

Aline Aita Naime

**ESTUDO DA NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELO
CLORPIRIFÓS E SEU METABÓLITO OXON EM CÉLULAS
HT22**

Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Bioquímica
da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau
de Mestre em Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Marcelo
Farina

Florianópolis
2017

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

Naime, Aline Aita
Estudo da neurotoxicidade induzida pelo
clorpirifós e seu metabólito-oxon em células HT22 /
Aline Aita Naime ; orientador, Marcelo Farina -
Florianópolis, SC, 2017.
102 p.

- Universidade Federal de Santa Catarina, Centro
de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Clorpirifós. 3. Clorpirifós-oxon.
4. Toxicidade não-colinérgica. I. Farina, Marcelo.
II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Simone e Marcos por todo apoio, incentivo e pela preocupação de sempre me proporcionar o melhor. Obrigado pela dedicação e força que sempre me deram e dão até hoje.

Ao meu orientador Professor Marcelo pela oportunidade de trabalhar junto ao seu grupo de pesquisa desde a minha iniciação científica. Agradeço por todos os ensinamentos e pelo apoio durante esses anos, nos quais sua orientação me proporcionou muito crescimento e aprendizagem.

Aos colegas do laboratório LEN (Dirleise, Mark, Diones, Viviane, Heloisa, Cinara, Débora, Marina, Sthéfani) e a colega Letícia por toda ajuda na execução dos experimentos, pelas conversas, trocas de ideias e ótimas risadas. Agradeço por terem feito meus dias no laboratório mais leves e alegres.

Um agradecimento especial à Dirleise e ao Mark que me ajudaram diretamente não só na execução de experimentos, mas também pela troca de ideias, opiniões e ensinamentos nesses anos trabalhando juntos. Agradeço à Dirleise por anos de ensinamentos, paciência e dedicação desde a minha iniciação científica.

Aos colegas mais antigos do laboratório, Alessandra, Danúbia, Juliana, Mariana, Renata. Obrigado por todos os ensinamentos, pela paciência, pelas nossas conversas e discussões sobre ciência.

Um agradecimento especial para a Alessandra com quem comecei a trabalhar no laboratório e quem desde do início me ajudou com os meus primeiros passos no laboratório. Obrigada pela força, dedicação, pelos ensinamentos técnicos e intelectuais.

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

Aos professores do PPG em Bioquímica responsáveis pela minha formação acadêmica.

Ao apoio financeiro da CAPES e CNPq.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram na realização deste trabalho.

RESUMO

Os pesticidas são compostos amplamente utilizados na agricultura e responsáveis por inúmeros casos de intoxicações em humanos. A exposição a esses compostos ocorre durante a sua aplicação, mas também pelo contato com lavouras tratadas com esses toxicantes ou ainda pela ingestão de alimentos ou água contaminados, bem como exposições intencionais em tentativas de suicídio. Nota-se que os principais casos de intoxicações ocorrem devido a exposição aos pesticidas organofosforados (OFs). O clorpirifós (CPF) é um OF muito utilizado no Brasil, principalmente no meio agrícola. Ele é um composto lipofílico que, ao ser metabolizado, gera um metabólito ativo tóxico e mais potente, o clorpirifós-oxon (CPF-O). O mecanismo principal de toxicidade destes compostos OFs está relacionado à inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), desencadeando uma variedade de sinais e sintomas que caracterizarão a clássica “síndrome colinérgica”. Por outro lado, algumas evidências indicam que a intoxicação aguda ou crônica com OFs pode ser caracterizada por efeitos que não são somente atribuídos à inibição da enzima AChE (efeitos denominados não-colinérgicos). De fato, algumas evidências experimentais têm apontado para a toxicidade não-colinérgica induzida por compostos OFs como um fator responsável pelo desenvolvimento de síndromes neurotóxicas. No entanto, pouco se sabe a respeito dos mecanismos moleculares relacionados à neurotoxicidade não-colinérgica induzida por OFs. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi identificar possíveis eventos não-colinérgicos envolvidos na neurotoxicidade do pesticida CPF e do CPF-O em cultivos celulares de neurônios hipocâmpais de camundongos (HT22). A exposição ao pesticida CPF e ao CPF-O foi capaz de diminuir a viabilidade celular das células HT22 de maneira concentração dependente. De modo interessante, o CPF-O mostrou-se mais tóxico para as células HT22. Esta citotoxicidade não foi protegida pela atropina (um antagonista muscarínico) e pela pralidoxima (um reativador da AChE), indicando que efeitos não colinérgicos poderiam estar envolvidos no mecanismo de toxicidade desses compostos. Foi demonstrado que a exposição das células HT22 ao CPF e ao CPF-O induziu redução dos níveis de glutathione (GSH) e inibição da GSK-3 β , porém somente o CPF foi capaz de ativar as MAPKs, ERK1/2 e p38^{MAPK}. Entretanto, a utilização de inibidores da ERK1/2 e p38^{MAPK} não protegeu as células HT22 da citotoxicidade induzida pelo CPF e CPF-O. Por outro lado, o pré-

tratamento com N-acetilcisteína (NAC) apresentou efeito protetor frente a citotoxicidade induzida por este pesticida. Nossos resultados indicam o envolvimento do estresse oxidativo no mecanismo de toxicidade desses compostos, bem como a ativação de MAPKs e inibição da GSK-3 β como eventos alternativos à superestimulação colinérgica.

Palavras chaves: Clorpirifós, clorpirifós-oxon e toxicidade não-colinérgica.

ABSTRACT

Pesticides are compounds widely used in agriculture and responsible for innumerable cases of intoxication in humans. Exposure to these compounds occurs during their application, but also by contact with crops treated with these compounds, or by ingestion of contaminated food or water, as well as intentional exposures to suicide attempts. It is noted that the main cases of intoxication occur due to exposure to organophosphorus pesticides (OFs). Chlorpyrifos (CPF) is an OF widely used in Brazil, mainly in the agricultural environment. It is a lipophilic compound that, when metabolized, generates a toxic and more potent active metabolite, chlorpyrifos-oxon (CPF-O). The main mechanism of toxicity of these OFs compounds is related to the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE), triggering a variety of signs and symptoms that characterize the classic "cholinergic syndrome". On the other hand, some evidence indicates that acute or chronic intoxication with OFs may lead to toxic effects that are not only attributed to inhibition of the AChE enzyme (so-called non-cholinergic effects). In fact, experimental evidence has pointed to the non-cholinergic toxicity induced by OFs compounds as a factor responsible for the development of neurotoxic syndromes. However, little is known about the molecular mechanisms related to non-cholinergic neurotoxicity induced by OFs. The aim of this study was to identify possible non-cholinergic events involved in the neurotoxicity of the CPF pesticide and CPF-O in cell cultures of hippocampal neurons of mice (HT22). Exposures to the CPF pesticide and CPF-O were able to decrease the cell viability of HT22 cells in a concentration-dependent manner. Interestingly, CPF-O was shown to be more toxic to HT22 cells. This cytotoxicity was not protected by atropine (a muscarinic antagonist) and by pralidoxime (a AChE reuptake) indicating that non-cholinergic effects could be involved in the mechanism of toxicity of these compounds. In addition, exposure of HT22 cells to CPF and CPF-O induced reduction of glutathione (GSH) levels and GSK-3 β inhibition, but only CPF was able to activate MAPKs, ERK1/2 and p38^{MAPK}. However, the use of ERK1/2 and p38MAPK inhibitors did not protect HT22 cells from CPF and CPF-O induced cytotoxicity. On the other hand, the pre-treatment with N-acetylcysteine (NAC) showed protective effect against this pesticide-induced cytotoxicity. Our results indicate the involvement of oxidative stress in the mechanism of

toxicity of these compounds, as well as the MAPKs activation and GSK-3 β inhibition as alternative events to cholinergic overstimulation.

Keywords: Chlorpyrifos, chlorpyrifos-oxon and non-cholinergic toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química geral dos OFs	20
Figura 2: AChE inibida.....	22
Figura 3: AChE envelhecida (AChE-OF).....	23
Figura 4: A via de neurotransmissão colinérgica.....	24
Figura 5: Esquema representativo da neurotransmissão colinérgica. ...	26
Figura 6: Representação esquemática da sinapse colinérgica com a localização e função dos receptores colinérgicos.	29
Figura 7: Processos de inibição, reativação e envelhecimento da enzima AChE.....	34
Figura 9: Metabolismo do clorpirifós.	37
Figura 10: Cascata de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos.....	41
Figura 11: Linha do tempo descritiva do protocolo experimental 1. ...	48
Figura 12: Linha do tempo descritiva do protocolo experimental 2. ...	48
Figura 13: Linha do tempo descritiva do protocolo experimental 3. ...	49
Figura 14: Linha do tempo descritiva do protocolo experimental 4. ...	49
Figura 15: Linha do tempo descritiva do protocolo experimental 5. ...	50
Figura 16: Linha do tempo descritiva do protocolo experimental 6. ...	50
Figura 17: Linha do tempo descritiva do protocolo experimental 7. ...	51
Figura 18: Linha do tempo descritiva do protocolo experimental 8. ...	52
Figura 19: Linha do tempo descritiva do protocolo experimental 9.....	52
Figura 20: Linha do tempo descritiva do protocolo experimental 10...	Erro! Indicador não definido. 53
Figura 21: O pesticida CPF e seu metabólito CPF-O reduzem a viabilidade celular das células HT22 de maneira concentração dependente.	60
Figura 22: O CPF reduz a viabilidade celular de células HT22 e não altera liberação da LDH e incorporação do IP.....	62
Figura 23: O CPF-O reduz a viabilidade celular de células HT22 e aumenta a liberação da LDH.	63
Figura 24: A pralidoxima não protege a redução da viabilidade celular induzida pelo CPF ou CPF-O em células HT22.	65
Figura 25: Efeito da ACh e da atropina sobre as células HT22.....	67
Figura 26: A atropina não protege as células HT22 da citotoxicidade induzida pelo CPF e CPF-O, mas protege da superestimulação colinérgica induzida pela ACh.....	68

Figura 27: A exposição ao CPF ou CPF-O não altera a geração do ânion superóxido em células HT22.....	69
Figura 28: A exposição ao CPF ou CPF-O reduz os níveis de tióis não proteicos (NPSH) em células HT22.....	70
Figura 29: Efeito do Trolox frente ao <i>t</i> BuOOH sobre as células HT22.....	71
Figura 30: O antioxidante Trolox não protege as células HT22 da citotoxicidade induzida pelo CPF e CPF-O.....	73
Figure 31: A NAC protege as células HT22 da redução da viabilidade celular induzida pelo CPF.....	74
Figura 32: A NAC protege parcialmente as células HT22 da redução da viabilidade celular induzida pelo CPF-O.....	75
Figura 33: A exposição ao CPF aumenta a fosforilação das enzimas ERK 1/2 em células HT22.....	77
Figura 34: A exposição ao CPF aumenta a fosforilação da enzima p38 ^{MAPK} em células HT22.....	78
Figura 35: A exposição ao CPF ou CPF-O aumenta a fosforilação da enzima GSK3 β , porém não altera o imunocontéudo da proteína β -catenina.....	80
Figura 36: Inibidores das MAPKs não protegem as células HT22 da citotoxicidade induzida pelo CPF ou CPF-O.....	82
Figura 37: O inibidor da MEK/ERK1/2 não reverte a redução dos níveis de GSH induzida pelo CPF e CPF-O nas células HT22.....	84
Figura 38: Resumo dos resultados.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ações fisiológicas periféricas da ACh mediadas pelos mAChR.....	28
----------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ASB:** Albumina de soro bovino
ACh: Acetilcolina
AChE: Acetilcolinesterase
ANOVA: Análise de variância
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AKT: Proteína Cinase B
BChE: Butirilcolinesterase
CAT: Catalase
ChAT: Colina acetiltransferase
ChEs: Colinesterases
CI₃₀: Concentração que inibe 30% da proliferação celular
CIT: Centro de Informações Toxicológicas
CPF: Clorpirifós
CPF-O: Clorpirifós-oxon
CPY: Citocromo P450
DHE: Dihidroetídeo
DMEM: Dulbecco's modified eagle medium
DMSO: Dimetilsulfóxido
DTNB: Ácido 5,5 ditiobis 2-nitrobenzóico
ENT: Esterase neurotóxica
ERK: Cinase regulada por sinal extracelular
EROS: Espécies reativas de oxigênio
GABA: Ácido gama-aminobutírico
GPx: Glutaciona peroxidase
GSH: Glutaciona reduzida
GSK3 β : Glicogênio sintase cinase 3 β
GST: Glutaciona transferase
IP: Iodeto de Propídeo
JNK: c-Jun cinase amino-terminal
LDH: Lactato desidrogenase
MAPKs: Proteínas cinases ativadas por mitógenos
MTT: Sal de tetrazólio 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NAC: N-acetilcisteína
NADH: Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NaHCO₃: Bicarbonato de sódio
NPSH: Tióis não-proteicos

NCIOF: Neurotoxicidade crônica induzida por organofosforados
NTIOF: Neurotoxicidade tardia induzida por organofosforados
OF: Organofosforado
PON-1: Paraoxonase
PKA: Proteína cinase A
Px: Pralidoxima
SDS: Dodecil sulfato de sódio
SFB: Soro bovino fetal
SI: Síndrome intermediária
SINITOX: Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
SNA: Sistema nervoso autônomo
SNC: Sistema nervoso central
SNP: Sistema nervoso periférico
SOD: Superóxido dismutase
***t*-BuOOH:** Peróxido de *t*-butila
TAC: Transportador de alta afinidade pela colina
TCA: Ácido tricloroacético
TNB: Ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico
VACHT: Transportador vesicular de acetilcolina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1.AGROTÓXICOS	17
1.2.COMPOSTOS ORGANOFOSFORADOS (OFs)	18
1.2.1.Sistema Colinérgico	23
1.2.2.Toxicidade dos compostos OFs	30
1.2.3.Tratamento das intoxicações por OFs	33
1.3.CLORPIRIFÓS	36
1.3.1.Mecanismos não-colinérgicos	38
2.JUSTIFICATIVA	43
3.OBJETIVOS	44
3.1.OBJETIVO GERAL	44
3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
4.MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1.REAGENTES.....	46
4.2.CULTIVO CELULAR	46
4.3.TRATAMENTOS DO CULTIVO CELULAR	47
4.4.ENSAIOS REALIZADOS.....	54
4.4.1.Redução do MTT	54
4.4.2.Liberação da lactato desidrogenase (LDH)	55
4.4.3.Incorporação do iodeto de propídeo (IP)	55
4.4.4.Determinação da produção do ânion superóxido (O₂^{•-}) ...56	
4.4.5.Determinação do conteúdo de tióis não-proteicos (NPSH) 57	
4.4.6.Determinação do nível de fosforilação e o conteúdo total das MAPKs (ERK1/2, p38MAPK), da AKT, GSK3β e β-catenina	57
4.4.7.Determinação de proteínas	59
4.4.8.Análises estatísticas	59

5. RESULTADOS.....	60
6. DISCUSSÃO.....	85
7. CONCLUSÃO	94

1. INTRODUÇÃO

1.1. AGROTÓXICOS

Os agrotóxicos são definidos como “os produtos e os 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 implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos” segundo a lei dos agrotóxicos, de 1989, e o decreto de 2002 que a regulamenta.

O desenvolvimento da produção agrícola no Brasil está cada vez mais dependente dos agrotóxicos e fertilizantes químicos. Isso provavelmente levou o Brasil a assumir a primeira posição no mercado mundial de agrotóxicos, ultrapassando os Estados Unidos em 2008. No período entre 2010 e 2011, o mercado brasileiro de agrotóxicos consumiu 936 mil toneladas desses compostos, sendo 833 mil produzidas no país e 246 mil importadas. Em 2010, o Brasil movimentou cerca de 7,3 bilhões de dólares, o que representou 19% do total de agrotóxicos comercializados globalmente (CARNEIRO et al., 2016). Contudo, a grande utilização de agrotóxicos acaba refletindo em um consumo diário desses produtos através dos alimentos contaminados, gerando um problema de saúde pública.

Segundo análise de amostras coletadas em todos os 26 estados brasileiros e Distrito Federal, realizada pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da Anvisa no período de 2013 a 2015 demonstrou que mais da metade dos alimentos consumidos cotidianamente pelos brasileiros está contaminado por agrotóxicos. Foram coletadas amostras de 25 alimentos de origem vegetal, representativos da dieta da população brasileira, destas amostras, 58% apresentaram contaminação por agrotóxicos, sendo que 19,7% apresentaram ingredientes ativos não autorizados para aquele cultivo e/ou ultrapassaram o limite máximo de resíduos considerados aceitáveis estabelecido pela ANVISA. Outros 38,3%, que apresentaram contaminação por agrotóxicos, estavam dentro deste limite. A Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO) alerta que mesmo que alguns dos ingredientes ativos dos agrotóxicos possam ser

classificados como medianamente ou pouco tóxicos, devido ao seus efeitos agudos, não se pode esquecer dos efeitos crônicos que podem ocorrer meses, anos ou até décadas após a exposição (CARNEIRO, 2012).

O elevado consumo desses compostos também tem gerado numerosos casos de intoxicações, seja no campo ou em áreas urbanas. No Brasil, segundo os últimos dados de intoxicações obtidos pelo SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico - Farmacológicas - Ministério da Saúde/Fiocruz), no ano 2013 foram registrados mais de 42 mil casos de intoxicações em todo território nacional, desses, 1907 (4,53%) foram causados por agrotóxicos de uso agrícola e 967 (2,30%), por agrotóxicos de uso doméstico. O número de óbitos total ocasionados pelas intoxicações no ano de 2013 foram de 209, sendo a maioria (35,89%), devido ao uso de agrotóxicos no meio agrícola.

Segundo o último levantamento de informações sobre intoxicações realizado pelo Centro de Informações Toxicológicas de Santa Catarina (CIT/SC), em 2015 foram registrados 588 casos de intoxicações humanas por agrotóxicos nos municípios catarinenses. Desses, 193 (32,82%) foram de ocorrência acidental; 152 (25,85%), devido à exposição ocupacional; 226 (38,43%), por tentativa de suicídio e os outros 17 (2,90%) incluem como causas homicídio, alimentação, causas ignoradas e outros tipos de ocorrência. A maioria dessas intoxicações, ou seja, 72,28%, teve como desfecho manifestações clínicas de leve a graves com sequelas, sendo que de todos os casos, 13 (2,21%) evoluíram para o óbito. Além disso, em estudo mais completo realizado pelo CIT/SC, no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2013, foram notificados mais de 57 mil casos de intoxicações por agentes tóxicos. Desses, 3 mil foram causados por agrotóxicos e representaram a maioria dos casos de letalidade (3,7%), ou seja, neste período foram registrados 3,7 óbitos para cada 100 casos notificados de intoxicação por agrotóxicos. Importante notar que segundo o CIT/SC, os principais agrotóxicos responsáveis por esse percentual foram o herbicida paraquate e os inseticidas inibidores das colinesterases, como os organofosforados.

1.2. COMPOSTOS ORGANOFOSFORADOS (OFs)

Os primeiros compostos OFs foram sintetizados no final da década de 1930 por Gerhard Schrader, um químico alemão. A descoberta das propriedades tóxicas e inseticidas de alguns compostos de fósforo, por esse químico e colaboradores, levou a criação de novos compostos

organofosforados pelas indústrias (COFFEY, 1965; KOSOLAPOFF e MAIER, 1974; STODDART, 1979; TOY, 1976). Essas descobertas também tiveram como consequência a produção e utilização de milhares de toneladas desses compostos durante a Segunda Guerra Mundial por vários países, logo, ficando conhecidos como OFs militarizados, os “agentes nervosos”, também classificados como armas químicas (como exemplo: sarin, tabun e soman) (KING e AARON, 2015).

Na atualidade, toneladas desses produtos químicos são produzidos por vários países, sendo uma pequena parte desviada e aplicada em várias situações, incluindo a guerra Irã-Iraque, o ataque iraniano contra os curdos e, mais recentemente, a guerra civil síria em agosto de 2013, resultando em mais de 1400 mortes. Antes disso, o uso mais notável desses agentes nervosos foi o ataque terrorista de 1995 em Tóquio, Japão, que deixou 11 mortos e mais de 5000 vítimas que necessitaram de atendimento médico (KING e AARON, 2015).

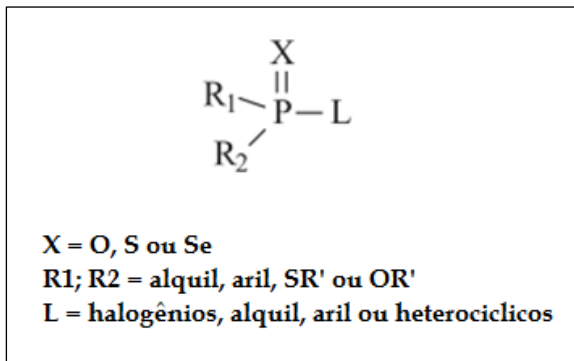
A aplicação industrial e comercial de compostos organofosforados na agricultura começou com Schrader e colaboradores, em 1941. Três anos mais tarde, em 1944, a descoberta do composto paration gerou um grande avanço no uso dos inseticidas – OFs na agricultura, bem como, o conhecimento científico na relação estrutura-atividade (COFFEY, 1965; KOSOLAPOFF e MAIER, 1974; STODDART, 1979; TOY, 1976). Atualmente, os organofosforados são pesticidas amplamente utilizados no mundo e como exemplo desses compostos podemos citar: malation, clortion, fention, diazinon, diclorvos e o clorpirifós (dos SANTOS et al., 2007; VALE e LOTTI, 2015).

Os produtos químicos da classe dos OFs têm várias aplicações, como por exemplo: pesticidas, fluidos industriais, na medicina veterinária e como armas químicas (ABOU-DONIA, 2003; dos SANTOS et al., 2007; VALE e LOTTI, 2015). Alguns desses compostos, como por exemplo o malation, são usados no tratamento de infestação de piolhos e sarna. Apesar de serem principalmente utilizados como pesticidas no meio agrícola, também são usados no controle de infestações de insetos em ambientes comerciais e residenciais (KING e AARON, 2015). Dentro da classe dos OFs, os organofosforotioatos são os compostos mais usados para controle de pragas presentes na produção agrícola, higiene municipal e no controle de vetores de doenças (dos SANTOS et al., 2007).

Os compostos organofosforados são ésteres ou tióis derivados de ácidos fosfóricos, fosfônico, fosfínico ou fosforamídico, que

apresentam um grande interesse comercial e toxicológico (dos SANTOS et al., 2007). A estrutura geral desses compostos inclui o grupo fosforil (P=O) ou um grupo tiofosforil (P=S), grupos R1 e R2 que são arilas ou alquilas (grupos lipofílicos) e o grupo L chamado de grupo de saída, que é liberado pelo átomo de fósforo quando o mesmo é hidrolisado (dos SANTOS et al., 2007; KING e AARON, 2015; VALE e LOTTI, 2015).

Figura 1: Estrutura química geral dos OFs.



A estrutura química geral dos OFs inclui o grupo fosforil (P=O) ou um grupo tiofosforil (P=S), grupos R1 e R2 que são arilas ou alquilas (grupos lipofílicos) e o grupo L chamado de grupo de saída. Adaptada de dos Santos et al., 2007.

A exposição aos OFs pode ocorrer por ingestão, inalação e pela via dérmica. O contato com a pele e a absorção subsequente são a principal via de exposição ocupacional. A inalação de inseticidas OFs durante a fabricação de formulações, pode ocorrer devido, por exemplo, a equipamentos de ventilação ineficientes ou durante a pulverização ou mistura desses compostos. A ingestão é incomum no local de trabalho, mas pode ocorrer acidentalmente com os trabalhadores que apresentam uma higiene pessoal deficiente, como aqueles que não removem o vestuário contaminado ou não lavam as mãos (VALE e LOTTI, 2015). A maioria da população se expõe aos OFs por meio da propagação dos produtos químicos no ambiente, pelo consumo de alimentos contaminados, além das intoxicações acidentais ou intencionais, como nos casos de homicídios ou suicídios (Da SILVA, 2006).

A absorção desses compostos acontece através de todas essas vias e, por serem compostos altamente lipofílicos, são facilmente

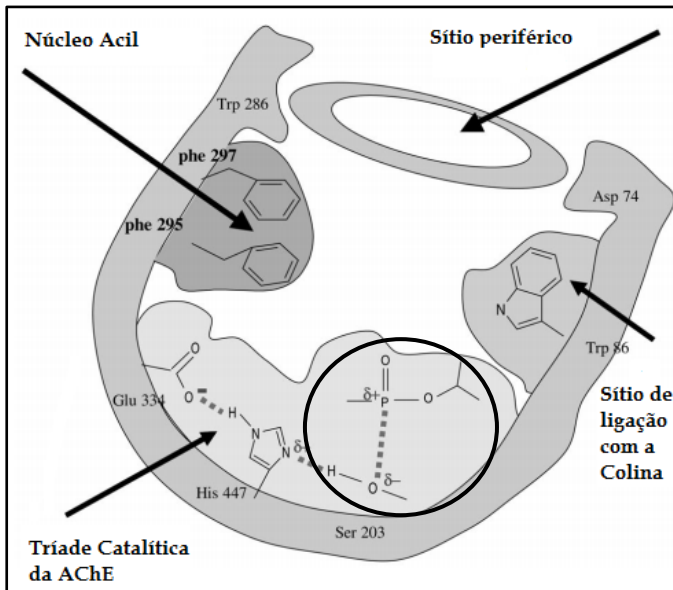
absorvidos e podem ser armazenados no tecido adiposo. Desta forma, pode acontecer o aparecimento tardio dos sintomas, bem como uma toxicidade prolongada ou uma re-intoxicação devido a redistribuição dos OFs das reservas de gordura (KING e AARON, 2015). Além disso, a solubilidade dos OFs em lipídios também é importante pois aumenta a habilidade desses compostos em atravessar membranas biológicas inclusive a barreira hematoencefálica (ABOU-DONIA, 2003).

