

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**EFEITO REATIVADOR DE OXIMAS FRENTE À INIBIÇÃO DA
ENZIMA ACETILCOLINESTERASE CEREBRAL INDUZIDA
POR MALATION E MALAOXON**

ALESSANDRA ANTUNES DOS SANTOS

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Bioquímica
do Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial para a obtenção
do Título de Mestre**

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Farina
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Andreza Fabro de Bem
Departamento de Bioquímica**

FLORIANÓPOLIS, JUNHO DE 2009

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Agrotóxicos	01
1.2. Compostos Organofosforados (OFs)	02
1.2.1. Toxicidade dos Organofosforados	04
1.2.2. Tratamento	06
1.3. Malation	07
1.4. Sistema Colinérgico versus Compostos Organofosforados	09
1.5. Espécies Reativas e Estresse Oxidativo	12
1.5.1. Lipoperoxidação	13
1.6. Sistema de Defesa Antioxidante	14
1.6.1. Glutathiona Reduzida	14
1.6.2. Glutathiona Redutase	15
1.6.3. Glutathiona Peroxidase	16
1.6.4. Catalase	17
1.6.5. Superóxido – Dismutase	18
1.6.6. Estresse Oxidativo	20
1.7. Estresse Oxidativo versus Compostos Organofosforados	20
2. JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivos Gerais	23
3.2. Objetivos Específicos	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1. Reagentes	25
4.2. Animais	25
4.3. Procedimentos experimentais	25

4.3.1.	Estudo <i>in vitro</i>	25
4.3.1.1.	Efeito do malaoxon sobre a atividade da AChE	25
4.3.1.2.	Efeito das oximas sobre a atividade da AChE	26
4.3.2.	Estudo <i>in vivo</i>	26
4.4.	Análises Bioquímicas	27
4.4.1.	Determinação da Atividade da Acetilcolinesterase	27
4.4.2.	Avaliação da Glutaciona Reduzida (NPSH)	27
4.4.3.	Avaliação da atividade Glutaciona Peroxidase (GPx)	28
4.4.4.	Avaliação da atividade Glutaciona Redutase (GR)	28
4.4.5.	Dosagem de Proteínas	28
4.5.	Análise Estatística	28
5.	RESULTADOS	29
5.1.	Módulo 1 – Estudo <i>in vitro</i>	30
5.2.	Módulo 2 – Estudo <i>in vivo</i>	49
6.	DISCUSSÃO	52
7.	CONCLUSÕES	59
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh - acetilcolina
AChE - acetilcolinesterase
ANOVA - Análise de Variância
CAT - catalase
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CIT - Centro de Informações toxicológicas
DL50 - dose letal para 50% de um grupo de animais
DTNB - ácido 5,5 – ditiobis – 2 – nitrobenzóico
ERO - espécies reativas de oxigênio
- SS - pontes dissulfeto
G6PD - glicose- 6 – fosfato desidrogenase
GPx - glutathiona peroxidase
GR - glutathiona redutase
GSH - glutathiona reduzida
GSSG - glutathiona oxidada
GST - glutathiona-S-transferase
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
HEPES – ácido n-2- hidroxietilpiperazina
HO₂[·] - radical hidroperoxil
IC50 – concentração inibitória 50%
L• - radical lipídico
LH - ácido graxo poliinsaturado
LO• - radical alcóxil
LOO• - radical peroxil
LOOH - hidroperóxido lipídico
MDA - malondialdeído
MGP - mercaptopropionilglicina
MMA - malation ácido monocarboxílico
NaCl - cloreto de sódio
NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo
NPSH - grupos tióis não-protéicos
NTE - esterase neurotóxica
O₂•- - radical superóxido
O₂1 - oxigênio singlet
OF - organofosforado
OH• - radical hidroxil
OMS - Organização Mundial da Saúde
OPIDP - polineuropatia tardia induzida por organofosforados
PCA - ácido perclórico

PON - paraoxonase
-SH - grupo sulfidrílico (grupo tiol)
SNA - sistema nervoso autônomo
SNC - sistema nervoso central
SNP - sistema nervoso periférico
SOD - superóxido dismutase
t-BOOH - peróxido de *ter*-butila
TBA - ácido tiobarbitúrico
TBARS - espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA - ácido tricloroacético
TFK - tampão fosfato de potássio
TNB - ácido 2 – nitro-5- mercapto-benzóico
TRIS - tris-(hidroximetil)-aminoetano

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura geral dos compostos organofosforados	02
Figura 2: Inibição, reativação e envelhecimento da enzima AChE	07
Figura 3: Estrutura química do OF malation	08
Figura 4: As vias de bioativação do malation	09
Figura 5: Anatomia das principais vias colinérgicas no cérebro	10
Figura 6: Representação da Acetilcolina em neurônios colinérgicos	11
Figura 7: Oxidantes do metabolismo normal	12
Figura 8: Peroxidação de lipídeos pela reação de radicais livres	13
Figura 9: Reação de redução da GSSG pela GR	15
Figura 10: Reação de detoxificação de H ₂ O ₂ pela GPx	16
Figura 11: Mecanismo de defesa antioxidante	17
Figura 12: Reação de detoxificação de H ₂ O ₂ promovida pela catalase	17
Figura 13: Reação de detoxificação de ânion superóxido promovida pela SOD	18
Figura 14: Representação esquemática da detoxificação de EROs por enzimas antioxidantes	19
Figura 15: Efeito do tratamento com malation, atropina e oximas sobre a atividade da AChE no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos agudos da exposição a compostos organofosforados	05
Tabela 2: Estrutura química das oximas estudadas	24
Tabela 3: Efeito do malation, atropina e oximas sobre níveis de glutathione e sobre as atividades glutathione redutase e peroxidase do córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos	51

RESUMO

O malation é um pesticida organofosforado (OF) e sua toxicidade depende da sua bioativação a malaaxon. O envenenamento por malation tem sido tratado com um antagonista do receptor colinérgico (atropina) e com oximas (principalmente pralidoxima) em uma tentativa de reativar a acetilcolinesterase (AChE) inibida pelo OF. Contudo, o tratamento com pralidoxima não tem sido eficiente para reativar a AChE inibida pelo malaaxon e o seu uso rotineiro tem sido questionado. Um dos objetivos deste estudo foi avaliar a potência *in vitro* de oximas padrão e de oximas recentemente sintetizadas em reativar a AChE derivada do sobrenadante de cérebro de camundongos, após inibição por malaaxon. O malaaxon exibiu um efeito inibitório dependente da concentração contra a AChE cerebral de camundongo ($IC_{50} = 3.18 \mu M$). A pralidoxima demonstrou um significativo, porém modesto efeito de reativação da AChE inibida pelo malaaxon (30% de reativação na concentração de $600 \mu M$). Embora as oximas HI-6 e metoxima exibiram efeitos de reativação similares quando comparadas com a pralidoxima, as oximas obidoxima e trimedoxima mostraram maior eficácia de reativação (em torno de 70% de reativação na concentração de $600 \mu M$). As oximas recentemente desenvolvidas K074 e K075 demonstraram maior efeito de reativação (em torno de 55% de reativação na concentração de $600 \mu M$) quando comparadas com a pralidoxima. Os resultados deste estudo mostram que as oximas padrão obidoxima e trimedoxima e as oximas inéditas K074 e K075 apresentam efeitos de reativação superior da enzima AChE de cérebro de camundongos inibida pelo malaaxon sob condições *in vitro* quando comparadas com a pralidoxima. O segundo objetivo do trabalho foi avaliar o potencial efeito benéfico das oximas K074, K075 e trimedoxima na reversão de efeitos deletérios induzidos pela exposição ao malation na atividade da enzima AChE e em alguns parâmetros de estresse oxidativo em córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos adultos. A administração de malation (na dose de $1,25 \text{ g/kg, s.c.}$) inibiu significativamente (em torno de 50 %) a atividade da enzima AChE no córtex pré-frontal dos animais 24 h após a administração. A oxima padrão pralidoxima ($1/4$ da DL_{50} e em combinação com a atropina) diminuiu significativamente este efeito. A oxima inédita K074 ($1/4$ da DL_{50} e em combinação com a atropina) apresentou baixo efeito de reativação da AChE, enquanto as outras oximas estudadas (trimedoxima e K075; $1/4$ da DL_{50} e em combinação com a atropina) não tiveram efeitos reativadores. A atividade da AChE

hipocampal não foi inibida após exposição aguda ao malation. A exposição ao malation causou uma diminuição significativa na atividade glutatona peroxidase e glutatona redutase no córtex pré-frontal do animal, mas os níveis de glutatona não foram afetados nesta mesma estrutura. Estes resultados demonstraram que a oxima padrão pralidoxima foi o melhor reativador da AChE inibida pelo malation, enquanto que as oximas inéditas K074 e K075 e a oxima padrão trimedoxima apresentaram somente modesto ou nenhum efeito de reativação. Esta aparente contradição entre dados *in vitro* e *in vivo* está provavelmente relacionada com as baixas doses das oximas K074, K075 e trimedoxima usadas no experimento *in vivo*.

ABSTRACT

Malathion is an organophosphate (OP) pesticide whose toxicity depends on its bioactivation to malaoxon. Malathion poisoning has been treated with the cholinergic receptor antagonist atropine and with oximes (mainly pralidoxime) in an attempt to reactivate the OP-inhibited acetylcholinesterase (AChE). However, pralidoxime has not been efficient to reactivate malaoxon-inhibited AChE and its routine use has been questioned. One of the objectives of this study was evaluated the *in vitro* potency of standards and newly developed oximes in reactivating malaoxon-inhibited AChE derived from mouse brain supernatants. Malaoxon displayed a concentration-dependent inhibitory effect toward mouse brain AChE (IC₅₀ = 3.18 μ M). Pralidoxime displayed a significant but modest reactivating effect toward malaoxon-inhibited AChE (30% of reactivation at 600 μ M). Although the oximes HI-6 and metoxime displayed similar reactivating effects when compared to pralidoxime, the oximes obidoxime and trimedoxime showed higher reactivating efficacies (around 70% of reactivation at 600 μ M). The newly developed oximes K074 and K075 showed significant increased reactivating effects (around 55% of reactivation at 600 μ M) when compared to pralidoxime. The results of this study show that standard (obidoxime and trimedoxime) and newly developed (K074 and K075) oximes present superior reactivating effects toward malaoxon-inhibited mouse brain AChE under *in vitro* conditions when compared to pralidoxime. The second objective of this work was to evaluate the potential beneficial effects of the oximes K074, K075 and trimedoxime in reversing hazardous effects induced by the malathion exposure on the activity of the enzyme AChE and on oxidative stress-related parameters in the pre-frontal cortex and hippocampus of adult mice. Malathion administration (at 1.25 g/kg; s.c.) significantly inhibited (around 50 %) the activity of cortical AChE at 24 h after poisoning. The standard oxime pralidoxime ($\frac{1}{4}$ of the LD₅₀ and in combination with atropine) significantly decreased this effect. The newly developed oxime K074 ($\frac{1}{4}$ of the LD₅₀ and in combination with atropine) displayed low reactivating effect while the other studied oximes (trimedoxime and K075; $\frac{1}{4}$ of the LD₅₀ and in combination with atropine) did not show reactivating effects. Hippocampal AChE activity was not inhibited by acute malathion poisoning. Malathion exposure induced a significant decrease in glutathione peroxidase and glutathione reductase in the prefrontal cortex, but glutathione levels were not modified in this

structure. These results indicate that the standard oxime pralidoxime was a better reactivator of malathion-inhibited AChE, while the oximes K075, K074 and trimedoxime displayed only modest reactivating effects. The apparent contradiction between *in vitro* and *in vivo* data is probably related to the low dosages of the oximes K075, K074 and trimedoxime used in the *in vivo* experiments.

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.

Sabe-se que estas substâncias podem ser classificadas quanto à praga que combatem em: herbicida, fungicida, raticida, nematocida, inseticida, acaricida e molusquicida (OMS, 1996).

O emprego de produtos químicos inorgânicos para o controle de pragas remonta as civilizações mais antigas. O uso do arsênio e o cobre como inseticidas foi recomendado pelos chineses no século XVI. No século seguinte, a nicotina e o crisântemo foram os primeiros inseticidas de origem natural a serem utilizados (Cremlyn, 1991; Rusyniak e Nañagas, 2004).

Quanto aos pesticidas organofosforados, em 1936, o químico Alemão Gerhard Schrader sintetizou uma série de compostos organofosforados (OFs) com uso potencial como inseticidas. Schrader conduziu trabalhos que levaram à descoberta dos “agentes nervosos”, especialmente o sarin, tabun e soman, os quais foram, posteriormente, aplicados como agentes químicos em ataques terroristas na Guerra Militar (Khurana e Prabhakar, 2000; Rusyniak e Nañagas, 2004; Kuca et al., 2005; Kassa e Kunesova, 2006).

Zanin e colaboradores (1992) sugerem que o primeiro agrotóxico utilizado no Brasil tenha sido o hexaclorocicloexano (BHC), classificado como composto organoclorado. A expansão de seu uso ocorreu na década de 60, acompanhando o 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).

O uso estimulado de agrotóxicos acarretou em elevados índices de intoxicações induzidas por estas substâncias, seja no campo ou em áreas urbanas. Em um estudo detalhado da realidade das intoxicações humanas por agrotóxicos em Santa Catarina, no ano de 2006, o Centro de Informações Toxicológicas (CIT) atendeu 944 pessoas com diagnóstico de intoxicação por agrotóxicos. Os inseticidas foram à classe de uso majoritariamente implicada nas intoxicações, e os compostos OFs (especialmente o composto Malation) estiveram envolvidos como contaminantes em casos de intoxicações humanas no Estado. Em 18% dos casos, a intoxicação foi devido a exposição ocupacional e cerca de 35 % dos casos foi por tentativas de suicídios.

1.2. Compostos Organofosforados (OFs)

Os pesticidas mais utilizados na agricultura são os compostos organofosforados (OFs), que derivam do ácido fosfórico e tiofosfórico e geralmente são aplicados como inseticidas. A estrutura geral dos compostos OFs está representada abaixo (Abdollahi, 2004b; Brocardo, 2004; Costa, 2006; de Silva, 2006).

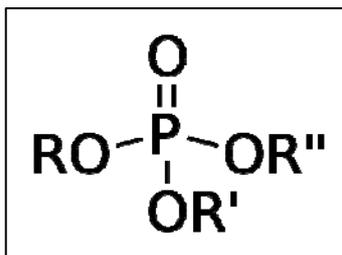


Figura 1: Estrutura geral dos compostos organofosforados. O átomo de fósforo (P) pode estar ligado através de uma dupla ligação com o oxigênio (O) ou com o enxofre. R e R' representam grupos alcoxil. R''= grupo substituível. Adaptado de Costa, 2006

O uso generalizado desses compostos tem causado poluição ambiental e risco potencial à saúde, incluindo casos crônicos e agudos de intoxicações, tanto em animais quanto humanos (Abdollahi, 2004b). Além disso, alguns dados revelam que os mesmos podem ser utilizados em tentativas de suicídio (Maroni et al., 2000; Costa, 2006), corroborando com as estatísticas do estado de Santa Catarina.

Como exemplo de compostos OFs estão: o malation, o paration, o diazinon, o fention, o diclorvos, o clorpirifos, o ecotiofato, o isoflurofato, o triclofon, os quais podem ser facilmente encontrados em estabelecimentos comerciais de produtos agropecuários (Maroni et al., 2000; Kushik e Chandrabhan, 2003; Petroianu et al, 2006).

A exposição aos OFs 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 desses produtos. 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 (homicídio e suicídios) (de Silva, 2006).

Os OFs 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).

Após absorvidos, os OFs interagem quimicamente e inibem a função de, principalmente, dois tipos de proteínas (enzimas da classe das acetilcolinesterases - AChEs):

- a) acetilcolinesterase específica, verdadeira ou acetilcolinesterase, (AChE) encontrada principalmente nas sinapses do SNC, periférico parassimpático e junção neuromuscular;
- b) butirilcolinesterase, pseudocolinesterase ou acetilcolinesterase inespecífica (BChE), encontrada no plasma, no intestino e, em menor concentração, em outros tecidos. A AChE está também presente nos eritrócitos (Carvalho e Ribeiro, 2001; Kushik e Chandrabhan, 2003; Costa et al., 2004).

Os OFs podem sofrer metabolismo, principalmente a nível hepático, podendo resultar em metabólitos tóxicos (inibidores de enzimas colinesterases). Compostos que possuem na sua estrutura química uma dupla ligação entre os átomos de enxofre e fósforo (P=S) necessitam de uma bioativação metabólica para que sua atividade

biológica (inibição de enzimas colinesterases) seja manifestada. Em contraste, os compostos OFs que possuem uma dupla ligação entre os átomos de oxigênio e fósforo P=O em sua estrutura química são inibidores efetivos da enzima AChE, sendo desnecessário um processo metabólico para que exerçam sua ação biológica. Essa bioativação consiste em uma desulfuração oxidativa realizada por enzimas Citocromo P 450 (principalmente no fígado), resultando na formação de um “oxon” (P=O).

