



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

*Campus São Gabriel*

ATIVIDADE INDUZIDA PELO EXTRATO DE ALGAS  
CIANOFÍCEAS CONTENDO ANATOXINA-A(S) SOBRE O SISTEMA  
NERVOSO CENTRAL E PERIFÉRICO DE VERTEBRADOS

Mauricio Maciel Pacheco

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

ATIVIDADE INDUZIDA PELO EXTRATO DE ALGAS CIANOFÍCEAS  
CONTENDO ANATOXINA A(S) SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL E  
PERIFÉRICO DE VERTEBRADOS

**MAURICIO MACIEL PACHECO**

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa –Unipampa, Campus São Gabriel, como partedo requisitos necessários à obtenção do graude Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Cháriston André Dal Belo

Rio Grande do Sul

Agosto de 2014

ATIVIDADE INDUZIDA PELO EXTRATO DE ALGAS CIANOFÍCEAS  
CONTENDO ANATOXINA A(S) SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL E  
PERIFÉRICO DE VERTEBRADOS

MAURICIO MACIEL PACHECO

ORIENTADOR: PROF. DR. CHÁRISTON ANDRÉ DAL BELO

Monografia submetida à Comissão de Trabalho de Conclusão de Curso de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado por:

---

Presidente, Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo

---

Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto

---

Profª Drª. Thaís Posser

---

Profª Drª. Lucia do Canto Vinadé - Suplente

São Gabriel, agosto de 2014.

## RESUMO

### **Atividade induzida pelo extrato de algas cianofíceas contendo anatoxina-a(S) sobre o sistema nervoso central e periférico de vertebrados**

A anatoxina-a(S) é o único organofosforado conhecido de ocorrência natural oriundo do metabolismo secundário de algas cianofíceas. Estes compostos têm sido descritos por possuírem atividade inibidora não reversível da enzima acetilcolinesterase. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos biológicos induzidos pelo extrato de algas cianofíceas contendo anatoxina-a(s) sobre o sistema nervoso central e periférico de vertebrados. Utilizaram-se camundongas fêmeas adultas da linhagem SPF (Swiss) e pintainhos neonatos da linhagem HY LINE W36. Foram realizados ensaios de viabilidade celular em fatias de hipocampo e de atividade neuromuscular em preparação músculo biventer cervicis de pintainho. A análise estatística foi realizada usando-se o método Anova e teste “t” de Student. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0.05$ . A análise da atividade do extrato de algas cianofíceas contendo anatoxina a(s) (1, 2, 4 e 8  $\mu\text{g/ml}$ ) em preparação músculo biventer cervicis de pintainho *in vitro* demonstrou um efeito dose e tempo-dependente sobre a resposta contrátil. A dose de 2  $\mu\text{g/ml}$  induziu facilitação transitória da força de contração muscular e inibição parcial da resposta contrátil em 120 min. Nas doses maiores houve bloqueio de 100% da resposta contrátil que não foi precedido de facilitação, em 120 min de registros. Os ensaios de viabilidade celular em fatias de hipocampo demonstraram que o extrato de algas cianofíceas contendo anatoxina-a(s) (2, 4 e 8  $\mu\text{g/ml}$ ) induz tanto neuroproteção quanto neurotoxicidade significativas. Nas concentrações de 2 e 8  $\mu\text{g/ml}$  houve neuroproteção enquanto na de 4  $\mu\text{g/ml}$  houve diminuição da viabilidade celular ( $n=6$ ,  $p < 0.05$ , respectivamente). Os ensaios realizados com um inibidor clássico da atividade colinesterásica, o Triclorfon, revelaram somente diminuição da viabilidade celular. Conclui-se que em vertebrados, em modelos *in vitro*, o extrato de algas cianofíceas contendo anatoxina-a(S) induz neurotoxicidade e neuroproteção sobre o sistema nervoso central e bloqueio neuromuscular, semelhantemente a outros compostos organofosforados.

**Palavras-chave:** Algas cianofíceas, organofosforado, anatoxina a(s), neurotoxicidade, junção neuromuscular.

## ABSTRACT

### Activity of extract of blue-green algae containing anatoxin-a(S) on the central and peripheral nervous systems of vertebrates

The anatoxin-a (S) is known as the only naturally occurring organophosphate from secondary metabolism of green algae. These compounds have been reported to cause not reversible inhibitory activity upon the enzyme acetylcholinesterase. The aim of this work was to investigate the biological activities induced by the green algae extracts containing-anatoxin-a(S) on the central and peripheral nervous system of vertebrates. It was used adult SPF female mice (Swiss) and newborn chicks (Hy Line W36). Hippocampal slice preparations were used to measure cell viability and chick biventer cervicis muscle preparations for the neuromuscular activity. Statistical analysis was performed using ANOVA and Student "t" tests. Results were considered significant when  $p < 0.05$ . At *in vitro* biventer cervicis muscle preparations the assay of the extract of green algae containing-anatoxin-a(S) (2, 4 and  $8\mu\text{g/ml}$ ) demonstrated a dose and time-dependent effect upon the muscle twitch tension ( $n=6$ ,  $p < 0.05$ ). With the concentration of  $2\mu\text{g/ml}$  there was a transitory increase in the amplitude of muscle twitches followed by partial inhibition of the muscle twitches in 120 min recordings. With the higher concentrations there was 100% blockage of muscle twitches that was not preceded of facilitation in 120 min recordings. The cell viability assays in hippocampal slices showed that the extracts (1, 2, 4 and  $8\mu\text{g/ml}$ ) induced both neuroprotection and neurotoxicity ( $n = 6$ ,  $p < 0.05$ ). Thus, the concentrations of 2 and  $8\mu\text{g/ml}$  induced only neuroprotection while those with  $4\mu\text{g/ml}$  induced decrease in the cell viability ( $n=6$ ,  $p < 0.05$ , respectively). The assay with trichlorfon, a common organophosphate, induced only decrease in cell viability. It is concluded that in vertebrates at *in vitro* models the extract of cyanobacteria containing anatoxin-a (S) induces both neurotoxicity and neuroprotection at central nervous system and neuromuscular blocking actions, similarly to other organophosphate compounds with anticholinesterase activity.