Os pesticidas OFs, após serem absorvidos, são metabolizados principalmente, mas não exclusivamente, no fígado. Os compostos que apresentam na sua estrutura química uma dupla ligação entre os átomos de enxofre e fósforo, os organofosforatos ($P=S$), podem sofrer bioativação metabólica. Esta consiste em uma desulfuração oxidativa realizada por enzimas do Citocromo P450 (CYPs) resultando na formação de um metabólito “oxon” ($P=O$). Esta bioativação leva a formação de compostos mais ativos que, igualmente aos compostos OFs, que já possuem uma dupla ligação entre os átomos de oxigênio e fósforo ($P=O$), são inibidores mais efetivos das enzimas colinesterases (ChEs). Além disso, os OFs podem sofrer detoxificação pela ação de outras enzimas como as fosfotriesterase (A-esterases) capazes de hidrolisar os compostos OFs gerando metabólitos inativos (com baixa capacidade de inibir as ChEs). Uma dessas enzimas é a paraoxonase (PON-1) que possui a capacidade de hidrolisar os compostos oxons dos OFs (COSTA, 2006).

Os OFs são capazes de inibir a função de, principalmente, dois tipos de enzimas da classe das colinesterases – ChEs (KING e AARON, 2015). Uma delas é a acetilcolinesterase específica, verdadeira ou acetilcolinesterase (AChE) que apresenta alta afinidade para a acetilcolina (ACh). Essa enzima é encontrada principalmente nas sinapses colinérgicas do sistema nervoso central (SNC), sistema nervoso periférico parassimpático e junção neuromuscular, estando também presente na superfície dos eritrócitos. Outra enzima é a butirilcolinesterase, pseudocolinesterase ou também chamada de acetilcolinesterase inespecífica (BChE), enzima com alta afinidade para a butirilcolina. Esta enzima está presente em todos os tecidos e no plasma, porém é encontrada principalmente no fígado onde é responsável pelo metabolismo de xenobióticos (KING e AARON, 2015; VENTURA et al., 2010). É importante notar que a atividade da AChE eritrocitária está mais relacionada com a atividade de AChE neuronal do que a butirilcolinesterase sendo, portando um melhor marcador para o estado fisiológico do SNC (KING e AARON, 2015).

A inibição das enzimas ChEs, realizada pelos OFs, ocorre através da fosforilação da hidroxila do resíduo de serina (Ser 203) presente no sítio ativo das ChEs pelo grupo fosforil (P=O) dos OFs. Assim, os OFs impendem a ação das ChEs sobre o seu substrato fisiológico (ABOU-DONIA, 2003). A Figura 2 mostra o sítio catalítico da enzima AChE inibida.

Figura 2: AChE inibida.

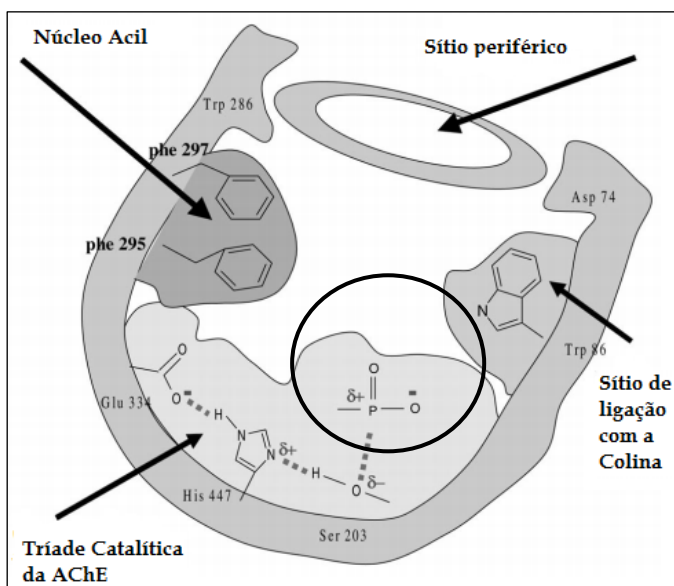


AChE inibida através da fosforilação da hidroxila do resíduo de serina (Ser 203) presente no sítio ativo pelo grupo fosforil (P=O) dos OFs. Adaptada de Abou-donia, 2003.

A ligação entre o átomo de fósforo e o sítio esterásico da enzima é muito estável, logo, quebrar a ligação fósforo-enzima pode levar de algumas horas a vários dias, dependendo da estrutura química do OF. Assim, estas enzimas ChEs são altamente susceptíveis ao processo de envelhecimento. Esse consiste na perda (por hidrólise não enzimática) que pode ocorrer por eliminação ou desalquilação do fósforo conjugado, por meio da quebra da ligação oxigênio-álquil resultando em um complexo aniônico bastante estável (AChE-OF).

Quando este processo acontece, a enzima pode ser considerada irreversivelmente inibida, resistindo a ação de reativadores, como as oximas e, desse modo, a única forma de substituir a sua atividade é através da síntese de uma nova enzima, um processo que pode levar dias (COSTA, 2006). A Figura 3 mostra a AChE envelhecida (AChE-OF).

Figura 3: AChE envelhecida (AChE-OF).



Sítio catalítico da AChE mostrando a enzima envelhecida (AChE-OF), ou seja, irreversivelmente inibida. Processo que ocorre pela eliminação ou desalquilação do fósforo conjugado, por meio da quebra da ligação oxigênio-alquil. Adaptada de Abou-donia, 2003.

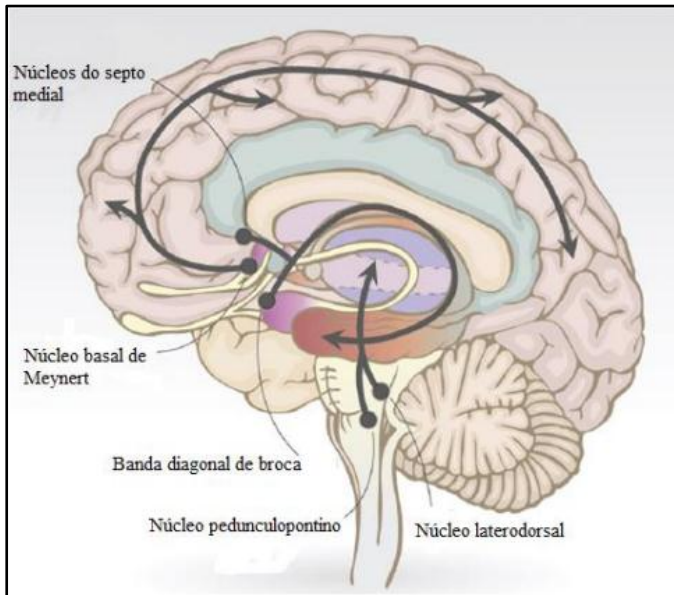
1.2.1. Sistema Colinérgico

O sistema de neurotransmissão colinérgica é constituído pela ACh, seus receptores e o aparato enzimático responsável por sua síntese e degradação. A ACh é um mediador químico de sinapses no sistema SNC, no SNP e também na junção neuromuscular (JNM). O neurotransmissor ACh liga-se a duas classes de receptores: os

receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR), de ação ionotrópica e os receptores colinérgicos muscarínicos (mAChR), de ação metabotrópica (RANG et al., 2007; VENTURA et al., 2010; FISHER e WONNACOTT, 2012).

A via de neurotransmissão colinérgica no SNC é formada pela projeção dos neurônios da base do prosencéfalo ou encéfalo frontal, que incluem grupos de células colinérgicas localizadas nos núcleos do septo medial e o membro vertical da banda diagonal broca, que enviam axônios para o hipocampo e córtex límbico, bem como, por neurônios colinérgicos encontrados no núcleo horizontal da banda diagonal e área pré-óptica magnocelular, cujos axônios terminam no bulbo olfatório, amígdala e córtex límbico, além dos corpos de células colinérgicas do núcleo basal de Meyner, que se projetam para todas as partes do córtex (FISHER e WONNACOTT, 2012). Esta via esta representada na figura 4.

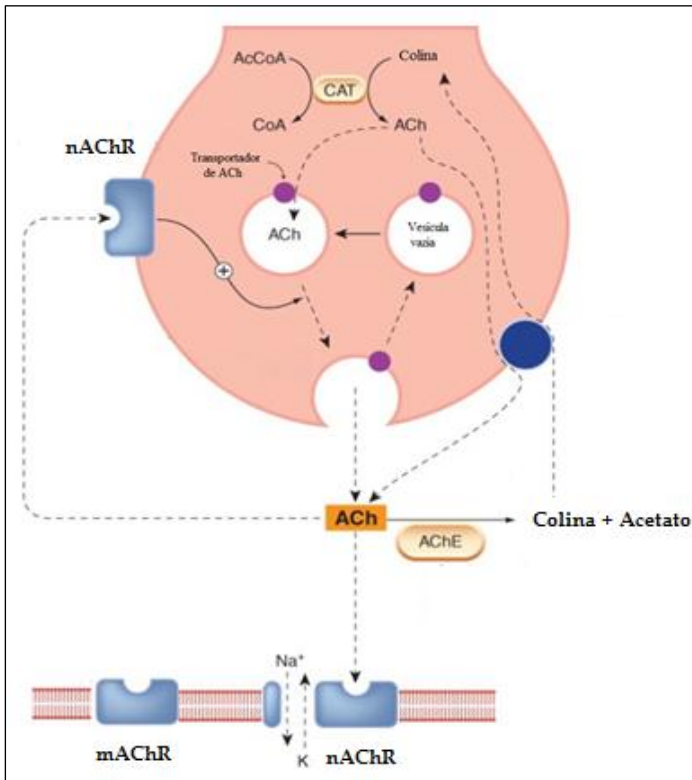
Figura 4: A via de neurotransmissão colinérgica.



A síntese de ACh ocorre nas terminações dos neurônios pré-sinápticos colinérgicos, a partir de duas moléculas precursoras, a colina e a acetil-coenzima (AcCoA ou Acetil-CoA), a primeira é fornecida pela hidrólise de lipídeos de membrana, os fosfolipídios, como a fosfatidilcolina, já a Acetil-CoA é gerada pelo metabolismo oxidativo mitocondrial mais especificadamente pela ação do complexo piruvato desidrogenase. A colina é transportada pela circulação sanguínea e atinge o SNC sendo levada para dentro das terminações dos neurônios colinérgicos por um transportador específico. Logo, a colina livre dentro das terminações colinérgicas é acetilada através da transferência do grupo acetil da Acetil-CoA, reação catalisada pela enzima citosólica colina acetiltransferase (ChAT) (RANG et al., 2007; VENTURA et al., 2010; FISHER e WONNACOTT, 2012).

Uma vez sintetizada, a maior parte da ACh é transportada por um transportador vesicular específico de ACh (VAcHT) e armazenada em vesículas sinápticas. A ACh é liberada das vesículas por exocitose, desencadeada pela entrada de íons de cálcio (Ca^{2+}). Uma vez liberada, a ACh difunde-se através da fenda sináptica e interage com seus receptores presentes nas membranas pré- e pós-sinápticas. A ação da ACh é interrompida pela sua hidrólise formando a colina, que é recapturada pelos neurônios colinérgicos, e acetato. Esta reação é catalisada pela AChE, que se localiza ligada à membrana basal sendo encontrada entre as membranas pré- e pós-sinápticas (RANG et al., 2007; VENTURA et al., 2010; FISHER e WONNACOTT, 2012). A figura 5 apresenta, de maneira esquemática, a neurotransmissão colinérgica (síntese, liberação, interação com receptores e degradação do neurotransmissor ACh).

Figura 5: Esquema representativo da neurotransmissão colinérgica.



Sinapse colinérgica apresentando o neurônio colinérgico pré-sináptico com a colina acetiltransferase (ChAT ou CAT), acetilcolina (ACh), vesículas contendo ACh ou vazias, transportador vesicular de ACh (VACHT) receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR) e os receptores colinérgicos muscarínicos (mAChR) pré e pós sinápticos e a enzima acetilcolinesterase (AChE) (Adaptada de Rang et al., 2007).

A ACh centralmente regula a função motora, a percepção sensorial, o processamento cognitivo, a excitação, os ciclos de sono/vigília e a nocicepção e, na periferia, controla a frequência cardíaca, a motilidade do trato gastrointestinal e a atividade do músculo liso. Esses efeitos mediados pela ACh ocorrem através da ativação dos seus receptores nicotínicos e muscarínicos (JONES, et al., 2012).

Os receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR) podem ser

divididos em três classes principais: musculares (presentes na junção neuromuscular esquelética), ganglionares (responsáveis pela transmissão nos gânglios simpáticos e parassimpáticos) e do SNC (distribuídos por todo o cérebro). Todos os nAChR são estruturas pentaméricas (cinco subunidades) que atuam como canais iônicos controlados por ligante (RANG et al., 2007). Quando ativados, esses receptores adquirem a conformação de canal aberto permeável aos íons Na^+ e K^+ , também podem permear Ca^{2+} dependendo do tipo do receptor (VENTURA et al., 2010; GIOVANNINI, et al., 2015).

Os nAChRs são uma família de canais iônicos formados por diferentes subtipos. Já foram identificados 16 diferentes membros desta família que foram designados como α (nove tipos), β (quatro tipos), γ , δ e ϵ (um tipo cada). Os subtipos dos nAChRs contêm, no geral, tanto subunidades α quanto β , sendo a única exceção o subtipo homomérico $(\alpha 7)_5$ encontrado no cérebro, sendo o mais permeável ao Ca^{2+} . Os nAChRs presentes nos músculos são heteropentâmeros constituídos por subunidades α , β , γ , δ e ϵ . O principal subtipo de receptor muscular é $(\alpha 2)/\beta 1\gamma\epsilon$, já o principal subtipo de receptor ganglionar é o $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$. No SNC doze subunidades foram descritas, são elas 9α ($\alpha 2$ – $\alpha 10$) e 3β ($\beta 2$ – $\beta 4$) (RANG et al., 2007; GIOVANNINI, et al., 2015). Somente as subunidades α contêm o sítio de ligação para a ACh e a combinação destas subunidades define a função e a afinidade do receptor para ligantes específicos (GIOVANNINI, et al., 2015).

Como visto, os diferentes subtipos dos nAChRs possuem estrutura variada e distribuição anatômica específica, bem como diferenças farmacológicas e fisiológicas. Desta forma, são variados os efeitos fisiológicos da ACh sobre os nAChRs e esses envolvem a estimulação de todos os gânglios autônomos, estimulação da musculatura voluntária e secreção da adrenalina pela medula das glândulas adrenais. Além disso, nAChRs presentes no SNC têm importância em diversos processos, como o aprendizado e a memória, o desenvolvimento neuronal e participam do sistema de recompensa, além de controlar a liberação de dopamina e de glutamato, alterar a atividade motora por modular a liberação de dopamina, controlam também a liberação de GABA e a resposta de neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo (RANG et al., 2007; VENTURA et al., 2010).

Os receptores colinérgicos muscarínicos (mAChR) pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G. Estruturalmente são proteínas de membrana contendo sete domínios transmembranares, uma região N-terminal extracelular (na qual estão os sítios de ligação

específicos para Ach, agonistas e antagonistas muscarínicos), uma região C-terminal intracelular e três alças intracelulares (i1, i2, i3), cuja diferença funcional está presente na alça i3 a qual interage com distintas proteínas G e apresenta variação na sequência de aminoácidos entre os mAChR (VENTURA et al., 2010).

Os mAChR são amplamente distribuídos e estão presentes em neurônios e na glia da maioria das regiões do SNC e, no SNP estão presentes na inervação parassimpática dos músculos cardíaco e liso (como exemplo: coração, pupila, estômago, bronquíolos, intestino e bexiga) além das glândulas salivares, lacrimais e sudoríparas (FISHER e WONNACOTT, 2012). Na tabela 1 estão representadas algumas das ações fisiológicas periféricas da ativação dos receptores muscarínicos pela Ach.

Tabela 1: Ações fisiológicas periféricas da Ach mediadas pelos mAChR

Tecido	Efeitos da Ach
Vasos (células endoteliais)	Vasodilação (liberação do óxido nítrico)
Olhos, íris (músculo esfíncter da pupila)	Contração, miose
Glândulas salivares e lacrimais	Secreção
Glândulas sudoríparas	Aumento da transpiração
Bronquíolos	Constricção e aumento da secreção
Coração	Bradycardia
Trato gastrointestinal	Aumento da motilidade e relaxamento do esfíncter
Bexiga urinária	Contração da musculatura e relaxamento do esfíncter
Tratoreprodutor masculino	Ereção

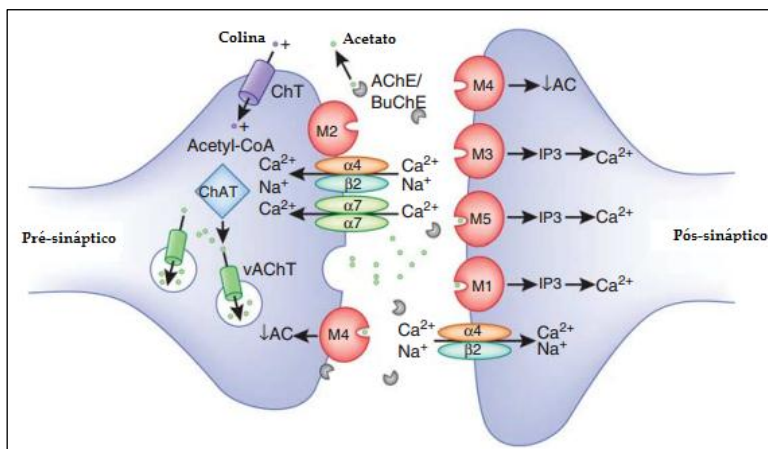
Adaptada de Fisher e Wonnacott, 2012.

Além dessas importantes funções periféricas, no SNC os mAChR estão envolvidos em funções cognitivas como memória, aprendizado e atenção, em respostas emocionais, na modulação do estresse, do sono e da vigília (VENTURA et al., 2010).

São conhecidos cinco subtipos moleculares (M_1 - M_5) de mAChR os quais quando ativados, a proteína G, composta por três

subunidades ($G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$), tem suas subunidades desacopladas devido a atividade da $G\alpha$ que se desliga do GDP e liga-se ao GTP, iniciando uma cascata de sinalização intracelular, envolvendo segundos mensageiros. Dependendo do tipo de mAChR e do tipo de proteína G associada, diversos são os efeitos produzidos. Foi determinado que os mAChR do tipo M_1 , M_3 e M_5 quando ativos acoplam-se seletivamente à proteína $Gq/G11$ e induzem a geração de inositol-1,4,5-trisfosfato e 1,2-diacilglicerol através da ativação da fosfolipase $C\beta$ específica de fosfatidilinositol, seguido do aumento intracelular de Ca^{2+} e ativação de MAPK (proteína cinase ativada por mitógeno). Diferentemente, os mAChR M_2 e M_4 , quando ativados, acoplam-se seletivamente à proteína G inibitória, Gi/Go , que inibe a atividade da adenilato ciclase e reduz os níveis intracelulares de AMP cíclico, resultando na redução da atividade da proteína cinase A (PKA). Estes receptores M_2 e M_4 quando localizados no terminal pré-sináptico atuam como autoreceptores, ou seja, quando ativados regulam negativamente a liberação da ACh (JONES, et al., 2012; FISHER e WONNACOTT, 2012; VENTURA et al., 2010). A figura 6 apresenta um esquema da sinapse colinérgica com a localização e ação dos receptores colinérgico.

Figura 6: Representação esquemática da sinapse colinérgica com a localização e função dos receptores colinérgicos.



(Legenda na próxima página)

Os mAChR do tipo M_1 , M_3 e M_5 quando ativos acoplam-se seletivamente à proteína Gq/G11 e induzem a geração de inositol-1,4,5-trisfosfato e 1,2-diacilglicerol através da ativação da fosfolipase $C\beta$ específica de fosfatidilinositol, seguido do aumento intracelular de Ca^{2+} . Os mAChR M_2 e M_4 , quando ativados, acoplam-se seletivamente à proteína G inibitória, Gi/Go, que inibe a atividade da adenilato ciclase e reduz os níveis intracelulares de AMP cíclico, resultando na redução da atividade da proteína cinase A (PKA). Adaptado de Jones et al., 2012.

1.2.2. Toxicidade dos compostos OFs

Os efeitos dos compostos OFs para o organismo dependem da dose, da frequência, da duração e via de exposição, além de outros fatores, como a exposição combinada a outros produtos químicos, bem como, a sensibilidade e susceptibilidade individual (ABOU-DONIA, 2003). Geralmente a exposição por ingestão ou inalação levam ao aparecimento imediato de sintomas. Já a exposição dérmica pode apresentar efeitos locais imediatos como a diaforese (transpiração excessiva) local e fasciculações (contração muscular pequena, local, momentânea e involuntária) e efeitos sistêmicos tardios (KING e AARON, 2015).

A exposição a altas concentrações de OFs em curto período de tempo causa toxicidade aguda, com a inibição da enzima AChE como mecanismo primário. A AChE é responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina nas sinapses colinérgicas terminando a neurotransmissão colinérgica. A inibição da AChE, portanto, causa acúmulo deste neurotransmissor, resultando na superestimulação dos seus receptores muscarínicos e nicotínicos, que se localizam na maioria dos órgãos do corpo. É importante destacar que 70-80% da inibição é necessária para que ocorra a toxicidade sistêmica. A “síndrome colinérgica” é então a consequência desta superestimulação, que tem como características o aumento da transpiração e salivação, profunda secreção brônquica, broncoespasmo, miose, aumento da motilidade gastrointestinal, diarreia, tremores e espasmos musculares. Esta pode levar à morte devido à insuficiência respiratória em decorrência da inibição de centros respiratórios no tronco cerebral ocasionando broncoespasmo e paralisia dos músculos respiratórios (EATON et al., 2008; SLOTKIN, 2004; VALLE e LOTTI, 2015).

Além da “síndrome colinérgica” a exposição aguda aos OFs pode levar ao desenvolvimento da síndrome intermediária (SI) ou da neurotoxicidade tardia induzida por organofosforados (NTIOF). Ambas,

usualmente, acontecem após a ingestão de compostos OFs seja de maneira acidental ou em tentativa de suicídio (BALTAZAR et al., 2014; VALLE e LOTTI, 2015).

A SI é caracterizada por distúrbios na junção neuromuscular que ocorrem de 1 a 4 dias após o envenenamento, acometendo pacientes conscientes e que receberam tratamento para a síndrome colinérgica aguda. A falência respiratória associada a SI é um dos principais fatores que contribuem para a alta mortalidade das intoxicações por OFs. Embora a fisiopatologia dessa síndrome não seja claramente compreendida, acredita-se que ocorra como resultado de um excesso persistente de ACh na junção neuromuscular, devido a liberação de OFs mais lipofílicos contidos no tecido adiposo, levando a uma inibição tardia e prolongada da AChE. Além disso, a regulação negativa ou dessensibilização de receptores pós-sinápticos da ACh ou a falha na liberação pós-sináptica deste neurotransmissor, parecem contribuir na fisiopatologia da SI. Além disso, outras possíveis causas têm sido consideradas, tais como necrose muscular e miopatia relacionada ao estresse oxidativo (BALTAZAR et al., 2014; VALLE e LOTTI, 2015).

A outra complicação desencadeada pela exposição aguda aos OFs é a NTIOF. Essa é uma patologia neurodegenerativa que se caracteriza pela axonopatia distal centro-periférica, que é seguida por degeneração dos axônios longos presentes no sistema nervoso central (SNC) e no sistema nervoso periférico (SNP). Os sinais e sintomas incluem formigamento das mãos e dos pés, seguido por perda sensorial, fraqueza muscular, flacidez dos músculos esqueléticos e ataxia, que aparecem cerca de 1 - 4 semanas após o episódio da intoxicação aguda (ABOU-DONIA, 2003; CHOWDHARY et al., 2014; COSTA, 2006; VALLE e LOTTI, 2015). De modo geral, a NTIOF não está relacionada com a inibição da AChE, mas sim com a fosforilação e subsequente envelhecimento de pelo menos 70% de uma esterase, a esterase neurotóxica (ENT), uma serina esterase presente, não exclusivamente, no sistema nervoso. A perda da função da ENT, após seu envelhecimento, tem como resultado prejuízo na homeostase de fosfolípidios de membrana e na função do retículo endoplasmático, bem como, perda no transporte axonal e de interações glio-axônios, por fim ocorrendo degeneração axonal seguida pela desmielinização das fibras nervosas (BALTAZAR et al., 2014; CHOWDHARY et al., 2014 VALLE e LOTTI, 2015). Entretanto, o papel da ENT na degeneração axonal envolvida na NTIOF permanece obscura, tendo em vista, que alguns pesticidas OFs que causam a neurotoxicidade tardia não inibem

a ENT. Além do mais, existem OFs que inibem essa esterase, mas não são neurotóxicos. Estes fatos indicam que outros eventos induzidos pelos OFs parecem estar relacionados com a neurotoxicidade tardia (ABOU-DONIA, 2003; COSTA, 2006; VALLE e LOTTI, 2015).