Costa (2006) cita outra importante classe de enzimas chamadas fosfotriesterases (também conhecidas como A-esterases) que desempenham suas atividades catalíticas hidrolisando os compostos OFs, 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 OFs. 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 OFs (Furlong et al., 2005).

Outras reações de hidrólises, porém não-catalíticas, também ocorrem quando compostos OFs fosforilam resíduos de serina das esterases, classificadas como B-esterases, as quais são inibidas durante uma exposição aos compostos OFs. As carboxilesterases, BChEs e AChEs são exemplos de B-esterases. De particular importância, a carboxilesterase também efetua uma hidrólise catalítica no composto OF malation, o que o torna menos tóxico aos mamíferos. Os OFs não são acumulados no organismo humano, sendo facilmente degradados e excretados, principalmente através da urina, quase sempre nas primeiras 24 horas (Costa, 2006).

1.2.1. Toxicidade dos OFs

A ação tóxica dos compostos OFs está relacionada à inibição de numerosas enzimas, porém, as esterases parecem ser as mais importantes clinicamente. A inibição da AChE ocorre através do processo de fosforilação do grupo hidroxila do resíduo de serina da enzima. Com isso, a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) será comprometida, levando ao acúmulo deste neurotransmissor nas sinapses do sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). Desta forma, haverá uma hiperestimulação dos receptores muscarínicos e nicotínicos (receptores colinérgicos) desencadeando uma variedade de sinais e sintomas que caracterizarão a “síndrome colinérgica” (Chanda e Pope, 1995; Abou-Donia et al., 2003; Ankarberg,

2004; Brocardo, 2004; Rusyniak e Nañagas, 2004; Slotkin, 2004; Calic et al., 2006; Roberts e Aaron, 2007).

As manifestações clínicas mais proeminentes da intoxicação por OFs estão separadas em categorias que se relacionam aos seus sítios de ação: SNC, SNA e junção neuromuscular, como mostra a Tabela 1 (Abdollahi, 2004b; Rusyniak e Nañagas, 2004).

Tabela 1: Efeitos agudos da exposição a compostos organofosforados. Adaptado de Rusyniak e Nañagas, 2004.

Receptor	Órgão	Efeito clínico
Sistema Nervoso Autônomo		
Muscarínico Pós-Ganglionar (Parassimpático)	Olhos	Miose, lacrimação
	Boca	Salivação
	Pulmão	Broncorréia, broncoespasmo
	Coração	Bradirritmia
	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

Alguns OFs podem causar um tipo de toxicidade conhecida como Polineuropatia Tardia induzida por OFs (OPIDP). Esta geralmente é evidenciada 14-28 dias após o episódio agudo do envenenamento a compostos OFs, 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 a observada da 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 por OFs. 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 esfínteres também podem ocorrer (Johnson, 1969; Faria et al., 1999).

Alguns estudos epidemiológicos têm evidenciado que a lesão primária na OPIDP é pela mudança degenerativa (danos nos segmentos neuríticos e na bainha mielínica) em axônios e terminais sinápticos, afetando tanto fibras nervosas periféricas quanto centrais (Lotti, 1992; Ehrich e Jortner, 2001; Jamal et al., 2002; Lotti, 2005; Costa, 2006; de Silva et al., 2006).

1.2.2. Tratamento

Alguns fármacos de rotina são utilizados para o tratamento antídoto à intoxicação por OFs. 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 (geralmente uma molécula da classe das oximas) (Kuca et al., 2005; Petroianu et al., 2006).

O sulfato de atropina, que apresenta uma configuração química semelhante à da Ach, age por um mecanismo de competição, inibindo a ação da Ach sobre o 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 OFs. 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 AChE, deslocando a ligação dos OFs junto ao sítio esterásico por serem doadores de próton H^+ , estabelecendo ligação oxima-OF, reativando 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.

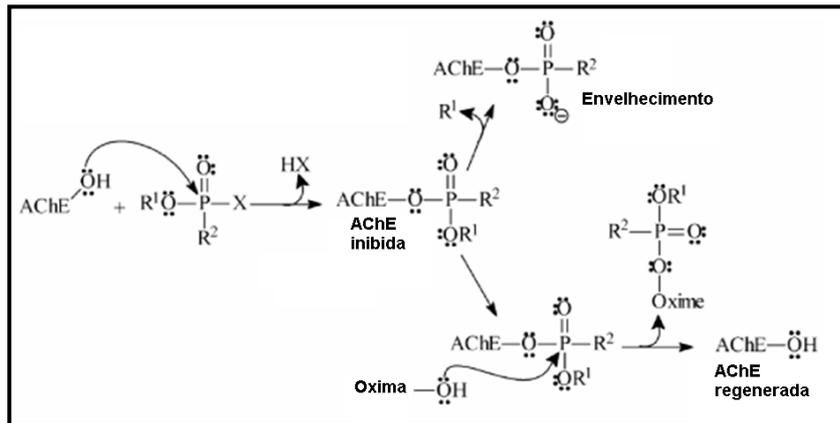


Figura 2: Inibição, reativação e envelhecimento da enzima AChE. Adaptado de Gonçalves et al; 2006.

1.3. Malation

Dentre os OFs mais utilizados no Brasil, destaca-se o malation (éster dietil dimetoxifosfotiol - Figura 3), que é utilizado nas áreas rurais e urbanas em uma variedade de situações (erradicações de insetos, formigas e até piolhos). O malation é amplamente utilizado devido a sua alta eficácia como inseticida e sua baixa toxicidade em mamíferos

quando comparado a outros OFs. Entretanto, impurezas presentes na sua formulação podem aumentar sua toxicidade (Maroni et al., 2000; Meinking et al., 2004).

O malation pode causar alterações bioquímicas e fisiológicas nos eritrócitos e linfócitos, além de induzir uma série de aberrações cromossômicas em animais (Banerjee et al., 1999; Giri et al., 2001; Amer et al., 2002).

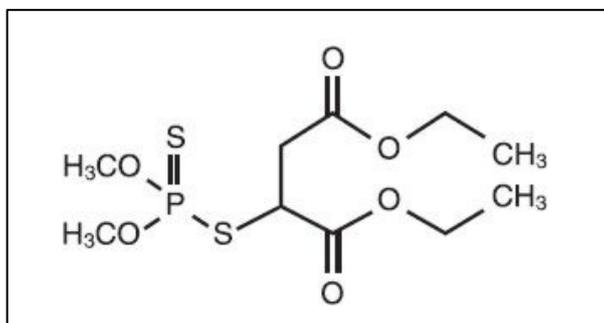


Figura 3: Estrutura química do OF malation. Fonte: Buratti et al., 2004.

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 (U.S. EPA, 2000; 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 (catalisada pelo Citocromo P-450), que por sua vez também pode ser degradado pela carboxilesterase (Buratti et al., 2004 - Figura 4).

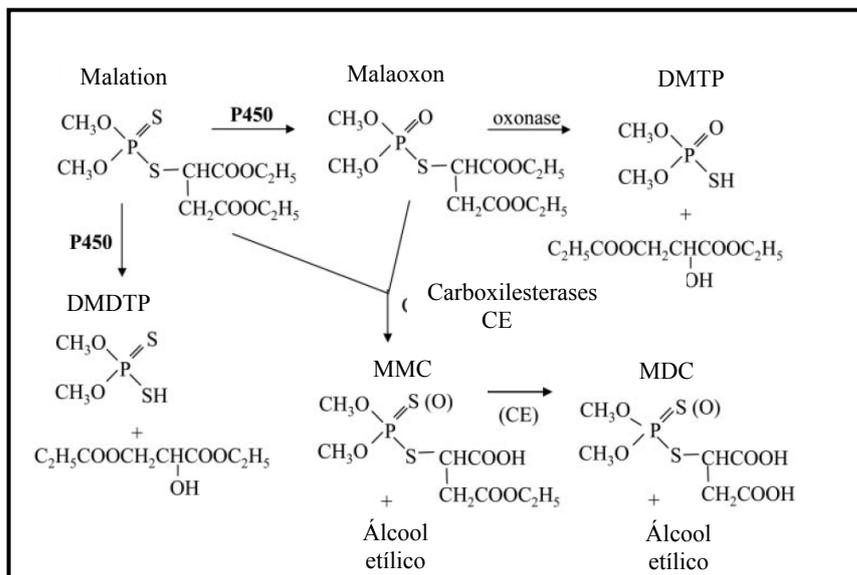


Figura 4: As vias de bioativação do malation. DMTP, dimetiltiofosfato; DMDTP, dimetilditiofosfato; MMC, malation ácido monocarboxílico; MDC, malation ácido dicarboxílico. Adaptado de Buratti et al ; 2004.

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).

Os efeitos da intoxicação aguda em populações expostas por malation são semelhantes ao descrito pelos compostos OFs, no item 1.2.1.

1.4. Sistema Colinérgico versus Compostos OFs

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 parasimpáticas 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.

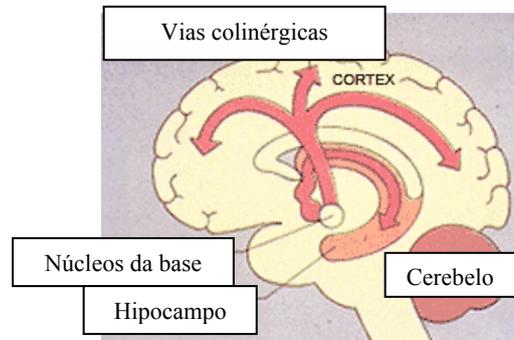


Figura 5: Principais vias colinérgicas no encéfalo. Adaptado de Woolf, 1991.

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 composto, com formação de colina e ácido acético, catalisada pela AChE (Figura 6) (Silman & Sussman, 2005).

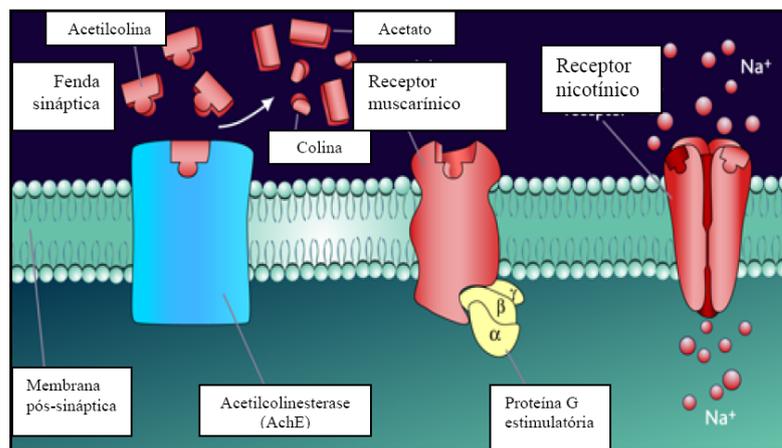


Figura 6: Representação esquemática da Acetilcolina em neurônios colinérgicos.

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).

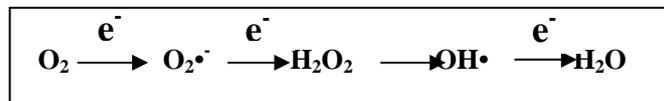
Tendo em vista que os compostos OFs causam inibição da enzima AChE, levando à perda da homeostase colinérgica, tais compostos OFs podem causar inúmeros distúrbios neuroquímicos, neurocomportamentais e neuromorfológicos. Dentre as alterações provocadas por esses compostos estão: mudança na conformação dos receptores colinérgicos e na densidade dos mesmos, citotoxicidade, vacuolização citoplasmática, aumento no espaço intercelular, apoptose, alteração em cascatas de sinalização celular, diminuição no número de células cerebrais, na comunicação sináptica, proliferação da célula da glia, comprometimento na inervação colinérgica em diferentes áreas cerebrais. Tais modificações podem refletir em distúrbios neuropsiquiátricos, como alterações locomotoras, ansiedade, depressão,

perda de memória e déficits de aprendizagem (Eyer, 1995; Slotkin, 2004; De Silva, 2006).

1.5. Espécies Reativas e Estresse Oxidativo

O termo “radical livre” define qualquer molécula que possui elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo, considerado agente oxidante. Dentre os oxidantes mais importantes envolvidos em processos patológicos estão as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as de nitrogênio (ERN). As principais ERO distribuem-se em dois grupos, as radicalares: superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila (OH^{\bullet}) peroxila (ROO^{\bullet}) e alcóxila (RO^{\bullet}); e as não-radicalares: oxigênio singlete (O_2^1), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso ($HClO^{\bullet}$). Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico (NO^{\bullet}), o óxido nitroso (N_2O) e o peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$), dentre outros. A maioria destes compostos é altamente reativa, com tempo de vida bastante curto. Eles são formados *in vivo* durante o metabolismo celular normal e, também, quando o organismo é exposto a uma série de estímulos tóxicos, como radiação ionizante e xenobióticos diversos (Comporti, 1989; Gillham et al., 1997, Barreiros et al., 2006).

As ERO são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . Durante esse processo, são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroperoxil (HO_2^{\bullet}) e hidroxil (OH^{\bullet}), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria, e a reatividade das ERO é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons (Figura 7) (Cohen, 1989).



e^-

Figura 7: Oxidantes do metabolismo normal. e^- = elétron. Adaptado de Ames et al., 1993.

1.5.1. Lipoperoxidação

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERO, porém, a membrana é uma das mais atingidas em decorrência da peroxidação lipídica (lipoperoxidação) que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das mesmas. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malondialdeído e hidroxinonenal), culminando com a morte celular. A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos. Salienta-se que os processos de lipoperoxidação nem sempre são prejudiciais, já que seus produtos são importantes na formação de prostaglandinas e, portanto, na resposta inflamatória. Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (Mello Filho et al., 1983; Hershko, 1989; Halliwell e Gutteridge, 1990; Shan et al., 1990; Ross e Moldeus, 1991).

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (Figura 8). Estas etapas estão apresentadas nas reações seguintes, onde L representa o lipídio (Gardès-Albert M, 1991):

$LH + OH\cdot$ (ou $LO\cdot$) \longrightarrow $L\cdot + H_2O$ (ou LOH)	Iniciação
$L\cdot + O_2 \longrightarrow LOO\cdot$	Propagação
$LH + LOO\cdot \longrightarrow L\cdot + LOOH$	Propagação
$LOO\cdot + L\cdot \longrightarrow LOOL$	Terminação
$LOO\cdot + LOO\cdot \longrightarrow LOOL + O_2$	Terminação

Figura 8: Peroxidação de lipídeos pela reação de radicais livres.
Adaptado de Salvador e Henrique, 2004.

As reações acima se iniciam com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana celular. Tal seqüestro pode ser realizado pelo $OH\cdot$ ou pelo $LO\cdot$ (radical alcóxil), com conseqüente formação do $L\cdot$ (radical lipídico). Na primeira equação de

propagação, o L• reage rapidamente com o O₂, resultando em LOO• (radical peroxil), que, por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo polinsaturado, formando novamente o L• na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais (L• e LOO•) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem a si próprios.

A lipoperoxidação pode ser catalisada por íons ferro, por conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais altamente reativos (alcoxil, LO• e peroxil, LOO•), que, por sua vez, iniciam nova cadeia de reações, denominada ramificação (Borg et al., 1988). O radical hidroxil (OH•) é freqüentemente reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante da lipoperoxidação (Gutteridge, 1988; Halliwell e Gutteridge, 1990).

1.6. Sistemas de Defesa Antioxidante

Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes pró-oxidantes (como as ERO) e os sistemas de defesas antioxidantes. Como descrito anteriormente, esses agentes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do O₂ e também em situações não-fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos que provocam a redução incompleta de O₂. Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que este cause lesão. Esta linha é constituída por glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GPx) e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona redutase (GR) e pela GPx, entre outros. Com exceção da vitamina E (α - tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (Hebbel, 1986; Ross e Moldeus, 1991).

1.6.1. Glutathiona reduzida (GSH)

A glutathiona reduzida (GSH, L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular. Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, presente na cisteína. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes

como íons ferro, oxigênio hiperbárico, radiação e luz ultravioleta. Além disto, diminui a suscetibilidade à lesão renal decorrente da isquemia e reperfusão; atua como transportadora e reservatório da cisteína e participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação. Ainda, é requerida para a síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas (Meister e Anderson, 1983; Deneke e Fanburg, 1989; Shan, 1990; Galleano e Puntarulo, 1995).

1.6.2. Glutationa redutase

Após exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG (glutationa oxidada) (Figura 10). A recuperação da GSH é feita pela enzima GR, uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular. Habitualmente, a reserva intracelular de GR é alta e somente uma grave deficiência desta enzima resultará em sinais clínicos. A GR é uma flavoproteína dependente da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) e, portanto, também dependente da integridade da via das pentoses. Sob condições de diminuição do fornecimento de NADPH, como no jejum e na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), há prejuízo da função da GR (Van Asbeck et al., 1985; Hebbel, 1986; Frisher e Ahmed, 1987; Gilbert e Mc Lean, 1990; Shan, 1990; Ross e Moldeus, 1991; Matsubara et al., 1992).

