

Alessandra Antunes dos Santos

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS INDUZIDOS POR
MALATION E MALAOXON E A POSSÍVEL PROTEÇÃO POR
OXIMAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutor em Bioquímica. Orientador:
Prof. Dr. Marcelo Farina

Florianópolis

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

dos Santos, Alessandra Antunes
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS INDUZIDOS POR MALATION E
MALAOXON E A POSSÍVEL PROTEÇÃO POR OXIMAS / Alessandra
Antunes dos Santos ; orientador, Marcelo Farina -
Florianópolis, SC, 2013.
120 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 3. Malation. 4. Neurotoxicidade. I.
Farina, Marcelo . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.


“Avaliação dos efeitos tóxicos induzidos por malation e malaoxon e a possível proteção por oximas”

por

Alessandra Antunes Dos Santos

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 17/PPGBQA/2013) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Orientador:



Dr(a) Marcelo Farina (Orientador/BQA/CCB/UFSC)

Banca examinadora:



Dr(a) Flávia Carla Meotti (Dpto Bioquímica/USP)



Dr(a) Carmem Juracy Silveira Gottfried (Dpto Bioquímica/UFRGS)



Dr(a) Rui Daniel Schroder Prediger (FMC/CCB/UFSC)



Dr(a) Patricia de Souza Brocardo (PPGNEURO/CCB/UFSC)



Dr(a) Carla Inês Tasca (BQA/CCB/UFSC)

Coordenador:



Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Florianópolis, 31 de julho de 2013

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carlos e Lorena, por todo o amor, carinho, paciência, confiança e incentivo. Por estarem sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis e também nos momentos de alegria. Essa conquista só foi possível graças a vocês. Por vocês eu tenho o maior amor do mundo.

Aos meus irmãos Kelly e Jean Carlos, por todo o carinho e amor, pelas milhões de risadas que sempre alegraram os meus dias, por todos os tipos de apoio, dentre eles o apoio financeiro, já que não é fácil ser bolsista. Obrigada por serem os irmãos mais legais do mundo. Por vocês eu tenho o maior amor do mundo.

A minha toquinha Flor, por deixar a minha vida muito mais feliz e divertida e por me fazer sentir a pessoa mais amada desse mundo.

Ao meu orientador, Marcelo Farina, pelos ensinamentos durante todos estes anos de convívio, desde o meu mestrado até agora. A minha co-orientadora do mestrado Andreza Fabro de Bem pelos ensinamentos e pelo apoio de sempre e aos demais professores da UFSC, que também foram muito importantes para a minha formação.

Aos amigos e colegas de laboratório: Danúbia, Dirleise, Renata, Aline, Juliana, Viviane, Mariana e Eduardo e aos amigos da UFSC e da vida: Marcão, Aline, Vivi, Roberta, Vanessa Valgas, Jade, Gianni, Fritz, Paulo, Wagner, Bibi e Denis, pela amizade, pelo convívio diário, pelo apoio e por terem feito dos meus dias aqui em Floripa muito mais felizes. Com certeza seria muito mais difícil sem vocês. Vou levar a nossa amizade pra sempre no meu coração.

Aos demais amigos queridos de Alpestre e Santa Maria pela confiança, amizade, carinho, amor, por estarem sempre comigo mesmo longe. Amo muito vocês.

Aos amigos do meu coração Bibiana, Mariana, Aline e Marcos, por estarem sempre comigo em todos os momentos, em todos mesmo, no laboratório, em casa, na balada, nas viagens, nos problemas, nas fofocas, nas risadas, na saudade, amigos pra vida toda. Obrigada pelo apoio

incondicional e por me aguentarem nesses últimos meses, sei que não foi fácil. Vou levar vocês pra sempre no meu coração #amomuito.

Um agradecimento especial pra Bibi e pra Ísis por me acolherem na casa delas, nunca vou esquecer esse gesto de amizade. Saibam que fui muitíssimo feliz morando com vocês.

Aos técnicos do LAMEB, Bibiana, Denis e Vanessa pela amizade, pela disponibilidade e auxílio na utilização dos equipamentos.

Ao pessoal do IIBB de Barcelona, Profa. Cristina Suñol, Nair, Mathieu e aos demais colegas, por todos os ensinamentos, por me acolherem tão bem no laboratório e pela amizade.

Ao CNPq e a Capes pelo apoio financeiro.

RESUMO

O malation é um composto tóxico pertencente à classe dos pesticidas organofosforados (OF) que tem como mecanismo primário de ação inibir a enzima acetilcolinesterase (AChE), levando à clássica síndrome colinérgica. No entanto, estudos vêm demonstrando que a neurotoxicidade decorrente da exposição crônica a esta classe de pesticidas pode ocorrer sem sintomas colinérgicos antecedentes e parece não depender da inibição da enzima AChE. Quanto ao tratamento da intoxicação aguda por esses compostos, a eficácia das oximas clinicamente disponíveis (por exemplo, pralidoxima), utilizadas para reativar a AChE inibida, tem sido questionada. Dessa forma, o primeiro objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da pralidoxima e de uma oxima experimental (K074) na reativação da AChE após exposição aguda ao malation, bem como na prevenção de possíveis alterações bioquímicas relacionadas com o estresse oxidativo induzidas pelo malation, utilizando camundongos Swiss. O malation (1,25 g/kg, s.c.) induziu uma diminuição significativa da atividade da AChE no córtex pré-frontal, hipocampo e sangue dos animais 24 h após uma única injeção. Após os tratamentos com as oximas (1/4 da DL₅₀, i.m., 6 h após a exposição ao malation), foi observado que a pralidoxima (66 mg/kg) foi capaz de reverter significativamente a inibição da AChE sanguínea, enquanto que a oxima K074 (5,8 mg/kg) não teve efeitos de reativação em relação à enzima sanguínea. Interessantemente, ambas as oximas testadas foram incapazes de reativar a AChE inibida pelo malation no córtex pré-frontal e no hipocampo após a injeção intramuscular ou intracerebroventricular (1/4 de DL₅₀, 6 h após a exposição ao malation). Os parâmetros bioquímicos relacionados com o estresse oxidativo (atividade das enzimas glutatona peroxidase, glutatona redutase e catalase, bem como os níveis de peroxidação lipídica) não foram afetados nos animais tratados com malation, oximas ou atropina. No entanto, quando a pralidoxima e K074 foram administradas por via intramuscular 6 h após a exposição ao malation, estas oximas foram capazes de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes no córtex pré-frontal e hipocampo. Estes resultados indicam que as atividades da AChE periférica e central não estão necessariamente correlacionadas após o tratamento com malation/oximas, além disso, considerando que os tratamentos disponíveis na clínica para a intoxicação com malation não parecem eficazes, este estudo reforça a necessidade de busca por novos reativadores da AChE capazes de reativar eficientemente a enzima sanguínea e cerebral após o envenenamento com malation. O

próximo objetivo do trabalho foi investigar os efeitos de administrações repetidas (ao longo de um período de 15 dias) com doses de malation que não causam toxicidade colinérgica, sobre o desempenho cognitivo (relacionado à memória), bem como alterações bioquímicas no hipocampo de camundongos adultos. Os tratamentos com malation (30 e 100 mg/kg, pela via subcutânea) não afetaram o peso corporal dos animais durante o período experimental, além disso, não foram observados sinais evidentes de toxicidade colinérgica durante todo o período de tratamento. Apenas a dose de 100 mg/kg de malation foi capaz de inibir significativamente a atividade da AChE hipocampal após um período de tratamento de 15 dias; no entanto, esta inibição não produziu sinais aparentes de toxicidade. Ao final do tratamento de 15 dias, os animais expostos ao malation (30 e 100 mg/kg) mostraram uma diminuição significativa na capacidade de memória espacial, a qual foi acompanhada por uma diminuição da atividade do complexo I mitocondrial, aumento da expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak, bem como ativação astrogliar no hipocampo. Por outro lado, os níveis de sinaptofisina (marcador de sinapses), de colina acetiltransferase (marcador de neurônios colinérgicos) e de aquaporina4 (proteína associada com disfunção da barreira hematoencefálica) não foram alterados pelo tratamento com malation. O déficit no teste de memória espacial de curto prazo causado pela exposição dos animais a 30 mg/kg de malation, dose que não causou inibição da atividade da AChE hipocampal, indica a possibilidade de acontecimentos não colinérgicos relacionados com a modulação da performance cognitiva nestes animais. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, sugere-se que o mecanismo envolvido no déficit de memória induzido pela exposição ao malation pode ser mediado, pelo menos em parte, por uma interação sinérgica entre disfunção mitocondrial e processos neuroinflamatórios. Finalmente, a partir de estudos *in vitro* com cultura primária de neurônios corticais, investigou-se os possíveis mecanismos que precedem a morte celular induzida pela exposição prolongada ao malaixon. O tratamento com malaixon 100 μ M foi capaz de causar significativa morte das células corticais no dia *in vitro* 6 (6DIV) e significativa inibição da atividade da AChE nos tempos que precederam a morte celular (0,5 h; 24 h e 48 h). Além disso, observou-se um aumento significativo da produção de espécies reativas de oxigênio e uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial nos primeiros 60 min de exposição das células a 100 μ M de malaixon. O pré-tratamento das culturas com o antioxidante ácido ascórbico foi capaz de proteger parcialmente, embora significativamente, da morte celular

induzida pela exposição prolongada ao malaoxon. Os nossos resultados indicam que a morte das células neuronais corticais expostas ao malaoxon pode estar associada com indução de estresse oxidativo. No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos com a toxicidade do malaoxon neste tipo de cultura, bem como a participação da AChE nestes eventos.

ABSTRACT

The organophosphorus (OP) pesticide malathion is a highly neurotoxic compound and its toxicity is primarily caused by the inhibition of acetylcholinesterase (AChE), leading to cholinergic syndrome. However, studies have shown that the neurotoxicity resulting from OP chronic exposure can occur without previous cholinergic symptoms and they do not appear to be dependent on AChE inhibition. Regarding the treatment of OP acute poisoning, the clinical experience with the available oximes (e.g. pralidoxime) is disappointing and their routine use has been questioned. Thus, the first aim of this study was to investigate the potency of pralidoxime and K074 in reactivating AChE after acute exposure to malathion, as well as in preventing malathion-induced changes in oxidative-stress related parameters in mice. Malathion (1.25 g/kg, s.c.) induced a significant decrease in cortico-cerebral, hippocampal and blood AChE activities at 24 h after exposure. Oxime treatments (1/4 of LD₅₀, i.m., 6 h after malathion poisoning) showed that pralidoxime (66 mg/kg) significantly reversed malathion-induced blood AChE inhibition, although no significant effects were observed after K074 treatment (5,8 mg/kg). Interestingly, both oximes tested were unable to reactivate the cortico-cerebral and hippocampal enzymes after intramuscular or intracerebroventricular injection (1/4 of LD₅₀, 6 h after malathion poisoning). Biochemical parameters related to oxidative stress (cerebro-cortical and hippocampal glutathione peroxidase, glutathione reductase and catalase activities, as well as lipid peroxidation) were not affected in animals treated with malathion, oximes or atropine alone. However, pralidoxime and K074, administered intramuscularly 6 h after malathion poisoning, were able to increase the endogenous activities of these antioxidant enzymes in the prefrontal cortex and hippocampus. These results indicate that peripheral and central AChE activities are not necessarily correlated after the treatment of OP compounds and/or oximes. In addition, considering that the available treatments to malathion poisoning appear to be ineffective, the present study reinforce the need to search for potential new AChE reactivators able to efficiently reactivate the brain and blood AChEs after malathion poisoning. The next aim of this study

was to investigate the effects of repeated subtoxic doses of malathion (over a 15-days period) on cognitive performance as well as biochemical changes in the hippocampus of adult mice. The treatments with malathion (30 and 100 mg/kg, subcutaneously) did not affect the body weight of animals throughout the experimental period, furthermore, no evident signs of cholinergic toxicity were observed throughout the treatment. The highest dose of malathion (100 mg/kg) was associated with significant AChE inhibition in the hippocampus after a 15-days treatment period, however, this inhibition did not produce signs of cholinergic toxicity. At the end of treatments, malathion-exposed animals (30 and 100 mg/kg) showed a significant impairment on learning-memory ability which was paralleled by a significant decrease in the mitochondrial complex I activity, increase in the levels of proapoptotic proteins (Bax and Bak) and astroglial activation (increase in the level of GFAP), in the hippocampus. On the other hand, the levels of synaptophysin (a specific synaptic marker), choline acetyltransferase (a marker of cholinergic neurons) and aquaporin 4 (a protein related with blood-brain barrier dysfunction), were not affected by the treatment with malathion. The short-term spacial memory deficit observed after the exposure to 30 mg/kg dose of malathion, that caused no hippocampal AChE inhibition, indicates the possibility that cholinergic events are not related with the modulation of the cognitive performance in these animals. From the results obtained in this study, we suggest that the cholinergic system may not be involved in the malathion-induced neurotoxic effects, in addition, we suggest that the mechanism involved in the spacial memory deficit induced by repeated malathion exposure can be mediated, at least in part, by a synergistic interaction between mitochondrial dysfunction and neuroinflammatory processes. Finally, we investigated the possible molecular events that precede malaoxon-induced cell death in cultured neuronal cortical cells. The treatment with 100 μ M of malaoxon was able to cause significant death of cortical cells on day in vitro 6 (DIV6) and significant AChE inhibition in the times preceding the cell death (0.5 h, 24 h and 48 h). In addition, there was a significant increase in the production of reactive oxygen species and a decrease in mitochondrial membrane potential in the cells exposed to

malaoxon. Pretreatment with the antioxidant ascorbic acid displayed a protective effect against malaoxon-induced neurotoxicity in the cortical neuronal cells. Our data indicate that the neuronal cortical cell death induced by malaoxon may be associated with induction of oxidative stress. However, additional studies are needed to elucidate the mechanisms involved in the malaoxon toxicity in these cells, as well as the involvement of AChE in these events.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura geral dos compostos organofosforados	31
Figura 2 -	Inibição, reativação e envelhecimento da enzima AChE	37
Figura 3 -	Estrutura química do OF malation	38
Figura 4 -	Metabolismo hepático do malation	39
Figura 5 -	Inervação colinérgica no encéfalo	41
Figura 6 -	Síntese e degradação da acetilcolina em neurônios colinérgicos	42
Figura 7 -	Linha do tempo descritiva das fases experimentais ao longo do tratamento agudo com malation (via subcutânea) e as oximas (via intramuscular)	51
Figura 8 -	Linha do tempo descritiva das fases experimentais ao longo do tratamento agudo com malation e oximas pela via intracerebroventricular	51
Figura 9 -	Linha do tempo descritiva das fases experimentais ao longo do tratamento por 15 dias com malation	54
Figura 10 -	Efeito do tratamento com malation, atropina e oximas sobre a atividade da AChE no córtex pré-frontal, hipocampo e sangue de camundongos adultos	64
Figura 11 -	Efeito do tratamento com malation, atropina e oximas sobre a atividade das enzimas glutatona redutase, glutatona peroxidase e catalase no córtex pré-frontal de camundongos adultos	66

Figura 12 -	Efeito do tratamento com malation, atropina e oximas sobre a atividade das enzimas glutatona redutase, glutatona peroxidase e catalase no hipocampo de camundongos adultos	67
Figura 13 -	Efeito do tratamento com malation e oximas sobre a atividade da AChE no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos adultos	68
Figura 14 -	Efeito do tratamento repetido com malation sobre o peso corporal de camundongos adultos	70
Figura 15 -	Efeito do tratamento repetido com malation sobre a atividade da AChE hipocampal	70
Figura 16 -	Tratamento repetido com malation induz dano cognitivo em camundongos no teste de realocação do objeto	72
Figura 17 -	Tratamento repetido com malation diminui a atividade da NADH desidrogenase em hipocampo de camundongos adultos	73
Figura 18 -	Correlação positiva entre a atividade da NADH desidrogenase hipocampal e o teste de realocação do objeto	74
Figura 19 -	Tratamento repetido com malation não afeta a expressão da enzima marcadora de neurônios colinérgicos colina acetiltransferase (ChAT)	75
Figura 20 -	Tratamento repetido com malation não modifica a expressão da proteína sináptica sinaptofisina	76
Figura 21 -	Tratamento repetido com malation aumenta a expressão de proteínas associadas com apoptose	77

Figura 22 -	Micrografias demonstrando a imunofluorescência para a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e aquaporina (AQP4), das regiões hipocâmpais CA1, CA3 e giro denteado de camundongos adultos	78
Figura 23 -	Efeito do tratamento com malaoxon (Mx) sobre a viabilidade de cultura primária de neurônios corticais	80
Figura 24 -	Efeito do tratamento com malaoxon (Mx) sobre a atividade da AChE em cultura de células primárias de neurônios corticais	81
Figura 25 -	Efeito do tratamento com malaoxon (Mx) sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em cultura primária de neurônios corticais	82
Figura 26 -	Efeito do tratamento com malaoxon (Mx) sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em cultura primária de neurônios corticais	83
Figura 27 -	Efeito do antioxidante ácido ascórbico (AA) sobre a diminuição da viabilidade celular induzida pelo malaoxon (Mx), em cultura primária de neurônios corticais	84
Figura 28 -	Efeito da pralidoxima (Px) sobre a diminuição da atividade da AChE induzida pelo malaoxon (Mx), em cultura primária de neurônios corticais	85
Figura 29 -	Efeito da pralidoxima (Px) sobre a diminuição da viabilidade celular induzida pelo malaoxon (Mx), em cultura primária de neurônios corticais	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Efeitos agudos da exposição a compostos OF	34
Tabela 2 -	Estrutura química das oximas testadas	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- $\Delta\Psi_m$ - Potencial de membrana mitocondrial
- AA – Ácido ascórbico
- ACh - Acetilcolina
- AChE–Acetilcolinesterase
- ANOVA – Análise de variância
- Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AP - Ântero-posterior
- AQP4 – Aquaporina4
- BChE - Butirilcolinesterase
- Bcl-2 Proteína anti-apoptótica descrita em célula B de linfoma 2
- BHE – Barreira hematoencefálica
- BSA – Albumina de soro bovino
- CAT –Catalase
- CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
- ChAT – Colina acetiltransferase
- ChEs - Colinesterases
- CIT - Centro de Informações Toxicológicas
- CO₂ – Dióxido de carbono
- DA – Doença de Alzheimer
- DCFH-DA - 2',7' - Diclorodihidrofluoresceína
- DDT - 1,1,1-tricloro-2,2-di(p-clorofenil)
- DIV – Dia *in vitro*
- DL50 -Dose letal 50%
- DMDTP - Dimetilditiofosfato

DMEM- Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

DMTP – Dimetilfosfato

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DP – Doença de Parkinson

DTNB - Ácido 5,5 ditiobis 2-nitrobenzóico

DV - Dorso-ventral

EDTA – Ácido etileno diaminotetracético

EGTA - Ácido etileno glicol tetracético

EPM - Erro padrão da média

EROs - Espécies reativas de oxigênio

GD – Giro denteado

GFAP – Proteína glial fibrilar ácida

GPx - Glutationaperoxidase

GR - Glutationaredutase

GSSG – Glutationa oxidada

Hb - Hemoglobina

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

i.c.v. – Intracerebroventricular

i.m. – Intramuscular

i.p. - Intraperitoneal

KCl – Cloreto de potássio

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

MDC - Malation ácido dicarboxílico

MMC - Malation ácido monocarboxílico

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
Mx - Malaoxon
NaCl – Cloreto de sódio
NADPH - Dinucleotídeo fosfato de nicotinamida adenina reduzida
NTE – Esteraseneurotóxica
OF - Organofosforado
OMS - Organização Mundial da Saúde
OPIDP – Polineuropatia tardia
PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS - Salina tamponada com fosfato
PON-1 – Paraoxonase I
Px - Pralidoxima
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SFB - Soro fetal bovino
SINITOX - Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
SNA - Sistema nervoso autônomo
SNC – Sistema nervoso central
SNP – Sistema nervoso periférico
SOD – Superóxido dismutase
TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNB – Ácido 2-nitro-5-mercapto –benzóico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
1.1	Agrotóxicos	29
1.1.1	Agrotóxicos no Brasil	30
1.1.2	Compostos organofosforados (OF)	31
1.1.2.1	Toxicidade dos OF	33
1.1.2.2	Tratamento da intoxicação	36
1.1.2.3	Malation	38
1.2	O sistema colinérgico	40
2	JUSTIFICATIVA	45
3	OBJETIVOS	47
3.1	Objetivos gerais	47
3.2	Objetivos específicos	47
4	MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1	Reagentes	49
4.2	Ensaio <i>in vivo</i>	49
4.2.1	Animais	49
4.2.2	Capítulo I	49
4.2.2.1	Administração de oximas pela via intramuscular	50
4.2.2.2	Administração de oximas pela via intracerebroventricular	51
4.2.2.3	Preparação tecidual para as análises bioquímicas	52
4.2.2.4	Análises bioquímicas	53
4.2.2.4.1	Avaliação da atividade da Acetilcolinesterase (AChE)	53
4.2.2.4.2	Avaliação da atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)	53

4.2.2.4.3	Avaliação da atividade da Glutathione Redutase (GR)	53
4.2.2.4.4	Avaliação da atividade da Catalase (CAT)	53
4.2.3	Capítulo II	53
4.2.3.1	Protocolo experimental	54
4.2.3.2	Análises comportamentais	55
4.2.3.2.1	Teste do campo aberto	55
4.2.3.2.2	Teste de realocação do objeto	55
4.2.3.3	Preparação tecidual para as análises bioquímicas	56
4.2.3.4	Análises bioquímicas	56
4.2.3.4.1	Avaliação da atividade da Acetilcolinesterase (AChE):	56
4.2.3.4.2	Avaliação da atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial	56
4.2.3.5	<i>Western blotting</i>	57
4.2.3.6	Imunofluorescência	58
4.2.3.7	Dosagem de Proteínas	58
4.2.4	Capítulo III	59
4.2.4.1	Cultivo primário de neurônios corticais	59
4.2.4.1.1	Tratamento das células neuronais	59
4.2.4.2	Análises bioquímicas	60
4.2.4.2.1	Ensaio de citotoxicidade celular	60
4.2.4.2.2	Determinação da atividade da AChE	60
4.2.4.2.3	Medida do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	61
4.2.4.2.4	Medida da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)	61
4.3	Análise estatística	62

5	RESULTADOS	63
5.1	Ensaio <i>in vivo</i>	63
5.1.1	CAPÍTULO I	63
5.1.2	CAPÍTULO II	69
5.2	CAPÍTULO III	79
5.2.1	Ensaio <i>in vitro</i>	79
6	DISCUSSÃO	87
7	CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS	103

1. INTRODUÇÃO

1.1. Agrotóxicos

“Agrotóxicos” representam um termo definido pela Lei Federal nº. 7802, regulamentada pelo Decreto nº. 98 816, no seu artigo 2, inciso I da seguinte forma:

- a) produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais. Produtos cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos;
- b) as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

São produtos aplicados em florestas (nativas e plantadas), nos ambientes hídricos, urbanos e industriais e, em larga escala, na agricultura e pastagens para a pecuária. Podem ser classificados quanto à praga que combatem em: inseticidas (controle de insetos), fungicidas (controle de fungos), herbicidas (controle de plantas invasoras), desfolhantes (controle de folhas indesejadas), fumigantes (controle de bactérias do solo), rodenticidas ou raticidas (controle de roedores/ratos), nematocidas (controle de nematóides) e acaricidas (controle de ácaros) (OMS, 1996).

O emprego de produtos químicos para o controle de pragas remonta as civilizações mais antigas. No século XIV, os chineses começaram a utilizar compostos de arsênio e cobre para controlar insetos. No século seguinte, a nicotina e o crisântemo foram os primeiros inseticidas de origem natural a serem utilizados e, a partir do final do século XIX, a rotenona passou a ser usada para o controle de lagartas (Cremlyn, 1991; Rusyniak e Nañagas, 2004). Mas foi no final do século XIX e início do século XX que começaram a ser desenvolvidos os primeiros inseticidas orgânicos sintéticos. O marco para o desenvolvimento de compostos orgânicos sintéticos foi a transformação do composto inorgânico cianato de amônio em ureia, que é um composto nitrogenado presente na urina. Acreditava-se, naquela época, que compostos orgânicos não poderiam ser sintetizados em laboratório, sendo produzidos apenas por organismos vivos (Barbosa, 2004).

Os inseticidas orgânicos sintéticos começaram a ser utilizados em grande escala na década de 1940, durante a Segunda Guerra Mundial, a fim de proteger os soldados das regiões tropicais e subtropicais da África e da Ásia, das pragas transmissoras da doença-dosono, malária, dentre outras. Devido à necessidade de proteger o exército, as pesquisas de novos inseticidas foram impulsionadas, o que resultou no desenvolvimento de vários agrotóxicos que são usados ainda hoje. Um marco importante para a química foi a descoberta da atividade inseticida do organoclorado 1,1,1-tricloro-2,2-di(p -clorofenil) etano em 1939, conhecido como DDT (Branco, 2003).

1.1.1. Agrotóxicos no Brasil

Os agrotóxicos começaram a ser usados em escala mundial após a Segunda Guerra Mundial. No Brasil, os agrotóxicos foram primeiramente utilizados em programas de saúde pública, no combate a vetores e no controle de parasitas e, mais tarde, na agricultura. A expansão do uso de agrotóxicos no Brasil ocorreu nas décadas de 60 e 70 com a chamada Revolução Verde, que foi um processo de modificação da estrutura agrária, com a penetração do capitalismo no campo através da introdução de máquinas e insumos agrícolas. Nos anos 70, com a implantação dos Planos Nacionais de Desenvolvimento Agrícola e de Fertilizante e Calcário, o Banco do Brasil concedia financiamentos agrícolas com 15% do crédito atrelado à “aplicação de tecnologia moderna”, dando início a um novo modelo agrícola baseado no uso intensivo de agrotóxicos e na total dependência tecnológica de multinacionais fornecedoras de insumos e sementes (Zanin *et al.*, 1992).

