



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

FELIPE GOMES PINHEIRO

**TOXICIDADES AGUDAS PULMONARES E SOBRE A VITALIDADE DE
ESPERMATOZÓIDES POR FULERENO C₆₀ EM MODELO EXPERIMENTAL
EM CAMUNDONGOS E EFEITOS PROTETORES DO EUGENOL**

FORTALEZA-CEARÁ

2018

FELIPE GOMES PINHEIRO

TOXICIDADES AGUDAS PULMONARES E SOBRE A VITALIDADE
DE ESPERMATOZÓIDES POR FULERENO C60 EM MODELO
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS E EFEITOS PROTETORES DO
EUGENOL

Tese apresentada ao Curso de
Doutorado em Ciências
Fisiológicas do Programa de Pós-
Graduação em Ciências
Fisiológicas do Instituto Superior
de Ciências Biomédicas da
Universidade Estadual do Ceará,
como requisito parcial à obtenção
do título de doutor em Ciências
Fisiológicas.

Orientador: Prof. Tit. Walter Araújo
Zin

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria
Diana Moreira Gomes

FORTALEZA - CEARÁ
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Pinheiro, Felipe Gomes.
Toxicidades agudas pulmonares e sobre a vitalidade de espermatozoides por fulereno C60 em modelo experimental em camundongos e efeitos protetores do eugenol [recurso eletrônico] / Felipe Gomes Pinheiro. - 2018.
1 CD-ROM: il.; 4 ¾ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 118 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Fortaleza, 2018.

Área de concentração: Fisiologia Respiratória.
Orientação: Prof. Ph.D. Walter Araujo Zin .
Coorientação: Prof.^a Dra. Maria Diana Moreira Gomes.

1. Fulereño C60. 2. Eugenol. 3. Mecânica pulmonar. 4. Inflamação. 5. Estresse oxidativo. I. Título.

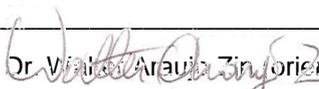
FELIPE GOMES PINHEIRO

TOXICIDADES AGUDAS PULMONARES E SOBRE A VITALIDADE
DE ESPERMATOZÓIDES POR FULERENO C60 EM MODELO
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS E EFEITOS PROTETORES DO
EUGENOL

Tese apresentada ao Curso de
Doutorado Acadêmico em Ciências
Fisiológicas do Programa de Pós-
Graduação em Ciências Fisiológicas
do Instituto Superior de Ciências
Biomédicas da Universidade
Estadual do Ceará, como requisito
parcial para à obtenção do título de
doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovado em: 23 / 04 / 2018

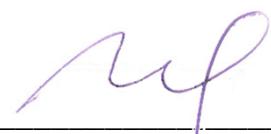
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Walter Araújo Zin (orientador)
Universidade Federal do Rio de Janeiro
(UFRJ)


Prof. Dr. Francisco Sales Ávila Cavalcante
Universidade Estadual do Ceará (UECE)


Prof. Dr. Marcelo Alcantara Holanda
Universidade Federal do Ceará (UFC)


Prof. Dr. Ariclécio Cunha de Oliveira
Universidade Estadual do Ceará (UECE)


Prof. Dr. Rinaldo dos Santos Araújo
Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Ceará (IFCE)

Dedico esse trabalho à minha esposa **Mariana** (meu maior apoio em todos os momentos), ao meu filho **Hugo** (que tornou o final dessa jornada ainda mais emocionante), aos meus pais **Ana Maria e Daniel** e aos meus irmãos **Isabela e João Guilherme**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar saúde e capacidade de realizar este trabalho.

Ao meu orientador, Professor **Walter Zin**, pela oportunidade, orientação, confiança e exemplo. O senhor não chegou onde chegou à toa. Eu tenho profunda admiração e respeito por tudo que aprendi ao longo desses anos. À minha co-orientadora **Maria Diana**, pelo apoio desde a primeira conversa, pela paciência de me introduzir numa área nova da ciência e por todo crescimento.