**Keywords:** Green algae, organophosphate, anatoxin-a(S), neurotoxicity, neuromuscular junction.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	4
ABSTRACT .....	5
SUMÁRIO.....	6
1.LISTA DE FIGURAS .....	7
2.INTRODUÇÃO .....	8
2.1. ORGANOFOSFORADOS .....	8
2.2. ANATOXINAS .....	11
3. OBJETIVO .....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	14
4.1. SOLUÇÃO NUTRITIVA.....	14
4.2.REAGENTES .....	15
4.3.ANIMAIS .....	15
4.4.PREPARAÇÕES E TESTES .....	16
5.RESULTADOS E DUSCUSSÃO.....	18
6. CONCLUSÕES.....	22
7. REFERÊNCIAS .....	23

## 1. Lista de figuras

Figura 1. Estrutura química básica de inseticidas organofosforados .....	8
Figura 2. Mecanismo de hidrólise de Acetilcolina.....	9
Figura 3. Floração de cianobactérias na Lagoa da Tijuca - RJ.....	11
Figura 4. Forma estrutural química da Anatoxina-a(S).....	12
Figura 5. Análise de viabilidade em fatias (Triclorfon) .....	18
Figura 6. Análise de viabilidade em fatias (Anatoxina-a(S)) .....	19
Figura 7. Diferentes tratamentos farmacológicos em preparação músculo biventer cervicis de pintainho. ....	21

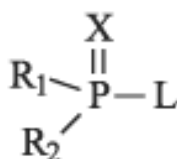
## 2. Introdução

### 2.1. Organofosforados

Relatos da história demonstram que os organofosforados já eram sintetizados na idade média por alquimistas. No século XIX o estudo sistemático desses compostos teve início com Lassaigne em 1820, com a esterificação do ácido fosfórico (TOY, 1976). Mais tarde foram descobertas as propriedades tóxicas e inseticidas de alguns compostos de fósforo por Shrader e colaboradores, em 1930, a partir dos quais novos compostos organofosforados surgiram na indústria (STODDART, 1979).

Os organofosforados são compostos orgânicos degradáveis que contêm uma ligação carbono-fósforo. Devido a sua instabilidade no meio ambiente (Dos Santos et al. 2007), com meia vida curta e efetiva atividade inseticida, se tornaram amplamente utilizados na agropecuária (FARIA et al., 2000).

Os inseticidas organofosforados são a classe de compostos químicos de maior interesse comercial e toxicológico, sendo ésteres ou tiois derivados de ácidos fosfóricos, fosfônico, fosfínico ou fosforamídico. A estrutura geral desses compostos está descrita na Figura 1 (DOS SANTOS et al., 2007).



X = O, S e Se

R<sub>1</sub>; R<sub>2</sub> = alquil, SR', OR' ou NHR'

L = halogênios; alquil, aril ou heterocíclicos

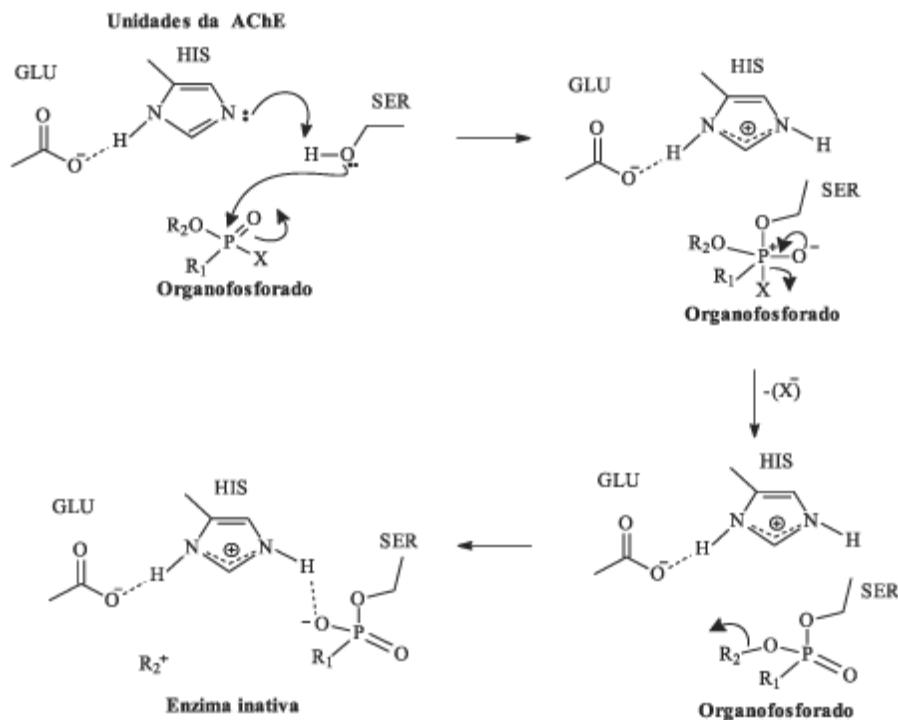
**Figura 1** – Estrutura química básica de inseticidas organofosforados

Fonte: Dos Santos et al. (2007)



Nos últimos 50 anos a intoxicação ocupacional por organofosforados tem ocorrido, devido a exposição a altas doses as quais por vezes causam mortes (DIMAS et al., 2004). A exposição crônica a esses compostos pode levar ao desenvolvimento de síndromes neurocomportamentais e até suicídios (FALK et al., 2002). Em camundongos a  $DL_{50}$  do Triclorfon, um dos organofosforados mais utilizados na agropecuária, é de 136 mg/kg (EPA, 1997).