Além desta síndrome neurotóxica, há também a neurotoxicidade crônica induzida por organofosforados (NCIOF), uma patologia do SNC que envolve neurodegeneração resultando em anormalidades neurológicas, neurocomportamentais e neuropsicológicas. A NCIOF acontece devido à exposição a uma única e grande dose tóxica ou a pequenas doses subclínicas, e persiste por anos após a exposição, apresentando efeitos diferentes dos colinérgicos e da NTIOF. Nos casos de NCIOF, os sinais e sintomas incluem dor de cabeça, sonolência, tonturas, ansiedade, apatia, confusão mental, inquietação, emoções lábeis, anorexia, insônia, letargia, fadiga, incapacidade de se concentrar, déficits de memória, depressão, irritabilidade, confusão, fraqueza e tremores. Nesta síndrome, as lesões neuropatológicas são observadas em várias regiões do SNC, incluindo o córtex, hipocampo e cerebelo. Estas lesões são caracterizadas pela morte de células neuronais resultante de necrose ou apoptose (ABOU-DONIA, 2003).

Entretanto, pouco se sabe a respeito dos mecanismos envolvidos nas síndromes neurotóxicas; sugere-se que, nos casos de toxicidade crônica (exposições repetidas ou a longo prazo), não haja a participação da inibição da AChE como alvo primário, ou seja, eventos não-colinérgicos (alternativos) poderiam estar relacionados (Da SILVA, 2006). Estudos já vêm demonstrando que a indução de estresse oxidativo por OFs, através da alteração da atividade de enzimas antioxidantes, aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) levando a peroxidação lipídica, podem ter um importante papel na toxicidade desses compostos em vez da inibição da AChE (BROCARDO et al., 2005; GULTEKIN et al., 2000; LEE, et al., 2012; SAULSBURY et al., 2009).

Também foi visto que exposições crônicas ao diclorvos induziram neurodegeneração apoptótica, pelo aumento dos níveis de Ca^{2+} na mitocôndria levando a disfunção mitocondrial e indução de estresse oxidativo (KAUR et al., 2007). Além disso, um recente trabalho do nosso grupo mostrou que exposições repetidas ao malation, causou alterações bioquímicas hipocâmpais em camundongos, tais como disfunção mitocondrial, ativação astrogliar e aumento nos níveis das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak, contribuindo para os danos

cognitivos observados. Estas alterações não foram acompanhadas da diminuição da atividade da AChE hipocampal nem de sinais evidentes de toxicidade colinérgica (dos SANTOS et al., 2016).

1.2.3. Tratamento das intoxicações por OFs

O tratamento das intoxicações agudas por OFs envolve medidas gerais, drogas antimuscarínicas, reativadores da enzima AChE e a utilização de benzodiazepínicos (CHOWDHARY et al., 2014; IYER et al., 2015; KING e AARON, 2015).

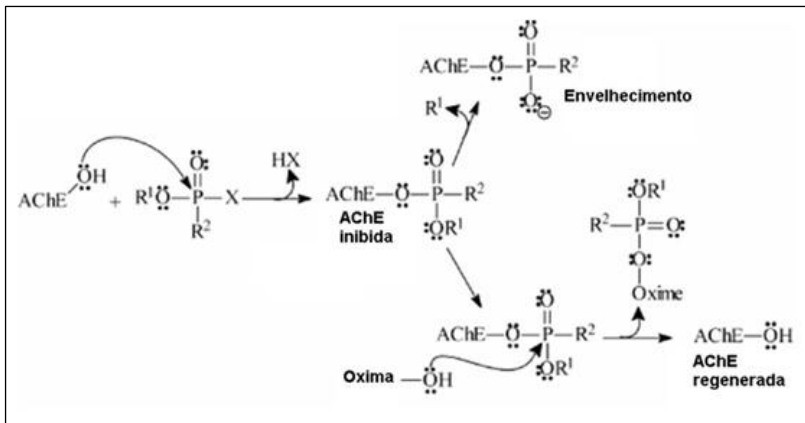
Primeiramente são realizadas condutas que tentam eliminar o contato do paciente com o composto OF. Portanto, tais medidas gerais envolvem a remoção do veneno não absorvido, seja pela descontaminação da pele, quando a via de exposição for a via dérmica, ou, no caso de ingestão, a lavagem gástrica que deve ser efetuada dentro de 2 horas após o contato com o toxicante, além da administração de carvão ativado. Algumas medidas de suporte também são utilizadas, como a manutenção da ventilação, o controle da frequência cardíaca e da pressão arterial (CHOWDHARY et al., 2014).

Posteriormente, são utilizados os agentes antimuscarínicos, oximas e benzodiazepínicos. A atropina é a principal droga utilizada nos casos de envenenamento agudo por OFs. Este composto é um alcaloide que atua como antagonista competitivo de receptores muscarínicos da ACh tanto do SNC quanto do SNP, competindo pelo mesmo sítio de ligação. (KING e AARON, 2015; IYER et al., 2015; VALLE e LOTTI, 2015). A administração da atropina tem como objetivo reverter a hiperestimulação dos receptores muscarínicos causada pelo acúmulo da ACh. Portanto, a utilização desse alcaloide é importante na redução dos sintomas muscarínicos, tais como salivação, lacrimejamento, náuseas, vômitos, diarreia, bradicardia e, principalmente, no controle dos sintomas respiratórios como, as secreções brônquicas, broncoespasmo, broncoconstrição e edema pulmonar. Todavia as manifestações nicotínicas não são prevenidas, já que a atropina reverte apenas os sintomas muscarínicos (CHOWDHARY et al., 2014; KING e AARON, 2015; VALLE e LOTTI, 2015).

Já as oximas funcionam como reativadores das ChEs, promovendo a reativação enzimática e, portanto, restaurando a sua função. As oximas são moléculas que possuem um nitrogênio quaternário que se liga diretamente ao sítio aniônico da enzima, deslocando a ligação do OF junto ao sítio esterásico por serem doadores

de próton H^+ , estabelecendo uma ligação oxima-OF e reativando dessa forma a enzima (GONÇALVES et al., 2006). Assim, quando reativada a AChE é capaz de degradar a ACh evitando a hiperestimulação dos seus receptores. Porém, como mencionado anteriormente, as ChEs são altamente susceptíveis ao processo de envelhecimento deixando a enzima refratária a reativadores (ABOU-DONIA, 2003; CHOWDHARY et al., 2014). Portanto, para uma reativação eficaz é necessária a administração das oximas dentro de 24 horas após intoxicação aguda pelos OFs (CHOWDHARY et al., 2014). A figura 7 mostra o processo de inibição, reativação e envelhecimento da enzima AChE.

Figura 7: Processos de inibição, reativação e envelhecimento da enzima AChE.



O processo de inibição ocorre através da fosforilação pelo grupo fosforil ($P=O$) dos OFs da hidroxila do resíduo de serina. As oximas podem reativar a AChE pela sua ligação ao sítio aniônico da enzima, deslocando a ligação do OF junto ao sítio esterásico por serem doadores de próton H^+ , estabelecendo uma ligação oxima-OF e reativando dessa forma a enzima inibida. O processo de envelhecimento consiste na perda por eliminação ou desalquilação do fósforo conjugado do OF, por meio da quebra da ligação oxigênio-alquil resultando em um complexo aniônico bastante estável (AChE-OF). Quando este processo acontece, a enzima pode ser considerada irreversivelmente inibida, resistindo a ação de reativadores, como as oximas. Adaptado de Gonçalves et al., 2006.

O efeito benéfico das oximas nessas intoxicações é a reversão das manifestações nicotínicas periféricas como a fraqueza muscular e a paralisia (KING e AARON, 2015). Existem cinco oximas mais comuns em uso que incluem a pralidoxima (Px), trimedoxima, obidoxima, metoxima e HI-6 (CHOWDHARY et al., 2014; IYER et al., 2015), sendo a pralidoxima a oxima mais comumente utilizada em todo o mundo (CHOWDHARY et al., 2014). As oximas parecem ter uma capacidade limitada para atravessar a barreira hemato-encefálica, fato que torna os efeitos clinicamente insignificantes no SNC, embora haja alguma evidência de que a pralidoxima possa cruzar essa barreira (CHOWDHARY et al., 2014; IYER et al., 2015; VALLE e LOTTI, 2015).

A administração de benzodiazepínicos ocorre principalmente para interromper episódios de convulsões induzidos pela exposição aos OFs (KING e AARON, 2015). A ação principal desses compostos é intensificar a resposta ao GABA (ácido gama-aminobutírico), um neurotransmissor que medeia a transmissão sináptica inibitória no SNC, por meio da ligação aos seus receptores GABA (canal iônico controlado por ligante que permeia cloreto). Os benzodiazepínicos atuam sobre os receptores GABA de forma seletiva e alostericamente aumentando a afinidade do GABA pelos seus receptores e assim facilitando a abertura do canal de cloreto. Desta forma, esses compostos melhoram a ação do GABA reduzindo a ansiedade, agitação, fasciculações musculares e convulsões (CHOWDHARY et al., 2014; RANG e DALE, 2007). O diazepam (Valium) tem sido a principal escolha como anticonvulsivante. Este fármaco tem demonstrado aumentar a taxa de sobrevivência de pacientes que sofreram exposição aos OFs, por interromper efetivamente as convulsões (IYER et al., 2015). Além disso, segundo Vale e Lotti, 2015, vários estudos farmacocinéticos em animais mostraram que o diazepam aumenta os benefícios da atropina e da clássica combinação de atropina e oximas (VALE e LOTTI, 2015). Por outro lado, esse benzodiazepínico tem apresentado algumas desvantagens graves. Quando administrado em doses mais elevadas o diazepam diminui as funções de controle motor e, em doses mais baixas, têm efeitos secundários indesejáveis, incluindo amnésia e atividade sedativa. Além disso, o repetido uso de diazepam também pode levar ao desenvolvimento de tolerância e dependência (IYER et al., 2015).

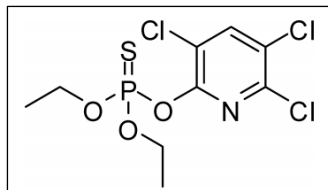
1.3. CLORPIRIFÓS

Nos EUA dentro da classe dos inseticidas OFs, o Clorpirifós (CPF) vem sendo o mais empregado na agricultura desde 2007 (GRUBE et al., 2011). No Brasil, desde 2004, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proibiu a industrialização, produção, distribuição, comercialização e entrega de inseticidas de uso doméstico e em ambientes coletivos à base de CPF. Porém, para fins agrícolas, o CPF tem o registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e, segundo a ANVISA, tem seu emprego permitido para aplicação nas folhas de culturas de algodão, batata, café, feijão, maçã, milho, soja, trigo, entre outras, podendo também ser aplicado no solo nas culturas de batata e milho. Da mesma forma, nos EUA, o uso residencial deste inseticida foi abolido desde 2001, limitando sua utilização na agricultura (U.S. EPA 2000).

Em relação às exposições ao CPF, a via dérmica e inalatória são as mais relevantes em comunidades agrícolas, gerando um grave problema de saúde pública devido à exposição ocupacional de trabalhadores responsáveis por aplicar o pesticida, além da exposição ambiental dos moradores de áreas próximas a lavouras tratadas com este composto. Por outro lado, o contato por meio da dieta parece ser a principal fonte de exposição não ocupacional, uma vez que o uso residencial foi proibido, reduzindo a exposição por inalação (EATON et al., 2008).

O CPF é um inseticida organofosforotioato (O,O-dietil O-3,5,6-tricloro-2-piridil fosfotioato) amplamente utilizado na agricultura. É um composto lipofílico e, portanto, é capaz de atravessar facilmente as membranas celulares, entrando no citoplasma das células (KI et al., 2013). A estrutura química desse composto pode ser observada na figura 8.

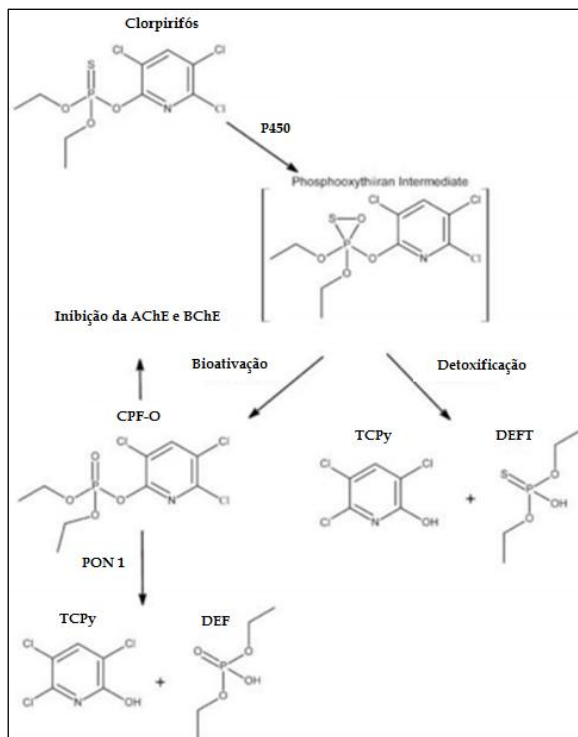
Figura 8: Estrutura química do clorpirifós.



Clorpirifós (O,O-dietil O-3,5,6-tricloro-2-piridil fosfotioato) Eaton et al., 2008.

O CPF é metabolizado podendo sofrer o processo de bioativação gerando o metabólito tóxico clorpirifós oxon (CPF-O). Além disso, pode também ser detoxificado formando metabólitos não tóxicos com o 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCPy), metabólito específico do clorpirifós e o dietilfosforotioato (DEFT) (EATON et al., 2008). O CPF, por ação do citocromo P-450 (CPY), gera um intermediário instável que se hidrolisa espontaneamente para formar DEFT e TCPy, os quais são eliminados pela urina. Por outro lado, pela ação do CPY, o CPF é oxidado sendo bioativado formando o CPF-O que, por sua vez, pode sofrer a ação da PON1 que degrada esse composto a metabólitos não tóxicos como o TCPy e o dietilfosfato (DEF), que são excretados pela urina (EATON et al., 2008). O esquema da metabolização do CPF pode ser observado na figura 9.

Figura 9: Metabolismo do Clorpirifós.



(Legenda na próxima página)

A detoxificação do clorpirifós (CPF) leva a formação do 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCPy), metabólito específico do clorpirifós e o dietilfosforotioato (DEFT). O CPF pode ser bioativado formando o clorpirifós-oxon (CPF-O) e esse por ação da paroxonase-1 (PON1) é degradado a metabólitos não tóxicos como o TCPy e o dietilfosfato (DEF). Adaptado de Crane et al., 2012.

O CPF é considerado uma neurotoxina por causar inibição da AChE no SNC (KI et al., 2013). Apesar de sua capacidade de inibir a AChE ser fraca, ao ser metabolizado, o CPF gera um metabólito ativo tóxico e mais potente, o CPF-O. A habilidade do CPF-O em se ligar e inibir irreversivelmente a AChE no SNC é o mecanismo de ação primário. Porém, não é necessariamente o único envolvido nos efeitos tóxicos do CPF (EATON et al. 2008). Saulsbury e colaboradores demonstraram que a neurotoxicidade induzida pelo CPF não foi associada à ativação colinérgica, uma vez que antagonistas dos receptores muscarínicos e nicotínicos não foram capazes de reverter à diminuição da viabilidade celular induzida pelo CPF (SAULSBURY et al., 2009).

1.3.1. Mecanismos não-colinérgicos

Neste contexto, recentes estudos vêm indicando possíveis mecanismos alternativos (não-colinérgicos) para a neurotoxicidade deste pesticida. Um mecanismo proposto é a indução do estresse oxidativo pelo CPF. Alguns trabalhos mostraram que o CPF foi capaz de gerar dano oxidativo em vários modelos *in vitro*, nos quais este pesticida foi responsável por induzir o aumento de EROs causar peroxidação lipídica, dano ao DNA e depleção de glutathiona (GSH) (GIORDANO et al., 2007; SAULSBURY et al., 2009; LEE et al., 2012; KI et al., 2013; LEE et al., 2014). Além disso, o CPF causou disfunção mitocondrial, uma vez que levou a inibição da atividade do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (LEE et al., 2012).

De particular importância, foi demonstrado que a toxicidade induzida pelo CPF é aumentada pela depleção de GSH intracelular. Um estudo utilizando cultura de neurônios granulares do cerebelo de camundongos que não expressavam a enzima glutamato cisteína ligase (GCL), a primeira enzima da síntese de GSH, mostrou que a neurotoxicidade do CPF e de seu metabólito oxon foi significativamente aumentada (GIORDANO et al., 2007). Outro estudo mostrou que o pré-tratamento de células progenitoras de oligodendrócitos com dietil maleato (DEM), um agente que depleta a GSH intracelular, também

aumentou a citotoxicidade induzida pelo CPF (SAULSBURY et al., 2009). Estes dados indicam que a redução dos níveis de GSH, parece ser um evento importante no mecanismo de toxicidade induzido pelo CPF.

A GSH é um tripeptídeo encontrado não somente no citosol, como também está presente no núcleo e na mitocôndria, onde desenvolve um importante papel como antioxidante. Esta molécula é o tiol não-protéico mais abundante e eficiente antioxidante presente nas células onde sua concentração varia entre 1 e 10 mM. A GSH pode atuar como um *scavenger* de EROs, pela reação direta sobre os radicais, assim como é um substrato para as reações catalisadas pela glutatona peroxidase (GPx) e glutatona transferase (GST). A depleção da GSH e a regulação de algumas enzimas relacionadas com a GSH podem estar relacionadas com eventos críticos na fisiologia e em situações patológicas que comprometem a homeostase das células neurais (MAZZETTI et al., 2015).

Por outro lado, a utilização de compostos antioxidantes tem minimizado os efeitos tóxicos do CPF. Foi visto que a N-acetilcisteína (NAC), uma molécula precursora da GSH, reduziu a produção EROs, a peroxidação lipídica e a morte celular induzida pelo CPF (LEE et al., 2012; KI et al., 2013; LEE et al., 2014). Outro composto antioxidante que apresentou efeitos protetores perante a toxicidade do CPF foi o Trolox. O Trolox é uma molécula análoga a vitamina E, porém, mais hidrossolúvel, que foi capaz de reverter a diminuição da viabilidade induzida pelo CPF (SAULSBURY et al., 2009). Esses dados da literatura indicam o papel do estresse oxidativo no mecanismo de toxicidade do CPF.

Além disso, alguns estudos vêm demonstrando a ativação de MAPKs pelo pesticida CPF como um evento envolvido na sua toxicidade (CAUGHLAN et al., 2004; KI, et al., 2013; LEE, et al., 2012). Um trabalho mostrou que a ativação da ERK1/2 contribuiu para redução da viabilidade celular e indução de apoptose em uma cultura primária de neurônios após exposição tanto ao CPF quanto ao CPF-O (CAUGHLAN et al., 2004). Além disso, foi observado que a utilização dos inibidores da MEK/ERK1/2 e da p38^{MAPK} protegeram da redução da viabilidade celular induzida pelo CPF em células SH-SY5Y e PC12 (KI, et al., 2013; LEE, et al., 2012).

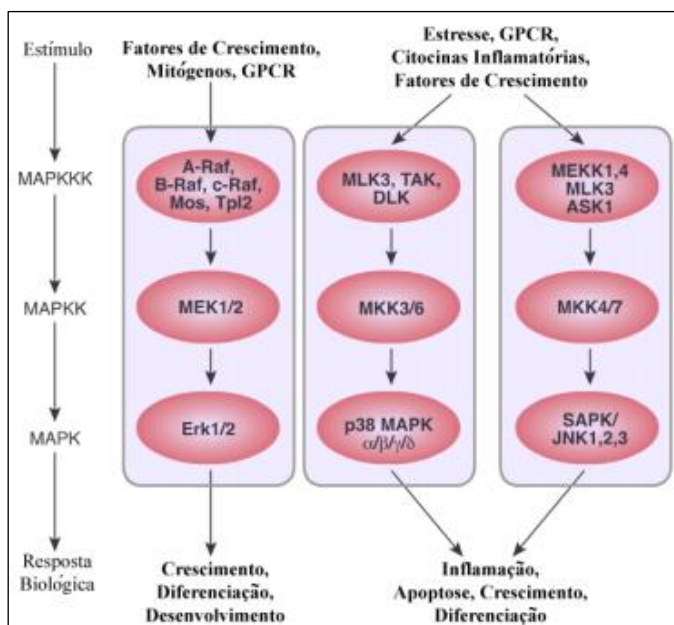
As proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) compõem um grupo de serina-treonina cinases que conduzem, amplificam e integram sinais originados de uma variedade de estímulos

extracelulares. Entre estes estímulos pode-se citar fatores de crescimento, toxinas, citocinas ou estresse ambiental (TIBBLES e WOODGETT, 1999). Esta sinalização resulta em respostas celulares como proliferação, diferenciação, desenvolvimento, inflamação e apoptose (DONG e BODE, 2003).

As MAPKs são agrupadas em pelo menos quatro famílias com base na similaridade das sequências de aminoácidos, mecanismos de regulação e mecanismos de ativação (ROBINSON e COBB, 1997). Estas famílias compreendem as proteínas cinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelular (ERK 1/2), uma das famílias de MAPKs mais estudadas no SNC; e as proteínas cinases ativadas por estresse (SAPKs) que incluem as c-Jun amino terminal cinases (JNKs), composta pelas isoformas JNK 1/2/3 e a p38^{MAPK}, composta pelas isoformas p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ . A ativação de todas as MAPKs ocorre por dupla fosforilação em resíduos de treonina e tirosina (CARGNELLO e ROUX, 2011).

A cascata de sinalização das MAPKs está representada na figura 10, e é composta por 3 cinases a qual se inicia pela chamada cinase da cinase da MAP cinase (MAPKKK). Esta, por sua vez, ativa uma segunda cinase, a MAPKK (cinase da MAP cinase) através de resíduos de serina e treonina. A ativação dessa é responsável pela subsequente fosforilação de MAPKs em resíduos de treonina e tirosina (ROBINSON e COBB, 1997; CARGNELLO e ROUX, 2011).

Figura 10: Cascata de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos.



Todas as vias das MAPKs quando ativas iniciam uma cascata de fosforilação que resulta em vários tipos de respostas celulares. Adaptado de www.cellsignaling.com. Acesso em: 24.11.2016.

Chen e colaboradores (2012), demonstraram o papel da hiperfosforilação da GSK3 β nas alterações comportamentais induzidas pelo CPF em um modelo animal de depressão, sugerindo como um mecanismo não colinérgico envolvido na neurotoxicidade desse OF (CHEN et al., 2012).

A glicogênio sintase cinase-3 β (GSK3 β) recebeu este nome devido a descoberta do seu envolvimento na fosforilação e consequente inativação da glicogênio sintase, enzima chave do metabolismo do glicogênio (GRIMES e JOPE, 2001). Existem duas formas altamente homólogas de GSK3 em mamíferos, a GSK3 α e a GSK3 β . A enzima GSK3 β é amplamente expressa em todos os tecidos, com níveis abundantes particularmente no cérebro (WOODGETT, 1990). A GSK3 é uma serina/reonina cinase que apresenta um papel central na regulação da plasticidade neuronal, da expressão gênica e na

sobrevivência celular, e pode ser um componente chave de certas doenças psiquiátricas e neurodegenerativas (GRIMES e JOPE, 2001).

A atividade da GSK3 pode ser inibida pela fosforilação da Ser-9. Têm sido descritas várias cinases capazes de realizar esta modificação, como por exemplo a AKT (também chamada de proteína cinase B - PKB), certas isoformas da proteína cinase C (PKC), a proteína cinase dependente de AMPc (PKA), bem como a cinase p38^{MAPK}. Por outra lado, sua ativação parece envolver a fosforilação da Tyr-216 ou pela redução da fosforilação da Ser-9 (BIKKAVILLI et al., 2008; GRIMES e JOPE, 2001).

A GSK3 β tem papel em muitos sistemas de sinalização intracelular. Uma das vias mais estudadas é a via de sinalização da Wnt que é regulada pela GSK3 β . Essa via refere-se a uma grande família de glicoproteínas que atuam sobre uma família de receptores ligados a membrana. A β -catenina é um componente dessa via. Quando a via da Wnt está inativa, a GSK3 β , constitutivamente ativa (não-fosforilada) promove a fosforilação da β -catenina, a qual é encaminhada para a degradação via ubiquitina-proteassoma. No entanto, em situações que a via encontra-se ativada, GSK3 β é inativada por fosforilação e dessa forma permite que a β -catenina entre no núcleo da célula e interaja com fatores de transcrição, regulando assim a expressão gênica (GRIMES e JOPE, 2001).