Aos Professores **José Henrique, Francisco Sales, Rodrigo Fortunato e Rinaldo Araújo** por gentilmente abrirem as portas de seus laboratórios para que eu pudesse aprender as técnicas e realizar parte dos meus experimentos. À minha esposa **Mariana** que, com invejável coragem, assumiu grandes responsabilidades para que eu pudesse realizar um doutorado em dedicação exclusiva, tendo que passar temporadas longe de casa. Além de ter tido paciência de aceitar a divisão de demandas de pai e doutorando. Qualquer agradecimento é simplório, perto de tudo que esse relacionamento me traz de bom.

À minha mãe **Ana Maria Gomes** que sempre falou, por mais lúdico que soasse, que seu filho seria cientista.

Ao meu pai **Daniel Pinheiro** que, mesmo sabendo o quão árduo é este caminho, me ensinou que na vida não há bônus sem ônus.

Aos meus irmãos, **Isabela e João Guilherme**, por todo apoio e carinho ao longo dessa jornada.

Aos meus familiares pelo amor, pelas ligações para saber como eu estava, se eu não passava pelas regiões perigosas do Rio de Janeiro e do interesse pelo meu trabalho, mesmo sem entender direito. Principalmente pela insistente frase do meu avô “Estude, estude e estude pra ser doutor!”.

À família **Magalhães Carrapeiro (Sidnei, Miriam e Juliana)** por todo amor e apoio desde sempre.

Ao amigo-irmão **Helano Souza** por ter me acolhido tão bem nas minhas temporadas no Rio de Janeiro. São, pelo menos, 20 anos de uma amizade inquestionável, que sempre me dá oportunidade de aprendizado humano, musical e até econômico. E à **Natalia Abunahman**, sua (até que enfim) noiva. Vocês fizeram, mesmo longe de casa, me sentir em família.

Aos meus amigos **Tiago Olinda, Danilo Gonçalves, Beatriz Bezerra, Diego Lima, Bruna Lima e Marcio Batista**, por me encherem de orgulho da minha profissão.

À minha fiel companheira de aventuras, **Renata Prado**, por estar sempre ao meu lado, em Fortaleza e no Rio de Janeiro, nos momentos difíceis, nas conquistas, nas besteiras, nos conselhos e puxões de orelha. Sua amizade foi um dos maiores presentes que o doutorado me deu.

A todos os amigos do ISCB: **Klausen, Carol, Walber, Kerly Thais, Edivânia, Edgleyson, Keciany, Alan, Fladmir, Paolo, Átila e Nathalia**, por todo apoio e pelos momentos de descontração.

Aos amigos do IBCCF: **Mari Machado, Priscila, Tailane, Flávia, Dayene, Luciana, Rodrigo, Mari Abreu, Giga, Tiago, Neto, Camila, Amanda, Thamires, Carol, Luís e Milena**, por toda ajuda na realização de experimentos, nas discussões de dados, além dos divertidíssimos almoços e cafés com 'bixcoitos'.

Aos técnicos **Pedro Militão, Antônio Quaresma, Diego Ribeiro e Aline Santos** (*in memoriam*) pelo auxílio na realização das análises.

À **Ecila e Lindalva**, da Secretaria de Pós-Graduação, por toda atenção.

Aos meus orientadores de iniciação científica, **Prof. Everardo Menezes** por ter me mostrado a beleza da pesquisa, **Prof. Carlos Couto** por ter me desafiado a ir mais longe do que conseguia imaginar e ao meu orientador de mestrado, **Prof. Jorge Mancini** por todas as oportunidades e aprendizado.

À **Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP**, pela concessão da bolsa de estudo.

À **CAPES, FAPERJ e CNPq** pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

“A ideia que constitui o ser formal da mente humana não é simples, mas composta de muitas ideias.”