A principal causa do efeito tóxico dos organofosforados é a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) (DUBOIS, 1948) (Figura 2), a qual possui função de hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) que é liberado na fenda sináptica. Tal inibição resulta no aumento da disponibilidade de acetilcolina (ACh) livre induzindo uma hiperestimulação dos receptores colinérgicos, comumente conhecida como intoxicação colinérgica (SALVI et al., 2003).



**Figura 2** – Mecanismo geral de Ação dos organofosforados. Na presença de organofosforados, o resíduo serina da enzima é prontamente fosforilado.

Fonte: Dos Santos, et al. 2007

Além da sua utilidade como inseticidas, os agentes anticolinesterásicos também têm sido amplamente empregados na medicina para o tratamento de diversas patologias. Dentre as doenças que se valem do tratamento por organofosforados o glaucoma e outras condições oftalmológicas (SAKANAKA et al., 2008) além de patologias associadas à motilidade gastrointestinal podem ser descritas (ANDRADE et al., 2001). Além disso, por influenciarem a neurotransmissão do sistema nervoso periférico, atuando sobre a junção neuromuscular do músculo esquelético, os organofosforados têm sido empregados no tratamento da miastenia grave (ANDRADE et al., 2001).

## 2.2. A anatoxina-a(S)

As cianobactérias são microorganismos fotossintetizantes primitivos, presentes na água doce e salgada, além de ambientes úmidos terrestres, as quais desempenham um importante papel na oxigenação da atmosfera terrestre. As cianobactérias podem sintetizar uma ampla variedade de compostos químicos e pigmentos os quais ainda não foram observados em outras algas e toxinas eucarióticas (SIGAUD-KUTNER et al., 2002; PINTO et al., 2003; GUARATINI et al., 2005; GUARATINI et al., 2009; ARÁOZ et al., 2010).

Por outro lado, esses organismos têm aumentado a preocupação dos órgãos de saúde pública em todo o mundo devido à sua capacidade de formar florações em ambientes aquáticos (como na Figura 3), e por produzirem uma grande diversidade de toxinas, conhecidas como cianotoxinas (SIVONEN & JONES, 1999; HUMMERT et al., 2001; BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2005; FRIAS et al., 2006; KUJBIDA et al., 2006; DORR et al., 2010).



**Figura 3** – Floração de cianobactérias na Lagoa da Tijuca - RJ

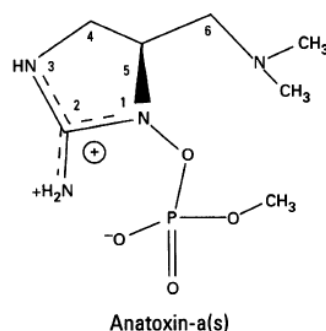
Fonte: UFRJ

Atualmente três subtipos de cianotoxinas são descritos: as microcistinas (compostos hepatotóxicos), as saxitoxinas (compostos neurotóxicos bloqueadores de canais de sódio em membranas neuronais) e as anatoxinas (ARAÓZ et al., 2010).

As anatoxinas se subdividem em dois tipos: as anatoxinas do tipo A (que são análogos do neurotransmissor acetilcolina) e as anatoxinas-a(S), que são o único organofosforado natural conhecido (CARMICHAEL et al., 1990).

Se por um lado esses compostos tornam-se uma ameaça ao meio ambiente devido sua alta toxicidade e dificuldade para detecção e identificação, por outro lado, surgem como potenciais agentes para desenvolvimento de novos compostos com atividade farmacológica e biotecnológica. Nesse sentido atualmente existem mais de 150 gêneros de algas cianofíceas descritas com aptidão para produzirem metabólitos secundários biologicamente ativos (PRASANNA et al., 2010).

A anatoxina-a(S) (antx-a(S)) é o único organofosforado de ocorrência natural conhecido, oriundo do metabolismo secundário de cianobactérias dos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *lyngbya* (MAHMOOD et al., 1985). Seu mecanismo de ação, assim como qualquer composto organofosforado, consiste na inibição irreversível da acetilcolinesterase (AChE), causando hipersalivação (daí a origem do s no nome), convulsões e também morte por parada respiratória (FERRÃO-FILHO et al., 2011). Sua DL<sub>50</sub> é de 20 µg/kg em camundongos (CARMICHAEL, 1990). Sua fórmula estrutural está descrita na Figura 4.



**Figura 4**– Forma estrutural química da Anatoxina-a(S)

Fonte: Rodrigues et al. (2006).

No Brasil, vários relatos da ocorrência de casos de intoxicação por antx-a(S) têm sido descritos, devido principalmente a floração de *Anabaena spirroides* (MONSSERAT et al., 2001; MOLICA et al., 2005). Dessa maneira, devido a dificuldade para a detecção e identificação dessa neurotoxina no ambiente aquático, ainda não foi definido o limite máximo aceitável para o consumo humano (CARMICHAEL, 1994).

### **3. Objetivo**

#### **3.1. Geral**

Nesse trabalho, propomo-nos comprovar a atividade biológica do extrato de *Anabaena sp* contendo anatoxina-a(S), identificando uma ação do tipo-organofosforado, sobre o sistema central e periférico de mamífero e ave.