Cabe ressaltar dentro destes mecanismos regulatórios, a modulação da enzima AKT, uma serina/treonina cinase que possui dois sítios regulatórios de fosforilação, o Thr-308 no domínio catalítico e Ser-473 no domínio regulatório C-terminal (NICHOLSON e ANDERSON 2002). Essa proteína pode regular através da fosforilação a função de muitas proteínas celulares envolvidas em processos relacionados ao metabolismo, apoptose, proliferação e neuroplasticidade (SONG et al., 2005), como a proteína GSK3 β (GRIMES e JOPE, 2001). No entanto, pouco se sabe a respeito da ativação da via AKT/GSK3 β / β -catenina frente a exposição aos compostos OFs e sua relação com os efeitos tóxicos induzidos pelos mesmos.

2. JUSTIFICATIVA

De acordo com o CIT/SC e o SINITOX, são numerosos os casos de intoxicação por agrotóxicos registrados anualmente no estado de Santa Catarina e no Brasil e grande parte desses casos acarretam em óbitos. Além disso, de acordo com o PARA da Anvisa, no ano de 2016, mais da metade das amostras analisadas de alimentos de origem vegetal, representativos da dieta da população brasileira, apresentaram contaminação por agrotóxicos. Esses dados indicam a magnitude do problema e a necessidade de pesquisas que busquem elucidar os mecanismos de toxicidade desses compostos, a fim de identificar tratamentos mais eficazes para os casos de intoxicação.

A toxicidade dos pesticidas OFs apresenta um mecanismo bem estabelecido que envolve a inibição da enzima AChE, como alvo primário, desencadeando uma variedade de sinais e sintomas que caracterizam a “síndrome colinérgica”. Por outro lado, algumas evidências indicam que efeitos não-colinérgicos, ou seja, que não estão relacionados com a inibição da AChE, podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de síndromes neurotóxicas induzidas pelos OFs. Deste modo, é de extrema importância investigar outros mecanismos moleculares, além da inibição da AChE, que podem potencialmente contribuir para a neurotoxicidade desses compostos.

Vale ressaltar que a busca por outros eventos associados à exposição aos pesticidas OFs é importante, uma vez que o tratamento antídoto convencional, utilizado em casos de intoxicações humanas por esses pesticidas, baseia-se particularmente no antagonismo dos efeitos colinérgicos decorrentes da inibição da enzima AChE. Este tratamento envolve a utilização de atropina (antagonista colinérgico), pralidoxima (reativador da colinesterase) e benzodiazepínicos, para interromper episódios de convulsões. Entretanto, este tratamento convencional parece ser limitado e apresenta alguns problemas em relação a sua eficácia bem como, o aparecimento de efeitos indesejáveis.

Desta forma, o conhecimento gerado a respeito de mecanismos moleculares não-colinérgicos envolvidos na toxicidade dos pesticidas OFs pode, futuramente, melhorar a conduta clínica padrão realizada em indivíduos intoxicados com esses pesticidas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar possíveis eventos não-colinérgicos envolvidos na neurotoxicidade induzida pelo pesticida CPF e seu metabólito CPF-O em cultivos celulares de neurônios hipocámpais de camundongos (linhagem HT22).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar os efeitos da exposição ao CPF e CPF-O nas células HT22 sobre marcadores de viabilidade (redução do MTT) e citotoxicidade (liberação da lactato desidrogenase (LDH) e incorporação do iodeto de propídeo (IP));
- II. Avaliar o efeito da atropina e da pralidoxima frente a neurotoxicidade induzida pelo CPF ou pelo CPF-O sobre as células HT22 através do ensaio da redução do MTT;
- III. Verificar a geração de espécies reativas em resposta à exposição ao pesticida (CPF e CPF-O) através do ensaio do diidroetídeo (DHE);
- IV. Avaliar o efeito da exposição ao pesticida (CPF e CPF-O) sobre a concentração de GSH (marcador de estresse oxidativo) através da medida dos níveis de tióis não-proteicos (NPSH);
- V. Avaliar o efeito de compostos antioxidantes, como o Trolox e a NAC sobre a neurotoxicidade induzida pelo CPF ou pelo CPF-O sobre as células HT22 através do ensaio de redução do MTT;
- VI. Avaliar o efeito da exposição ao pesticida (CPF e CPF-O) sobre o conteúdo total e a fosforilação das MAPKs (ERK1/2, P38^{MAPK}) em células HT22, através da técnica de *Western blotting* (WB);
- VII. Avaliar o efeito da exposição ao pesticida (CPF e CPF-O) sobre o conteúdo total e a fosforilação das proteínas AKT,

GSK3 β e o conteúdo de β -catenina em células HT22, através da técnica de *Western blotting* (WB);

- VIII. Investigar o envolvimento da ERK1/2 e p38^{MAPK} na neurotoxicidade induzida pelo pesticida (CPF e CPF-O) utilizando inibidores, através do ensaio da redução do MTT.
- IX. Investigar o envolvimento da ERK1/2 com os níveis de GSH, por meio do uso do inibidor U0126 através da medida dos níveis de tióis não-proteicos (NPSH);

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. REAGENTES

O pesticida clorpirifós e seu metabólito clorpirifós-oxon foram obtidos das empresas Sigma-Aldrich e Interprise, respectivamente. Estes compostos foram preparados em dimetilsulfóxido (DMSO) puro, na concentração de 300 mM (solução mãe), e alíquotas de 20 µL foram preparadas e mantidas a -20°C. A partir da solução mãe foi realizada a primeira diluição em água milliQ estéril e, para as diluições seguintes, foi utilizada uma solução de DMSO a 2%, afim de que a concentração final de DMSO nos poços da placa de cultivo não ultrapassasse a concentração de 0,5%.

Os compostos acetilcolina, Trolox e N-acetilcisteína foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich. Os inibidores das MAPKs, MEK/ERK1/2 (U0126) e p38^{MAPK} (SB203580), foram obtidos da empresa Cell Signaling Technology. Os anticorpos primários anti-fosfo-ERK1/2 (M8159) e anti-total-ERK1/2 (M5670) foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich, o anticorpo anti-fosfo-p38^{MAPK} (05-1059) da empresa Millipore e o anticorpo anti-total-p38^{MAPK} (M0800) da empresa Sigma-Aldrich. O anticorpo anti-fosfo-AKT (P4112) foi obtido da empresa Sigma-Aldrich e os anticorpos anti-total-AKT (#9272), anti-fosfo-GSK3β (#9336) e anti-total-GSK3β (#9315) da empresa Cell Signaling Technology. O anticorpo anti-β-catenina (C2206) foi obtido da empresa Sigma-Aldrich e o anticorpo anti-β-actina (sc-47773) foi obtido da empresa Santa Cruz Biotechnology. Os anticorpos secundários anti-rabbit (AP132P) e anti-mouse (AP308P) foram obtidos da empresa Millipore. O meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) e o soro fetal bovino (SFB) foram obtidos da empresa Gibco Life Technologies.

4.2. CULTIVO CELULAR

No presente trabalho foi utilizado uma linhagem celular de neurônios hipocâmpais de camundongos (HT22), que foi gentilmente doada pelo Salk Institute, por intermédio do professor Dr. Alcir Luiz Dafre. As células HT22 são uma sublinhagem derivada das células HT4, que foram originalmente imortalizadas a partir de uma cultura primária de neurônios hipocâmpais de camundongos (FREDERIKSEN et al., 1988). Foi demonstrado por Liu e colaboradores, 2009, que as células HT22 expressam marcadores colinérgicos, tais como a colina

acetiltransferase (ChAT), enzima responsável pela síntese de acetilcolina, um importante marcador de neurônio colinérgico, além do transportador de alta afinidade pela colina (TAC), transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) e receptores muscarínicos (M1 e M2) (LIU et al., 2009).

As células foram cultivadas em DMEM, pH entre 7,2-7,3, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, inativo pelo calor na temperatura de no máximo 57°C por 40 minutos), 2 mM de glutamina, 0,28 µg/µL de gentamicina e 250 µg de anfotericina B e mantidas em atmosfera contendo 5% de CO₂, a 37°C. O meio de cultivo era trocado a cada 2 dias e, ao atingirem uma confluência de 80-90%, as células eram repicadas utilizando tripsina (0,05%).

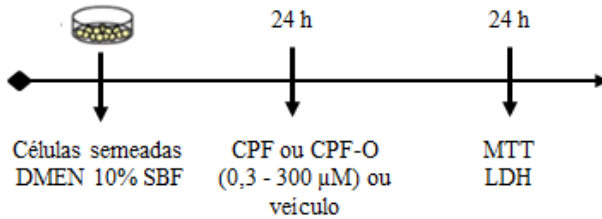
Os experimentos foram realizados utilizando células entre a 5^a e a 15^a passagem, apresentando uma confluência de 75 a 85%. O número de células foi padronizado por meio de contagem em câmara de Neubauer e as mesmas eram cultivadas em placas de 6, 12, 24 ou 96 poços, de acordo com a necessidade experimental.

4.3. TRATAMENTOS DO CULTIVO CELULAR

As células foram semeadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas em cultura, o meio foi trocado para DMEM contendo 1% de SFB e as células foram submetidas aos diferentes tratamentos como explicado a seguir.

Primeiramente, foram realizados estudos de toxicidade, nos quais as células HT22 foram expostas a diferentes concentrações do pesticida CPF e do seu metabólito oxon (0,3 - 300 µM). As células controle foram tratadas com DMSO 0,1%, o veículo do CPF e CPF-O. Os experimentos foram realizados após 24 horas de exposição. A figura 11 apresenta a linha do tempo descritiva desse protocolo experimental 1.

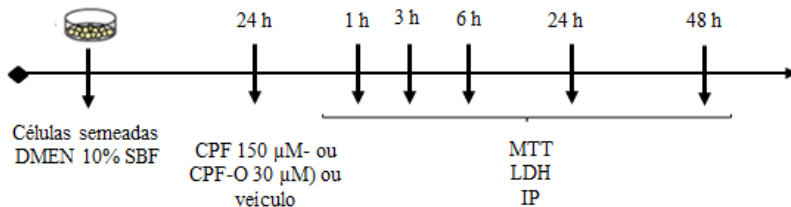
Figura 11: Linha do tempo descritiva do protocolo experimental 1.



As células foram semeadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas em cultura, o meio foi trocado para DMEM contendo 1% de SFB e as células HT22 foram expostas a diferentes concentrações do pesticida CPF e do seu metabólito oxon (0,3 - 300 μM) ou tratadas com DMSO 0,1%, o veículo do CPF e CPF-O. Após 24 horas de tratamento foram realizados os ensaios de MTT e LDH.

Baseado neste experimento inicial, foi calculada a CI30 (Concentração Inibitória de 30%) para o CPF (150 μM) e para o CPF-O (30 μM) e as células foram então expostas a estes pesticidas nessas concentrações por 1, 3, 6, 24 e 48 horas, conforme descrito na figura 12.

Figura 12: Linha do tempo descritiva do protocolo experimental 2.

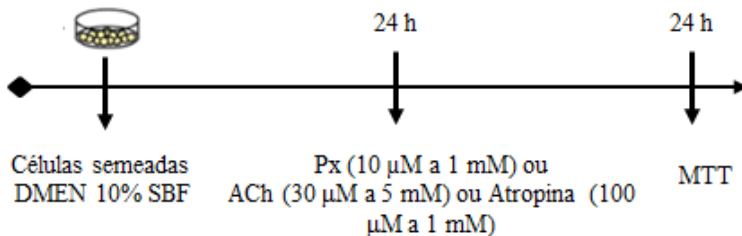


As células foram semeadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas em cultura, o meio foi trocado para DMEM contendo 1% de SFB e as células HT22 foram expostas a 150 μM de CPF, 30 μM de CPF-O ou tratadas com DMSO 0,1% (veículo). Após 1, 3, 6, 24 e 48 horas de tratamento foram realizados os ensaios do MTT, LDH e IP.

Para avaliar a relação da ativação colinérgica com a toxicidade do CPF e CPF-O, as células HT22 foram primeiramente tratadas com concentrações crescentes de Px (10 μM - 1 mM) ou veículo (água Milli-Q estéril), atropina (100 μM - 1 mM) ou veículo (água Milli-Q estéril) e

ACh ($30 \mu\text{M}$ - 5mM) ou veículo (DMSO $0,1\%$) por 24 horas. A figura 13 apresenta a linha do tempo descritiva desse protocolo experimental 3.

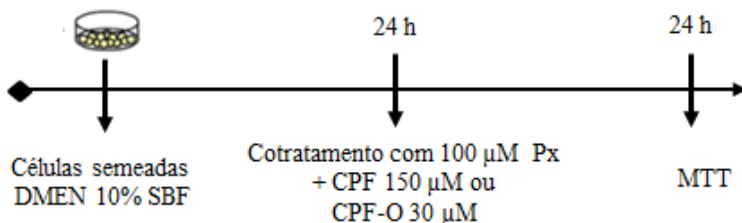
Figura 13: Linha do tempo descritiva do protocolo experimental 3.



As células foram semeadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas em cultura, o meio foi trocado para DMEM contendo 1% de SFB e as células HT22 foram tratadas com concentrações crescentes de Px ($10 \mu\text{M}$ - 1mM) ou veículo (água Milli-Q estéril), atropina ($100 \mu\text{M}$ - 1mM) ou veículo (água Milli-Q estéril) ACh ($30 \mu\text{M}$ - 5mM) ou veículo (DMSO $0,1\%$) por 24 horas. Após 24 horas de tratamento foi realizado o ensaio do MTT.

Após, as células foram tratadas concomitantemente com $100 \mu\text{M}$ de pralidoxima e $150 \mu\text{M}$ de CPF ou $30 \mu\text{M}$ de CPF-O por 24 horas, conforme a figura 14.

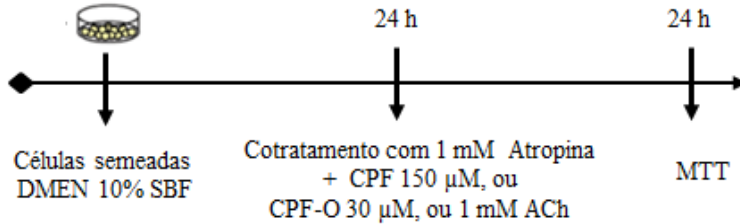
Figura 14: Linha do tempo descritiva do protocolo experimental 4.



As células foram semeadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas em cultura, o meio foi trocado para DMEM contendo 1% de SFB e as células HT22 foram cotratadas com $100 \mu\text{M}$ Px e $150 \mu\text{M}$ de CPF ou $30 \mu\text{M}$ de CPF-O por 24 horas. Após 24 horas de tratamento foi realizado o ensaio do MTT.

As células também receberam tratamento concomitante com 1 mM de atropina e 1 mM de acetilcolina ou 150 μM de CPF ou 30 μM de CPF-O por 24 horas, conforme a figura 15.

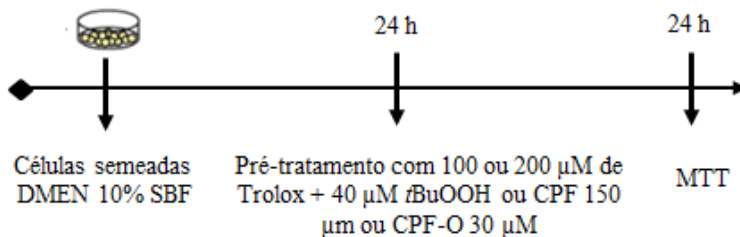
Figura 15: Linha do tempo descritiva do protocolo experimental 5.



As células foram semeadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas em cultura, o meio foi trocado para DMEM contendo 1% de SFB e as células HT22 foram cotratadas com 1 mM de atropina e 1 mM de acetilcolina ou 150 μM de CPF ou 30 μM de CPF-O por 24 horas. Após 24 horas de tratamento foi realizado o ensaio do MTT.

Para testar o efeito protetor de compostos antioxidantes frente a citotoxicidade induzida pelo CPF e CPF-O as células foram pré-tratadas com os compostos Trolox ou NAC. Os ensaios onde o antioxidante Trolox foi utilizado, as células foram pré-tratadas com este composto nas concentrações de 100 μM e 200 μM ou com veículo (DMSO 0,1%) durante 1 hora e, em seguida, foram expostas ao CPF (150 μM) ou ao CPF-O (30 μM) ou ao peróxido de *t*-butila (*t*-BuOOH, 40 μM , 24 horas) por 24 horas. A figura 16 mostra a linha de tempo descritiva desse protocolo experimental 6.

Figura 16: Linha do tempo descritiva do protocolo experimental 6.

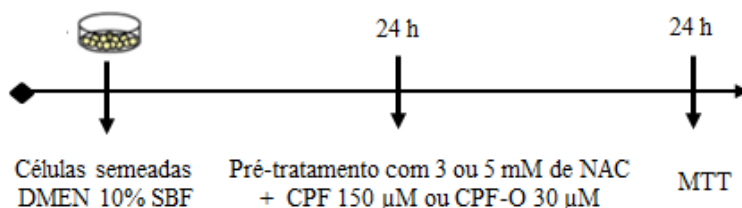


(Legenda na próxima página)

As células foram semeadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas em cultura, o meio foi trocado para DMEM contendo 1% de SFB as células foram pré-tratadas com Trolox nas concentrações de 100 μM e 200 μM ou com veículo (DMSO 0,1%) durante 1 hora e, em seguida, foram expostas ao CPF (150 μM) ou ao CPF-O (30 μM) ou ao peróxido de *t*-butila (*t*-BuOOH, 40 μM , 24 horas) por 24 horas. Após 24 horas de tratamento foi realizado o ensaio do MTT.

Nos experimentos utilizando o antioxidante N-acetilcisteína (NAC), as células HT22 foram pré-tratadas por 1 hora com a NAC nas concentrações de 3 mM e 5 mM ou com seu veículo (água Milli-Q estéril) e, logo em seguida, expostas à 150 μM CPF ou à 30 μM de CPF-O por 24 horas. A figura 17 mostra a linha de tempo descritiva desse protocolo experimental 7.

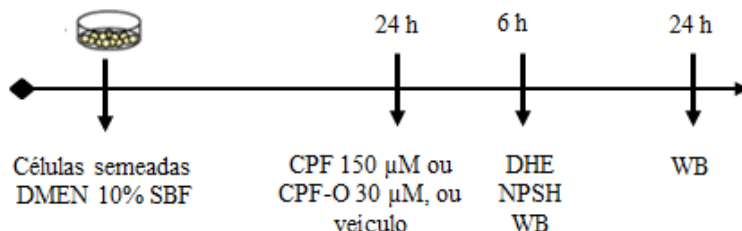
Figura 17: Linha do tempo descritiva do protocolo experimental 7.



As células foram semeadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas em cultura, o meio foi trocado para DMEM contendo 1% de SFB as células foram pré-tratadas com NAC nas concentrações de 3 ou 5 mM ou com veículo (água Milli-Q estéril) durante 1 hora e, em seguida, foram expostas ao CPF (150 μM) ou ao CPF-O (30 μM) por 24 horas. Após 24 horas de tratamento foi realizado o ensaio do MTT.

Além disso, foram realizados experimentos para determinar o efeito da exposição ao CPF e ou ao CPF-O sobre os níveis do ânion superóxido e GSH, sobre as MAPKs (ERK1/2, p38^{MAPK}) e as proteínas da via AKT/GSK3 β / β -catenina. Para esses experimentos as células foram tratadas com CPF e CPF-O nas concentrações de 150 μM e 30 μM , respectivamente, durante 6 e 24 horas. Após 6 horas foram realizados os ensaios de DHE, NPSH e WB e após 24 horas foi realizado o WB. A figura 18 mostra a linha de tempo descritiva desse protocolo experimental 8.

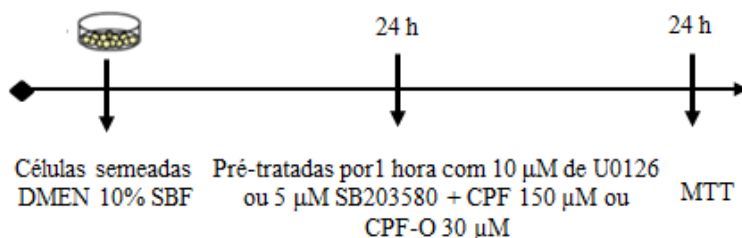
Figura 18: Linha do tempo descritiva do protocolo experimental 8.



As células foram semeadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas em cultura, o meio foi trocado para DMEM contendo 1% de SFB as células foram expostas ao CPF (150 μ M) ou ao CPF-O (30 μ M) ou DMSO 0,1% por 6 horas e após realizou-se os ensaios de DHE, NPSH e WB. Além disso, após 24 horas de tratamento foi realizado o ensaio do WB.

Foram realizados experimentos com os inibidores das MAPKs, para investigar o possível envolvimento dessas proteínas na citotoxicidade do CPF e CPF-O. Nesses as células HT22 foram pré-tratadas por 1 hora com 10 μ M de U0126 (inibidor da MEK/ERK1/2), 5 μ M SB203580 (inibidor da p38^{MAPK}) e veículo (DMSO 0,1%). Logo, as células foram expostas ao CPF e CPF-O nas concentrações de 150 μ M e 30 μ M, respectivamente, durante 24 horas. Após 24 horas de tratamento foi realizado o ensaio do MTT. A figura 19 apresenta a linha de tempo descritiva desse protocolo experimental.

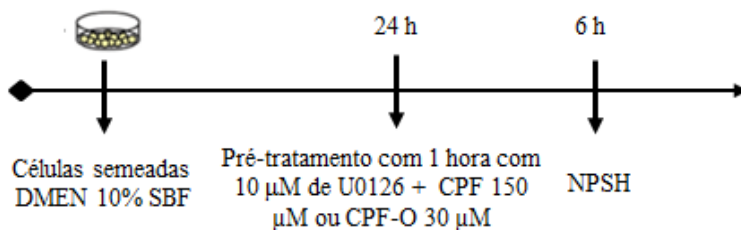
Figura 19: Linha do tempo descritiva do protocolo experimental 9.



As células foram semeadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas em cultura, o meio foi trocado para DMEM contendo 1% de SFB as células foram pré-tratadas por 1 hora com 10 μ M de U0126 ou 5 μ M SB203580 ou DMSO 0,1% e, em seguida, foram expostas ao CPF (150 μ M) ou ao CPF-O (30 μ M) por 24 horas. Após 24 horas de tratamento foi realizado o ensaio do MTT.

Por fim, as células HT22 foram pré-tratadas por 1 hora com 10 μM de U0126 (inibidor da MEK/ERK1/2) e após expostas à 150 μM CPF ou à 30 μM de CPF-O por 6 horas. Após as 6 horas foi realizado o ensaio do NPSH afim de determinar a relação entre ERK1/2 com os níveis de GSH. A figura 20 apresenta a linha de tempo descritiva desse protocolo experimental 10.

Figura 20: Linha do tempo descritiva do protocolo experimental 10.



As células foram semeadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas em cultura, o meio foi trocado para DMEM contendo 1% de SFB as células foram pré-tratadas por 1 hora com 10 μM de U0126 ou DMSO 0,1% e, em seguida, foram expostas ao CPF (150 μM) ou ao CPF-O (30 μM) por 6 horas. Após 6 horas de tratamento foi realizado o ensaio do NPSH.

4.4. ENSAIOS REALIZADOS

4.4.1. Redução do MTT

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazólio) conforme descrito por Mosmann, 1983. Este composto é reduzido por células metabolicamente ativas através da ação das enzimas desidrogenases, principalmente pela ação da succinato desidrogenase (complexo II da cadeia respiratória mitocondrial). Assim, este método é utilizado como uma forma de avaliar além da viabilidade celular a função mitocondrial (MOSMANN, 1983). As desidrogenases clivam os anéis de tetrazólio do MTT de coloração amarela gerando cristais de formazan ((4, 5-dimetiltiazol-2-il)-3, 5-difenilformazan) de cor azul escura, que podem ser solubilizados e quantificados por meios espectrofotométricos. Desta forma, a quantidade de cristais de formazan formados é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis.

Esta técnica foi realizada em células cultivadas em placas de 96 poços na densidade de $3,5 \times 10^3$ células por poço (35000 células/mL). Após o término de cada tratamento, o meio de cultivo foi removido, por inversão, e em seguida foi adicionado 100 μ L de MTT (0,5 mg/mL em solução tampão Hank's, HBSS) previamente mantido à 37°C. As células permaneceram sob incubação à 37°C na presença da solução de MTT por uma hora. Após este período, a solução de MTT foi removida e 100 μ L de DMSO puro foi adicionado para solubilização dos cristais de formazan.

Após a completa solubilização dos cristais foi realizada a leitura pontual da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm por meio do equipamento Multileitora Infinite M200 (TECAN). A viabilidade celular foi expressa pela porcentagem do controle (células não tratadas, 100%). Foram realizados 7 a 10 experimentos independentes em sextuplicata para cada tratamento.

Baseado nesses resultados, através da análise de regressão logarítmica, calculou-se a CI 30 (Concentração Inibitória de 30%), ou seja, a concentração que inibiu a viabilidade celular em 30% quando comparada ao controle (células não tratadas), considerado como 100%.

4.4.2. Liberação da lactato desidrogenase (LDH)

A LDH é uma enzima citosólica responsável por catalisar a reação de redução do piruvato a lactato, na qual o NADH é necessário como doador de elétrons. Esta enzima pode ser detectada no meio extracelular na ocorrência de um dano na membrana plasmática e, desta forma, é utilizada como um bom marcador de morte celular. Logo, a liberação da LDH que avalia a integridade da membrana plasmática foi medida de acordo com o protocolo previamente descrito (ROSA et al., 1997; PETEGNIEF et al., 2003).

