

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

**AVANÇOS SOBRE A NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELO PESTICIDA
ORGANOFOSFORADO MALATION EM MODELOS EXPERIMENTAIS COM
CAMUNDONGOS**

ALINE PREVE DA SILVA

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

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Farina
Departamento de Bioquímica**

Florianópolis, outubro de 2007.

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

**AVANÇOS SOBRE A NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELO PESTICIDA
ORGANOFOSFORADO MALATION EM MODELOS EXPERIMENTAIS COM
CAMUNDONGOS**

ALINE PREVE DA SILVA

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Farina
Departamento de Bioquímica**

Florianópolis, Outubro de 2007.

**AVANÇOS SOBRE A NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELO PESTICIDA
ORGANOFOSFORADO MALATION EM MODELOS EXPERIMENTAIS COM
CAMUNDONGOS**

ALINE PREVE DA SILVA

**Dissertação apresentada a Universidade Federal de
Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção
do Título de Mestre em Neurociências.**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Farina

Florianópolis, Outubro de 2007.

A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido. Não na vitória propriamente dita.

(Mahatma Gandhi)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Pai Criador, pela vida e a confiança N'Ele que me deram a força e a certeza de que os momentos difíceis passariam.

A meus pais, Marcio e Marlene, primeiros mestres de minha vida, pela formação moral e sólida base emocional e afetiva que me sustentam e guiam. Por haverem me ensinado que o importante é ter humildade e perseverança.

As minhas irmãs Emanuelle e Fernanda, e meu cunhado Fabio, meus agradecimentos pelo apoio, incentivo, atenção e carinho. Obrigado por tudo, amo vocês.

A minha amiga Flavia Oliveira pelo carinho, atenção, compreensão e apoio nos momentos difíceis.

A toda a família, pelo constante apoio emocional, amizade, carinho e por ser um grupo que serve de estrutura e segurança para alçar meus sonhos.

Ao professor Dr. Marcelo Farina pela oportunidade de aprendizado, pela dedicação, paciência e orientação deste trabalho. Também pelo exemplo de perseverança, determinação e garra, sempre estimulando o crescimento profissional, mostrando caminhos, dando apoio e tornando-se um grande amigo.

Ao Prof. Alcir Dafré pela competência, amizade e pela maneira prestativa em permitir o uso de alguns equipamentos para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Nelson Gabilan pela amizade, parceria, e por nos ter recebido de braços abertos em seu laboratório e fazer parte do seu convívio.

A Prof^a. Andreza de Bem agradeço pela simpatia e dedicação ao Grupo do Marcelo Farina.

Aos amigos do Laboratório: Keller, Hugo, Roberta, Jéferson, Felipe e Taiane pela amizade, apoio emocional, pela contribuição na minha formação técnica e humana e por terem proporcionado um ambiente agradável e amigável. Sempre os terei com carinho em minhas lembranças. Obrigado por tudo.

Ao Hugo Braga, pela amizade e os churrascos nos momentos de descontração.

Aos professores da Pós-Graduação em Neurociências pelo conhecimento e pela experiência em ensinar que contribuíram para minha formação.

Ao funcionário Nivaldo, secretário da pós, pela disposição em ajudar.

Ao funcionário Péricles pela amizade, prestação e colaboração com este trabalho.

Agradeço a Banca examinadora pela contribuição e engrandecimento no trabalho final.

A todos os amigos e demais pessoas que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Agrotóxicos	01
1.2. Compostos Organofosforados (OFs)	02
1.2.1. Toxicidade dos Organofosforados	05
1.2.2. Toxicidade Induzida por Compostos Ofs Durante Período de Desenvolvimento Do Sistema Nervoso Central	07
1.2.3. Tratamento	07
1.3. Malation	08
1.4. Sistema Colinérgico versus Compostos Organofosforados	10
1.5. Espécies Reativas e Estresse Oxidativo	12
1.5.1. Radical Superóxido	13
1.5.2. Radical Hidroperoxila	13
1.5.3. Radical Hidroxila	13
1.5.4. Peróxido de Hidrogênio	13
1.5.5. Oxigênio Singlet	14
1.5.6. Lipoperoxidação	14
1.6. Sistema de Defesa Antioxidante	16
1.6.1. Glutathiona Reduzida	16
1.6.2. Glutathiona Redutase	16
1.6.3. Glutathiona Peroxidase	17
1.6.4. Catalase	18
1.6.5. Superóxido – Dismutase	19

1.6.6. Estresse Oxidativo	20
1.7. Estresse Oxidativo versus Compostos Organofosforados	21
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	24
3.1. Objetivos Gerais	24
3.2. Objetivos Específicos	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. Reagentes e Drogas	25
4.2. Animais	25
4.3. Tratamentos	25
4.3.1. Tratamento 1: Efeito da exposição lactacional (pós-natal) ao malation sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase e variáveis bioquímicas relacionadas com o estresse oxidativo no cérebro de camundongos lactentes	25
4.3.2. Tratamento 2: Papel das oximas inéditas K027 e K048 sobre o efeito do malation na atividade da enzima AChE e variáveis bioquímicas relacionadas com estresse oxidativo em córtex pré-frontal de camundongos	26
4.4. Análises Bioquímicas	26
4.4.1. Preparação das Amostras Teciduais	26
4.4.2. Determinação da Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)	27
4.4.3. Lipoperoxidação	27
4.5. Parâmetros Antioxidantes	27
4.5.1. Avaliação da atividade Glutaciona Reduzida	27
4.5.2. Avaliação da atividade Glutaciona Peroxidase	28
4.5.3. Avaliação da atividade Glutaciona Redutase	28
4.5.4. Dosagem de Proteínas	28
4.6. Análise Estatística	28

5. RESULTADOS	30
6. DISCUSSÃO	37
7. CONCLUSÕES	46
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
9. ANEXOS	
Manuscrito 1: Lactational exposure to malathion inhibits brain acetylcholinesterase in mice	66
Manuscrito 2: Temporal effects of newly developed oximes (K027, K048) on malathion- induced acetylcholinesterase inhibition and lipid peroxidation in mouse prefrontal cortex	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh - acetilcolina
AChE - acetilcolinesterase
ANOVA - Análise de Variância
BHC - hexaclorocicloexano
CAT - Catalase
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CIT - Centro de Informações toxicológicas
DL₅₀ - dose letal para 50% de um grupo de animais
DTNB - ácido 5,5 – ditiobis – 2 – nitrobenzóico
EROs - espécies reativas de oxigênio
- SS - pontes dissulfeto
FIOCRUZ - Fundação Osvaldo Cruz
G6PD - glicose- 6 – fosfato desidrogenase
GPx - glutathione peroxidase
GR - glutathione reductase
GSH - glutathione reduzida
GSSG - glutathione oxidada
GST - glutathione-S-transferase
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
HEPES – ácido n-2- hidroxietilpiperazina
HO₂⁻ - radical hidroperoxila
L[·] - radical lipídico
LH - ácido graxo poliinsaturado
LO[•] - radical alcóxila
LOO[•] - radical peróxila
LOOH - hidroperóxido lipídico
MDA - malondialdeído
MGP - mercaptopropionilglicina
MMA - malation ácido monocarboxílico

NaCl - cloreto de sódio
NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídio
nº - número
NPSH - grupos tióis não- protéicos
NTE - esterase neurotóxica
O₂•⁻ - radical superóxido
O₂¹ - oxigênio singlet
OF - organofosforado
OH• - radical hidroxil
OMS - Organização Mundial da Saúde
OPIDP - polineuropatia tardia induzida por organofosforados
PCA - ácido perclórico
PON - paraoxonase
-SH - grupos sulfidrílicos (grupo tiol)
SINITOX - Sistema Nacional de Informações Tóxico – Farmacológicas
SNA - sistema nervoso autônomo
SNC - sistema nervoso central
SNP - sistema nervoso periférico
SOD - superóxido dismutase
t-BOOH - peróxido de ter-butila
TBA - ácido tiobarbitúrico
TBARS - espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA - ácido tricloroacético
TFK - tampão fosfato de potássio
TNB - ácido 2 – nitro-5- mercapto- benzóico
TRIS – tris-(hidroximetil)- aminoetano
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
ε - coeficiente de extinção molar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura geral dos compostos organofosforados	03
Figura 2: Estrutura química do OF malation	08
Figura 3: As vias de bioativação do malation	09
Figura 4: Anatomia das principais vias colinérgicas no cérebro	10
Figura 5: Representação da Acetilcolina em neurônios colinérgicos	11
Figura 6: Oxidantes do metabolismo normal	12
Figura 7: Representação da Reação de Fenton	14
Figura 8: Lipoperoxidação de lipídeos pela reação de radicais livres	15
Figura 9: Reação de redução da GSSG pela GR, usando NADPH como co-enzima.	17
Figura 10: Reação de detoxificação de ERO promovida pela GPx	17
Figura 11: Mecanismo de defesa antioxidante	18
Figura 12: Reação de detoxificação de ERO promovida pela catalase	18
Figura 13: Reação de detoxificação de ERO promovida pela SOD	19

Figura 14: Representação esquemática da detoxificação de EROs por enzimas antioxidantes	20
Figura 15: Efeito da exposição ao malation sobre a atividade da acetilcolinesterase cerebral	31
Figura 16: Efeito do tratamento com malation, atropina e oximas K027 ou K048 sobre atividade da AChE no córtex pré-frontal	34
Figura 17: Efeito do tratamento com malation, atropina e oximas K027 ou K048 sobre a peroxidação lipídica no córtex pré-frontal de camundongos	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos agudos da exposição a compostos organofosforados	06
Tabela 2: Efeito da exposição do malation sobre a atividade das enzimas glutationala peroxidase e glutationala redutase, peroxidação lipídica e níveis de glutationala	32
Tabela 3: Efeito do malation, atropina e as oximas K027 ou K048 sobre níveis de glutationala e atividade das enzimas glutationala redutase e peroxidase do córtex pré-frontal de camundongos expostos ao malation	36

RESUMO

O pesticida organofosforado (OF) Malation é um composto utilizado como inseticida em áreas urbanas e rurais. Sabe-se que a toxicidade dos OFs é atribuída à inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), causando neurotoxicidade tanto em humanos quanto em animais. Além da inibição da AChE, a toxicidade dos OFs está também relacionada com as propriedades pró-oxidantes desses compostos. Um dos objetivos deste trabalho foi investigar a contribuição exclusiva da exposição ao malation através do leite materno sobre a atividade da AChE, bem como sobre parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo (níveis de glutathione, peroxidação de lipídeos e atividade das enzimas glutathione peroxidase e glutathione redutase), no encéfalo de camundongos (genitoras e prole). As genitoras foram expostas ao malation através de injeções diárias e subcutâneas nas doses de 20, 60 e 200 mg/kg do peso corporal, durante o período lactacional (1º ao 21º dia pós-natal). Após a última injeção, dois animais de cada prole e suas respectivas genitoras foram sacrificados por decapitação. Removeu-se o encéfalo para a análise das variáveis bioquímicas. Os resultados mostraram que a exposição lactacional ao malation causou um alto efeito inibitório na atividade da AChE no cérebro da prole, mesmo quando as mães foram expostas à menor dose do malation (20 mg/kg). A atividade da AChE cerebral também foi inibida nas mães; entretanto, somente na dose mais elevada do composto (200 mg/kg). Nenhuma mudança foi observada nos parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo, tanto nas mães quanto nas proles. Esta fase do estudo mostra que a exposição (via lactação) de camundongos neonatos ao malation inibe a atividade da AChE no cérebro da prole. Este dado, somado ao fato de que os pesticidas OF são excretados no leite materno, torna relevante a exposição lactacional a estes xenobióticos em termos de interesses a saúde humana.

Sabe-se que o tratamento antídoto para a intoxicação por malation, que é baseado na combinação de atropina e um reativador da enzima acetilcolinesterase (principalmente a pralidoxima), não é suficientemente eficaz. Desta forma, o outro objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial efeito benéfico de duas oximas inéditas (K027 e K048) na reversão do efeito inibitório na atividade da AChE e na eliminação do estresse oxidativo em córtex pré-

frontal de camundongos expostos ao malation. Para este propósito, utilizaram-se camundongos adultos. O malation foi administrado subcutaneamente na dose de 1 g/kg. As oximas inéditas K027 e K048 (1/4 da LD₅₀, dissolvidas em salina, i.p) foram administradas imediatamente após o malation e o sulfato de atropina (20 mg/kg, dissolvido em salina i.p). A atividade da AChE e os parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo (níveis glutaciona, atividade da glutaciona peroxidase e redutase, e peroxidação lipídica) foram avaliados no córtex pré-frontal destes camundongos em dois tempos diferentes (3 e 24 horas após a exposição). Os resultados do experimento mostraram que atividade da AChE cérebro-cortical de camundongos adultos foi consideravelmente inibida (em torno de 55 %) em 3 horas e se manteve inibida até 24 horas após a exposição ao malation. Nem a atropina nem as oximas foram capazes de eliminar a inibição da AChE cortical provocada pelo malation em 3 horas após o tratamento. A oxima K027 (em combinação com a atropina) impediu completamente a ocorrência de efeito inibitório do malation na atividade da AChE no córtex pré-frontal em 24 horas após o envenenamento. A oxima K048 (em combinação com a atropina) diminuiu significativamente, mas não completamente, o efeito inibitório do malation na atividade da AChE no córtex pré-frontal em 24 horas após envenenamento. A exposição aguda ao OF malation causou um aumento significativo na peroxidação de lipídeos no córtex pré-frontal dos animais. O aumento da peroxidação lipídica foi observado somente em 24 h após a administração do malation. A oxima K027 foi capaz de diminuir notavelmente a peroxidação lipídica no córtex pré-frontal de camundongos adultos em 24 h após intoxicação com malation. Estes resultados demonstraram que as oximas inéditas K027 e K048 foram capazes de reativar a enzima AChE no córtex pré-frontal de camundongos expostos ao malation. Além disso, o efeito benéfico da oxima K027 sobre a peroxidação lipídica induzida pelo malation em 24 horas sugere uma possível ligação entre a super-estimulação do sistema colinérgico e o estresse oxidativo no córtex pré-frontal de camundongos após a exposição ao malation. Tendo em vista que os tratamentos disponíveis (baseados em oximas) para intoxicações por malation parecem ser pouco eficazes, os dados do presente estudo são muito importantes porque apontam para as oximas assimétricas da série K como antídotos promissores para os casos de intoxicação por este pesticida.

ABSTRACT

The organophosphate pesticide (OP) Malathion is a compound used as insecticide in urban and agriculture areas. It is known that the toxicity of the OP is attributed to inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE), inducing neurotoxicity in both animals and humans. In addition to the inhibition of AChE activity, OP-induced toxicity is also related to the pro-oxidative properties of these compounds. One of the objectives of this study was to investigate the exclusive contribution of malathion exposure through maternal milk in the activity of acetylcholinesterase (AChE), as well as on biochemical parameters related to the oxidative stress (glutathione levels, lipid peroxidation and glutathione reductase and glutathione peroxidase activities) in the mice brain (dams and pups). The mothers were exposed to malathion through daily subcutaneous injections in the doses of 20, 60 and 200 mg/kg of the body weight, during the lactational period (1^o st to 21^o st postnatal day). After the last injection, two animals of each offspring and its respective mothers were killed by decapitation. And brain removed for the biochemical analyses. The results showed that the lactational exposure to malathion caused a high inhibitory effect in the activity of AChE in the brain of the offspring, even when mothers were exposed to the lowest malation dose (20 mg/kg). Brain AChE activity was also inhibited in the mothers; however, only at the highest malathion dose (200 mg/kg). No changes were observed in the biochemical parameters related to the oxidative stress for both dams and pups brains. This part of the study shows that the exposure of neonatal mice to malathion via lactation inhibits the activity of brain AChE in the offspring. These data, added to the fact that OP pesticides are excreted in human milk, makes relevant the lactational exposure to these xenobiotics in terms of human health concerns.

