journal of Pathology**, v. 42, 1963.
- NINEHAM A.W., The chemistry of formazans and tetrazolium salts, **Chemical**. 55, O'BRIEN, P. J. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 80, n. 1, p.1-14, 1991.
- ORRENIUS, S. Biochemical mechanisms of cytotoxicity. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.6, p. S15–S20. (FEST Suppl.). 1985.
- PICH S., KLEIN H.H., LINDERT S., NEBENDAHL K. E KREUZER H., Cell death in ischemic, reperfused porcine hearts: A histochemical and functional study, **Basic Research in Cardiology**, v. 83, 1988.
- PRIETO, A.I.; JOS, A.; PICHARDO, S.; MORENO, I.; CAMEAN, A.M. Protective role of vitamin E on the microcystin-induced oxidative stress in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 27, n. 5, p. 1152-1159, 2009.

- QIU, T.; XIE, P.; LIU, Y.; LI, G.; XIONG, Q.; HAO, L.; LI, H. The profound effects of microcystin on cardiac antioxidant enzymes, mitochondrial function and cardiac toxicity in rat. **Toxicology**, v. 257, n.1-2, p.86-94, 2009.
- RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S.K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nature Protocols**, v.1, n. 6, p. 3159- 3165, 2006.
- RAMKISSON R.A., Macroscopic identification of early myocardial infarction by RAPPUOLI, R.; MONTECUCCO, C. (Editors) (1997). Protein Toxins and their **Use in Cell Biology**. Oxford University Press, Oxford.
- RUNNEGAR, M.; SHOU-MING, K.; YA-ZHEN, Z.; SHELLY, C. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. **Biochemical Pharmacology**, v. 49, n. 2, p. 219-255, 1995.
- RUNNERGAR, M. T. C.; GERDES, R. G.; FALCONER, I. R. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. **Toxicon**, v. 29, n. 1, p. 43 -51, 1991.
- SAHIN, A.; TENCALLA, F.G.; DIETRICH, D. R.; MEZ, K.; NAEGELI, H. Enzymatic analysis of liver samples from rainbow trout for diagnosis of blue-green algae-induced toxicosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 1110-1115, 1995.
- SANDRITTER W. E JESTAEDT R., Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) als Reduktionsindikator zur makroskopischen Diagnose des frischen Herzinfarktes, **Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie**, v.41, 1958.
- SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P. Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. Nova Hedwigia, Zeitschrift Für **Kryptogamenkunde**, Alemanha, v. 71, n.3-4, p.359-385, 2000.
- SHIDEH POURIA.; ANDRADE, A.; BARBOSA, J.; CAVALCANTI, R.L.; BARRETO, V.T.S.; WARD, C.J.; PREISER, W.; POON, G.K.; NEILD, G.H.; CODD, G.A. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **The lancet**, v. 352, n. 9121, p.21-26, 1998.
- SIVONEN, K.; NIEMELA, S.I.; NIEMI, R.M.; LEPISTO, L.; LUOMA, T.H.; RASAMEN, L.A. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Finnish fresh and coastal waters. **Hydrobiologia**, v. 190, p. 267-275, 1990.
- SONG, W.; CRUZ, A.D.L.; REIN, K.; O'SHEA, K.E. Ultrasonically induced degradation of Microcystin-LR and -RR: Identification of products, effect of pH, formation and destruction of peroxides. **Environmental Science & Technology**, v.40, n.12, p.3941-3946, 2006.