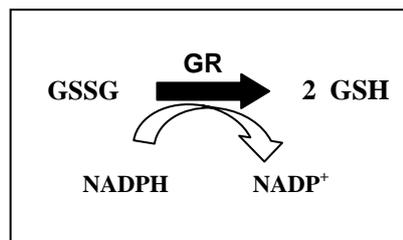


Figura 9: Reação de redução da GSSG pela GR. Nesta reação, é usando o NADPH como co-enzima. Adaptado de Salvador e Henrique, 2004.

1.6.3. Glutationa peroxidase

A família das enzimas glutaciona-peroxidase (GPx) catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos orgânicos para água e seus correspondentes alcoóis às custas da conversão da GSH a GSSG (Figura 10), tanto no citosol quanto nas membranas e mitocôndrias (Hebbel, 1986; Shan, 1990). Interessantemente, tal enzima é inibida por alguns xenobióticos eletrofílicos, tais como metais pesados (Farina et al., 2005). Além disso, tal enzima parece ser inibida pelo composto OF malation (Brocardo et al., 2007). Este fenômeno parece ser responsável, ao menos em parte, pela peroxidação de lipídeos induzida por este OF.



Figura 10: Reação de detoxificação de H_2O_2 pela GPx. Adaptado de Possamai, 2005.

A razão entre GSH e GSSG em células normais é alta, pois existe um mecanismo de redução da GSSG que é catalisado pela enzima glutaciona redutase, conforme descrito anteriormente (Figura 9).

A glutaciona desempenha também um importante papel na detoxificação de xenobióticos e vários compostos endógenos, como prostaglandinas, leucotrienos e hidroperóxidos orgânicos, por meio de reações mediadas pela glutaciona transferase (Possamai, 2005).

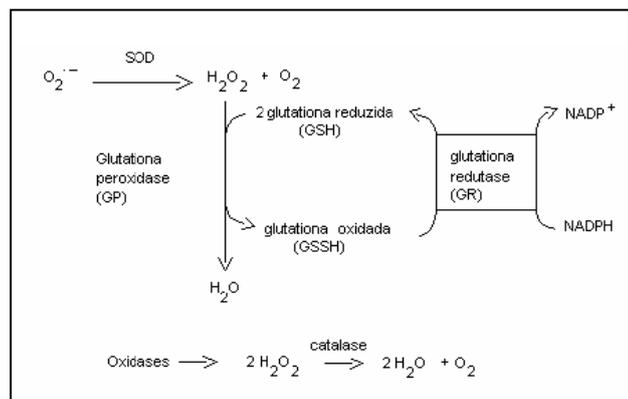


Figura 11: Mecanismo de defesa antioxidante. Adaptado de Possamai, 2005.

1.6.4. Catalase

A catalase é uma hemeoproteína que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 (Figura 12). É encontrada principalmente no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado (Mayes, 1990). No SNC, tal enzima apresenta uma grande importância por auxiliar a enzima GPx na detoxificação de H_2O_2 , prevenindo danos oxidativos (Dringen et al., 2005).



Figura 12: Reação de detoxificação de H_2O_2 promovida pela catalase (Andreazza et al., 2004).

Em células eucarióticas, existem catalases citosólicas e peroxissomais, estando presentes principalmente nos peroxissomas. Por não possuírem peroxissomas, alguns órgãos estão mais expostos aos danos provocados pela produção de ERO, como o coração, os pulmões e o cérebro. Nesses órgãos, um mecanismo de defesa pode ser a difusão do H_2O_2 para o sangue, onde reagem com a catalase eritrocitária (Possamai, 2005).

1.6.5. Superóxido-dismutase (SOD)

A SOD corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Nos sistemas eucariontes existem duas formas de SOD. A forma SOD-cobre-zinco está presente principalmente no citosol, enquanto que SOD-manganês está localizada primariamente na mitocôndria. Esta enzima também tem papel antioxidante, já que catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , na presença do próton H^+ (Figura 13) (Acharya et al., 1991). Tal enzima está implicada em uma série de processos neurodegenerativos (Rotilio et al., 2003). Além disso, a expressão desta enzima parece ser estimulada após a exposição ao OF malation (Fortunato et al., 2006).

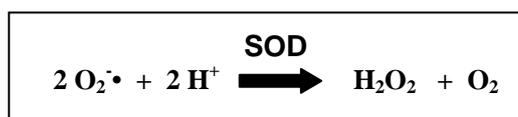


Figura 13: Reação de detoxificação de ânion superóxido promovida pela SOD (Andreazza et al., 2004)

As enzimas acima citadas atuam de forma cooperativa para neutralizar os efeitos deletérios de ERO gerados endogenamente durante os processos fisiológicos normais ou em condições de desequilíbrio oxidativo induzido por toxicantes xenobióticos. A figura 14 resume a função de tais enzimas nos processos de detoxificação de ERO.

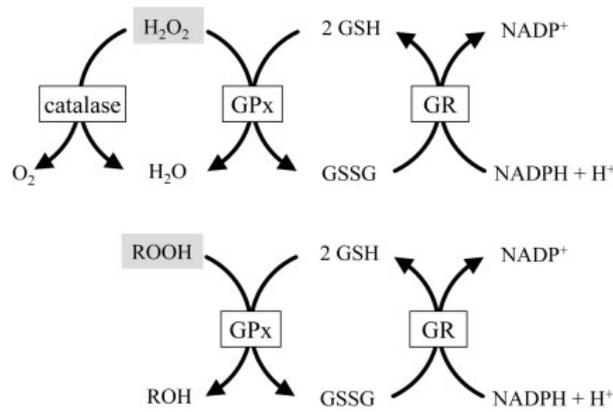


Figura 14: Representação esquemática da detoxificação de EROs por enzimas antioxidantes. Adaptado de Dringen et al., 2005.

Além dos antioxidantes citados, a vitamina E confere proteção à membrana celular por atuar como quelante dos oxidantes produzidos durante a lipoperoxidação. É um importante antioxidante lipofílico, mas esta função poderá estar limitada em situações de sobrecarga de ferro. O α -caroteno interage com as ERO especialmente quando ocorrem baixas tensões de O_2 , enquanto que a vitamina E se mostra mais eficiente quando há altas tensões de O_2 no meio. A vitamina C, ou ascorbato, é um antioxidante hidrossolúvel que pode neutralizar diretamente as ERO; porém, pode funcionar como pró-oxidante quando em dose elevada, ou quando exposta ao metal, levando à lipoperoxidação (Hebbel, 1986).

Ao lado dos antioxidantes vitamínicos disponíveis em medicamentos, destacam-se também os derivados tíóis, entre eles a N-acetilcisteína e mercaptopropionilglicina (MGP). Tais derivados são antioxidantes sintéticos que contêm o grupo-SH em sua composição (Jepsen et al., 1992; Kollef e Shuster, 1995; Fontana et al., 1996).

1.6.6. Estresse Oxidativo

Sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema antioxidante protetor, haverá desequilíbrio caracterizado como “estresse oxidativo”. Sugere-se que a magnitude do estresse oxidativo pode ser monitorada pela razão GSSG/GSH (Halliwell, 1993). De fato, o excesso de GSSG resulta em ambiente mais oxidante, que favorece a formação de pontes dissulfeto (-SS-) nas proteínas portadoras de grupamento tiol (-SH). As pontes dissulfeto oxidam estas proteínas, com prejuízo de suas funções. Esta oxidação é reversível à custa da ação de compostos antioxidantes, como a GSH (Gilbert e Mc Lean, 1990). Neste contexto, sabe-se que o estresse oxidativo está relacionado com muitas desordens neurológicas, tais como a doença de Alzheimer (Meydani et al., 2001; Kedar, 2003), Parkinson (Mariani et al., 2005), além de neurotoxicidade induzida pela exposição à xenobióticos, tais como os OFs (Kehrer, 1993).

1.7. Estresse Oxidativo versus Compostos Organofosforados

O SNC é muito susceptível ao estresse oxidativo. Alguns dos fatores que contribuem para essa maior suscetibilidade são: o elevado consumo de oxigênio cerebral, os níveis relativamente baixos de defesas antioxidantes no cérebro, o alto nível de ácidos graxos poliinsaturados (membrana com bicamada fosfolipídica) nas membranas neuronais e o alto teor de ferro encontrado em todo o tecido cerebral. Além disso, muitos neurotransmissores são moléculas auto-oxidáveis o que leva o metabolismo cerebral a gerar ERO (Tsakiris et al., 2000; Slotkin, 2005).

Apesar da inibição enzimática da AChE após a exposição a OFs ser bem caracterizada, pesquisadores vêm evidenciando ao longo dos anos, que outros alvos bioquímicos podem ser afetados pelos OFs. Além disso, a natureza lipofílica desses compostos facilita sua interação com as membranas das células e levam ao rompimento da bicamada fosfolipídica (Fortunato et al., 2006).

A toxicidade dos OFs pode estar associada à indução de estresse oxidativo, através da geração de radicais livres e alterações no sistema de enzimas antioxidantes (Kovacic, 2003; Abdollahi et al., 2004b; Brocardo et al., 2005; Delgado et al., 2006; Fortunato et al., 2006; Trevisan et al., 2008; Franco et al., 2009).

Alguns estudos têm demonstrado que a exposição ao malation aumenta os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúricos (TBARS), um parâmetro comumente utilizado para avaliar

lipoperoxidação, em eritrócitos, fígado e cérebro de ratos. Outros estudos indicam que a atividade das enzimas antioxidantes pode estar aumentada ou diminuída, ou ainda, inalterada no fígado, cérebro e eritrócitos de animais tratados com este OF (Srikanth e Seth, 1990; Bagchi et al., 1995; Pedrajas et al., 1995; Ahmed et al., 2000; John et al., 2001; Akhgari et al., 2003; Hazarika et al., 2003). Estes resultados aparentemente discordantes pode ser devido às diferenças na exposição ao malation, à distribuição tecidual, a idade dos animais entre outros fatores. De qualquer forma, há evidências de que a ocorrência de estresse oxidativo é um fenômeno bastante importante que contribui para a neurotoxicidade de compostos OFs (Slotkin & Seidler, 2007), incluindo o malation (Fortunato et al., 2006; Brocardo et al., 2007).

2. JUSTIFICATIVA

São inúmeros os estudos indicando que os pesticidas, incluindo os inseticidas OFs, representam um sério risco à saúde pública. Cerca de um milhão de casos letais não intencionais e dois milhões de envenenamentos são reportados no mundo todo a cada ano (Maroni et al; 2000). 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 OFs, 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.

As oximas têm sido investigadas por muitos anos como compostos que possuem grande potencial no tratamento de envenenamentos por compostos OFs. Apesar disso, no momento, somente quatro oximas piridinium (TMB-4, pralidoxima, HI-6 e obidoxima) têm encontrado aplicação clínica (Jokanović and Stojiljković, 2006; Antonijevic and Stojiljkovic, 2007), contudo, o tratamento com essas oximas ainda têm desvantagens, tais como baixa eficácia reativadora e alta toxicidade. Isto sugere a necessidade da busca por reativadores da enzima AChE de amplo espectro e com maior eficácia que os disponíveis clinicamente (Kassa, 2002). Dados recentes mostram que mudanças estruturais nesses reativadores têm cooperado para uma maior capacidade de reativação enzimática, a qual reflete positivamente na atenuação de sinais e sintomas neurotóxicos induzidas pelos compostos OFs (Kassa et al, 2006; Kassa e Kunesova, 2006).

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.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Comparar oximas inéditas (K026, K027, K048, K074 e K075) com oximas atualmente disponíveis na clínica (Pralidoxima, Trimedoxima, Obidoxima, HI-6 e Metoxima) quanto aos seus potenciais efeitos benéficos contra o dano induzido por malation (e seu metabólito malaaxon) *in vitro* e *in vivo*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

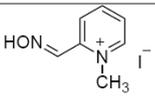
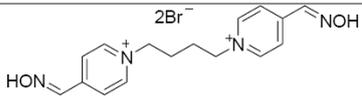
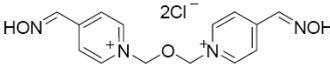
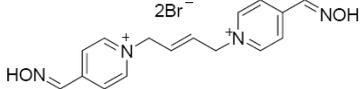
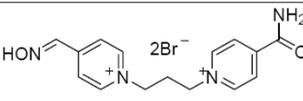
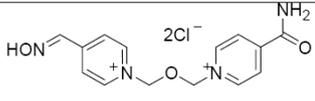
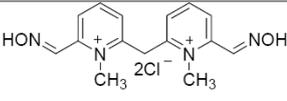
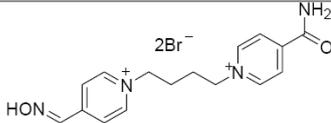
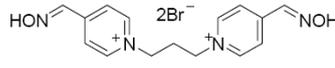
- a. Determinar o potencial efeito inibitório *in vitro* do malaaxon sobre a atividade da enzima AChE de sobrenadante tecidual de cérebro de camundongos;
- b. Determinar o efeito *in vitro* das oximas K026, K027, K048 K074, K075, Pralidoxima, Trimedoxima, Obidoxima, HI-6 e Metoxima em reverter a inibição da atividade da enzima AChE provocada pelo malaaxon em sobrenadante tecidual de cérebro de camundongos;
- c. Avaliar o efeito da exposição *in vivo* de camundongos ao malation sobre a atividade da AChE no córtex pré-frontal e hipocampo dos animais;
- d. Avaliar o efeito da exposição *in vivo* de camundongos ao malation sobre variáveis bioquímicas relacionadas com o estresse oxidativo (atividade das enzimas glutaciona peroxidase, glutaciona redutase e níveis de glutaciona) no córtex pré-frontal e hipocampo dos animais;
- e. Avaliar o efeito das oximas K074, K075, trimedoxima e pralidoxima em proteger de alterações bioquímicas (atividade das enzimas AChE, glutaciona peroxidase, glutaciona redutase e níveis de glutaciona) induzidas pela exposição ao malation em córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes:

As oximas testadas foram gentilmente cedidas pelo Dr Kuca Kamil, 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 estudadas

 <p>Pralidoxima</p>	 <p>K074</p>
 <p>Obidoxima</p>	 <p>K075</p>
 <p>K027</p>	 <p>HI-6</p>
 <p>Methoxima</p>	 <p>K048</p>
 <p>Trimedoxima</p>	

Ácido 5,5 ditiobis 2-nitrobenzóico, Comassie Blue, Albumina de soro bovino, Nicotinamida adenina dinucleotídeo fostato reduzida,

Glutathione oxidada, Glutathione redutase, Glutathione reduzida, Peróxido de *ter*-butila, Iodeto de Acetilcolina e Malaoxon 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).

4.2. Animais:

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos adultos, com idade de 2 a 3 meses de idade, pesando entre 35 - 45 gramas, provenientes do Biotério Central da UFSC. 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 o protocolo número (313/CEUA; 23080.026023/2004-39/UFSC).

4.3. Procedimentos experimentais:

4.3.1. Estudo *in vitro*: Efeito do malaoxon e das oximas padrão (pralidoxima, trimedoxima, metoxima, obidoxima) e inéditas (K026, K027, K048, K074 e K075) sobre a atividade da enzima AChE de sobrenadante tecidual de cérebro de camundongos.

Preparação tecidual: Os camundongos foram eutanaziados por decapitação. O cérebro foi imediatamente removido e homogeneizado em 15 volumes de tampão HEPES 20 mM pH 7,4 e centrifugado a 1000 x g a 4°C por 5 minutos. Os sobrenadantes obtidos foram utilizados para as incubações com malaoxon e/ou oximas de acordo com os seguintes protocolos:

4.3.1.1 - Efeito do malaoxon sobre a atividade da AChE:

Os sobrenadantes teciduais foram incubados com crescentes concentrações de malaoxon (0µM, 1µM, 3µM, 5µM e 7 µM, dissolvido em DMSO) em um meio contendo 135 mM de tampão fosfato (pH 8) por 30 min a 37°C. A concentração final de DMSO no meio de reação

foi 1%. Passado o período de incubação, realizou-se a análise da atividade da AChE (item 4.4.1).

4.3.1.2 - Efeito das oximas sobre a atividade da AChE:

A reativação da AChE inibida pelo malaoxon foi realizada imediatamente após a sua inibição por 3 μM de malaoxon. Esta concentração foi escolhida com base no estudo anterior, no qual a inibição da AChE foi dependente da concentração. Dez minutos após a adição das oximas (0 μM , 20 μM , 60 μM , 100 μM , 200 μM e 600 μM), alíquotas de 25 μL foram utilizadas para a medida da atividade da enzima (item 4.4.1).

Para determinar se a reativação feita pelas oximas sobre a atividade da AChE era tempo dependente, foi realizada uma cinética de reativação onde analisou-se a atividade da enzima nos tempos de 0, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos. Observou-se que a reativação enzimática aos 10 minutos foi a máxima, pois não diferiu dos demais tempos. Assim, trabalhou-se apenas com o tempo 10 minutos.

4.3.2. Estudo *In Vivo*: Determinação do papel das oximas K074, K075, trimedoxima e pralidoxima sobre o efeito *in vivo* do malation na atividade da enzima AChE e parâmetros relacionados ao estresse oxidativo em córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos.