It is well known that the antidote treatment for malathion poisoning, which is based on the combination of atropine sulfate and reactivators of the enzyme AChE (mainly pralidoxime), is not completely effective. In this regard, another objective of this work was to evaluate the potential beneficial effect of two inedit oximes (K027 and K048) in the reversion of the inhibitory effect in AChE and in the elimination of oxidative stress in the prefrontal cortex of adult mice exposed to malathion. Malathion was

administered subcutaneously at a dose of 1 g/kg. Oximes K027 and K048 (1/4 of the LD₅₀, dissolved in saline, i.p) were administered immediately after malathion and atropine sulfate (20 mg/kg, dissolved in saline, i.p.). AChE activity and biochemical parameters related to oxidative stress (glutathione levels, glutathione peroxidase and glutathione reductase activities, and lipid peroxidation) were evaluated in mouse prefrontal cortex at two different timepoints (3 or 24 h after malathion poisoning). The results of the experiment showed that malathion markedly inhibited cortical acetylcholinesterase activity (around 55 %) at 3 h after malathion challenge and such inhibition was maintained until 24 h after poisoning. Nor the atropine nor the oximes were able to eliminate malathion-induced cortical acetylcholinesterase inhibition at 3 h after poisoning. The oxime K027 (in combination with atropine) completely eliminated the inhibitory effect of malathion in cortical AChE activity at 24 h after malathion administration. The oxime K048 (in combination with atropine) significantly decreased malathion-induced AChE inhibition at 24 h after poisoning, but not completely. The acute exposure to the OP malathion markedly increased lipid peroxidation in the prefrontal cortex of adult mice. Such phenomenon was observed only at 24 h after malathion administration. The oxime K027 was able to significantly decrease malathion-induced lipid peroxidation in the prefrontal cortex of adult mice in 24 h after malathion exposure. These results demonstrate that the oximes K027 and K048 are able to reactivate malathion-inhibited AChE in the mouse prefrontal cortex after acute malathion exposure. Moreover, the protective effect of the oxime K027 on malathion-induced lipid peroxidation at 24 h after poisoning suggests a potential link between the hyperstimulation of the cholinergic system and oxidative stress in the mouse prefrontal cortex after malathion exposure. Because the available oxime-based treatment against malathion poisoning appear to be ineffective, the present data are very important because in they rendering asymmetric bispyridinium oximes of the K-series as promising antidotes for malathion poisoning.

1. INTRODUÇÃO

Agrotóxicos

Dentre os argumentos utilizados por aqueles que estimulam o uso de defensivos agrícolas, destacam-se o crescimento da população mundial e a conseqüente necessidade de aumento da produção para suprir a demanda alimentar, servindo de pretexto para justificar o incentivo a esta prática. Entretanto, quando se constata o desperdício nas centrais de abastecimento, bem como a poluição ambiental e o risco potencial a saúde humana, conclui-se que interesses financeiros vêm sendo colocados à frente da saúde da população mundial. Neste contexto, intoxicações por inseticidas têm se tornado um problema de saúde pública em nossa sociedade (Abdollahi et al., 2004a; Assini, 2005).

O termo “agrotóxico” é definido pela Lei Federal nº. 7 802, regulamentada pelo Decreto nº. 98 816, no seu artigo 2, inciso I da seguinte forma:

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

Estas substâncias podem ser classificadas quanto à praga que combatem em: herbicida, fungicidas, raticidas, nematocidas, inseticidas, acaricidas e molusquicidas (OMS, 1996).

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

Quanto aos pesticidas organofosforados, em 1936, o químico Alemão Gerhard Schrader sintetizou uma série de compostos organofosforados (OFs) com uso potencial como inseticidas. Schrader conduziu trabalhos que levaram a descoberta dos “agentes

nervosos”, especialmente o sarin, tabun e soman, os quais foram, posteriormente, aplicados como agentes químicos em ataques terroristas na Guerra Militar (Kuca et al., 2005; Kassa e Kunesova, 2006; Khurana e Prabhakar, 2000; Rusyniak e Nañagas, 2004).

Zanin e colaboradores (1992) sugerem que o primeiro agrotóxico utilizado no Brasil tenha sido o hexaclorocicloexano (BHC), classificado como composto organoclorado. A expansão de seu uso ocorreu na década de 60, acompanhando o processo de modificação da estrutura agrária, com a penetração do capitalismo no campo através da introdução de máquinas e insumos agrícolas. Nos anos 70, com a implantação dos Planos Nacionais de Desenvolvimento Agrícola e de Fertilizante e Calcário, o Banco do Brasil concedia financiamentos agrícolas com 15% do crédito atrelado à “aplicação de tecnologia moderna”, dando início a um novo modelo agrícola baseado no uso intensivo de agrotóxicos e na total dependência tecnológica de multinacionais fornecedoras de insumos e sementes (Zanin et al., 1992).

As conseqüências do uso estimulado de agrotóxicos refletem-se nos índices de intoxicações induzidas por estas substâncias, seja no campo ou em áreas urbanas. No Brasil, segundo estatísticas do Sistema Nacional de Informações Tóxico - Farmacológicas (SINITOX/FIOCRUZ), no ano de 2003, foram registrados aproximadamente 8.500 casos de intoxicação por agrotóxicos de uso rural e doméstico. Na região Sul estão 24% destes casos, no referido ano.

Em um estudo detalhado da realidade das intoxicações humanas por agrotóxicos em Santa Catarina, no ano de 2006, o Centro de Informações Toxicológicas (CIT) atendeu 944 pessoas com diagnóstico de intoxicação por agrotóxicos. Os inseticidas foram à classe de uso majoritariamente implicada nas intoxicações, e os compostos OFs, especialmente o Malation, esteve envolvido como o principal contaminante em casos de intoxicações humanas no Estado. Em 18% dos casos, a intoxicação foi devido a exposição ocupacional e cerca de 34 % dos casos foram por tentativas de suicídios.

1.2. Compostos Organofosforados (OFs)

Os pesticidas são amplamente utilizados tanto no âmbito agropecuário (aumento da produção de alimentos, erradicação de insetos, controle de vetores de doenças, horticultura e na medicina veterinária para o tratamento de ectoparasitas) quanto urbano

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

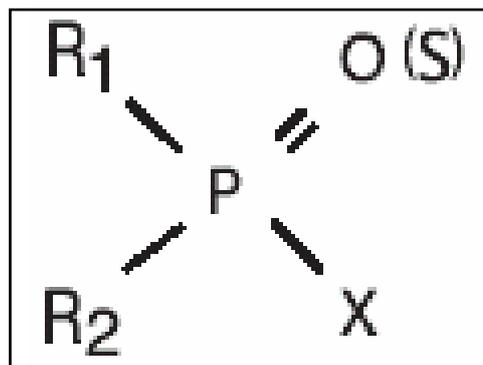


Figura 1: Estrutura geral dos compostos organofosforados. O átomo de fósforo (P) pode estar ligado através de uma dupla ligação com o oxigênio (O) ou com o enxofre (S).

R₁ e R₂ representam grupos alcoxil. X= grupo substituível. Adaptado de Costa, 2006

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

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

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

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

Por via respiratória, pode haver absorção durante a elaboração das formulações comerciais, nos indivíduos que aplicam estes compostos sob a forma de pulverização sem tomar as medidas de proteção tendo em vista o desconhecimento em relação ao poder tóxico dos defensivos agrícolas por parte dos agricultores (Carvalho e Ribeiro, 2001).

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

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

b) butirilcolinesterase, pseudocolinesterase ou acetilcolinesterase inespecífica (BChE), encontrada no plasma, no intestino e, em menor concentração, em outros tecidos. A AChE está também presente nos eritrócitos (Carvalho e Ribeiro, 2001; Kushik e Chandrabhan, 2003; Costa et al., 2004).

Os OFs podem sofrer metabolismo, principalmente a nível hepático, podendo resultar em metabólitos tóxicos (inibidores de enzimas colinesterases). Nesse sentido, Costa (2006) explica as principais vias metabólicas envolvidas na biotransformação dos compostos OFs. Em compostos que possuem, na sua estrutura química, uma dupla ligação entre os átomos de enxofre e fósforo (P=S), é necessário que ocorra uma bioativação metabólica para que sua atividade biológica (inibição de enzimas colinesterases) seja manifestada. Em contraste, os compostos OFs que possuem P=O em sua estrutura química são inibidores efetivos da enzima AChE, sendo desnecessário um processo metabólico para que exerçam sua ação biológica. Essa bioativação consiste em uma desulfuração oxidativa realizada por enzimas Citocromo P 450 (principalmente no fígado), resultando na formação de um "oxon".

Costa (2006) cita outra importante classe de enzimas chamadas fosfotriesterase (também conhecidas como A-esterases) que desempenham suas atividades catalíticas

hidrolisando os compostos OFs, desempenhando um importante papel na sua detoxificação. Uma representante desta classe é a enzima Paraoxonase (PON 1), que possui a capacidade de hidrolisar os compostos oxons dos OFs. A baixa atividade desta enzima, que ocorre principalmente em crianças com menos de 2 anos, é um fator que aumenta a toxicidade de certos compostos oxons dos OFs (Furlong et al., 2005).

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

1.2.1. Toxicidade dos OFs

Existe um consenso na literatura sustentando a hipótese de que a ação tóxica dos compostos OFs está relacionada à inibição de numerosas enzimas, porém, as esterases parecem ser as mais importantes clinicamente. A inibição da acetilcolinesterase (AChE), através do processo de fosforilação do grupo hidroxila do resíduo de serina da enzima, leva à inativação da mesma. Com isso, a hidrólise da acetilcolina (ACh) será comprometida, levando ao acúmulo deste neurotransmissor nas sinapses do sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). Desta forma, haverá uma hiperestimulação dos receptores muscarínicos e nicotínicos (receptores colinérgicos) desencadeando uma variedade de sinais e sintomas que caracterizarão a “síndrome colinérgica” (Rusyniak e Nañagas, 2004; Slotkin, 2004; Ankarberg, 2004; Roberts e Aaron, 2007; Chanda e Pope, 1995; Calic et al., 2006; Abou-Donia et al., 2003; Brocardo, 2004).

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

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

Tabela 1: Efeitos agudos da exposição a compostos organofosforados.

Adaptado de Rusyniak e Nañagas, 2004.

Alguns OFs podem causar um tipo de toxicidade conhecida como Polineuropatia Tardia induzida por OFs (OPIDP). Esta geralmente é evidenciada 14-28 dias após o episódio agudo do envenenamento a compostos OFs, porém, não está relacionada à inibição da AChE, mas sim a outras esterases nomeadas “esterases neurotóxicas” (NTE). Tais enzimas agem por mecanismos ainda pouco conhecidos, porém, sabe-se que a fosforilação da enzima NTE é similar a observada da AChE, e que estas têm uma ação protetora dos nervos longos dos membros inferiores e superiores. Para a OPIDP ser iniciada, 70 a 80% da NTE tem que estar fosforilada e isso ocorre em questão de horas após a intoxicação por OFs. No entanto, os sinais clínicos serão evidentes algumas semanas após, quando a atividade da enzima já tenha sido restabelecida. Os sinais e sintomas da OPIDP incluem tremores nas mãos e pés, seguido de perda sensorial, fraqueza muscular progressiva, paralisia no músculo esquelético distal dos membros inferiores e superiores e ataxia. Atrofia muscular, arreflexia e perda ocasional do controle dos esfíncteres também podem ocorrer (Johnson, 1969; Faria et al., 1999).

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

1.2.2. Toxicidade induzida pelos compostos OFs durante o período de desenvolvimento do Sistema Nervoso Central

Embora indivíduos adultos representem uma classe bastante susceptível à exposição por OFs, principalmente devido ao seu uso em atividades agropecuárias, alguns estudos apontam para crianças e neonatos como grupos etários importantes no que se refere à exposição a OFs (Curl et al., 2002). Além disto, salienta-se que o SNC em desenvolvimento é mais susceptível aos efeitos neurotóxicos de xenobióticos, incluindo pesticidas OFs (Costa et al., 2004). Neste contexto, com o uso de modelos animais, alguns pesquisadores têm observado que a exposição gestacional a baixas doses a OFs causa uma redução na síntese do DNA e no número de células cerebrais tanto nos fetos quanto em neonatos. Tais autores sugeriram que os sistemas nervosos de fetos e de animais jovens são mais susceptíveis a toxicidade induzida por OFs (Chakraborti et al., 1993; De Silva, 2006).

1.2.3. Tratamento

O cenário hospitalar oferece drogas rotineiras para o tratamento antídoto à intoxicação por OFs. Neste sentido, indivíduos que apresentam uma sintomatologia característica de síndrome colinérgica são submetidos à combinação de drogas anticolinérgicas, tais como o sulfato de atropina, e um reativador da enzima AChE (geralmente uma molécula da classe das oximas) (Petroianu et al., 2006; Kuca et al., 2005)

O sulfato de atropina, que apresenta uma configuração química semelhante à da acetilcolina, age por um mecanismo de competição, inibindo a ação da acetilcolina sobre o órgão efector. Esta competição ocorre preferencialmente nos receptores

colinérgicos muscarínicos, cuja expressão não é homogênea em todos os órgãos. Desta forma, a atropina reverte apenas sintomas muscarínicos e deve ser administrada assim que se suspeitar o diagnóstico de intoxicação por compostos OFs. Já as oximas têm a propriedade de reativar a AChE. Elas reagem diretamente com a enzima fosforilada, restabelecendo as condições do centro ativo por serem doadores de próton H^+ , o que contribuirá para deslocar o radical fosfato da sua ligação com o centro esterásico da enzima, resultando na restauração da atividade da mesma. Essas drogas devem ser administradas após o sulfato de atropina (Moraes, 1999; Kushik e Chandrabhan, 2003; Rusyniak e Nañagas, 2004).

1.3. Malation

Dentre os OFs mais utilizados no Brasil, destaca-se o malation (éster dietil dimetoxifosfinotiol - Figura 2), o qual é utilizado nas áreas rurais e urbanas em uma variedade de situações (erradicações de insetos, formigas e até piolhos. O malation é amplamente utilizado devido a sua alta eficácia como inseticida e sua baixa toxicidade em mamíferos quando comparado a outros OFs. Entretanto, impurezas presentes na sua formulação podem aumentar sua toxicidade (Meinking et al., 2004; Maroni et al., 2000).

Esse pesticida OF é conhecido no meio científico por apresentar alterações bioquímicas e fisiológicas nos eritrócitos e linfócitos, além de induzir uma série de aberrações cromossômicas em animais (Giri et al., 2001; Amer et al., 2002; Banerjee et al., 1999).