(Spinoza)

RESUMO

O fulereno C₆₀ (C₆₀) é liberado na atmosfera de fontes antropogênicas e naturais, porém informações sobre sua toxicidade são insuficientes. Além disso, nenhum tratamento foi proposto contra danos derivados do C₆₀. O objetivo foi investigar temporalmente os danos pulmonares e espermáticos induzidos por C₆₀, bem como o potencial terapêutico do eugenol frente à exposição ao C₆₀. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (IBCCF 139/16). Quarenta camundongos BALB/c machos foram divididos em cinco grupos: eles foram intratraquealmente instilados (i.t.) com veículo (CTRL) ou com C₆₀ (1,0 mg/kg), e estudados em 12, 24, 72 e 96 h (grupos F12, F24, F72 e F96) após a exposição. Ainda, 32 outros camundongos foram divididos em quatro grupos: instilados com veículo (CTRL e EUG) ou 1,0 mg/kg de C₆₀ (FUL e FUL+EUG). Após 1 h, os animais receberam veículo (CTRL e FUL) ou eugenol (150 mg/kg; EUG e FUL+EUG) por gavagem. Foram avaliados 24 h após a instilação. Os parâmetros de mecânica, morfológicos, atividade de enzimas antioxidantes, dano oxidativo e citocinas inflamatórias foram determinados nos pulmões. Além da qualidade de espermatozoides epididimais. No primeiro experimento, a viscosidade (*G*) foi maior em 24 h (CTRL: 2,8 ± 0,5; F24: 4,1 ± 0,4 cmH₂O/mL) e elastância (*H*) nos grupos F24 e F72. Os parâmetros morfológicos e inflamatórios variaram ao longo do tempo, com pico em 24 h e declínio até 96 h após a instilação. Houve um desequilíbrio redox e redução na vitalidade espermática em função do tempo. Eugenol evitou o aumento de *G*, *H*, celularidade e de citocinas inflamatórias, atenuou o desequilíbrio redox induzidas por C₆₀, mas não teve efeito sobre os parâmetros de qualidade espermática. Os resultados sugerem que uma dose de C₆₀ foi capaz de induzir alterações morfofuncionais, desequilíbrio redox e alterações inflamatórias em pulmões de camundongos e aumentar o risco de infertilidade; O eugenol foi capaz de evitar alterações morfológicas e funcionais, possivelmente pelo seu potencial anti-inflamatório e antioxidante.

Palavras-chave: Fulereno C₆₀. Eugenol. Mecânica pulmonar. Inflamação. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

C₆₀ fullerene (C₆₀) is released into the atmosphere from anthropogenic and natural sources, however information on its toxicity are insufficient. Furthermore, no treatment has been proposed against C₆₀-derived damages. We aimed to investigate the time course of C₆₀-induced pulmonary and spermatic impairments, as well as to evaluate the therapeutic potential of eugenol against fullerene toxicity. This study was approved by the Institutional Ethics Committee on Animal Use (IBCCF 139/16). Forty male BALB / c mice were divided into five groups: they were either intratracheally instilled (it) with vehicle (CTRL) or C₆₀ (1.0 mg / kg), and studied at 12, 24, 72 and 96 h (F12, F24, F72 and F96 groups) after exposure. In addition, 32 other mice were divided into four groups (n=8/group): instilled with vehicle (CTRL and EUG) or 1.0 mg / kg C₆₀ (FUL and FUL + EUG). After 1 h, the animals received vehicle (CTRL and FUL) or eugenol (150 mg / kg; EUG and FUL + EUG) by gavage. Experiments were done 24 h after instillation. Mechanics, morphological, activity of antioxidant enzymes, oxidative damage and inflammatory cytokines were determined in the lungs. Besides epididymal spermatozoa were measured. In the first experiment, tissue damping (*G*) was higher at 24 h (CTRL: 2.8±0.5 vs. F24: 4.1±0.4 cmH₂O/mL) and elastance (*H*) in F24 and F72. Morphological and inflammatory parameters varied over time, with higher changes at 24 h and subsequent decline until 96 h after instillation. There was a time-dependent redox imbalance and reduction in spermatic vitality. Eugenol was able to avoid the increase in *G*, *H*, cellularity and inflammatory cytokines, attenuated the redox imbalance induced by C₆₀, but had no effect on sperm quality parameters. The results suggest that a single dose of C₆₀ was able to induce morphofunctional changes, redox imbalance and inflammatory alterations in mice lungs and increase the risk of infertility; eugenol was able to avoid morphological and functional changes, possibly by its anti-inflammatory and antioxidant potential.

Key words: C₆₀ fullerene. Eugenol. Lung mechanics. Inflammation. Oxidative stress.