O estudo *in vivo* foi realizado com as oximas que obtiveram os melhores resultados *in vitro*. Trinta e cinco animais (machos adultos) foram agrupados em sete grupos com cinco animais cada. O tratamento consistiu de uma única injeção de salina (NaCl 0,9% - 10 mL/kg) pelas vias subcutânea, intraperitoneal e intramuscular, ao grupo controle. Os demais grupos receberam uma única injeção subcutânea de malation na dose de 1,25 g/kg. Cinco dos sete grupos expostos ao malation receberam também uma injeção intraperitoneal de sulfato de atropina (20 mg/kg). As oximas selecionadas no estudo *in vitro* foram administradas via intramuscular ($\frac{1}{4}$ DL₅₀). Todos os compostos foram administrados quase sucessivamente de acordo com o protocolo:

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

Grupo 2 - Malation (s.c.) + salina (i.p.) + salina (i.m.);
Grupo 3 - Malation (s.c.) + atropina (i.p.) + salina (i.m.);
Grupo 4 - Malation (s.c.) + atropina (i.p.) + K074 (5,8 mg/kg, i.m.);
Grupo 5 - Malation (s.c.) + atropina (i.p.) + K075 (10,75 mg/kg, i.m.);
Grupo 6 - Malation Malation (s.c.) + atropina (i.p.) + trimedoxima (37,6 mg/kg, i.m.);
Grupo 7 - Malation Malation (s.c.) + atropina (i.p.) + pralidoxima (65,9 mg/kg, i.m.).

Todas as doses utilizadas no presente trabalho ($\frac{1}{4}$ DL₅₀) foram baseadas em trabalhos prévios na literatura (Kuca et al., 2004; Kassa et al; 2005; Kassa and Humlicek; 2008).

Preparação tecidual: Após 24 horas da administração das substâncias, os animais foram eutanaziados por decapitação e o córtex pré-frontal e hipocampo foram homogeneizados em 10 volumes de tampão TFK 50 mM, pH 7,4 para posterior dosagens bioquímicas. Os homogenatos foram centrifugados a 1.000 x g por 5 minutos a 4°C para a obtenção do sobrenadante que foi utilizado na determinação da atividade da AChE (item 4.4.1). Para a determinação dos níveis de glutatona e da atividade da glutatona peroxidase e glutatona redutase os homogenatos foram centrifugados a 16.000 x g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante gerado foi utilizado nas análises.

4.4. Análises Bioquímicas:

4.4.1. Determinação da Atividade da Acetilcolinesterase (AChE): O método baseia-se na produção de tiocolina, a partir da hidrólise da acetiltiocolina. Isto é acompanhado por uma reação da tiocolina com ácido 5',5 – ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) para produzir o ânion ácido 2-nitro-5-mercaptop -benzóico (TNB) com cor amarela (Ellman et al., 1961).

4.4.2. Avaliação da Glutaciona Reduzida: Os grupamentos tióis não-proteicos (NPSH) nas amostras foram determinados usando reagente de Ellman, 5,5-ditiobis 2-nitrobenzoato (DTNB). A amostra (40µL do sobrenadante) foi misturada com 40 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10%. Após, as amostras foram centrifugadas a 16.000 x g por 10 min. Os NPSH foram quantificados pela adição de 60 µL do sobrenadante ácido/desproteínizado em 125 µL de TFK 1M, pH 7,0 e 25 µL de DTNB 10mM. O monitoramento da concentração dos grupos tióis foi avaliando através da medida da absorbância em 405 nm devido ao produto

resultante da reação de NPSH (90% GSH) com DTNB, que gerou o TNB de cor amarela (Ellman, 1959).

4.4.3. Avaliação da atividade Glutaciona Peroxidase (GPx): A GPx catalisa a redução de H_2O_2 , bem como outros lipoperóxidos, 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 (Wendel, 1981).

4.4.4. Avaliação da atividade Glutaciona Redutase (GR): A GR catalisa a redução da glutaciona oxidada (GSSG) através da oxidação do NADPH. Ao utilizar o substrato GSSG, a enzima leva ao consumo de NADPH, que é acompanhado em 340 nm. A velocidade de consumo de NADPH, em condições de saturação, expressa a atividade enzimática (Carlberg e Mannervik, 1985).

4.4.5. Dosagem de Proteínas: O conteúdo de proteínas foi quantificado pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino como padrão.

4.5. Análise Estatística: Foi efetuada a análise de variância (ANOVA) de uma ou de duas vias, de acordo com o protocolo experimental, seguida do teste post-hoc de Bonferroni ou de Dunnett, quando apropriado. As diferenças entre as médias foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Os resultados do presente trabalho foram divididos em dois módulos.

O módulo 1 representa dados obtidos do estudo *in vitro* (Efeito do malaixon e das oximas sobre a atividade da enzima AChE em sobrenadante tecidual de cérebro de camundongos). Este módulo está sob a forma de artigo científico, o qual foi enviado para publicação no periódico *Toxicology in Vitro*. Assim, além dos resultados, contém uma breve introdução, materiais e métodos, discussão e referências bibliográficas.

O módulo 2 exibe os dados do estudo *in vivo* (papel das oximas K074, K075, trimedoxima e pralidoxima sobre o efeito do malation na atividade da enzima AChE e parâmetros relacionados ao estresse oxidativo em córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos). Este módulo não está sob a forma de artigo científico e contém apenas os resultados.

5.1. Módulo 1:

In vitro reactivating effects of standard and newly developed oximes on
malaoxon-inhibited mouse brain acetylcholinesterase

Alessandra Antunes dos Santos¹, Alcir Luiz Dafre², Kamil Kuca³,
Andreza Fabro de Bem¹, Marcelo Farina^{1,*}

¹Departamento de Bioquímica and ²Departamento de Ciências
Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de
Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

³Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences,
University of Defense, Hradec Kralove, Czech Republic

*Corresponding author: Marcelo Farina, Departamento de Bioquímica,
Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina,
88040900, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil Fax: +554837219672,
e-mail: farina@ccb.ufsc.br

Abstract

Malathion is an organophosphate (OP) pesticide whose toxicity depends on its bioactivation to malaoxon. Malathion poisoning has been treated with the cholinergic receptor antagonist atropine and with oximes (mainly pralidoxime) in an attempt to reactivate the OP-inhibited acetylcholinesterase (AChE). However, pralidoxime has not been efficient to reactivate malaoxon-inhibited AChE and its routine use has been questioned. In this study, we evaluated the *in vitro* potency of standards and newly developed oximes in reactivating malaoxon-inhibited AChE derived from mouse brain supernatants. Malaoxon displayed a concentration-dependent inhibitory effect toward mouse brain AChE ($IC_{50} = 3.18 \mu M$). Pralidoxime displayed a significant but modest reactivating effect toward malaoxon-inhibited AChE (30% of reactivation at $600 \mu M$). Although the oxime HI-6 and metoxime displayed similar reactivating effects when compared to pralidoxime, the oximes obidoxime and trimedoxime showed higher reactivating efficacies (around 70% of reactivation at $600 \mu M$). The newly developed oximes K074 and K075 showed significant increased reactivating effects (around 55% of reactivation at $600 \mu M$) when compared to pralidoxime. The results show that standard (obidoxime and trimedoxime) and newly developed (K074 and K075) oximes present superior reactivating effects toward malaoxon-inhibited mouse brain AChE under *in vitro* conditions when compared to pralidoxime. Taking into account the unsatisfactory effect of pralidoxime as antidotal treatment for malathion poisonings, the presented results motivate *in vivo* studies on the effects of obidoxime, trimedoxime, K074 and K075 as potential antidotes for malathion poisonings.

Key words: Malaoxon; malathion; oximes; pralidoxime; acetylcholinesterase.

1. Introduction

Malathion is an organophosphate (OP) compound widely used as a pesticide in agriculture and in veterinary practice, as well as in attempts at suicide (Maroni et al; 2000). Its toxicity requires the bioactivation to malaoxon (Buratti et al; 2006; Forsyth and Chambers, 1989) and phosphorylation of the serine hydroxyl group in the active site of acetylcholinesterase (AChE), leading to the inactivation of this enzyme and accumulation of acetylcholine at cholinergic receptors' sites. The acute toxicity observed in malathion poisoning is usually attributed to the hyperstimulation of the muscarinic and nicotinic receptors triggering a variety of signs and symptoms that characterize the cholinergic syndrome (Abou-Donia, 2003; Brocardo et al., 2005; Trevisan et al., 2008; Franco et al., 2009). Various studies have reported neurotoxic effects of malathion exposure in both humans (Komori et al; 1991; Vidair, 2004) and experimental animals (Abdel-Rahman et al; 2004; Brocardo et al; 2007; da Silva et al; 2006). Malathion has been pointed as the most important contaminant in cases of OP intoxication in Santa Catarina, a state in Southern Brazil, according to unpublished data obtained from a Toxicological Information Center (Centro de Informações Toxicológicas – CIT) hosted by the Hospital Universitário, Florianópolis, SC.

The standard antidotal treatment of malathion poisoning includes the administration of a muscarinic cholinergic receptor antagonist (generally atropine) to block the overstimulation of cholinergic receptors by acetylcholine. Moreover, the use of oximes also represents a useful antidotal procedure to reactivate the inhibited AChE (da Silva et al; 2008). From a molecular point of view, oximes are nucleophilic substances that are able to break down the bond between the enzyme and the OPs inhibitors, releasing the enzyme to perform its physiological role (Bartosova et al., 2006; Kassa, 2002). Oximes have been investigated for many years as compounds with a great potential in the treatment of OPs poisoning (Dawson, 1994), but, to the present time, few compounds have found clinical application (Antonijevic and Stojiljkovic, 2007; Jokanović and Stojiljković, 2006). Nevertheless, the treatment with these oximes still has disadvantages. Of particular interest, the antidotal treatment of malathion poisoning with pralidoxime (the standard oxime used in such condition) has not been efficient to reactivate inhibited AChE (Sudakin et al; 2000) and its routine use has been questioned. In this scenario, there is a clear demand for new and “broad spectrum”

AChE reactivators with a higher efficacy than those clinically available (Kassa, 2002).

The newly oximes from the K-series (K026, K027, K048, K074 and K075), which were recently developed at the Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, Hradec Kralove, Czech Republic, have been reported as excellent reactivators of OP poisoning under *in vitro* and *in vivo* conditions (Kassa and Karasova, 2007; Kuca et al., 2005 a,b,c; Kuca et al., 2007; Petroianu et al., 2007a,b). It is notable that the antidotal effectiveness of some of these oximes against toxicity/AChE inhibition induced by the OP compounds tabun and sarin has been shown to be higher when compared to commercially available oximes (Kuca and Cabal, 2004; Kuca et al., 2005a,b,c).

Considering the high incidence of malathion poisoning in Brazil, the low effectiveness of the current antidotal treatment of malathion poisoning and the evident beneficial effects of the oximes from the K-series on poisonings with OP compounds others than malathion, the aim of this study was to investigate the reactivation *in vitro* potency of newly developed oximes (K026, K027, K048, K074 and K075) to reactivate malaoxon-inhibited AChE from mouse brain homogenates, comparing their effects with the commonly clinically used oximes (pralidoxime). The potencies of standard oximes others than pralidoxime (HI-6, obidoxime, trimedoxime and metoxime) in reactivating malaoxon-inhibited AChE were also evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Malaoxon, acetylthiocholine iodide and 5-5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic) acid were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Pralidoxime, obidoxime, metoxime, HI-6, trimedoxime, and the newly developed oximes (K027, K028, K074, K075 - see Figure 1) of 98.5% purity were synthesized at the Department of Toxicology of the Faculty of Military Health Sciences in Hradec Kralove (Czech Republic). Their purity was analyzed using high performance liquid chromatography. All other chemicals were of the highest grade available commercially.

2.2. Animals

Swiss male mice (60 days old), from our own breeding colony, were maintained at 22°C, on a 12 h light:12 h dark cycle, with free access to food and water. All experiments were conducted in accordance with the Guiding Principles in the Use of Animals in Toxicology, adopted by the

Society of Toxicology (1989) and were approved by our ethics committee for animal use at the Universidade Federal de Santa Catarina (313/CEUA; 23080.026023/2004-39/UFSC).

2.3. Enzymatic source

Animals were euthanized by decapitation and the whole brain was quickly removed and homogenized (1:15 w/v) in 20 mM HEPES buffer 20 mM, pH 7.4. Tissue homogenates were centrifuged at 3.000 x g, at 4°C for 5 min. The supernatants obtained were used for incubations with malaoxon and/or the oximes and further determination of AChE activity.

2.3. Inhibition of AChE

Mouse brain supernatants were incubated with increasing malaoxon concentrations (0 - 7 µM) in a medium contained 50 mM phosphate buffer, pH 8.0, for 30 min at 37 °C. After incubations, aliquots of 15 µL were taken to measure the enzyme activity (item 2.5).

2.4. Reactivation of AChE

Reactivation of the malaoxon-inhibited AChE was performed immediately after its inhibition by 3 µM of malaoxon. This concentration (3 µM) is approximately the IC₅₀ value for AChE inhibition (item 2.3). Ten minutes after the addition of oximes (0 - 600 µM) aliquots of 15 µL were taken to measure the enzyme activity (item 2.5). No further reactivations were observed after 10 min of incubations with the oximes in temporal studies up to 2 h (data not shown). Experimental data were presented as percentage of reactivation and calculated from the following equation:

$$\%R = \frac{(1 - \alpha_0 - \alpha_r)}{\alpha_0 - \alpha_i} \times 100$$

where α_0 is the activity of the intact enzyme, α_i is the activity of the inhibited enzyme and α_r is the activity of the reactivated enzyme.

2.5. AChE activity

Brain AChE activity was estimated by the method of Ellman et al. (1961), using acetylthiocholine iodide as a substrate. The rate of hydrolysis of acetylthiocholine iodide is measured at 412 nm through the release of

the thiol compound which, when reacted with DTNB, produces the color-forming compound TNB.

2.6. Statistical analyses

The differential effects of the studied oximes (concentration-response studies) were analyzed by Two-Way Analysis of Variance, followed by the Bonferroni test. Differences between the slopes of the reactivation curves for standard and newly developed oximes were analyzed by One-Way Analysis of Variance, followed by the Dunnett's test.

2. Results

Figure 2 shows the inhibitory effect of malaoxon on the mouse brain AChE activity. After a 30 minutes incubation with increasing malaoxon concentrations (0-7 μM), mouse brain AChE was significantly inhibited in a concentration response manner (Figure 2). From these results, an IC_{50} value of 3.18 μM was found.

Figure 3 shows the reactivating effects of the oximes on malaoxon-inhibited AChE. In such studies, the malaoxon concentration used (3 μM) was based the IC_{50} value found in the previous experiment (3.18 μM).

While the monopyridinium oxime pralidoxime displayed only modest reactivation effects toward malaoxon-inhibited AChE (around 20 % at 600 μM), the bispirydinium oximes (trimedoxime and obidoxime - Figure 3A) and newly developed oximes (K074 and K075 - Figure 3B) displayed significant higher reactivation efficacies when compared to pralidoxime. Unlike, the other evaluated oximes (HI-6, metoxime, K027 and K048) showed reactivation effects similar to that of the standard oxime pralidoxime. Conversely, the oxime K026 showed low reactivating effect when compared to pralidoxime (Figure 3B). The higher reactivating efficacies of trimedoxime, obidoxime, K074 and K075 are also observed in Table 1, which depicts the slopes of the reactivation curve for standard and newly oximes. It is important to mention that no further reactivations were observed after 10 min of incubations with the oximes in temporal studies up to 2 h (data not shown).

4. Discussion

Malathion, which is an organophosphorothionate pesticide with relative low toxicity, can be activated by the cytochrome P450 system by oxidative desulfuration to form malaoxon, an effective inhibitor of AChE (Forsyth and Chambers, 1989; Buratti et al., 2006). Malathion has been pointed as one of the main contaminants in cases of organophosphorus (OP) intoxication in Santa Catarina, a state in Southern Brazil, according to unpublished data obtained from Toxicological Information Center (Centro de Informações Toxicológicas - CIT) hosted by the Hospital Universitário, Florianópolis, SC. However, the antidotal treatment of malathion poisonings is not sufficiently effective (Sudakin et al., 2000). In fact, there are biochemical and clinical evidences that pralidoxime, a widely used oxime in OP poisoning, does not reactivate human AChE inhibited by malathion exposure (Ganendran & Balabaskaran, 1976). With particular emphasis to malathion, there is a clear demand for more effective AChE reactivators in comparison with currently available oximes.

The results presented in this study clearly showed that the standard oximes trimedoxime and obidoxime, as well as the oximes from the K-series (developed by Kuca from Department of Toxicology of the Faculty of Military Health Sciences, Hradec Kralove, Czech Republic), namely K074 and K075, were able to reactivate malaoxon-inhibited AChE derived from mouse brain with a higher efficacy when compared to the standard oxime pralidoxime. These findings suggest that obidoxime, trimedoxime, K074 and K075 could also act as potential AChE reactivators under *in vivo* conditions after malathion poisonings.