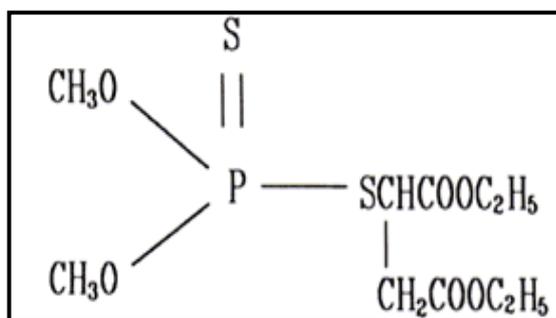


Figura 2: Estrutura química do OF malation. Fonte: Buratti et al., 2004.

Estudos com animais e humanos mostram que o malation, após absorção, é oxidado no fígado por enzimas do Citocromo P-450 em pequenas quantidades para malaoxon, o qual é o principal metabólito responsável pelos efeitos tóxicos observados (U.S. EPA, 2000; Buratti et al., 2004). O metabolismo do malation também se dá através de uma enzima carboxilesterase hepática que catalisa a degradação rápida do malation a derivados como o malation ácido monocarboxílico (MMC) e malation ácido dicarboxílico (MDC). Essas reações competem com a formação do malaoxon (catalisada pelo Citocromo P-450), que por sua vez também pode ser degradado pela carboxilesterase (Buratti et al., 2004 - Figura 3).

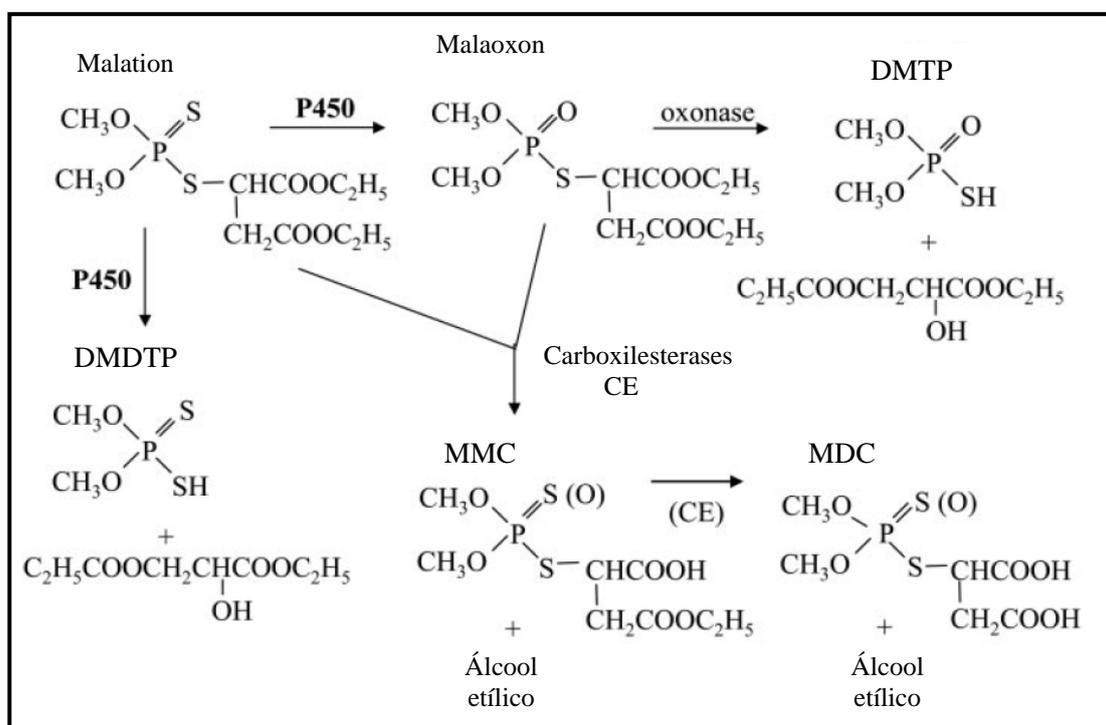


Figura 3: As vias de bioativação do malation. DMTP, dimetilíofosfato; DMDTP, dimetilditiofosfato; MMC, malation ácido monocarboxílico; MDC, malation ácido dicarboxílico. Adaptado de Buratti et al., 2004.

A excreção do malation se dá quase que totalmente nas primeiras 24 horas, predominantemente pela urina (cerca de 84%) e em pequena proporção pelas fezes (cerca de 6%) (Carvalho e Ribeiro, 2001).

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

1.4. Sistema Colinérgico versus Compostos OFs

A acetilcolina é um neurotransmissor do sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP), e sua transmissão é mediada por dois tipos distintos de receptores: muscarínicos (acoplados à proteína G) e nicotínicos (canais ionotrópicos). Os receptores muscarínicos são localizados no coração, células musculares lisas e células glandulares. Além disso, estão localizados, juntamente com receptores nicotínicos, em células ganglionares autônomas e em neurônios do SNC (Costa, 2006).

No SNP, a acetilcolina é o principal neurotransmissor dos gânglios autônomos, fibras nervosas parasimpáticas pós-ganglionares e junção neuromuscular. Possui um papel fisiológico essencial na estimulação da contração dos músculos esqueléticos e lisos. Também regula a secreção em tecidos glandulares, como o intestino e as parótidas (Slotkin, 2004; Costa, 2006). No SNC, a acetilcolina apresenta inúmeras funções, estando implicada no processo cognitivo (atenção, aprendizado e memória), na motivação e recompensa, no processamento de estímulos, além da participação no processo de sono e vigília (Ankarberg, 2004).

A localização anatômica dos neurônios colinérgicos e suas projeções nas estruturas cerebrais estão apresentadas na Figura 4.

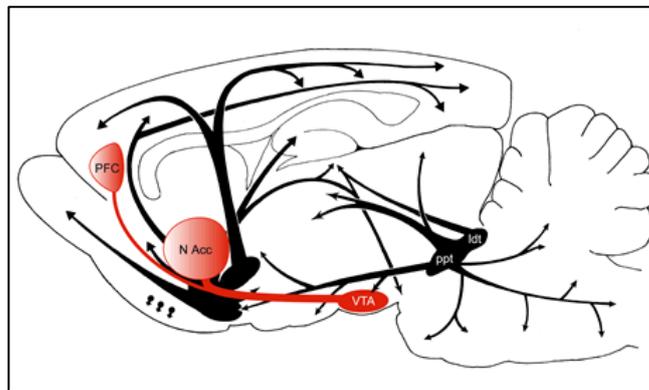


Figura 4: Anatomia das principais vias colinérgicas no cérebro. Adaptado de Woolf, 1991. Abreviações: ldt: área tegmental laterodorsal; N Acc: nucleus accumbens; PFC: córtex pré-frontal; ptt: núcleo tegmental pedunculopontino; VTA: área tegmental ventral.

Após a liberação da acetilcolina na fenda sináptica ou junção neuromuscular e sua ação em receptores específicos (nicotínicos ou muscarínicos), este neurotransmissor deve ser removido para permitir a recuperação do receptor ou para evitar respostas repetitivas e

descontroladas após um único estímulo. Esta remoção é feita pela hidrólise do composto, com formação de colina e ácido acético, catalisada pela AChE (Figura 5) (Silman & Sussman, 2005).

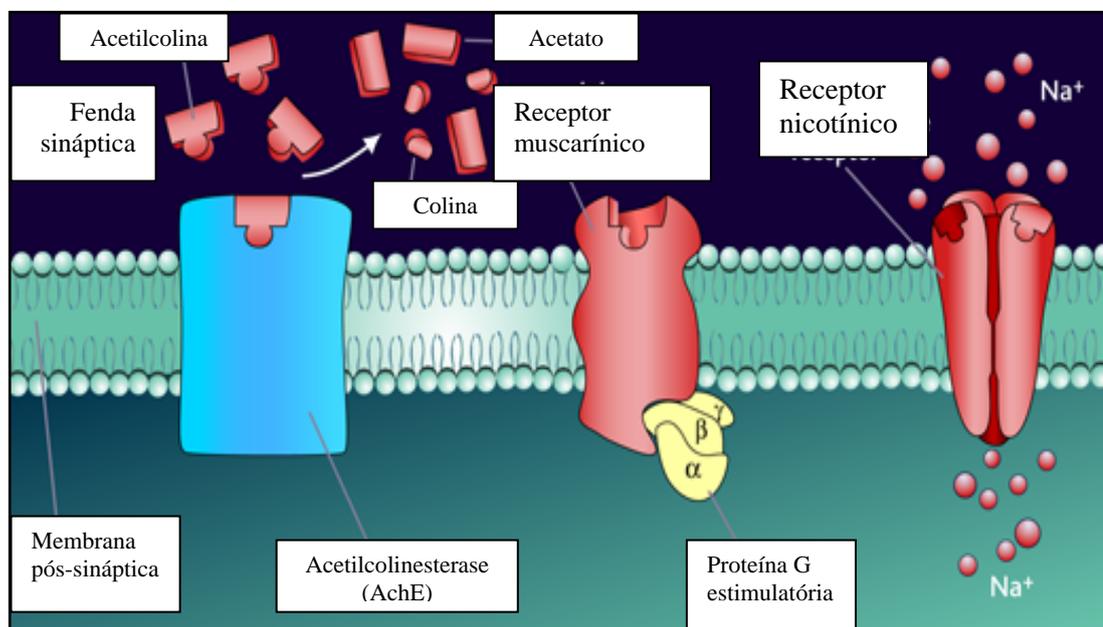


Figura 5: Representação esquemática da Acetilcolina em neurônios colinérgicos.

Estudos recentes vêm evidenciando as diferentes funções dos neurônios colinérgicos no cérebro. A avaliação dessas funções, por meio de técnicas eletrofisiológicas e uso de toxicantes, permite verificar que a acetilcolina está implicada em importantes processos fisiológicos relacionados à cognição, motivação, sono e vigília, conforme já descrito anteriormente. Neste contexto, um crescente número de estudos vem mostrando que colinotóxicos podem causar distúrbios no desenvolvimento do sistema colinérgico, bem como na função em si, em diferentes áreas no cérebro (Ankarberg, 2004).

Tendo em vista que os compostos OFs causam inibição da enzima AChE, levando à perda da homeostase colinérgica (Costa et al., 2005), tais compostos OFs podem causar inúmeros distúrbios neuroquímicos, neurocomportamentais e neuromorfológicos. Dentre as alterações provocadas por esses compostos estão: mudança na conformação dos receptores colinérgicos e na densidade dos mesmos, citotoxicidade, vacuolização citoplasmática, aumento no espaço intercelular, anormalidades mitóticas, apoptose, alteração em cascatas de sinalização celular, diminuição no número de células cerebrais, nas projeções neuríticas, na comunicação sináptica, proliferação da célula da glia,

comprometimento na inervação colinérgica em diferentes áreas cerebrais. Tais modificações podem refletir em desordens neuropsiquiátricas, tais como alterações da habilidade locomotora, ansiedade, depressão, perda de memória de aprendizagem e déficits de aprendizagem e de atenção (Eyer, 1995; Costa et al., 2005; De Silva, 2006; Slotkin, 2004).

1.5. Espécies Reativas e Estresse Oxidativo

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

As Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . Durante esse processo, são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroperoxila (HO_2^{\bullet}) e hidroxila (OH^{\bullet}), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria, e a reatividade das ERO é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons (Figura 6) (Cohen, 1989).

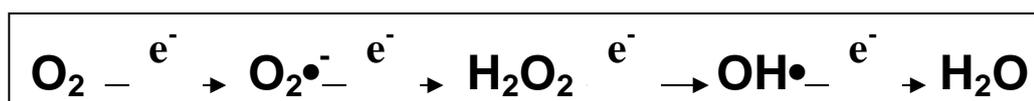


Figura 6: Oxidantes do metabolismo normal. Adaptado de Ames et al., 1993.

1.5.1. Radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

O radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é formado após a primeira redução do O_2 . O radical superóxido ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos. Apesar de ser considerado pouco reativo em soluções aquosas, tem sido observada lesão biológica secundária a sistemas geradores de $O_2^{\bullet-}$ (seja enzimático, fagocítico ou químico) (Halliwell e Gutteridge, 1986; Halliwell e Gutteridge, 1990).

1.5.2. Radical hidroperoxila (HO_2^{\bullet})

Representa a forma protonada do radical superóxido, ou seja, possui o próton hidrogênio. Existem evidências de que o hidroperoxila é mais reativo que o superóxido, por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas (Halliwell e Gutteridge, 1990).

1.5.3. Radical hidroxila (OH^{\bullet})

É considerada a ERO mais reativa em sistemas biológicos. A combinação extremamente rápida do OH^{\bullet} com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Assim, se o radical hidroxila for produzido próximo ao DNA e este estiver fixado a um metal, poderão ocorrer modificações de bases púricas e pirimídicas. Além disso, a hidroxila pode inativar várias proteínas (enzimas e de membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS). Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (Halliwell & Gutteridge, 1986).

1.5.4. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada eletrônica, o H_2O_2 é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o OH^{\bullet} (Reação de Fenton - Figura 7). O H_2O_2 tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com membranas celulares e com proteínas ligadas ao Fe^{++} . Assim, é altamente tóxico para as células; esta toxicidade pode ser aumentada de dez para mil vezes quando em presença de ferro, como ocorre, por exemplo, na hemocromatose transfusional (Scott et al., 1991).



Figura 7: Representação da Reação de Fenton.

Adaptado de Barreiros e David, 2006.

1.5.5. Oxigênio singlet (O_2^1)

É forma excitada de oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada. O O_2^1 tem importância em certos eventos biológicos, mas poucas doenças foram relacionadas à sua presença. Embora as ERO possam ser mediadoras de doenças, sua formação nem sempre é deletéria, como na defesa contra a infecção, quando a bactéria estimula os neutrófilos a produzirem espécies reativas com a finalidade de destruir o microorganismo. Contudo, se houver estímulo exagerado na produção dessas espécies, e a ele estiver associada uma falha da defesa antioxidante, poderão ocorrer vários eventos nosológicos, tais como aterosclerose, câncer, mutações, doenças auto-imunes, lesão pós-isquêmica e reperfusão (Halliwell e Gutteridge, 1990; Floyd, 1990; Hatherill et al., 1991).

1.5.6. Lipoperoxidação

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

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

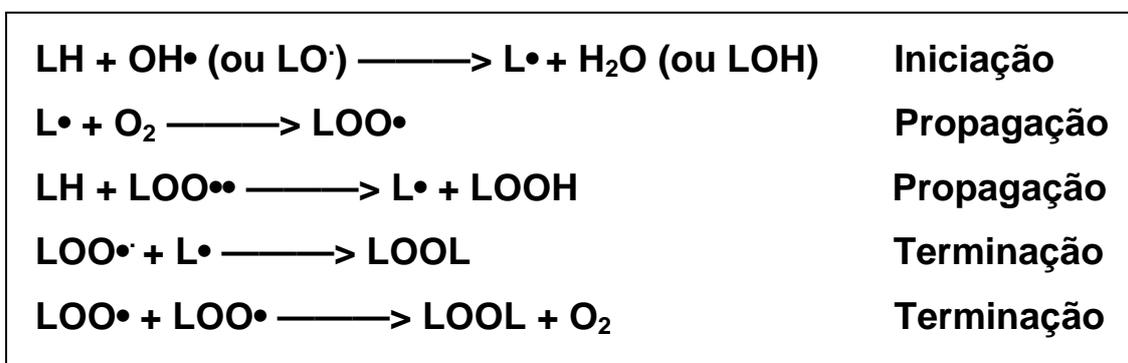


Figura 8: Lipoperoxidação de lipídeos pela reação de radicais livres.