Atualmente, os agrotóxicos são considerados extremamente relevantes no modelo de desenvolvimento da agricultura no país. Desde 2008, o Brasil é o maior consumidor de produtos agrotóxicos do mundo e o uso estimulado desses compostos acarretou em elevados índices de intoxicações induzidas por estas substâncias, seja no campo ou em áreas urbanas. De acordo com dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), responsável por analisar o uso de agrotóxicos e conceder registro no Brasil, foram utilizadas 936 mil toneladas de agrotóxicos na safra 2010/2011. Somente as lavouras de milho, soja, algodão e cana-de-açúcar absorveram 80% do volume total comercializado. Em comparação aos demais países, em 2010, o Brasil comercializou 19% do total global de agrotóxicos.

Segundo dados do SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas – Ministério da Saúde/Fiocruz), no período de

1999 a 2009, foram notificados cerca de 60 mil casos de intoxicações por agrotóxicos de uso agrícola. Isto significa aproximadamente 5.600 intoxicações por ano no país, o que equivale a uma média de 15,5 intoxicações diárias, ou uma a cada 90 minutos. Em um estudo detalhado da realidade das intoxicações humanas por agrotóxicos em Santa Catarina, no ano de 2012, o Centro de Informações Toxicológicas (CIT) atendeu 660 pessoas com diagnóstico de intoxicação por agrotóxicos. Os inseticidas foram à classe de uso majoritariamente implicada nas intoxicações, e os compostos OF (especialmente o composto Malation) estiveram envolvidos como contaminantes em casos de intoxicações humanas no Estado. Em 14% dos casos, a intoxicação foi devido a exposição ocupacional e cerca de 40 % dos casos foi por tentativas de suicídios. É importante ressaltar que a totalidade dos casos registrados no país em um dado período pelo SINTOX é diferente da totalidade dos casos ocorridos no país neste mesmo período. Pires *et al.*, (2005) sugerem que o número de notificações seja da ordem de um para 50, ou seja, para cada caso notificado há 50 que não foram notificados.

1.1.2. Compostos organofosforados (OF)

O termo genérico “organofosforado” é utilizado para uma ampla variedade de compostos químicos, que podem ser derivados dos ácidos fosfórico, fosfônico ou fosfínico e geralmente são aplicados como inseticidas (Figura 1) (Terry, 2012).

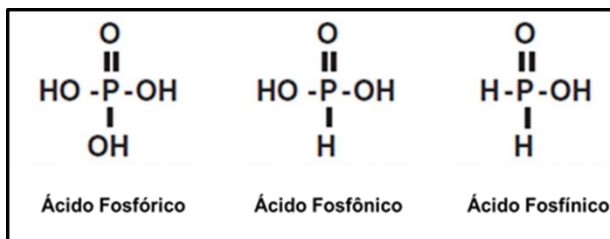


Figura 1: Estrutura geral dos compostos organofosforados. O átomo de fósforo (P) pode estar ligado através de uma dupla ligação com o oxigênio (O) ou com o enxofre. R e R' representam grupos alcóxil. R'' = grupo substituível (adaptado de Terry, 2012).

Os primeiros compostos OF foram sintetizados no final da década de 1930 por um químico alemão chamado Gerhard Schrader, quando este pesquisava inseticidas tendo como base uma estrutura organofosforada. Estes trabalhos levaram à descoberta de compostos mais potentes, conhecidos como “agentes nervosos”, especialmente o sarin, tabun e soman, os quais foram, posteriormente, utilizados como armas químicas (Khurana e Prabhakar, 2000; Rusyniak e Nañagas, 2004; Kuca *et al.*, 2005; Kassa e Kunesova, 2006).

Atualmente, os compostos OF são os pesticidas mais utilizados na agricultura e o seu uso generalizado tem causado poluição ambiental e risco potencial à saúde, incluindo casos crônicos e agudos de intoxicações, tanto em animais quanto humanos (Abdollahi, 2004).

A exposição aos OF geralmente ocorre em pessoas que estão em contato com tais produtos químicos em consequência de sua ocupação, no hábito de comer durante o trabalho, no preparo do produto ou indivíduos que residem próximo aos locais de armazenamento. No entanto, a população em geral se expõe através da propagação dos produtos químicos no ambiente, pelo consumo de alimentos contaminados, além das intoxicações intencionais (homicídios e suicídios) (da Silva, 2006).

Os OF são absorvidos pelo organismo humano por via dérmica, respiratória e digestiva. A absorção por via oral assume importância nas intoxicações digestivas, principalmente em crianças em casos acidentais e em adultos através do consumo de alimentos contaminados (Cavaliere *et al.*, 1996; Larini, 1996; Maroni *et al.*, 2000; Kushik e Chandrabhan, 2003; Rusyniak e Nañagas, 2004; Aluigi *et al.*, 2005).

Os pesticidas OF, após serem absorvidos, podem interagir quimicamente e inibir a função de, principalmente, dois tipos de proteínas (enzimas da classe das colinesterases - ChEs):

a) acetilcolinesterase específica, verdadeira ou acetilcolinesterase (AChE), encontrada principalmente nas sinapses do sistema nervoso central (SNC), sistema nervoso periférico parassimpático, junção neuromuscular e nos eritrócitos;

b) butirilcolinesterase, pseudocolinesterase ou acetilcolinesterase inespecífica (BChE), encontrada no plasma, no intestino e, em menor concentração, em outros tecidos (Kushik e Chandrabhan, 2003; Costa *et al.*, 2004).

Os OF podem sofrer metabolismo, principalmente a nível hepático, podendo resultar em metabólitos mais tóxicos. Compostos que possuem na sua estrutura química uma dupla ligação entre os átomos de enxofre e fósforo (P=S) podem sofrer *bioativação metabólica*, fazendo

com que a afinidade da ligação entre o OF com as ChEs seja muito aumentada. Essa bioativação consiste em uma desulfuração oxidativa realizada por enzimas do Citocromo P 450 (principalmente no fígado), resultando na formação de um “oxon” (P=O). Em contraste, os compostos OF que já possuem uma dupla ligação entre os átomos de oxigênio e fósforo P=O em sua estrutura química, sendo considerados “oxons”, são inibidores efetivos das ChEs.

Costa (2006) cita outra importante classe de enzimas chamadas fosfotriesterases (também conhecidas como A-esterases), que são capazes de hidrolisar os compostos OF, desempenhando um importante papel na sua detoxificação. Uma representante desta classe é a enzima paraoxonase (PON-1), que possui a capacidade de hidrolisar os compostos oxons dos OF. A baixa atividade desta enzima, que ocorre principalmente em crianças com menos de 2 anos, é um fator que aumenta a toxicidade de certos compostos oxons dos OF (Furlong *et al.*, 2005).

Como exemplos de compostos OF podemos destacar: malation, paration, diazinon, fention, diclorvos, clorpirifos, ecotiofato, isoflurofatoetriclorfon, os quais podem ser facilmente encontrados em estabelecimentos comerciais de produtos agropecuários (Maroni *et al.*, 2000; Kushik e Chandrabhan, 2003; Petroianu *et al.*, 2006).

1.1.2.1. Toxicidade dos OF

Os efeitos induzidos pela exposição aos OF em animais e humanos têm sido clinicamente descritos e dependem basicamente de três fatores: tipo de OF, dose utilizada e duração da exposição (Pope, 1999). Neste sentido, exposições com altas doses por curtos períodos de tempo caracterizam a intoxicação aguda, onde os sintomas aparecem rapidamente após o contato com o OF e são caracterizados como “síndrome colinérgica”, que envolve, principalmente, a inibição da atividade da enzima AChE e subsequente hiperestimulação dos receptores de acetilcolina (ACh) muscarínicos e nicotínicos (receptores colinérgicos). A inibição da atividade da AChE ocorre através do processo de fosforilação do grupo hidroxila do resíduo de serina da enzima. Com isso, a hidrólise do neurotransmissor ACh será comprometida, levando ao acúmulo deste neurotransmissor nas sinapses do SNC e sistema nervoso periférico (SNP). Desta forma, haverá uma hiperestimulação dos receptores colinérgicos, desencadeando uma variedade de sinais e sintomas que caracterizarão a “síndrome colinérgica”, como por exemplo, náusea, vômito, lacrimejamento,

salivação, bradicardia, miose e finalmente a morte pode ocorrer por falência respiratória (Abou-Donia *et al.*, 2003; Rusyniak e Nañagas, 2004).

Embora todos os pesticidas inibidores da AChE possuam um mecanismo comum de toxicidade, o espectro de sintomas colinérgicos pode ser distinto com diferentes tipos de inibidores (diferentes OF), o mesmo inibidor em diferentes espécies ou o mesmo inibidor com diferentes vias de administração. No entanto, um ou mais dos sinais "clássicos" de toxicidade colinérgica estarão presentes após a exposição a qualquer um dos inibidores, o qual seja capaz de provocar uma inibição substancial da atividade da AChE tecidual (Pope, 2005).

As manifestações clínicas mais proeminentes da intoxicação aguda por OF estão separadas em categorias relacionadas com os seus sítios de ação: SNC, sistema nervoso autônomo (SNA) e junção neuromuscular, como mostra a Tabela 1.

Receptor	Órgão	Efeito clínico
Sistema Nervoso Autônomo		
Muscarínico Pós-Ganglionar (Parassimpático)	Olhos	Miose, lacrimação
	boca	Salivação
	Pulmão	Broncorréia, broncoespasmo
	Coração	Bradíarritmia
	Trato Gastrointestinal	Diarréia, emeses, aumento da motilidade
	Trato Geniturinário	Incontinência urinária
Muscarínico Pós-Ganglionar (Simpático)	Glândulas Sudoríparas	Diaforeses
Nicotínico Pré-Ganglionar (Simpático)	Adrenal	Aumento das Catecolaminas circulantes
Junção Neuromuscular (Nicotínico)	Músculo Esquelético	Fasciculações, paralisia, fraqueza
Sistema Nervoso Central		
(Nicotínico e Muscarínico)	Encéfalo	Convulsões, coma, depressão SNC e agitação

Tabela 1: Efeitos agudos da exposição a compostos OF (adaptado de Rusyniak e Nañagas, 2004).

A inibição da enzima AChE é amplamente aceita como um mecanismo primário fundamental para a toxicidade dos compostos OF (Banks e Lein, 2012). Por outro lado, alguns trabalhos indicam que a intoxicação aguda ou crônica por estes pesticidas pode ser caracterizada por efeitos que não são somente atribuídos à inibição das enzimas ChEs (efeitos não-colinérgicos) (Pope, 1999; Duysen *et al.*, 2001). De fato, estudos sugerem que, mesmo em baixas doses, alguns OF podem interagir diretamente com outros alvos moleculares ou funções celulares no SNC, como por exemplo, receptores e canais de membrana ou até mesmo com neurotransmissores (Solberg e Belkin; 1997; Nijima *et al.*, 1999), podendo causar fosforilação de proteínas, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (Carlson e Ehrich, 1999; Hargreaves., 2012). Em particular, os efeitos dos OF sobre as mitocôndrias podem ser muito relevantes devido à importância fundamental dessas organelas para as funções neuronais normais, incluindo o metabolismo aeróbico, homeostase do cálcio e processos apoptóticos (Hollenbeck e Saxton, 2005).

A exposição crônica a compostos OF, geralmente com doses baixas ou moderadas, caracteriza-se pelo surgimento tardio dos sintomas, após meses ou anos, e geralmente envolvem anormalidades neurocomportamentais, incluindo ansiedade, depressão, sintomas psicóticos e déficits no aprendizado, memória, atenção e processamento da informação (Stephens *et al.*, 1995; Amr *et al.*, 1997; Singh e Sharma, 2000; Salvi *et al.*, 2003). Como dito anteriormente, estes sintomas podem ocorrer na ausência de sinais de toxicidade colinérgica ou até mesmo na ausência de inibição da atividade da AChE (Brown e Brix, 1998; Singh e Sharma, 2000; Ray e Richards, 2001). Neste sentido, vários estudos têm encontrado uma associação entre a exposição crônica à pesticidas com doenças neurológicas, como por exemplo, a Doença de Parkinson (DP), onde a diminuição da atividade do complexo I mitocondrial pode estar intimamente relacionada com esta patologia (Binukumar *et al.*, 2010; Manthripragada *et al.*, 2010). Além da DP, outras doenças possivelmente associadas com este tipo de intoxicação incluem a esclerose lateral amiotrófica, demência, como a doença de Alzheimer (DA) e a polineuropatia tardia (OPIDP) (Baldi *et al.*, 2003; Lotti, 2005; Johnson e Atchison, 2009).

A OPIDP é uma doença neurológica causada por alguns compostos OF que geralmente é evidenciada 14-28 dias após o episódio agudo de envenenamento, porém, não está relacionada à inibição da AChE, mas sim a outras esterases nomeadas “esterases neurotóxicas” (NTE). Tais enzimas agem por mecanismos ainda pouco conhecidos,

porém sabe-se que a fosforilação da enzima NTE é similar à observada com a AChE, e que estas têm uma ação protetora dos nervos longos dos membros inferiores e superiores. Para a OPIDP ser iniciada, 70 a 80% da NTE tem que estar fosforilada e isso ocorre em questão de horas após a intoxicação pelo OF. No entanto, os sinais clínicos serão evidentes algumas semanas após, quando a atividade da enzima já tenha sido restabelecida. Os sinais e sintomas da OPIDP incluem tremores nas mãos e pés, seguido de perda sensorial, fraqueza muscular progressiva, paralisia no músculo esquelético distal dos membros inferiores e superiores e ataxia. Atrofia muscular, arreflexia e perda ocasional do controle dos esfíncteres também podem ocorrer (Johnson, 1969; Faria *et al.*, 1999). Alguns estudos epidemiológicos têm evidenciado que a lesão primária na OPIDP se deve à degeneração em axônios e terminais sinápticos, afetando tanto fibras nervosas periféricas quanto centrais (Lotti, 1992; Jamal *et al.*, 2002; Lotti, 2005; Costa, 2006; de Silva *et al.*, 2006).

Outra manifestação clínica importante observada após exposição aguda aos pesticidas OF é a chamada síndrome intermediária. Caracteristicamente, esta síndrome apresenta-se como uma paralisia das musculaturas respiratória, proximal dos membros e flexora do pescoço, sendo observada de 24 a 96 horas após a bem definida fase colinérgica da intoxicação e antes do estabelecimento da OPIDP (De Bleecker, 1995). Os mecanismos que envolvem o aparecimento dessa síndrome ainda são desconhecidos; no entanto, sabe-se que não está relacionada com um efeito direto de inibição da AChE. Uma hipótese é que a fraqueza muscular observada nos pacientes com a síndrome intermediária seja o resultado da dessensibilização dos receptores colinérgicos nicotínicos, devido a prolongada estimulação colinérgica após a inibição da AChE (Lotti, 2001).

1.1.2.2. Tratamento da intoxicação

Alguns fármacos são utilizados para o tratamento antídoto à intoxicação por OF. Geralmente, indivíduos que apresentam uma sintomatologia característica de síndrome colinérgica são submetidos à combinação de drogas anticolinérgicas, tais como o sulfato de atropina, e um reativador da enzima AChE (molécula da classe das oximas, geralmente a pralidoxima) (Kuca *et al.*, 2005; Petroianu *et al.*, 2006).

O sulfato de atropina, que apresenta uma estrutura química semelhante à da Ach, age por um mecanismo de competição, inibindo a ação da ACh sobre o receptor do órgão efector. Esta competição ocorre

preferencialmente nos receptores colinérgicos muscarínicos, cuja expressão não é homogênea em todos os órgãos. Desta forma, a atropina reverte apenas sintomas muscarínicos e deve ser administrada assim que se suspeitar o diagnóstico de intoxicação por compostos OF. Já as oximas têm a propriedade de reativar a AChE. Elas são moléculas que possuem um nitrogênio quaternário que se liga diretamente ao sítio aniônico da enzima, deslocando a ligação do OF junto ao sítio esterásico por serem doadores de próton H^+ , estabelecendo uma ligação oxima-OF e reativando dessa forma a enzima (Moraes, 1999; Kushik e Chandrabhan, 2003; Rusyniak e Nañagas, 2004). A eficiência das oximas varia de acordo com a estrutura química do composto OF, com a estrutura química da oxima e com a taxa de dealquilação pós-inibitória conhecida como “envelhecimento”. O envelhecimento é um processo que acontece através da cisão da ligação P-O, a qual resulta na formação de um complexo estável fosfonil-colinesterase, carregado negativamente, interrompendo o ataque nucleofílico pela oxima. Dessa forma, a efetividade do tratamento depende da administração logo após a exposição ao OF, quando a ligação AChE-OF ainda não está totalmente estável (Elhanany *et al.*, 2001). O processo de inibição, reativação e envelhecimento da AChE está mostrado na Figura 2.

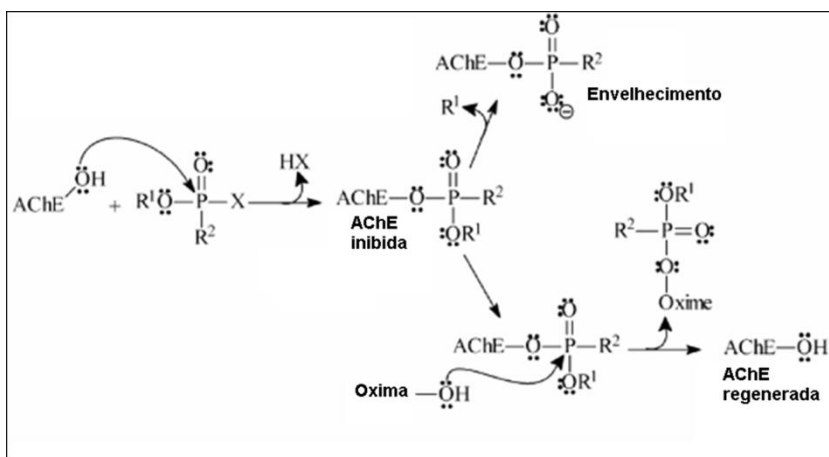


Figura 2: Inibição, reativação e envelhecimento da enzima AChE. (adaptado de Gonçalves *et al.*, 2006).

Apesar de as oximas serem compostos geralmente utilizados para reverter a atividade da enzima AChE inibida pelos OF (Worek *et al.*, 2002), alguns trabalhos têm mostrado que reativadores das colinesterases com propriedades antioxidantes podem ser uma boa ferramenta para o tratamento de intoxicações com esses compostos (Puntel *et al.*, 2008, 2009). Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que as oximas K027 e K048 foram capazes de reduzir a peroxidação lipídica no córtex pré-frontal de camundongos expostos ao malation (da Silva *et al.*, 2008). Além disso, algumas oximas foram capazes de diminuir a produção de TBARS induzida por malonato e ferro em homogenatos de cérebro (Puntel *et al.*, 2008) e proteger a oxidação da LDL induzida por Cu^{2+} in vitro (de Lima Portella *et al.*, 2008).

1.1.2.3. Malation

Dentre os OF mais utilizados no Brasil, destaca-se o malation (éster dietildimetoxifosfinotiol - Figura 3).

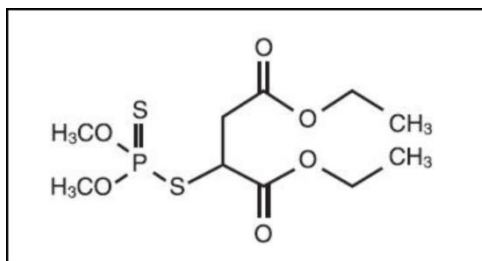


Figura 3: Estrutura química do OF malation (Buratti *et al.*, 2004).

O malation é amplamente utilizado devido a sua alta eficácia como inseticida e baixa toxicidade em mamíferos quando comparado a outros OF. Estudos com animais e humanos mostram que o malation, após absorção, é oxidado no fígado por enzimas do citocromo P-450 em pequenas quantidades para malaoxon, o qual é o principal metabólito responsável pelos efeitos tóxicos observados (Buratti *et al.*, 2004). O metabolismo do malation também se dá através de uma enzima carboxilesterase hepática que catalisa a degradação rápida do malation a derivados como o malation ácido monocarboxílico (MMC) e malation ácido dicarboxílico (MDC). Essas reações competem com a

formação do malaoxon, que por sua vez também pode ser degradado pela carboxilesterase (Buratti *et al.*, 2004 - Figura 4). A excreção do malation se dá quase que totalmente nas primeiras 24 horas, predominantemente pela urina (cerca de 84%) e em pequena proporção pelas fezes (cerca de 6%) (Carvalho e Ribeiro, 2001).

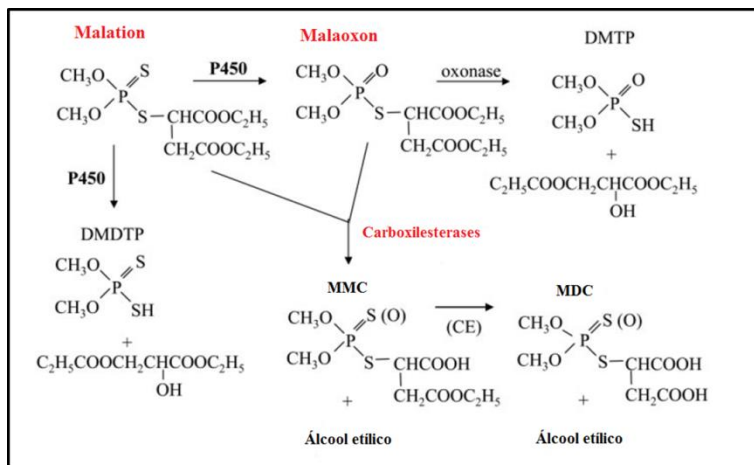


Figura 4: Metabolismo hepático do malation. DMTP, dimetiltiofosfato; DMDTP, dimetilditiofosfato; MMC, malation ácido monocarboxílico; MDC, malation ácido dicarboxílico (adaptado de Buratti *et al.*, 2004).

Os efeitos da intoxicação aguda (síndrome colinérgica) em populações expostas ao malation são semelhantes aos descritos anteriormente para os compostos OF (item 1.1.2.1). No entanto, trabalhos científicos vêm evidenciando ao longo dos anos que outros alvos bioquímicos podem ser afetados pelo malation, além da inibição enzimática da AChE. Animais expostos ao malation apresentaram níveis aumentados de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Brocardo *et al.*, 2007; da Silva *et al.*, 2008), atividade alterada das enzimas antioxidantes glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR), superóxido dismutase (SOD) e catalase (Fortunato *et al.*, 2006), bem como dano no DNA em estruturas cerebrais após tratamento agudo (Brocardo *et al.*, 2007) e crônico (Reus *et al.*, 2008) com malation. Além disso, estudos com roedores mostram que a exposição ao malation foi capaz de induzir alterações neurocomportamentais como ansiedade,

prejuízo da memória aversiva e comportamento tipo depressivo (Assini *et al.*, 2005; Brocardo *et al.*, 2007; Valvassori *et al.*, 2007). No entanto, existe uma falta de informação na literatura sobre os mecanismos envolvidos na toxicidade induzida pelo malation que poderiam estar associados com estes eventos.

1.2. O sistema colinérgico

A ACh é um neurotransmissor do SNC e SNP, e sua transmissão é mediada por dois tipos distintos de receptores: muscarínicos (acoplados à proteína G) e nicotínicos (canais ionotrópicos). Os receptores muscarínicos estão localizados no coração, células musculares lisas e células glandulares. Além disso, estão localizados, juntamente com receptores nicotínicos, em células ganglionares autônomas e em neurônios do SNC (Costa, 2006). No SNP, a ACh é o principal neurotransmissor dos gânglios autônomos, fibras nervosas parassimpáticas pós-ganglionares e junção neuromuscular. Possui um papel fisiológico essencial na estimulação da contração dos músculos esqueléticos e lisos. Também regula a secreção em tecidos glandulares, como o intestino e as parótidas (Slotkin, 2004; Costa, 2006). No SNC, a ACh apresenta inúmeras funções, estando implicada no processo cognitivo (atenção, aprendizado e memória), na motivação e recompensa, no processamento de estímulos, além da participação no processo de sono e vigília (Ankarberg, 2004). A localização anatômica dos neurônios colinérgicos e suas projeções nas estruturas cerebrais estão apresentadas na Figura 5.

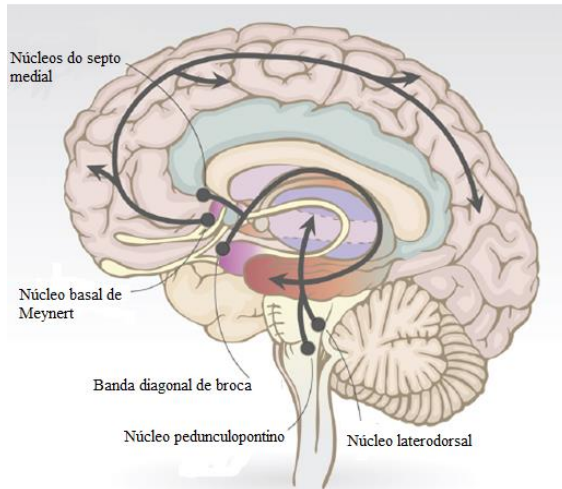


Figura 5: Inervação colinérgica no encéfalo (adaptada de Pinto *et al.*, 2011).

Após a liberação da ACh na fenda sináptica ou junção neuromuscular e sua ação em receptores específicos (nicotínicos ou muscarínicos), este neurotransmissor deve ser removido para permitir a recuperação do receptor ou para evitar respostas repetitivas e descontroladas após um único estímulo. Esta remoção é feita pela hidrólise do neurotransmissor catalisada pela enzima AChE, com formação de colina e ácido acético (Rang e Dale, 2007) (Figura 6).

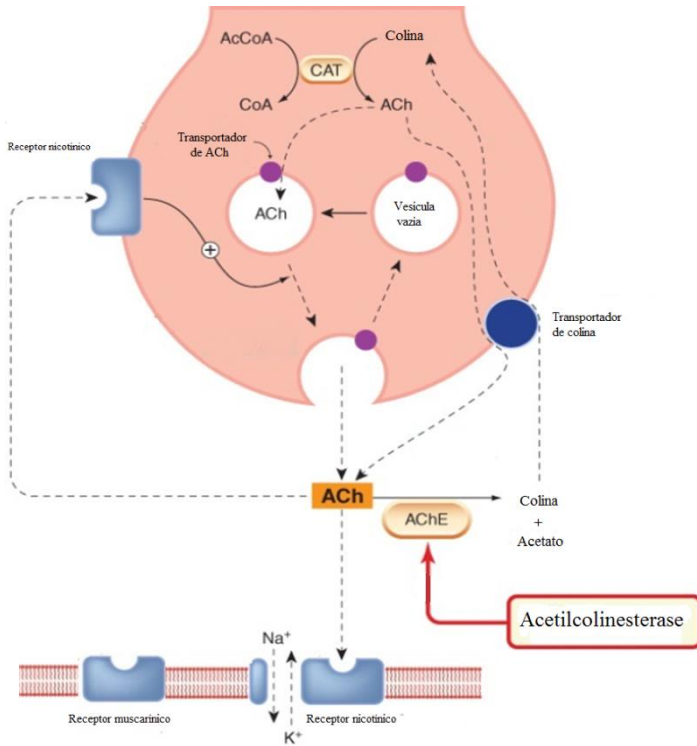


Figura 6: Representação esquemática da neurotransmissão colinérgica (adaptada de Rang e Dale, 2007).