From a molecular point of view, AChE reactivators are mono-(pralidoxime) and bisquaternary (obidoxime, trimedoxime, methoxime, HI-6, K027, K048, K074, K075) salts with the oxime group (nucleophilic functional group splitting the bond between enzyme and inhibitor) in positions two or four at the pyridinium ring (Kuca and Cabal, 2005; Kuca et al., 2007). Interestingly, pralidoxime, which is a monoquaternary oxime, displayed a very similar reactivating effect toward malaoxon-inhibited AChE when compared to the bisquaternary oximes methoxime, HI-6, K027 and K048. Conversely, the bisquaternary oximes trimedoxime and obidoxime displayed a significantly higher reactivating effect toward malaoxon-inhibited AChE when compared to pralidoxime. In addition, the oximes K074 and K075, which are also bisquaternary, displayed significant higher reactivating effect toward malaoxon-inhibited AChE when compared to

pralidoxime, K027 and K048. The relationships between molecular profiles and reactivating potencies of the studied oximes are complex. The effectiveness of oxime reactivation is primarily attributed to the nucleophilic displacement rate of organophosphates, but the efficiency varies with the chemical structure of the OP compound, the chemical structure of the oxime and the rate of post-inhibitory dealkylation known as aging (Worek et al., 2002; Kovarik et al., 2004). The aging is a process that proceeds through P-O bond scission, which results in formation of a negatively charged phosphonyl-cholinesterase complex (Elhanany et al., 2001), thwarting nucleophilic attack by an oxime. The fast and extremely high reactivation (70% in some conditions) observed in our experimental protocol discards the occurrence of significant post-inhibitory dealkylation.

The fact that no further reactivations were observed after 10 min of the incubations (in temporal studies up to 2 h) with all the studied oximes indicate that the kinetics of their reactivating effects is very fast under *in vitro* conditions. However, slower reactivating effects under *in vivo* conditions could not be ruled out. This is believed taking into consideration mainly the distribution of these oximes. In agreement, an *in vivo* study (da Silva et al., 2008) demonstrated that the oxime K027 presented reactivating effect toward malathion/malaoxon-inhibited mouse brain AChE at 24 h, but not at 3 h after treatment. This indicates that the fast reactivating effects observed in this study under *in vitro* conditions could not be reproduced under *in vivo* conditions. Of particular importance, the kinetics of the oximes transport through the blood brain barrier is crucial for the reactivating effects toward brain AChE (da Silva et al., 2008).

An important theme to take into consideration is the potential toxicity of the studied oximes. Although our data showed that obidoxime and trimedoxime were better reactivators of malaoxon-inhibited AChE when compared to pralidoxime, *in vivo* studies have shown that obidoxime and trimedoxime can be more toxic (lower LD₅₀) than pralidoxime to rodents (Musilek et al., 2007). In addition, K074 and K075 displayed higher toxicity when compared to K027 and K048 (Musilek et al., 2007). The oxime K027 has been reported to be safer (less toxic) when compared to pralidoxime in rats (Musilek et al., 2007) and mice (Calic et al., 2006). From a comparative point of view, the toxicities of the studied standard oximes in rodents are HI-6 < pralidoxime < obidoxime < trimedoxime (Calic et al., 2006; Musilek et al., 2007). With respect to the newly developed oximes of the K series, their toxicities are K027 < K048 < K075 < K074 (Musilek et al., 2007). Toxicological

information on K026 and methoxime are scarce. Based on the differential toxicity induced the studied oximes under *in vivo* conditions (Calic et al., 2006; Musilek et al., 2007), it is possible that the outstanding reactivating effects of trimedoxime, obidoxime, K074 and K075 toward malaoxon-inhibited AChE could be overcome by their potential higher toxicity when compared to pralidoxime. *In vivo* studies are necessary to solve these questions.

In summary, the present study indicates that standard (obidoxime and trimedoxime) and newly developed (K074 and K075) oximes present superior reactivating effects toward malaoxon-inhibited mouse brain AChE under *in vitro* conditions when compared to pralidoxime. Taking into account the unsatisfactory effect of pralidoxime as antidotal treatment for malathion poisonings, the presented results motivate *in vivo* studies on the effects of obidoxime, trimedoxime, K074 and K075 as potential antidotes for malathion poisonings.

Acknowledgements

This study was supported by the Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq - Brazil) and by the Ministry of Defense of the Czech Republic.

Legends

Figure 1: Chemical structure of oximes used.

Figure 2: Inhibitory effect of malaoxon on mouse brain AChE activity *in vitro*. Mouse brain supernatant was incubated with different Malaoxon concentrations during 30 min at 37°C. Thereafter, AChE activity was determined according to Materials and Methods Section. Data are expressed as percent of inhibition and represented as mean \pm SEM of three independent experiments. The calculated IC₅₀ value was 3.18 μ M.

Figure 3: Effect of standard oximes (a) and newly oximes (b) to reactivate mouse brain AChE inhibited by malaoxon *in vitro*. Mouse brain supernatant was incubated with 3 μ M of malaoxon during 30 min at 37 °C and then different oximes concentrations (0-600 μ M) were added to the medium for 10 min at 37 °C. Thereafter, AChE activity was determined according to the Materials and Methods Section described above. Data are expressed as reactivation potency and represented as mean \pm SEM (n = 7-10). *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 when compared to the pralidoxime standard by Two-Way ANOVA, followed by the Bonferroni test.

Figures

Figure 1

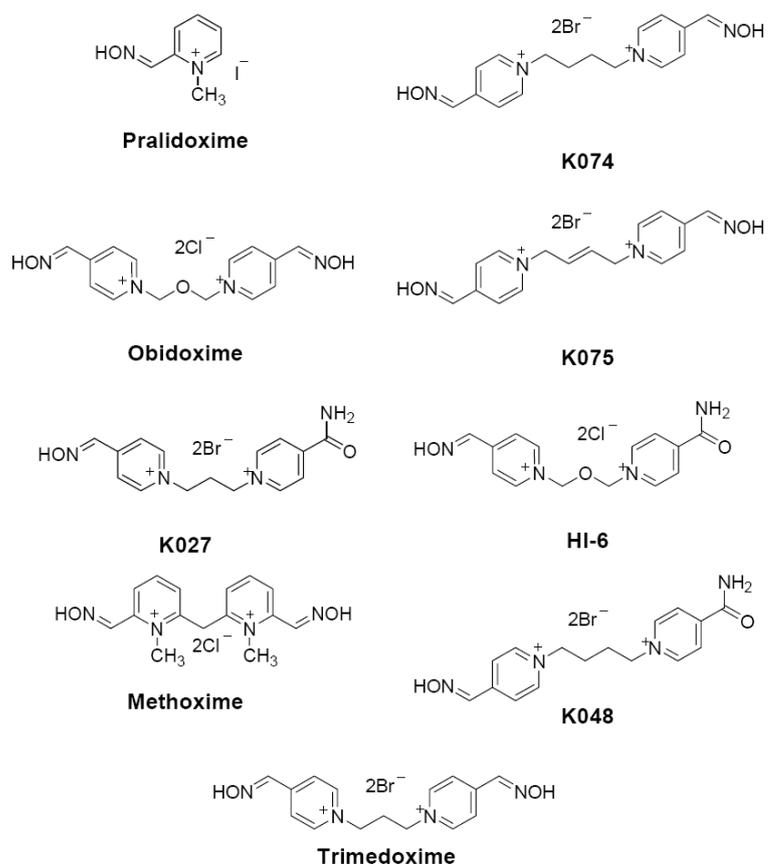


Figure 2

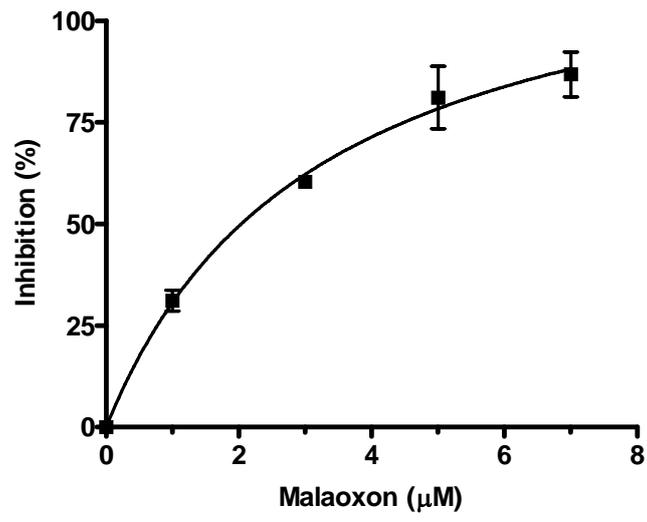
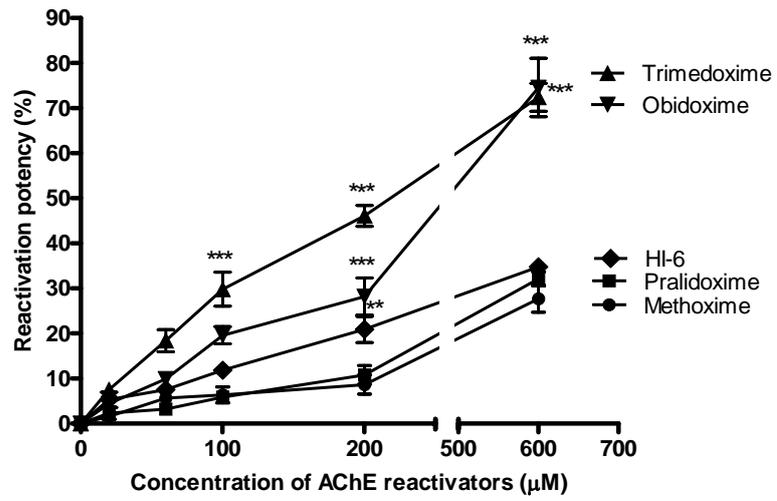


Figure 3

(A)



(B)

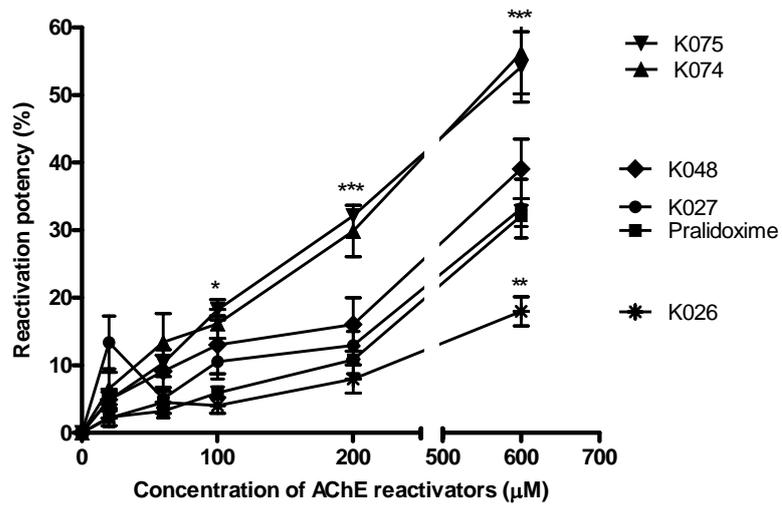


Table 1

Slopes of the linear reactivation curves for standard and newly oximes

Standard Oximes		Newly Oximes	
Oxime	Slope	Oxime	Slope
Pralidoxime	0,04737 ± 0,004247	K074	0,08801 ± 0,009435*
Trimedoxime	0,1768 ± 0,02100*	K075	0,08631 ± 0,008555*
Obidoxime	0,1226 ± 0,01218*	K048	0,05988 ± 0,006434
HI-6	0,08609 ± 0,01096	K027	0,05262 ± 0,006932
Methoxime	0,03884 ± 0,006464	K026	0,02855 ± 0,003550

The slopes of the reactivation curve for standard and newly oximes were derived from the reactivation studies (Figure 3). Values are expressed as mean ± SEM (n = 7-10). *Statistically different (p < 0.01) when compared to pralidoxime by One-Way ANOVA, followed by Dunnett's test.

References

- Abdel-Rahman, A; Dechkovskaia, A.M; Goldstein, L.B; Bullman, S.H; Khan, W; El-Masry, E.M; Abou-Donia, M.B; 2004. Neurological deficits induced by malathion, DEET, and permethrin, alone or in combination in adult rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health A* 67, 331-56.
- Abou-Donia, M.B; 2003. Organophosphorus ester-induced chronic neurotoxicity. *Archives of Environmental Health* 58, 484-97.
- Antonijevic, B; Stojiljkovic, M.P; 2007. Unequal efficacy of pyridinium oximes in acute organophosphate poisoning. *Clinical Medicine & Research* 5, 71-82.
- Bartosova, L; Kuca, K; Kunesova, G; Jun, D; 2006. The acute toxicity of acetylcholinesterase reactivators in mice in relation to their structure. *Neurotoxicity Research* 9, 291-6.
- Brocardo, P.S; Assini, F; Franco, J.L; Pandolfo, P; Muller, Y.M; Takahashi, R.N; Dafre, A.L; Rodrigues, A.L; 2007. Zinc attenuates malathion-induced depressant-like behavior, and confers neuroprotection in the rat brain. *Toxicological Sciences* 97, 140-8.
- Brocardo, P.S; Pandolfo, P; Takahashi, R.N; Rodrigues, A.L; Dafre, A.L; 2005. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride. *Toxicology* 207, 283-91.
- Buratti, F.M; Leoni, C; Testai, E; 2006. Foetal and adult human CYP3A isoforms in the bioactivation of organophosphorothionate insecticides. *Toxicology letters* 167, 245-55.
- Čalić, M; Vrdoljak, A.L; Radić, B; Jelić, D; Jun, D; Kuca, K; Kovarik, Z; 2006. 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.
- da Silva, A.P; Meotti, F.C; Santos, A.R; Farina, M; 2006. Lactational exposure to malathion inhibits brain acetylcholinesterase in mice. *Neurotoxicology* 27, 1101-05.
- da Silva, A.P; Farina, M; Franco, J.L; Dafre, A.L; Kassa, J; Kuca, K; 2008. Temporal effects of newly developed oximes (K027, K048) on malathion-induced acetylcholinesterase inhibition and lipid peroxidation in mouse prefrontal cortex. *Neurotoxicology* 29, 184-9.
- Dawson, R.M; 1994. Review of oximes available for treatment of nerve agent poisoning. *Journal of Applied Toxicology* 14, 317-31.
- Elhanany, E; Ordentlich, A; Dgany, O; Kaplan, D; Segall, Y; Barak, R; Velan, B; Shafferman, A; 2001. Resolving pathways of interaction of

- covalent inhibitors with the active site of acetylcholinesterases: MALDI-TOF/MS analysis of various nerve agent phosphyl adducts. *Chemical Research in Toxicology* 14, 912-18.
- Ellman, G.L; Courtney, K.D; Andres, V.Jr; Feather-Stone, R.M; 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88-95.
- Forsyth, C.S; Chambers, J.E; 1989. Activation and degradation of the phosphorothionate insecticides parathion and EPN by rat brain. *Biochemical Pharmacology* 38, 1597-603.
- Franco, J.L; Posser, T; Mattos, J.J; Trevisan, R; Brocardo, P.S; Rodrigues, A.L; Leal, R.B; Farina, M; Marques, M.R; Bairy, A.C; Dafre, A.L; 2009. Zinc reverses malathion-induced impairment in antioxidant defenses. *Toxicology Letters* 187, 137-43.
- Ganendran, A; Balabaskaran, S; 1976. Reactivation studies on organophosphate inhibited human cholinesterases by pralidoxime (P-2-AM). *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 7, 417-23.
- Jokanović, M; Stojiljković, M.P; 2006. Current understanding of the application of pyridinium oximes as cholinesterase reactivators in treatment of organophosphate poisoning. *European Journal of Pharmacology* 553, 10-7.
- Kassa, J; Karasova, J; 2007. A comparison of the potency of newly developed oximes (K074, K075) and commonly used oximes (obidoxime, HI-6) to counteract tabun-induced neurotoxicity in rats. *Toxicology* 229, 136-44.
- Kassa, J; 2002. Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology* 40, 803-16.
- Kovarik, Z; Radic, Z; Berman, H.A; Simeon-Rudolf, V; Reiner, E; Taylor, P; 2004. Mutant cholinesterases possessing enhanced capacity for reactivation of their phosphonylated conjugates. *Biochemistry* 43, 3222-29.
- Kuca, K., Cabal, J; 2005. Evaluation of newly synthesized reactivators of the brain cholinesterase inhibited by sarin-nerve agent. *Toxicology Mechanisms and Methods* 15, 247–252.
- Kuca, K; Bartosova, L; Jun, D; Patocka, J; Cabal, J; Kassa, J; Kunesova, G; 2005. New quaternary pyridine aldoximes as casual antidotes against nerve agents intoxications. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc Czech Repub* 149, 75-82.
- Kuca, K; Bartosova, L; Kassa, J; Cabal, J; Bajgar, J; Kunesova, G; Jun, D; 2005. Comparison of the potency of newly developed and currently