Adaptado de Salvador e Henrique, 2004.

As reações acima se iniciam com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana celular. Tal seqüestro pode ser realizado pelo $OH\cdot$ ou pelo $LO\cdot$ (radical alcóxila), com conseqüente formação do $L\cdot$ (radical lipídico). Na primeira equação de propagação, o $L\cdot$ reage rapidamente com o O_2 , resultando em $LOO\cdot$ (radical peróxila), que, por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo polinsaturado, formando novamente o $L\cdot$ na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais ($L\cdot$ e $LOO\cdot$) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem a si próprios.

A lipoperoxidação pode ser catalisada por íons ferro, por conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais altamente reativos (alcóxila, $LO\cdot$ e peróxila, $LOO\cdot$), que, por sua vez, iniciam nova cadeia de reações, denominada ramificação (Borg et al., 1988).

O radical hidroxila ($OH\cdot$) é freqüentemente reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante da lipoperoxidação. Entretanto, estudos recentes indicam que o ferro também desempenha papel determinante na iniciação deste processo, sendo necessária uma relação equimolar $Fe^{+++} : Fe^{++}$ no meio, para que ocorra a lipoperoxidação (Gutteridge, 1988; Halliwell e Gutteridge, 1990).

1.6. Sistemas de Defesa Antioxidante

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

1.6.1. Glutathiona reduzida (GSH)

A glutathiona reduzida (GSH, L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular. Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, presente na cisteína. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, radiação e luz ultravioleta. Além disto, diminui a suscetibilidade à lesão renal decorrente da isquemia e reperfusão; atua como transportadora e reservatório da cisteína e participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação. Ainda, é requerida para a síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas (Shan, 1990; Meister e Anderson, 1983; Galleano e Puntarulo, 1995; Deneke e Fanburg, 1989).

1.6.2. Glutathiona-redutase (GR)

Após exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG (glutathiona oxidada) (Figura 9). A recuperação da GSH é feita pela enzima GR, uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular. Habitualmente, a reserva intracelular de GR é alta e somente uma grave deficiência desta enzima resultará em sinais

clínicos. A GR é uma flavoproteína dependente da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) e, portanto, também dependente da integridade da via das pentoses. Sob condições de diminuição do fornecimento de NADPH, como no jejum e na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), há prejuízo da função da GR (Shan, 1990; Ross e Moldeus, 1991; Hebbel, 1986; Van Asbeck et al., 1985; Matsubara et al., 1992; Gilbert e Mc Lean, 1990; Frisher e Ahmed, 1987).

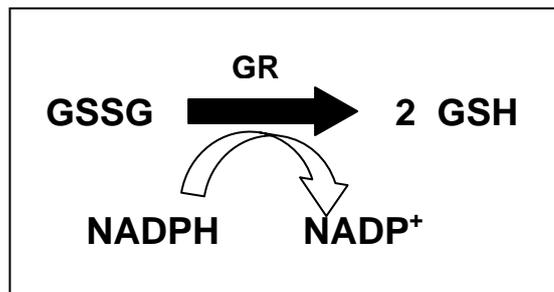


Figura 9: Reação de redução da GSSG pela GR, usando NADPH como co-enzima. Adaptado de Salvador e Henrique, 2004.

1.6.3. Glutationa-peroxidase (GPx)

A GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis às custas da conversão da GSH a GSSG (Figura 10). Embora a GPx tenha ação fundamentalmente citosólica, *in vitro* ela é capaz de reduzir hidroperóxidos de membrana (Shan, 1990; Hebbel, 1986). Interessantemente, tal enzima é inibida por alguns xenobióticos eletrofílicos, tais como metais pesados (Farina et al., 2005). Além disso, tal enzima parece ser inibida pelo composto OF malation (Brocardo et al., 2007). Este fenômeno parece ser responsável, ao menos em parte, pela peroxidação de lipídeos induzida pelo malation.



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

A razão entre GSH e GSSG em células normais é alta, pois existe um mecanismo de redução da GSSG que é catalisado pela enzima glutathiona redutase, conforme descrito anteriormente (Figuras 9 e 11).

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

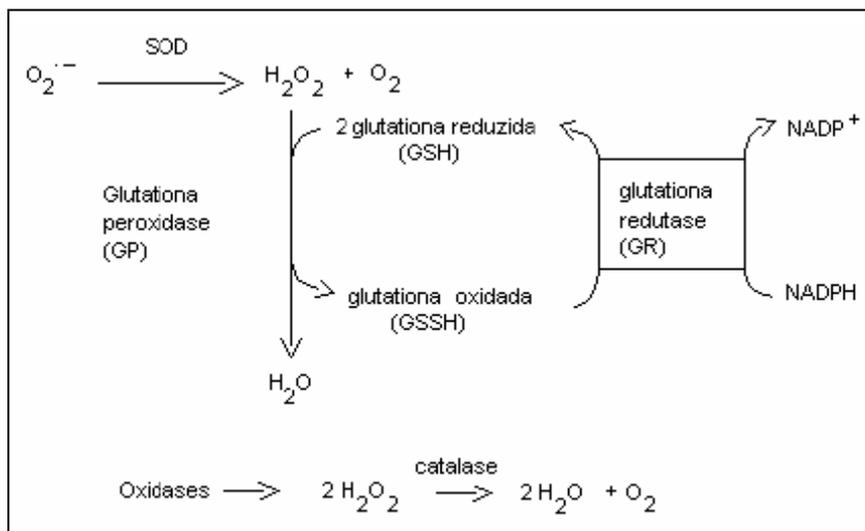


Figura 11: Mecanismo de defesa antioxidante. Adaptado de Possamai, 2005.

1.6.4. Catalase

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



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

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

1.6.5. Superóxido-dismutase (SOD)

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

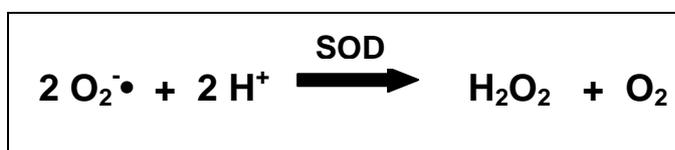


Figura 13: Reação de detoxificação de ERO promovida pela SOD (Andreazza et al., 2004)

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

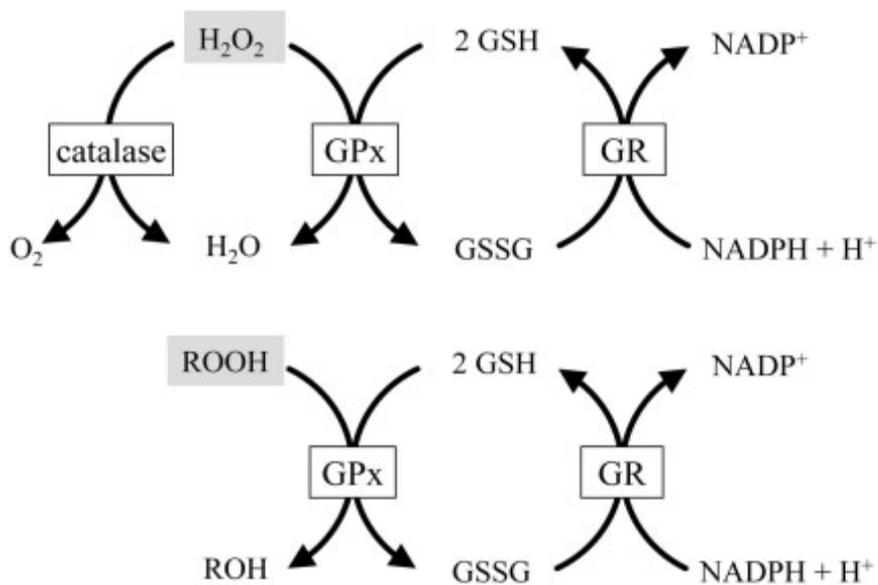


Figura 14: Representação esquemática da detoxificação de EROs por enzimas antioxidantes. Adaptado de Dringen et al., 2005.

Além dos antioxidantes citados, a vitamina E confere proteção à membrana celular por atuar como quelante dos oxidantes produzidos durante a lipoperoxidação. É um importante antioxidante lipofílico, mas esta função poderá estar limitada em situações de sobrecarga de ferro. O α -caroteno interage com as ERO especialmente quando ocorrem baixas tensões de O₂, enquanto que a vitamina E se mostra mais eficiente quando há altas tensões de O₂ no meio. A vitamina C, ou ascorbato, é um antioxidante hidrossolúvel que pode neutralizar diretamente as ERO; porém, pode funcionar como pró-oxidante quando em dose elevada, ou quando exposta ao metal, levando à lipoperoxidação (Hebbel, 1986).

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

1.6.6. Estresse Oxidativo

Na inativação de um agente antioxidante, poderá ocorrer produção de GSSG e depleção de GSH. Em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, haverá recuperação da GSH. Entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou

deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza o estresse oxidativo. Assim, a magnitude do estresse oxidativo pode ser monitorada pela razão GSSG/GSH (Halliwell, 1993)

O excesso de GSSG resulta em ambiente mais oxidante, que favorece a formação de pontes dissulfeto (-SS-) nas proteínas portadoras de grupamento tiol (-SH). As pontes dissulfeto oxidam estas proteínas, com prejuízo de suas funções. Esta oxidação é reversível às custas da ação de compostos antioxidantes, como a GSH (Gilbert e Mc Lean, 1990). Neste contexto, sabe-se que o estresse oxidativo está relacionado com muitas desordens neurológicas, tais como a doença de Alzheimer (Kedar, 2003; Meydani et al., 2001), Parkinson (Mariani et al., 2005), além de neurotoxicidade induzida pela exposição à xenobióticos, tais como os OFs (Kehrer, 1993).

1.7. Estresse Oxidativo versus Compostos Organofosforados

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

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

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

Alguns estudos têm demonstrado que a exposição ao malation aumenta os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúricos (TBARS), um parâmetro comumente utilizado para avaliar lipoperoxidação, em eritrócitos, fígado e cérebro de ratos. Outros estudos

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

2. JUSTIFICATIVA

Vários estudos mostram que o sistema nervoso central (SNC) em desenvolvimento é mais susceptível aos efeitos neurotóxicos de compostos OFs quando comparado com o SNC adulto (Costa et al., 2005; Slotkin et al., 2005). Neste contexto, sabe-se que compostos OFs podem ser excretados através do leite materno (Sanghi et al., 2003), o que poderia sugerir a contribuição da exposição lactacional a compostos OFs como causa de neurotoxicidade. Entretanto, a busca por trabalhos relacionados aos potenciais efeitos neurotóxicos do malation em modelos experimentais durante o período lactacional (pós-natal) demonstrou a escassez de trabalhos acerca deste tema na literatura científica. De fato, apesar das alterações neuroquímicas, neurocomportamentais e morfológicas serem bastante relatadas em estudos com modelos animais de exposição a OFs, não existem trabalhos acerca de efeitos neurotóxicos decorrentes da exposição lactacional ao composto OF malation.

Embora exista um consenso quanto ao tratamento terapêutico de emergência para ser empregado clinicamente em casos de intoxicação por compostos OFs, o qual se baseia na administração de uma droga anticolinérgica (geralmente a atropina) e oximas reativadoras da enzima AChE (geralmente a pralidoxima), a experiência clínica com pralidoxima não tem demonstrado eficiência nas intoxicações pelo composto malation (Sudakin et al., 2000) e o seu uso rotineiro tem sido questionado. Existe uma clara demanda por reativadores da enzima AChE de amplo espectro e com maior eficácia que os disponíveis clinicamente (Kassa, 2002). Dados recentes mostram que mudanças estruturais nesses reativadores têm cooperado para uma maior capacidade de reativação enzimática, a qual reflete positivamente na atenuação de sinais e sintomas neurotóxicos induzidas pelos compostos OFs (Kassa et al, 2006; Kassa e Kunesova, 2006).

Tendo em vista as informações acima citadas, parece de extrema importância uma melhor compreensão do potencial neurotóxico da exposição lactacional ao malation, já que compostos OFs podem ser excretados através do leite materno e que o período pós-natal de desenvolvimento cerebral rápido representa um momento crítico no que diz respeito ao desenvolvimento do sistema nervoso (Richardson & Chambers, 2003; Costa, 2006). Igualmente, tendo em vista a baixa eficácia de reativadores da enzima AChE após a exposição ao malation, estudos que busquem identificar novos compostos reativadores desta enzima, com maior capacidade de reativação, parecem ser de suma importância.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a potencial neurotoxicidade induzida pela exposição lactacional ao composto OF malation em camundongos. Além disso, avaliar o potencial efeito benéfico de duas oximas inéditas (K027 e K048) na reversão do efeito neurotóxico do malation sobre a enzima AChE e outros parâmetros bioquímicos em camundongos adultos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o efeito da exposição lactacional (pós-natal) ao malation sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase cerebral de camundongos genitoras e na respectiva prole;
- Avaliar o efeito da exposição lactacional (pós-natal) ao malation sobre variáveis bioquímicas relacionadas com o estresse oxidativo (atividade das enzimas glutationala peroxidase, glutationala redutase, níveis de glutationala e produtos de peroxidação lipídica) no cérebro de camundongos genitoras e na prole;
- Investigar a capacidade das oximas K027 e K048 em reverter à inibição enzimática da acetilcolinesterase do córtex pré-frontal provocada pela administração do malation em camundongos machos adultos;
- Verificar a contribuição das oximas K027 e K048 em prevenir os danos oxidativos induzidos pelo malation no córtex pré-frontal de camundongos machos adultos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes e Drogas:

Ácido tiobarbitúrico, Ácido 5,5 ditiobis 2 - nitrobenzóico, Comassie Blue, Albumina de soro bovino, Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida, Glutathione oxidada, Glutathione reductase, Glutathione reduzida, Peróxido de terbutila e Iodeto de Acetilcolina foram adquiridos da empresa Sigma (St. Louis, MO, USA). Ácido acético, Ácido clorídrico concentrado, Ácido tricloroacético, Fosfato de potássio dibásico, Fosfato de potássio monobásico foram adquiridos da empresa Reagen Quimibras (RJ, Brasil). Malation (95 % pureza) foi adquirido da empresa Dipil (Massaranduba, SC, Brasil). As oximas inéditas K027 e K048 foram gentilmente cedidas pelo Dr Kuca Kamil, da Universidade de Defesa e Faculdade Militar de Ciências da Saúde, República Tcheca.

4.2. Animais:

Foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas prenhas e machos adultos, com idade de 2 a 3 meses de idade, pesando entre 35 - 45 gramas, provenientes do Biotério Central da UFSC. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com ração e água *ad libitum*, em ambiente com temperatura controlada de 22 +/- 2 °C e ciclo claro/escuro 12:12 horas (7:00-19:00 h). Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob o protocolo número (313/CEUA; 23080.026023/2004-39/UFSC).

4.3. Tratamentos:

Todas as doses utilizadas no presente trabalho foram baseadas em trabalhos prévios na literatura (Brocardo et al., 2004, Kuca et al., 2004).

4.3.1. Tratamento 1: Efeito da exposição lactacional (pós-natal) ao malation sobre a atividade da enzima AChE e variáveis bioquímicas relacionadas com o estresse oxidativo no cérebro de camundongos genitoras e na respectiva prole.