Estudos recentes vêm evidenciando as diferentes funções dos neurônios colinérgicos no cérebro. A avaliação dessas funções, por meio de técnicas eletrofisiológicas e uso de toxicantes, permite verificar que a ACh está implicada em importantes processos fisiológicos relacionados à cognição, motivação, sono e vigília, conforme já descrito anteriormente. Neste contexto, um crescente número de estudos vem mostrando que colinotóxicos podem causar distúrbios no desenvolvimento do sistema colinérgico, bem como na função em si, em diferentes áreas no cérebro (Ankarberg, 2004). Tendo em vista que o mecanismo primário de toxicidade dos compostos OF é devido a inibição da enzima AChE, levando à perda da homeostase colinérgica, tais compostos podem causar inúmeros distúrbios neuroquímicos,

neurocomportamentais e neuromorfológicos. Dentre as alterações provocadas por esses compostos estão: mudança na conformação dos receptores colinérgicos e na densidade dos mesmos, citotoxicidade, vacuolização citoplasmática, aumento no espaço intercelular, apoptose, alteração em cascatas de sinalização celular, diminuição da comunicação sináptica, proliferação de células gliais, comprometimento na inervação colinérgica em diferentes áreas cerebrais. Tais modificações podem refletir em desordens neuropsiquiátricas, como alterações locomotoras, ansiedade, depressão, perda de memória e déficits de aprendizagem (Eyer, 1995; Slotkin, 2004; De Silva, 2006).

2. JUSTIFICATIVA

São inúmeros os estudos indicando que os pesticidas, incluindo os inseticidas OF, representam um sério risco à saúde pública. Seu emprego indiscriminado, sem as devidas precauções e cuidados em relação à manipulação, produção, estocagem e destino final, põe em risco não só o meio ambiente, mas também a saúde das pessoas que de alguma forma entram em contato com tais produtos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, a cada ano, entre três e cinco milhões de pessoas são contaminadas por agrotóxicos em todo o mundo e são vários os fatores que contribuem para essa estatística, tais como a ampla utilização desses compostos, o desrespeito às normas de segurança, a livre comercialização, o baixo nível de informação dos trabalhadores quanto aos riscos a que estão sendo expostos e a pressão exercida pelas empresas distribuidoras e produtoras. A realidade no estado de Santa Catarina também é um tema preocupante. Segundo dados do Centro de Informações Toxicológicas (CIT) localizado no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, 30% dos casos comunicados neste setor estão relacionados com exposição a pesticidas, indicando a magnitude do problema e a necessidade de pesquisas que busquem elucidar por completo os mecanismos de toxicidade e identificar tratamentos mais eficazes para os casos de intoxicação. Neste sentido, existe um consenso quanto ao tratamento terapêutico de emergência para ser empregado clinicamente em casos de intoxicação por compostos OF, o qual se baseia na administração de um fármaco anticolinérgico (geralmente a atropina) e oximas reativadoras da enzima AChE (geralmente a pralidoxima). No entanto, a experiência clínica com a pralidoxima não tem demonstrado eficiência nas intoxicações pelo composto malation (Sudakin *et al.*, 2000) e o seu uso rotineiro tem sido questionado. Isto sugere a necessidade da busca por reativadores da enzima AChE de amplo espectro e com maior eficácia que os disponíveis clinicamente (Kassa, 2002). Tendo em vista a baixa eficácia de reativadores da enzima AChE após a exposição ao malation, estudos que busquem identificar novos compostos reativadores desta enzima, com maior capacidade de reativação, parecem ser de suma importância.

Enquanto que os efeitos da intoxicação aguda por OF têm sido claramente identificados e caracterizados através de uma grande quantidade de estudos envolvendo animais e humanos, os efeitos do envenenamento crônico por pesticidas OF ainda são contraditórios.

Hipotetiza-se que os possíveis efeitos neurocomportamentais observados após este tipo de envenenamento não envolvam necessariamente a inibição da enzima AChE (Terry, 2012), sendo provável que outros alvos no SNC estejam envolvidos nestes eventos. No entanto, os mecanismos envolvidos na toxicidade crônica dos pesticidas OF, não relacionados com a inibição da AChE, ainda são pouco compreendidos. Sabendo que o malation é um dos inseticidas mais utilizados no mundo (Donaldson *et al.*, 2002) e que não existem evidências da associação entre baixos níveis de exposição ao malation e déficits neurocomportamentais (Rothlein *et al.*, 2006), torna-se fundamental estudos que busquem o entendimento dos mecanismos capazes de modular tal associação.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Esta tese objetivou oferecer um melhor conhecimento acerca dos mecanismos moleculares de toxicidade induzida pelo pesticida malation (e seu metabólito malaoxon), além de avaliar possíveis estratégias antidotas contra este toxicante. Tais objetivos foram divididos em três ramos, os quais representam os capítulos desta tese:

Capítulo I: Comparar as oximas pralidoxima (oxima utilizada na clínica) e K074 (oxima experimental) quanto aos seus potenciais efeitos reativadores da AChE sanguínea e cerebral, inibida após a exposição aguda de camundongos ao malation. Além disso, investigar a efetividade dessas oximas em conter o potencial dano induzido pelo malation em parâmetros relacionados ao estresse oxidativo.

Capítulo II: Investigar os possíveis déficits neurocomportamentais (relacionados à memória), bem como alterações bioquímicas no hipocampo em camundongos expostos a doses repetidas de malation, que não causam toxicidade colinérgica aparente e nem inibição da enzima AChE.

Capítulo III: Investigar os possíveis eventos moleculares que precedem a morte celular induzida pelo malaoxon, em cultura primária de neurônios corticais.

3.2. Objetivos específicos

Capítulo I:

Avaliar o efeito da exposição de camundongos ao malation, 24 horas após uma única injeção do pesticida, sobre:

- a atividade da AChE no córtex pré-frontal, hipocampo e sangue;
- variáveis bioquímicas relacionadas com o estresse oxidativo (atividade das enzimas glutatona peroxidase, glutatona redutase e catalase e níveis de peroxidação lipídica) no córtex pré-frontal e hipocampo dos animais;

Avaliar o efeito das oximas K074 e pralidoxima sobre as possíveis alterações bioquímicas (atividade das enzimas AChE, glutathione peroxidase, glutathione reductase e catalase e níveis de peroxidação lipídica) induzidas pela exposição ao malation em córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos.

Capítulo II:

- Avaliar o efeito da exposição de camundongos ao malation sobre a atividade da AChE hipocampal, 24 horas após uma única injeção com baixas doses do pesticida;

Avaliar o efeito de exposições repetidas (por um período de 15 dias) com baixas doses de malation, sobre:

- a atividade da AChE hipocampal;
- parâmetros comportamentais;
- a atividade dos complexos I, II e IV da cadeia respiratória mitocondrial, no hipocampo dos camundongos;
- a expressão da enzima marcadora de neurônios colinérgicos colina acetiltransferase (ChAT), da proteína sináptica sinaptofisina e das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak;
- a expressão da proteína marcadora de astrócitos proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e da proteína de canal de água aquaporina 4 (AQP4) (relacionada com disfunção da BHE).

Capítulo III:

- Investigar o efeito de concentrações crescentes de malaoxon sobre a viabilidade celular em cultura primária de neurônios corticais;
- Investigar o efeito do malaoxon e da oxima pralidoxima sobre a atividade da AChE, em cultura primária de neurônios corticais;
- Avaliar o efeito do malaoxon sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e sobre o potencial de membrana mitocondrial;
- Determinar o efeito protetor do antioxidante ácido ascórbico sobre a morte celular induzida pelo malaoxon, em cultura primária de neurônios corticais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes:

Ácido 5,5 ditiobis 2-nitrobenzóico, comassie blue, albumina de soro bovino, nicotinamida adenina dinucleotídefostato reduzida, glutationa oxidada, glutationa redutase, glutationa reduzida, peróxido de *tert*-butila, iodeto de acetiltiocolina e malaixon foram adquiridos da empresa Sigma (St. Louis, MO, USA). Ácido acético, ácido clorídrico concentrado, ácido tricloroacético, fosfato de potássio dibásico, fosfato de potássio monobásico foram adquiridos da empresa Reagen Quimibras (RJ, Brasil). Malation (95 % pureza) foi adquirido da empresa Dipil (Massaranduba, SC, Brasil). Rodamina 123, 2',7'-diclorodihidrofluoresceína acetato, 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina foram adquiridos da empresa Invitrogen. Anticorpos anti-Bax, anti-Bak, anti-sinaptofisina, anti-aquaporina4 e anti- β -actina foram adquiridos da empresa Santa Cruz Biotechnology, anticorpo anti-colina acetiltransferase foi adquirido da empresa Abcam e anti-GFAP da empresa Sigma-Aldrich.

4.2. Ensaio *in vivo*:

4.2.1. Animais:

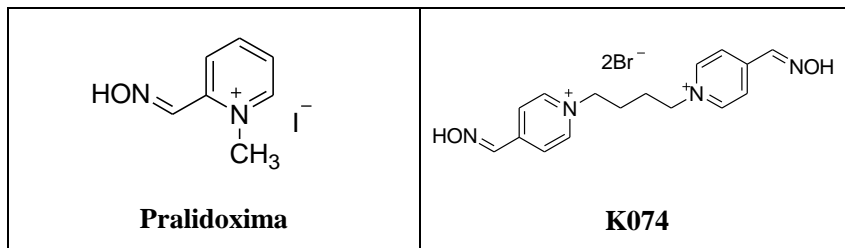
Foram utilizados camundongos *Swiss* machos adultos, provenientes do Biotério Central da UFSC, com 2 a 3 meses de idade e pesando entre 35 - 45 gramas. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com ração e água *ad libitum*, em ambiente com temperatura controlada de 22 +/- 2 °C e ciclo claro/escuro 12:12 horas (7:00-19:00 h). Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob os protocolos de números PP00765.

4.2.2. Capítulo I:

Avaliação dos efeitos das oximas pralidoxima e K074 sobre a toxicidade aguda induzida pelo pesticida OF malation, em camundongos adultos:

As oximas testadas foram gentilmente cedidas pelo Doutor Kamil Kuca, da Universidade de Defesa e Faculdade Militar de Ciências da Saúde, República Tcheca. Suas estruturas estão representadas na tabela abaixo (Tabela 2).

Tabela 2: Estrutura química das oximas testadas:



Com o objetivo de investigar o papel das oximas pralidoxima e K074 sobre o efeito de uma exposição aguda ao malation na atividade da enzima AChE e parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, dois protocolos experimentais foram utilizados:

4.2.2.1. Administração de oximas pela via intramuscular:

Quarenta e oito animais foram divididos randomicamente em oito grupos experimentais, com seis animais cada, conforme descrito abaixo:

Grupo 1 - Salina (s.c.) + salina (i.p.) + salina (i.m.);

Grupo 2 - Salina (s.c.) + salina (i.p.) + pralidoxima 66 mg/kg (i.m.);

Grupo 3 - Salina (s.c.) + salina (i.p.) + K074 5,8 mg/kg (i.m.);

Grupo 4 - Salina (s.c.) + atropina 20 mg/kg (i.p.) + salina (i.m.);

Grupo 5 - Malation 1,25 g/kg (s.c.) + salina (i.p.) + salina (i.m.);

Grupo 6 - Malation 1,25 g/kg (s.c.) + atropina 20 mg/kg (i.p.) + salina (i.m.);

Grupo 7 - Malation 1,25 g/kg (s.c.) + atropina 20 mg/kg (i.p.) + pralidoxim 66 mg/kg (i.m.);

Grupo 8 - Malation 1,25 g/kg (s.c.) + atropina 20 mg/kg (i.p.) + K074 5,8 mg/kg, (i.m.).

O malation (1,25 g/kg) foi administrado nos animais pela via subcutânea. Após 6 h da exposição ao pesticida, uma única dose de atropina (i.p.) e/ou oximas (i.m.) foi administrada. A dose de malation utilizada foi baseada em um estudo anterior do nosso grupo (da Silva *et al.*, 2008) e o protocolo de exposição foi desenvolvido numa tentativa de mimetizar uma condição de intoxicação humana aguda real,

caracterizada por elevada inibição da AChE sanguínea (cerca de 70%) (OMS, 1986). Animais controle receberam injeções de solução salina (NaCl 0,9%) (Figura 7).

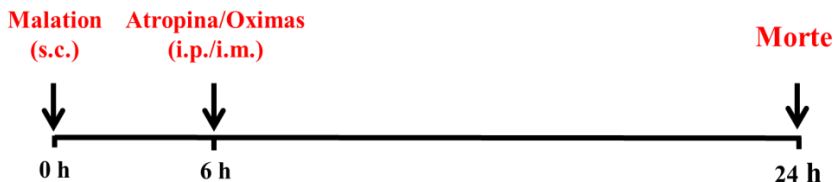


Figura 7: Linha do tempo descritiva das fases experimentais ao longo do tratamento agudo com malation (via subcutânea) e as oximas (via intramuscular).

4.2.2.2. Administração de oximas pela via intracerebroventricular:

As oximas pralidoxima e K074 (dissolvidas em solução salina) foram injetadas intracerebroventricularmente (i.c.v.) 6 h após uma única administração de malation (1,25 g/kg, s.c.), de acordo com o protocolo abaixo (Figura 8):

Grupo 1 - Salina (s.c.) + salina (i.c.v.);

Grupo 2 - Malation 1,25 g/kg (s.c.) + salina (i.c.v.);

Grupo 3 - Salina (s.c.) + pralidoxima 300 nmol (i.c.v.);

Grupo 4 - Salina (s.c.) + K074 30 nmol (i.c.v.);

Grupo 5 - Malation 1,25 g/kg (s.c.) + pralidoxima 300 nmol (i.c.v.);

Grupo 6 - Malation 1,25 g/kg (s.c.) + K074 30 nmol (i.c.v.).

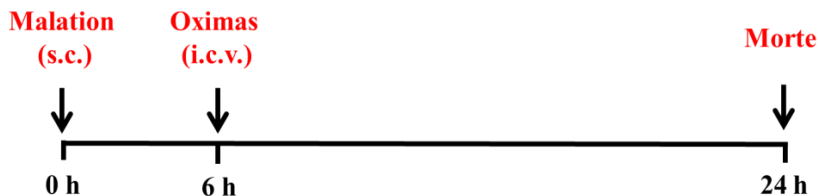


Figura 8: Linha do tempo descritiva das fases experimentais ao longo do tratamento agudo com malation e oximas pela via intracerebroventricular.

Para as injeções i.c.v, foi utilizada uma seringa *Hamilton* com agulha de calibre 28 e 3 mm de comprimento. Camundongos foram anestesiados levemente com éter (apenas o necessário para a perda do reflexo postural) e a agulha foi inserida unilateralmente, 1 mm para a direita do ponto da linha média equidistante de cada um dos olhos e 1 mm posterior a uma linha desenhada através da base anterior dos olhos (utilizada como referência externa). Pralidoxima (300 nmol /3 μ L, \sim 1/4 DL₅₀), K074 (30 nmol / 3 μ L, \sim 1/4 DL₅₀) ou solução salina foi administrada gradualmente no ventrículo lateral, nas seguintes coordenadas a partir do bregma: -0,1 mm no eixo ântero-posterior (AP), 1 mm no eixo médio-lateral (ML) e 2,4 mm no eixo dorso-ventral (DV).

As doses de oximas utilizadas em ambos os protocolos (administração i.m. ou i.c.v.) foram 1/4 DL₅₀, de acordo com trabalhos prévios na literatura (Kassa e Humlicek; 2008, Kassa *et al.*, 2005) e com um estudo toxicológico preliminar realizado em nosso laboratório.

4.2.2.3. Preparação tecidual para as análises bioquímicas:

Vinte e quatro horas após a administração de malation, os animais foram submetidos à anestesia com éter e o sangue foi coletado por punção cardíaca em tubos heparinizados. Em seguida, os animais foram mortos por decapitação e o córtex pré-frontal e hipocampo foram removidos e homogeneizados em 10 volumes de tampão HEPES 20 mM, pH 7,4. Os homogenatos foram centrifugados a 3.000 x g por 5 minutos a 4°C e uma alíquota do sobrenadante foi utilizada na determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE). Para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR) e catalase (CAT), e medida dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), os sobrenadantes da primeira centrifugação foram novamente centrifugados a 16.000 x g a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante gerado foi utilizado nas análises. Para a determinação da atividade da AChE sanguínea, o sangue total foi diluído em 25 volumes de água ultra pura e as amostras hemolisadas foram utilizadas na determinação da atividade da enzima. Os valores obtidos foram normalizados pela quantidade de hemoglobina (Hb) referente a cada amostra. A concentração de Hb foi medida a 540 nm na forma de ciano-metahemoglobina, conforme descrito por Ventura *et al.* (1967), com pequenas modificações de Farina *et al.* (2002).

4.2.2.4. Análises bioquímicas:

4.2.2.4.1. Avaliação da atividade da Acetilcolinesterase (AChE):

A atividade da AChE sanguínea e cerebral foi determinada pelo método de Ellman (Ellman *et al.*, 1961). Esse método baseia-se na taxa de hidrólise do iodeto de acetiltiocolina, que é medida em 412 nm. Isto é acompanhado por uma reação da tiocolina com o ácido 5',5 – ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) para produzir o ânion ácido 2-nitro-5-mercaptopentano-2-carboxílico (TNB), de cor amarela. A atividade da AChE foi expressa em nmol de substrato hidrolisado/min/mg de proteína.

4.2.2.4.2. Avaliação da atividade da Glutaciona Peroxidase (GPx):

A atividade da GPx foi determinada através do método de Wendel, utilizando peróxido de *tert*-butila como substrato (Wendel, 1981). A GPx catalisa a redução de H₂O₂, bem como outros peróxidos orgânicos, utilizando a glutaciona reduzida (GSH) como co-substrato e produzindo glutaciona oxidada (GSSG). A GSSG é reduzida pela glutaciona redutase com o consumo de NADPH, que foi mensurado através da leitura em espectrofotômetro em 340 nm. A atividade da GPx foi expressa em nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína.

4.2.2.4.3. Avaliação da atividade da Glutaciona Redutase (GR):

A atividade da GR foi determinada através do método descrito por Carlberg e Mannervik (1985). A taxa de redução da glutaciona oxidada (GSSG) foi determinada indiretamente através do monitoramento do consumo (oxidação) do NADPH a 340 nm. A atividade da GR foi expressa em nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína.

4.2.2.4.4. Avaliação da atividade da Catalase (CAT):

A atividade da CAT foi medida pelo método de Aebi (1974). A reação foi iniciada pela adição de 300 mM de H₂O₂ e a taxa de consumo do H₂O₂ foi medida espectrofotometricamente a 240 nm.

4.2.3. Capítulo II:

Avaliação dos efeitos tóxicos induzidos pela administração repetida, com doses subtóxicas do pesticida OF malation em hipocampo de camundongos adultos:

Com o objetivo de investigar os efeitos tóxicos de uma exposição repetida (ao longo de um período de 15 dias), com uma dose subtóxica de malation (que não produz sinais e sintomas evidentes de toxicidade colinérgica), sobre parâmetros comportamentais, inflamatórios e mitocondriais, os camundongos foram aleatoriamente divididos em três grupos experimentais, conforme o protocolo abaixo:

4.2.3.1. Protocolo experimental:

Camundongos machos adultos foram administrados diariamente com injeções subcutâneas de malation, por um período de 15 dias, nas doses de 30 e 100 mg/kg de peso corporal. Solução salina (NaCl 0,9%) foi utilizada como veículo e injetada pela via s.c. no grupo controle. Os animais foram pesados e individualmente monitorados durante todo o período de tratamento (em suas gaiolas), para a visualização de possíveis sintomas de toxicidade colinérgica, por exemplo, diarreia, salivação ou lacrimação excessiva, dificuldades respiratórias, ou fasciculação muscular. Dezesesseis dias após o início do tratamento (24 horas após a última injeção de malation, dia 15), as análises comportamentais (atividade locomotora e comportamento exploratório, utilizando o teste do campo aberto, e o teste de realocação do objeto) foram realizadas, como descritas a seguir no item 4.2.3.2. Após as análises comportamentais, os animais foram mortos por decapitação, os cérebros foram imediatamente removidos e os hipocampus foram dissecados para as posteriores análises bioquímicas (Figura 9).

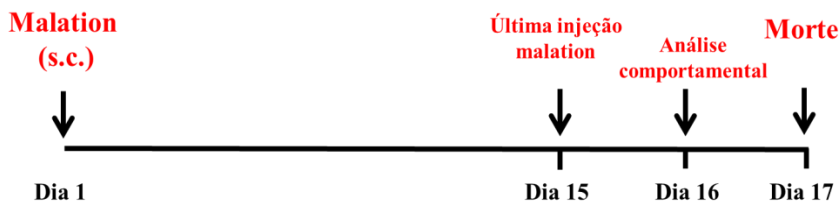


Figura 9: Linha do tempo descritiva das fases experimentais ao longo do tratamento por 15 dias com malation.

4.2.3.2. Análises comportamentais:

4.2.3.2.1. Teste do campo aberto:

O teste do campo aberto foi utilizado para investigar a atividade locomotora e o comportamento exploratório dos animais ($n = 8$ -10 animais). Os camundongos foram colocados individualmente em um campo aberto de plástico circular azul (diâmetro = 44 cm, altura = 22 cm), com setores desenhados no chão. O número de cruzamentos (número de quadrados cruzados pelo animal com as quatro patas) foi utilizado para avaliar a atividade locomotora, e o número de levantadas (número de vezes que os animais se equilibram sobre as patas traseiras ou atividade exploratória vertical) para avaliar o comportamento exploratório. Todos os parâmetros foram registrados em um período de 5 min. O aparato foi higienizado com uma solução de etanol 10% entre os testes de cada animal, a fim de remover os odores ou pistas.

4.2.3.2.2. Teste de realocação do objeto:

O teste de realocação do objeto foi conduzido para a avaliação da capacidade de aprendizado e memória dos animais ($n = 8$ -10 animais). O aparelho utilizado para o teste foi o campo aberto. Os objetos utilizados foram dois retângulos plásticos idênticos (3 cm lado X 4,5 cm lado X 4,5 cm altura), os quais foram colados ao chão de maneira equidistante 7 cm de dois lados da caixa. O procedimento consistiu em uma sessão treino, onde dois objetos idênticos eram apresentados aos animais. Neste momento, foi registrado o tempo de exploração de cada um dos objetos colocados na caixa, durante cinco minutos. Depois da sessão treino os animais retornavam às suas gaiolas e aguardavam até o momento do teste, 90 minutos após o treino. No momento do teste, porém, um dos objetos era colocado em uma nova posição no campo aberto. Neste momento registrava-se, novamente, o tempo de exploração de cada um dos objetos. Os seguintes comportamentos foram considerados como exploração do objeto: cheirar, tocar ou observar o objeto a menos de 1 cm de distância. Este tempo de exploração dos objetos foi utilizado para o cálculo do índice dotempo de exploração dos objetos, o qual foi utilizado como parâmetro de memória (Assini et al., 2009).

Índice do tempo de exploração = $[t(s) A2 \times 100 / \{t(s) A2 + t(s) A1 \}]$

Onde A2 foi o tempo gasto pelos animais explorando o objeto deslocado e A1 foi o tempo gasto pelos animais explorando o objeto não deslocado.

4.2.3.3. Preparação tecidual para as análises bioquímicas:

Vinte e quatro horas após as análises comportamentais, 6 animais foram utilizados para as seguintes análises bioquímicas: atividade da acetilcolinesterase (AChE) e atividade dos complexos I, II e IV da cadeia respiratória mitocondrial.

Os animais foram mortos por decapitação e os hipocampus foram removidos e homogeneizados em 10 volumes de tampão fosfato (pH 7,4), contendo 0,3 M de sacarose, 5 mM de MOPS, 1 mM de EGTA e 0,1% de albumina de soro bovino. Os homogenatos teciduais foram centrifugados a 1000 x g a 4°C durante 10 minutos e uma alíquota do sobrenadante foi utilizada para a determinação da atividade da AChE e para a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial.

4.2.3.4. Análises bioquímicas:

4.2.3.4.1. Avaliação da atividade da Acetilcolinesterase (AChE):

A atividade da enzima AChE foi determinada pelo método de Ellman (Ellman *et al.*, 1961), conforme já descrito no item 4.2.2.3.1.