#### **3.2. Específicos**

-Avaliar o efeito induzido por diferentes concentrações do extrato de *Anabaena sp* contendo anatoxina-a(S) sobre a viabilidade celular de fatias de hipocampo de camundongas adultas da linhagem Swiss;

-Avaliar o efeito induzido por diferentes concentrações do extrato de *Anabaena sp* contendo anatoxina-a(S) sobre a junção neuromuscular em preparação músculo biventer cervicis de pintainhos.

## 4. Matérias e métodos

### 4.1. Soluções nutritivas

Foram utilizados dois tipos de soluções nutritivas as quais possuem importante papel em manter as atividades metabólicas dos tecidos simulando condições *in vivo*. A solução de Krebs e a de HEPES-salina descritas a seguir:

Krebs: 136 mM NaCl, 5 KCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 23,8 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 11 mM de glicose.

HEPES-salina: 124 mM NaCl, 4nM KCL, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 12 mM glucose, 1 mM CaCl e 25 mM HEPES pH 7,4.

### 4.2. O extrato contendo anatoxina-a(S)

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens (ITEP24, ITPE25 e ITE26) de cianobactérias classificadas como *Anabaena spiroides* (MOLICA et al., 2005), isoladas do reservatório Tapacurá – PE, Brasil, gentilmente cedidas pelo professor Ernani Pinto da Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo-USP. As linhagens têm sido mantidas na coleção de culturas do Laboratório de Produtos Naturais e Toxinas de Algas do Departamento de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). A produção de antx-a(s) por estas linhagens foi caracterizada por bioensaios em camundongos, ensaios de inibição de AChE *in vitro* e LC-MS/MS (MOLICA et al., 2005; DORR et al., 2010). Cabe salientar que as linhagens ITEP24 e ITEP26 estão em processo de reclassificação através de técnicas moleculares.

Por meio de estudos de biologia molecular verificou-se que, além das diferenças com relação à presença e/ou ausência de vacúolos entre as espécies planctônicas e bentônicas do gênero *Anabaena*, ambas são geneticamente distintas. Sendo assim, todos os morfotipos que apresentavam vacúolos das espécies planctônicas pertencentes ao gênero *Anabaena* foram transferidos para o gênero *Dolichospermum* (WACKLIN et al., 2009). Porém, o nome *Anabaena* continua sofrendo mudanças e ainda não há um consenso entre os taxonomistas sobre a nomenclatura a qual o gênero irá pertencer. Desta forma, neste estudo optou-se por manter o nome *Anabaena* para designar tanto as linhagens já citadas na literatura como as linhagens estudadas neste trabalho.

### **4.3. Reagentes**

Organofosforados: Foi usado o produto triclorfon (dimetil 2,2,2-tricloro-1-hidroximetil fosfonato  $C_4H_8Cl_3O_4P$ ), marca comercial Triclorvet – Allvet ®.

Todos os demais reagentes químicos utilizados foram obtidos de empresas certificadas como Sigma, Aldrich, Merck ou BioRad sendo todos de alto grau de pureza.

### **4.4. Animais**

#### **Camundongos**

Camundongos fêmeas da linhagem (Swiss) SPF, pesando entre 25 e 30g (30-120 dias) foram cedidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Santa Maria.

#### **Pintainhos**

Pintainhos da linhagem HY LINE W36, com peso entre 40 e 50 g (4-10 dias), comprados em casas agropecuárias.

Todos os animais usados nesse trabalho foram alojados em vivário com temperatura controlada ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) com livre acesso à água e ração (Projeto aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal nº 011/2012).

#### **4.5. Preparações e ensaios de atividade biológica**

##### **Preparação músculo biventer cervicis de pintainho**

A preparação foi isolada e montada de acordo com o método descrito por GINSBORG e WARRINER (1960). Os pintainhos sofreram eutanásia por halotano (300mg/Kg). Após a dissecação e isolamento do músculo biventer cervicis o mesmo foi marrado com linha de sutura a um transdutor isométrico (AVS, São Carlos, São Paulo) e acondicionado em uma cuba de 5 ml, contendo solução nutritiva de Krebs. A solução foi areada de modo constante com carbogênio (mistura 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) e mantida a 37°C. A preparação foi submetida a uma tensão constante de 1g e estimulada eletricamente por um Estimulador Analógico (AVS, São Carlos, São Paulo) no qual eletrodos bipolares (estimulação de campo) foram conectados. Para a estimulação foram aplicados estímulos de até 7 V com pulsos supramaximais de 0,1 Hz de frequência e 0,2 ms de duração. Os registros isométricos da força de contração muscular foram feitos por meio do software AQCAD (AVS, São Carlos, São Paulo), armazenados em computador Dell Vostro (Dell, São Paulo, Brasil) e posteriormente analisados pelo software ANCAD (AVS, São Carlos, São Paulo).



## **Preparação de fatias de Hipocampo**

As fatias de hipocampo foram preparadas como descrito por TIMOTHY (1980). Os camundongos foram decapitados e tiveram o cérebro removido imediatamente; o hipocampo foi dissecado e mantido em gelo e umidificado por HEPES-salina gelada e aerada com O<sub>2</sub> (~4°C). As fatias foram obtidas de acordo com VINADÉ e RODNIGHT (1996), utilizando um fatiador de tecidos (McIlwain, EUA). Foram feitas fatias (0.4 mm) que foram separadas e pré-incubadas à 37°C por 30 min em placas de 96 poços (microwell) e preenchidas com HEPES-salina (200µL/fatia). Posteriormente o conteúdo foi substituído pelos controles e tratamentos com antx-a(S) (1, 2, 4 e 8 µg/ml) e triclorfon (1,2,4 e 8 µg/ml) sendo incubados por uma hora (37°C). A leitura das amostras foi feita em leitor de microplacas do tipo elisa.