Para a realização deste ensaio, as células foram cultivadas em placas de 96 poços na densidade de $3,5 \times 10^3$ células por poço (35000 células/mL). Após o término de cada tratamento, primeiramente, foi adicionado 10 μ L de Triton X-100 à 2% (concentração final no poço de 0,2%) em poços utilizados como controles positivos para a morte celular (100% de morte). Após 15 minutos de incubação a 37°C foi retirado 50 μ L de meio de cultura e passados para uma nova placa de 96 poços.

Nesta placa contendo somente o meio de cultura foi adicionado 200 μ L de Mix de reação (tampão fosfato de potássio 0,5 M pH 7,4, contendo, NaHCO_3 piruvato, e NADH). Logo, foram realizadas leituras em espectrofotômetro (Multileitora Infinite M200 - TECAN) no comprimento de onda de 340 nm de 15 em 15 segundos, por dois minutos e meio. A liberação da LDH foi expressa pela porcentagem do controle positivo (células tratadas com Triton X-100, 100%). Realizou-se 7 a 10 experimentos independentes em sextuplicata para cada tratamento.

4.4.3. Incorporação do iodeto de propídeo (IP)

O IP é excluído pelas células viáveis, porém, pode entrar rapidamente quando ocorrer um dano na membrana celular, sendo também um marcador para morte celular. Ao penetrar nas células, o IP intercala-se ao DNA permanecendo no interior das mesmas. O IP é um fluoróforo ou fluorocromo, composto que emite fluorescência ao ser excitado por um comprimento de onda específico. Esta fluorescência pode ser medida e corresponde, de forma direta, a quantidade de IP presente no interior das células. Este ensaio foi realizado de acordo com o protocolo previamente descrito (PETEGNIEF et al., 2003; ROSA et al., 1997).

Para este ensaio as células foram cultivadas em placas de 96 poços na densidade de $3,5 \times 10^3$ células por poço (35000 células/mL). Após o término de cada tratamento, primeiramente, foi adicionado 10 μ L de uma solução de Triton X-100 a 2% (concentração final no poço de 0,2%) em poços utilizados como controles para morte celular (100% de morte). Em seguida, as células foram incubadas com uma solução de 147 μ g/mL de IP por 20 a 30 minutos a 37 °C no escuro. Após o período de incubação, foi realizada a leitura em multileitor de placas (Multileitora Infinite M200 - TECAN) utilizando os comprimentos de leitura em multileitor de placas (Multileitora Infinite M200 - TECAN) nos comprimentos de onda de 488 nm de excitação e 585 nm de emissão. onda de 535 nm de excitação e 617 nm de emissão. A incorporação do IP foi expressa pela percentagem do controle positivo (células tratadas com Triton X-100, 100%). Foram realizados 7 a 10 experimentos independentes em sextuplicata para cada tratamento.

4.4.4. Determinação da produção do ânion superóxido (O₂^{•-}).

A produção do ânion superóxido foi determinada pelo ensaio de dihidroetídio (DHE), de acordo com o protocolo previamente descrito (BINDOKAS et al., 1996). O composto DHE atravessa facilmente as membranas celulares e é convertido pelo radical superóxido a etídio, um composto fluorescente de cor vermelha que se intercala ao DNA permanecendo no interior da célula. Logo, a fluorescência obtida corresponde diretamente a quantidade de ânion superóxido que é produzida.

Esta técnica foi realizada com células cultivadas em placas de 24 poços na densidade de $2,1 \times 10^4$ células por poço (42000 células/mL). A medida do ânion superóxido foi realizada após 6 horas de tratamento com o pesticida CPF ou seu metabólito oxon (CPF-O). Após os tratamentos, o meio de cultura foi removido por inversão e as células lavadas com 500 μ L de HBSS previamente aquecido a 37°C. Logo, o HBSS foi retirado também por imersão e adicionou-se 500 μ L de uma solução de DHE na concentração de 10 μ M, seguido de incubação por 30 minutos a 37°C. Após o período de incubação, realizou-se uma lavagem com HBSS seguido da Foram realizados 8 experimentos independentes. A produção do radical superóxido foi expressa pela percentagem do controle (células não tratadas).

4.4.5. Determinação do conteúdo de tióis não-proteicos (NPSH)

O conteúdo de tióis não-proteicos foi determinado de acordo com o método previamente descrito por Ellman, 1959, o qual é utilizado para avaliar principalmente a concentração de glutatona reduzida (GSH). Este método baseia-se na ligação do composto DTNB a grupos SH presentes, com a liberação do TNB, molécula que absorve luz e transmite em um comprimento de onda específico. Logo, a quantidade de luz transmitida corresponde a quantidade de GSH presente na amostra (ELLMAN, 1959).

Nesse ensaio, as células HT22 foram cultivadas em placas de seis poços na densidade de $1,02 \times 10^5$ células por poço (51.000 células/mL). A medida do conteúdo de GSH foi realizada após 6 horas de tratamento com o pesticida CPF ou seu metabólito oxon (CPF-O). Após o término dos tratamentos as células foram lavadas com PBS e coletadas por raspagem com 200 μ L de uma solução de PBS contendo 0,5% de Triton X-100, utilizada para romper a membrana das células e liberar o conteúdo intracelular. Dois poços foram utilizados para cada grupo. Após a coleta, 20 μ L de amostra foi reservado para a dosagem de proteínas e o restante foi precipitado com 180 μ L de ácido tricloroacético (TCA) a 10% gelado, seguido de centrifugação a 5.000 x g por 10 minutos a 4°C. Desta forma, o conteúdo proteico era precipitado e no sobrenadante era medido o NPSH. Para isto, o sobrenadante foi incubado com DTNB 10 mM em tampão fosfato 1 M pH 7,0. Por fim, as absorbâncias foram mensuradas em 412 nm através da utilização do espectrofotômetro (Multileitora Infinite M200 - TECAN) e uma curva de GSH foi utilizada para calcular o conteúdo de NPSH (nmol de NPSH/ μ g de proteína). Os dados foram expressos como percentual do controle (células não-tratadas).

4.4.6. Determinação do nível de fosforilação e o conteúdo total das MAPKs (ERK1/2, p38MAPK), da AKT, GSK3 β e β -catenina.

Para avaliar o nível de fosforilação das enzimas ERK, p38^{MAPK}, AKT, GSK3 β e o imunocónteúdo de β -catenina foi utilizada a técnica de *Western blotting*. Esta técnica baseia-se na separação e detecção de proteínas presentes em uma amostra através de suas diferenças de tamanho e utilizando anticorpos específicos.

Para esse ensaio as células HT22 foram cultivadas em placas de seis poços na densidade de $1,02 \times 10^5$ células por poço (51.000 células/mL). A medida do nível de fosforilação dessas proteínas foi realizada após 6 e 24 horas de tratamento com o pesticida CPF ou seu metabólito oxon (CPF-O). As células HT22 foram homogeneizadas mecanicamente em 200 μ L da solução “SDS-stopping solution”, contendo 4% SDS, 2 mM EDTA e 50 mM Tris, pH 6.8. Os lisados foram aquecidos a 100°C durante 5 min e posteriormente centrifugados (13.000 x g por 10 min) para eliminar os restos celulares. Uma alíquota do sobrenadante foi coletado para a dosagem de proteínas conforme metodologia descrita por Peterson, 1977. Aos sobrenadantes foi adicionado o tampão de diluição (40% glicerol, 100 mM Tris, azul de bromofenol, pH 6,8) 25:100 (v/v) e β -mercaptoetanol (concentração final 8%).

Depois da preparação das amostras, as proteínas (35 μ g por poço) foram separadas através de SDSPAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio/SDS) utilizando gel de separação de acrilamida com concentração de 10% e gel de entrada 4%. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 40 mA e voltagem máxima de 150 mV durante aproximadamente 2 horas. Após a corrida, os géis foram transferidos para membranas de nitrocelulose (processo de eletrotransferência) usando um sistema semi-dry (1,2 mA/cm²; 1,5 h) como descrito por Bjerrum e Heegaard, 1988. Para verificar a eficiência do processo de transferência, os géis foram corados com Coomassie blue e as membranas com Ponceau S. Após a eletrotransferência as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em tampão TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) por 1 hora. Em seguida, sucessivas lavagens com TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,5) foram realizadas e as membranas incubadas *overnight* a 4°C com anticorpos primários monoclonais em TBS-T contendo 2% de albumina nas seguintes diluições: anti-fosfo e anti-total-ERK1/2 (P-ERK, 1:2000; T-ERK, 1:40000; 44/42 kDa), anti-fosfo-p38^{MAPK} e anti-total-p38^{MAPK} (P-p38^{MAPK}, 1:10000; T-p38^{MAPK}, 1:10000; 38 kDa), anti-fosfo e anti-total-AKT (P-AKT, 1:3000; T-AKT, 1:2000; 60 kDa), anti-fosfo e anti-total-GSK3 β (P-GSK3 β , 1:2000; T-GSK3 β , 1:2000; 46 kDa), anti β -catenina (1:2000; 94 kDa) e anti- β -actina (1:2000, 43 kDa).

Após as lavagens, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário anti-coelho (1:5000) ou anti-camundongo (1:2500) conjugados com peroxidase. Feito isto, as membranas foram

expostas ao kit de emissão de quimioluminescência e o sinal emitido foi registrado pelo Fotodocumentador ChemiDoc MP (Bio-Rad, CA, USA). O controle de carga proteica foi feito utilizando o anticorpo anti- β -actina. Por fim, o nível de fosforilação foi determinado pela razão entre a densidade ótica (D.O) da banda fosforilada e a D.O da banda total. Para a proteína β -catenina, o imunocontéudo foi determinado pela razão entre a D.O da banda da proteína pela D.O da banda da β -actina. As bandas foram quantificadas utilizando o software Scion Image ® (CALLONI et al., 2005; POSSER et al., 2007).

4.4.7. Determinação de proteínas

A determinação do conteúdo de proteínas foi realizada através do método descrito por Lowry e colaboradores, 1951. Como padrão foi utilizada albumina de soro bovino (ASB).

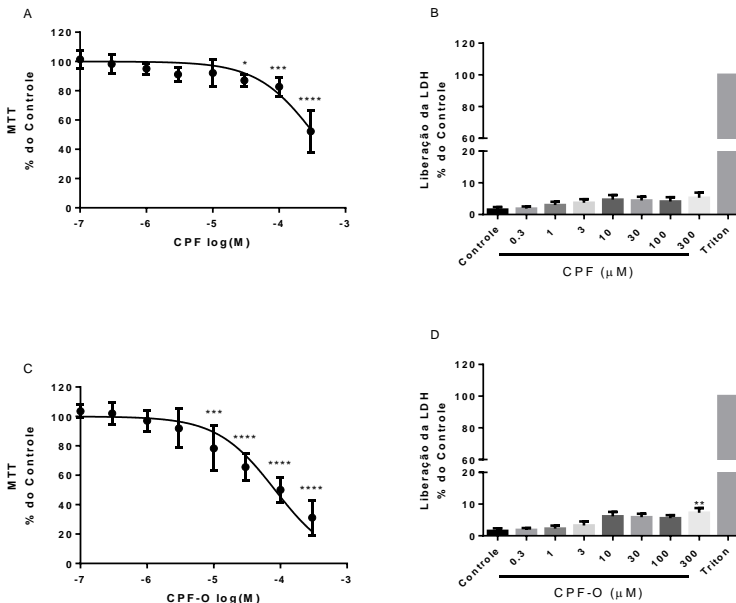
4.4.8. Análises estatísticas

As análises estatísticas e os gráficos foram feitos utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Diferenças entre grupos foram avaliadas através do teste t de Student ou pela análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA), seguidos do teste *post hoc* de Tukey. Os dados foram representados como média \pm erro padrão da média (EPM) e diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Inicialmente foi avaliada a citotoxicidade do pesticida clorpirifós (CPF) e do seu metabólito oxon (CPF-O) para as células HT22. Foi observado que a exposição ao CPF, por 24 horas, nas concentrações de 30, 100 e 300 μM reduziu significativamente a viabilidade celular das células HT22 (13, 17 e 48% respectivamente) (Figura 21 A). Por outro lado, nenhum efeito sobre a liberação da LDH foi observado após 24 horas de exposição às concentrações crescentes do CPF (Figura 21 B). Já as células HT22, quando expostas por 24 horas ao CPF-O nas concentrações de 10, 30, 100 e 300 μM , apresentaram uma redução significativa na viabilidade celular (22, 34, 50, e 70% respectivamente), conforme Figura 21 C. Todavia, somente a exposição à 300 μM de CPF-O por 24 horas levou ao aumento significativo na liberação de LDH (7,3%) (Figura 21 D).

Figura 21: O pesticida CPF e seu metabólito CPF-O reduzem a viabilidade celular das células HT22 de maneira concentração dependente.



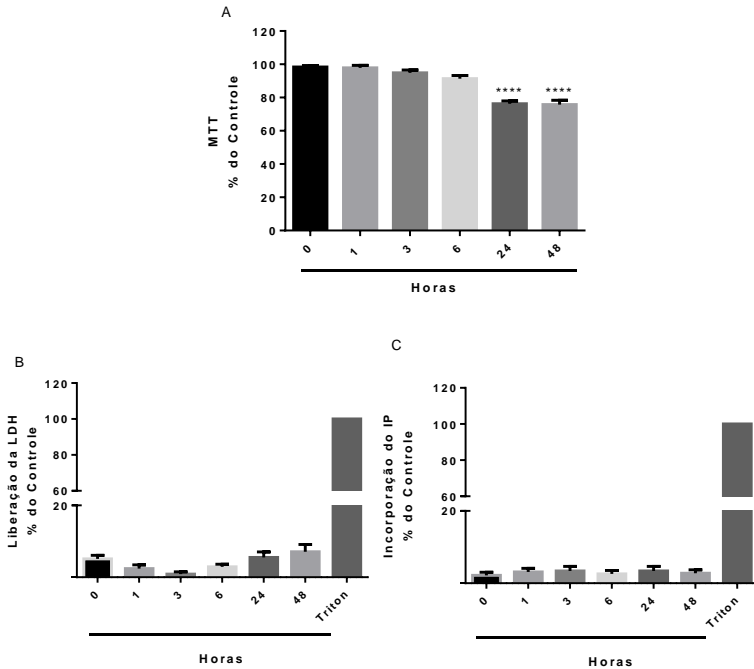
(Legenda na próxima página)

As células foram expostas a concentrações crescentes do CPF (A e B) ou CPF-O (C e D) (0, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 e 300 μM). Após 24 horas de exposição, os ensaios de citotoxicidade. A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT e o resultado expresso pela porcentagem do controle (células não tratadas, 100%). A liberação da lactato desidrogenase (LDH) foi expressa pela porcentagem em relação ao controle positivo (células tratadas com Triton X-100 2 % por 5 minutos, 100%). Cada barra representa a média \pm EPM de 7 experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ indicam a diferença quando comparados com o grupo controle conforme ANOVA de uma via seguido pelo teste de *post hoc* de Tukey.

Estes resultados indicam que tanto o clorpirifós quanto seu metabólito oxon são tóxicos para as células HT22 de maneira concentração dependente. Além disso, o CPF demonstrou ter um efeito tóxico maior quando na sua forma metabolizada, uma vez que seu metabólito oxon (CPF-O) levou a redução da viabilidade celular em concentrações inferiores. Logo, apresentando uma CI_{30} de 30 μM , cinco vezes menor a CI_{30} do CPF (150 μM).

Em seguida, com a CI_{30} do CPF e do CPF-O foi realizada uma curva de tempo para se estabelecer uma relação temporal e determinar o momento que antecede a redução da viabilidade celular previamente observada. Conforme apresentado na Figura 22 A, foi possível observar que a exposição à 150 μM de CPF reduziu de forma significativa a viabilidade celular das células HT22 somente nos períodos de 24 e 48 horas (24 e 25% respectivamente). Por outro lado, tanto a liberação de LDH quanto a incorporação do IP não foram alterados pela exposição à 150 μM de CPF nos períodos avaliados (Figuras 22 B e 22 C, respectivamente).

Figura 22: O CPF reduz a viabilidade celular de células HT22 e não altera liberação da LDH e incorporação do IP.

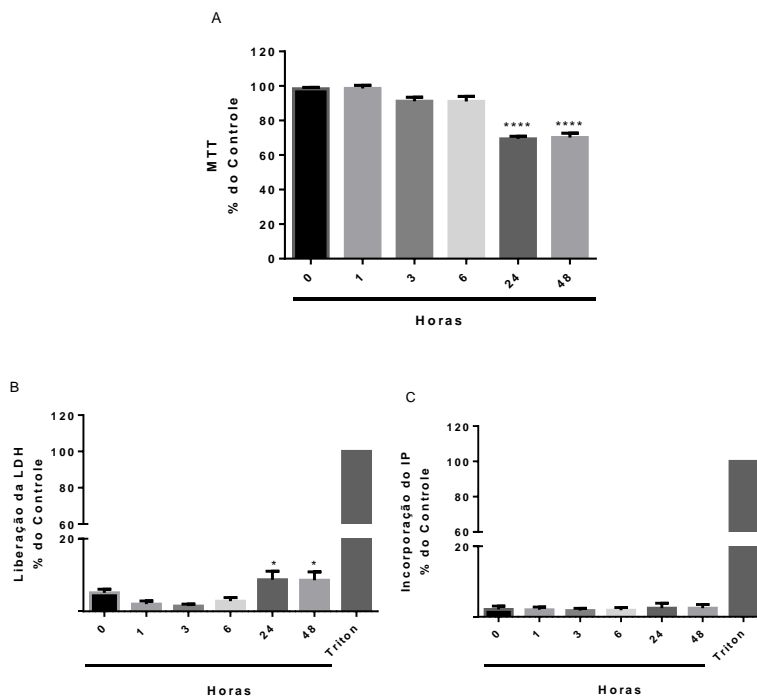


As células foram expostas a 150 μM de CPF em diferentes tempos (0, 1, 3, 6, 24 e 48 horas), nos quais foram realizados ensaios de citotoxicidade. (A) A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT e o resultado expresso pela porcentagem do controle (células não tratadas, 100%). (B) A liberação da lactato desidrogenase (LDH) foi expressa pela porcentagem em relação ao controle positivo (células tratadas com Triton X-100 2% por 5 minutos, 100%). (C) A incorporação do iodeto de propídeo (IP) foi expressa pela porcentagem em relação ao controle positivo (células tratadas com Triton X-100 2% por 5 minutos, 100%). Cada barra representa a média \pm EPM de 10 experimentos independentes. **** $p < 0,001$ indica a diferença quando comparado com o grupo controle conforme ANOVA de uma via seguido pelo teste de *post hoc* de Tukey.

Em relação a exposição ao CPF-O, também foi observada redução significativa da viabilidade celular das células HT22 após 24 e 48 horas (31 e 30% respectivamente), conforme demonstrado na Figura

23 A. Além disso, a exposição por 24 e 48 horas à 30 μM de CPF-O levou ao aumento significativo da liberação da LDH (8,7 e 8,6% respectivamente, Figura 23 B), mas não alterou a incorporação do IP (Figura 23 C).

Figura 23: O CPF-O reduz a viabilidade celular de células HT22 e aumenta a liberação da LDH.



As células foram expostas à 30 μM CPF-O em diferentes tempos (0, 1, 3, 6, 24 e 48 horas), nos quais foram realizados ensaios de citotoxicidade. (A) A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT e o resultado expresso pela porcentagem do controle (células não tratadas, 100%). (B) A liberação da lactato desidrogenase (LDH) foi expressa pela porcentagem em relação ao controle positivo (células tratadas com Triton X-100 2 % por 5 minutos, 100%). (C) A incorporação do iodeto de propídeo (IP) foi expressa pela porcentagem em relação ao controle positivo (células tratadas com Triton X-100 2 % por 5 minutos, 100%). Cada barra representa a média \pm EPM de 10 experimentos independentes. * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$ indicam a diferença

quando comparados com o grupo controle conforme ANOVA de uma via seguido pelo teste de *post hoc* de Tukey.

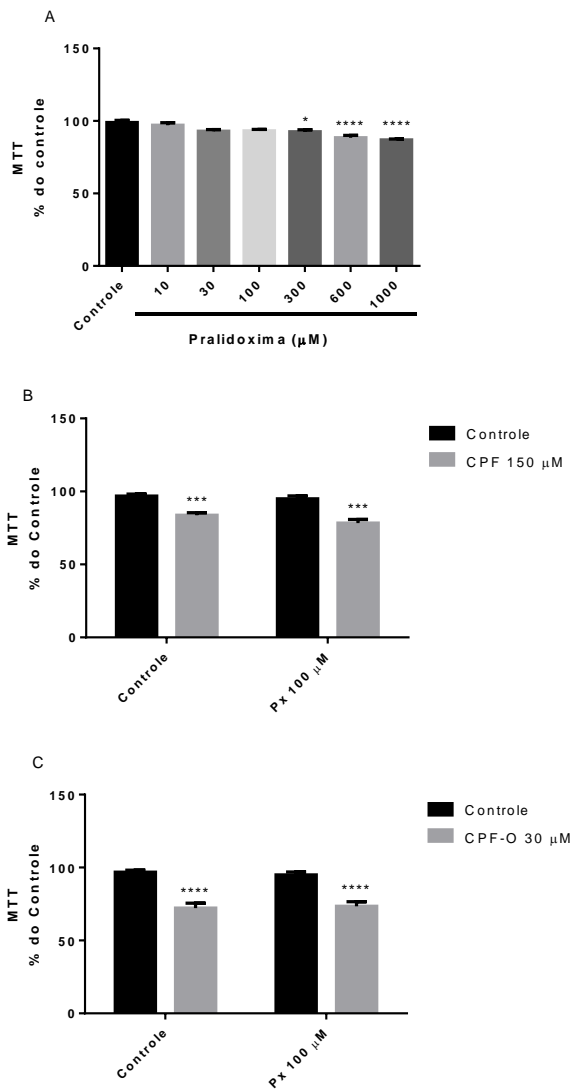
Estes resultados mostraram que a redução da viabilidade celular induzida pela exposição tanto ao CPF na concentração de 150 μM , quanto ao CPF-O na concentração de 30 μM ocorreu a partir de 24 horas. Dessa forma, estabelecemos o período de 6 horas, como ponto inicial para investigarmos os eventos moleculares que poderiam estar relacionados com a citotoxicidade apresentada por este pesticida e seu metabólito oxon.

O possível envolvimento da ativação colinérgica na citotoxicidade do pesticida CPF e do seu metabólito oxon foi avaliado utilizando a pralidoxima, um conhecido reativador da enzima AChE, e a atropina, um antagonista muscarínico inespecífico.

Avaliou-se inicialmente o possível efeito protetor da pralidoxima frente a citotoxicidade induzida pelo CPF e CPF-O. Primeiramente as células HT22 foram tratadas com concentrações crescentes de pralidoxima a fim de avaliar a sua toxicidade. A Figura 24 A demonstra que após 24 horas de tratamento as concentrações de 300, 600 e 1000 μM de pralidoxima reduziram de forma significativa a viabilidade celular das células HT22 (8, 12 e 13%, respectivamente).

Logo, para avaliar uma possível ação protetora frente a citotoxicidade do pesticida em estudo, foi utilizada a concentração de 100 μM de pralidoxima, a qual não alterou a viabilidade celular das células HT22 (Figura 24 A). Assim, as células HT22 foram cotratadas com 100 μM de pralidoxima e 150 μM de CPF ou 30 μM de CPF-O. De acordo com os resultados anteriores, a exposição por 24 horas à 150 μM de CPF ou à 30 μM de CPF-O reduziu de forma significativa a viabilidade celular das células HT22 (17 e 28% respectivamente, Figura 24 B e Figura 24 C). Porém, o cotratamento com 100 μM de pralidoxima não protegeu as células HT22 da citotoxicidade induzida pelo CPF ou CPF-O (Figura 24 B e C).

Figura 24: A pralidoxima não protege a redução da viabilidade celular induzida pelo CPF ou CPF-O em células HT22.



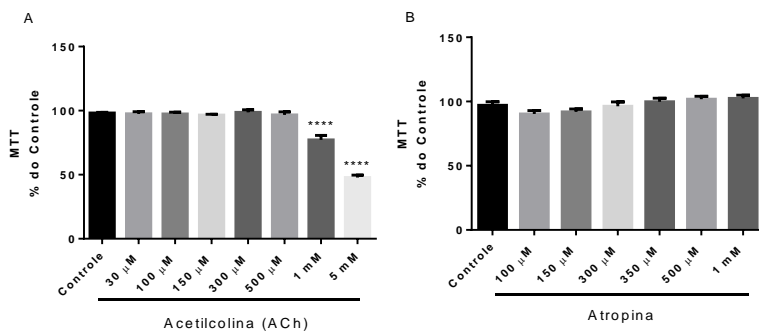
(Legenda na próxima página)

As células foram expostas a concentrações crescentes de pralidoxima (Px) (0, 10, 30, 100, 300, 1000 μM) (A), cotratadas com 100 μM de pralidoxima (Px) e 150 μM CPF (B), ou cotratadas com 100 μM de pralidoxima (Px) e 30 μM de CPF-O (C). Após 24 horas de tratamento foi realizado o ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT e o resultado foi expresso pela porcentagem do controle (células não tratadas, 100%). Cada barra representa a média \pm EPM de 6 - 7 experimentos independentes. * $p < 0,5$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ indicam a diferença quando comparados com o grupo controle conforme ANOVA de uma via (A) ou de duas vias (B e C) seguido pelo teste de *post hoc* de Tukey.