4.2.3.4.2 Avaliação da atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial:

A atividade do complexo I (NADH desidrogenase) foi medida através da taxa de redução do ferricianeto a 420 nm, dependente de NADH, como descrito anteriormente por Cassina e Radi (1996). A atividade da succinato-2,6-dicloroindofenol (DCIP)-oxidoreductase (complexo II) foi determinada de acordo com o método de Fischer *et al* (1985), enquanto que a atividade citocromo C oxidase (complexo IV), foi determinada de acordo com Rustin *et al* (1994). Os métodos descritos foram ligeiramente modificados por Latini *et al* (2005). As atividades dos complexos da cadeia respiratória foram calculados como $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

4.2.3.5. Western blotting:

Vinte e quatro horas após as análises comportamentais, 4 animais foram utilizados para a técnica de *western blotting*. Os animais foram mortos por decapitação e os hipocampus foram rapidamente removidos e homogeneizados em tampão de extração (50 mM Tris-HCl pH 7,5, X-100, NaCl 100 mM, Triton, 5 mM de EDTA pH 8,0, 40 mM de β -glicerolfosfato, NaF 50 mM, ortovanadato 200 μ M, 5% de glicerol e inibidores de protease) e sonicados durante 5 min. As amostras foram centrifugadas a 13000 x g a 4°C durante 45 min e os sobrenadantes separados e dosados quanto ao conteúdo protéico. As amostras (40-50 μ g de proteína) foram submetidas à eletroforese em gel de SDS poliacrilamida (PAGE), utilizando géis de 12-15%, e após a separação eletroforética as proteínas foram eletro-transferidas para membranas de nitrocelulose (0,45 μ m de diâmetro). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas (1 h) com 5% de leite desnatado em TBS tween 0,05% (10 mM Tris, 150 mM de NaCl, pH 7,5) e incubadas *overnight* a 4°C, com os seguintes anticorpos: anticorpo monoclonal de camundongo anti-Bax (1/300; 23kDa; Santa Cruz Biotechnology), anticorpo policlonal de coelho anti-Bak (1/300; 28 kDa; Santa Cruz Biotechnology), anticorpo monoclonal de camundongo anti-sinaptofisina (1/300; 38-48 kDa; Santa Cruz Biotechnology), anticorpo policlonal de coelho anti-colina acetiltransferase (1/2000; 70 kDa; Abcam) e anticorpo de camundongo anti- β -actina (1:3000; 43kDa; Santa Cruz Biotechnology), diluídos em tampão TBS-Tween-BSA (20 mM de Tris base, 140 mM de NaCl, 0,05% de Tween-20). Após as lavagens, as membranas foram incubadas durante 60 min à temperatura ambiente com os anticorpos secundários anti-camundongo ou anti-coelho, conjugados com peroxidase. A ligação específica do anticorpo foi revelada utilizando um kit quimioluminescente (Immun-Star reagentes HRP quimioluminescente (luminol Reagente sc-2048, Santa Cruz, CA, EUA). Finalmente, as bandas foram analisadas quanto a densidade óptica utilizando-se o software Scion Image e os valores densitométricos das bandas foram normalizados em relação as bandas de β -actina. Para melhor visualização das diferenças, os resultados da análise estatística foram convertidos em valores percentuais em relação ao grupo controle (considerado 100%).

4.2.3.6. Imunofluorescência:

Para a visualização da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e da aquaporina-4 (AQP4), em diferentes regiões do hipocampo, um novo grupo de animais foi tratado com malation (30 e 100 mg/kg) ou com veículo (NaCl 0,9%) por um período de 15 dias (n = 4). Ao final do período de tratamento, os camundongos foram anestesiados com quetamina/xilazina (10 e 75 mg/kg, respectivamente, i.p.) e logo perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com solução salina (NaCl 0,9%), seguida por uma solução fixadora de paraformaldeído 4% em 0,1 M de solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4. Após a perfusão, os cérebros foram removidos e pós-fixados na mesma solução fixadora durante 24 h à temperatura ambiente e crioprotégidos por imersão em solução de sacarose 30% em PBS a 4°C. Após, os cérebros foram congelados por imersão em isopentano resfriado e armazenados em congelador (-80°C) para as análises posteriores. Cortes coronais em série (40 µM) de hipocampo foram obtidos com um criostato (Leica) a -20°C. As secções foram primeiramente bloqueadas com 5% de soro de cavalo, diluído em PBS contendo 2% de Triton X-100 (PBS-Tx), durante 2 h à temperatura ambiente. Em seguida, as secções foram incubadas *overnight* a 4 °C com o anticorpo de camundongo anti-GFAP (Sigma-Aldrich) e o anticorpo feito em cabra anti-aquaporina 4 (AQP4) (Santa Cruz Biotechnology), em 1% de soro de cavalo diluído em PBS-Tx 0,5%. Após três lavagens em PBS, as secções de tecido foram incubadas com o anticorpo anti-camundongo Alexa 488 e anti-cabra Alexa 568 em 1% de soro de cavalo diluído em PBS-Tx 0,5%, durante 2 h à temperatura ambiente. Em seguida, as secções foram lavadas três vezes com PBS, montadas em lâminas com Fluor Save e cobertas com lamínulas. Após, as imagens das secções dos hipocampus foram capturadas em um microscópio confocal Olympus FV-1000 e examinadas com o software Image G (Rodrigues *et al.*, 2010).

4.2.3.7. Dosagem de Proteínas:

O conteúdo de proteínas foi quantificado pelo método de Lowry (1951), usando albumina de soro bovino para curva padrão.

Todas as atividades enzimáticas descritas nos Capítulos I e II (AChE, GPx, GR, CAT e complexos da cadeia respiratória

mitocondrial) foram medidas utilizando-se o multileitor Infinite M 200 (Tecan ®).

4.2.4. Capítulo III:

Ensaio *in vitro*:

Com o objetivo de investigar os possíveis alvos de ação do pesticida OF malation no SNC, utilizamos um protocolo *in vitro* utilizando células provenientes de cultura primária de neurônios corticais.

4.2.4.1. Cultivo primário de neurônios corticais:

Os cultivos primários de neurônios corticais de fetos de camundongos NMRI (com 16 dias gestacionais) foram preparados como previamente descrito por Frandsen e Schousboe (1990), com pequenas modificações. Resumidamente, camundongos fêmeas prenhas foram anestesiadas com isoflurano, eutanasiadas por deslocamento cervical e os fetos foram removidos. Os córtices foram dissecados com a ajuda de uma pinça, triturados mecanicamente e as células foram dissociadas através de leve tripsinização. As células foram semeadas em placas de cultura na presença de meio de cultura DMEM (5 mM de KCl, 31 mM de glicose e 0,2 mM de glutamina) suplementado com p-aminobenzoato, insulina, penicilina e 10% de soro bovino fetal. A suspensão celular ($0,8 \times 10^6$ células/mL) foi semeada em placas de 96 poços e incubada a 37°C em uma atmosfera com 5% CO₂. Uma mistura de 5 µM de 5-fluoro-2'-deoxiuridina e 20 µM de uridina foi adicionada às culturas no segundo dia *in vitro* (DIV), para prevenir a proliferação glial.

4.2.4.1.1. Tratamento das células neuronais:

Malaoxon (Mx), o metabólito tóxico do malation, foi diluído em DMSO e adicionado aos meios de cultura em concentrações finais de 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 µM. A concentração final de DMSO no meio de cultura foi de 0,1%. Os parâmetros bioquímicos foram determinados após 0,5, 24 e 48 horas e 6 DIV de tratamento. Através destes ensaios foi estabelecida a relação temporal entre a atividade da enzima AChE, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) com a morte celular induzida por Mx.

Nos ensaios onde a pralidoxima foi utilizada, as células foram expostas ao Mx pelos tempos acima especificados e, logo em seguida, à pralidoxima (Px) (concentração final no poço de 600 μM) ou veículo (PBS). Nos experimentos utilizando o antioxidante ácido ascórbico (AA), soluções estoque foram preparadas em água estéril. AA (concentração final no poço de 200 μM) foi adicionado 30 minutos antes da adição do Mx (100 μM) nas culturas corticais. A Px e o antioxidante foram mantidos nas culturas durante todo o período de tratamento.

4.2.4.2. Análises bioquímicas:

4.2.4.2.1. Ensaio de citotoxicidade celular:

A viabilidade das culturas primárias de neurônios corticais foi medida através do ensaio da função mitocondrial pelo método de redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). A técnica é baseada na medida da atividade de desidrogenases mitocondriais que clivam e reduzem o corante amarelo solúvel MTT em cristais de formazan insolúvel, que possui coloração violeta. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços ($0,8 \times 10^6$ células/mL) e colocadas em incubadora (5% CO_2 , 37 °C) por 24 h. Após este período, as células foram tratadas com diferentes concentrações de Mx (0,01 – 100 μM), ou veículo (PBS + concentração máxima de DMSO 0,1%) nos grupos controles, e incubadas por 0,5, 24 e 48 horas ou 6 DIV. Ao final deste período, o meio foi removido e 100 μL de MTT 0,5 mg/mL foram adicionados a cada poço e uma nova incubação por 2 h foi efetuada. Terminada esta etapa, o MTT foi removido e foram adicionados 200 μL de SDS 10% para dissolução dos cristais de formazan. As placas foram então submetidas à leitura espectrofotométrica a 560 nm e a porcentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle (sem Mx). Os experimentos foram realizados em triplicata (Rosa *et al.*, 1997; García *et al.*, 2008).

4.2.4.2.2. Determinação da atividade da AChE:

A atividade da enzima AChE foi determinada nos cultivos primários de neurônios corticais nos tempos de 0,5, 24 e 48 horas ou 6 DIV, após a exposição das células ao Mx e/ou Px. Após os tempos de incubação especificados, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e foram adicionados 50 μL 5',5 - ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), concentração final de 420 μM e 50 μL de substrato da enzima (iodeto de

acetiltiocolina), concentração final de 633 μM . As células foram incubadas por 30 min a 37°C e após o período de incubação a absorbância foi medida em 412 nm. O método baseia-se na produção de tiocolina, a partir da hidrólise da acetiltiocolina. Isto é acompanhado por uma reação da tiocolina com o DTNB para produzir o ânion ácido 2-nitro-5-mercaptop-benzóico (TNB) de cor amarela (Ellman *et al.*, 1961).

4.2.4.2.3. Medida do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$):

A perda relativa do potencial de membrana mitocondrial das células expostas ao Mx foi determinada pelo teste da rodamina 123. Rodamina 123 é uma molécula fluorescente catiônica capaz de atravessar a membrana plasmática e rapidamente ser sequestrada por mitocôndrias com o potencial de membrana normal. Alterações no potencial de membrana mitocondrial desencadeiam um efluxo da rodamina 123 para o citosol e a sua fluorescência aumenta. As células foram semeadas em placas de 96 poços ($0,8 \times 10^6$ células/mL), mantidas em estufa incubadora (5% CO_2 , 37 °C) por 24 h, e em seguida incubadas com rodamina 123 (concentração final de 5 $\mu\text{g/mL}$) durante 15 min. Após 2 lavagens com PBS, as células foram expostas a 100 μM de Mx; o controle positivo (máxima despolarização) recebeu antimicina A (30 μM), e a intensidade de fluorescência da rodamina foi medida em espectrofluorímetro durante 1 h (excitação 485 nm e emissão, 530 nm). Os resultados foram expressos em intensidade de fluorescência pelo tempo (minutos) (Debbasch *et al.*, 2001).

4.2.4.2.4. Medida da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs):

A geração celular de EROs foi medida utilizando a sonda fluorescente 2',7'- diclorodihidrofluoresceína acetato (DCFH-DA). Quando aplicada a células intactas, a DCFH-DA passa pela membrana celular e é hidrolisada enzimaticamente por esterases, formando um produto não fluorescente DCFH. Na presença de ERO, a DCFH é oxidada gerando o composto DCF, cuja fluorescência pode ser quantificada em um espectrofluorímetro com 488 nm de excitação e 520 nm de emissão (Wang e Joseph, 1999). Para avaliar a cinética de formação de EROs induzida pela exposição ao Mx, as células foram primeiramente incubadas com DCFH-DA (10 μM) durante 30 min. Após 2 lavagens com PBS, as células foram expostas a 100 μM de Mx e a intensidade de fluorescência do composto DCF foi medida em

espectrofluorímetro durante 1 h (excitação 488 nm e emissão, 520 nm). Os resultados foram expressos em intensidade de fluorescência pelo tempo (minutos).

4.3. Análise estatística

Diferenças entre grupos foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias (com medidas repetidas quando indicado), seguidas pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. A correlação de Pearson foi utilizada para as associações entre a tarefa de realocação do objeto e a atividade do complexo I mitocondrial. No teste de realocação do objeto, o teste t de *Student* foi utilizado para avaliar se a % de tempo explorando o objeto deslocado diferia significativamente de um valor teórico de 50%. Os dados foram representados como média \pm E.P.M e diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Ensaios *in vivo*:

5.1.1. CAPÍTULO I:

Avaliação dos efeitos das oximas pralidoxima e K074 sobre a toxicidade aguda induzida pelo pesticida OF malation em córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos adultos:

Primeiramente, foram realizados estudos toxicológicos com as oximas pralidoxima e K074 a fim de encontrarmos o valor da dose letal 50 (DL₅₀) em camundongos Swiss. Com base na taxa de mortalidade dos animais 24 h após uma única administração de oximas, pela via i.m. ou i.c.v, encontramos valores de DL50 de aproximadamente 264 e 23,2 mg/kg (i.m.) e 1200 e 120 nmol/sítio (i.c.v.) para pralidoxima e K074, respectivamente. Em seguida, investigamos a capacidade dessas oximas (1/4 da DL₅₀, i.m, em combinação com atropina) em reverter a inibição da AChE induzida pelo malation em córtex pré-frontal, hipocampo e sangue de camundongos adultos, 24 h após a exposição ao pesticida (Figura 10). É importante ressaltar que os possíveis tratamentos antidotos foram administrados 6 h após uma única injeção de malation, na tentativa de mimetizar uma condição real onde os seres humanos (principalmente agricultores) demoram várias horas para chegarem aos serviços de saúde de emergência, após um episódio de intoxicação aguda.

A análise de variância (ANOVA) de uma via mostrou efeitos significativos dos tratamentos na atividade da AChE córtico-cerebral [F (7, 41) = 12,97, p < 0,001] (Figura 10A), hipocampal [F (7, 45) = 19,72, p < 0,001] (Figura 10B) e sanguínea [F (7, 42) = 8,86, p < 0,001] (Figura 10C). A exposição dos animais ao malation inibiu, de forma significativa, a atividade da AChE (p < 0,001) no córtex pré-frontal (aproximadamente 50%), hipocampo (aproximadamente 40%) e no sangue (aproximadamente 70%). A pralidoxima ou K074 (em combinação com atropina) foi incapaz de reverter a inibição da AChE induzida pelo malation em córtex pré-frontal e hipocampo, 18 h após a administração das oximas (Figura 10A e 10B). Apenas a pralidoxima (43%, p < 0,05) minimizou significativamente (embora parcialmente) a inibição da AChE sanguínea induzida pela exposição dos animais ao malation (Figura 10C).

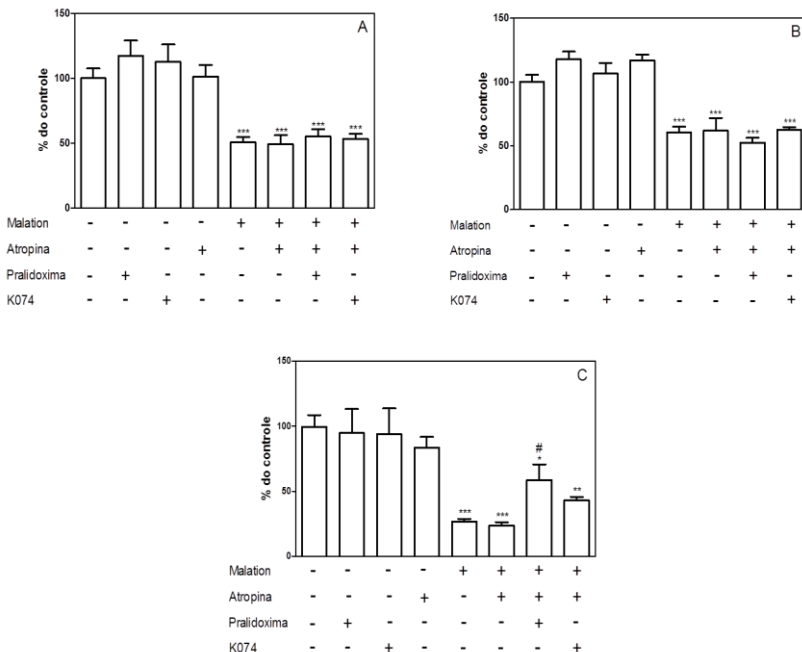


Figura 10. Efeito do tratamento com malation, atropina e oximas sobre a atividade da AChE no córtex pré-frontal (A), hipocampo (B) e sangue (C) de camundongos adultos. Os animais foram tratados com uma única injeção de malation (1,25 g/kg, s.c.) e, após 6 horas, as oximas foram administradas (1/4 da DL₅₀, i.m.). A atividade da AChE no córtex pré-frontal, hipocampo e sangue é expressa como % do controle (n = 4 - 6 animais por grupo). A atividade da AChE basal foi de $11,70 \pm 2,533$ nmol de substrato hidrolisado/min/mg de proteína no córtex, $5,374 \pm 1,176$ nmol de substrato hidrolisado/min/mg de proteína no hipocampo e $1,882 \pm 0,7071$ μ mol de substrato hidrolisado/min/mg de hemoglobina no sangue (média \pm E.P.M). *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 quando comparado ao grupo controle tratado com salina, #p < 0,05 quando comparado ao grupo tratado com malation + atropina, por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan.

Sabendo-se que o estresse oxidativo tem sido proposto como um importante mecanismo envolvido na neurotoxicidade induzida pelo malation, investigou-se os efeitos das exposições ao malation e oximas em parâmetros bioquímicos relacionados com as defesas antioxidantes (glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR) e catalase

(CAT)) e um marcador de peroxidação lipídica (TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) em córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos (Figuras 11 e 12). Estes ensaios foram realizados para investigar se a oximas (administradas por via intramuscular) poderiam evitar a ocorrência de mudanças induzidas pelo malation nos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo nestas duas estruturas encefálicas, correlacionando estes possíveis efeitos preventivos com os potenciais eventos de reativação.

A Figura 11 mostra os efeitos das exposições ao malation (s.c.) e oximas (i.m.) sobre as atividades das enzimas antioxidantes no córtex pré-frontal. O tratamento com malation, atropina, pralidoxima ou K074, por si só, não afetou a atividade das enzimas antioxidantes GPx, CAT e GR no córtex pré-frontal dos animais após as administrações (Figura 11).

No entanto, as atividades da GPx ($p < 0,001$), GR ($p < 0,001$) e CAT ($p < 0,001$) foram significativamente aumentadas quando a pralidoxima foi injetada 6 h após a exposição ao malation, quando comparado ao grupo controle. Além disso, a oxima K074 aumentou significativamente as atividades da GPx ($p < 0,05$) e GR ($p < 0,01$) no córtex pré-frontal (Figura 11A e 11B).

A Figura 12 mostra os efeitos das exposições ao malation e oximas sobre a atividade das enzimas antioxidantes no hipocampo de camundongos adultos. Semelhante ao córtex pré-frontal, o tratamento com atropina, pralidoxima e K074 não afetaram a atividade das enzimas GPx, GR e CAT, 24 h após o tratamento com malation. No entanto, ambas as oximas aumentaram significativamente a atividade da GR quando injetadas 6 h após a exposição ao malation [Figura 12A, $p < 0,01$ (pralidoxima) e $p < 0,001$ (K074)]. O tratamento com pralidoxima, mas não com K074, foi capaz de aumentar a atividade da GPx no hipocampo (Figura 12B, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle, bem como aumentar a atividade da CAT no hipocampo quando comparado ao grupo malation + atropina (Figura 12C, $p < 0,05$).

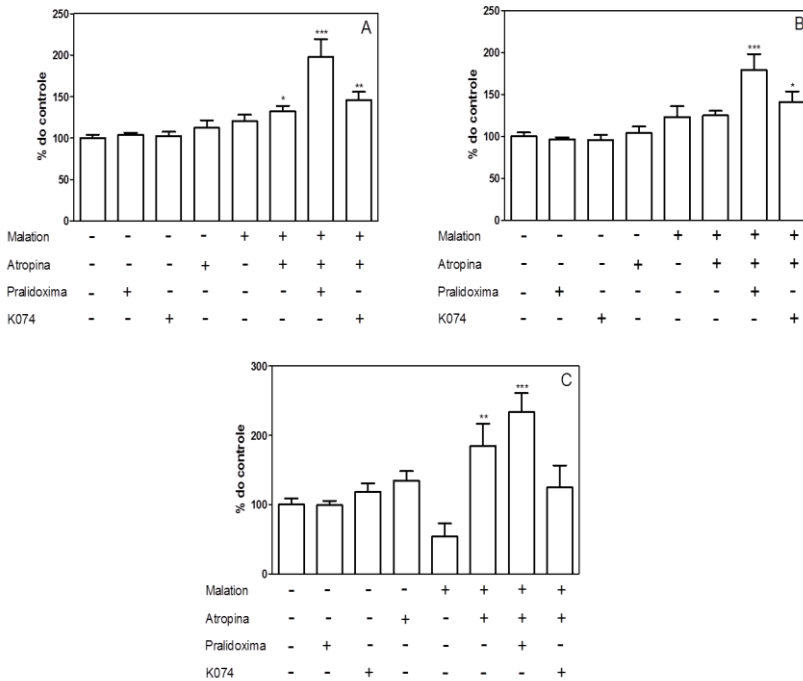


Figura 11. Efeito do tratamento com malathion, atropina e oximas sobre a atividade das enzimas glutathione redutase (A), glutathione peroxidase (B) e catalase (C) no córtex pré-frontal de camundongos adultos. Os animais foram tratados com uma única injeção de malathion (1,25 g/kg, s.c.) e após 6 horas as oximas foram administradas (1/4 da DL₅₀, i.m.). As atividades das enzimas glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR) e catalase estão expressas como % do controle (n = 6 animais por grupo). A atividade enzimática basal foi de 34,05 ± 3,615 nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína para a GR, 14,58 ± 0,7044 nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína para a GPx e 0,7846 ± 0,1613 μmol de substrato hidrolizado/min/mg de proteína para a catalase (média ± E.P.M). *p < 0,05, **p < 0,01 ***p < 0,001 quando comparado ao grupo controle tratado com salina, por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan.

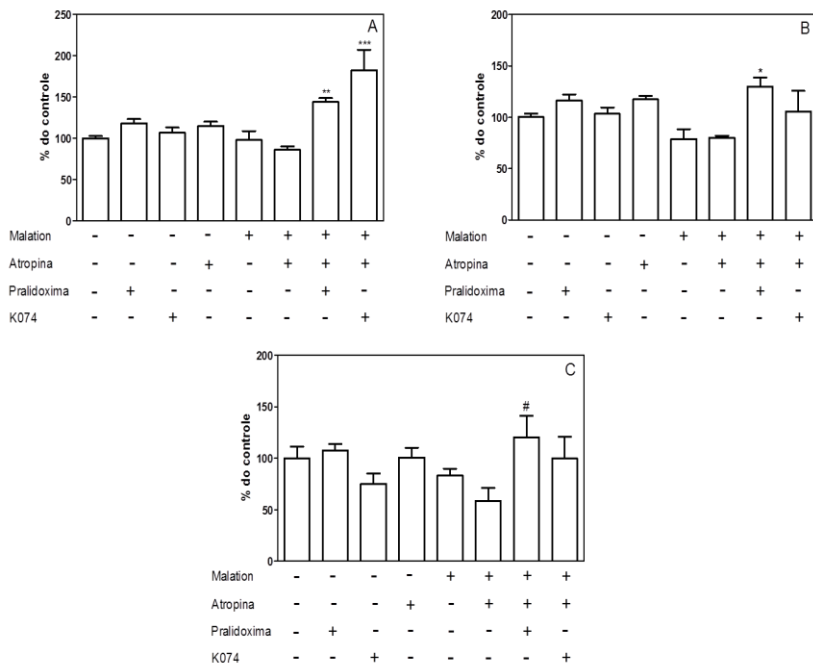


Figura 12. Efeito do tratamento com malation, atropina e oximas sobre a atividade das enzimas glutathione redutase (A), glutathione peroxidase (B) e catalase (C) no hipocampo de camundongos adultos. Os animais foram tratados com uma única injeção de malation (1,25 g/kg, s.c.) e após 6 horas as oximas foram administradas (1/4 da DL_{50} , i.m.). As atividades glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR) e catalase são expressas como % do controle (n = 6 animais por grupo). A atividade enzimática basal foi de $38,29 \pm 1,498$ nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína para a GR, $11,71 \pm 0,9502$ nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína para a GPx e $0,7620 \pm 0,1213$ μ mol de substrato hidrolizado/min/mg de proteína para a catalase (média \pm E.P.M). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle tratado com salina, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado com malation + atropina, por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan.

Embora os tratamentos com as oximas pralidoxima e K074 pela via i.m foram capazes de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes no córtex pré-frontal e hipocampo dos animais tratados com malation, o parâmetro bioquímico relacionado com a peroxidação lipídica (TBARS) não foi alterado nestas mesmas estruturas após os tratamentos (dados não mostrados).

Levando em consideração que a ausência de efeitos significativos de reativação da AChE hipocampal e cortical por parte de ambas as oximas (Figura 10) poderia ser devido ao transporte limitado dessas oximas através da barreira hematoencefálica (Bajgar *et al.*, 2007, Lorke *et al.*, 2007; Sakurada, *et al.*, 2003), realizou-se um experimento com base na administração dessas moléculas pela via i.c.v. Como esperado, a exposição dos animais ao malation inibiu de forma significativa ($p < 0,01$) a atividade da AChE no córtex pré-frontal e hipocampo dos camundongos (aproximadamente 50%), 24 h após uma única administração. As injeções i.c.v. de pralidoxima ou K074, realizadas 6 h após a única exposição ao malation, foram incapazes de reverter a inibição da AChE induzida pelo malation no córtex pré-frontal e hipocampo dos camundongos (Figuras 13A e 13B).

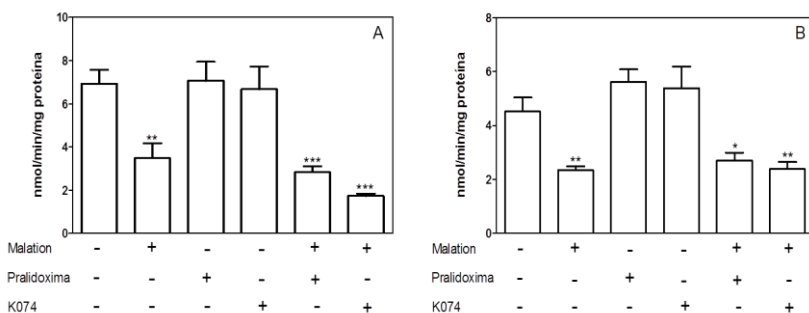


Figura 13. Efeito do tratamento com malation e oximas sobre a atividade da AChE no córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B) de camundongos adultos. Os animais foram tratados com uma única injeção de malation (1,25 g/kg, s.c.) e após 6 horas as oximas foram administradas (1/4 da DL_{50} , i.c.v.). A atividade da enzima no córtex pré-frontal e hipocampo é expressa como nmol de substrato hidrolisado/min/mg de proteína e representada como média \pm E.P.M (n = 5 animais por grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle tratado com salina, por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan.