## **Viabilidade de fatias de Hipocampo**

Imediatamente após a incubação das fatias com os tratamentos, as fatias foram submetidas ao ensaio com MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (0,05% em HEPES-salina) por 30 min (37°C) (CORDOVA et al., 2004). O ensaio basicamente usa a conversão do MTT em cristais de formazan (cor azul), devido à atividade metabólica ligada ao NADH e NADHP. Sendo assim a quantidade de formazan é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Teste proposto primeiramente por MOSSAN (1983).

## **Análise estatística**

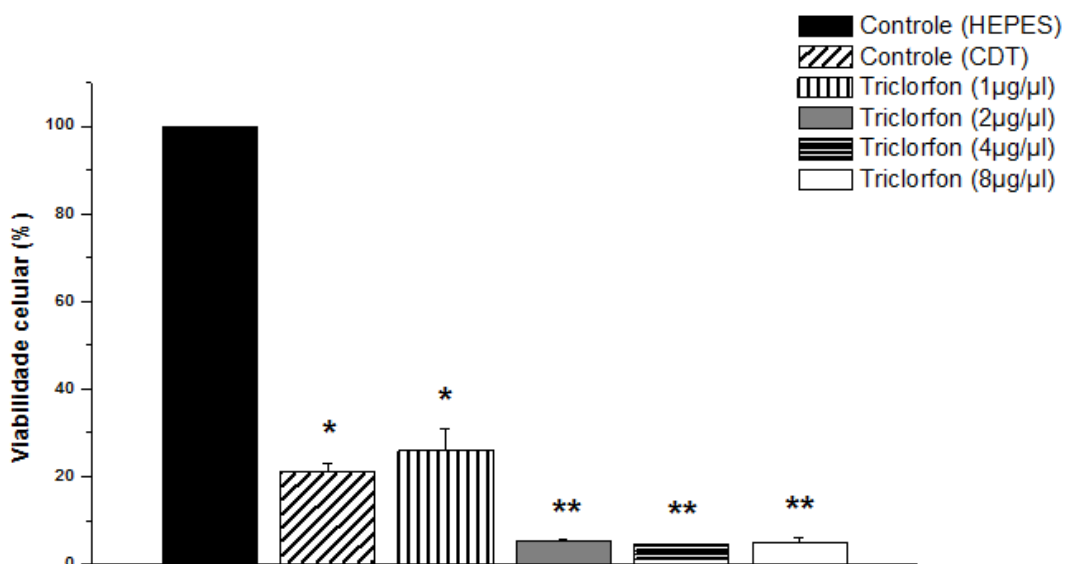
Os dados foram representados como a média ± erro padrão da média e as diferenças entre os tratamentos foram confirmadas por meio do teste ANOVA e t de Student onde p<0,05 foi considerado significativo.

## 5. Resultados e Discussão

### Análise de viabilidade celular

#### Análise de viabilidade em fatias de hipocampo de camundongo (Triclorfon)

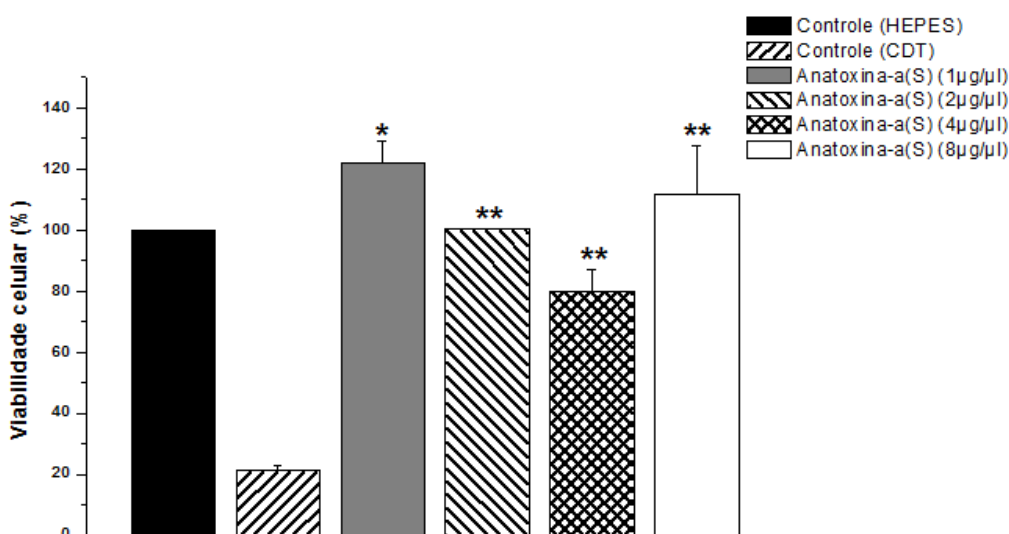
A análise de viabilidade celular foi obtida medindo-se a porcentagem de células viáveis após a exposição aos tratamentos (Figura 5). A análise de viabilidade celular demonstrou que o triclorfon (1-8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) induziu um efeito significativo diminuindo a viabilidade celular em relação ao controle com a solução de HEPES (n=6,  $p<0,05$ ). Dentre todas as concentrações ensaiadas a de (4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) foi a que induziu maior nível de diminuição na viabilidade quando comparado com o controle (Hepes) (n=6,  $p<0,05$ ). O controle positivo com o veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi usado apenas para demonstrar o efeito de um composto excito-tóxico (DAL BELO et al., 2013) sobre as fatias de cérebro.



**Figura 5** – Efeito do organofosforado Triclorfon sobre a viabilidade celular em fatias de cérebro de camundongos. CDT: veneno de *Crotalus durissus terrificus* \* Significância para  $p<0.05$  em comparação como o controle HEPES; \*\* Significância para  $p<0.05$  em comparação com o controle CDT.