- available oximes to reactivate nerve agent-inhibited acetylcholinesterase in vitro and in vivo. *Chemico - Biological Interactions* 157-158, 367-68.
- Kuca, K; Cabal, J; Kassa, J; 2005. A comparison of the potency of newly developed oximes (K005, K027, K033, K048) and currently used oximes (pralidoxime, obidoxime, HI-6) to reactivate sarin-inhibited rat brain acetylcholinesterase by in vitro methods. *Journal of Toxicology and Environmental Health A* 68, 677-86.
- Kuca, K; Cabal, J; 2004. In vitro reactivation of tabun-inhibited acetylcholinesterase using new oximes- K027, K005, K033 and K048. *Central European Journal of Public Health* 12, 59-61.
- Kuca, K., Jun, D., Bajgar, J; 2007. Currently used cholinesterase reactivators against nerve agent intoxication: comparison of their effectivity in vitro. *Drug and Chemical Toxicology* 30, 31-40.
- Maroni, M; Colosio, C; Ferioli, A; Fait, A; 2000. Biological Monitoring of Pesticide Exposure: a review. *Toxicology* 143, 1-118.
- Musilek, K; Jun, D; Cabal, J; Kassa, J; Gunn-Moore, F; Kuca, K; 2007. Design of a potent reactivator of tabun-inhibited acetylcholinesterase--synthesis and evaluation of (E)-1-(4-carbamoylpyridinium)-4-(4-hydroxyiminomethyl pyridinium)-but-2-ene dibromide (K203). *Journal of Medical Chemistry* 50, 5514-8.
- Petroianu, G.A; Arafat, K; Nurulain, S.M; Kuca, K; Kassa, J; 2007. In vitro oxime reactivation of red blood cell acetylcholinesterase inhibited by methyl-paraoxon. *Journal of Applied Toxicology* 27, 168-75.
- Petroianu, G.A; Nurulain, S.M; Nagelkerke, N; Shafiullah, M; Kassa, J; Kuca, K; 2007. Five oximes (K-27, K-48, obidoxime, HI-6 and trimedoxime) in comparison with pralidoxime: survival in rats exposed to methyl-paraoxon. *Journal of Applied Toxicology* 27, 453-7.
- Sudakin, D.L; Mullins, M.E; Horowitz, B.Z; Abshier, V; Letzig, L; 2002. Intermediate syndrome after malathion ingestion despite continuous infusion of pralidoxime. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology* 38, 47-50.
- Trevisan, R; Uliano-Silva, M; Pandolfo, P; Franco, J.L; Brocardo, P.S; Santos A.R, Farina, M; Rodrigues, A.L; Takahashi, R.N; Dafre, A.L; 2008. Antioxidant and acetylcholinesterase response to repeated malathion exposure in rat cerebral cortex and hippocampus. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 102, 365-9.
- Vidair, C.A; 2004. Age dependence of organophosphate and carbamate neurotoxicity in the postnatal rat: extrapolation to the human. *Toxicology and Applied Pharmacology* 196, 287-302.

Worek, F; Reiter, G; Eyer, P; Szinicz, L; 2002. Reactivation kinetics of acetylcholinesterase from different species inhibited by highly toxic organophosphates. *Archives of Toxicology* 76, 523-29.

5.2. Módulo 2: Papel das oximas K074, K075, trimedoxima e pralidoxima sobre o efeito do malation na atividade da enzima AChE e parâmetros relacionados ao estresse oxidativo em córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos.

Primeiramente, investigou-se a capacidade das oximas K074, K075, trimedoxima e pralidoxima (em combinação com sulfato de atropina) em reverter à inibição da enzima AChE no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos 24 h após a exposição ao malation. Os dados obtidos estão expressos na Figura 14A.

A atividade da AChE cortical foi consideravelmente inibida pelo malation (em torno de 50%). As oximas pralidoxima e K074 (em combinação com atropina) diminuíram significativamente essa inibição, mas a pralidoxima foi mais efetiva. As outras oximas (trimedoxima e K075) não tiveram efeito reativador significativo. Por outro lado, a atividade da AChE hipocampal não foi significativamente reduzida após o tratamento com malation (Figura 14B).

Após verificar a capacidade reativadora das oximas na inibição da enzima AChE, investigou-se o efeito do malation e das oximas frente a parâmetros do sistema antioxidante da glutathione no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos 24 horas após a intoxicação. O malation causou uma diminuição significativa nas atividades glutathione peroxidase e glutathione redutase no córtex pré-frontal (Tabela 3). Os tratamentos com as oximas não alteraram este efeito. Quanto aos níveis de glutathione do córtex pré-frontal, não foram verificados efeitos significativos dos tratamentos. No hipocampo, as atividades glutathione peroxidase e glutathione redutase não foram modificadas após os tratamentos (Tabela 3).

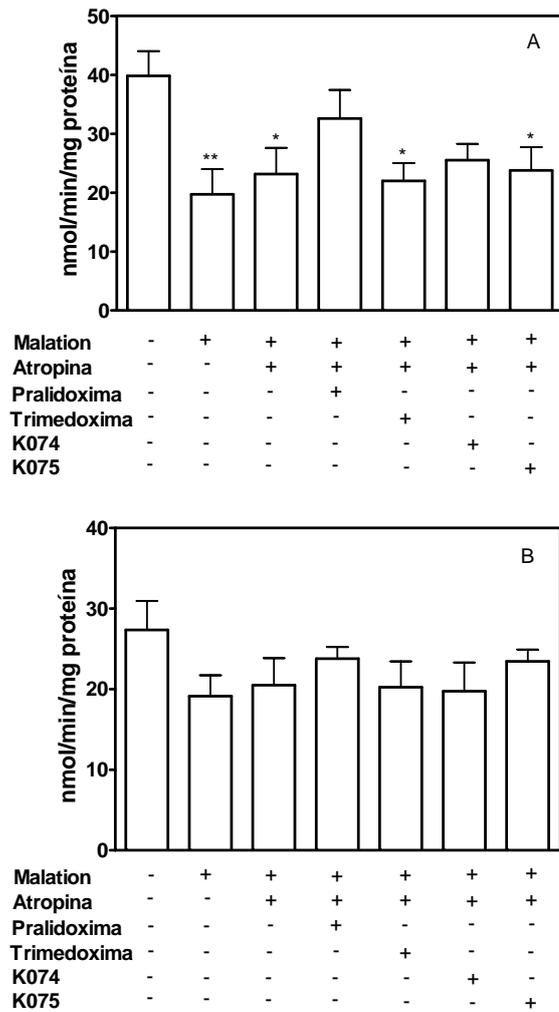


Figura 15: Efeito do tratamento com malation, atropina e oximas sobre a atividade da AChE no córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B) de camundongos após 24 horas. A atividade da AChE está expressa em nmol de substrato hidrolisado/min/mg de proteína e representada como média \pm erro padrão (n = 5 animais por grupo). *p < 0.05 e **p < 0.01 quando comparado com o controle tratado com salina pela análise de variância de uma via, seguida do Teste de Dunnett.

Tabela 3: Efeito do malation, atropina e oximas sobre os níveis de glutathiona e sobre as atividades glutathiona redutase e peroxidase do córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos. Os níveis de glutathiona estão expressos em nmol/mg de proteína. As atividades glutathiona peroxidase (GPx) e redutase (GR) estão expressas em nmol de NADPH oxidado/min/ mg de proteína. Os dados estão expressos por média e erro padrão (n = 5 animais por grupo). *p < 0.05 e **p < 0.01 quando comparado com o controle tratado com salina pela análise de variância de uma via, seguida do Teste de Dunnett.

	Grupos	GPx	GR	GSH
Córtex pré-frontal	Controle	6,20 ± 0,25	16,76 ± 2,28	2,91 ± 0,78
	Malation	3,66 ± 0,66**	10,73 ± 2,27**	2,48 ± 0,56
	Malation + Atropina	3,44 ± 0,44**	9,67 ± 0,65**	2,73 ± 0,50
	Malation + Atropina + Pralidoxima	3,54 ± 0,42**	8,81 ± 0,67**	2,39 ± 0,30
	Malation + Atropina + Trimedoxima	3,14 ± 0,46**	9,86 ± 0,69**	2,58 ± 0,44
	Malation + Atropina + K074	3,78 ± 0,66*	8,77 ± 1,15**	3,39 ± 0,49
	Malation + Atropina + K075	3,54 ± 0,25**	8,61 ± 0,33**	3,23 ± 0,45
Hipocampo	Controle	0,90 ± 0,39	10,25 ± 1,18	
	Malation	1,03 ± 0,23	14,56 ± 3,03	
	Malation + Atropina	1,08 ± 0,26	14,05 ± 1,13	
	Malation + Atropina + Pralidoxima	0,84 ± 0,24	12,96 ± 1,57	
	Malation + Atropina + Trimedoxima	0,66 ± 0,24	11,30 ± 0,75	
	Malation + Atropina + K074	0,85 ± 0,35	11,63 ± 1,34	
	Malation + Atropina + K075	0,82 ± 0,21	9,13 ± 1,25	

6. DISCUSSÃO

6.1. Módulo 1: Estudo *in vitro* - Efeito do malaoxon e das oximas sobre a atividade da enzima AChE em sobrenadante tecidual de cérebro de camundongos.

O malation, que é um pesticida organofosforado com toxicidade relativamente baixa, pode ser ativado pelas enzimas do sistema citocromo P450 por dessulfuração oxidativa para formar malaoxon, um inibidor efetivo da AChE (Forsyth and Chambers, 1989; Buratti et al., 2006). O malation tem sido apontado como um dos principais contaminantes em casos de intoxicações por organofosforados (OP) em Santa Catarina, de acordo com dados não publicados obtidos do Centro de Informações Toxicológicas (CIT) localizado no Hospital Universitário, Florianópolis, SC. No entanto, o tratamento antidoto contra o envenenamento por malation não é suficientemente efetivo (Sudakin et al., 2000). De fato, existem evidências bioquímicas e clínicas de que a pralidoxima, oxima amplamente utilizada em casos de intoxicações por compostos organofosforados, não reativa eficientemente a AChE humana inibida pela exposição ao malation (Ganendran & Balabaskaran, 1976). Com particular ênfase ao malation, existe uma clara demanda por reativadores da AChE mais efetivos em comparação com aqueles atualmente disponíveis.

Os resultados apresentados neste estudo demonstraram claramente que as oximas padrão trimedoxima e obidoxima, bem como as oximas da série – K (desenvolvidas pelo Dr. Kamil Kuca, do Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, Hradec Kralove, República Checa), nomeadas de K074 and K075, foram capazes de reativar a AChE inibida *in vitro* por malaoxon derivada de cérebro de camundongos com maior eficácia quando comparadas com a oxima padrão pralidoxima. Estes achados sugerem que a obidoxima, trimedoxima, K074 e K075 também poderiam atuar como potenciais reativadores da AChE sob condições *in vivo* após envenenamentos com malation.

De um ponto de vista molecular, os reativadores da AChE são sais mono- (pralidoxima) e biquaternários (obidoxima, trimedoxima, methoxima, HI-6, K027, K048, K074, K075) com o grupo oxima (grupo funcional nucleofílico capaz de quebrar a ligação entre a enzima e o inibidor) nas posições dois ou quatro do anel piridino (Kuca e Cabal, 2005; Kuca et al., 2007). Curiosamente, a pralidoxima, que é uma oxima monoquaternária, exibiu um efeito de reativação muito similar em

relação a AChE inibida pelo malaixon quando comparada com as oximas biquaternárias metoxima, HI-6, K027 e K048. Por outro lado, as oximas biquaternárias trimedoxima e obidoxima demonstraram um efeito de reativação significativamente maior na AChE inibida pelo malaixon quando comparadas com a pralidoxima. Além disso, as oximas K074 e K075, as quais também são biquaternárias, exibiram um efeito de reativação significativamente maior na AChE inibida pelo malaixon quando comparadas com a pralidoxima, K027 e K048. A relação entre as características estruturais/moleculares e os efeitos de reativação das oximas estudadas é complexa. A eficácia de reativação das oximas é primeiramente atribuída à taxa de deslocamento nucleofílico dos OFs, mas a eficiência 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” (Worek et al., 2002; Kovarik et al., 2004). O “envelhecimento” é um processo que acontece através da cisão da ligação P-O, a qual resulta na formação de um complexo fosfonil-colinesterase carregado negativamente (Elhanany et al., 2001), interrompendo o ataque nucleofílico pela oxima. A rápida e extremamente elevada reativação (70% em algumas condições) observada em nosso protocolo experimental descarta a ocorrência de desalquilação pós-inibitória significativa.

O fato de não ser observada mais reativação após 10 min de incubação (em estudo temporal de até 2 h) com todas as oximas estudadas indica que a cinética de seus efeitos de reativação é muito rápida sob condições *in vitro*. Contudo, efeitos lentos de reativação sob condições *in vivo* não podem ser excluídos. Acredita-se nesta possibilidade levando em consideração principalmente a distribuição dessas oximas. De acordo, um estudo *in vivo* (da Silva et al., 2008) demonstrou que a oxima K027 apresentou efeito de reativação contra a AChE cerebral de camundongo inibida por malation/malaixon no tempo de 24 h, mas não 3 h após o tratamento. Isso indica que o rápido efeito de reativação observado nesse estudo sob condições *in vitro* poderia não ser reproduzido sob condições *in vivo*. De particular importância, a cinética de transporte das oximas através da barreira hemato-encefálica é crucial para os efeitos de reativação em relação a AChE cerebral (da Silva et al., 2008).

Um importante tema que deve ser levado em consideração é a potencial toxicidade das oximas estudadas. Embora nossos dados demonstrem que a obidoxima e trimedoxima foram os melhores reativadores da AChE inibida pelo malaixon quando comparadas com a

pralidoxima, estudos *in vivo* demonstraram que a obidoxima e trimedoxima podem ser mais tóxicas (menor DL₅₀) do que a pralidoxima para roedores (Musilek et al., 2007). Além disso, as oximas K074 e K075 demonstraram maior toxicidade quando comparadas com as oximas K027 e K048 (Musilek et al., 2007). Há relatos na literatura mostrando que a oxima K027 é mais segura (menos tóxica) quando comparada com a pralidoxima em ratos (Musilek et al., 2007) e camundongos (Calic et al., 2006). De um ponto de vista comparativo, as toxicidades das oximas padrão estudadas em roedores são HI-6 < pralidoxima < obidoxima < trimedoxima (Calic et al., 2006; Musilek et al., 2007). Com respeito às oximas recentemente sintetizadas da série – K, suas toxicidades são K027 < K048 < K075 < K074 (Musilek et al., 2007). Informações toxicológicas sobre as oximas K026 e metoxima são escassas. Com base na diferencial toxicidade induzida das oximas estudadas sob condições *in vivo* (Calic et al., 2006; Musilek et al., 2007), é possível que os efeitos marcantes de reativação da trimedoxima, obidoxima, K074 e K075 na AChE inibida pelo malaixon possam ser superados pelos seus maiores potenciais tóxicos quando comparadas com a pralidoxima. Estudos *in vivo* são necessários para resolver estas questões.

Em resumo, o presente estudo indica que as oximas padrão (obidoxima e trimedoxima) e as oximas inéditas (K074 and K075) apresentam efeitos de reativação superior contra a AChE cerebral de camundongo inibida por malaixon sob condições *in vitro* quando comparadas com a pralidoxima. Levando em consideração o efeito insatisfatório da pralidoxima como tratamento antídoto para envenenamentos por malation, os resultados apresentados motivam estudos *in vivo* dos efeitos da obidoxima, trimedoxima, K074 and K075 como potenciais antídotos para envenenamentos por malation.

6.2. Módulo 2: Estudo *in vivo* - papel das oximas K074, K075, trimedoxima e pralidoxima sobre o efeito do malation na atividade da enzima AChE e parâmetros relacionados ao estresse oxidativo em córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos.

Dados estatísticos indicam que o Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo, tanto de uso doméstico como de uso agrícola. Neste contexto, acredita-se que a falta de controle no uso destas substâncias tóxicas, somada com o desconhecimento da população a cerca dos riscos e perigos à saúde, contribui para os dados

alarmantes publicados pelo CIT, onde o malation tem sido destaque no registro de intoxicações humanas em Santa Catarina (Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, 2002; CIT/SC, 2005). No entanto, apesar do elevado número de casos de intoxicações, o malation é considerado um pesticida OF de baixa toxicidade para mamíferos (Maroni et al; 2000).

O tratamento padrão oferecido em âmbito hospitalar aos intoxicados por OFs consiste na combinação de drogas anticolinérgicas (atropina) e reativadores da enzima AChE (oximas) (Rusyniak e Nañagas, 2004). Esses reativadores contêm um grupo oxima nucleofílico (ânion oximato) o qual é capaz de deslocar o OP da AChE e assim restaurar a sua a função (Marrs; 1993).

Apesar de serem amplamente utilizadas na clínica, o uso de oximas têm sido questionado no que diz respeito às intoxicações por diferentes compostos OFs. De fato, sua eficácia nos tratamentos de intoxicações por OFs depende do tipo do composto, não sendo igual para todos os OFs, o que torna seu uso, algumas vezes, controverso (Quinby e Wash, 1964; Willems et al., 1993; Bardin et al., 1994, Rotenberg, 1995, Dawson et al., 1997, Thiermann et al., 1999). De fato, atualmente, não existe uma oxima de amplo espectro capaz de contribuir para o tratamento e reversão da intoxicação por diferentes OFs. Nesse sentido, esforços estão sendo direcionados no desenvolvimento de novas moléculas (oximas) visando uma melhor capacidade de reativação enzimática para atenuar sinais e sintomas neurotóxicos induzidos pelos compostos OFs (Kassa e Kunesova, 2006).