5.1.2. CAPÍTULO II:

Avaliação dos efeitos tóxicos induzidos pela exposição repetida ao pesticida OF malation sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos em hipocampo de camundongos adultos:

A exposição aguda e prolongada a doses elevadas de pesticidas OF provoca sinais bem definidos de toxicidade colinérgica, principalmente devido à inibição da atividade da AChE e hiperestimulação dos receptores de acetilcolina no sistema nervoso central e no periférico (Bajgar, 2004; Bartling *et al.*, 2007). O presente estudo investigou os efeitos da exposição repetida a doses subtóxicas de malation, que não provocam sinais evidentes de toxicidade colinérgica. Para garantir que os camundongos receberam doses subtóxicas de malation, sinais de envenenamento por OF foram observados qualitativamente ao longo de um período de 15 dias.

A Figura 14 mostra que os tratamentos não afetaram o peso corporal dos animais durante o período experimental [$F(2, 26) = 1,49$; $p = 0,2430$] quando os dados foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, sugerindo a ausência de toxicidade sistêmica evidente. Além disso, não foram observados sinais evidentes de toxicidade colinérgica, tais como diarreia, lacrimejamento excessivo e dificuldade respiratória, durante o tratamento (dados não mostrados).

A Figura 15 mostra os efeitos da exposição ao malation (30 e 100 mg/kg) sobre a atividade da AChE hipocampal. Foram observados efeitos significativos após o período de tratamento de 15 dias [$F(2, 13) = 11,97$, $p < 0,001$], mas apenas para a dose de 100 mg/kg. De fato, a análise *post-hoc* não mostrou efeito significativo da exposição ao malation (30 mg/kg) sobre a atividade da AChE do hipocampo após 15 dias de tratamento, sugerindo que esta dose (30 mg/kg) não afeta a atividade desta enzima no hipocampo dos animais. A atividade da AChE hipocampal foi também medida em um grupo de animais expostos paralelamente ao malation de forma aguda (24 h), com as mesmas doses anteriores (30 e 100 mg/kg) (Figura 15) e não foram observados efeitos significativos dos tratamentos [$F(2, 11) = 0,6059$; $p = 0,5628$]. Estes resultados indicam que uma exposição aguda (24 h) ou repetida (15 dias) com 30 mg/kg de malation não inibem a atividade da AChE no hipocampo e não causam sinais evidentes de toxicidade colinérgica.

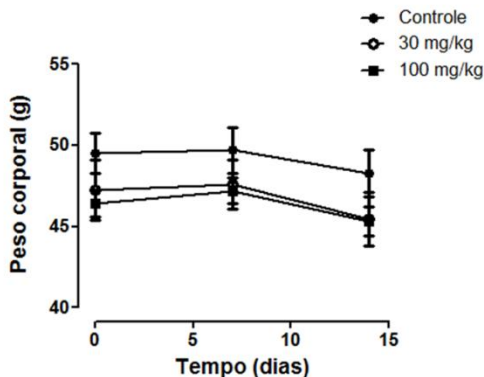


Figura 14. Efeito do tratamento repetido com malation sobre o peso corporal de camundongos adultos. Malation (30 e 100 mg/kg, s.c.), dissolvido em salina, foi administrado uma vez ao dia durante 15 dias. Os animais foram pesados três vezes durante o período de tratamento e os dados estão representados como média \pm E.P.M.

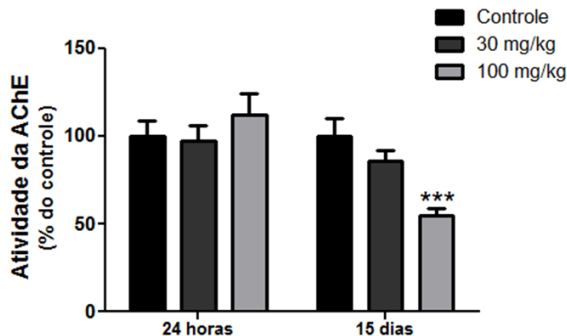


Figura 15. Efeito do tratamento repetido com malation sobre a atividade da AChE hipocampal. Malation (30 e 100 mg/kg, s.c.), dissolvido em salina, foi administrado uma vez ao dia durante 15 dias. A atividade da AChE é expressa como % do controle ($n = 6$ animais por grupo) e foi medida em dois intervalos de tempo durante o período de tratamento (24 h e 15 dias). Os dados estão representados como média \pm E.P.M. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan.

Os efeitos de exposições repetidas ao malation no teste de memória espacial estão ilustrados na Figura 16. Primeiramente, verificou-se se a exposição ao malation teve efeitos significativos sobre a atividade exploratória ou motora (efeitos que poderiam influenciar o desempenho dos animais nos testes relacionados à memória). Não foram observados efeitos significativos do tratamento no número de quadrantes cruzados [$F(2, 26) = 0,5752$; $p = 0,5696$]. (Figura 16A) e na atividade exploratória vertical (número de levantadas) [$F(2, 26) = 0,2999$; $p = 0,7433$] (Figura 16B), após um período de tratamento de 15 dias.

A fim de avaliar os efeitos de exposições repetidas ao malation sobre a memória espacial dos animais, o teste de realocação do objeto foi utilizado. A Figura 16D mostra que apenas os animais que não receberam malation (controle) investigaram o objeto deslocado por um tempo significativamente maior do que o objeto não deslocado, como indicado pelo aumento significativo no índice do tempo em comparação com 50% ($p < 0,01$). Por outro lado, os animais tratados com 30 ou 100 mg/kg de malation durante 15 dias não foram capazes de identificar a alteração espacial no campo aberto ($p > 0,05$). A Figura 16C nos mostra que, durante a sessão de treinamento, todos os grupos de animais apresentaram o mesmo interesse em explorar ambos os objetos, usando cerca de 50% do tempo explorando cada um deles.

É importante ressaltar que as mudanças observadas no teste de realocação do objeto não foram relacionadas com comprometimento motor. Além disso, a ocorrência de disfunção no teste de memória espacial em animais expostos a 30 mg/kg de malation, sem inibição significativa da atividade da AChE hipocampal, sugere a possibilidade de ocorrência de eventos não-colinérgicos relacionados com a modulação da performance cognitiva nestes animais.

Devido a atividade da AChE hipocampal não estar relacionada com as alterações de memória induzidas pela exposição ao malation (30 mg/kg), investigou-se alguns eventos moleculares não-colinérgicos possivelmente envolvidos com este evento. O efeito da exposição repetida e com doses subtóxicas de malation sobre os complexos da cadeia respiratória mitocondrial no hipocampo é mostrado na Figura 17. A ANOVA de uma via demonstrou efeitos significativos dos tratamentos sobre a atividade da NADH desidrogenase no hipocampo (complexo I) [$F(2, 15) = 32,29$, $p < 0,001$]. Observou-se que os animais tratados durante um período de 15 dias com 30 e 100 mg/kg de malation apresentaram inibição significativa da atividade da NADH

desidrogenase no hipocampo comparada com a do grupo controle tratado com veículo ($p < 0,001$) (Figura 17A). Por outro lado, nenhum efeito significativo foi observado nas atividades dos complexos II e IV hipocampais após a exposição a este pesticida (Figura 17B e 17C).

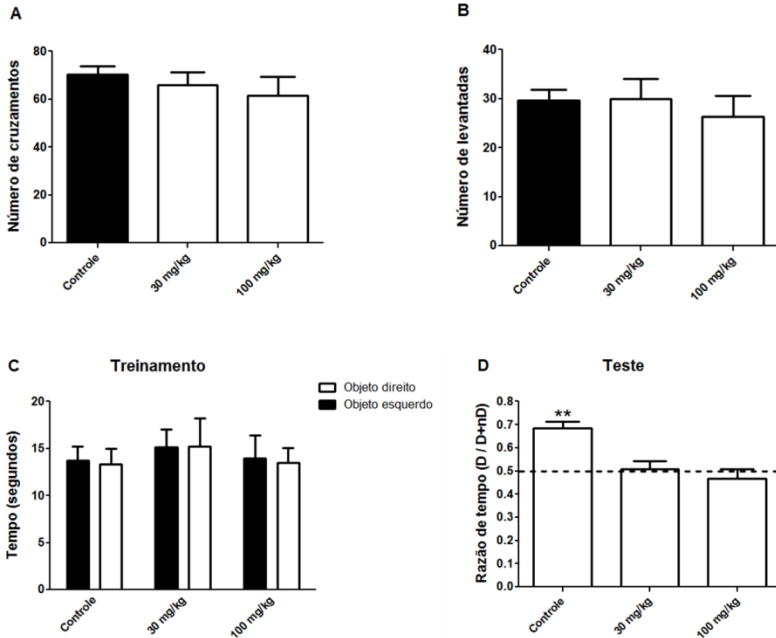


Figura 16. Tratamento repetido com malation induz dano cognitivo em camundongos no teste de realocação do objeto. Malation (30 e 100 mg/kg, s.c.), dissolvido em salina, foi administrado uma vez ao dia durante 15 dias. Animais controle receberam injeções de solução salina. As atividades locomotora (A) e exploratória (B), bem como o tempo gasto pelos animais explorando os objetos na sessão treinamento (C) e na sessão teste (D), foram avaliados 24 horas após a última administração de malation. Os resultados estão expressos como número total de cruzamentos (A), número total de levantadas (B), tempo gasto explorando o objeto da direita e o objeto da esquerda (C) e a razão entre o tempo gasto explorando o objeto deslocado pelo tempo total gasto explorando ambos os objetos (deslocado + não deslocado). Os dados estão representados como média \pm E.P.M ($n = 8-10$ animais por grupo). ** $p < 0,01$ em relação ao valor teórico de 50%, através do teste t de Student.

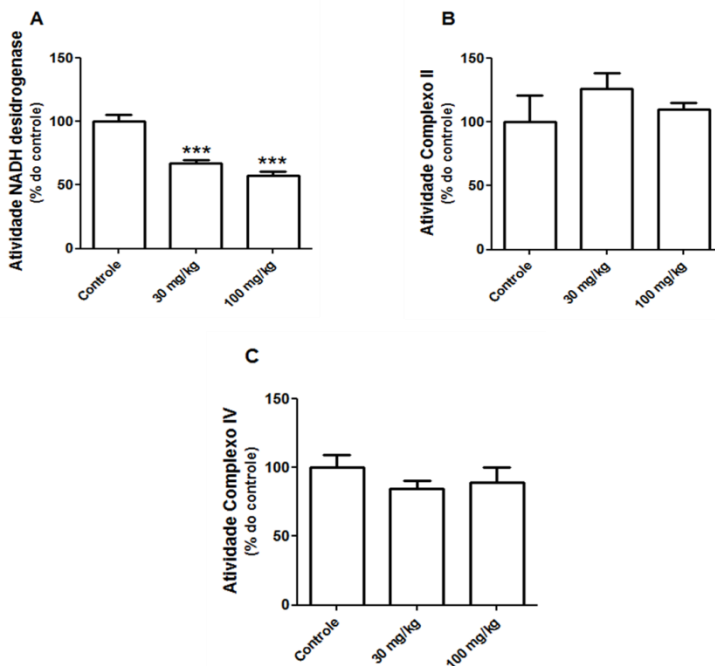


Figura 17. Tratamento repetido com baixas doses de malation diminui a atividade da NADH desidrogenase em hipocampo de camundongos adultos. Malation (30 e 100 mg/kg, s.c.), dissolvido em salina, foi administrado uma vez ao dia durante 15 dias. Animais controle receberam injeções de solução salina. As atividades NADH desidrogenase (A), do complexo II (B) e complexo III (C) da cadeia respiratória mitocondrial estão expressas como % do controle (n = 5 - 6 animais por grupo). Os dados estão representados como média \pm E.P.M. ***p < 0,001 quando comparado ao grupo controle tratado com salina, através da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan.

De maneira interessante, a atividade da NADH desidrogenase hipocampal foi positivamente correlacionada com o teste de realocação do objeto (coeficiente de Pearson = 0,6902, p = 0,0015) (Figura 18), sugerindo uma possível ligação entre o prejuízo na função da cadeia respiratória mitocondrial no hipocampo com o déficit no desempenho cognitivo (memória espacial de curto prazo)

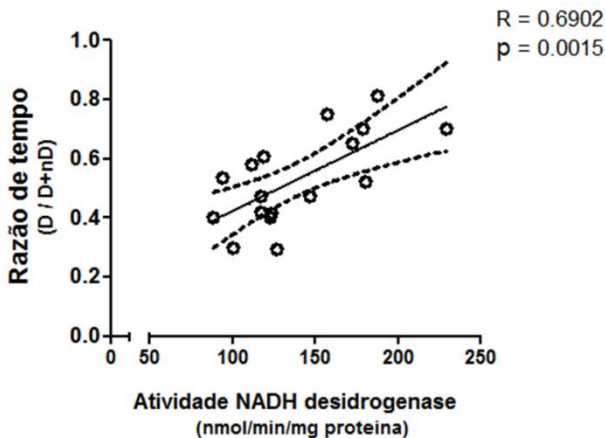


Figura 18. Correlação positiva entre a atividade da NADH desidrogenase hipocampal e o teste de realocação do objeto. A atividade da NADH desidrogenase foi plotada contra a razão de discriminação no teste de realocação do objeto. A relação entre as alterações na atividade enzimática e o declínio na memória espacial foi significativa ($r = 0.6902$, $p < 0.01$).

Os resultados apresentados apontam para um dano do metabolismo energético mitocondrial (sem inibição significativa da atividade da AChE) no hipocampo como uma causa provável para o déficit de memória espacial induzido após a exposição ao malation (30 mg/kg). A fim de investigar mais profundamente os mecanismos envolvidos no déficit de memória, investigou-se eventos que podem representar uma consequência da disfunção mitocondrial, tais como ocorrência de ativação glial, apoptose, disfunção da barreira hematoencefálica (BHE), prejuízo sináptico e alteração em marcadores de neurônios colinérgicos.

A Figura 19 mostra que a expressão da colina acetiltransferase (ChAT), um marcador de neurônios colinérgicos, não foi alterada no hipocampo após a exposição de 30 ou 100 mg/kg de malation [$F(2, 9) = 0,4422$, $p = 0,6559$]. Estes dados sugerem que o déficit de memória espacial induzido após a exposição ao malation não está relacionado com a perda de neurônios colinérgicos hipocampais (geralmente associados com mecanismos de aprendizado e memória).

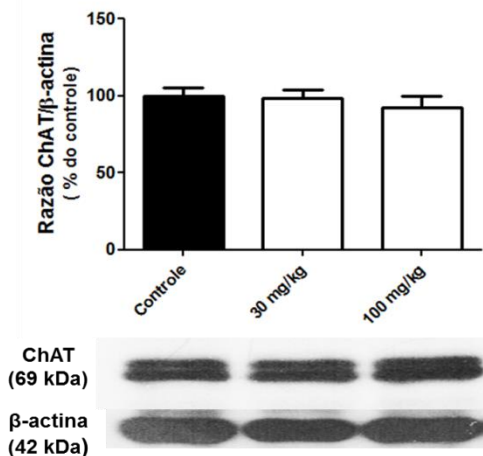


Figura 19. Tratamento repetido com malation não afeta a expressão da enzima marcadora de neurônios colinérgicos colina acetiltransferase (ChAT). Malation (30 e 100 mg/kg, s.c.), dissolvido em salina, foi administrado uma vez ao dia durante 15 dias. A figura representa a análise densitométrica da razão entre ChAT e β-actina e a imagem representativa dos níveis de expressão da ChAT no grupo controle e tratado com malation 30 e 100 mg/kg. Os dados estão expressos como % do controle (n = 4) e representados como média ± E.P.M.

Para explorar ainda mais os possíveis eventos envolvidos no déficit de memória espacial induzido pelo OF malation, foram avaliados os níveis da proteína pré-sináptica sinaptofisina no hipocampo, após o tratamento de 15 dias (24 horas após as sessões de comportamento) (Figura 20). Os tratamentos com malation, nas doses de 30 e 100 mg/kg, não afetaram a expressão da proteína marcadora de sinapses sinaptofisina no hipocampo [$F(2, 9) = 1,626, p = 0,2495$]. Estes resultados sugerem que o déficit de memória induzido pelo malation não está relacionado com alterações na homeostase sináptica no hipocampo.

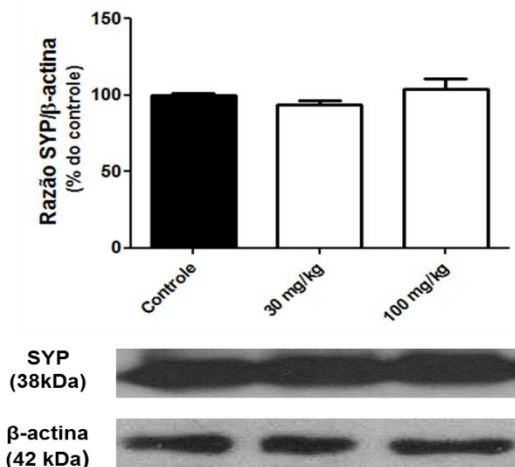


Figura 20. Tratamento repetido com malation não modifica a expressão da proteína sináptica sinaptofisina. Malation (30 e 100 mg/kg, s.c.), dissolvido em salina, foi administrado uma vez ao dia durante 15 dias. A figura representa a análise densitométrica da razão entre sinaptofisina e β -actina e imagem representativa dos níveis de expressão da sinaptofisina, no grupo controle e tratado com malation 30 e 100 mg/kg. Os dados são expressos como média \pm E.P.M. e foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan.

Por outro lado, a expressão de proteínas implicadas com a via apoptótica mitocondrial Bax [F (2, 6) = 12,69, $p < 0,05$] e Bak [F (2, 6) = 12,69, $p < 0,05$] foram afetadas significativamente após os tratamentos com malation durante 15 dias (Figura 21). As administrações de malation por um período de 15 dias causaram um aumento significativo da expressão da Bax [30 mg/kg, $p < 0,05$ e 100 mg/kg, $p < 0,01$ (Figura 21A)] e Bak [30 mg/kg, $p < 0,05$ e 100 mg/kg, $p < 0,01$ (Figura 21B)] nas doses de 30 e 100 mg/kg. Esses resultados sugerem que o dano do metabolismo energético mitocondrial induzido pelo malation, mesmo na dose que não afeta a atividade da AChE (30 mg/kg), poderia estar favorecendo a ativação da via apoptótica envolvendo a mitocôndria.

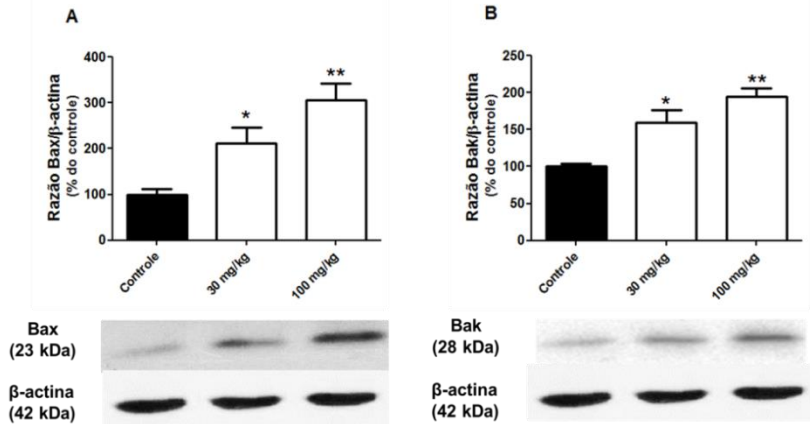


Figura 21. Tratamento repetido commalation aumenta a expressão de proteínas associadas com apoptose. Malation (30 e 100 mg/kg, s.c.), dissolvido em salina, foi administrado uma vez ao dia durante 15 dias. (A) Os níveis densitométricos da proteína Bax foram normalizados pela β -actina e imagem mostra os níveis de expressão dessas proteínas no grupo controle e malation 30 e 100 mg/kg (B) Os níveis densitométricos da proteína Bak foram normalizados pela β -actina e imagem mostra os níveis de expressão dessas proteínas no grupo controle e malation 30 e 100 mg/kg. Os dados estão expressos como % do controle (n = 3) e representados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo controle tratado com salina, através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan.

Além disso, uma significativa gliose (detectada pelo aumento da expressão da proteína glial fibrilar ácida - GFAP) foi observada no hipocampo dos animais expostos ao malation (Figura 22). ANOVA de uma via demonstrou efeitos significativos dos tratamentos com malation sobre os níveis de GFAP nas regiões hipocâmpais CA1 [F (2, 8) = 7,94, $p < 0,05$], CA3 [F (2, 8) = 12,45, $p < 0,01$] e giro denteado (GD) [F (2, 8) = 16,44, $p < 0,01$]. O tratamento com malation, nas doses de 30 e 100 mg/kg e por um período de 15 dias, aumentou significativamente a expressão de GFAP nas regiões CA1 [30 e 100 mg/kg, $p < 0,05$], CA3 [30 mg/kg, $p < 0,01$ e 100 mg/kg, $p = 0,055$] e GD [30 e 100 mg/kg, $p < 0,01$] quando comparada com a do grupo controle (Figura 22A e 22D). Por outro lado, não foram observadas mudanças nos níveis da proteína

aquaporina-4 (AQP4) (uma proteína de canal de água relacionada com disfunção da BHE e neuroinflamação) nas regiões CA1, CA3 e GD do hipocampo (Figura 22B e 22D).

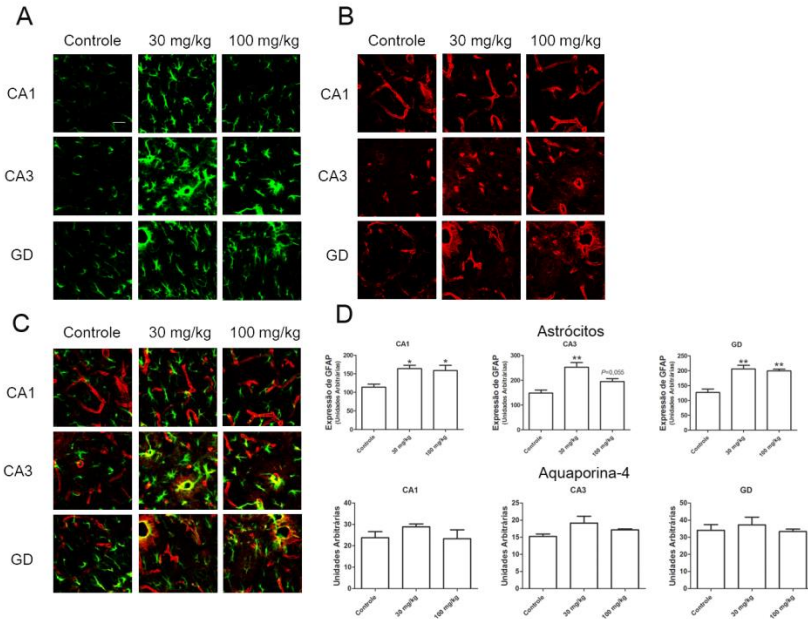


Figura 22. Micrografias demonstrando a imunofluorescência para a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e aquaporina (AQP4), das regiões hipocâmpais CA1, CA3 e giro denteado de camundongos adultos. Malation (30 e 100 mg/kg, s.c.), dissolvido em salina, foi administrado uma vez ao dia durante 15 dias. Os animais controle receberam injeções de solução salina. (A) Imagens da imunofluorescência para GFAP, (B) imagens da imunofluorescência para AQP4, (C) imagens sobrepostas para determinar a colocalização (merge) e (D) quantificação da fluorescência para GFAP e AQP4. Todas as imagens foram obtidas em microscópio confocal Olympus FV-1000. Barra de escala = 25 μ m. Os dados são expressos como média \pm E.P.M. *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle tratado com salina, através da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan.

5.2. CAPÍTULO III:

5.2.1 Ensaios *in vitro*:

A pergunta inicial que motivou este estudo foi investigar os possíveis eventos moleculares que precedem a morte celular induzida pelo malaoxon (Mx), metabólito tóxico do malation, em cultura primária de neurônios corticais. .

Primeiramente, determinou-se as concentrações/tempos específicos em que as células corticais ainda estavam viáveis após os tratamentos com Mx. As células corticais foram incubadas com diferentes concentrações de Mx (10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM e 100µM) e a viabilidade celular foi determinada nos tempos de 30 minutos, 24 e 48h ou 6DIV, através do método do MTT. A Figura 23 mostra a porcentagem de células viáveis após 6 dias de tratamento com concentrações crescentes de Mx. A ANOVA de uma via mostra um efeito significativo do tratamento com Mx na viabilidade das células corticais [$F(5, 12) = 32, 44, p < 0,001$]. O tratamento das células corticais com Mx do DIV 1 ao DIV 6 causou uma diminuição significativa da viabilidade celular em relação ao controle (ausência de Mx) nas concentrações de 10 µM ($p < 0,01$) e 100 µM ($p < 0,001$) (Figura 23). Por outro lado, não houve diminuição significativa da viabilidade celular nos tempos de 30 minutos, 24 e 48 horas (dados não mostrados). A concentração de 100 µM foi selecionada para os experimentos posteriores.

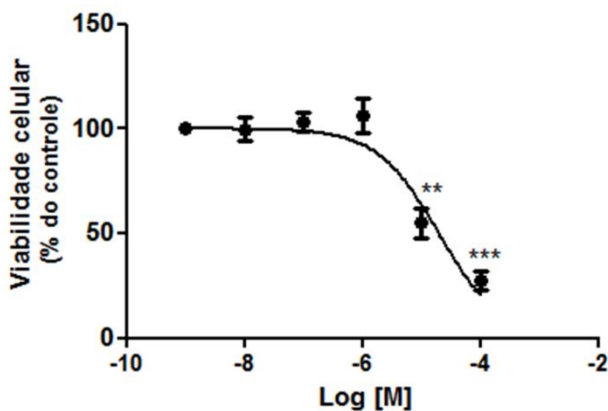


Figura 23: Efeito do tratamento com malaoxon (Mx) sobre a viabilidade celular em cultura de células primárias de neurônios corticais. As células foram incubadas com concentrações crescentes de Mx por 6 DIV (37°C, 5% CO₂) e em seguida avaliadas pelo ensaio do MTT. Os dados estão representados como média \pm EPM da porcentagem de células viáveis em relação ao controle (ausência de Mx), de 3-4 experimentos independentes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle tratado com PBS através da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan.