## Análise de viabilidade em fatias de hipocampo de camundongo (Anatoxina-a(S))

Diferentemente do Triclorfon, os ensaios com o extrato de algas contendo a anatoxina-a(S) induziram tanto aumento quanto redução no número de células viáveis. Assim, na dose de 1µg/ml houve uma neuroproteção caracterizada pelo aumento da viabilidade celular quando comparada ao controle (HEPES) (Fig. 6, n=3, p<0.05). Quando as concentrações de 2 e 4µg/ml foram ensaiadas houve redução da viabilidade celular, que foi significativa para a dose de 4 µg/ml, quando comparada ao controle HEPES (n=3, p<0.05). Quando a concentração de 8µg/ml foi administrada não houve alteração significativa comparando-se a viabilidade celular a do controle HEPES. O ensaio com o veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) induziu diminuição de 80% na viabilidade celular e foi usado como modelo de composto bioativo para esse parâmetro (Fig.6).



**Figura 6** – Efeito do extrato de algas cianofíceas contendo anatoxina a(s) sobre a viabilidade celular em fatias de cérebro de camundongos. Note que na concentração de 1µg/ml o extrato induziu neuroproteção significativa e com a concentração de 4µg/ml houve uma redução da viabilidade celular (p<0.05, n=3, respectivamente). \*significância para p<0.05 comparada ao Controle HEPES; \*\*Significância para p<0.05 comparado ao tratamento com o veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt).

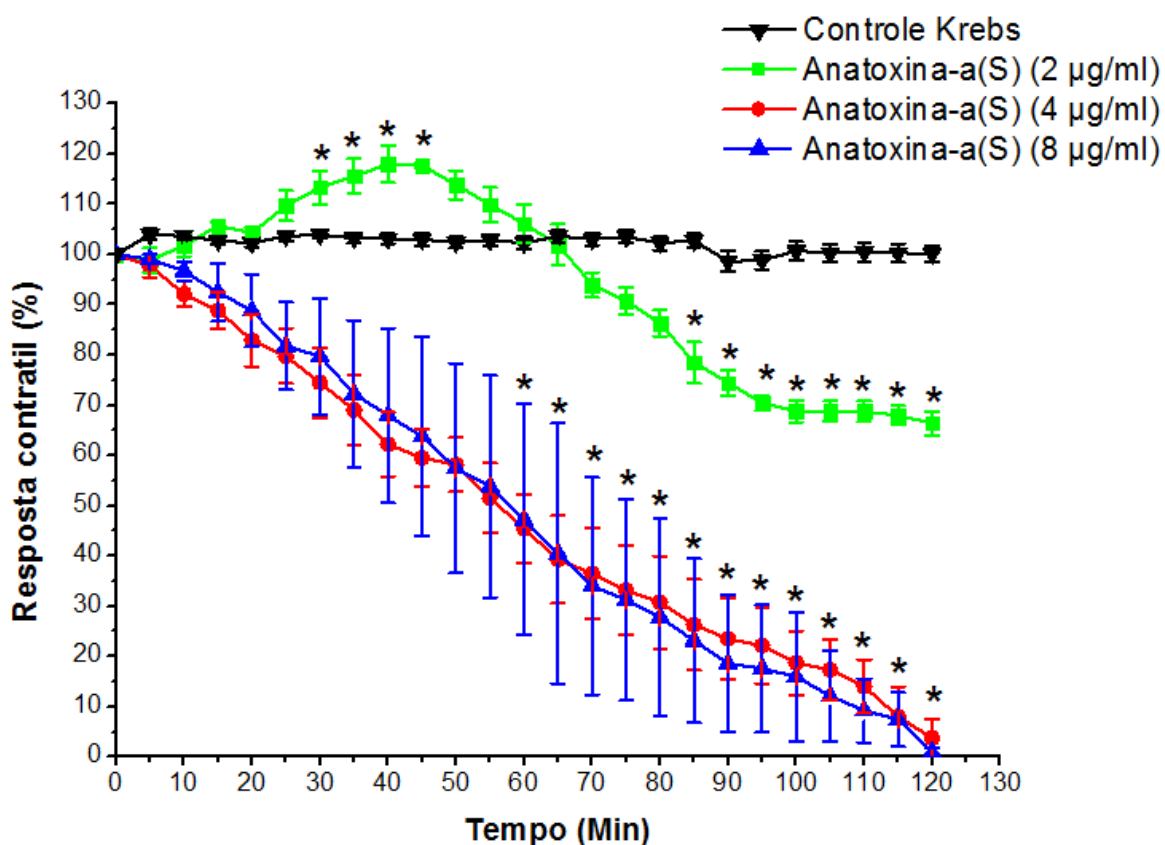
Fenômenos de neuroproteção podem estar associados a atividade de compostos organofosforados (TAKATA-TAKATORI et al., 2006). Assim, a neuroproteção caracterizada pelo aumento na viabilidade celular pela incubação com o extrato de anatoxina a(s) poderia estar associada a uma atividade desse composto sobre a enzima colinesterase presente nos neurônios do sistema nervoso central. Por outro lado, o aumento excessivo do neurotransmissor acetilcolina no sistema nervoso central, levaria a um processo de excitotoxicidade caracterizado pela diminuição no número de células viáveis como observado com o triclorfon (SOLBER e BELKIN, 1997).