O próximo passo foi avaliar uma possível ação protetora da atropina na toxicidade induzida pelos pesticidas, bem como pelo tratamento com acetilcolina. Para isso, primeiramente, foi realizada uma curva de concentração (30 μM à 5 mM) com a ACh no período de 24 horas, para determinar que concentração causaria uma citotoxicidade semelhante a observada pela exposição ao pesticida e seu metabólito oxon e, assim, ser possível comparar o efeito do cotratamento da atropina com o CPF, CPF-O e com a ACh.

Logo, na Figura 25 A foi observado que as células HT22 quando tratadas por 24 horas com 1 ou 5 mM de ACh têm a viabilidade celular reduzida significativamente (23 e 52% respectivamente, Figura 25 A). Em seguida, a toxicidade da atropina para as células HT22 foi avaliada utilizando concentrações crescentes (100 μM à 1 mM) da mesma. Observou-se que o tratamento por 24 horas com atropina não alterou a viabilidade celular das células HT22 (Figura 25 B). Desta forma, com estes resultados, foi escolhida a concentração de 1 mM de ACh pois, essa apresentou uma redução na viabilidade celular semelhante a do CPF e do CPF-O e 1 mM de atropina devido sua ação como um antagonista competitivo.

Figura 25: Efeito da ACh e da atropina sobre as células HT22.

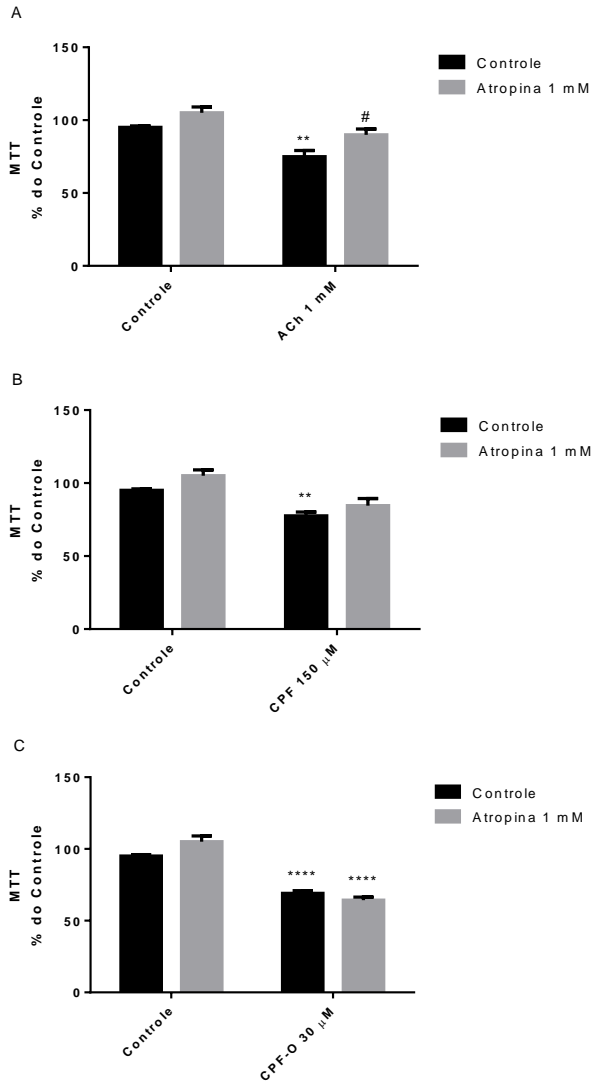


As células foram expostas a concentrações crescentes de ACh (0, 30, 100, 300, 500 μ M, 1 e 5 mM) (A) e concentrações crescentes de atropina (0, 100, 150, 300, 350, 500 μ M e 1 mM) (B), por 24 horas. Após 24 horas de tratamento foi realizado o ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT e o resultado expresso pela porcentagem do controle (células não tratadas, 100%). Cada barra representa a média \pm EPM de 6 - 9 experimentos independentes. **** $p < 0,0001$ indicam diferença quando comparado com o grupo controle, conforme ANOVA de uma via seguido pelo teste de *post hoc* de Tukey.

Desta forma, com estes resultados, foi escolhida a concentração de 1 mM de ACh pois, essa apresentou uma redução na viabilidade celular semelhante a do CPF e do CPF-O e 1 mM de atropina devido sua ação como um antagonista competitivo. Logo, essas concentrações foram utilizadas no estudo seguinte, no qual, foi testada a proteção da atropina frente a citotoxicidade induzida pela ACh, pelo CPF e pelo CPF-O.

Conforme já observado, a exposição à 1 mM de ACh, à 150 μ M de CPF ou à 30 μ M de CPF-O reduziu de forma significativa a viabilidade celular das células HT22 (25, 22 e 30% respectivamente, Figura 26 A, 26 B e 26 C). O cotratamento com 1 mM de atropina somente protegeu as células HT22 da redução da viabilidade celular induzida por 1 mM de ACh (90%, Figura 26 A). Já as células tratadas concomitantemente com 1 mM de atropina e 150 μ M de CPF ou 30 μ M de CPF-O permaneceram com a viabilidade em torno de 85 e 64% respectivamente (Figura 26 B e 26 C).

Figura 26: A atropina não protege as células HT22 da citotoxicidade induzida pelo CPF e CPF-O, mas protege da superestimulação colinérgica induzida pela ACh.



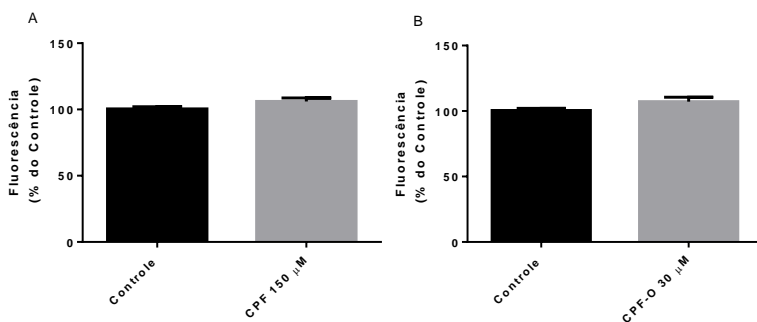
(Legenda na próxima página)

As células HT22 foram coexpostas a 1 mM de ACh e 1 mM de atropina (A), coexpostas a 150 μ M de CPF e 1 mM de atropina (B) e coexpostas a 30 μ M de CPF-O e 1 mM de atropina (C) por 24 horas. Após 24 horas de tratamento foi realizado o ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT e o resultado expresso pela porcentagem do controle (células não tratadas, 100%). Cada barra representa a média \pm EPM de 6 - 9 experimentos independentes. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ indicam diferença quando comparado com o grupo controle e # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo 1 mM de ACh conforme ANOVA de duas vias (C, D e E) seguido pelo teste de *post hoc* de Tukey.

Tomados em conjunto, estes resultados indicam que a toxicidade do pesticida CPF e do seu metabólito oxon para as células HT22, ao menos em parte, não parece ser dependente da ativação colinérgica. Uma vez que, tanto o cotratamento com a pralidoxima quanto com a atropina não foram eficazes em proteger as células HT22 da redução da viabilidade celular induzida pelo CPF e pelo CPF-O.

Na tentativa de compreender os mecanismos de toxicidade do CPF e do seu metabólito oxon, que poderiam estar causando a redução da viabilidade celular nas células HT22, investigamos o envolvimento do estresse oxidativo. Foi avaliado se esse pesticida e seu metabólito oxon poderiam levar ao aumento na geração do ânion superóxido, bem como alteração nos níveis de glutatona. Observou-se que tanto a exposição ao CPF (150 μ M) quanto ao CPF-O (30 μ M), por 6 horas, não alterou a geração intracelular do ânion superóxido, conforme demonstrado na Figura 27 A e 27 B, respectivamente.

Figura 27: A exposição ao CPF ou CPF-O não altera a geração do ânion superóxido em células HT22.

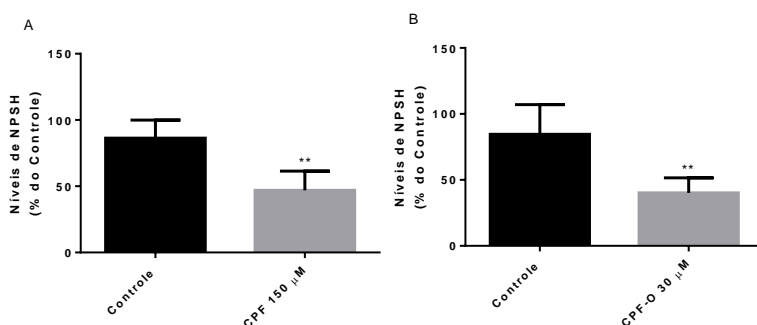


(Legenda na próxima página)

As células foram expostas à 150 μM CPF (A) ou 30 μM de CPF-O (B) por 6 horas. Após 6 horas de tratamento foi realizado o ensaio do DHE. O resultado foi expresso pela porcentagem do controle (células não tratadas, 100%). Cada barra representa a média \pm EPM de 8 experimentos independentes. Não houve alteração significativa em relação ao grupo controle conforme o teste t de Student.

Entretanto, a exposição ao CPF e ao CPF-O, durante 6 horas induziu uma redução significativa nos níveis de glutatona de 40 e 45% respectivamente (Figura 28 A e 28 B).

Figura 28: A exposição ao CPF ou CPF-O reduz os níveis de tióis não proteicos (NPSH) em células HT22.



As células foram expostas à 150 μM CPF (A) ou 30 μM de CPF-O (B) por 6 horas. Após 6 horas, foi realizado o ensaio para determinação dos níveis de NPSH. O resultado foi expresso pela porcentagem do controle (células não tratadas, 100%). Cada barra representa a média \pm EPM de 5 experimentos independentes. ** $p < 0,01$ indica a diferença quando comparados com o grupo controle conforme o teste t de Student.

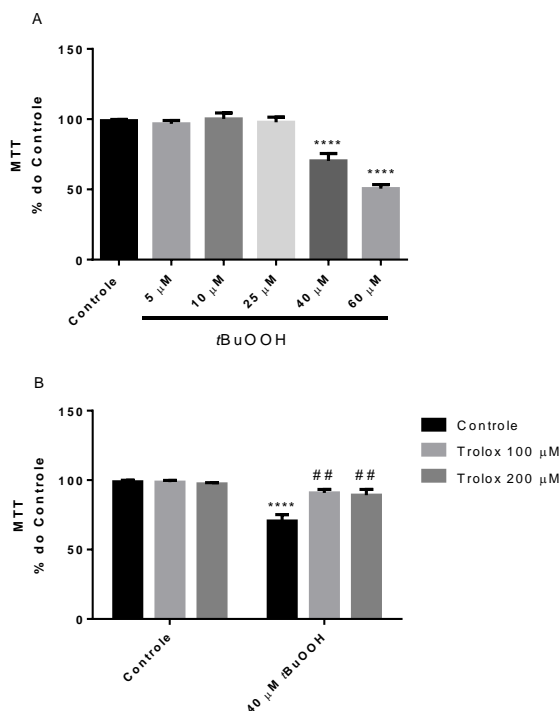
Além disso foram realizados ensaios onde as células HT22 foram pré-tratadas com antioxidantes para determinar se esses compostos eram capazes de proteger contra a redução na viabilidade celular induzida pelo CPF e seu metabólito CPF-O.

Primeiramente, foi realizado um pré-tratamento com o composto Trolox, para assegurar sua ação antioxidante, onde o mesmo foi testado frente ao efeito do peróxido de terbutila (*t*BuOOH) sobre a viabilidade celular das células HT22. Para isto, inicialmente avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de *t*BuOOH (5, 10, 25, 40 e 60 μM) sobre a viabilidade celular das células HT22. Foi observado, conforme a

Figura 29 A, que as concentrações de 40 e 60 μM de *t*BuOOH, após 24 horas de tratamento, reduziram significativamente a viabilidade celular das células HT22 (30 e 49%, respectivamente).

Assim, foi escolhida a concentração de 40 μM de *t*BuOOH para o ensaio de proteção pelo Trolox, uma vez que esta concentração apresentou uma redução na viabilidade celular semelhante a observada pelo pesticida e seu metabólito oxon. Logo, conforme demonstrado na Figura 29 B as células HT22 tratadas com 40 μM de *t*BuOOH apresentaram uma redução significativa na viabilidade celular (29%) e o pré-tratamento com o Trolox por uma hora nas concentrações de 100 ou 200 μM protegeu as células HT22 deste efeito (91 e 90% respectivamente).

Figura 29: Efeito do Trolox frente ao *t*BuOOH sobre as células HT22.

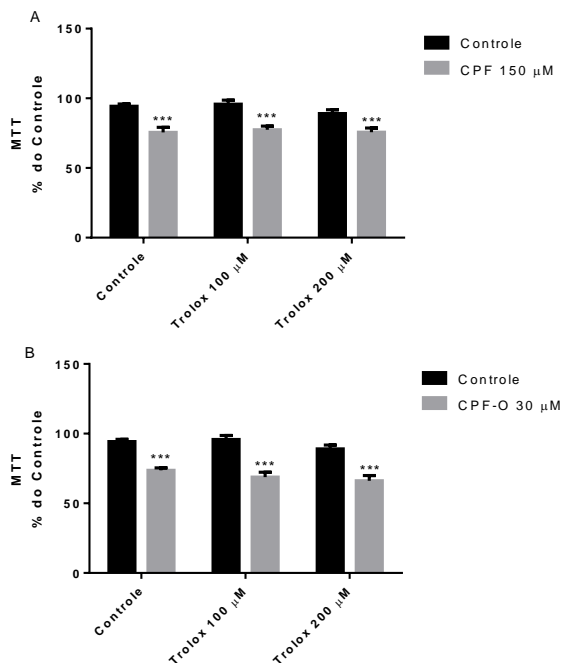


(Legenda na próxima página)

As células foram tratadas com concentrações crescentes de *t*BuOOH (0, 5, 10, 25, 40 e 60 μ M) (A) e pré-tratadas por uma hora com 100 ou 200 μ M de Trolox e após foram expostas à 40 μ M de *t*BuOOH (B). Após 24 horas de tratamento, foi realizado o ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT e o resultado foi expresso pela porcentagem do controle (células não tratadas, 100%). Cada barra representa a média \pm EPM de 6 - 10 experimentos independentes. **** $p < 0,0001$ indicam a diferença quando comparados com o grupo controle e ## $p < 0,01$ quando comparado com o grupo 40 μ M de *t*BuOOH conforme ANOVA de uma via (A) ou duas vias (B) seguido pelo teste de *post hoc* de Tukey.

Desta forma, estes resultados mostraram que o antioxidante Trolox apresentou ação protetora frente a citotoxicidade induzida pelo *t*BuOOH, validando a sua utilização como potencial molécula protetora frente ao pesticida e seu metabólito. Na sequência, foi avaliado se o Trolox apresentava este efeito protetor sobre a citotoxicidade do pesticida CPF e seu metabólito oxon. Foi observado que o pré-tratamento com Trolox não foi capaz de proteger a redução na viabilidade celular induzida pelo CPF ou pelo CPF-O (Figura 30 A e 30 B).

Figura 30: O antioxidante Trolox não protege as células HT22 da citotoxicidade induzida pelo CPF e CPF-O.

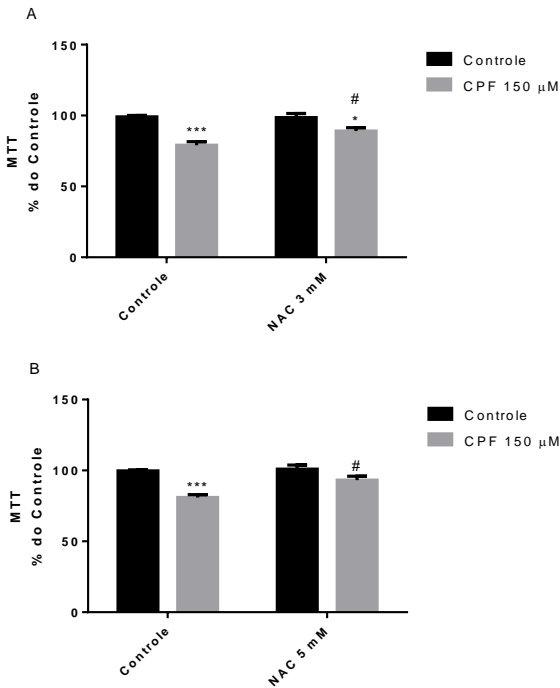


(A) As células foram pré-tratadas por uma hora com 100 ou 200 μM de Trolox seguido da exposição à 150 μM CPF ou (B) foram pré-tratadas por uma hora com 100 ou 200 μM de Trolox seguido da exposição à 30 μM de CPF-O. Após 24 horas de tratamento, foi realizado o ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT e o resultado foi expresso pela porcentagem do controle (células não tratadas, 100%). Cada barra representa a média \pm EPM de 6 - 10 experimentos independentes. *** $p < 0,001$ indicam a diferença quando comparados com o grupo controle conforme ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *post hoc* de Tukey.

Contudo, mesmo com a proteção observada pelo Trolox contra a redução da viabilidade celular induzida pelo *t*BuOOH, este composto não apresentou ação protetora frente a citotoxicidade do CPF e do CPF-O em células HT22.

Baseado na redução dos níveis de GSH observada após a exposição ao CPF e ao CPF-O, foi investigado o possível efeito protetor de outro composto antioxidante, a N-acetilcisteína (NAC) um precursor do tripeptídeo GSH. Observamos que apesar do pré-tratamento por 1 hora com 3 mM de NAC proteger apenas parcialmente da redução da viabilidade celular induzida pelo CPF, a concentração de 5 mM de NAC se mostrou eficaz na proteção das células HT22 após a exposição ao pesticida (89% e 93%, respectivamente Figura 31 A e 31 B). Já o pré-tratamento por um hora, tanto com 3 mM quanto com 5 mM de NAC, protegeu parcialmente a redução da viabilidade induzida pelo CPF-O (80% e 80%, respectivamente, Figura 32 A e 32 B).

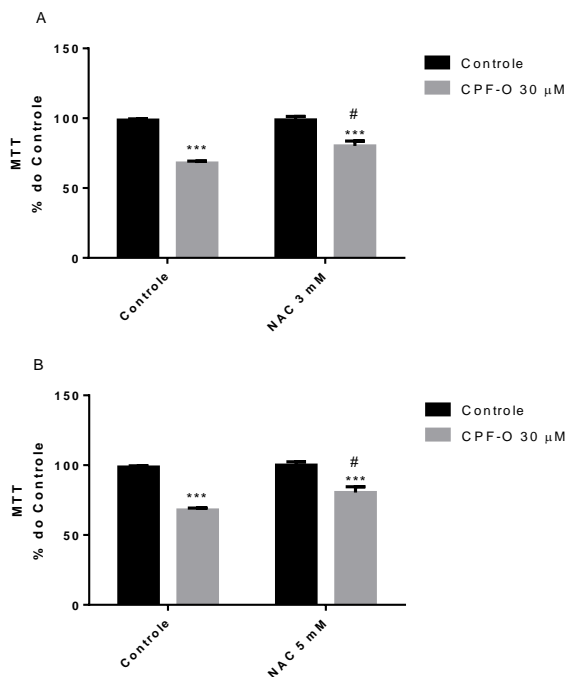
Figura 31: A NAC protege as células HT22 da redução da viabilidade celular induzida pelo CPF.



(Legenda na próxima página)

As células foram pré-tratadas por 1 hora com 3 mM ou 5 mM de NAC seguido da exposição à 150 μ M CPF (A e B) por 24 horas. Após 24 horas de tratamento foi realizado o ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT e o resultado foi expresso pela porcentagem do controle (células não tratadas, 100%). Cada barra representa a média \pm EPM de 8 experimentos independentes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ indicam a diferença quando comparados ao grupo controle e # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo CPF 150 μ M conforme ANOVA de duas via seguido pelo teste de *post hoc* de Tukey.

Figura 32: A NAC protege parcialmente as células HT22 da redução da viabilidade celular induzida pelo CPF-0.



(Legenda na próxima página)

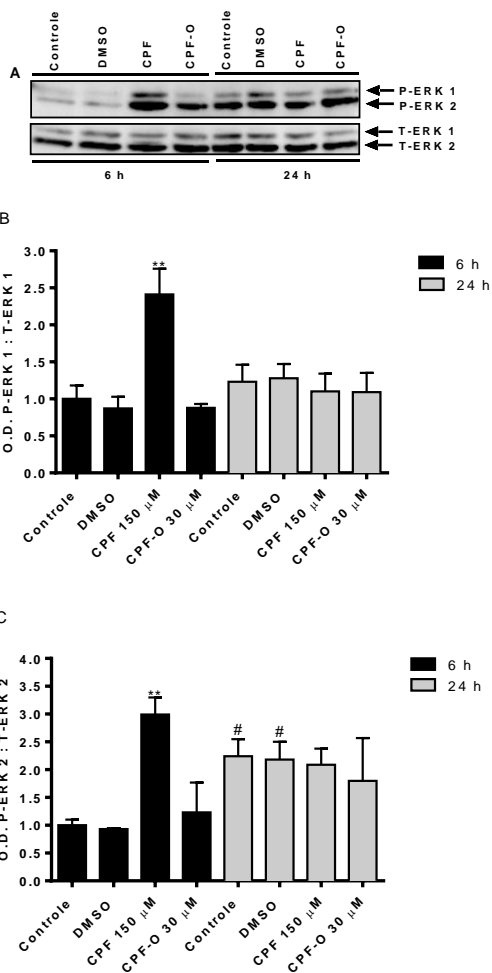
As células foram pré-tratadas por 1 hora com 3 mM ou 5 mM de NAC seguido da exposição à 30 μ M de CPF-O (A e B) por 24 horas. Após 24 horas de tratamento foi realizado o ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT e o resultado foi expresso pela porcentagem do controle (células não tratadas, 100%). Cada barra representa a média \pm EPM de 8 experimentos independentes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ indicam a diferença quando comparados com o grupo controle e # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CPF-O 30 μ M conforme ANOVA de duas via seguido pelo teste de *post hoc* de Tukey.

Em conjunto, estes resultados mostraram que no período de 6 horas de exposição ao pesticida CPF e ao seu metabólito oxon não foi observado aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido, porém observou-se uma diminuição significativa nos níveis intracelulares de GSH. Além disso, o pré-tratamento com o Trolox não foi eficaz em proteger as células HT22. Por outro lado, o pré-tratamento com NAC protegeu parcialmente estas células da citotoxicidade induzida pelo CPF e CPF-O. Sugere-se que provavelmente o evento mais importante da citotoxicidade no modelo aqui apresentado, seja a redução na concentração intracelular de glutatona induzida pelo CPF ou CPF-O após 6 horas de exposição.

Tendo em vista que foi demonstrado proteção pela NAC frente a redução da viabilidade induzida pelo CPF e além disso a NAC reduziu a fosforilação das MAPKs induzida também por esse pesticida (LEE et al., 2012) Neste contexto, foi avaliado o possível envolvimento da ativação das MAPKs e também da via da AKT/GSK3 β / β -catenina na redução da viabilidade celular das células HT22 induzida pela exposição ao CPF ou ao seu metabólito oxon.

Primeiramente, foi determinado o efeito do CPF e do CPF-O sobre as MAPKs, ou seja, se estes compostos poderiam ou não ativar estas proteínas. Conforme a Figura 33 B e 33 C, somente a exposição à 150 μ M de CPF por 6 horas aumentou significativamente a fosforilação da ERK1/2. Nota-se que após 24 horas ocorre um aumento fisiológico significativo da fosforilação da ERK2 (Figura 33 C). Da mesma forma, somente a exposição por 6 horas à 150 μ M de CPF levou ao aumento significativo na fosforilação da p38^{MAPK} (Figura 34 B).

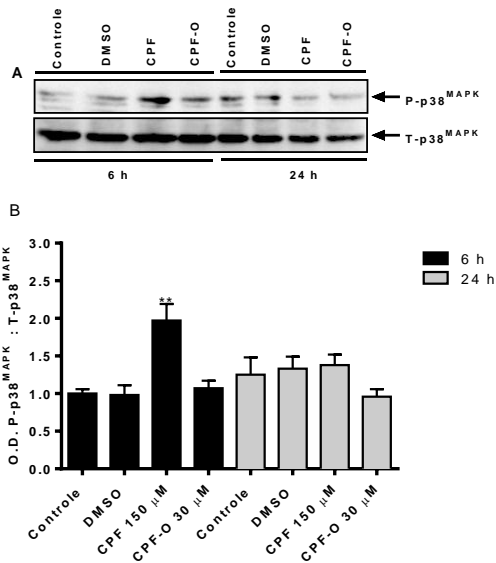
Figura 33: A exposição ao CPF aumenta a fosforilação das enzimas ERK 1/2 em células HT22.