A Figura 24 mostra o efeito do tratamento com 100 μ M de Mx sobre a atividade da AChE em cultura de células corticais, em diferentes intervalos de tempo que antecedem a morte neuronal, ocorrida no DIV 6. Através da ANOVA de duas vias, observou-se um efeito significativo dos tratamentos com Mx sobre a atividade da AChE [$F(1, 33) = 873, p < 0,001$]. O tratamento com 100 μ M de Mx diminuiu significativamente a atividade da AChE já nos primeiros 30 minutos de exposição e essa atividade permaneceu inibida até o último dia de tratamento (dia 6) [0,5, 24 e 48 h e 6 DIV ($p < 0,001$)].

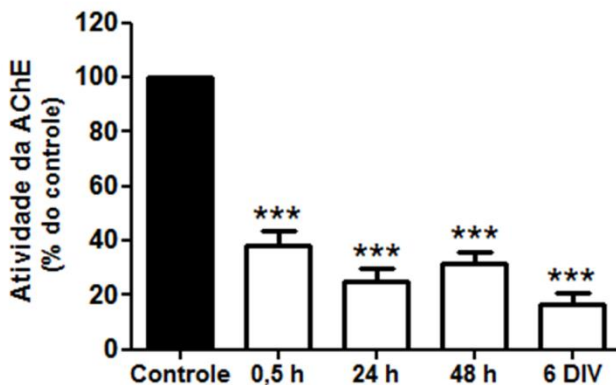


Figura 24: Efeito do tratamento com malaoxon (Mx) sobre a atividade da AChE em cultura de células primárias de neurônios corticais. As células foram incubadas com Mx (37°C, 5% CO₂) e em seguida a atividade da AChE foi avaliada nos tempos de 0,5 h, 24 h, 48 h e 6 DIV. A atividade da enzima é expressa como % do controle (ausência de Mx) de 3-4 experimentos independentes. *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle tratado com PBS, através da análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan.

Posteriormente, avaliou-se os efeitos do Mx sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e sobre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) imediatamente após a exposição das células ao OF, assim como no transcorrer da primeira hora após os tratamentos.

A Figura 25 mostra o efeito do tratamento com 100 μ M de Mx sobre o $\Delta\Psi_m$ das células neuronais corticais. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do tratamento [F (1, 24) = 39,54, $p < 0,01$], do tempo [F (6, 24) = 9,22, $p < 0,001$] e uma interação significativa tratamento x tempo [F (6, 24) = 9,03, $p < 0,001$]. A exposição das células ao Mx pelo período de 1 h diminuiu significativamente o $\Delta\Psi_m$ logo no primeiro minuto de exposição ($p < 0,001$), como indicado pelo aumento da fluorescência quando comparada com o grupo controle (ausência de Mx). No entanto, com o passar do tempo, as células foram restabelecendo o seu potencial de membrana normal (a partir de 20 min de exposição ao Mx).

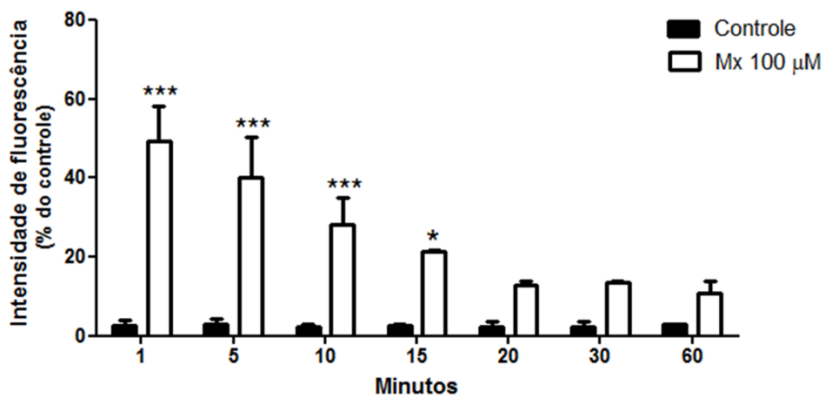


Figura 25: Efeito do tratamento com malaoxon (Mx) sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em cultura de células primárias de neurônios corticais. As células foram incubadas com rodamina (5 µg/mL) ou veículo (PBS) por 30 min e em seguida com Mx 100 µM por 1 hora. O gráfico representa a curva temporal das mudanças induzidas pelo Mx no potencial de membrana mitocondrial pelo período de 1 h. A intensidade de fluorescência foi avaliada e os dados estão expressos como % do controle positivo (100%, células tratadas com antimicina A) e representados como média \pm EPM de 3-4 experimentos independentes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle positivo (antimicina A), através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, com medidas repetidas, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan.

A Figura 26 demonstra a avaliação da cinética de produção de EROs nas células neuronais corticais induzidas por 100 µM de Mx e avaliadas através da oxidação da sonda fluorescente DCFH-DA. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do tratamento [F (1, 28) = 9,3; $p < 0,05$], do tempo [F (7, 28) = 379,5; $p < 0,001$] e uma interação significativa tratamento x tempo [F (7, 28) = 19,05, $p < 0,001$]. A exposição das células ao Mx pelo período de 1 h aumentou significativamente a produção de EROs a partir de 15 min de exposição ($p < 0,05$), atingindo valores máximos (máxima intensidade de fluorescência) em 60 minutos de exposição ($p < 0,001$).

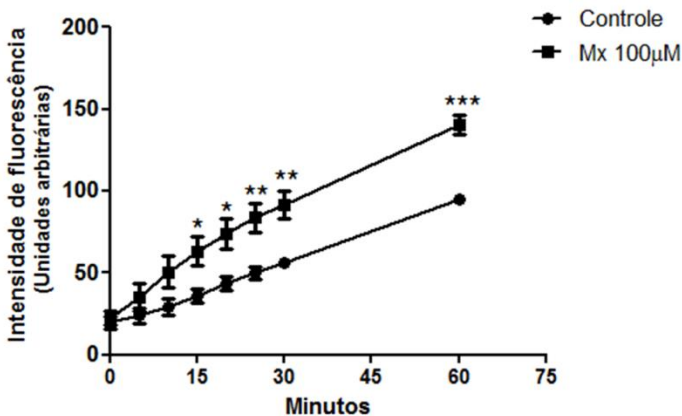


Figura 26: Efeito do tratamento com malaoxon (Mx) sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em cultura de células primárias de neurônios corticais. As células foram incubadas com DCFH-DA (10 µM) por 30 min e em seguida com Mx 100 µM por 1 hora. O gráfico representa a curva temporal da geração de EROs induzidas pelo Mx pelo período de 1 h. Os dados estão expressos como intensidade de fluorescência e representados como média ± EPM de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle tratado com PBS, através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, com medidas repetidas, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan.

Estes resultados sugerem que os eventos moleculares envolvidos na neurotoxicidade induzida pelo Mx são observados imediatamente após a exposição das células corticais ao pesticida. O aumento da produção de EROs e a diminuição significativa do $\Delta\Psi_m$ após o tratamento das células com Mx nos levam a especular que a neurotoxicidade induzida por este pesticida em cultura de células neuronais corticais deve estar relacionada, pelo menos em parte, a eventos oxidativos. Dessa forma, o próximo passo do estudo foi investigar se o pré-tratamento das células com um conhecido antioxidante (ácido ascórbico, AA) poderia ter efeitos neuroprotetores.

A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo do tratamento com Mx [$F(1, 17) = 19,58$, $p < 0,001$] e uma interação significativa entre os tratamentos [$F(1, 17) = 14,20$, $p < 0,01$] sobre a viabilidade das células corticais (Figura 27). A morte celular induzida pela exposição a 100 µM de Mx a partir do DIV1 ao DIV6 foi

significativamente (embora parcialmente) prevenida pelo pré-tratamento das células com 200 μ M de AA ($p < 0,001$).

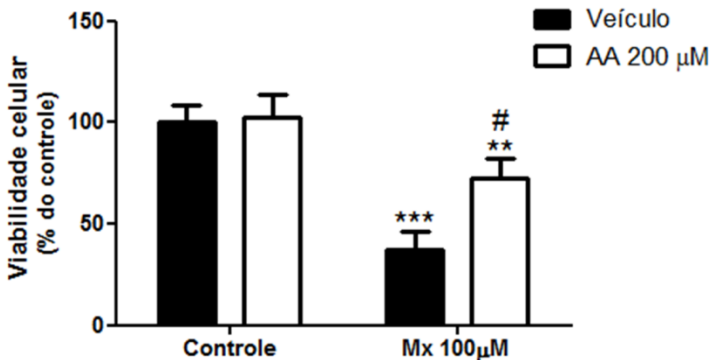


Figura 27: Efeito do antioxidante ácido ascórbico (AA) sobre a diminuição da viabilidade celular induzida pelo malaixon (Mx) em cultura de células primárias de neurônios corticais. As células foram pré-incubadas com AA (200 μ M) por 30 min e em seguida foram tratadas com Mx (100 μ M). A viabilidade celular foi avaliada após 6 DIV de incubação com os compostos. Os dados estão representados como média \pm EPM da porcentagem de células viáveis em relação ao controle (ausência de Mx e AA), de 3 experimentos independentes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle tratado com PBS e # $p < 0,001$ quando comparado às células tratadas com Mx, através da análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan.

O próximo objetivo do estudo foi avaliar se a morte neuronal induzida pelo Mx poderia estar relacionada com a inibição da atividade da AChE nas células corticais. Para isso, utilizamos como ferramenta a oxima mais utilizada na clínica, a Px, em uma tentativa de reverter a inibição da AChE nas células e assim estudar a potencial neuroproteção. A atividade da AChE após a exposição das células aos compostos (Mx e/ou Px) foi avaliada nos mesmos intervalos de tempo utilizados anteriormente (0,5, 24 e 48 h e 6 DIV), uma vez que o Mx já foi capaz de inibir a atividade desta enzima a partir de 30 min (Figura 28). Através da análise de variância de duas vias (ANOVA), observou-se um efeito significativo do tratamento com Mx sobre a atividade da AChE [F (3,

40) = 240; $p < 0,001$]. A Figura 23 mostra que a inibição significativa da atividade da AChE causada pelo Mx ($p < 0,001$) não foi revertida pelo tratamento concomitante das células com 600 μM de Px ($p < 0,001$), em nenhum dos tempos avaliados (0,5, 24 e 48 h e 6 DIV).

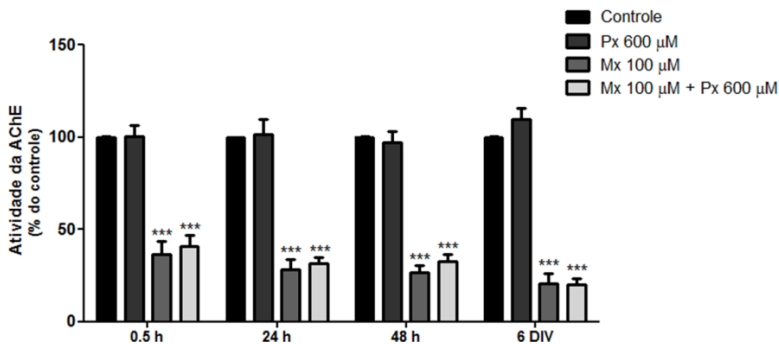


Figura 28: Efeito da pralidoxima (Px) sobre a diminuição da atividade da AChE induzida pelo malaoxon (Mx) em cultura de células primárias de neurônios corticais. As células foram incubadas concomitantemente com Mx (100 μM) e Px (600 μM) (37°C, 5% CO_2) e em seguida a atividade da AChE foi avaliada nos tempos de 0,5 h, 24 h, 48 h e 6 DIV. A atividade da enzima é expressa como % do controle (ausência de Mx e Px) de 3 experimentos independentes. *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle tratado com PBS, através da análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan.

Apesar de as oximas serem compostos geralmente usados para reverter a inibição da AChE, estudos demonstraram que oximas com capacidade antioxidante poderiam ser uma boa ferramenta para o tratamento de intoxicações por OF (Puntel *et al.*, 2008, 2009). Dessa forma, considerando que neste estudo a neurotoxicidade induzida pelo Mx pode estar relacionada a eventos oxidativos, avaliou-se se o tratamento das células corticais com Px poderia estar protegendo da morte induzida pelo Mx, por algum mecanismo independente do seu efeito sobre a AChE.

A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo do tratamento com Mx sobre a viabilidade das células neuronais corticais [$F(1, 9) = 83,67$; $p < 0,001$] quando avaliada no DIV 6 da exposição. No entanto, o tratamento concomitante das células corticais com Px (do

DIV 1 ao DIV 6) não foi capaz de evitar a morte celular induzida pelo Mx (Figura 29).

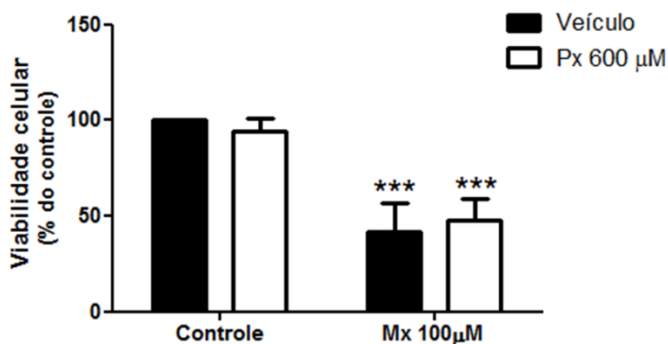


Figura 29: Efeito da pralidoxima (Px) sobre a diminuição da viabilidade celular induzida pelo malaixon (Mx) em cultura de células primárias de neurônios corticais. As células foram incubadas concomitantemente com Mx (100 µM) e Px (600 µM) (37°C, 5% CO₂) e a viabilidade celular foi avaliada após 6 DIV de incubação com os compostos. Os dados estão representados como média ± EPM da porcentagem de células viáveis em relação ao controle (ausência de Mx e Px), de 3-4 experimentos independentes. ***p < 0,001 quando comparado ao controle tratado com PBS através da análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan

6. DISCUSSÃO

O aumento da taxa de uso de pesticidas nas últimas décadas, principalmente nos países em desenvolvimento, tem gerado uma preocupação crescente em relação ao uso generalizado desses compostos e seus possíveis impactos sobre a saúde pública. Os pesticidas diferem de outras substâncias químicas por serem produtos tóxicos distribuídos deliberadamente no meio ambiente com o objetivo de combater pragas e ervas daninhas. Nesse sentido, o pesticida ideal deveria agir especificamente no organismo indesejável e ser inócuo para os organismos não alvo. No entanto, a maior parte dos produtos químicos utilizados como pesticidas não são completamente seletivos e os seus usos podem representar um risco para a saúde humana (Maroni, 2000). Neste cenário, encontram-se os pesticidas OF, compostos comumente utilizados em todo o mundo e os mais frequentemente associados com intoxicações em humanos (Rohlman *et al.*, 2011). Os pesticidas OF têm o potencial de produzir diversas formas de toxicidade, em animais e humanos, dependendo basicamente da dose, frequência de exposição e tipo de OF, sendo o tipo mais comum de intoxicação a intoxicação aguda (Ray e Richards, 2001). Os sintomas da intoxicação aguda a altas doses de OF ocorrem principalmente como resultado da inibição da enzima AChE, que leva a um aumento da concentração de ACh nas sinapses do SNC e SNP e, conseqüentemente, à hiperestimulação dos receptores colinérgicos (muscarínicos e nicotínicos). Os sintomas clássicos incluem fasciculações musculares, paralisia dos músculos respiratórios, convulsões, diarreia, miose, salivação e lacrimejamento (Kwong, 2002; Bajgar, 2004; Bartling *et al.*, 2007); alguns destes sintomas podem levar à morte se o indivíduo exposto não for tratado rapidamente. Neste sentido, o tratamento da intoxicação aguda com atropina, um antagonista dos receptores colinérgicos muscarínicos, já é uma prática bem estabelecida. No entanto, a eficácia do tratamento com moléculas (oximas) capazes de romper a ligação entre a AChE e o OF não é totalmente satisfatória (Bartosova *et al.*, 2006; Kassa *et al.*, 2007).

Além da intoxicação aguda, existe outro tipo de intoxicação importante causada pelos pesticidas OF: a intoxicação crônica (ou prolongada), geralmente envolvendo exposições com doses baixas ou moderadas de pesticida. Quanto a este tipo de intoxicação, é importante ressaltar que a neurotoxicidade associada à intoxicação crônica pode estar ligada a sintomas neurocomportamentais que incluem ansiedade, depressão, sintomas psicóticos, déficits de aprendizagem, atenção, processamento da informação e da memória de curto prazo, que podem

ocorrer sem sintomas colinérgicos visíveis e parecem não ser dependentes da inibição da AChE (Stephens *et al.*, 1995; Amr *et al.*, 1997; Singh e Sharma, 2000; Salvi *et al.*, 2003). De fato, tem sido proposto que a exposição crônica ou prolongada aos pesticidas OF pode estar relacionada com alterações na função de uma série de proteínas além da AChE (alvos não colinérgicos) (Terry, 2012). Ainda, estas alterações podem envolver eventos como disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e inflamação (Carlson e Ehrich, 1999; Lotti e Moretto, 2005; Costa, 2004; Banks e Lein, 2012; Hargreaves, 2012).

Dentre os OF mais utilizados no mundo destaca-se o malation (Donaldson *et al.*, 2002). O malation tem sido apontado como um dos principais contaminantes em casos de intoxicações por OF em Santa Catarina, de acordo com dados obtidos do Centro de Informações Toxicológicas (CIT) localizado no Hospital Universitário, Florianópolis, SC. No entanto, apesar do grande número de intoxicações causadas pelo malation, o tratamento antídoto contra o envenenamento por OF não é suficientemente efetivo (Sudakin *et al.*, 2000). De fato, existem evidências bioquímicas e clínicas de que a pralidoxima, oxima amplamente utilizada na clínica em casos de intoxicações por compostos OF, não reativa eficientemente a AChE humana inibida pela exposição ao malation (Ganendran e Balabaskaran, 1976; Eddleston *et al.*, 2002). Neste sentido, existe uma clara demanda por reativadores da AChE mais efetivos em comparação com aqueles atualmente disponíveis.

De fundamental importância, a falta de penetração das oximas através da BHE é uma importante limitação para as moléculas atualmente utilizadas como antídotos contra o envenenamento por OF, incluindo a pralidoxima (Kalisiak *et al.*, 2011). Neste contexto, apesar de a pralidoxima estar comercialmente disponível e ser considerada padrão-ouro dos reativadores da AChE, ela parece ser um pobre reativador da AChE inibida por OF (Kuca *et al.*, 2010) e, particularmente, pelo malation (Ganendran e Balabaskaran, 1976). Dessa forma, de um ponto de vista clínico, existe uma clara demanda por moléculas mais eficazes para reativar a AChE inibida pelo malation.

Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que oximas da série K (desenvolvidas pelo Dr. Kamil Kuca, do Departamento de Toxicologia da Faculdade de Ciências da Saúde Militar, Hradec Kralove, República Tcheca), nomeadamente K027, K048, K074 e K075, são potentes reativadores da AChE inibida por malation/malaoxon sob condições *in vivo* e *in vitro* (da Silva *et al.*, 2008; Dos Santos *et al.*,

2010). Nestes estudos anteriores, demonstramos que a oxima K074 apresentou um excelente efeito reativador da AChE de cérebro de camundongos inibida pelo malaoxon, que foi significativamente maior quando comparada com a pralidoxima, quando ambas as oximas encontravam-se presentes em concentrações equimolares (Santos *et al.*, 2010). Baseado neste estudo, nosso próximo passo foi testar se a oxima K074, que apresentou a melhor eficácia de reativação *in vitro*, também apresentaria uma boa potência de reativação da AChE inibida pelo malation *in vivo* quando comparada com a oxima utilizada na clínica, pralidoxima. No entanto, para testarmos a eficácia da K074 *in vivo*, não foi possível utilizar doses equimolares das oximas devido a sua diferença de toxicidade. Com base em dados da literatura comparando a toxicidade da pralidoxima com a de outras oximas que já foram ou ainda são utilizadas na clínica (obidoxima), e também em estudos de toxicidade desenvolvidos em nosso laboratório, observamos que o grau de toxicidade dessas oximas em roedores é HI-6 < pralidoxima < obidoxima < trimedoxima (Calic *et al.*, 2006; Musilek *et al.*, 2007). Já em relação às oximas da série K, o grau de toxicidade é K027 < K048 < K075 < K074 (Musilek *et al.*, 2007). Levando isso em consideração, para testar a eficácia reativadora da K074 e comparar com aquela da pralidoxima, após um episódio de envenenamento agudo por malation, nós utilizamos 1/4 DL₅₀ para ambas as oximas. Os resultados mostram que a pralidoxima e a K074 (administradas por via intramuscular) não foram capazes de reativar a AChE inibida pelo malation no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos, pelo menos dentro das primeiras 24 h após a exposição ao malation. Ao contrário, a pralidoxima, mas não a K074, reverteu significativamente (embora parcialmente) a inibição da AChE induzida pelo malation no sangue dos animais. Estes resultados estão de acordo com estudos recentes em cobaias, mostrando que oximas (por exemplo, pralidoxima) exibiram eficácias de reativação diferentes da AChE inibida por agentes nervosos em vários tecidos periféricos e no sangue, mas não afetaram a atividade da AChE em diferentes regiões cerebrais (Shih *et al.*, 2009, 2010). Estes dados são particularmente importantes levando em consideração a utilização da AChE sanguínea como um parâmetro importante para prever o estado de inibição da enzima sináptica (Eyer *et al.*, 2007). Nossos dados sugerem que a atividade da AChE periférica e central não estão necessariamente correlacionadas após exposições à compostos OF e/ou oximas, e essa informação deveria ser levada em consideração na conduta a ser tomada em casos de pessoas expostas a OF.

A eficácia de reativação de uma oxima é atribuída à taxa de deslocamento nucleofílico do OF, a qual vai depender da estrutura química do OF e da oxima, e da taxa de desalquilação pós-inibitória do complexo enzima-OF, conhecida como envelhecimento (Kovarík *et al.*, 2004, Worek *et al.*, 2002). Além disso, a persistência do OF no corpo e o tempo decorrido entre a exposição e o tratamento com a oxima podem limitar a efetividade da oxima como um antídoto contra o envenenamento por OF (Sudakin *et al.*, 2000). Os nossos resultados demonstraram que os efeitos de reativação da pralidoxima foram relativamente baixos quando comparados com os seus efeitos sobre a AChE inibida pelo malaoxon *in vitro* (dos Santos *et al.*, 2010). De fato, nossos resultados não mostraram efeitos significativos de ambas as oximas (K074 e pralidoxima) em reativar a AChE cortical e hipocampal após a exposição ao malation. Além disso, um modesto (embora significativo) efeito de reativação da AChE sanguínea foi observado após o tratamento com pralidoxima. Estes eventos deveriam estar relacionados, pelo menos em parte, com a taxa de desalquilação pós-inibitória (envelhecimento), que pode ser uma consequência do protocolo de exposição. Na verdade, a administração das oximas 6 horas após o envenenamento com malation provavelmente permitiu a ocorrência de níveis elevados de desalquilação do complexo enzima-inibidor, diminuindo a probabilidade de reativação pelas oximas e sugerindo que a taxa de desalquilação da AChE inibida pelo malation é alta. De um ponto de vista clínico, é importante ressaltar que o nosso protocolo de exposição com as oximas foi realizado na tentativa de mimetizar condições reais, onde as pessoas (principalmente trabalhadores rurais) não recebem atendimento imediato após um episódio de envenenamento agudo.

Parâmetros cinéticos certamente podem afetar a eficácia inibitória dos compostos OF, bem como os efeitos de reativação das oximas. Neste sentido, a alta biodisponibilidade dos compostos OF e das oximas e as suas distribuições através da BHE são fatores cruciais para a reativação da enzima cerebral. O transporte da pralidoxima através da BHE é mínimo, assim como o de outras oximas hidrofílicas positivamente carregadas, como obidoxima, K027 e K048 (Bajgar *et al.*, 2007; Lorke *et al.*, 2007; Sakurada, *et al.*, 2003). Sakurada, *et al.* (2003) relataram que a média de penetração da pralidoxima através da BHE é de aproximadamente 10%. Além disso, foi sugerido que a razão entre a concentração de pralidoxima no fluido extracelular cerebral e a concentração sanguínea seria menor após a intoxicação por OF devido

ao fato de a pralidoxima ser utilizada para reativar a AChE sanguínea antes da penetração através da BHE (Sakurada *et al.*, 2003). É importante enfatizar aqui que a capacidade da oxima K074 em atravessar a BHE não está bem descrita na literatura. No entanto, neste estudo, a ausência de efeitos reativadores da AChE cerebral sugerem que a K074 tem um acesso limitado ao SNC.

Sabendo-se da possibilidade de estas oximas não atravessarem efetivamente a BHE, um protocolo de administrações i.c.v. foi realizado. Entretanto, mesmo após as injeções i.c.v, a pralidoxima e a K074 foram incapazes de reverter a inibição da AChE induzida pelo malation em córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos. Estes resultados indicam que ambas as oximas, as quais foram injetadas $\frac{1}{4}DL_{50}$, não foram capazes de desestabilizar o complexo formado entre a AChE cortical e hipocampal com o malaaxon, ao menos quando administradas 6 horas após a exposição ao malation. Os dados acima sugerem que a taxa de desalquilação pós-inibitória da AChE inibida por OF representa um evento crucial no SNC e que deve ser levada em consideração quando se utiliza oximas para tratar as intoxicações por malation. De acordo com essa idéia, nossos dados mostraram que a pralidoxima, injetada pela via i.m, foi capaz de reverter significativamente a AChE inibida pelo malation no sangue; no entanto, esta mesma oxima não foi capaz de reverter a inibição da AChE cortical e hipocampal quando injetada pela via i.c.v. Estes resultados sugerem que a taxa de envelhecimento da AChE parece depender da fonte tecidual (sangue x SNC). Embora os dados na literatura sobre o tema são escassos, Sket e Brzin (1986) investigaram a taxa de envelhecimento da AChE cerebral inibida pelo agente nervoso soman e mostraram uma reativação estatisticamente significativa da AChE cerebral inibida pelo soman somente quando a oxima (injetada via i.c.v.) foi administrada 20 min após a exposição ao soman. Dessa forma, é possível que um efeito reativador eficaz com pralidoxima e K074 poderia ter sido alcançado em nosso modelo de intoxicação com malation, se estas oximas fossem administradas imediatamente após a exposição ao OF.