### **Efeito do extrato de algas cianofíceas contendo (Anatoxina-a(S) sobre a preparação músculo biventer cervicis de pintainhos.**

Os ensaios de atividade em preparação músculo biventer cervicis de pintainho demonstraram um efeito dose e tempo-dependente induzido pelo extrato de anatoxina a(s). Assim, a incubação da preparação apenas com a solução de Krebs não induziu alteração da resposta contrátil. Quando a preparação foi incubada com o extrato de anatoxinas (2 $\mu$ g/mL) houve uma facilitação transitória da força de contração muscular, seguida de inibição parcial da resposta contrátil que foi máxima 25% em 120 min de registro (Fig. 7,  $p < 0.05$ ,  $n=6$ ). Quando a concentração de (4 $\mu$ g/mL) foi ensaiada não ocorreu o fenômeno de facilitação transitória, havendo um bloqueio de 100% da resposta contrátil em 120 min (Fig.7,  $p < 0.05$ ,  $n=6$ ).

Os músculos de aves são conhecidos por exibirem diferentes tipos de fibras as quais se caracterizam por serem de contração rápida e lenta, diferindo também em termos histológicos, mecânicos e eletrofisiológicos. Fibras musculares inervadas unitariamente exibem um tipo de placa motora conhecida como “em plaque” sendo que aquelas cuja inervação é multiunitária possuem placas motoras do tipo “em grape” (HESS, 1961). Dessa forma, na preparação biventer cervicis as fibras multinervadas possuem placas motoras do tipo “em grape” as quais são passíveis de serem ativadas pela aplicação exógena do neurotransmissor acetilcolina (GINSBORG e WARRINER, 1960). Dessa forma, os resultados demonstrados pela aplicação da anatoxina a(s) assemelham-se àqueles nos quais organofosforados foram ensaiados nas mesmas condições (GINSBORG e WARRINER, 1960), e que

demonstram uma facilitação seguida de bloqueio neuromuscular reversível após o uso do organofosforado neostigmina (MACDONALD, 1988).



**Figura 7** – Efeito do extrato de algas cianofíceas contendo anatoxina a(s) sobre a resposta contrátil em preparação músculo biventer cervicis de pintainho estimulada indiretamente (0.1Hz, 0.2ms, 7V) em 120min. No gráfico cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão dos seis experimentos. Note o efeito facilitador transitório seguido de bloqueio neuromuscular parcial na menor dose. Note ainda, o efeito bloqueador neuromuscular em maiores doses. \*Significância para  $p < 0.05$ . \* : Possui diferença estatística significativa em relação ao controle.

## **6. Conclusão**

O extrato de algas cianofíceas contendo anatoxina-a(S), sugere baixa toxicidade em baixa concentração sobre o sistema nervoso central.

O extrato de algas cianofíceas contendo anatoxina-a(S), induz bloqueio neuromuscular em preparação biventercervicis de pintainho. Esse bloqueio neuromuscular assemelha-se ao induzido por compostos organofosforados. A contratatura observada na vigência do efeito neurotóxico sugere o aumento da concentração do neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica validando a presença do composto organofosforado na preparação.

## 7. Referências

ANDRADE FILHO, A; ROMANO, C. Toxicologia na prática clínica: Anticolinesterásicos. *Folium*. Belo Horizonte, Cap.5, p.53-60, 2001.

AHLGREN, J. D; MANZ, H. J; HARVEY, J. C. Myopathy of chronic organophosphate poisoning: a clinical entity? *South Med*, 72: 555-63, 1979.

BETTINA, C. H; STEFAN J. H; DANIEL R. D. Cyanobacterial Toxins: Removal during Drinking Water Treatment and Human Risk Assessment, *Environmental Health Perspectives*. Vol 1 08, Supplement 1, 2000.

BROWN, B. K. Review of Health Consequences from High, Intermediate and Low-Level Exposure of Organophosphorous Nerve Agents. *Toxicol*. 18 (6):393- 408, 1998.

CARMICHAEL, W. W; GORHAM, P. R. Anatoxins from clones of *Anabaena flos-aquae* isolated from lakes of western Canada. *Mitt InternatVereinLimmol* 21: 285-295, 1978.

CARMICHAEL, W. W; GORHAM, P. R. Laboratory case studies on oral toxicity to calves of freshwater cyanophyte (blue-green-alga) *Anabaena flos-aquae* NRC-44-1. *Can Vet J* 18: 71-75, 1997.

CARMICHAEL, W. W.; BIGGS, D. F.; GORHAM, P. R. Toxicology and Pharmacological Action of *Anabaena Flos-Aquae* Toxin. *Science*, 187, 542-544, 1975.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites: The cyanotoxins. *Bacteriol*. 72, 445-459, 1992.

CAVALIERE, MARIA, J; CALORE, EDENILSON, E; PEREZ, NILDA, M. and RODRIGUES, P. F. Miotoxicidade por organofosforados. *Rev. Saúde Pública*, 1996.

DAL BELO, C. A; LUCHO, A. P; VINADÉ, L; ROCHA, L; MARANGONI, S; RODRIGUES-SIMIONI, L. In vitro antiophidian mechanisms of Hypericum brasiliense choisy standardized extract: quercetin-dependent neuroprotection. *Biomed Res Int*. doi: 10.1155/2013/943520, 2013.

DELFINO, R. T; RIBEIRO, T. S and FIGUEROA-VILLAR, J. D. Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. *J. Braz. Chem*, vol.20, n.3 pp. 407-428, 2009.

DIMAS, S. R. J, ET AL., Síndromes Neurológicas Induzidas por Praguicidas Organofosforados e a Relação com o Suicídio. *Saúde rev.*, Piracicaba, 6(14): 53-60, 2004.

DUBOIS, KP. New Rodenticidal Compounds. *Pharm Assoc*, 37:307-10, 1948.

CORDOVA, F. M; RODRIGUES, A. L. S; GIACOMELLI, M. B. O, ET AL. "Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats," *Brain Research*, vol. 998, no. 1, pp. 65–72, 2004.