Neste contexto, nossos estudos *in vivo* objetivaram avaliar as atividades reativadoras de oximas inéditas (da série K), comparando-as com oximas padrão; dentre estas, a oxima pralidoxima (utilizada nos casos de intoxicação por malation). Nossos resultados demonstraram que a pralidoxima foi o reativador mais eficaz contra a AChE inibida pelo malation em córtex pré-frontal de camundongos, enquanto que a oxima recentemente sintetizada K074 foi capaz de reverter a AChE apenas parcialmente. As outras oximas estudadas, trimedoxima e K075, não foram capazes de reativar a AChE inibida após a exposição aguda ao malation.

Um importante ponto a ser considerado é que as doses das oximas administradas nos animais não foram as mesmas. Isto poderia sugerir que a maior eficácia da pralidoxima em reverter a inibição da enzima AChE após exposição ao malation se deveu à maior dose utilizada. Isto realmente pode ser verdade. Entretanto, não foi possível utilizar doses equimolares das oximas testadas porque a toxicidade das

mesmas é diferente. Baseando-se em dados da literatura (Calic et al., 2006; Musilek et al., 2007) e em estudos piloto de toxicidade desenvolvidos em nosso laboratório, observou-se que as toxicidades das oximas padrão estudadas em roedores são HI-6 < pralidoxima < obidoxima < trimedoxima. Com respeito às oximas recentemente sintetizadas da série – K, suas toxicidades são K027 < K048 < K075 < K074 (Musilek et al., 2007). Neste estudo, as doses utilizadas foram ¼ da DL₅₀. Embora experimentos de nosso grupo demonstrem que as oximas obidoxima, trimedoxima, K075 e K074 são mais potentes reativadoras da enzima AChE inibida *in vitro* por malaoxon (metabólito ativo do malation) quando comparadas com a pralidoxima e usadas em concentrações equimolares, a situação *in vivo* não pôde ser mimetizada devido à elevada toxicidade das oximas obidoxima, trimedoxima, K075 e K074. Uma alternativa interessante seria detectar mecanismos moleculares relacionados com a toxicidade destas oximas. Assim, poderiam ser administradas em doses mais elevadas (e eficazes) juntamente com um antídoto específico, no intuito de bloquear tal toxicidade. Novos estudos são necessários para isto. De qualquer forma, pode-se dizer que a toxicidade destas oximas parece não estar envolvida com alterações no sistema antioxidante da glutathione e com alterações da atividade da AChE, ao menos no córtex pré-frontal e hipocampo dos animais.

Estudos similares comparando a eficácia de oximas em reativar a AChE inibida por OFs tanto *in vitro* quanto *in vivo* são bem demonstrados na literatura. Kassa et al; 2005, demonstrou que a trimedoxima foi capaz de reativar significativamente a AChE inibida pelo agente tóxico tabun em ratos tanto sob condições *in vitro* quanto *in vivo*, ao contrário das oximas pralidoxima e HI-6 que reativaram modestamente a AChE em ambas situações. Neste sentido, estudos com as oximas recentemente desenvolvidas K074 e K075 demonstraram que esses novos reativadores são compostos promissores para reativar a AChE inibida por tabun *in vivo*, tendo a sua eficácia comparável com a oxima padrão trimedoxima (Kassa e Humlicek; 2008) e sendo mais eficazes quando comparadas com a oxima HI-6 (Kuca et al; 2005b; Kassa et al; 2007).

Até o presente momento, não existe uma oxima de amplo espectro capaz de conter, satisfatoriamente, os efeitos tóxicos agudos de todos os agentes OFs indiferente da sua estrutura química (Kassa; 2002). Um exemplo disso é a oxima HI-6, que é muito eficaz em reativar a AChE inibida pelos agentes tóxicos soman e ciclosarin, no entanto o HI-6 não foi eficaz em proteger ratos da neurotoxicidade induzida pelo

tabun (Kassa e Krejcova; 2003). Da mesma forma, as novas oximas da série K (K074 e K075) parecem ser reativadores efetivos contra a AChE inibida pelo agente VX (Kuca e Kassa; 2004) e relativamente efetivos contra a AChE inibida pelo tabun, no entanto, K074 e K075 não são oximas adequadas para o tratamento de envenenamentos com ciclosarin devido essas oximas não serem capazes de reativar eficientemente a AChE inibida por este composto (Kuca et al; 2006, Musilek et al; 2006). No presente estudo, observou-se que a oxima mais eficaz em reativar a AChE inibida pelo malation foi a oxima padrão pralidoxima, enquanto que as oximas da série K, quando usadas em doses seguras (atóxicas), demonstraram baixa ou nenhuma eficácia de retivação contra a AChE inibida após exposição aguda por malation.

Apesar do claro envolvimento da enzima AChE na toxicidade dos compostos OFs, outros alvos potencialmente envolvidos nessa toxicidade tem sido reportados. Embora os mecanismos de toxicidade de tais compostos não serem totalmente elucidados, sabe-se que as espécies reativas de oxigênio (EROs) possuem um importante papel (Almeida et al., 1997; Ray e Banerjee, 1998). A intoxicação por OFs pode estar acompanhada por um aumento na geração de EROs em tecidos biológicos, neste sentido o malation pode agir direta ou indiretamente modificando a capacidade das defesas antioxidantes nesses tecidos (Banerjee et al., 1999).

A formação de EROs que podem levar a peroxidação lipídica após exposição a pesticidas tem sido muito relatada na literatura (Banerjee et al., 1999, Akhgari et al; 2003), tornando essas EROs candidatos alternativos que podem causar toxicidade pelo composto malation. Com relação a isto já foi observado dano oxidativo nos lipídeos do córtex pré-frontal após exposição aguda ao malation (da Silva et al; 2007). De acordo com estes achados, Delgado e colaboradores (2006) demonstraram que a exposição subaguda ao malation provocou aumento nos níveis de MDA em diferentes regiões cerebrais de ratos. Além disso, há evidências que a inibição da atividade da AChE pelo malation está acompanhada pela indução de estresse oxidativo no plasma em ratos submetidos à uma alimentação misturada com malation (Abdollahi et al., 2004).

De particular importância ao malation, nossos resultados reforçam a idéia de que sua neurotoxicidade está relacionada, ao menos em parte, com a indução de estresse oxidativo. De fato, o tratamento com malation inibiu as atividades glutatona peroxidase e glutatona redutase no córtex pré-frontal dos animais. Estes dados estão de acordo com estudos prévios (Brocardo et al., 2005, 2007; Trevisan et al., 2008;

Franco et al., 2009), que demonstram dano oxidativo (lipoperoxidação) e inibição de enzimas do sistema antioxidante da glutathione no SNC de animais expostos ao malation. Interessantemente, nossos estudos mostram que o córtex foi mais susceptível ao efeito do malation quando comparado com o hipocampo. Estes dados estão de acordo com resultados previamente publicados (Trevisan et al., 2008), mas se desconhece os eventos relacionados com esta diferencial susceptibilidade.

Em suma, o presente módulo de resultados (Módulo 2) indica que as novas oximas desenvolvidas K074 e K075 e a oxima padrão trimedoxima, quando administradas em doses seguras (atóxicas), não foram capazes de reativar eficientemente a enzima AChE inibida pelo malation no córtex pré-frontal de camundongos. Tendo em vista que os tratamentos disponíveis (baseados em oximas, particularmente a pralidoxima) para intoxicações por malation parecem ser pouco eficazes, confirma-se a necessidade de busca por novos potenciais agentes reativadores da enzima AChE após a intoxicação humana ou animal por malation.

7. CONCLUSÕES

Módulo 1: Efeito do malaoxon e das oximas sobre a atividade da enzima AChE em sobrenadante tecidual de cérebro de camundongos.

Com os resultados deste estudo, conclui-se que:

- O malaoxon causou uma inibição significativa na atividade da AChE em sobrenadante tecidual de cérebro dos camundongos;
- O efeito inibitório do malaoxon sobre a AChE cerebral de camundongos foi dependente da concentração;
- A IC₅₀ do malaoxon sobre a atividade da AChE cerebral de camundongos *in vitro* foi de 3.18 µM;
- A oxima padrão pralidoxima exibiu um significativo, porém modesto efeito de reativação *in vitro* contra a AChE inibida por malaoxon na concentração de 600 µM;
- A maior potência de reativação da AChE foi alcançada pelas oximas padrão trimedoxima e obidoxima (em torno de 70%) na concentração de 600 µM;
- As oximas inéditas K074 e K075 apresentaram um efeito de reativação significativo (em torno de 55%) quando comparadas com a pralidoxima, na concentração de 600 µM;
- Isto sugere que as oximas K074, K075, trimedoxima e obidoxima poderiam ser melhores reativadoras quando comparadas com a pralidoxima em condições *in vivo*;

Módulo 2: Papel das oximas pralidoxima, trimedoxima, K074 e K075 sobre o efeito do malation na atividade da enzima AChE e parâmetros relacionados ao estresse oxidativo em córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos.

Com os resultados deste estudo, conclui-se que:

- A atividade da AChE do córtex pré-frontal de camundongos foi consideravelmente inibida (em torno de 50%) 24 horas após a exposição ao malation, confirmando o seu efeito inibitório já relatado;
- A atividade da AChE hipocampal de camundongos não foi afetada após tratamento agudo com malation, o que sugere uma suscetibilidade diferencial dependendo da estrutura analisada;
- A oxima padrão pralidoxima (em combinação com a atropina) diminuiu significativamente a inibição causada pelo malation na

atividade da AChE do córtex pré-frontal 24 horas após a exposição, corroborando com seu uso na clínica;

- A oxima inédita K074 (em combinação com a atropina) apresentou baixos efeitos de reativação sobre a AChE inibida pelo malation no córtex pré-frontal de camundongos quando comparada com a pralidoxima. Entretanto, deve-se considerar que as doses não foram equimolares devido à elevada toxicidade desta oxima inédita.
- O malation diminuiu significativamente as atividades glutathione peroxidase e glutathione reductase no córtex pré-frontal de camundongos 24 horas após intoxicação, o que sugere que o estresse oxidativo está implicado na toxicidade induzida por este composto.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, A. et al. Neurological deficits induced by malathion, DEET, and permethrin, alone or in combination in adult rats. **J Toxicol Environ Health A**, v. 67, p. 331–356. 2004.

ABDOLLAHI, M. et al. Hyperglycemia associated with increased hepatic glycogen phosphorylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in rats following subchronic exposure to malathion. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 137, p. 343-347. 2004a.

ABDOLLAHI, M. et al. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 137, p. 29-34. 2004b.

ABOU-DONIA, MB. Organophosphorus ester-induced chronic neurotoxicity. **Arch Environ Health**, v. 58, p. 484–497. 2003

ACHARYA, J. et al. Red cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency. **Eur J Haematol**, v. 47, p. 287-291. 1991.

AHMED, RS. et al. Influence of dietary ginger (*Zingiber officinales* Rose) on oxidative stress induced by malathion in rats. **Food Chem Toxicol**, v. 38, p. 443–450. 2000.

AKHGAR, M. et al. Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. **Hum Exp Toxicol**, v. 22, p. 205–211. 2003.

ALUIGI, MG. et al. Interaction between organophosphate compounds and cholinergic functions during Development. **Chem Biol Interact**, v. 157-158, p. 305-16. 2005.

AMER, SM. et al. Cytogenetic studies on the effect of feeding mice with stored wheat grains treated with malathion. **Mutat Res**, v. 513(1-2), p. 1-10. 2002.

AMES, BN. et al. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 1915-1922. 1993.

ANDREAZZA, AC. et al. Transtornos neuropsiquiátricos e estresse oxidativo. In: Izquierdo I, Quevedo j, Kapczinski F. Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos. Porto Alegre: Artmed, p. 489-496. 2004.

ASCHNER, M. et al. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, p. 285-291. 2007.

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.

BAGCHI, D. et al. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. **Toxicology**, v. 140(1-3), p. 129-140. 1995.

BANERJEE, BD. et al. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. **Toxicol Lett**, v. 107, p. 33-47. 1999.

BARDIN, PG. et al. Organophosphate and Carbamate Poisoning. **Arch. Intern. Med**, v. 154, p. 1433-1441. 1999.

BARREIROS, ALBS. et al. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29(1), p. 113-126. 2006.

BORG, DC; SCHAICH, KM. Iron and iron-derived radicals. In Halliwell B (ed): Oxygen radicals and tissue injury. Proceedings of a Brook Lodge Symposium, Apr, p. 27-29. 1987. Bethesda (MLD): Upjohn/Federation of American Societies for Experimental Biology, p. 20-26. 1988.

BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254. 1976.

BROCARD, P. Avaliação comportamental e do estresse oxidativo em ratos expostos ao malation e/ou zinco. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

BROCARD, PS. et al. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride. **Toxicology**, v. 207, p. 283-291. 2005.

BROCARD, PS. et al. Zinc attenuates malathion-induced depressant-like behavior and confers neuroprotection in the rat brain. **Toxicol Sci**, v. 97(1), p. 140-148. 2007.

BURATTI, FM. et al. Malathion bioactivation in the human liver: the contribution of different cytochrome p450 isoforms. **Drug Metab Dispos**, v. 33(3), p. 295-302. 2005.

CALIC' M. 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**, v. 219(1-3), p. 85-96. 2006.

CARLBERG,I; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods Enzymol**, v. 113, p. 484-490. 1985.

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

CAVALIERE, MJ. et al Organophosphate-induced myotoxicity. **Rev Saúde Pública**, v. 30(3), p. 267-272. 1996.

CHAKRABORTI, TK. et al. Comparative neurochemical and neurobehavioral effects of repeated chlorpyrifos exposures in young and adult rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 46(1), p. 219-224. 1993.

CHANDA, SM; POPE, CN. Neurochemical and neurobehavioral effects of repeated gestational exposure to chlorpyrifos in maternal and developing rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 53(4), p. 771-776. 1995

CHANDA, SM. et al. Comparative developmental and maternal neurotoxicity following acute gestational exposure to chlorpyrifos in rats. **J Toxicol Environ Health**, v. 44, p.189–202. 1995.

CIT/SC – Centro de Informações Toxicológicas da Secretaria de Saúde do Estado de Santa Catarina (CIT/SC) – Departamento de Estatística (2005).

COHEN HUBAL, EA. et al. Children's exposure assessment: a review of factors influencing children's exposure, and the data available to characterize and assess that exposure. **Environ Health Perspect**, v. 108, p. 475-486. 2000.

COHEN, MV. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Ann Intern Med**, v. 111, p. 918-931. 1989.

COMPORTI, M. Three models of free radical-induced cell injury. **Chem Biol Interact**, v. 72(1-2), p. 1-56. 1989.

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

COSTA LG. et al. Developmental neuropathology of environmental agents. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 44, p. 87-110. 2004.

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

CURL, CL. et al. Evaluation of take-home organophosphorus pesticide exposure among agricultural workers and their children. **Environ Health Perspect**, v. 110, p. 787–792. 2002.

DAWSON, A. et al. What target pralidoxime concentration? **J Toxicol Clin Toxicol**, v. 35(2), p. 227-230. 1997.

DA SILVA, AP. et al. Lactational exposure to malathion inhibits brain acetylcholinesterase in mice. **NeuroToxicology**, v. 27, p. 1101-1105. 2006.

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

DELGADO, E. Central nervous system effects of acute organophosphate poisoning in a two-year follow-up. **Scand J Work Environ Health**, v. 30(5), p. 362-370. 2004.

DELGADO, EH. et al. Mitochondrial respiratory dysfunction and oxidative stress after chronic malathion exposure. **Neurochem Res**, v. 31, p. 1021-1025. 2006.

DENEKE, SM; FANBURG, BL. Regulation of cellular glutathione. **Am J Physiol**, v. 257, p. 163-173. 1989.

DIJK, SN. et al. Cholinomimetics increase glutamate outflow via an action on the corticostriatal pathway: implications for Alzheimer's disease. **J Neurochem**, v. 65, p. 2165-2169. 1995.

DRINGEN, R. et al. Peroxide detoxification by brain cells. **J Neurosci Res**, v. 79(1-2), p. 157-165. 2005.

EHRICH, M; JORTNER, BS. Organophosphorus-induced delayed neuropathy. In: Krieger R, editor. **Handbook of Pesticide Toxicology**. San Diego' Academic Press, p. 987– 1012. 2001.

EL-SHARKAWY, AM. et al. Biochemical effects of some insecticides on the metabolic enzymes regulating glutathione metabolism. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 52(4), p. 505-510.1994.

ELHANANY, E. 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**, v. 14, p. 912-918. 2001.

ELLMAN, GL. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, v. 82, p. 70-77. 1959.

ELLMAN, GL. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol**, v. 7, p. 88-95. 1961.