(Legenda na próxima página)

As células foram expostas por 6 e 24 horas à 150 μM CPF ou 30 μM de CPF-O. Após o tratamento as células foram coletadas e preparadas para o Western blot. (A) O painel mostra os blots representativos da imunorreatividade de fosfo-ERK1, fosfo-ERK2, total-ERK1 e total-ERK2. (B) Mostra a quantificação de fosfo-ERK1 e (C) da fosfo-ERK-2. Os níveis de fosforilação foram determinados por densitometria, fazendo a razão entre a D.O. da banda fosforilada sobre a D.O. da banda total. Os dados são expressos em relação ao grupo controle. Os valores são apresentados como média \pm E.P.M. de 4 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguido pelo teste de *post hoc* de Tukey. $**p < 0,01$ indica a diferença quando comparado com o grupo controle e # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle 6 horas.

Figura 34: A exposição ao CPF aumenta a fosforilação da enzima p38^{MAPK} em células HT22.

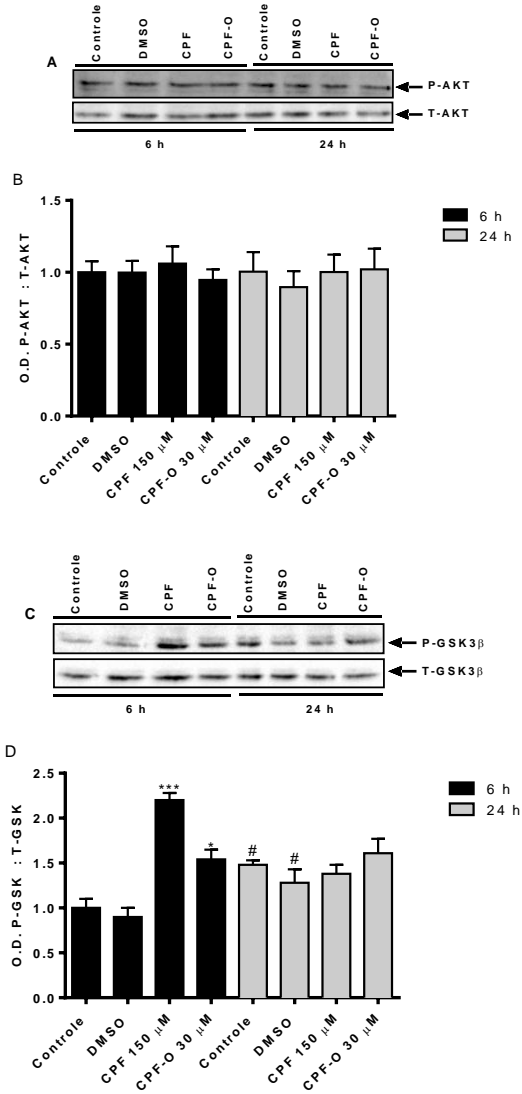


(Legenda na próxima página)

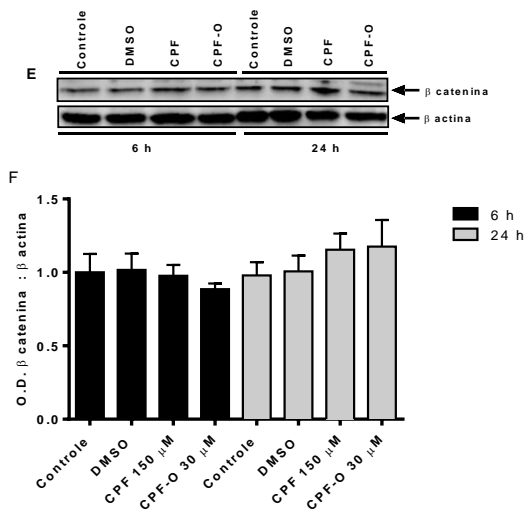
As células foram expostas por 6 e 24 horas à 150 μM CPF ou 30 μM de CPF-O. Após o tratamento as células foram coletadas e preparadas para o Western blot. (A) O painel mostra os blots representativos da imunoreatividade de fosfo-p38^{MAPK} e total-p38^{MAPK}. (B) O gráfico mostra a quantificação de fosfo-p38^{MAPK}. Os níveis de fosforilação foram determinados por densitometria, fazendo a razão entre a D.O. da banda fosforilada sobre a D.O. da banda total. Os dados são expressos em relação ao grupo controle. Os valores são apresentados como média \pm E.P.M. de 4 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguido pelo teste de *post hoc* de Tukey. ** $p < 0,01$ indica a diferença quando comparado com o grupo controle.

Em seguida foi determinado o efeito do CPF e do CPF-O sobre a via da AKT/GSK3 β / β -catenina. Conforme a figura 35 B não foi observado alteração na fosforilação da AKT pela exposição ao CPF ou ao CPF-O por 6 horas (Figura 35 B). Apesar disso, a fosforilação da GSK3 β foi aumentada de forma significativa após exposição por 6 horas tanto ao CPF quanto ao CPF-O (30 μM) (Figura 35 D), enquanto que os níveis de β -catenina não foram alterados após as exposições (Figura 35 F). Nota-se que após 24 horas ocorre um aumento fisiológico significativo da fosforilação da GSK3 β (Figura 35 D).

Figura 35: A exposição ao CPF ou CPF-O aumenta a fosforilação da enzima GSK3 β , porém não altera o imunocônteúdo da proteína β -catenina.



(Continua na próxima página)

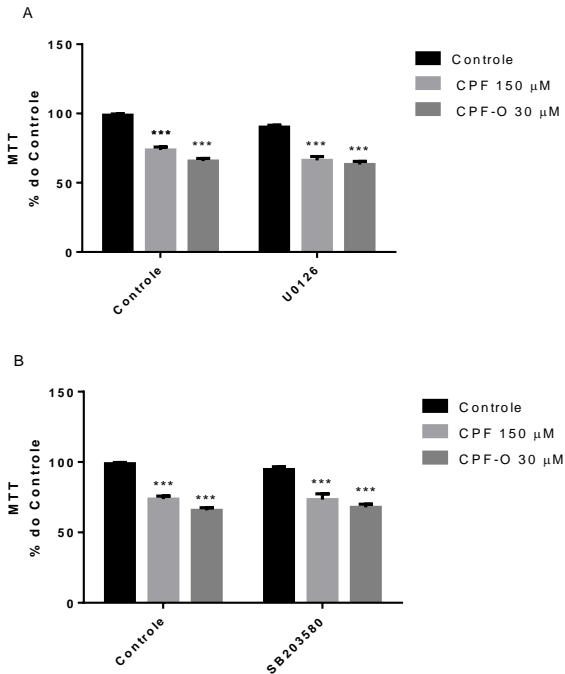


As células foram expostas por 6 e 24 horas à 150 μ M CPF ou 30 μ M de CPF-O. Após o tratamento as células foram coletadas e preparadas para o Western blot. (A) O painel mostra blots representativos da imunorreatividade de fosfo-AKT e total-AKT. (B) Mostra a quantificação de fosfo-AKT. (C) O painel mostra blots representativos da imunorreatividade de fosfo-GSK3 β e total-GSK3 β . (D) Mostra a quantificação de fosfo-GSK3 β . (E) O painel mostra blots representativos da imunorreatividade de β -catenina e β -actina. (F) Mostra a quantificação da imunorreatividade de β -catenina. Os níveis de fosforilação foram determinados por densitometria, fazendo a razão entre a D.O. da banda fosforilada sobre a D.O. da banda total ou através da D.O. da banda da proteína total sobre a D.O. da banda da β -actina. Os dados são expressos em relação ao grupo controle. Os valores são apresentados como média \pm E.P.M. de 4 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguido pelo teste de *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ indica a diferença quando comparados com o grupo controle e # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle 6 horas.

Considerando os efeitos do pesticida e seu metabólito sobre a fosforilação das MAPKs, na sequência, foi determinado se a inibição das MAPKs poderia proteger as células HT22 da citotoxicidade induzida pelo CPF e CPF-O. Assim, as células foram pré-tratadas com os inibidores das MAPKs por uma hora, seguido da exposição ao CPF ou ao seu metabólito oxon por 24 horas. Foi observado que o pré-tratamento com 10 μ M de U0126 (inibidor da MEK/ERK 1/2) e 5 μ M de SB203580 (inibidor da p38^{MAPK}) não foram capazes de proteger as

células HT22 da redução da viabilidade celular induzida tanto pelo CPF quanto pelo CPF-O (Figura 36 A e B).

Figura 36: Inibidores das MAPKs não protegem as células HT22 da citotoxicidade induzida pelo CPF ou CPF-O.



As células foram pré-tratadas por 1 hora com 10 µM de U0126 (inibidor da MEK/ERK1/2) de (A) e 5 µM de SB203580 (inibidor da p38^{MAPK}) (B) seguida da exposição à 150 µM CPF ou 30 µM de CPF-O por 24 horas. Após 24 horas de tratamento foi realizado o ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT e o resultado foi expresso pela porcentagem do controle (células não tratadas, 100%). Cada barra representa a média ± EPM de 10 experimentos independentes. *** p < 0,001 indica a diferença quando comparado com o grupo controle (ANOVA de duas via seguido pelo teste de *post hoc* de Tukey).

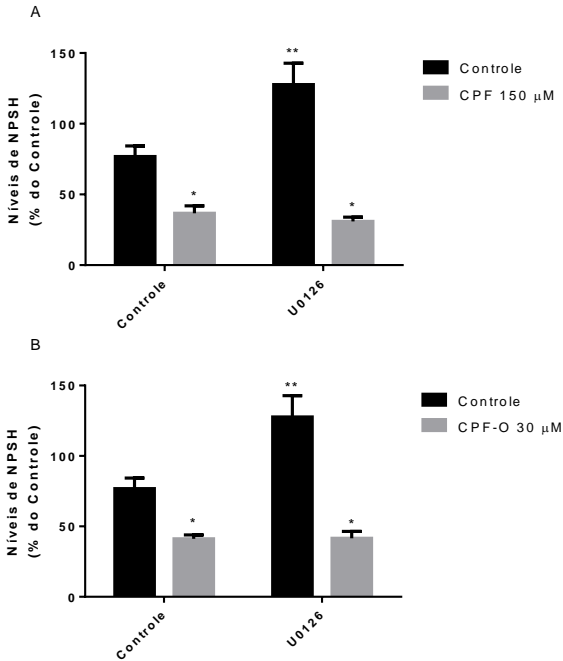
Desta forma, estes resultados sugerem que a ativação das MAPKs não parece estar relacionada diretamente com a redução da viabilidade celular induzida pelo CPF ou CPF-O, uma vez que, a inibição destas proteínas não foi eficaz em proteger as células HT22 da

citotoxicidade induzida por este pesticida e seu metabólito oxon.

Entretando, tendo em vista que a ativação intracelular da enzima ERK pode modular os níveis de GSH (CHEN et al., 2008), e considerando que no modelo apresentado foi observado uma redução na concentração de GSH paralelo a um aumento da fosforilação da enzima ERK frente ao pesticida, decidimos investigar se estes eventos moleculares estariam relacionados.

Para isto, as células foram pré-tratadas com o inibidor da MEK/ERK1/2 (U0126) por uma hora, e, em seguida, expostas ao CPF (150 μ M) ou CPF-O (30 μ M) por 6 horas. Ao final, medimos os níveis de NPSH. Na Figura 37 A é possível observar que após 6 horas de exposição ao CPF (150 μ M) a concentração intracelular de GSH das células HT22 diminuiu significativamente (43%) e o pré-tratamento com o inibidor da MEK/ERK1/2 não foi capaz de proteger deste efeito. O mesmo foi observado para a exposição ao CPF-O (30 μ M), o qual reduziu de forma significativa a concentração de GSH (40%), sendo que o pré-tratamento com o inibidor da MEK/ERK1/2 também não foi eficaz em proteger deste efeito (Figura 33 B). É interessante notar que a inibição de MEK/ERK1/2, apesar de não proteger da diminuição da concentração de GSH induzida pelo CPF e seu metabólito oxon, é capaz de aumentar de maneira significativa os níveis deste tripeptídeo (30%, Figuras 37 A e 37 B), corroborando com os dados previamente publicados por Chen e colaboradores (2008).

Figura 37: O inibidor da MEK/ERK1/2 não reverte a redução dos níveis de GSH induzida pelo CPF e CPF-O nas células HT22.



As células foram pré-tratadas por 1 hora com 10 μ M de U0126 (inibidor da MEK/ERK1/2), seguida da exposição à (A) 150 μ M CPF ou (B) 30 μ M de CPF-O por 6 horas. Após o tratamento foi realizado o ensaio para determinação dos níveis de NPSH. Os resultados foram expressos pela porcentagem do controle (células não tratadas, 100%). Cada barra representa a média \pm EPM de 4 experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ indicam a diferença quando comparados com o grupo controle (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *post hoc* de Tukey).

6. DISCUSSÃO

Os pesticidas são compostos amplamente utilizados na agricultura e responsáveis por inúmeros casos de intoxicações em humanos (SINITOX, CIT/SC). A exposição a esses compostos ocorre durante a sua aplicação, mas também pelo contato com lavouras tratadas com esses toxicantes ou ainda pela ingestão de alimentos ou água contaminados, bem como exposições intencionais em tentativas de suicídio (Da SILVA, 2006; EATON et al., 2008; VALE e LOTTI, 2015). Nota-se que os principais casos de intoxicações ocorrem devido a exposição aos pesticidas organofosforados (OFs) (CIT/SC).

O principal mecanismo de toxicidade destes compostos OFs está relacionado à inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), desencadeando uma variedade de sinais e sintomas que caracterizaram a clássica “síndrome colinérgica” (EATON et al., 2008). Por outro lado, algumas evidências indicam que a intoxicação aguda ou crônica com OFs pode ser caracterizada por efeitos não-colinérgicos, ou seja, aqueles que não estão somente relacionados a inibição da AChE. De fato, algumas evidências experimentais têm apontado para a toxicidade não-colinérgica induzida por compostos OFs como um fator responsável pelo desenvolvimento de síndromes neurotóxicas (dos SANTOS et al., 2016; GIORDANO et al., 2007; KAUR et al., 2007; KI et al., 2013;; LEE et al., 2012;; LEE et al., 2014; SAULSBURY et al., 2009; No entanto, pouco se sabe a respeito dos mecanismos moleculares relacionados à neurotoxicidade não-colinérgica induzida por OFs.

Neste sentido, o objetivo do trabalho foi investigar os mecanismos moleculares envolvidos na neurotoxicidade do pesticida CPF e do seu metabólito oxon, independentes da superestimulação colinérgica. Observamos que o CPF e seu metabólito CPF-O foram capazes de diminuir a viabilidade celular das células HT22 de maneira concentração dependente. De modo interessante, o CPF-O mostrou-se mais tóxico para as células HT22 do que o CPF, uma vez que a forma metabolizada deste pesticida reduziu a viabilidade celular em concentrações inferiores. Esta neurotoxicidade não foi protegida pela atropina e pela pralidoxima indicando que efeitos não colinérgicos podem estar envolvidos. Além disso, o presente trabalho demonstrou que o CPF e o CPF-O induziram a redução dos níveis de GSH e inibiram GSK-3 β , porém somente o CPF foi capaz de ativar as MAPKs,

ERK1/2 e p38^{MAPK}. Entretanto a utilização de inibidores da ERK1/2 e p38^{MAPK} não protegeram as células HT22 da citotoxicidade induzida pelo CPF e CPF-O. Por outro lado, o pré-tratamento com N-acetilcisteína (NAC) apresentou efeito protetor frente a citotoxicidade induzida por este pesticida, sugerindo o envolvimento do estresse oxidativo no mecanismo de toxicidade desses compostos.

Estudos com vários modelos *in vitro* também demonstraram a citotoxicidade do CPF e ou CPF-O através indução da redução da viabilidade celular (CAUGHLAN, et al., 2004; GIORDANO, et al., 2007; LEE, et al., 2012; KI, et al., 2013), bem como pelo aumento da liberação da LDH, ambos de maneira concentração dependente, corroborando em parte com nossos dados (PARK, et al., 2013). Entretanto, no presente estudo, foi observado que somente o CPF-O aumentou a liberação da LDH.

Além disso, em uma cultura de neurônios granulares de cerebelo de camundongos, a toxicidade do CPF-O foi cinco vezes maior que a do CPF, apresentando uma IC₃₀ de aproximadamente 1,5 e 7,5 µM, respectivamente (GIORDANO, et al., 2007). Estes dados são semelhantes àqueles aqui encontrados, onde também foi visto uma maior toxicidade induzida pelo CPF-O (cinco vezes maior) em relação ao CPF em células HT22. Porém, a IC₃₀ do CPF foi de 150 µM e do CPF-O foi de 30 µM para as células HT22, indicando que esta linhagem possa ser mais resistente que o cultivo primário de neurônios cerebelares.

Apesar do efeito tóxico bem estabelecido de compostos OFs envolvendo a inibição da AChE como alvo primário, principalmente nos casos de intoxicações agudas por esses compostos (EATON et al., 2008; SLOTKIN, 2004; VALLE e LOTTI, 2015), muitos trabalhos vem demonstrado que em determinadas situações a toxicidade do OF CPF e seu metabólito CPF-O, parece ser independente da ativação colinérgica, uma vez que antagonistas muscarínicos e nicotínicos não foram capazes de reverter a redução da viabilidade celular induzida por esses compostos (GIORDANO, et al., 2007; SAULSBURY, et al., 2009; PARK, et al., 2015). Um destes trabalhos demonstrou que o pré-tratamento por 30 minutos, com o antagonista do receptor nicotínico mecamilamina e com o antagonista muscarínico atropina não foi capaz de proteger os neurônios granulares do cerebelo de camundongos da redução da viabilidade celular causada pelo CPF e pelo CPF-O, indicando que esse efeito não parece estar relacionado com a ativação dos receptores colinérgicos (GIORDANO, et al., 2007). Da mesma

forma, Saulsbury e colaboradores também observaram que o bloqueio dos receptores colinérgicos promovido pelo pré-tratamento por 1 hora, com a atropina ou com a mecamilamina não foi capaz de proteger as células progenitoras de oligodendrócitos da citotoxicidade induzida pelo CPF, sugerindo efeitos independentes da ativação colinérgica na toxicidade desse OF (SAULSBURY, et al., 2009). Além disso, um estudo de Park e colaboradores também mostrou resultados semelhantes, onde, afim de determinar se a inibição da AChE estava envolvida na citotoxicidade induzida pelo CPF em células SH-SY5Y, essas foram pré-tratadas por 1 hora com os antagonistas colinérgicos atropina ou mecamilamina, porém não foi observado proteção desses antagonistas sobre a redução da viabilidade induzida pelo CPF, indicando mais uma vez, efeitos tóxicos alternativos, em vez da inibição da AChE (PARK, et al., 2015). Esses dados da literatura corroboram com os resultados do nosso trabalho, onde foi visto que tanto o cotratamento com a pralidoxima quanto com a atropina não foram eficazes em proteger as células HT22 da citotoxicidade induzida pelo CPF e pelo CPF-O. Por outro lado, foi demonstrado que o acúmulo da ACh e provável superestimulação dos seus receptores levou a redução da viabilidade celular das células HT22 e esse efeito foi protegido pela atropina. Logo, sugere-se que a citotoxicidade do CPF e do CPF-O, em parte, não esteja relacionada com a inibição da AChE, mas sim à eventos alternativos não colinérgicos.

Neste contexto, trabalhos tem indicado o envolvimento de outros mecanismos na toxicidade de compostos OFs. Kaur e colaboradores observaram que a exposição crônica por 12 semanas ao diclorvos induziu neurodegeneração apoptótica, uma vez que foi observado liberação do citocromo c, presente na mitocôndria, para o citosol e consequente ativação da caspase-3. Esses eventos foram, de certo modo, causados pelo aumento dos níveis de Ca^{2+} na mitocôndria levando à disfunção mitocondrial e indução de estresse oxidativo. O envolvimento do estresse oxidativo foi observado pelo aumento da oxidação de proteínas, lipídios e dano ao DNA induzidos por esse OFs (KAUR et al., 2007). Além disso, nosso grupo já demonstrou que a exposição repetida ao malation por 15 dias causa alterações bioquímicas no hipocampo de camundongos, tais como disfunção mitocondrial, ativação astrogliar e aumento nos níveis das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak, eventos estes que podem estar contribuindo para o prejuízo na memória espacial também observado neste trabalho. Importante salientar, que essas alterações foram observadas após exposição a dose

de 30 mg/kg, a qual não alterou a atividade da AChE hipocampal, assim como, os camundongos expostos a esta dose não apresentaram sinais evidentes de toxicidade colinérgica (dos SANTOS et al., 2016).

Neste cenário, vários trabalhos têm sugerido a indução do estresse oxidativo como um mecanismo alternativo a ativação colinérgica. Trabalhos demonstram a depleção de GSH e o aumento da geração de EROs seguido pelo aumento da peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e dano ao DNA após exposição a OFs (GIORDANO, et al., 2007; KI, et al., 2013; KAUR, et al., 2007; LEE, et al., 2012; SAULSBURY et al., 2009). Por outro lado, foi visto a reversão dos danos oxidativos pelo tratamento com compostos antioxidantes (GIORDANO, et al., 2007; KI, et al., 2013; LEE, et al., 2012; SAULSBURY et al., 2009).

Muitos trabalhos demonstraram aumento de EROs após exposição aos OFs (GIORDANO, et al., 2007; LEE, et al., 2012; KI, et al., 2013; PARK, et al., 2015; PARK, et al., 2016; SAULSBURY et al., 2009). Nesses trabalhos foi observado que o aumento de EROs ocorreu 3 ou 6 horas após a exposição ao CPF (LEE, et al., 2012; KI, et al., 2013; PARK, et al., 2015; PARK, et al., 2016; SAULSBURY et al., 2009). Giordano e colaboradores demonstraram que após 30 minutos de exposição ao CPF já ocorre aumento de EROs e este aumento é observado após 15 minutos de exposição ao CPF-O (GIORDANO, et al., 2007). Logo, foi constatado que a geração de EROs precedeu a redução da viabilidade celular ou disfunção mitocondrial vistos 24 horas após exposição ao CPF ou CPF-O (GIORDANO, et al., 2007; LEE, et al., 2012; KI, et al., 2013; PARK, et al., 2015; PARK, et al., 2016; SAULSBURY et al., 2009). Estes dados indicam que o aumento das EROs induzida por OFs, pode ser um possível evento primário envolvido na toxicidade induzida por esses compostos.

Nosso trabalho não observou aumento de EROs, como o ânion superóxido 6 horas após a exposição tanto ao CPF quanto ao CPF-O. Porém, Saulsbury e colaboradores observaram aumento desse radical, de maneira concentração dependente 2 horas após a exposição ao CPF (SAULSBURY et al., 2009). Desta forma, pode-se hipotetizar que o aumento das EROs induzidas pelo CPF ou CPF-O possa ter ocorrido em um período anterior a 6 horas de exposição a estes compostos e, por isto, aqui não foi observada tal alteração.

No entanto, observamos uma redução dos níveis de GSH 6 horas após a exposição ao CPF bem como ao CPF-O, período no qual não houve redução da viabilidade celular. Estudos mostraram que a

redução da GSH levou ao aumento da toxicidade induzida pelo CPF (GIORDANO et al., 2007; SAULSBURY et al., 2009). Um desses estudos demonstrou que a neurotoxicidade do CPF e do seu metabólito oxon foi significativamente maior para os neurônios do cerebelo de camundongos que não expressavam a enzima glutamato cisteína ligase (GCL), enzima chave na via de síntese da glutatona, e, conseqüentemente, apresentavam baixos níveis de GSH. Além disso, as células que expressavam essa enzima, mas que foram tratadas com butionina sulfoximina (BSO), um inibidor da síntese de glutatona, e após expostas ao CPF ou CPF-O, apresentaram uma maior toxicidade induzida por esses compostos (GIORDANO et al., 2007). Outro estudo mostrou que o pré-tratamento de células progenitoras de oligodendrócitos com dietil maleato (DEM), um agente que depleta a GSH intracelular, também aumentou a citotoxicidade induzida pelo CPF (SAULSBURY et al., 2009). Portanto, estes trabalhos, indicam que a redução dos níveis de GSH é um evento importante na toxicidade de ambos os compostos, CPF e CPF-O.

Considerando nossos achados, bem como os dados presentes na literatura, podemos sugerir que a depleção de GSH observada após a exposição ao CPF ou ao CPF-O esteja relacionada ao aumento de espécies reativas induzidas por estes compostos. Apesar de não ter sido observado aumento na geração de ânion superóxido, 6 horas após a exposição, não se pode descartar o possível aumento na geração de EROs, já que o OF CPF e seu metabólito CPF-O parecem aumentar a geração de EROs em tempos anteriores a 6 horas (GIORDANO, et al., 2007). Logo, tendo em vista que a GSH é uma das principais formas de proteção das células agindo contra o dano oxidativo induzido pelas EROs (SMITH et al., 2007), sugere-se que o estresse oxidativo, ao menos em parte, esteja relacionado com a citotoxicidade causada pelo CPF e CPF-O no nosso modelo experimental.

O estresse oxidativo ocorre quando a velocidade de produção de EROs excede a capacidade da célula em removê-las pelos mecanismos de defesa celular ou quando o mesmo estiver prejudicado (SMITH, et al., 2007). Este sistema de defesa inclui várias enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPx). Além dessas defesas enzimáticas, moléculas *scavengers* de radicais livres, como por exemplo a vitamina E, convertem essas espécies em formas não tóxicas por meio de reações não enzimáticas (SMITH et al., 2007). Ambas as formas de defesa evitam os danos oxidativos a proteínas, DNA ou lipídios que ocorre

quando o estresse oxidativo é estabelecido nas células (SMITH et al., 2007).