No primeiro dia após o nascimento (1º dia pós-natal), vinte e oito camundongos fêmeas, juntamente com suas proles, foram alocados em quatro grupos (controle, malation 20 mg/kg, malation 60 mg/kg e 200 mg/kg) de 7 animais cada. A prole (8 animais por

ninhada) foi mantida com suas genitoras, as quais foram expostas diariamente ao malation - injeções subcutâneas nas doses de 20, 60 ou 200 mg/kg (diluído em salina - NaCl 0,9%), durante o período lactacional, que corresponde do 1º ao 21º dia pós-natal. As genitoras do grupo controle receberam injeções diárias de salina (NaCl 0,9%), 10 mL/kg. A via de exposição da prole ao malation foi exclusivamente através do leite materno. Após o tratamento (dia 22 pós-natal), um animal de cada prole e as respectivas genitoras foram sacrificados por decapitação e o tecido cerebral foi utilizado para a preparação das amostras para as análises bioquímicas.

4.3.2. Tratamento 2: Papel das oximas inéditas K027 e K048 sobre o efeito do malation na atividade da enzima AChE e parâmetros relacionados ao estresse oxidativo em córtex pré-frontal de camundongos.

Sessenta animais (machos adultos) foram agrupados em cinco grupos com sete animais cada. O tratamento consistiu em injeções subcutâneas de salina (NaCl 0,9% - 10 mL/kg) ao grupo controle. Os demais grupos receberam injeções subcutâneas de malation na dose de 1 g/kg (dissolvido em salina). Três dos quatro grupos expostos ao malation receberam também uma injeção intraperitoneal de sulfato de atropina (10 mg/kg). Destes, um grupo recebeu ainda uma injeção intraperitoneal da oxima K027 (150 mg/kg; ¼ da DL₅₀ - Kuca et al., 2003) e outro grupo recebeu ainda uma injeção intraperitoneal da oxima K048 (180 mg/kg; ¼ da DL₅₀ - Kuca et al., 2003). Passadas 3 ou 24 horas após a administração das substâncias, os animais foram decapitados e o córtex pré-frontal foi utilizado para a preparação das amostras para as análises bioquímicas. Ressalta-se que ambas oximas (K027 e K048) são inéditas e foram sintetizadas e gentilmente doadas pelo Dr. K. Kuca da Universidade de Defesa e Faculdade Militar de Ciências da Saúde, República Tcheca.

4.4. Análises Bioquímicas:

4.4.1. Preparação das Amostras Teciduais: Após a decapitação dos animais, as estruturas cerebrais (o encéfalo para o tratamento 1; córtex pré-frontal para o tratamento 2) foram homogeneizadas em 5 volumes de tampão HEPES 25 mM, pH 7,4 para posterior dosagens bioquímicas. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 x g por 30 minutos a 4 graus centígrados objetivando a obtenção do sobrenadante (utilizado na determinação das atividades de enzimas antioxidantes, níveis de glutathiona e substâncias reativas com o

ácido tiobarbitúrico) e do pellet, o qual foi ressuspenso em Tampão fosfato de potássio (TFK) 0,1 M, pH 8,0 (utilizado na determinação da atividade da enzima AChE). No mesmo dia da preparação das amostras teciduais, foram avaliados os níveis de glutathione e substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico. O restante do homogenato foi congelado à temperatura – 20° C por cinco dias, e então foram determinadas as atividades da AChE e de enzimas antioxidantes.

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

4.4.3. Lipoperoxidação - Método Espectrofotométrico TBARS-MDA: A lipoperoxidação foi estimada pela detecção dos derivados dos lipoperóxidos, através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como malonildialdeído (MDA) (Ohkawa et al; 1979).

4.5. Parâmetros Antioxidantes:

Os tecidos cerebrais foram homogeneizados conforme descrito no item 4.3.1. Para as dosagens das enzimas antioxidantes, foi utilizado o sobrenadante das amostras.

4.5.1. Avaliação da Glutathione Reduzida (NPSH): Os grupamentos tióis não-proteicos (NPSH) nas amostras foram determinados usando reagente de Ellman, 5,5-ditiobis 2-nitrobenzoato (DTNB). A amostra (100 µL do sobrenadante) foi misturada com 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10%. Após, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 5 min. Os NPSH foram quantificados pela adição de 150 µL do sobrenadante ácido/desproteinizado em 425 µL de TFK 1 M, pH 7,0 e 25 µL de DTNB 10 mM. O monitoramento da concentração dos grupos tióis foi avaliando através da medida da absorbância em 412 nm devido ao produto resultante da reação de NPSH (90% GSH) com DTNB, que gerou o TNB de cor amarela (Ellman, 1959).

4.5.2. Avaliação da atividade da Glutathione Peroxidase (GPx): A GPx catalisa a redução de H₂O₂, bem como outros lipoperóxidos, utilizando a glutathione reduzida (GSH) como co-

substrato e produzindo glutatona oxidada (GSSG). A GSSG é reduzida pela glutatona redutase com o consumo de NADPH, que foi mensurado através da leitura em espectrofotômetro em 340 nm (Wendel, 1981).

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

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

4.6. Análise Estatística: Foi efetuada a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste post-hoc de Duncan, quando apropriado. Testes de correlação (correlação de Pearson) também foram efetuados. As diferenças entre as médias foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Os resultados do presente trabalho foram subdivididos em dois módulos.

O módulo 1 representa dados obtidos do Tratamento 1 (Efeito da exposição lactacional (pós-natal) ao malation sobre a atividade da enzima AChE e variáveis bioquímicas relacionadas com o estresse oxidativo no cérebro de camundongos (genitoras e a respectiva prole). Estes também encontram-se disponíveis na literatura sob forma de artigo na Revista Neurotoxicology: da Silva AP, Meotti FC, Santos AR, Farina M. **Lactational exposure to malathion inhibits brain acetylcholinesterase in mice.** Neurotoxicology. 2006; 27(6): 1101-1105 (Anexo 1).

O módulo 2 exhibe os dados do Tratamento 2 (Papel das oximas inéditas K027 e K048 sobre o efeito do malation na atividade da enzima AChE e parâmetros relacionados ao estresse oxidativo em córtex pré-frontal de camundongos). Estes dados também foram utilizados para a preparação de um artigo científico intitulado: **Temporal effects of newly developed oximes (K027, K048) on malathion-induced acetylcholinesterase inhibition and lipid peroxidation in mouse prefrontal cortex.** Este também foi enviado para a revista Neurotoxicology e está sendo avaliado para possível publicação (Anexo 2).

5.1. Módulo 1: Efeito da exposição lactacional (pós-natal) ao malation sobre a atividade da enzima AChE e variáveis bioquímicas relacionadas com o estresse oxidativo no cérebro de camundongos genitoras e na respectiva prole

A Figura 15 mostra o efeito da exposição direta de fêmeas lactentes ao malation sobre a atividade da enzima AChE cerebral de camundongos (genitoras e na respectiva prole). A exposição ao malation causou uma inibição significativa da atividade da AChE no cérebro das genitoras, porém, somente na dose mais alta (200 mg/kg). A atividade da AChE também foi inibida na prole, no período em que a genitora estava sendo diretamente exposta ao malation. Entretanto, o efeito inibitório na atividade da enzima AChE cerebral é revelado mesmo quando as genitoras foram expostas à dose mais baixas do composto (20 mg/kg). Outra observação relevante é que o efeito da exposição lactacional ao malation sobre a atividade da AChE cerebral foi dose-dependente (Figura 15). De fato, houve significativas correlações negativas entre a dose de malation versus a atividade da enzima AChE tanto nos filhotes (Coeficiente de Pearson = -0.499, $p = 0.006$) quanto nas genitoras (Coeficiente de Pearson = -0.616, $p = 0.019$).

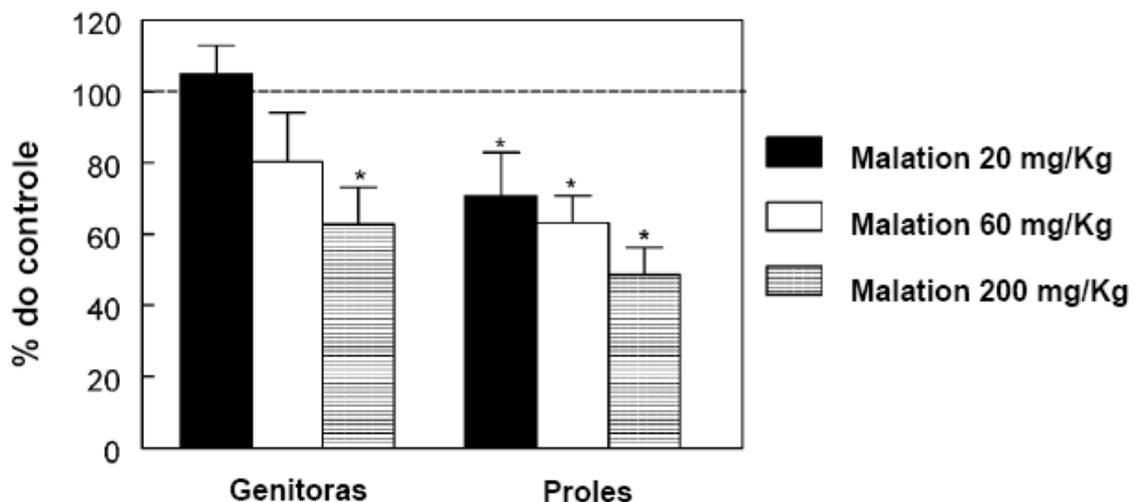


Figura 15: Efeito da exposição direta de fêmeas lactentes ao malation sobre a atividade da enzima AChE cerebral de camundongos (genitoras e na respectiva prole). A atividade da AChE está expressa como por cento do controle. Todos os dados estão representados como média \pm erro padrão, exceto do grupo controle, no qual a média esta representada como linha traçada (100%). A atividade da acetilcolinesterase cerebral das mães e prole foram 49,1 e 60,3 nmol/min/mg de proteína, respectivamente.

Quando se avaliou exposição direta de fêmeas lactentes ao malation sobre variáveis bioquímicas relacionadas ao estresse oxidativo (atividade das enzimas GPx, GR, níveis de glutatona e produtos da peroxidação lipídica) no cérebro das genitoras e da prole, não foi possível observar diferença significativa nos parâmetros avaliados, os quais estão expostos na Tabela 2.

GENITORAS				
	GPx	GR	GSH	TBARS
Controle	57,1 (2,8)	61,7 (2,8)	76,7 (2,2)	0,159 (0,01)
Malation 20 mg/ Kg	53,2 (5,1)	56,7 (1,7)	73,4 (2,0)	0,156 (0,007)
Malation 60 mg/ Kg	56,4 (7,1)	59,4 (3,0)	78,7 (2,7)	0,143 (0,01)
Malation 200 mg/ Kg	55,2 (3,8)	56,9 (3,2)	72,3 (3,1)	0,153 (0,01)
PROLES				
	GPx	GR	GSH	TBARS
Controle	65,8 (3,4)	59,7 (1,7)	72,9 (3,8)	0,218 (0,04)
Malation 20 mg/ Kg	60,3 (7,1)	58,9 (3,7)	73,9 (4,8)	0,212 (0,03)
Malation 60 mg/ Kg	63,7 (7,5)	59,7 (6,3)	77,3 (6,7)	0,174 (0,01)
Malation 200 mg/ Kg	60,3 (2,1)	52,6 (2,7)	74,2 (4,8)	0,196 (0,02)

Tabela 2: Efeito da exposição direta de fêmeas lactentes ao malation sobre variáveis bioquímicas relacionadas ao estresse oxidativo no cérebro de camundongos (genitoras e na respectiva prole). As atividades das enzimas estão representadas como nmol de NADPH oxidado/mg proteína/min. Os níveis de SHNP estão expressos como nmol/mg proteína. A peroxidação de lipídeos (níveis de TBARS) estão expressos como nmol de malondialdeído (MDA)/mg proteína. Os dados são representados como média com seus respectivos erros padrões entre parênteses. Dois camundongos lactentes foram randomicamente selecionados de cada ninhada. Mães ($n = 5$ por grupos). Prole ($n = 5$ ninhadas por grupo; dois animais por ninhada).

5.2. Módulo 2: Papel das oximas inéditas K027 e K048 sobre o efeito do malation na atividade da enzima acetilcolinesterase e variáveis bioquímicas relacionadas com o estresse oxidativo em córtex pré-frontal de camundongos

Primeiramente, investigamos a capacidade das oximas K027 e K048 (em combinação com sulfato de atropina) em reverter à inibição da enzima AChE no córtex pré-frontal de camundongos, em 3 h e 24 h após a exposição ao malation. Os dados obtidos estão expressos na Figura 16.

A atividade da AChE cortical foi consideravelmente inibida pelo malation (em torno de 55%) em 3 h (Figura 16A) e tal inibição se manteve até 24 h (Figura 16B) depois da exposição ao malation. Embora nem a atropina nem as oximas tenham sido capazes de eliminar a inibição da AChE cortical provocada pelo malation em 3 h (Figura 16A) após o tratamento, a oxima K027 reduziu completamente o efeito inibitório do malation na atividade da AChE no córtex pré-frontal em 24 h (Figura 16B) após o envenenamento. A oxima K048 (em combinação com a atropina) diminuiu significativamente a inibição da AChE induzida pelo malation em 24 h (Figura 16B) após a intoxicação, mas esta não foi capaz de reduzir completamente a inibição da AChE neste tempo.

Uma vez verificada a capacidade reversora das oximas K027 e K048 na inibição da enzima AChE, restou ainda uma questão a ser investigada: a contribuição dessas oximas frente à potencial peroxidação lipídica induzida pelo malation no córtex pré-frontal. Isto também foi realizado em 3 h (Figura 17A) e 24 h (Figura 17B) após intoxicação dos camundongos.

O malation causou um aumento significativo na peroxidação de lipídeos no córtex pré-frontal, porém, este efeito foi observado somente em 24 h após a administração do malation (Figure 17B). A oxima K027, que reativou completamente a enzima AChE inibida pelo malation em 24 h após intoxicação, foi capaz de diminuir notavelmente a peroxidação lipídica neste mesmo tempo (Figure 17B).