- EYER, P. Neuropsychopathological changes by organophosphorus compounds. **Hum Exp Toxicol**, v. 14(11), p. 857-864. 1995.
- FARIA, NMX. et al. Estudo transversal sobre saúde mental de agricultores da Serra Gaúcha. **Rev Saúde Pública**, v. 33(4), p. 391-400. 1999.
- FARINA, M. et al. Protective effects of Polygala paniculata extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. **J. Pharm. Pharmacol**, v. 57(11), p. 1503-1508. 2005.
- FENSKE, RA. et al. Children's exposure to chlorpyrifos and parathion in an agricultural community in central Washington State. **Environ Health Perspect**, v. 110, p. 549-553. 2002.
- FLOYD, RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. **FASEB J**; v. 4, p. 2587-2597. 1990.
- FONTANA, C. et al. The protective effect of mercaptopropionylglycin. A free radical scavenger on ischemia / reperfusion injury in rats. **Rev Soc Bras Cir Plast Est Reconstr**, v. 9(2,3), p. 80-90. 1996.
- FORTUNATO, JJ. et al. Lipid peroxidative damage on malathion exposure in rats. **Neurotox Res**, v. 9, p. 23-28. 2006a.
- FORTUNATO, JJ. et al. Malathion induced oxidative stress in rat brain regions. **Neurochem Res**, v. 31, p. 671-678. 2006b.
- FRANCO, JL. et al. Cerebellar thiol status and motor deficit after lactational exposure to methylmercury. **Environ Res**, v. 102, p. 22-28. 2006.
- FRANCO, JL. et al. Zinc reverses malathion-induced impairment in antioxidant defenses. **Toxicol Lett**, v. 187(3), p. 137-143. 2009.
- FRISCHER, H; AHMAD, T. Consequences of erythrocytic glutathione reductase deficiency. **J Lab Clin Med**, v. 109, p. 583-588. 1987.
- FURLONG, CE. et al. Role of paraoxonase (PON1) status in pesticide sensitivity: genetic and temporal determinants. **Neurotoxicology**, v. 26(4), p. 651-659. 2005.

GALLEANO, M; PUNTARULO, S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. **Biochim Biophys Acta**, v. 1271(2-3), p. 321-326. 1995.

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

GARDÈS-ALBERT, M. et al. Membrane lipid peroxidation: pulse and radiolysis in oxyradical research. *In* Vigo-Pelfrey C (ed): Membrane lipid oxidation. 1th ed. Santa Clara, CRC Press 1991:2-30.

GILBERT, HF; MC LEAN, VM. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**, v. 172, p. 63-69.1990

GILLHAM, B. et al. Wills: biochemical basis of medicine. 3. ed. Oxford: Reed Educational and Professional Publishing Ltd, 1997: 196-202.

GIRI, S. et al. Genotoxic effects of malathion: an organophosphorus insecticide, using three mammalian bioassays in vivo. **Mutation Research**, v. 514, p. 223-231. 2001.

GONÇALVES, AS. et al. Molecular Dynamics of the Interaction of Pralidoxime and Deazapralidoxime with Acetylcholinesterase Inhibited by the Neurotoxic Agent Tabun. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 17, p. 968-975. 2006.

GRIGG, J. Environmental toxins; their impact on children's health. **Arch Dis Child**, v. 89, p. 244-250. 2004

GUTTERIDGE, JMC. Lipid peroxidation: some problems and concepts. *In* Halliwell B (ed): Oxygen radicals and tissue injury. Proceedings of a Brook Lodge Symposium; 1987 Apr 27-29; Bethesda (MLD): Upjohn/Federation of American Societies for Experimental Biology, p. 9-19. 1988.

- HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch Biochem Biophys**, v. 246, p. 501-514. 1986.
- HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 1-85. 1990.
- HALLIWELL, B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. **Haemostasis**, v. 23(suppl 1), p. 118-126. 1993.
- HATHERILL, JR. et al. Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. **Agents-Actions**, v. 32, p. 351-358. 1991.
- HAZARIKA, A. et al. Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study. **Toxicology**, v. 185, p. 1-8. 2003.
- HEBBEL, RP. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **J Lab Clin Med**, v. 107, p. 401-404. 1986.
- HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin Hematol**, v. 26, p. 277-285. 1989.
- HILL, RHJr. et al. Pesticide residues in urine of adults living in the United States: reference range concentrations. **Environ Res**, v. 71, p. 99-108. 1995.
- JAMAL, GA. et al. Low level exposures to organophosphorus esters may cause neurotoxicity. **Toxicology**, v. 27;181-182:23-33. 2002.
- JEPSEN, S. et al. Antioxidant treatment with N-acetylcysteine during adult respiratory distress syndrome: a prospective, randomized, placebo-controlled study. **Crit Care Med**, v. 20(7), p. 918-923. 1992.
- JOHN, S. et al. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. **J Nutr Biochem**, v. 12, p. 500-504. 2001.

JOHNSON, MK. The delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds: identification of the phosphorylation site as an esterase. **Biochem J**, v. 114(4), p. 711-717. 1969.

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

KASSA, J. The influence of oxime and anticholinergic drug selection on the potency of antidotal treatment to counteract acute toxic effects of tabun in mice. **Neurotox Res**, v. 9, p. 59-62. 2006.

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**, v. 26, p. 309-316. 2006.

KASSA, J. et al. A comparison of the efficacy of new asymmetric bispyridinium oximes (K027, K048) with currently available oximes against tabun by in vivo methods. **J Toxicol Environ Health A**, v. 69(20), p. 875-82. 2006.

KEDAR, NP. Can we prevent Parkinson's and Alzheimer's disease? **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 49(3), p. 236-245. 2003.

KEHRER, JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Crit Rev Toxicol**, v. 23(1), p. 21-48. 1993.

KHURANA, D; PRABHAKAR, S. Organophosphorus intoxication. **Arch Neurol**, v. 57(4), p. 600-2. 2000.

KOLLEF, MH; SHUSTER, DP. The acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med**, v. 332(1), p. 27-37. 1995.

KOVACIC, P. Mechanism of organophosphates (nerve gases and pesticides) and antidotes: electron transfer and oxidative stress. **Curr Med Chem**, v. 10(24), p. 2705-2709. 2003.

KOVARIK, Z. et al. Mutant cholinesterases possessing enhanced capacity for reactivation of their phosphorylated conjugates. **Biochemistry**, v. 43, p. 3222-3229. 2004.

KUCA, K. et al. Synthesis of a potential reactivator of acetylcholinesterase 1-(4-hydroxyiminomethyl pyridinium)-3-(carbamoyl- pyridinium) propane dibromide. **Tetrahedron Lett**, v. 44, p. 3123–3125. 2003a.

KUCA, K. et al. Synthesis of a new reactivator of tabun-inhibited acetylcholinesterase. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 13, p. 3545–3547. 2003b.

KUCA, K; CABAL, J. In vitro reactivation of tabun-inhibited acetylcholinesterase using new oximes- K027, K005, K033 and K048. **Cent Eur J Public Health**; v. 12 Suppl:S p. 59-61. 2004.

KUCA, K. 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**, v. 149(2), p. 429-431. 2005.

KUSHIK, J; CHANDRABHAN, D. Sources of exposure to and public health implications of organophosphate pesticides. **Rev Panam Salud Publica**, v. 14(3), p. 171-185. 2003.

LANDRIGAN, PJ; GARG, A. Chronic Effects of Toxic Environmental Exposures on Children's Health', **Clinical Toxicology**, v. 40(4), p. 449-456. 2002.

LARINI, L. Praguicidas. In: OGA'S. **Fundamentos da Toxicologia**. Atheneu (São Paulo), 1996, 515p.

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

LOTTI, M; MORETTO, A. Organophosphate-induced delayed polyneuropathy. **Toxicol Rev**, v. 24(1), p. 37-49. 2005.

MAKRI, A. et al. Children's susceptibility to chemicals: a review by developmental stage. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev**, v. 7, p. 417-435. 2004.

MANFROI, CB. et al. Maternal milk as methylmercury source for suckling mice: neurotoxic effects involved with the cerebellar glutamatergic system. **Toxicol Sci**, v. 81, p. 172–178. 2004.

MARIANI, E. et al. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 827(1), p. 65-75. 2005.

MARONI, M. et al. Biological Monitoring of Pesticide Exposure: a review. Introduction. **Toxicology**, v. 143 (1), p. 1-118. 2000.

MATSUBARA, LS. et al. Influence of diabetes mellitus on the glutathione redox system of human red blood cells. **Braz J Med Biol Res**, v. 25, p. 331-335. 1992.

MAYES, PA. Biologic oxidation. In Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (eds): Harper's biochemistry. San Mateo, Appleton & Lange: 105-11. 1990

MCCAULEY, LA. et al. Work characteristics and pesticide exposures among migrant agricultural families: a community based research approach. **Environ Health Perspect**, v. 109, p. 533–538. 2001.

MEINKING, TL. et al. Efficacy of a reduced application time of Ovide lotion (0.5% malathion) compared to Nix creme rinse (1% permethrin) for the treatment of head lice. **Pediatr Dermatol**, v. 21(6), p. 670-674. 2004.

MEISTER, A; ANDERSON, ME. Glutathione. **Annu Rev Biochem**, v. 52, p. 711-760. 1983.

MELLO FILHO, AC. et al. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochem J**, v. 218, p. 273-275. 1983.

MEYDANI, M. Nutrition Interventions in Aging and Age-Associated Disease. **Ann N Y Acad Sci**, v. 928, p. 226-235. 2001.

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; 21-5. 1999.

MUSILEK, K. et al. Evaluation of potency of known oximes (pralidoxime, trimedoxime, HI-6, methoxime, obidoxime) to in vitro reactivate acetylcholinesterase inhibited by pesticides (chlorpyrifos and methylchlorpyrifos) and nerve agent (Russian VX). **Acta Medica (Hradec Kralove)**, v. 50(3), p. 203-206. 2007.

OHKAWA, H. et al. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, v. 95, p. 351-358. 1979.

PEDRAJAS, JR. et al. Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu, Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers. **Chem Biol Interact**, v. 98, p. 267-282. 1995.

PETER, JV. et al. Oxime therapy and outcomes in human organophosphate poisoning: an evaluation using meta-analytic techniques. **Crit Care Med**, v. 34, p. 502-510. 2006.

PETROIANU, GA. et al. Five oximes (K-27, K-33, K-48, BI-6 and methoxime) in comparison with pralidoxime: survival in rats exposed to the organophosphate paraoxon. **J Appl Toxicol**, v. 26(3), p. 262-268. 2005.

PETROIANU, GA. 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**, v. 99(4), p. 312-316. 2006.

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

POPE, CN; CHAKRABORTI, TK. Dose-related inhibition of brain and plasma cholinesterase in neonatal and adult rats following sublethal organophosphate exposures. **Toxicology**, v. 73, p. 35-43. 1992.

POPE, CN. et al Comparison of in vivo cholinesterase inhibition in neonatal and adult rats by three organophosphorothioate insecticides. **Toxicology**, v. 68, p. 51–61. 1991.

POSSAMAI, FP. Estudo do estresse oxidativo em órgãos de ratos wistar adultos induzidos à intoxicação por malation. Dissertação(Mestrado). Unesc. Universidade do Extremo Sul Catarinense. 2005.

QUINBY, GE; WASH, W. Further Therapeutic Experience With Pralidoximes in Organic Phosphorus Poisoning. **JAMA**, v. 187 (3), p. 114-118. 1964.

RAY, A; BANERJEE, BD. A comparative evaluation of immunotoxicity of malathion after subchronic exposure in experimental animals. **Indian J Exp Biol**, v. 36(3), p. 273-282. 1998.

RICHARDSON, JR; CHAMBERS, JE. Neurochemical effects of repeated gestational exposure to chlorpyrifos in developing rats. **Toxicol Sci**, v. 77(1), p. 83-90. 2004.

ROBERTS, DM; AARON, CK. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. **BMJ**, v. 334(7594), p. 629-634. 2007.

ROSS, D; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): Membrane lipid oxidation. 1th ed. Boca Raton, CRC Press 1991; 151-70.

ROTENBERG, M. et al. Differentiation between organophosphate and carbamate poisoning. **Clinica Chimica Acta**, v. 234, p. 11-21. 1995.

ROTILIO, G. et al. Interplay of Cu, Zn superoxide dismutase and nitric oxide synthase in neurodegenerative processes. **IUBMB Life**, v. 55(10-11), p. 629-634. 2003.

RUSYNIAK, DE; NAÑAGAS, KA. Organophosphate poisoning. **Semin Neurol**, v. 24(2), p. 197-204. 2004.

SALAS, JH. et al. Organophosphorus pesticide residues in Mexican commercial pasteurized milk. **J Agric Food Chem**, v. 51, p. 4468–4471. 2003.

SANGHI, R. et al. Organochlorine and organophosphorus pesticide residues in breast milk from Bhopal, Madhya Pradesh, India. **Hum Exp Toxicol**, v. 22, p. 73–76. 2003.

SCOTT, MD. et al. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. **J Lab Clin Med**, v. 118, p. 7-16. 1991.

SHAN, X. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther**, v. 47, p. 61-71. 1990.

SILMAN, I; SUSSMAN, JL. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. **Curr Opin Pharmacol**, v. 5(3), p. 293-302. 2005.

SIMCOX, NJ. et al. Farmworker exposure to organophosphorus pesticide residues during apple thinning in central Washington State. **Am Ind Hyg Assoc J**, v. 60, p. 752–761. 1999.

SLEZAK, BP. et al TCDD-mediated oxidative stress in male rat pups following perinatal exposure. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 16(2), p. 49-52. 2002.

SLOTKIN, TA. Developmental cholinotoxicants: nicotine and chlorpyrifos. **Environ Health Perspect**, v. 107 Suppl 1, p. 71-80. 2005.

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

SLOTKIN, TA. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 198, p. 132–151. 2004b.

SLOTKIN, TA; SEIDLER, FJ. Comparative developmental neurotoxicity of organophosphates in vivo: transcriptional responses of pathways for brain cell development, cell signaling, cytotoxicity and neurotransmitter systems. **Brain Res Bull**, v. 72(4-6), p. 232-274. 2007.

SLOTKIN, TA. et al. Critical periods for the role of oxidative stress in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos and terbutaline, alone or in combination. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 157, p. 172–180. 2005.

SLOTKIN, TA. et al. Comparative developmental neurotoxicity of organophosphate insecticides: effects on brain development are separable from systemic toxicity. **Environ Health Perspect**, v. 114(5), p. 746-751. 2006.

SONG, X. et al. Cellular mechanisms for developmental toxicity of chlorpyrifos: targeting the adenylyl cyclase signaling cascade. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 145, p. 158–174. 1997.

SRIKANTH, NS; SETH, PK. Alterations in xenobiotic metabolizing enzymes in brain and liver of rats coexposed to endosulfan and malathion. **J Appl Toxicol**, v. 10, p. 157-160. 1990.

SUDAKIN, DL. et al. Intermediate syndrome after malathion ingestion despite continuous infusion of pralidoxime. **J Toxicol Clin Toxicol**, v. 38(1), p. 47-50. 2000.

THIERMANN, H. et al. Modern Strategies in Therapy of Organophosphate Poisoning. **Toxicol Lett**, v. 107(1-3), p. 233-239. 1999.

TREVISAN, R. et al. Antioxidant and acetylcholinesterase response to repeated malathion exposure in rat cerebral cortex and hippocampus. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 102(4), p. 365-369. 2008.

TSAKIRIS, S. et al. Protective effect of L-phenylalanine on rat brain acetylcholinesterase inhibition induced by free radicals. **Clin Biochem**, v. 33(2), p. 103-106. 2000.

U.S. EPA. Office of Pesticides and Toxic. Guidance for the registration of pesticides products containing malathion as the active ingredient. Washington, D.C 2000; 161-76.

VAN ASBECK, BS. et al. Protection against lethal hyperoxia by tracheal insufflation of erythrocytes: role of red cell glutathione. **Science**, v. 277, p. 756-759. 1985.

VAN HELDEN, HP. et al. Pharmacological effects of oximes: how relevant are they? **Arch Toxicol**, v. 70, p. 779-786. 1996.

WARD, TR; MUNDY, WR. Organophosphorus compounds preferentially affect second messenger systems coupled to M2/M4 receptors in rat frontal cortex. **Brain Res Bull**, v. 39(1), p. 49-55. 1996.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 77, p. 325-333. 1981.

WHYATT, RM. et al. Residential pesticide use during pregnancy among a cohort of urban minority women. **Environ Health Perspect**, v. 110, p. 507-514. 2002.

WILLEMS, J.L. et al. Cholinesterase Reactivation in Organophosphorus Poisoned Patients Depends on the Plasma Concentrations of the Oxime Pralidoxime Methylsulphate and of the Organophosphate. **Arch. Toxicol**, v. 67, p. 79-84. 1993.

WOOLF, NJ. Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. **Prog Neurobiol**, v. 37, p. 475-524. 1991.

WOREK, F. et al Reactivation kinetics of acetylcholinesterase from different species inhibited by highly toxic organophosphates. **Arch Toxicol**, v. 76, p. 523-529. 2002.

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