Algumas evidências apontam para um papel importante do estresse oxidativo na toxicidade induzida pelos agentes OF. Estudos recentes têm mostrado que a exposição ao malation é capaz de induzir estresse oxidativo em diferentes modelos animais através do aumento dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) no cérebro de roedores (Brocardo *et al.*, 2007; da Silva *et al.*, 2008), alteração da atividade de enzimas antioxidantes como GPx, GR, SOD e CAT (Fortunato *et al.*,

2006), bem como dano no DNA de estruturas cerebrais após a exposição curta (Brocardo *et al.*, 2007) ou crônica (Reus *et al.*, 2008) com malation. No entanto, os mecanismos exatos envolvidos com estes fenômenos não são totalmente compreendidos. Em nossos experimentos, não foram observadas alterações nas defesas antioxidantes enzimáticas (GR, GPx e CAT) e nos níveis de TBARS no córtex pré-frontal e hipocampo 24 h após a exposição ao malation. Estes resultados estão de acordo com outros estudos, tais como o relatado por Acker *et al* (2009), que demonstraram que a exposição de ratos ao malation não alterou parâmetros de estresse oxidativo, tais como os níveis de TBARS e defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas.

Apesar de as oximas serem compostos geralmente utilizados para reverter a inibição da AChE causada por OF (Worek *et al.*, 2004), alguns estudos propuseram que reativadores das colinesterases com propriedades antioxidantes poderiam ser uma ferramenta útil para o tratamento da intoxicação com OF (Puntel *et al.*, 2008, 2009). Em um estudo anterior do nosso grupo, nós demonstramos que as oximas da série K (K027 e K048) foram capazes de reduzir a peroxidação lipídica no córtex pré-frontal de camundongos (da Silva *et al.*, 2008). Além disso, algumas oximas foram capazes de diminuir a produção de TBARS induzida por malonato e ferro em homogenato de cérebro de camundongos (Puntel *et al.*, 2008) e também exibiram um papel protetor durante a oxidação da LDL induzida por Cu^{2+} *in vitro* (de Lima Portella *et al.*, 2008). Curiosamente, em nosso estudo, os tratamentos com pralidoxima e K074, por si só, não foram capazes de aumentar a atividade endógena das enzimas antioxidantes no córtex pré-frontal e hipocampo dos animais, 18 horas após a sua administração. No entanto, a atividade dessas enzimas foi significativamente aumentada quando as oximas foram administradas após o envenenamento com malation. De um ponto de vista molecular, é difícil explicar claramente estes resultados apenas com base nos nossos dados. Além disso, estudos sobre o tema são escassos na literatura. Dessa forma, estudos adicionais precisariam ser realizados para tentar elucidar esse fenômeno.

Além dos efeitos clássicos da intoxicação aguda por OF (síndrome colinérgica), resultado da inibição da AChE e consequente hiperestimulação dos receptores colinérgicos (Kwong, 2002; Bajgar, 2004; Bartling *et al.*, 2007), os efeitos neurocomportamentais associados à exposição a esses compostos em trabalhadores agrícolas e aplicadores de pesticidas têm sido estudados por várias décadas (Korsak e Sato, 1977). Estudos epidemiológicos examinando déficits associados com o

desempenho cognitivo e psicomotor após exposições agudas (Rosenstock *et al.*, 1991; Calvert *et al.*, 2008) e crônicas (Daniell *et al.*, 1992; Farahat *et al.*, 2003; Kamel *et al.*, 2004; Roldan-Tapia *et al.*, 2005; Rohlman *et al.*, 2007; Colossio *et al.*, 2009) têm sido reportados. No entanto, apesar da longa história de pesquisas sobre os efeitos neurocomportamentais associados à exposição aos OF, existe uma falta de informação sobre outros mecanismos de ação, além da inibição da AChE, que poderiam estar associados com estes eventos. Neste sentido, alguns estudos sugerem que a neurotoxicidade decorrente da exposição crônica (ou repetida) aos pesticidas OF pode ocorrer sem sintomas colinérgicos antecedentes e parece não ser dependente da inibição da AChE (Singh e Sharma, 2000; Ray e Richards, 2001).

Levando estes dados em consideração, o objetivo do nosso segundo trabalho foi investigar os efeitos de administrações repetidas de malation (ao longo de um período de 15 dias) sobre os potenciais déficits neurocomportamentais (relacionados à memória), bem como alterações bioquímicas no hipocampo de camundongos, na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos com os potenciais efeitos deletérios no desempenho cognitivo dos animais. Nós hipotetizamos que a exposição dos animais ao malation (em doses que não alteram a atividade da AChE hipocampal) poderia levar a neurotoxicidade através de eventos não-colinérgicos, resultando em déficits de memória semelhantes aos observados em humanos cronicamente expostos aos OF (Rothlein *et al.*, 2006; Colosio *et al.*, 2009).

Neste estudo, a administração de 30 ou 100 mg/kg de malation não causou uma inibição significativa da atividade da AChE no hipocampo dos camundongos, após uma única administração, e não causou efeitos colaterais colinérgicos ou efeitos relacionados à exposição ao malation sobre o peso corporal dos animais. Estes dados confirmam a nossa ideia de que as doses avaliadas foram doses baixas que não causaram sintomas de toxicidade aguda aparente. Além disso, o tratamento com malation durante 15 dias não causou mudanças no teste do campo aberto e esta observação demonstra que os déficits observados nas tarefas relacionadas à memória não foram devidos a um efeito do OF sobre a atividade locomotora. A dose mais elevada de malation (100 mg/kg) foi associada a uma inibição de 50% da atividade da AChE hipocampal, após um período de tratamento de 15 dias. No entanto, esta inibição não produziu sinais aparentes de toxicidade colinérgica. Nossos resultados estão de acordo com Middlemore-Risher *et al.* (2010), que demonstraram que ratos expostos ao OF clorpirifós (CPF) por um

período de 14 dias não apresentaram sintomas clínicos de toxicidade colinérgica, apesar de uma redução na atividade da AChE hipocampal de aproximadamente 60%.

Como dito anteriormente, os déficits cognitivos são uma das sequelas comportamentais mais comuns e persistentes em pessoas expostas aos pesticidas OF (Chen, 2012). Nosso protocolo experimental provocou um declínio significativo na memória espacial dos animais após o tratamento de 15 dias com malation, a qual é altamente dependente do sistema hipocampal (Assini *et al.*, 2009; Broadbent *et al.*, 2010). É importante ressaltar que o déficit de memória espacial induzido por exposições repetidas ao malation ocorreu mesmo com a dose que não foi capaz de inibir a atividade da AChE hipocampal (30 mg/kg) e na ausência de qualquer sinal clássico de toxicidade colinérgica. Estes resultados estão de acordo com Valvassori *et al* (2007), os quais demonstraram que o malation foi capaz de prejudicar a memória aversiva em ratos, sem afetar a atividade da AChE no hipocampo. No entanto, os mecanismos de toxicidade não colinérgica induzidos pelo malation que poderiam estar envolvidos nos déficits cognitivos são ainda desconhecidos.

De particular importância, tem sido sugerido que interações envolvendo os OF com alvos não relacionados com as colinesterases podem contribuir para os efeitos persistentes e a longo prazo observados após a exposição crônica a estes compostos (Lotti e Moretto, 2005; Costa, 2006; Terry, 2012). Devido a sua natureza altamente reativa, os OF podem alterar a função de uma série de proteínas além das colinesterases (Terry, 2012). Em particular, os efeitos sobre as mitocôndrias podem ser muito relevantes devido à importância fundamental dessas organelas para as funções neuronais normais, incluindo o metabolismo aeróbico, homeostase do cálcio e processos apoptóticos (Hollenbeck e Saxton, 2005). A diminuição da produção de ATP e a alteração da integridade mitocondrial foram observadas em culturas de células neuronais após a exposição a compostos OF neurotóxicos (Massicotte *et al.*, 2005). Além disso, a administração de MitoQ (um antioxidante mitocondrial) foi eficaz na prevenção da morte celular induzida pelo OF diclorvos em cérebro de ratos (Wani *et al.*, 2011). Um estudo recente mostrou que a exposição crônica ao diclorvos provocou uma diminuição significativa na atividade do complexo I mitocondrial, em cérebro de ratos, em concentrações que não foram capazes de inibir a atividade da AChE (Binukumar *et al.*, 2010). Do mesmo modo, os nossos resultados demonstraram uma inibição

significativa da atividade do complexo I mitocondrial, de fundamental importância para o controle da fosforilação oxidativa e da função mitocondrial (Davey *et al.*, 1998), no hipocampo de camundongos tratados com 30 e 100 mg/kg de malation.

Uma extensa literatura sugere que a exposição a pesticidas pode aumentar o risco de desenvolvimento da DP, onde a diminuição da atividade do complexo I mitocondrial pode estar intimamente relacionada com esta patologia (Binukumar *et al.*, 2010; Manthripragada *et al.*, 2010). A exposição ocupacional a pesticidas foi também associada com disfunção cognitiva leve (Bosma *et al.*, 2000), esclerose lateral amiotrófica (ELA) (Johnson e Atchison, 2009) e demência, como a DA (Baldi *et al.*, 2002). Em nosso modelo experimental, o déficit de memória induzido pelo malation não foi acompanhado por mudanças nos níveis de sinaptofisina (uma proteína marcadora de sinapses) no hipocampo, sugerindo que o número de sinapses não foi afetado pelo tratamento com malation. Por outro lado, é possível pensar que a diminuição significativa da função mitocondrial (diminuição da atividade do complexo I) pode ter afetado a qualidade das sinapses hipocámpais e contribuído para o declínio na memória. Neste sentido, Reddy e Beal (2008) demonstraram que mitocôndrias funcionais e morfológicamente anômalas encontradas nos terminais sinápticos podem ser um fator crítico que contribuem para o dano sináptico e declínio cognitivo observado em pacientes com DA. Reforçando a possível relação entre déficit de memória e prejuízo na função mitocondrial, nós observamos uma correlação positiva entre a diminuição da atividade do complexo I hipocámpal e a diminuição do tempo gasto pelos animais explorando o objeto deslocado, comportamento que sugere déficit no desempenho relacionado à memória.

Há evidências sugerindo uma ligação entre a exposição aguda e crônica a pesticidas OF e inflamação (Banks e Lein, 2012). Foi demonstrado que a exposição repetida a baixos níveis de OF foi capaz de induzir respostas inflamatórias em cultura de astrócitos (Mense *et al.*, 2006) e aumentar os níveis de citocinas inflamatórias *in vivo* (Singh e Jiang, 2003). A intoxicação aguda com Soman (um agente nervoso OF) foi capaz de aumentar a expressão de GFAP e de ativar a microglia em várias regiões cerebrais, incluindo o hipocampo (Angoa-Perez *et al.*, 2010; Baille-LeCrom *et al.*, 1995; Collombet *et al.*, 2005; Zimmer *et al.*, 1997). Do mesmo modo, a administração crônica de clorpirifós aumentou a expressão de GFAP no hipocampo de ratos, sem inibição da

colinesterase do soro (Lim *et al.*, 2011). Curiosamente, a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias e excessiva inflamação no SNC é uma característica de muitas doenças neurodegenerativas (Blasko *et al.*, 2004; Eikelenboom *et al.*, 1998; Whitton, 2007) e, neste cenário, tem sido proposto que as mitocôndrias podem exercer um papel crucial (Di Filippo *et al.*, 2010). Particularmente para o malation, a administração de baixas doses do pesticida por 14 ou 90 dias foi capaz de aumentar a função de macrófagos e a degranulação de mastócitos em camundongos (Rodgers e Xiong, 1997a,b). No entanto, estudos relacionando a exposição ao malation com neuroinflamação não foram relatados na literatura. Levando em consideração as evidências acima mencionadas, o nosso próximo passo foi investigar se o dano induzido pelo malation no desempenho cognitivo e na função mitocondrial dos animais poderia estar relacionado com uma resposta inflamatória no hipocampo. Os resultados mostraram um aumento na expressão de GFAP, uma proteína expressa nos astrócitos e um biomarcador sensível e precoce de neurotoxicidade, nas regiões hipocâmpais CA1, CA3 e GD, após um período de tratamento de 15 dias com 30 e 100 mg/kg de malation. Estes resultados indicam que a exposição repetida ao malation pode ter desencadeado uma resposta inflamatória em diferentes regiões do hipocampo, até mesmo na ausência de inibição da AChE. Todavia, o mecanismo pelo qual a exposição repetida ao malation poderia estar induzindo neuroinflamação precisa ainda ser estudado.

A disfunção da BHE é uma complicação frequentemente associada com vários tipos de doenças neurodegenerativas (Zlokovic, 2008) e edema cerebral após lesão traumática (Zador *et al.*, 2009). Além disso, estudos mostram que a exposição a agentes nervosos OF, como soman e sarin, foi capaz de provocar mudanças na permeabilidade da BHE após envenenamento agudo com altas doses (Abdel-Rahman *et al.*, 2002) ou mesmo após a exposição a baixas doses desses OF (Grauer *et al.*, 2001). Sabendo-se disso, neste estudo nós avaliamos se a exposição ao malation por um período de 15 dias poderia afetar a expressão da AQP4, uma proteína de canal de água encontrada principalmente nos astrócitos que circundam a BHE, desempenhando um papel importante no transporte de água através das membranas celulares, sendo relacionada com disfunção da BHE (Saadoun, 2002). Nossos resultados mostram que a expressão da AQP4 não foi modificada após o tratamento repetido com malation, nas doses de 30 e 100 mg/kg, sugerindo que a neurotoxicidade induzida pelo malation, neste protocolo experimental, não está relacionada com disfunção da BHE.

Abdel-Rahman e colaboradores (2004) demonstraram que a exposição cutânea de ratos ao malation por 30 dias induziu déficits neurocomportamentais significativos e significativa redução na densidade de neurônios nas regiões hipocâmpais CA1, CA3 e GD. Outro estudo utilizando ratos adultos injetados com baixas doses de malation (40 mg/kg, i.p.) por 14 dias demonstrou uma redução significativa na morfologia dendrítica (comprimento dos dendritos e densidade das espinhas dendríticas) de neurônios do hipocampo e do córtex pré-frontal, regiões cerebrais implicadas com a cognição (Campanha *et al.*, 2008). Neste estudo, nós avaliamos se a exposição ao malation por um período de 15 dias poderia alterar a expressão de duas proteínas envolvidas na via apoptótica mitocondrial, Bax e Bak (Dewson e Kluck, 2009). Estas proteínas são membros da família de proteínas pró-apoptóticas Bcl-2 que atuam como fatores essenciais na ativação da via de morte celular intrínseca, perturbando a permeabilidade da membrana mitocondrial externa e facilitando a liberação do citocromo c (Hetz *et al.*, 2005; Sheridan *et al.*, 2008). Os resultados mostraram um aumento significativo nos níveis de ambas as proteínas no hipocampo dos camundongos após o tratamento com 30 e 100 mg/kg de malation. Alguns estudos com cultura de células indicaram que compostos OF induzem apoptose através da ativação da via de morte dependente da mitocôndria. Por exemplo, Saleh *et al.* (2003) demonstraram que o OF paraoxon causou um efeito direto nas mitocôndrias por perturbar o potencial transmembrana mitocondrial, causar aumento da expressão da Bax e aumentar a liberação do citocromo c em cultura de linfócitos de murinos. No nosso estudo *in vitro*, também demonstramos que o malaoxon, metabólito tóxico do malation, foi capaz de perturbar o potencial de membrana mitocondrial e aumentar a produção de EROs em células corticais em cultura. Nós observamos que estas modificações foram eventos precoces que precederam a morte celular induzida pelo malaoxon. Além disso, o pré-tratamento das células com o antioxidante AA foi capaz de prevenir parcialmente a morte celular induzida pelo malaoxon, sugerindo que o estresse oxidativo pode ter um papel importante neste evento. É importante ressaltar que neste estudo *in vitro* a atividade da AChE foi significativamente inibida pelo malaoxon em todas as concentrações investigadas e o tratamento com pralidoxima não foi capaz de reverter a inibição da enzima causada pelo malaoxon. Dessa forma, somente a partir desses dados, não é possível afirmar a relação existente entre a inibição da enzima AChE e a morte das células corticais induzida pelo malaoxon. Desta forma, estudos adicionais precisam ser realizados para

desvendar este fenômeno. Por outro lado, alguns estudos na literatura mostram que o malation pode causar morte celular sem afetar a atividade da AChE. Masoud *et al* (2003) sugerem que a citotoxicidade induzida pelo malation, em doses não-anticolinérgicas, é mediada através da apoptose dependente de caspases em cultura de fibroblastos de camundongo. Brocardo *et al* (2007) também relataram que o malation, em doses que não afetaram a atividade da AChE, foi capaz de induzir apoptose na região hipocampal do GD de ratos. Baseado nesses estudos e nos nossos dados demonstrando que o malation foi capaz de aumentar a expressão de proteínas pró-apoptóticas após um período de exposição de 15 dias, é possível sugerir que o mecanismo de citotoxicidade do malation observado após exposições com baixas doses pode ser devido à indução de apoptose.

Sabendo-se que a atividade colinérgica desempenha um papel chave nos mecanismos de memória e na patofisiologia da neurotoxicidade induzida pelos OF (Nordberg, 2001; Bajgar, 2004), nós avaliamos se o aumento dos níveis das proteínas pró-apoptóticas (Bax e Bak) poderia induzir a morte de neurônios colinérgicos no hipocampo e assim contribuir para o déficit de memória observado após o tratamento com o malation. Os nossos resultados mostraram que os níveis da enzima colina acetiltransferase (ChAT), a enzima responsável pela biossíntese da acetilcolina e o marcador mais específico de neurônios colinérgicos, manteve-se igual ao grupo controle, sugerindo que a viabilidade dos neurônios colinérgicos do hipocampo não foi afetada após o tratamento com malation. Estes resultados fornecem evidências de que, neste protocolo experimental, o processo de apoptose foi detectado durante a fase inicial, uma vez que não observamos a morte de neurônios colinérgicos durante este período, mesmo com o aumento da expressão da Bax e da Bak. Além disso, existe evidência de que as proteínas pró-apoptóticas avaliadas neste trabalho estão envolvidas, principalmente, na fase de iniciação da apoptose (Mattson, 2000). Portanto, não se pode descartar a ideia de que a morte de neurônios colinérgicos poderia estar acontecendo em estágios mais avançados da intoxicação. No entanto, mais estudos precisam ser realizados para responder a esta pergunta. Finalmente, os resultados obtidos neste estudo contribuem para um melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na neurotoxicidade induzida após exposições repetidas ao pesticida OF malation, bem como do tratamento da intoxicação aguda por malation.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que:

CAPÍTULO I:

- A atividade da AChE no córtex pré-frontal (em torno de 50%), hipocampo (em torno de 40%) e sangue (em torno de 70%) de camundongos foi consideravelmente inibida 24 h após a exposição ao malation (exposição aguda), confirmando o seu efeito inibitório já relatado;
- As oximas, pralidoxima e K074, não foram capazes de reativar a AChE inibida pelo malation no córtex pré-frontal e hipocampo, quando administradas 6 h após a exposição ao malation;
- Somente a oxima pralidoxima (em combinação com a atropina) diminuiu significativamente a inibição causada pelo malation na atividade da AChE sanguínea, corroborando com seu uso na clínica;
- A administração intracerebroventricular de ambas oximas (6 h após a exposição ao malation) não modificou o efeito inibitório causado pelo OF na atividade da AChE hipocampal e cortical;

De modo geral, os resultados do capítulo I indicam que: (i) a atividade da AChE periférica (sangue) e central (hipocampal e cortical) não estão necessariamente correlacionadas após a exposição ao malation e/ou tratamento com as oximas; (ii) a taxa de “envelhecimento” da enzima AChE representa um evento crucial no SNC, o qual parece ser cineticamente diferente quando comparado ao tecido periférico; e (iii) a ausência de reativação significativa no córtex pré-frontal e hipocampo por parte das oximas reforça a necessidade de busca por potenciais novos reativadores capazes de reativar eficientemente a AChE no cérebro e no sangue após o envenenamento por malation.

CAPÍTULO II:

- A exposição aguda ao malation (24 h) nas doses de 30 e 100 mg/kg não afetou a atividade da AChE hipocampal. Do mesmo modo, a exposição repetida (15 dias) com 30 mg/kg também não teve efeito na atividade desta enzima no hipocampo; por outro lado, os animais tratados durante 15 dias com 100 mg/kg de malation apresentaram uma diminuição de aproximadamente 50% da atividade da AChE hipocampal. Isto sugere a ausência de efeitos anti-colinesterásicos da dose de 30 mg/kg, independentemente do período de tratamento (agudo ou sub-crônico);

- A administração repetida de malation nas doses de 30 e 100 mg/kg por um período de 15 dias não causou sintomas aparentes de toxicidade colinérgica como perda de peso, diarreia, lacrimejamento excessivo e dificuldade respiratória;
- A exposição repetida ao malation induziu significativo déficit na memória espacial em camundongos adultos, mesmo na dose que não afetou a atividade da AChE hipocampal (30 mg/kg);
- A atividade da enzima NADH desidrogenase mitocondrial (complexo I) foi significativamente inibida no hipocampo dos animais após os tratamentos com 30 e 100 mg/kg de malation por um período de 15 dias;
- A exposição repetida ao malation nas doses de 30 e 100 mg/kg induziu uma significativa astrogliose nas regiões hipocampais CA1, CA3 e GD;
- A exposição repetida ao malation nas doses de 30 e 100 mg/kg induziu um aumento da expressão das proteínas pro-apoptóticas Bax e Bak no hipocampo dos animais expostos durante 15 dias com o pesticida;

De modo geral, os resultados do capítulo II indicam que: (i) exposições repetidas com baixas doses do pesticida OF malation podem levar a prejuízo no teste de memória espacial até mesmo na ausência de inibição da atividade da AChE, sugerindo que o sistema colinérgico pode não estar envolvido nos efeitos neurotóxicos induzidos pelo malation; (ii) a diminuição do desempenho dos animais na tarefa relacionada a memória foi positivamente correlacionada com a diminuição da atividade do complexo I mitocondrial no hipocampo; (iii) a partir desses resultados, nós podemos sugerir que o mecanismo envolvido no déficit cognitivo (memória espacial) induzido pelo malation é mediado, pelo menos em parte, por uma interação sinérgica entre disfunção mitocondrial e processos neuroinflamatórios, os quais podem levar a um dano sináptico e, possivelmente, a morte neuronal.

CAPÍTULO III: Conclusões parciais:

- O tratamento das culturas primárias de neurônios corticais com Mx, metabólito tóxico do malation, causou morte neuronal após incubação por 6DIV nas concentrações de 10 e 100 μM ;
- O tratamento das culturas primárias de neurônios corticais com 100 μM de Mx causou uma inibição significativa da atividade da AChE nos tempos que antecederam a morte neuronal: 0,5 h-24 h- 48 h -6 DIV.
- O tratamento agudo (1 h) das culturas primárias de neurônios corticais com 100 μM de Mx causou uma diminuição significativa do potencial de membrana mitocondrial em um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio, sugerindo um efeito imediato do

toxicante na homeostase mitocondrial, o que pode ser causa da elevada produção de espécies reativas de oxigênio;

- O pré-tratamento das células corticais com o antioxidante AA preveniu parcialmente a morte celular causada pelo Mx após 6 DIV de incubação com os compostos;

De modo geral, os resultados do capítulo III indicam que a morte celular induzida pelo Mx em cultura primária de neurônios corticais está associada, pelo menos em parte, com a indução de estresse oxidativo. No entanto, nossos resultados são preliminares e estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos na morte celular induzida pelo Mx e a participação da AChE neste fenômeno. Uma perspectiva neste contexto seria a utilização de um efetivo reativador da AChE após a prévia inibição com Mx, no intuito de investigar se a morte neuronal induzida por este composto depende exclusivamente de eventos relacionados ao estresse oxidativo, ou se depende também da inibição desta enzima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Rahman, A; Shetty, AK; Abou-Donia MB. Acute exposure to sarin increases blood brain barrier permeability and induces neuropathological changes in the rat brain: dose-response relationships. **Neuroscience**,113(3):721-741, 2002.

Abdel-Rahman, A; Dechkovskaia, AM; Goldstein, LB. et al. Neurological deficits induced by malathion, DEET, and permethrin, alone or in combination in adult rats. **J Toxicol Environ Health A**, 67(4):331-356, 2004.

Abdollahi, M; Mostafalou, S; Pournourmohammadi, S. et al. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, 137:29-34, 2004.

Abou-Donia, MB. Organophosphorus ester-induced chronic neurotoxicity. **Arch Environ Health**, 58:484-497, 2003.

Acker, CI; Luchese, C; Prigol, M. et al. Antidepressant-like effect of diphenyl diselenide on rats exposed to malathion: involvement of Na⁺ K⁺ ATPase activity. **Neurosci.Lett**, 455:168-172, 2009.

Aebi, H. Catalase. In: Bergmeyer HV, editor. Methods of enzymatic analysis. Chemie, Weinheim: FRG, pp. 673-677, 1974.

Aluigi, MG; Angelini, C; Falugi, C. et al. Interaction between organophosphate compounds and cholinergic functions during Development. **Chem Biol Interact**, 157-158:305-316. 2005.

Amr, MM; Halim, ZS; Moussa, SS. Psychiatric disorders among Egyptian pesticide applicators and formulators. **Environmental Research**, 73:193-199, 1997.

Angoa-Perez; Kreipke, CW; Thomas, DM. et al. Soman increases neuronal COX-2 levels: possible link between seizures and protracted neuronal damage. **Neurotoxicology**, 31:738-746, 2010.

Assini, FL. A Administração aguda/repetida de malation afeta modelos animais de ansiedade e depressão. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

Assini, FL; Duzzioni, M; Takahashi, RN. Object location memory in mice: Pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. **Behavioural Brain Research** 204:206–211, 2009.

Baille-Le Crom, V; Collombet, JM; Carpentier, P. et al. Early regional changes of GFAP mRNA in rat hippocampus and dentate gyrus during soman-induced seizures. **Neuroreport**, 7:365–369, 1995.

Bajgar, J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. **Adv Clin Chem**, 38:151–216, 2004.