- SVIRCEV, Z.; KRSTIC, S.; MILADINOV-MIKOV, M.; BALTIC, V.; VIDOVIC, M. Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 27, n.1, p.36-55, 2009.
- TADA, M.; KIRCHBERGER, M.A.; KATZ, A.M. Phosphorylation of a 22,000-danton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n.7, p. 2640-2647, 1975.
- TANG, W.H.; KRAVTSOV, G.M.; SAUERT, M.; TONG, X.Y.; HOU, X.Y.; WONG, T.M.; CHUNG, S.K.; CHUNG, S.S.M. Polyol pathway impairs the function of SERCA and RyR in ischemic-reperfused rat hearts by increasing oxidative modifications of these proteins. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 49, n.1, p.58-69, 2010.
- TROGEN, G.; ANNILA, A.; ERIKSSON, J.; KONTTELI, M.; MERILUOTO, J.; SETHSON, I.; ZDUNEK, J.; EDLUND, U. Conformational studies of microcystin-LR using NMR spectroscopy and molecular dynamics calculations. **Biochemistry**, v.35, n.10, p. 3197-3205, 1996.
- TSUJI, K.; NAITO, S.; KONDO, F.; ISHIKAWA, N.; WATANABE, M.F.; SUZUKI, M.; HARADA, K. Stability of microcystin from cyanobacteria: effect of light on decomposition and isomerization. **Environmental Science & Technology**, v. 28, n. 1, p. 173-177, 1994.
- TZENG, W.F.; CHIOU, T.J.; HUANG, J.Y.; CHEN, Y.H. Menadione-induced cardiotoxicity is associated with alteration in intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis. **Proceedings of the National Science**, v.16, n.2, p.84-90, 1992.
- VAN APELDOORN, M.E.; VAN EGMOND, H.P.; SPEIJERS, G.J.; BAKKER, G.J. Toxins of cyanobacteria. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, n.1, p.7-60, 2007.
- WANG, Y.; KODANI, E.; WANG, J.; ZHANG, S.X.; TAKANO, H.; TANG, X.L.; BOLLI, R. Cardioprotection during the final stage of the late phase of ischemic preconditioning is mediated by neuronal NO synthase in concert with cyclooxygenase2. **Circulation Research**, v.95, p.84-91, 2004.
- WANG, W.; FANG, H.; GROOM, L.; CHENG, A.; ZHANG, W.; LIU, J.; WANG, X.; LI, K.; HAN, P.; ZHENG, M.; YIN, J.; WANG, W.; MATTSON, M. P.; KAO, J. P.; LAKATTA, E. G.; SHEU, S. S.; OUYANG, K.; CHEN, J.; DIRKSEN, R. T.; CHENG, H. Superoxide flashes in single mitochondria. **Cellular**, v. 134, p. 279–290, 2008.
- WANG, Y.; QIAN, C.; ROCKS, A.J.M.; WESTERMANN, D.; SCHMARCHER, S.M.; ESCHER, F.; SCHOEMAKER, E.G.; REUDELHUBER, T.L.; GILST, W.H.V.;

- SCHLTHEISS, H.P.; TSCHOPE, C.; WALTHER, T. Circulating rather than cardiac angiotensin-(1-7) stimulates cardioprotection after myocardial infarction. **Circulation**, v. 3, p. 286-293, 2010.
- WEI, B; JIN, J.P. Troponin T isoforms and posttranscriptional modifications: Evolution, regulation and function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.505, n.2, p. 144-154, 2011.
- XING, Y.; XU, Y.;CHEN, Y.;JEFFREY, P.D.; CHAO, Y.; LIN, Z.; LI, Z.; STRACK, S.; STOCK, J.B.; SHI, Y. Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins. **Cells Press**, v.127, n.2, p.341-353, 2006.
- YOSHIZAWA, S.; MATSUSHIMA, R.; WATANABE, M.F.; HARADA, K.; ICHIHARA, A.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H. Inhibition of protein phosphatases by microcystins and nodularin associated with hepatotoxicity. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 116, n. 6, p. 609–614, 1990.
- YUE, YUANKUN.; KRENZ, M.; COHEN, M.V.; DOWNEY, J.M.; CRITZ, S.D. Menadione mimics the infarcts-limiting effect of preconditioning in isolated rat hearts. **American Journal of Physiology- Heart**, v. 281, n.2, p.90-95, 2001.
- YUNES, J.S,*et alli*. “Effect of nutrient balance and physical factors on blooms of toxic cyanobacteria in the Patos Lagoon, southern Brazil”. In: Verh. International Verein. **Linnology**, v. 26:1796-1800, 1998.
- ZEGURA, B.; VOLCIC, M.; LAH, T.; FILIPIC, M. Different sensitivities of human colon adenocarcinoma (CaCo-2), astrocytoma (IPDDC-A2) and lymphoblastoid (NCNC) cell lines to microcystin-LR induced reactive oxygen species and DNA damage. **Toxicon**, v. 52, n.3, p. 518-525, 2008.
- ZHANG, Z.; LIAN, M.; LIU, Y.; WEI, G.; YU, S.; KANG, S.; ZHANG, Y, CHEN, C. Teratosis and damage of viscera induced by microcystin in SD rat fetuses. **Europe PubMed Central**, v. 82, n.5, p. 345-347, 2002.
- ZHANG, Z; BIESIADECKI, B.J; JIN, J.P. Selective deletion of the NH2-terminal variable region of cardiac troponin T in ischemia reperfusion by myofibrilassociated mu-calpain cleavage. **Biochemistry**, v. 45, n.38, p.11681-11694, 2006.
- ZOLNIEROWICZ, S.; VAN HOOF, C.; STEVENS, P.; STEVENS, I.; MERLEVEDE, W.; GORIS, J.; HEMMINGS, B. The variable subunit associated with phosphatase 2A defines a novel multimember family of regulatory subunits. **Journal of Biochemistry**, v. 317, 187-194, 1996.
- ZWEIER, J. L.; TALUKDER, M. A. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. **Cardiovascular Research**, v. 70, n. 2, p. 181–190, 2006.

ZWEIER, J.L. Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 1353–1357, 1988.