FALK, J. W; CARVALHO, L. A; SILVA, L. R; PINHEIRO, S. Suicídio e Doença Mental em Venâncio Aires/rs: consequência do uso de agrotóxicos organofosforados: *relatório preliminar de pesquisa*, 2002.

FARIA, N. M. X; FACCHINI, L. A; FASSA, A. G; TOMASI, E. Processo de Produção Rural e Saúde na Serra Gaúcha: um estudo descritivo. *Cad. Saúde Pública*. 16(1):115-28, 2000.

FARIA, N. M. X; FACCHINI, L. A; FASSA, A. G; TOMASI, E. Processo de produção rural e saúde na serra gaúcha: um estudo descritivo. *Cad. Saúde Pública*. 2000, vol.16, n.1, 2000.

FERRÃO-FILHO ET AL., Cyanotoxins: Bioaccumulation and Effects on Aquatic Animals, *Mar. Drugs*, 9, 2729-2772; doi: 10.3390/md9122729, 2011.



FERRÃO-FILHO, A. S; COSTA, S. M; RIBEIRO, M. G. L; AZEVEDO, S. M. F. O. Effects of a saxitoxin-producer strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) on the swimming movements of cladocerans. *Environ Toxicol.* 23, 161–168, 2008.

HESS, A. Structural differences of fast and slow extrafusal muscle fibres and their nerve endings in chickens. *Physiol.* pp. 221-231 221, 1961.

KARLIN, A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 102-114, 2002.

VINADÉ, L; RODNIGHT, R. The dephosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus is catalyzed mainly by a type 1 protein phosphatase, *Brain Research*, vol. 732, no. 1-2, pp. 195–200, 1996.

MAHMOOD, N. A, CARMICHAEL, W. W. Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. *Toxicon* 25:1221-1227, 1987.

MATSUNAGA, S. M. R; NIEMCZURA, W; CARMICHAEL W. Anatoxin-a(s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flosaquae*. *Chemsoc* 111:8021-023, 1989.

MOLICA, R. J. R; OLIVEIRA, E. J. A; CARVALHO, P. V. C; COSTA, A; CUNHA, M. C. C; MELO, G. L; AZEVEDO, S. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a brazilian drinking water supply. *Harmful Algae* 4: 743-753, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *Immunol. Methods*, v.65, p.55-63, 1983.

MACDONALD, E. Screening for drugs blocking acetylcholine-activated ion channels and local anaesthetics with the isolated chick biventer cervicis preparation. *Pharmacol Toxicol.* 193-8, 1998.

PRASANNA ET AL., Cyanobacterial bioactive molecules – Biosynthesis and genetic regulation, *Microbiological Research*, DOI: 10.1016/j.micres, 2012.

RODRIGUEZ, VANIA ET AL. Effects of a cyanobacterial extract containing-anatoxin-a(s) on the cardiac rhythm of *Leurolestescircunvagans*. *Rev. bras. farmacogn.* vol.22, n.4 , pp. 775-781, 2012.

SAKANAKA, K; KAWAZU, K; ET AL. Ocular pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling for multiple anti-glaucoma drugs. *Biol Pharm Bull.* 1590-5, 2008.

SANTOS, REBELLO, V. M; DONNICI, C. L; DACOSTA, João B. N; CAIXEIRO, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Quím. Nova.* vol.30, n.1, 2007.

SALVI, R. M; LARA, D. R, GHISOLFI, E. S; PORTELA, L. V; DIAS, R. D; SOUZA, D. O. Neuropsychiatric Evaluation in Subjects Chronically Exposed to Organophosphate Pesticides. *ToxicolSci.* 72(2):267-71, 2003.

SIGAUD-KUTNER, T. C. S; PINTO, O. K; LATORRE, L. R; COLEPICOLO, P.Changes in superoxide dismutase activity and photosynthetic pigment content during growth of marine phytoplankters in batch-cultures. *PhysiolPlantarum* 114: 566-572, 2002.

SIVONEN, K; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: Chorusl, Bartram J (eds.). Toxic cyanobacteria in water-Aguide to their public health consequences, monitoringand management. *E & FN Spon.* p. 41-110, 1999.

SOLBERG, Y; BENKIN, M. The role of excitotoxicity in organophosphorous nerve agents central poisoning. *Trends Pharmacol Sci.* 18(6):183-5, 1997.

STALLONES, L; BESELER, C. Pesticide Poisoning and Depressive Symptoms Among Farm Residents. *Ann. Epidemiol.* 12(6):389-94, 2002.

STODDART, J. F; *Comprehensive Organic Chemistry: The synthesis and reaction of organic compounds*. 6th ed. Oxford, 1979.

TOY, D. F; *Phosphorus Chemistry in Everyday Living*, *American Chemical Society*, D. C, 1976.

WACKLIN, P; HOFFMANN, L; KOMÁREK, J. Nomenclatural validation of the genetically revised cyanobacterial genus *Dolichospermum* (Ralfs ex Bornet et Flahault) *comb. Nova. Fottea*, v. 9, p. 59-64, 2009.

WHITTON, B. A.; POTTS, M. Introduction to the Cyanobacteria. In *The Ecology of Cyanobacteria, Their Diversity in Time and Space*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, *The Netherlands*. pp. 1–4, 2000.

WONNACOTT, S; Timothy, G. The Chemistry and Pharmacology of Anatoxina and Related Homotropanes with respect to Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Mar. Drugs*. 4, 228-254, 2006.

LIU, Y. D. A; PETERSON, H. K; SCHUBERT, D. "Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction," *Journal of Neurochemistry*, vol. 69, no. 2, pp. 581–593, 1997.