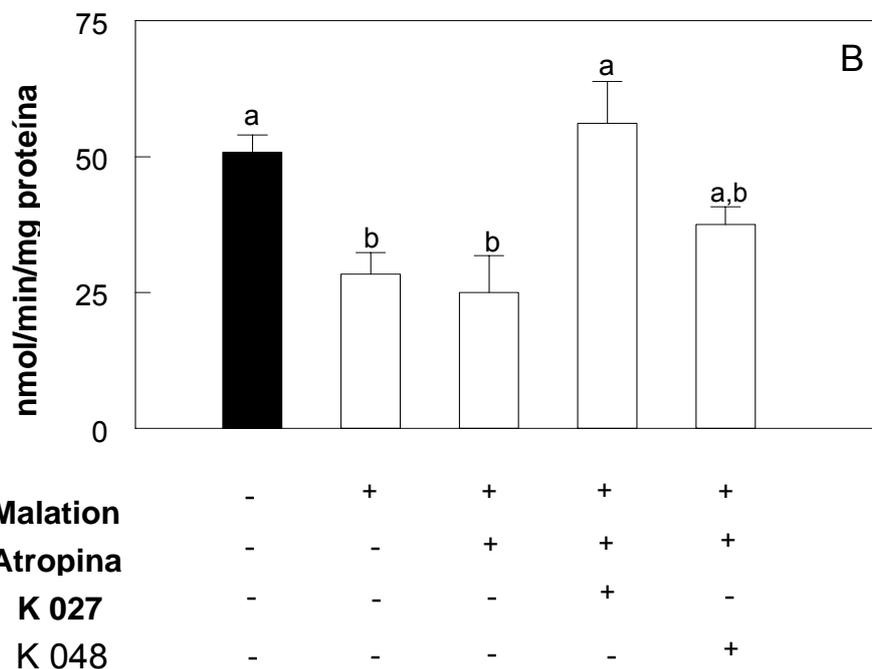
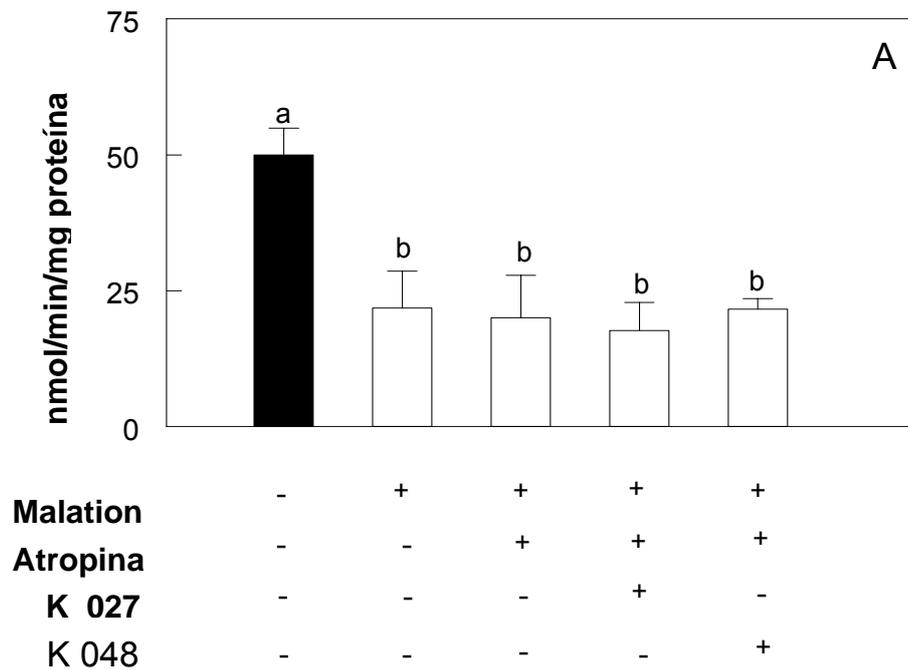
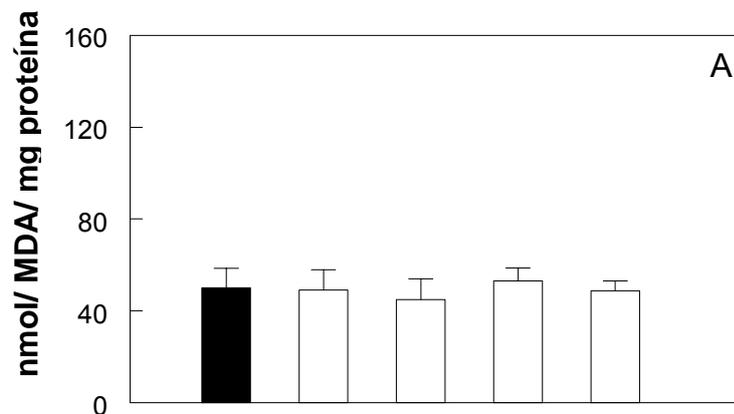
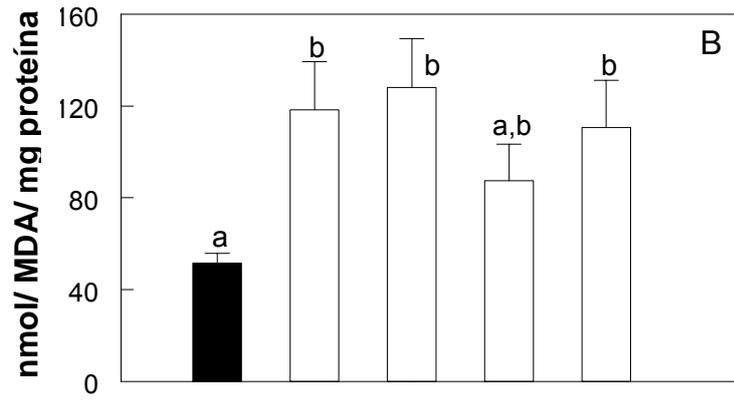


Figura 16: Efeito do tratamento com malation, atropina e das oximas K 027 e K 048 sobre a atividade AChE no córtex pré-frontal de camundongos. Os animais foram sacrificados em 3 h (A) ou 24 h (B) após a intoxicação com os compostos. Atividade da AChE está expressa em nmol de substrato hidrolisado/min/mg de proteína e representada como média \pm erro padrão (n = 6 animais por grupo). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$) pela análise de variância, seguida do Teste de Duncan.



Malation	-	+	+	+	+
Atropina	-	-	+	+	+
K 027	-	-	-	+	-
K 048	-	-	-	-	+



Malation	-	+	+	+	+
Atropina	-	-	+	+	+
K 027	-	-	-	+	-
K 048	-	-	-	-	+

Figura 17: Efeito do tratamento com malation, atropina e das oximas K 027 e K 048 sobre a peroxidação lipídica no córtex pré-frontal de camundongos. Os animais foram sacrificados em 3 h (A) ou 24 h (B) após tratamento com os compostos. A peroxidação lipídica foi medida através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os dados foram expressos em nmol de malondialdeído (MDA)/mg de proteína e representados como média e erro padrão (n = 6 animais por grupo). Letras diferentes indicam diferença significativa (p < 0.05) pela análise de variância, seguida do Teste de Duncan.

Não foi possível verificar diferença significativa nos parâmetros bioquímicos, acerca do Sistema de Enzimas Antioxidantes no córtex pré-frontal em 3 horas bem como nas 24 horas após intoxicações de animais com malation (Tabela 3).

Tempo	Grupos	GSH	GPx	GR
3 h	Controle	42,7 ± 3,5	58,0 ± 6,7	89,9 ± 3,2
	Malation	48,6 ± 4,6	45,6 ± 9,9	97,4 ± 5,8
	Malation + Atropina	40,4 ± 4,5	44,3 ± 3,5	85,4 ± 4,4
	Malation + Atropina + Oxima K027	45,7 ± 4,3	53,1 ± 5,7	91,2 ± 3,0
	Malation + Atropina + Oxima K048	41,9 ± 2,2	44,9 ± 2,8	78,8 ± 7,3
24 h	Controle	48,2 ± 5,0	43,5 ± 3,5	85,5 ± 7,9
	Malation	42,9 ± 6,3	39,9 ± 3,4	82,3 ± 1,8
	Malation + Atropina	42,0 ± 4,3	41,5 ± 5,5	82,4 ± 4,4
	Malation + Atropina + Oxima K027	48,4 ± 2,0	48,4 ± 3,6	86,3 ± 3,7
	Malation + Atropina + Oxima K048	39,2 ± 3,7	40,3 ± 1,3	82,8 ± 2,5

Tabela 3: Efeito do malation, atropina e as oximas K027 e K048 sobre níveis de glutaciona e atividade das glutacionas redutase e peroxidase do córtex pré-frontal de camundongos expostos ao malation. Os animais foram sacrificados em 3 h (A) ou 24 h (B) após tratamento com malation. Os níveis de glutaciona (SHNP) estão expressos em nmol/mg de proteína. As atividades das glutacionas: peroxidase (GPx) e redutase (GR) estão expressas em nmol de NADPH oxidado/ min/ mg de proteína. Os dados estão expressos por média e erro padrão (n = 6 animais por grupo).

6. DISCUSSÃO

6.1. Módulo 1: Efeito da exposição lactacional (pós-natal) ao malation sobre a atividade da enzima AChE e variáveis bioquímicas relacionadas com o estresse oxidativo no cérebro de camundongos (genitoras e respectiva prole).

Um dos temas prioritários em saúde pública tem sido a proteção de crianças aos efeitos adversos de toxicantes ambientais à saúde. Desta forma, pesquisadores têm buscado entender os fatores específicos que podem promover uma maior susceptibilidade de organismos ou sistemas em desenvolvimento (imaturos) aos efeitos deletérios de toxicantes (Costa, 2006).

No caso dos compostos OFs, dados experimentais estabelecem que a toxicidade aguda aos OFs (atribuída a inibição da AChE) é influenciada pela idade, ou seja, animais jovens são mais sensíveis aos efeitos deletérios dos OFs. Esta sensibilidade é bem evidente, sobretudo, no período perinatal de desenvolvimento (Slotkin et al., 2006). De fato, neste período, animais expostos aos OFs apresentaram pouco ou nenhuma inibição da AChE e, mesmo assim, pode ocorrer o comprometimento em eventos bioquímicos (replicação do DNA, sobrevivência neuronal, proliferação da célula glial) e comportamentais (atividade locomotora, funções cognitivas) (Bellamy, 2003; Landrigan e Garg, 2002; Costa, 2005).

Essa relação de neurotoxicidade induzida por OFs e as possíveis alterações a saúde em longo prazo pode ser melhor visualizada e compreendida através de um estudo realizado num grupo de mulheres que, em algum momento da suas vidas, se expuseram a pesticidas e apresentaram resíduos desses compostos no leite oferecido aos seus bebês (período de lactação) (UNEP; 2002).

Associado a esse estudo, outros pesquisadores também afirmam que a exposição perinatal aos pesticidas OF causa neurotoxicidade em animais (Chanda et al., 1995; Slotkin et al., 2005). Além disso, tem sido relatado que pesticidas OFs podem ser excretados no leite (Salas et al., 2003; Sanghi et al., 2003; Battu et al., 2004)

Tendo em vista o volume ainda restrito de informações acerca da contribuição exclusiva da exposição lactacional ao pesticida OF malation e as conseqüências neurotóxicas na prole, nosso trabalho procurou desenvolver um protocolo experimental

capaz de oferecer uma melhor compreensão dos efeitos da exposição lactacional ao malation nesse período crítico do desenvolvimento (Cohen et al., 2000; Makri et al., 2004).

O resultado do nosso estudo constatou a incidência de neurotoxicidade (inibição da enzima AChE) como consequência da exposição lactacional ao malation em camundongos. Do ponto de vista toxicológico, estes resultados revelaram um importante achado, pois a exposição lactacional pode, *per se*, ser responsável pelos danos deletérios na prole, sem a necessidade de intoxicação prévia *in útero*.

Nos últimos anos, parece haver um maior volume de estudos relacionando a elevada vulnerabilidade de mulheres grávidas e lactantes e a exposição aos pesticidas (Hill et al., 1995; Whyatt et al., 2002; Berkowitz et al., 2003). Neste contexto, alguns estudos sugerem que famílias residentes em regiões rurais e trabalhadores rurais estão mais expostos, se comparado a outras populações (Simcox et al., 1999; McCauley et al., 2001; Curl et al., 2002; Fenske et al., 2002). Essas evidências possuem relação com nossos dados experimentais, que comprovam a ocorrência de neurotoxicidade após a exposição a um pesticida OF, chamando a atenção das mulheres gestantes sobre a exposição ao OF, não somente durante a gestação, mas também no período lactacional.

Sabe-se que a inibição da AChE cerebral pelos pesticidas OF leva ao acúmulo de ACh na fenda sináptica, desencadeando a hiperatividade das vias colinérgicas. Visto que a acetilcolina possui um importante papel trófico no desenvolvimento cerebral, supomos que a exposição aos OFs durante o período de desenvolvimento possa interferir com a função deste neurotransmissor levando a anormalidades no desenvolvimento neuronal devidas a mudanças temporais ou de intensidade dos fenômenos neurotróficos (Slotkin, 2004a). Além disso, sabe-se que pesticidas OF possuem efeitos diretos sobre processos celulares que são únicos ao desenvolvimento cerebral, e que estes efeitos não estão necessariamente relacionados à inibição da AChE (Slotkin, 2004b).

Outra importante constatação do nosso estudo é que o efeito inibitório do malation sobre a atividade da AChE cerebral foi mais intenso em camundongos da prole quando comparado com suas respectivas genitoras. De fato, embora as genitoras tenham sido expostas diretamente a injeções subcutâneas de malation, somente a dose mais alta (200 mg/Kg) foi capaz de causar inibição na AChE cerebral. Entretanto, na prole lactacionalmente expostas ao malation, este efeito inibitório já foi observado mesmo nos animais cujas genitoras foram expostas a baixas doses de malation (20 mg/Kg). O motivo pelo qual o cérebro imaturo apresenta alta sensibilidade aos pesticidas OFs quando

comparado com adultos não está completamente resolvido. Entretanto, evidências sugerem que os organismos em desenvolvimento se recuperam mais facilmente da inibição da enzima AChE do que em adultos e este fenômeno parece estar relacionado à rápida síntese de novas moléculas de acetilcolinesterase (Pope e Chakraborti, 1992; Pope et al., 1991; Song et al., 1997).

Estudos recentes têm sugerido que os OFs têm outros alvos moleculares de ação além da enzima AChE (Ward e Mundy, 1996, Pope, 1999). Tal fato é evidenciado pela importante ação dos OFs em induzir estresse oxidativo (Banerjee et al., 1999), através da geração de radicais livres e alterações no sistema de enzimas antioxidantes (Almeida et al., 1997; El- Sharkawy et al., 1994).

Em animais, bem como em humanos, existem mecanismos específicos para reparar danos celulares promovidos pelo estresse oxidativo após exposição a agentes tóxicos. O principal mecanismo de defesa é o enzimático, representado pela superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, tentando primeiramente combater os radicais livres, e depois o estresse oxidativo. Está claramente demonstrado na literatura que a exposição ao malation e outros OF, atinge alvos alternativos como o sistema antioxidante do cérebro, fígado, eritrócitos (Bagchi et al., 1995; Srikanth e Seth, 1990; Pedrajas et al., 1995; Ahmed et al., 2000; John et al., 2001; Akhgari et al., 2003; Hazarika et al., 2003), levando ao desbalanço no sistema, contribuindo para a toxicidade não-colinérgica dos OFs.

Nesse trabalho, mensuramos a atividade da GPx e GR, os níveis de glutathione e TBARS (peroxidação lipídica) na tentativa de avaliar o grau de dano oxidativo imposto pela exposição lactacional ao malation. Porém, não identificamos mudanças significativas nesses parâmetros tanto no cérebro de camundongos genitoras quanto na prole.

A relação entre estresse oxidativo e toxicidade induzida pelos pesticidas OFs ainda é tema de debate: há alguns estudos contraditórios (Srikanth and Seth, 1990; Pedrajas et al., 1995; Ahmed et al., 2000; John et al., 2001; Akhgari et al., 2003; Hazarika et al., 2003). Resultados divergentes podem estar relacionados a diferentes compostos pesticidas OFs e a diferentes regimes de exposição aplicados, que se referem principalmente a diferenças de doses, diferenças nos períodos de administração e a diferenças de idades dos animais no momentos de exposição.