Bajgar, J. et al. Treatment of organophosphate intoxication using cholinesterase reactivators: facts and fiction. **Mini Rev Med Chem**, 7: 461–466, 2007.

Baldi, I; Lebailly, P; Mohammed-Brahim, B. et al. **Am J Epidemiol**, 157:409–414, 2002.

Banks, CN; Lein, PJ. A review of experimental evidence linking neurotoxic organophosphorus compounds and inflammation. **Neurotoxicology**, 33:575-584, 2012.

Barbosa, LCA. Os pesticidas, o homem e o meio ambiente. Minas Gerais: Ed. UFV, 2004.

Bartling A; Worek, F; Szynicz, L. et al. Enzyme-kinetic investigation of different sarin analogues reacting with human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. **Toxicology**, 233:166–172, 2004.

Bartosova, L; Kuca, K; Kunesova, G. et al. The acute toxicity of acetylcholinesterase reactivators in mice in relation to their structure. **Neurotox Res**, 9:291–296, 2006.

Blasko, I; Stampfer-Kountchev, M; Robatscher, P. et al. How chronic inflammation can affect the brain and support the development of

Alzheimer's disease in old age: the role of microglia and astrocytes. **Aging Cell**, 3(4):169-176, 2004.

Bosma, H; van Boxtel, MP; Ponds, RW. et al. Pesticide exposure and risk of mild cognitive dysfunction. **Lancet**, 356:912-913, 2000.

Branco, SM. *Natureza e agroquímicos*. 2. ed. São Paulo: Moderna, 2003.

Broadbent, NJ; Squire, LR; Clark, RE. Sustained dorsal hippocampal activity is not obligatory for either the maintenance or retrieval of long-term spatial memory. **Hippocampus**, 20(12):1366-1375, 2010.

Brown, MA; Brix, KA. Review of health consequences from high-intermediate and low-level exposure to organophosphorus nerve agents. **J Appl Toxicol**, 18, 393-408, 1998.

Calvert, GM; Karnik, J; Mehler, L. et al. Acute pesticide poisoning among agricultural workers in the United States, 1998-2005. **Am J Ind Med**, 51:883-898, 2008.

Campaña, AD; Sanchez, F; Gamboa, C. et al. Dendritic morphology on neurons from prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens is altered in adult male mice exposed to repeated low dose of malathion. **Synapse**, 62(4):283-290, 2008.

Carlberg, I; Mannervik, B. Glutathione reductase. **Methods Enzymol**, 113:484-490, 1985.

Carlson, K; Ehrich, M. Organophosphorus compound-induced modification of SH-SY5Y human neuroblastoma mitochondrial transmembrane potential. **Toxicol Appl Pharmacol**, 160:33-42, 1999.

Carvalho, G; Ribeiro, SL. *Intoxicações por agrotóxicos em trabalhadores dos pomares de maçãs*. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, 11-17. 2001.

Chen, Y. Organophosphate-induced brain damage: Mechanisms, neuropsychiatric and consequences, and potential therapeutic strategies. **Neurotoxicology**, 33:391-400, 2012.

Collombet, JM. et al. Soman poisoning increases neural progenitor proliferation and induces long-term glial activation in mouse brain. **Toxicology**, 208:319–334, 2005.

Baldi, I; Lebailly, P; Mohammed-Brahim, B. et al. Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly. **Am J Epidemiol**, 157:409–414, 2003.

Binukumar, BK; Bal, A; Kandimalla, RJ. et al. Nigrostriatal neuronal death following chronic dichlorvos exposure: crosstalk between mitochondrial impairments, a synuclein aggregation, oxidative damage and behavioral changes. **Mol Brain**, 13:3–35, 2010.

Brocardo, PS; Assini, F; Franco, JL. et al. Zinc attenuates malathion-induced depressantlike behavior and confers neuroprotection in the rat brain. **Toxicol Sci**, 97(1):140-148, 2007.

Buratti, FM; D'Aniello, A; Volpe, MT. et al. Malathion bioactivation in the human liver: the contribution of different cytochrome p450 isoforms. **Drug Metab Dispos**, 33(3):295-302, 2004.

Calic, M; Vrdoljak, AL; Radić, B. et al. In vitro and in vivo evaluation of pyridinium oximes: mode of interaction with acetylcholinesterase, effect on tabun- and soman-poisoned mice and their cytotoxicity. **Toxicology**, 219:85–96, 2006.

Cavaliere, MJ; Calore, EE; Perez, NM. et al. Organophosphate-induced myotoxicity. **Rev Saude Publica**, 30(3):267-272, 1996.

Cremlyn, RJ. Introduction: historical aspects. In: *Agrochemicals: preparation and mode of action*. 1. Ed. Cichester: John Wiley & Sons, p. 1-15. 1991.

Colosio, C; Tiramani, M; Brambilla, G. et al. Neurobehavioural effects of pesticides with special focus on organophosphorus compounds: which is the real size of the problem? **Neurotoxicology**, 30(6):1155-1161, 2009.

Costa, LG. Current issues in organophosphate toxicology. **Clin Chim Acta**, 366(1-2):1-13, 2006.

Daniell, W; Barnhart, S; Demers, P. et al. Neuropsychological performance among agricultural pesticide applicators. **Environ Res**, 59:217-228, 1992.

da Silva, AP; Meotti, FC; Santos, AR. et al. Lactational exposure to malathion inhibits brain acetylcholinesterase in mice. **Neurotoxicology**, 27:1101-1105, 2006.

da Silva, AP; Farina, M; Franco, JL. et al. Temporal effects of newly developed oximes (K027, K048) on malathion-induced acetylcholinesterase inhibition and lipid in mouse prefrontal cortex. **Neurotoxicology** 29:184 – 189, 2008.

Davey, GP; Peuchen, S; Clark, JB. Energy thresholds in brain mitochondria. Potential involvement in neurodegeneration. **J Biol Chem**, 273(21):12753-12757, 1998.

Debbasch, C; Pisella, PJ; De Saint Jean, M. et al. Mitochondrial activity and glutathione injury in apoptosis induced by unpreserved and preserved beta-blockers on Chang conjunctival cells. **Investig. Ophthalmol. Vis. Sci**, 42:2525–2533, 2001.

DeBleeker, JL. The Intermediate Syndrome in Organophosphate Poisoning: An Overview of Experimental and Clinical Observations. **Clin Toxicol**, 33:683-686, 1995.

de Lima Portella, R; Barcelos, RP; de Bem, AF. et al. Oximes as inhibitors of low density lipoprotein oxidation. **Life Sci** 83: 878–885, 2008.

de Silva, HJ. Toxicity due to organophosphorus compounds: what about chronic exposure? **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 100(9):803-806. 2006.

Delgado, EH; Streck, EL; Quevedo, JL. et al. Mitochondrial respiratory dysfunction and oxidative stress after chronic malathion exposure. **Neurochem Res**, 31:1021-1025, 2006.

Dewson G, Kluck RM. Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. **J Cell Sci**, 122:2801-2808, 2009.

Di Filippo, M; Chiasserini, D; Tozzi, A. et al. Mitochondria and the link between neuroinflammation and neurodegeneration. **J Alzheimers Dis**, 20:369–379, 2010.

Donaldson, D; Kiely, T; Grube, A. Pesticides industry sales and usage: 1998 and 1999 market estimates, U.S. EPA. Office of Pesticide Programs , pp. 14–15, 2002.

dos Santos, AA; dos Santos, DB; Dafre, AL. et al. In vitro reactivating effects of standard and newly developed oximes on malaoxon-inhibited mouse brain acetylcholinesterase. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 107:768-773, 2010.

dos Santos, AA; dos Santos, DB; Ribeiro, RP. et al. Effects of K074 and pralidoxime on antioxidant and acetylcholinesterase response in malathion-poisoned mice. **Neurotoxicology**, 32:888-895, 2011.

Duysen, EG; Li, B; Xie, W. et al. Evidence for nonacetylcholinesterase targets of organophosphorus nerve agent: supersensitivity of acetylcholinesterase knockout mouse to VX lethality. **J Pharmacol Exp Ther**, 299:528–535, 2001.

Eddleston, M; Szinicz, L; Eyer, P. et al. Oximes in acute organophosphorus pesticide poisoning: a systematic review of clinical trials. **QJM**, 95(5):275-283, 2002.

Eikelenboom, P; Rozemuller, JM; Van Muiswinkel, FL. Inflammation and Alzheimer's disease: relationships between pathogenic mechanisms and clinical expression. **Exp Neurol**, 154(1):89-98, 1998.

Elhanany, E; Ordentlich, A; Dgany, O. et al. Resolving pathways of interaction of covalent inhibitors with the active site of acetylcholinesterases: MALDI-TOF/MS analysis of various nerve agent phosphyl adducts. **Chem Res Toxicol**, 14:912-918, 2001.

Ellman, GL; Courtney, KD; Andres Jr, V. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol**, 7:88–95, 1961.

Eyer, P. Neuropsychopathological changes by organophosphorus compounds. **Hum Exp Toxicol**, 14(11):857-864, 1995.

Eyer, P; Szinicz, L; Thiermann, H. et al. Testing of antidotes for organophosphorus compounds: Experimental procedures and clinical reality. **Toxicology**, 233:108–119, 2007.

Farahat, TM; Abdel Rasoul, GM; Amr, MM. et al. Neurobehavioral effects among workers occupationally exposed to organophosphorous pesticides. **Occup Environ Med**, 60:279-286, 2003.

Farina, M; Lara, FS; Brandão, R. et al. Effects of aluminum sulfate on erythropoiesis in rats. **Toxicol Lett**, 132:131–139, 2002.

Fischer, J.C; Ruitenbeek, W; Berden, JA. et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **ClinChimActa**, 153:23–36, 1985.

Fortunato, JJ; Feier, G; Vitali, AM. et al. Malathion induced oxidative stress in rat brain regions. **Neurochem Res**, 31:671-678. 2006.

Frandsen, A; Schousboe, A. Development of excitatory amino acid induced cytotoxicity in cultured neurons. *Int. J. Dev. Neurosci*, 8:209–216, 1990.

Furlong, CE; Cole, TB; Jarvik, GP. et al. Role of paraoxonase (PON1) status in pesticide sensitivity: genetic and temporal determinants. **Neurotoxicology**, 26(4):651-659, 2005.

Ganendran, A; Balabaskaran, S. Reactivation studies on organophosphate inhibited human cholinesterases by pralidoxime (P-2-AM). **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, 7:417–423, 1976.

García, DA; Vendrell, I; Galofré, M. et al. GABA released from cultured cortical neurons influences the modulation of t-[(35)S] butylbicyclophosphorothionate binding at the GABA(A) receptor Effects of thymol. **Eur J Pharmacol**, 600:26-31, 2008.

Gonçalves, AS; França, TCC; Wilter, A. et al. Molecular Dynamics of the Interaction of Pralidoxime and Deazapralidoxime with Acetylcholinesterase Inhibited by the Neurotoxic Agent Tabun. **J. Braz. Chem. Soc**, 17:968-975, 2006.

Grauer, E; Ben Nathan, D; Lustig, S. et al. Viral neuroinvasion as a marker for BBB integrity following exposure to cholinesterase inhibitors. **Life Sci**, 68(9):985-990, 2001.

Hargreaves, AJ. Neurodegenerations Induced by Organophosphorous Compounds. **Adv Exp Med Biol**, 724:189-204, 2012.

Hetz C; Vitte, PA; Bombrun, A. et al. Bax channel inhibitors prevent mitochondrion-mediated apoptosis and protect neurons in a model of global brain ischemia. **J Biol Chem**, 280(52):42960-42970, 2005.

Hollenbeck, PJ; Saxton, WM. The axonal transport of mitochondria. **J Cell Sci**, 118:5411–5419, 2005.

Jamal, GA; Hansen, S; Julu, PO. Low level exposures to organophosphorus esters may cause neurotoxicity. **Toxicology**, 181-182:23-33, 2002.

Johnson, FO; Atchison, WD. The role of environmental mercury, lead and pesticide exposure in development of amyotrophic lateral sclerosis. **Neurotoxicology**, 30:761–765, 2009.

Kalisiak, J; Ralph, EC; Zhang, J. et al. Amidine-Oximes: Reactivators for organophosphate exposure. **J Med Chem**, 54(9):3319-3330, 2011.

Kamel, F; Hoppin, JA. Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. **Environ Health Perspect**, 112:950-958, 2004.

Kassa, J. Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. **J Toxicol Clin Toxicol**, 40:803- 816, 2002.

Kassa, J; Kuca, K; Cabal, J. A comparison of the potency of trimedoxime and other currently available oximes to reactivate tabun-inhibited acetylcholinesterase and eliminate acute toxic effects of tabun. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, 149:419–423, 2005.

Kassa, J; Kuca, K; Bartosova, L. The development of new structural analogues of oximes for the antidotal treatment of poisoning by nerve

agents and the comparison of their reactivating and therapeutic efficacy with currently available oximes. **Curr Org Chem**, 11:267–283, 2007.

Kassa, J; Humlicek, V. A comparison of the potency of newly developed oximes (K074, K075) and currently available oximes (obidoxime, trimedoxime, HI-6) to counteract acute toxic effects of tabun and cyclosarin in mice. **Drug Chem Toxicol**, 31:127–135, 2008.

Kassa, J; Kunesova, G. A comparison of the potency of newly developed oximes (K027, K048) and commonly used oximes (obidoxime, HI-6) to counteract tabun-induced neurotoxicity in rats. **J Appl Toxicol**, 26:309-316, 2006.

Khurana, D; Prabhakar, S. Organophosphorus intoxication. **Arch Neurol**, 57(4):600-602, 2000.

Korsak, RJ; Sato, MM. Effects of chronic organophosphate pesticide exposure on the central nervous system. **Clin Toxicol**, 11:83-95, 1977.

Kovarik, Z; Radić, Z; Berman, HA. et al. Mutant cholinesterases possessing enhanced capacity for reactivation of their phosphorylated conjugates. **Biochemistry**, 43:3222–3229, 2004.

Kuca, K; Cabal, J; Jun, D. et al. Strategy for the development of new acetylcholinesterase reactivators – antidotes used for treatment of nerve agent poisonings. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, 149(2):429-431, 2005.

Kuca K; Hrabínová, M; Soukup, O. et al. Pralidoxime – the gold standard of acetylcholinesterase reactivators – reactivation in vitro efficacy. **Bratisl Lek Listy**, 111:502–504, 2010.

Kushik, J; Chandrabhan, D. Sources of exposure to and public implications of organophosphate pesticides. **Rev Panam Salud Publica**, 14(3):171-185, 2003.

Kwong, TC. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. **Ther Drug Monit**, 24:144–149, 2002.

Larini, L. Praguicidas. In: OGA'S. Fundamentos da Toxicologia. Atheneu (São Paulo), 1996.

Latini, A; da Silva, CG; Ferreira, GC. et al. Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2- hydroxyglutaric acid in rat tissues. **Mol Genet Metab**, 86:188–199, 2005.

Lim, KL; Tay, A; Nadarajah, VD. et al. The effect of consequent exposure of stress and dermal of low doses of chlorpyrifos on the expression of glial fibrillary acidic protein in the hippocampus of adult mice. **J Occup Med Toxicol**, 6(1):4, 2011.

Lorke, DE; Hasan, MY; Nurulain, SM. et al. Entry of two new asymmetric bispyridinium oximes (K-27 and K-48) into the rat brain: comparison with obidoxime. **J Appl Toxicol**, 27:482–490, 2007.

Lotti, M. The pathogenesis of organophosphate polyneuropathy. **Crit Rev Toxicol**, 21(6):465-487, 1992.

Lotti, M. Clinical toxicology of anticholinesterase agents in humans. In: Krieger RI, editor. Handbook of Pesticide Toxicology. San Diego' Academic Press, p. 1043–1085, 2001.

Lotti, M; Moretto, A. Organophosphate-induced delayed polyneuropathy. **Toxicol Rev**, 24(1):37-49, 2001.

Lowry, OH; Rosebrough, NJ; Farr, AL. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**, 193:265–275, 1951.

Manthripragada, AD. et al. Paraoxonase 1, agricultural organophosphate exposure, and Parkinson disease. **Epidemiology**, 21:87-94, 2010.

Maroni, M; Colosio, C; Ferioli, A. et al. Biological Monitoring of Pesticide Exposure: a review. **Toxicology**, 143 (1):100-118, 2000.

Masoud, L; Vijayasathary, C; Fernandez-Cabezudo, M. et al. Effect of malathion on apoptosis of murine L929 fibroblasts: a possible mechanism for toxicity in low dose exposure. **Toxicology**, 185(1-2):89-102, 2003.

Massicotte C; Knight, K; Van der Schyf, CJ. et al. Effects of organophosphorus compounds on ATP production and mitochondrial integrity in cultured cells. **Neurotox Res**, 7(3):203-217, 2005.

Mattson, MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 2:120-129, 2000.

Mense, SM; Sengupta, A; Lan, C. et al. The common insecticides cyfluthrin and chlorpyrifos alter the expression of a subset of genes with diverse functions in primary human astrocytes. **Toxicol Sci**, 93(1):125-135, 2006.

Middlemore-Risher, ML; Buccafusco, JJ; Terry Jr, AV. Repeated exposures to low-level chlorpyrifos results in impairments in sustained attention and increased impulsivity in rats. **Neurotoxicol Teratol**, 32:415-424, 2010.

Moraes, ACL. Contribuição para o estudo das intoxicações por carbamatos: o caso do chumbinho no Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado)- Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública; 21-25, 1999.

Musilek, K; Jun, D; Cabal, J. et al. Design of a potent reactivator of tabun-inhibited acetylcholinesterase – synthesis and evaluation of (E)-1-(4- carbamoylpyridinium)-4-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-but-2-ene dibromide (K203). **J Med Chem**, 50:5514-5518, 2007

Niiijima, H; Nagao, M; Nakajima, M. et al. Sarin-like and soman-like organophosphorous agents activate PLC in rat brains. **Toxicol. Appl. Pharmacol**, 156:64-69, 1999.

Nordberg, A. Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's disease: therapeutic implications. **Biol Psychiatry**, 49(3):200-210, 2001.

Petroianu, GA; Hasan, MY; Nurulain, SM. et al. Ranitidine in acute high-dose organophosphate exposure in rats: effect of the time-point of administration and comparison with pyridostigmine. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 99(4):312-316, 2006.

Pinto, T; Lanctôt, KL; Herrmann, N. Revisiting the cholinergic hypothesis of behavioral and psychological symptoms in dementia of the Alzheimer's type. **Ageing Research Reviews**, 10:404-412, 2011.

Pires, DX; Caldas, ED; Recena, MC. Uso de agrotóxicos e suicídios no Mato Grosso do Sul, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, 21(2):598-605, 2005.

Pope, CN. Organophosphorus pesticides: do they all have the same mechanism of toxicity? **J Toxicol Environ Health B Crit Rev**, 2(2):161-181, 1999.

Pope, C; Karanth, S; Liu, J. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 19: 433-446, 2005.

Puntel, GO; Gubert, P; Peres, GL. et al. Antioxidant properties of oxime 3-(phenylhydrazono) butan-2-one. **Arch Toxicol**, 82:755-762, 2008.

Puntel, GO; de Carvalho, NR; Gubert, P. et al. Butane-2,3-dionethiosemicarbazone: an oxime with antioxidant properties. **Chem Biol Interact**, 177:153-160, 2009.

Ray, DE; Richards, PG. The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates. **Toxicology Letters**, 120:343-351, 2001.

Reddy, PH, Beal, MF. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. **Trends Mol Med** 14:45-53, 2008.

Reus, GZ; Valvassori, SS; Nuernberg, H. et al. DNA damage after acute and chronic treatment with malathion in rats. **J Agric Food Chem**, 56:7560-7565. 2008.

Rodgers, K; Xiong, S. Contribution of inflammatory mast cell mediators to alterations in macrophage function after malathion administration. **Int. J. Immunopharmae**, 19(3):149 -156, 1997a.

Rodgers, K; Xiong, S. Effect of Administration of Malathion for 14 Days on Macrophage Function and Mast Cell Degranulation. **Fundam Appl Toxicol**, 37(1):95-99, 1997b.

Rohlman, DS; Lasarev, M; Anger, WK. et al. Neurobehavioral performance of adults and adolescent agricultural workers. **Neurotoxicology**, 28:374-380, 2007.

Rohlman, DS; Anger, WK, Lein, PJ. Correlating neurobehavioral performance with biomarkers of organophosphorous pesticide exposure. **Neurotoxicology**, 32:268-276, 2011.

Rosa, R; Sanfeliu, C; Rodríguez-Farré, E. et al. Properties of ryanodine receptors in cultured cerebellar granule neurons: effects of hexachlorocyclohexane isomers and calcium. **J Neurosci Res**, 47:27-33, 1997.

Rothlein J; Rohlman, D; Lasarev, M. et al. Organophosphate pesticide exposure and neurobehavioral performance in agricultural and non-agricultural Hispanic workers. **Environ Health Perspect**, 114(5):691-696, 2006.

Rodrigues, L; Dutra, MF; Ilha, J. et al. Treadmill training restores spatial cognitive deficits and neurochemical alterations in the hippocampus of rats submitted to an intracerebroventricular administration of streptozotocin. **J Neural Transm**, 117:1295-1305, 2010.

Roldan-Tapia, L; Parron, T; Sanchez-Santed, F. Neuropsychological effects of longterm exposure to organophosphate pesticides. **Neurotoxicol Teratol**, 27:259-266, 2005.

Rosenstock, L; Keifer, M; Daniell, WE. et al. Chronic central nervous system effects of acute organophosphate intoxication. The Pesticide Health Effects Study Group. **Lancet**, 338:223-227, 1991.

Rustin, P; Chretien, D; Bourgeron, T. et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. **ClinChimActa**, 228:35-51, 1994.

Rusyniak, DE; Nañagas, KA. Organophosphate poisoning. **Semin Neurol**, 24(2):197-204, 2004.

Saadoun, S; Papadopoulos, MC; Davies, DC. et al. Aquaporin-4 expression is increased in oedematous human brain tumours. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 72:262-265, 2002.

Sakurada, K; Matsubara, K; Shimizu, K. et al. Pralidoxime iodide (2-pAM) penetrates across the blood–brain barrier. **Neurochem Res**, 28:1401–1407, 2003.

Saleh, AM; Vijayasathy, C; Masoud, L. et al. Paraoxon induces apoptosis in EL4 cells via activation of mitochondrial pathways. **Toxicol Appl Pharmacol**, 190(1):47-57, 2003.

Salvi, RM; Lara, DR; Ghisolfi, ES. et al. Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides. **Toxicol Sci**, 72:267–271, 2003.

Santos, DB; Peres, KC; Ribeiro, RP. et al. Probucol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid β peptide in mice. **Exp Neurol**, 233:767-775, 2012.

Sheridan, C; Delivani, P; Cullen, SP. et al. Bax- or Bak-induced mitochondrial fission can be uncoupled from cytochrome C release. **Mol Cell**, 31(4):570-585, 2008.

Shih, TM; Skovira, JW; O'Donnell, JC. et al. Evaluation of nine oximes on in vivo reactivation of blood, brain, and tissue cholinesterase activity inhibited by organo- phosphorus nerve agents at lethal dose. **Toxicol Mech Methods**, 19:386–400, 2009.

Shih, TM; Skovira, JW; O'Donnell, JC. et al. In vivo reactivation by oximes of inhibited blood, brain and peripheral tissue cholinesterase activity following exposure to nerve agents in guinea pigs. **Chem Biol Interact**, 187:207–14, 2010.

Singh, S; Sharma, N. Neurological syndromes following organophosphate poisoning. **Neurology India**, 48:308–313, 2000.

Sket, D; Brzin, M. Effect of HI-6, applied into the cerebral ventricles, on the inhibition of brain acetylcholinesterase by soman in rats. **Neuropharmacology**, 25:103–107, 1986.

Slotkin, TA. Guidelines for developmental neurotoxicity and their impact on organophosphate pesticides: a personal view from an academic perspective. **Neurotoxicology**, 25:631–640, 2004.

Solberg, Y; Belkin, M. The role of excitotoxicity in organophosphorous nerve agents central poisoning. **Trends Pharmacol. Sci**, 18:183–185, 1997.

Stephens, R; Spurgeon, A; Calvert, IA. et al. Neuropsychological effects of long-term exposure to organophosphates in sheep dip. **Lancet**, 345:1135-1139, 1995.

Sudakin, DL; Mullins, ME; Horowitz, BZ. et al. Intermediate syndrome after malathion ingestion despite continuous infusion of pralidoxime. **J Toxicol Clin Toxicol**, 38:47–50, 2000.

Terry Jr, AV. Functional consequences of repeated organophosphate exposure: Potential non-cholinergic mechanisms. **Pharmacology & Therapeutics**, 134:355–365, 2012.

Valvassori, SS; Fortunato, JJ; Gomes, KM. et al. Acute and subacute exposure to malathion impairs aversive but not non-associative memory in rats. **Neurotox Res**, 12(1):71-79, 2007.

Ventura, F; Hoxter, G; Jamra, M. Hemoglobin: determination using the cyanmethemoglobin method. Use of an artificial solution for the calibration of colorimetric instruments. **Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo**, 22:303–304, 1967.

Zador, Z; Stiver, S; Wang, V. et al. Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. **Handb Exp Pharmacol**, (190):159-170, 2009.

Zanin, M. et al. Agrotóxicos: a realidade do Paraná. Curitiba: Edição da Secretaria do Meio Ambiente do Paraná. 93p, 1992.

Zimmer, LA; Ennis, M; Shipley, MT. Soman-induced seizures rapidly activate astrocytes and microglia in discrete brain regions. **J Comp Neurol**, 378:482–492, 1997.

Zlokovic, BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. **Neuron**, 57(2):178-201, 2008.

Wang, H; Joseph, JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radic Biol Med**, 27: 612-616, 1999.

Wani, WY; Gudup, S; Sunkaria, A. et al. Protective efficacy of mitochondrial targeted antioxidant MitoQ against dichlorvos induced oxidative stress and cell death in rat brain. **Neuropharmacology**, 61(8):1193-1201, 2011.

Wendel, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, 77:325-333, 1981.

Whitton, PS. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. **Br J Pharmacol**, 150(8):963-976, 2007.

Worek, F; Reiter, G; Eyer, P. et al. Reactivation kinetics of acetylcholinesterase from different species inhibited by highly toxic organophosphates. **Arch Toxicol**, 76:523-529, 2002.