Resultados recentes mostraram o efeito do pré-tratamento com NAC sobre o aumento das EROs e peroxidação lipídica induzida pelo CPF em células dopaminérgicas, onde foi observado que a NAC protegeu parcialmente destes efeitos (KI, et al., 2013; LEE, et al., 2012). Esses resultados foram semelhantes ao observado no presente trabalho, no qual o pré-tratamento com a NAC protegeu parcialmente as células HT22 da citotoxicidade induzida pelo CPF e CPF-O. No entanto, o pré-tratamento com o Trolox, outro composto antioxidante análogo da vitamina E, não apresentou efeito protetor perante a redução da viabilidade celular das células HT22 causada pelo CPF e seu metabólito CPF-O. Em contra partida, foi demonstrada a proteção pelo pré-tratamento com Trolox frente a citotoxicidade induzida pelo CPF (SAULSBURY et al., 2009). A vitamina E é um importante antioxidante lipossolúvel que atua principalmente contra a peroxidação lipídica nas membranas celulares (SMITH et al., 2007). Portanto, com nossos resultados e dados da literatura pode-se atribuir, ao menos em parte, a indução do estresse oxidativo como um mecanismo envolvido da citotoxicidade do CPF e CPF-O alternativo a inibição da AChE.

Além disso, vários estudos têm demonstrado o envolvimento da ativação de MAPKs na indução de apoptose por compostos OFs (CAUGHLAN et al., 2004; KI, et al., 2013; LEE, et al., 2012; PARK et al., 2015). O trabalho de Caughlan e colaboradores, 2004, demonstrou que tanto a exposição ao CPF quanto ao CPF-O reduziram a viabilidade celular e induziram apoptose em uma cultura primária de neurônios corticais de ratos. Esses eventos foram relacionados com a ativação da ERK1/2, uma vez que foi observado aumento de sua fosforilação, somando a isso, a inibição dessa MAPK reduziu parcialmente a indução de apoptose pelo CPF. Logo, esses resultados indicaram que a via de sinalização da ERK1/2 contribuiu para a indução de apoptose em neurônios corticais após exposição ao CPF (CAUGHLAN et al., 2004). Por outro lado, foi observado aumento da fosforilação da p38^{MAPK} induzida pela exposição ao CPF, entretanto, a sua inibição aumentou a apoptose causada pelo CPF em neurônios corticais. Esses resultados sugeriram que a ativação da via de sinalização da p38^{MAPK} induziu a sobrevivência dos neurônios corticais em resposta a exposição ao CPF (CAUGHLAN et al., 2004).

Outro trabalho demonstrou ativação de ERK1/2 a partir de 10 minutos após exposição das células SY-SH5Y ao CPF, esse evento foi

mantido até 12 horas, não apresentando mais efeito em 24 horas (KI, et al., 2013). Também foi observado ativação de p38^{MAPK} nas células SY-SY5Y após 10 minutos de exposição ao CPF, a fosforilação da p38^{MAPK} foi mantida até 6 horas e em 12 e 24 horas após exposição ao CPF não era mais observado esse efeito (KI, et al., 2013).

Estes dados corroboraram com os achados do nosso trabalho, onde foi observado a ativação da ERK1/2 6 horas após a exposição das células HT22 ao CPF, porém esse efeito não foi mais percebido após 24 horas de tratamento com esse OF. Da mesma forma, foi observado a ativação de p38^{MAPK} induzida pelo CPF, onde 6 horas após a exposição ocorreu o aumento de sua fosforilação, no entanto a mesma não foi mais observada após 24 horas de exposição das células HT22 ao CPF. Todavia, quando as células foram pré-tratadas com os respectivos inibidores da MEK/ERK1/2 e da p38^{MAPK} não foi observado proteção sobre a redução da viabilidade induzida pelo CPF e CPF-O nas células HT22. Sugerindo que a ativação da via das MAPKs parece não estar relacionada diretamente com a redução da viabilidade celular induzida por estes compostos. Por outro lado, dados da literatura demonstraram que a exposição ao CPF ativou as MAPKs ERK1/2 e p38^{MAPK} em células SH-SY5Y e PC12 (KI, et al., 2013; LEE, et al., 2012). Foi observado que a utilização dos inibidores da MEK/ERK1/2 e da p38^{MAPK} não só protegeram as células SH-SY5Y e as células PC12 da redução da viabilidade celular induzida pelo CPF, como também atenuaram o aumento de espécies reativas e preveniram da ativação da caspase-3 induzidos por esse OF (KI, et al., 2013; LEE, et al., 2012). Nesses trabalhos os autores sugeriram que a ativação das vias da ERK1/2 e p38^{MAPK} serviu como um sinal de morte, uma vez que, os inibidores das mesmas bloquearam a ativação da caspase-3 e consequentemente preveniram da apoptose induzida pelo CPF (KI, et al., 2013; LEE, et al., 2012).

Entretanto ainda não está claro o mecanismo de ativação dessas MAPKs pelo CPF. Todavia, o trabalho de Lee e colaboradores, 2012, sugere que a ativação de MAPKs foi causada pela geração de EROs, uma vez que a fosforilação dessas enzimas (ERK1/2 e p38^{MAPK}) foi atenuada pelo pré-tratamento com o antioxidante NAC (LEE, et al., 2012). Porém, estudos adicionais são necessários para explicar a relação entre as EROs e MAPKs observada nesses trabalhos (KI, et al., 2013; LEE, et al., 2012).

No entanto, o presente trabalho demonstrou que a inibição da MEK/ERK1/2, apesar de não proteger da diminuição da concentração

de GSH induzida pelo CPF e seu metabólito oxon, é capaz de aumentar de maneira significativa os níveis deste tripeptídeo corroborando com os dados previamente publicados por Chen e colaboradores, 2008. Foi observado que a inibição da MEK/ERK1/2 aumentou a atividade da GCL e, conseqüentemente, os níveis de GSH em células PC12. Além disso, foi demonstrado que o aumento dos níveis de GSH protegeu as células PC12 contra a morte celular oxidativa induzida por H₂O₂ (CHEN et al., 2008). Portanto, ao menos em parte, a inibição da MEK/ERK1/2 poderia explicar a redução da geração de EROs induzida pela inibição dessa MAPKs devido a indução do aumento dos níveis de GSH.

Conforme os dados da literatura e os resultados do nosso trabalho, sugere-se que a via de sinalização da ERK1/2 contribui em parte com a neurotoxicidade induzida pelo CPF. Pois, apesar de ter sido aqui demonstrado que a inibição da MEK/ERK1/2 não protegeu a redução da viabilidade induzida pelo CPF, sua inibição foi capaz de proteger a indução de apoptose em neurônios corticais por este pesticida (CAUGHLAN et al., 2004). Além disso, a ativação desta via pode estar relacionada com a redução dos níveis de GSH. Evento aqui demonstrado ser de extrema importância na toxicidade tanto do CPF quanto do CPF-O.

Nosso trabalho também demonstrou que a exposição ao CPF e ao CPF-O após 6 horas, aumentou a fosforilação de GSK-3 β , porém não alterou os níveis de β -catenina. Nossos dados estão de acordo com um estudo que mostrou aumento na fosforilação de GSK-3 β após repetida exposição ao CPF por 10 dias sem alteração nos níveis de β -catenina no hipocampo de ratos (CHEN et al., 2012). Esse trabalho sugere o envolvimento da hiperfosforilação de GSK-3 β na neurotoxicidade induzida pelo CPF, como um mecanismo não colinérgico (CHEN et al., 2012). Assim, o aumento da fosforilação da enzima GSK-3 β e a sua inibição observada no nosso trabalho, poderia também estar envolvida na redução da viabilidade induzida pelo CPF e CPF-O. Além disso, o aumento da fosforilação de GSK-3 β aqui demonstrada, parece não ocorrer via AKT, uma vez que a exposição ao CPF e CPF-O não ativou esta enzima. No entanto, estudos adicionais são necessários para estabelecermos uma relação temporal de ativação da via AKT/GSK-3 β . Além disso, o aumento da fosforilação de GSK-3 β pode ser proveniente da ativação de outras cinases intracelulares, além da AKT. Trabalhos vem demonstrando que a enzima p38^{MAPK} pode fosforilar GSK-3 β (BIKKAVILLI et al., 2008; THORNTON et al., 2008), porém, para

testar esta hipótese no nosso modelo, experimentos adicionais deverão ser realizados. Por fim, percebe-se que a literatura carece de trabalhos que investiguem a relação desta via com os compostos OF e o seu envolvimento com os efeitos tóxicos induzidos pelos mesmos devem ser aprofundados.

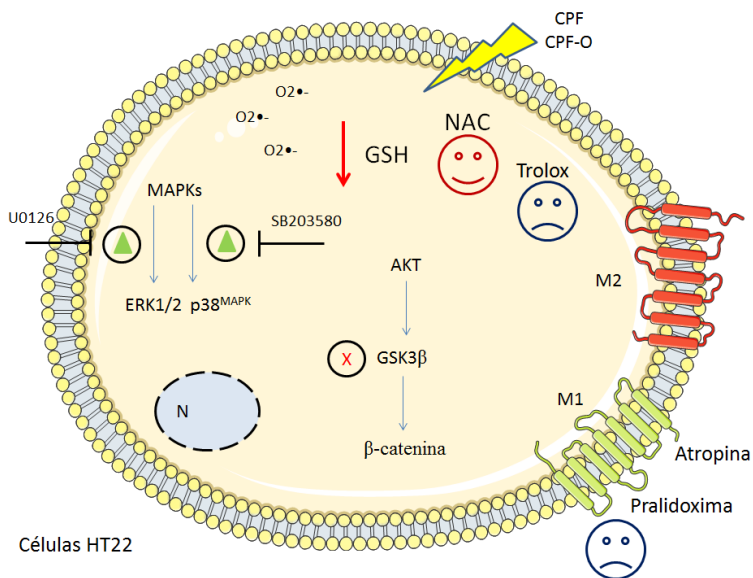
7. CONCLUSÃO

A partir da finalização deste projeto, podemos concluir que o estresse oxidativo e a modulação de cascatas de sinalização intracelular (ativação de MAPKs, ERK1/2 e p38^{MAPK} e inibição da GSK3 β) parecem estar envolvidos na citotoxicidade induzida pelos compostos OFs, CPF e CPF-O. Estas alterações a nível molecular poderiam compreender eventos alternativos à superestimulação colinérgica em um modelo *in vitro* utilizando as células HT22 expostas aos OFs. A figura 38 apresenta um resumo dos resultados aqui encontrados.

No entanto, ainda não está totalmente esclarecida a relação entre esses eventos, necessitando, desta forma, de estudos adicionais para estabelecer essa relação e para melhor compreender tais eventos induzidos pelo pesticida CPF e seu metabólito CPF-O.

Além disso, foi aqui observada a ação neuroprotetora de um composto antioxidante frente a citotoxicidade induzida pelo CPF e CPF-O. Este dado, juntamente com outros trabalhos da literatura que demonstram neuroproteção com uso de moléculas antioxidantes, suportam, de forma inicial, a utilização destas moléculas juntamente com a terapia convencional nos casos de intoxicação por compostos OFs.

Figura 38: Resumo dos resultados



A exposição ao CPF e ao CPF-O levou a redução dos níveis de GSH e não alterou os níveis do ânion superóxido. O pré-tratamento com NAC protegeu parcial e totalmente a citotoxicidade do CPF-O e CPF respectivamente enquanto o pré-tratamento com Trolox não protegeu. Além disso, o cotratamento com atropina ou pralidoxima também não protegeu as células HT22 da citotoxicidade induzida pelo CPF e CPF-O. A exposição ao CPF e CPF-O levou a inibição da GSK3β e somente o CPF causou a ativação da ERK1/2 e $p38^{MAPK}$. Entretanto a inibição da ERK1/2 ou $p38^{MAPK}$ não protegeu as células HT22 da citotoxicidade induzida pelo CPF e CPF-O.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-DONIA, M. B. Organophosphorus Ester-Induced Chronic Neurotoxicity. **Archives of Environmental Health**, v. 58, p. 487- 497, 2003.
- ALI, S.F.; LEBEL, C.P.; BONDY, S.C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**. v.13, p. 637–648, 1992.
- ANVISA. Programa de Análise de Resíduo de Agrotóxico em Alimentos (PARA). Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015. Brasília: ANVISA, 2016, Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 15 de janeiro de 2017.
- BALTAZAR, M. T.; DINIS-OLIVEIRA, R. J.; BASTOS, M. de L.; TSATSAKIS, A. M.; DUARTE, J. A.; CARVALHO, F. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson’s disease and other neurodegenerative diseases—A mechanistic approach. **Toxicology Letters**, v. 230, p. 85–103, 2014.
- BIKKAVILLI, R. K.; FEIGIN, M. E.; MALBON, C. C. p38 mitogen-activated protein kinase regulates canonical Wnt– β -catenin signaling by inactivation of GSK3 β . **Journal of Cell Science**, v. 121, p. 3598-3607, 2008.
- BINDOKAS, V.P.; JORDAN, J.; LEE, C.C.; MILLER, R.J. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 16, p. 1324-1336, 1996.
- BJERRUM O.J.; HEEGAARD N.H.H. CRC handbook of immunoblotting of proteins. **CRC Press**, 1, 1988.
- BRASIL, Decreto n.º 4.074 de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802/89(lei federal dos agrotóxicos). Brasília, Diário Oficial da União de 08/01/2002.
- BRASIL. Lei n.º 7.802, de 12 de julho de 1989. “Lei federal dos agrotóxicos”. Brasília, Diário Oficial da União de 12/07/1989.
- BROCARD, P. S.; PANDOLFO, P.; TAKAHASHI, R. N.; RODRIGUES A. L. S.; DAFRE, A. L. 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.

- CALLONI, G. W. et al. . Congenital hypothyroidism alters the phosphorylation of ERK1/2 and p38MAPK in the hippocampus of neonatal rats. **Brain Research Developmental Brain Research Journal**, v. 154, n. 1, p. 141-5, 2005.
- CARGNELLO, M.; ROUX, P. P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 1, p. 50-83, 2011.
- CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R, M.; AUGUSTO, L. G. S.; RIZZOLO, A.; FARIA, N. M. X.; ALEXANDRE, V. P.; FRIEDRICH, K.; MELLO, M. S. C. Dossiê ABRASCO - Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde. Rio de Janeiro: ABRASCO, p. 1- 88, 2012.
- CAUGHLAN, A.; NEWHAOUSE, K.; NAMGUNG, Uk.; XIA Z. Chlorpyrifos Induces Apoptosis in Rat Cortical Neurons that is Regulated by a balance Between p38 and ERK/JNK MAP Kinases. **Toxicological Sciences**, v. 78, p. 125–134, 2004.
- CHEN, W-Q.; MA, H.; BIAN, J-M.; ZHANG, Y-Z.; LI, J. Hyper-phosphorylation of GSK-3 β : Possible roles in chlorpyrifos-induced behavioral alterations in animal model of depression. **Neuroscience Letters**, v. 528, p. 148– 152, 2012.
- CHOWDHARY, S.; BHATTACHARYYA R.; BANERJEE D. Acute organophosphorus poisoning. **Clinica Chimica Acta**, v. 431, p. 66–76, 2014.
- COFFEY, S.; Rood's Chemistry of Carbon Compounds, 2nded., Elsevier Publishing Company: London, 1965.
- COSTA, L. G. Current issues in organophosphate toxicology **Clinica Chimica Acta**, v. 366, p. 1 – 13, 2006.
- CRANE, A.L.; KLEIN, K.; ZANGER, U.M.; OLSON, J.R. Effect of CYP2B6*6 and CYP2C19*2 genotype on chlorpyrifos metabolism. **Toxicology**, v. 293, p. 115–122, 2012.
- Da SILVA, H.J.; SAMARAWICKREMA, N.A.; WICKREMASINGHE, A.R. Toxicity due to organophosphorus compounds: what about chronic exposure?. **Transactions of the Royal Society of Tropical of Medicine and Hygiene**, v.100, p. 803-806, 2006.
- DONG, Z.; BODE, A. M. Dialogue between ERKs and JNKs: friendly or antagonistic?. **Molecular Interventions**, v. 3, n. 6, p. 306-8, 2003.

dos SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C. L.; DaCOSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. R. Organophosphorus pentavalent compounds: history, synthetic methods of preparation and application as insecticides and antitumor agents. **Química Nova**, v. 30, n^o. 1, p. 159-170, 2007.

dos SANTOS, A. A.; NAIME A. A.; de OLIVEIRA J.; COLLE D.; dos SANTOS, D. B.; Hort, M. A.; MOREIRA, E. L. G.; SUÑOL, C.; de BEM, A. F.; FARINA, M. Long-term and low-dose malathion exposure causes cognitive impairment in adult mice: evidence of hippocampal mitochondrial dysfunction, astrogliosis and apoptotic events. **Archives of Toxicology**, 2016.

EATON, D.L.; DAROFF, R.B.; AUTRUP, H.; BRIDGES, J.; BUFFLER, P.; COSTA, L.G.; COYLE J.; MCKHANN, G.; MOBLEY, W.C.; NADEL, L.; NEUBERT, D.; SCHULTE-HERMANN, R.; SPENCER, P.S. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 38, p.1–125, 2008.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, p. 70–77, 1959.

FISHER, S.K.; WONNACOTT, S. Acetylcholine. In. BRADY, S.T., SIEGEL, G.J.; ALBERS, W.; PRICE, D.L.; editors. Basic neurochemistry, principles of molecular, cellular and medical neurobiology. 8th edition p. 258–282, 2012.

FREDERIKSEN, K., JAT, P.S., VALTZ, N., et al. Immortalization of precursor cells from mammalian CNS. **Neuron**, v. 6, p. 439–448, 1988.

GIORDANO, G.; AFSHARINEJAD, Z.; GUIZZETTI, M.; VITALONE, A.; KAVANAGH, T. J.; COSTA, L.G. Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 219, p. 181–189, 2007.

GONÇALVES, A.S.; FRANÇA, T.C.C.; WILTER, A. et al. Molecular Dynamics of the Interaction of Pralidoxime and Deazapralidoxime with Acetylcholinesterase Inhibited by the Neurotoxic Agent Tabun. **Jornal of the brazilian chemical society**, v.17, p. 968-975, 2006.

GRUBE, A.; DANALDSON, D.; KIELY, T.; WU, L. Pesticides Industry sales and Usage: 2006 and 2007 Market Estimates. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC 20460. 2011.

GRIMES C. A.; JOPE R. S. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 in cellular Signaling. **Progress in Neurobiology**, v. 65, p. 391–426, 2001.

- GULTEKIN, F.; OZTURK, M.; AKDOGAN, M. The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (in vitro). **Archives of Toxicology**, v.74, p.533—538, 2000.
- IYER R.; IKEN B.; LEON, A. Developments in alternative treatments for organophosphate poisoning. **Toxicology Letters**, v. 233, p. 200–206, 2015.
- KAUR, P.; RADOTRA, B.; MINZ, R. W.; GILL K. D. Impaired mitochondrial energy metabolism and neuronal apoptotic cell death after chronic dichlorvos (OP) exposure in rat brain. **NeuroToxicology**, v. 28, p. 1208–1219, 2007.
- JONES, C. K.; BYUN N.; BUBSER M. Muscarinic and Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists and Allosteric Modulators for the Treatment of Schizophrenia. **Neuropsychopharmacology reviews**, v. 37, p. 16–42, 2012.
- KI, Y.W.; PARK, J. H.; LEE, J. E.; SHIN, I.C.; KOH, H.C. JNK and p38 MAPK regulate oxidative stress and the inflammatory response in chlorpyrifos-induced apoptosis. **Toxicology Letters**, v. 218, p. 235–245, 2013.
- KING, A. M.; AARON, C. K. Organophosphate and Carbamate Poisoning. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 33, p. 133–151, 2015.
- KOSOLAPOFF, G. M.; MAIER, L.; Organic Phosphorus Compounds, WileyInterscience: New York, 1972-1974.
- LEE, J. E.; PARK, J. H.; SHIN, I. C.; KOH, H. C. Reactive oxygen species regulated mitochondria-mediated apoptosis in PC12 cells exposed to chlorpyrifos. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 263, p. 148-162, 2012.
- LEE, J. E.; LIM M. S.; PARK, J. H.; PARK, C. H.; KOH, H.C. Nuclear NF- κ B contributes to chlorpyrifos-induced apoptosis through p53 signaling in human neural precursor cells. **NeuroToxicology**, v. 42, p. 58–70, 2014.
- LIU, J.; LI L.; SUO W.Z. HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties. **Life Sciences**, v. 84, p. 267–271, 2009.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

- MAZZETTI, A. P.; FIORILE, M. C.; PRIMAVERA, A.; BELLO, M. L. Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. **Neurochemistry International**, v. 82, p. 10–18, 2015.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 63, p. 45-55, 1983.
- NICHOLSON K. M.; ANDERSON N. G The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. **Cellular Signalling**, v. 14, p. 381-395, 2002.
- PARK, J. H.; LEE, J. E.; SHIN, I. C.; KOH, H. C.; Autophagy regulates chlorpyrifos-induced apoptosis in SH-SY5Y cells, **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 268, p. 55–6, 2013.
- PARK, J. H.; Ko, J.; HWANG, J.; KOH, H. C. Dynamin-related protein 1 mediates mitochondria-dependent apoptosis in chlorpyrifos-treated SH-SY5Y cells, **NeuroToxicology**, v. 51, p. 145–157, 2015.
- PARK, J. H.; KO, J.; PARK, Y. S.; PARK, J.; HWANG, J.; KOH, H. C. Clearance of Damaged Mitochondria Through PINK1 Stabilization by JNK and ERK MAPK Signaling in Chlorpyrifos-Treated Neuroblastoma Cells, **Molecular Neurobiology**, p1-14, 2016.
- PETEGNIEF, V.; FRIGULS, B.; SANFELIU, C.; SUÑOL, C.; PLANAS, A.M. Transforming growth factor-alpha attenuates N-methyl-D-aspartic acid toxicity in cortical cultures by preventing protein synthesis inhibition through an Erk1/2-dependent mechanism. **Journal Biological Chemistry**, v. 278, p. 29552–29559, 2003.
- PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 346-56, 1977.
- PINTO, T; LANCTÔT, KL; HERRMANN, N. Revisiting the cholinergic hypothesis of behavioral and psychological symptoms in dementia of the Alzheimer's type. **Ageing Research Reviews**, v. 10, p. 404-412, 2011.
- POSSER, T. et al. Exposure of C6 glioma cells to Pb(II) increases the phosphorylation of p38(MAPK) and JNK1/2 but not of ERK1/2. **Archives of Toxicology**, v. 81, n. 6, p. 407-14, 2007.
- RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., FLOWER, R.J., HENDERSON, G. *Farmacologia*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ROBINSON, M. J.; COBB, M. H. Mitogen-activated protein kinase pathways. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 180-6, 1997.

ROSA, R.; SANFELIU, C.; RODRÍGUEZ-FARRÉ, E.; FRANDBSEN, A.; SCHOUSBOE, A.; SUÑOL, C. Properties of ryanodine receptors in cultured cerebellar granule neurons: effects of hexachlorocyclohexane isomers and calcium. **Journal of Neuroscience Research**, v. 47, p. 27-33, 1997.

SAULSBURY, M. D.; HEYLIGER, S. O.; WANG, K.; JOHNSON, D. J. Chlorpyrifos induces oxidative stress in oligodendrocyte progenitor cells. **Toxicology**, v. 259, p. 1-9, 2009.

SAYRE L. M.; PERRY G.; SMITH M. A. Oxidative Stress and Neurotoxicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, p. 172-188, 2008.

SMITH C. M.; MARKS A. D.; LIEBERMAN, M. Bioquímica médica básica de Marks: uma abordagem clínica. Porto Alegre: Artmed, 2th edição, p. 439 – 457, 2007.

SLOTKIN T. A. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 198, p. 132 – 151, 2004.

SONG G.; OUYANG G.; BAO S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 9, p. 59-71, 2005.

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

THORNTON, T.M.; PEDRAZA-ALVA, G.; DENG B.; Wood, C. D.; AROSHTAN A.; CLEMENTS, J. L.; SABIO, G.; DAVIS R. J.; MATTHEWS, D. E.; DOBLE, B.; RINCON, M. Phosphorylation by p38 MAPK as an Alternative Pathway for GSK3 β Inactivation. **Science**, v. 320, p. 667-670, 2008.

TIBBLES, L. A.; WOODGETT, J. R. The stress-activated protein kinase pathways. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, n. 10, p. 1230-54, 1999.

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

U.S. EPA. Chlorpyrifos Revised Risk Assessment and Agreement with Registrants. Washington, DC: U.S. **Environmental Protection Agency**; 2000.

VALE, A.; LOTTI, M. Organophosphorus and carbamate insecticide poisoning. Occupational Neurology. **Handbook of Clinical Neurology**, v.131, p. 150-168, 2015.

VENTURA, A. L. M.; ABREUL, P.A.; FREITAS, R. C.; C. SATHLER.; LOUREIRO, N., CASTRO, H. C. Cholinergic system: revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 37, n° 2, p. 66-72, 2010.

WOODGETT J.R. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. **The EMBO Journal**, v. 9, p. 2431–2438, 1990.