Fortunato e colaboradores (2006) reforçaram o conceito vigente na literatura que a exposição ao malation promove a peroxidação lipídica; os autores apontaram aumento nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) tanto em animais expostos

ao malation agudamente quanto cronicamente. Um outro estudo, conduzido por Delgado (2006), demonstrou que ratos expostos sub-agudamente ao malation apresentaram alterações nos níveis de TBARS em diferentes regiões cerebrais como hipocampo e estriado. Slotkin e colaboradores (2005) utilizaram protocolos experimentais *in vitro* para avaliar os efeitos da exposição lactacional a outro OF (clorpirifos) sobre a peroxidação lipídica. Neste estudo, os autores verificaram um aumento nos níveis de peroxidação lipídica no encéfalo de ratos prole.

Em relação à exposição lactacional a xenobióticos, além dos inseticidas OFs, outros compostos de grande toxicidade ambiental tem sido objeto de estudo quanto a toxicidade para organismos em desenvolvimento. Dentre eles, o mercúrio possui significativa importância. Por meio de experimentos em animais, nosso grupo tem apresentado que a exposição lactacional ao metilmercúrio, um neurotóxico ambiental bem conhecido, alterou variáveis bioquímicas relacionadas ao estresse oxidativo no cerebelo de camundongos (Franco et al., 2006); os mesmos achados foram observados no estudo conduzido por Manfroi e seus colaboradores (2004). Paralelamente, estudos em humanos revelam que crianças expostas a metilmercúrio durante o período perinatal demonstraram impactos adversos sobre a inteligência e desempenho reduzido nas áreas de linguagem, atenção e memória (Grigg, 2004).

Ainda em relação à exposição lactacional a xenobióticos, o composto tetraclorodibenzodioxina (TCDD), representante mais conhecido do grupo das dioxinas, tem recebido grande atenção. Este composto é um contaminante ambiental capaz de se acumular no tecido adiposo dos animais e capaz de causar dano aos organismos em desenvolvimento. Investigações ao TCDD tem revelado sua capacidade em aumentar os níveis de EROs na prole de ratos expostos lactacionalmente a esses compostos (Slezak et al., 2002).

Em resumo, o presente módulo de resultados (Módulo 1) demonstra que a exposição de camundongos lactantes ao malation durante o período de lactação inibe a atividade da AChE cerebral na prole cuja única forma de alimentação é através do leite materno. Esses dados são extremamente importantes porque a inibição da AChE causa hiperatividade colinérgica, a qual pode comprometer as ações neurotróficas durante o desenvolvimento. Levando em consideração que pesticidas OFs (inclusive malation) são excretados no leite humano, o presente resultado torna-se relevante em termos de saúde humana.

6.2. Módulo 2: Papel das oximas inéditas K027 e K048 sobre o efeito do malation na atividade da enzima acetilcolinesterase e variáveis bioquímicas relacionadas com o estresse oxidativo em córtex pré-frontal de camundongos.

Segundo alguns dados estatísticos, o Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo, tanto de uso domésticos como de uso agrícola. Neste contexto, acredita-se que a falta de controle no uso destas substâncias tóxicas, somada com o desconhecimento da população a cerca dos riscos e perigos à saúde, contribui para os dados alarmantes publicados pelo CIT, onde o malation tem sido destaque no registro de intoxicações humanas em Santa Catarina (Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, 2002; CIT/SC, 2005).

O tratamento padrão oferecido em âmbito hospitalar aos intoxicados por OFs consiste na combinação de drogas anticolinérgicas (atropina) e reativadores da enzima AChE (oximas) (Rusyniak e Nañagas, 2004).

Ainda que amplamente utilizadas clinicamente, as oximas têm recebido questionamentos quanto ao seu uso em todos os tratamentos de intoxicações por diferentes OFs. De fato, sua eficácia nos tratamentos de intoxicações OFs dependem do composto, não sendo igual para todos os OFs, o que torna seu uso, algumas vezes, controverso (Quinby e Wash, 1964; Willems et al., 1993; Bardin et al., 1994, Rotenberg, 1995, Dawson et al., 1997, Thiermann et al., 1999).

Contudo, grande parte dos pesquisadores assume que, atualmente, não existe uma oxima de amplo espectro capaz de contribuir para o tratamento e reversão da síndrome determinada pela intoxicação por diferentes OFs. Nesse sentido, esforços estão sendo direcionados no desenvolvimento de novas moléculas (oximas) visando uma melhor capacidade de reativação enzimática para atenuar sinais e sintomas neurotóxicos induzidos pelos compostos OFs (Kassa e Kunesova, 2006).

Estudos apontam que o tratamento antídoto da intoxicação ao malation não é suficientemente efetivo (Sudakin et al., 2000). De fato, há evidências clínicas e bioquímicas que a pralidoxima, uma oxima amplamente usada em intoxicações por OF, não é capaz de reativar a AChE inibida pelo malation (Ganendran e Balabaskaran, 1976). Portanto há uma clara demanda de reativadores da AChE mais efetivos em comparação com as oximas disponíveis atualmente (van Helden et al., 1996; Kassa, 2002; Peter et al., 2006). Nossos resultados demonstraram claramente que ambas oximas da série K (Desenvolvidas por

Kuka no Departamento de Toxicologia da Faculdade Militar de Ciências da Saúde - República Tcheca) (Kuca et al., 2003a,b), nomeadas K027 e K048, foram capazes de reativar a enzima AChE de córtex pré-frontal de camundongos inibida após a exposição aguda ao malation.

Ainda que as oximas K027 e K048 representem estruturas químicas intimamente relacionadas, a K027 foi um reativador da AChE marcadamente mais efetivo do que a oxima K048. De fato, a K027 reativou completamente a AChE inibida pelo malation em 24 horas após a exposição ao pesticida, enquanto que a K048 reativou parcialmente a AChE nesse momento. Tal dado é extremamente importante porque apontam para estas oximas assimétricas da série K como compostos promissores para estudos farmacológicos sobre a reativação da AChE após intoxicação com malation.

Kassa e Kunesova (2006), em um estudo comparativo do efeito neuroprotetor das oximas inéditas (K027 e K048) com as oximas disponíveis comercialmente (obidoxima e HI-6), demonstraram que as oximas inéditas K027 e K048 foram mais eficazes em eliminar a neurotoxicidade provocada pelo agente tabun em ratos quando comparadas às oximas usadas rotineiramente na clínica (obidoxima e HI-6). Num segundo passo, os autores investigaram o potencial reativador da AChE entre as duas oximas inéditas, K027 e K048, e a oxima K048 foi mais eficaz em reativar a enzima inibida pelo tabun quando comparada com a K027. Porém, as duas oximas inéditas tanto K048 quanto a K027 se mostraram como sendo ferramentas promissoras para o tratamento de intoxicação por tabun, pois a diferença de reativação da AChE entre as duas foi mínima, e as duas mereceram ser consideradas.

Protocolos experimentais *in vitro* (Petroianu et al., 2005) investigaram o potencial de diferentes oximas (K027, K033, K048, BI-6 e metoxima) em reativar a AChE inibida pelo OF paraoxon em células sanguíneas. Os resultados do grupo mostraram que as oximas K027 e K048 tiveram maior ação farmacológica em reativar a enzima inibida pelo paraoxon quando comparadas com as demais oximas avaliadas.

A eficiência de reativação pelas oximas é atribuída principalmente à velocidade de ataque nucleofílico aos organofosforados, mas a eficiência varia com a estrutura química dos compostos OFs, a origem da enzima, a estrutura química da oxima e a taxa de dealquilação pós-inibitória, conhecida como envelhecimento enzimático (Worek et al., 2002; Kovarik et al., 2004). O envelhecimento enzimático é um processo que se origina da cisão da ligação P-O, resultando na formação de um complexo colinesterase–fosforil, carregado

negativamente (Elhanany et al., 2001), impedindo o ataque nucleofílico por uma oxima. Um interessante achado do nosso estudo foi o efeito temporal das oximas em reativar AChE inibida pelo malation no córtex pré-frontal de camundongos. Ainda que as oximas não tenham tido efeito reativador em 3 horas, houve reativação completa da atividade AChE no córtex pré-frontal dos camundongos 24 horas após a intoxicação com malation e o tratamento com a K027. Isto indica que a ação desta oxima parece ser suficientemente rápida para evitar o envelhecimento da enzima AChE. Do ponto de vista farmacológico, esta informação é interessante e estes estão de acordo com estudos prévios que têm apresentado redução na letalidade e neurotoxicidade em animais tratados com oxima K027 expostos a OFs (Kassa, 2006; Kassa & Kunesova, 2006).

Embora os mecanismos de toxicidade dos OFs não sejam totalmente elucidados, sabe-se que as EROs possuem um importante papel na toxicidade desses compostos (Almeida et al., 1997; Ray e Banerjee, 1998). Isso porque os radicais livres possuem um grande potencial deletério, induzindo dano oxidativo. O malation pode agir diretamente ou indiretamente, modificando a capacidade das defesas antioxidantes (Banerjee et al., 1999).

Há evidências que a inibição da atividade da AChE pelo malation está acompanhada pela indução de estresse oxidativo no plasma em ratos submetidos à uma alimentação misturada com malation (Abdollahi et al., 2004).

A respeito disso, Fortunato e seus colaboradores (2006b) têm proposto que o estresse oxidativo induzido pelo malation nos cérebros de ratos está associado com a modulação das enzimas antioxidantes: catalase e superóxido dismutase. Além disso, estes têm demonstrado que o OF malation aumenta a formação de ânion superóxido na mitocôndria de determinadas regiões cerebrais de ratos (Delgado et al., 2006).

Em nossos experimentos, também foi observado o dano oxidativo nos lipídeos do córtex pré-frontal de camundongos expostos ao malation. De acordo com nossos achados, Delgado e colaboradores (2006) demonstraram que a exposição sub-aguda ao malation provocou aumento nos níveis de MDA em diferentes regiões cerebrais de ratos. É importante salientar que, em nosso estudo, este fenômeno não foi observado em 3 horas após a intoxicação, mas em 24 horas, sugerindo que este não é um evento imediato. Ainda que o exato mecanismo molecular relacionado a tal processo não esteja bem esclarecido, nossos resultados sugerem que o aumento observado na peroxidação lipídica em animais intoxicados com malation não está relacionado a um desequilíbrio na homeostase do

sistema antioxidante da glutathiona, já que não afetou a atividade das enzimas GPx e GR e não alterou os níveis do tripeptídeo.

Um relevante achado do nosso estudo é que, além destes efeitos benéficos em reativar a AChE inibida pelo malation em córtex pré-frontal de camundongos em 24 horas após a intoxicação, a oxima K027 também reduziu a peroxidação lipídica induzida pelo malation neste mesmo tempo. Estes resultados sugerem uma potencial ligação entre a hiperestimulação do sistema colinérgico e o estresse oxidativo no córtex pré-frontal de camundongos após exposição ao malation. Nesse sentido, tem sido evidenciado que a superestimulação dos receptores muscarínicos (M_1) no córtex frontal pode levar a um aumento na concentração de glutamato extracelular (Dijk et al., 1995), sugerindo que a acetilcolina produz efeitos excitatórios no córtex pré-frontal. Levando em consideração que a excitotoxicidade e o estresse oxidativo no sistema nervoso central são eventos relacionados (Aschner et al., 2007), supõem-se que a peroxidação lipídica observada após a exposição ao malation está relacionada aos eventos excitotóxicos. Contudo, estudos adicionais são necessários para confirmar tal hipótese.

Em suma, o presente módulo de resultados (Módulo 2) indica que as novas oximas desenvolvidas, K027 e K048, são capazes de reativar a enzima AChE inibida pelo malation no córtex pré-frontal de camundongos. Além disso, o efeito benéfico da oxima K027 sobre a peroxidação lipídica induzida pelo malation em 24 horas sugere uma possível ligação entre a superestimulação do sistema colinérgico e o estresse oxidativo no córtex pré-frontal de camundongos após exposição ao malation. Tendo em vista que os tratamentos disponíveis (baseados em oximas) para intoxicações por malation parecem ser pouco eficazes, os dados do presente estudo são muito importantes porque apontam para as oximas assimétricas da série K como antídotos promissores para os casos de intoxicação por este pesticida OF.

7. CONCLUSÕES

Módulo 1: Efeito da exposição lactacional (pós-natal) ao malation sobre a atividade da enzima AChE e variáveis bioquímicas relacionadas com o estresse oxidativo no cérebro de camundongos (genitoras e respectiva prole).

Com os resultados deste estudo, conclui-se que:

- A exposição ao malation causou uma inibição significativa da atividade da AChE no cérebro das genitoras, porém, somente na dose mais alta (200 mg/kg).
- A atividade da AChE cerebral foi inibida na prole exposta lactacionalmente ao malation.
- O efeito inibitório da enzima AChE é revelado na prole mesmo quando as genitoras foram expostas a doses mais baixas do malation (20 mg/kg).
- O efeito da exposição lactacional ao malation sobre a atividade da AChE foi dose-dependente.
- O efeito inibitório do malation sobre a atividade da AChE cerebral foi maior em camundongos da prole quando comparado com o efeito em suas genitoras.
- O malation é excretado no leite materno.
- A exposição lactacional ao malation pode, *per se*, ser responsável pelos danos deletérios na prole, sem a necessidade de intoxicação prévia *in utero*.

Módulo 2: Papel das oximas inéditas K027 e K048 sobre o efeito do malation na atividade da enzima acetilcolinesterase e variáveis bioquímicas relacionadas com o estresse oxidativo em córtex pré-frontal de camundongos.

Com os resultados deste estudo, conclui-se que:

- A atividade da AChE cortical de camundongos adultos foi consideravelmente inibida (em torno de 55%) em 3 horas depois da exposição ao malation.
- A atividade da AChE cortical de camundongos adultos foi consideravelmente inibida (em torno de 55%) em 24 horas depois da exposição ao malation.
- Nem a atropina nem as oximas foram capazes de eliminar a inibição da AChE cortical provocada pelo malation em 3 horas após o tratamento.

- A oxima K027 (em combinação com a atropina) reverteu completamente a ocorrência de efeito inibitório do malation na atividade da AChE no córtex pré-frontal em 24 horas após envenenamento.
- A oxima K048 (em combinação com a atropina) diminuiu significativamente a ocorrência de efeito inibitório do malation na atividade da AChE no córtex pré-frontal em 24 horas após envenenamento, mas não completamente.
- A exposição aguda ao OF malation causou um aumento significativo na peroxidação de lipídeos no córtex pré-frontal de camundongos adultos.
- O aumento da peroxidação lipídica foi observado somente em 24 h após a administração do malation.
- A oxima K027 foi capaz de diminuir notavelmente a peroxidação lipídica no córtex pré-frontal de camundongos adultos em 24 h após intoxicação com malation.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Rahman A, Dechkovskaia AM, Goldstein LB, et al. Neurological deficits induced by malathion, DEET, and permethrin, alone or in combination in adult rats. *J Toxicol Environ Health A* 2004;67:331–56.

Abdollahi M, Donyavi M, Pournourmohammadi S, Saadat M. Hyperglycemia associated with increased hepatic glycogen phosphorylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in rats following subchronic exposure to malathion. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2004a;137(4):343-7.

Abdollahi M, Mostafalou S, Pournourmohammadi S, Shadnia S. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2004b;137(1):29-34.

Abou-Donia MB. Organophosphorus ester-induced chronic neurotoxicity. *Arch Environ Health* 2003;58:484–97.

Acharya J, Punchard NA, Taylor JA, Thompson RPH, Pearson TC. Red cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency. *Eur J Haematol* 1991; 47: 287-91.

Ahmed RS, Seth V, Pasha ST, Banerjee BD. Influence of dietary ginger (*Zingiber officinales* Rosc) on oxidative stress induced by malathion in rats. *Food Chem Toxicol* 2000;38:443–50.

Akhgari M, Abdollahi M, Kebryaezadeh A, Hosseini R, Sabzevari O. Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Hum Exp Toxicol* 2003;22:205–11.

Aluigi MG, Angelini C, Falugi C, Fossa R, Genever P, Gallus L, Layer PG, Prestipino G, Rakonczay Z, Sgro M, Thielecke H, Trombino S. Interaction between organophosphate

compounds and cholinergic functions during Development. *Chem Biol Interact.* 2005;157-158:305-16.

Amer SM, Fahmy MA, Aly FA, Farghaly AA. Cytogenetic studies on the effect of feeding mice with stored wheat grains treated with malathion. *Mutat Res.* 2002;513(1-2):1-10.

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; 90:7915-1922.

Andreazza AC, Soares D G, Kehl LF, Lima- Borella ML, Salvador M. Transtornos neuropsiquiátricos e estresse oxidativo. In: Izquierdo I, Quevedo j, Kapczinski F. *Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos.* Porto Alegre: Artmed 2004:489-496.

Aschner M, Syversen T, Souza DO, Rocha JB, Farina M. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40:285-91.

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

Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Stohs SJ. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology* 1995; 140(1-3):129-40.

Banerjee BD, Seth V, Bhattacharya A, Pasha ST, Chakraborty AK. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicol Lett* 1999; 107:33-47.

Bardin PG, et al. Organophosphate and Carbamate Poisoning. *Arch. Intern. Med.*199; 154:1433-1441.

Barreiros ALBS, DAVID JM, DAVID JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova* 2006;29(1):113-126.

Battu RS, Singh B, Kang BK. Contamination of liquid milk and butter with pesticide residues in the Ludhiana district of Punjab state, India. *Ecotoxicol Environ Saf* 2004;59:324–31.

Bellamy C. Healthy environments for children. *Bull World Health Organ.* 2003;81:157.

Berkowitz GS, Obel J, Deych E, et al. Exposure to indoor pesticides during pregnancy in a multiethnic, urban cohort. *Environ Health Perspect* 2003;111:79–84.

Borg DC, Schaich KM. Iron and iron-derived radicals. In Halliwell B (ed): *Oxygen radicals and tissue injury. Proceedings of a Brook Lodge Symposium; 1987 Apr 27-29; Bethesda (MD): Upjohn/Federation of American Societies for Experimental Biology, 1988; 20-6.*

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 1976; 72:248-54.

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

Brocardo PS, Pandolfo P, Takahashi RN, Rodrigues AL, Dafre AL. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride. *Toxicology* 2005; 207:283-91.

Brocardo PS, Assini F, Franco JL, Pandolfo P, Müller YM, Takahashi RN, Dafre AL, Rodrigues AL. Zinc attenuates malathion-induced depressant-like behavior and confers neuroprotection in the rat brain. *Toxicol Sci.* 2007 May;97(1):140-8.

Buratti FM, D'Aniello A, Volpe MT, Meneguz A, Testai E. Malathion bioactivation in the human liver: the contribution of different cytochrome p450 isoforms. *Drug Metab Dispos.* 2005; 33(3):295-302.

Calic' M, Vrdoljak AL, Radic' B, Jelic' D, Jun D, Kuca K, Kovarik Z. In vitro and in vivo evaluation of pyridinium oximes: mode of interaction with acetylcholinesterase, effect on tabun- and soman-poisoned mice and their cytotoxicity. *Toxicology.* 2006;15;219(1-3):85-96.

Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 1985; 113:484-90.

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

Cavaliere MJ, Calore EE, Perez NM, Puga FR. Organophosphate-induced myotoxicity. *Rev Saúde Pública* 1996;30(3):267-72.

Chakraborti TK, Farrar JD, Pope CN. Comparative neurochemical and neurobehavioral effects of repeated chlorpyrifos exposures in young and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;46(1):219-24.

Chanda SM, Pope CN. Neurochemical and neurobehavioral effects of repeated gestational exposure to chlorpyrifos in maternal and developing rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1995;53(4):771-6.

Chanda SM, Harp P, Liu J, Pope CN. Comparative developmental and maternal neurotoxicity following acute gestational exposure to chlorpyrifos in rats. *J Toxicol Environ Health* 1995;44:189–202.

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

Cohen Hubal EA, Sheldon LS, Burke JM, McCurdy TR, Berry MR, Rigas ML, et al. Children's exposure assessment: a review of factors influencing children's exposure, and the data available to characterize and assess that exposure. *Environ Health Perspect*. 2000;108:475-86.

Cohen MV. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? *Ann Intern Med* 1989;111:918-31.

Comporti M. Three models of free radical-induced cell injury. *Chem Biol Interact*. 1989;72(1-2):1-56.

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

Costa LG, Aschner M, Vitalone A, Syversen T, Soldin OP. Developmental neuropathology of environmental agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44:87-110.

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

Curl CL, Fenske RA, Kissel JC, et al. Evaluation of take-home organophosphorus pesticide exposure among agricultural workers and their children. *Environ Health Perspect* 2002;110:787-92.

Dawson A, Buckley N, Whyte I. What target pralidoxime concentration? *J Toxicol Clin Toxicol*. 1997;35(2):227-30.

da Silva AP, Meotti FC, Santos AR, Farina M. Lactational exposure to malathion inhibits brain acetylcholinesterase in mice. *NeuroToxicology* 2006;27:1101-05.

De Silva HJ, Samarawickrema NA, Wickremasinghe AR. Toxicity due to organophosphorus compounds: what about chronic exposure? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;100(9):803-6.

Delgado E. Central nervous system effects of acute organophosphate poisoning in a two-year follow-up. *Scand J Work Environ Health.* 2004;30(5):362-70.

Delgado EH, Streck EL, Quevedo JL, Dal-Pizzol F. Mitochondrial respiratory dysfunction and oxidative stress after chronic malathion exposure. *Neurochem Res* 2006;31:1021-25.

Deneke SM, Fanburg BL. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol* 1989;257:L163-73.

Dijk SN, Francis PT, Stratmann GC, Bowen DM. Cholinomimetics increase glutamate outflow via an action on the corticostriatal pathway: implications for Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1995;65:2165-69.

Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J. Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res.* 2005;1-15;79(1-2):157-65.

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

el-Sharkawy AM, Abdel-Rahman SZ, Hassan AA, Gabr MH, el-Zoghby SM, el-Sewedy SM. Biochemical effects of some insecticides on the metabolic enzymes regulating glutathione metabolism. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1994 Apr;52(4):505-10.

Elhanany E, Ordentlich A, Dgany O, Kaplan D, Segall Y, Barak R, Velan B, Shafferman A. Resolving pathways of interaction of covalent inhibitors with the active site of acetylcholinesterases: MALDI-TOF/MS analysis of various nerve agent phosphyl adducts. *Chem Res Toxicol* 2001;14:912-18.

Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70-77.

Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961;7:88-95.

Eyer P. Neuropsychopathological changes by organophosphorus compounds. *Hum Exp Toxicol*. 1995;14(11):857-64.

Faria NMX, Facchini LA, Fassa AG, Tomasi E. Estudo transversal sobre saúde mental de agricultores da Serra Gaúcha. *Rev Saúde Pública* 1999;33(4):391-400.

Farina M, Franco JL, Ribas CM, Meotti FC, Missau FC, Pizzolatti MG, Dafre AL, Santos AR. Protective effects of *Polygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 2005;57(11):1503-8.

Fenske RA, Lu C, Barr D, Needham L. Children's exposure to chlorpyrifos and parathion in an agricultural community in central Washington State. *Environ Health Perspect* 2002;110:549-53.

Floyd RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J* 1990;4:2.587-97.

Fontana C, Komatsu CA, Pigozzi E, Gemperli R. The protective effect of mercaptopropionylglycin. A free radical scavenger on ischemia / reperfusion injury in rats. *Rev Soc Bras Cir Plast Est Reconstr* 1996;9(2,3):80-90.

Fortunato JJ, Agostinho FR, Réus GZ, Petronilho FC, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Lipid peroxidative damage on malathion exposure in rats. *Neurotox Res* 2006a; 9:23-8.

Fortunato JJ, Feier G, Vitali AM, Petronilho FC, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Malathion induced oxidative stress in rat brain regions. *Neurochem Res* 2006b;31:671-78.

Franco JL, Teixeira A, Meotti FC, et al. Cerebellar thiol status and motor deficit after lactational exposure to methylmercury. *Environ Res* 2006;102:22–8.

Frischer H, Ahmad T. Consequences of erythrocytic glutathione reductase deficiency. *J Lab Clin Med* 1987;109:583-8.

Furlong CE, Cole TB, Jarvik GP, Pettan-Brewer C, Geiss GK, Richter RJ, Shih DM, Tward AD, Lulis AJ, Costa LG. Role of paraoxonase (PON1) status in pesticide sensitivity: genetic and temporal determinants. *Neurotoxicology*. 2005;26(4):651-9.

Galleano M, Puntarulo S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. *Biochim Biophys Acta* 1995;1271(2-3):321-6.

Ganendran A, Balabaskaran S. Reactivation studies on organophosphate inhibited human cholinesterases by pralidoxime (P-2-AM). *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1976;7:417-23.

Gardès-Albert M, Jore D, Ferradini C. Membrane lipid peroxidation: pulse and \square -radiolysis in oxyradical research. In Vigo-Pelfrey C (ed): *Membrane lipid oxidation*. 1th ed. Santa Clara, CRC Press 1991:2-30.

Gilbert HF, Mc Lean VM. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1990;63:69-172.

Gillham B, Papachristodoulou DK, Thomas JH. *Wills': biochemical basis of medicine*. 3. ed. Oxford: Reed Educational and Professional Publishing Ltd, 1997:196-202.

Giri S, Prasad SB, Giri A and Sharma GD. Genotoxic effects of malathion: an organophosphorus insecticide, using three mammalian bioassays in vivo. *Mutation Research* 2001;514:223-231.

Grigg J. Environmental toxins; their impact on children's health. *Arch Dis Child*. 2004;89:244-50.

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

Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986;246:501-14.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990;186: 1-85.

Halliwell B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis* 1993;23(suppl 1):118-26.

Hatherill JR, Till GO, Ward PA. Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. *Agents-Actions* 1991;32:351-8.

Hazarika A, Sarkar SN, Hajare S, Kataria M, Malik JK. Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study. *Toxicology* 2003;185:1-8.

Hebbel RP. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. *J Lab Clin Med* 1986;107:401-4.

Hershko C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Semin Hematol* 1989;26:277-85.

Hill RHJr, Head SL, Baker S, et al. Pesticide residues in urine of adults living in the United States: reference range concentrations. *Environ Res* 1995;71:99-108.

Jamal GA, Hansen S, Julu PO. Low level exposures to organophosphorus esters may cause neurotoxicity. *Toxicology*. 2002;27;181-182:23-33.

Jepsen S, Herlevsen P, Knudsen P, Bud MI, Klausen NO. Antioxidant treatment with N-acetylcysteine during adult respiratory distress syndrome: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Crit Care Med* 1992;20(7):918-23.

John S, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J Nutr Biochem* 2001;12:500-04.

Johnson MK. The delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds: identification of the phosphorylation site as an esterase. *Biochem J*. 1969;114(4):711-7.

Kassa J. Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *J Toxicol Clin Toxicol* 2002;40:803-16.

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

Kassa J, Kunesova G. A comparison of the potency of newly developed oximes (K027, K048) and commonly used oximes (obidoxime, HI-6) to counteract tabun-induced neurotoxicity in rats. *J Appl Toxicol* 2006;26:309-16.

Kassa J, Kuca K, Cabal J, Paar M. A comparison of the efficacy of new asymmetric bispyridinium oximes (K027, K048) with currently available oximes against tabun by in vivo methods. *J Toxicol Environ Health A*. 2006;69(20):1875-82.

Kedar N P. Can we prevent Parkinson's and Alzheimer's disease?. *Journal of Postgraduate Medicine* 2003;49(3):236-245.

Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol*. 1993;23(1):21-48.

Khurana D, Prabhakar S. Organophosphorus intoxication. *Arch Neurol*. 2000;57(4):600-2.

Kollef MH, Shuster DP. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1995; 332(1):27-37.

Kovacic P. Mechanism of organophosphates (nerve gases and pesticides) and antidotes: electron transfer and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2003;10(24):2705-09.

Kovarik Z, Radic Z, Berman HA, Simeon-Rudolf V, Reiner E, Taylor P. Mutant cholinesterases possessing enhanced capacity for reactivation of their phosphonylated conjugates. *Biochemistry* 2004;43:3222-29.

Kuca K, Bielavský J, Cabal J, Bielavska M. Synthesis of a potential reactivator of acetylcholinesterase 1-(4-hydroxyiminomethyl pyridinium)-3-(carbamoyl- pyridinium) propane dibromide. *Tetrahedron Lett* 2003a;44:3123–25.

Kuca K, Bielavský J, Cabal J, Kassa J. Synthesis of a new reactivator of tabun-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg Med Chem Lett* 2003b;13:3545–47.

Kuca K, Cabal J. In vitro reactivation of tabun-inhibited acetylcholinesterase using new oximes- K027, K005, K033 and K048. *Cent Eur J Public Health* 2004; 12 Suppl:S59-61.

Kuca K, Cabal J, Jun D, Kassa J, Bartosova L, Kunesova G, Dohnal V. Strategy for the development of new acetylcholinesterase reactivators – antidotes used for treatment of nerve agent poisonings. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2005;149(2):429-31.

Kushik J, Chandrabhan D. Sources of exposure to and public health implications of organophosphate pesticides. *Rev Panam Salud Publica* 2003;14(3):171-85.

Landrigan PJ. and Garg A. Chronic Effects of Toxic Environmental Exposures on Children's Health', *Clinical Toxicology* 2002;40(4):449- 456

Larini L. Praguicidas. In: OGA´S. Fundamentos da Toxicologia. Atheneu (São Paulo); 1996:515.

Lotti M. The pathogenesis of organophosphate polyneuropathy. *Crit Rev Toxicol.* 1992;21(6):465-87.

Lotti M, Moretto A. Organophosphate-induced delayed polyneuropathy. *Toxicol Rev.* 2005;24(1):37-49.

Makri A, Goveia M, Balbus J, Parkin R. Children´s susceptibility to chemicals: a review by developmental stage. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2004;7:417-35.

Manfroi CB, Schwalm FD, Cereser V, et al. Maternal milk as methylmercury source for suckling mice: neurotoxic effects involved with the cerebellar glutamatergic system. *Toxicol Sci* 2004;81:172–8.

Mariani E, Polidore MC, Cherubini A, Mecocci P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 827(1):65-75.

Maroni M, Colosio C, Ferioli A, Fait A. Biological Monitoring of Pesticide Exposure: a review. *Introduction. Toxicology.* 2000;7;143(1):1-118.

Matsubara LS, Ferreira ALA, Tornero MTT, Machado PEA. Influence of diabetes mellitus on the glutathione redox system of human red blood cells. *Braz J Med Biol Res* 1992;25:331-5.

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

McCauley LA, Lasarev MR, Higgins G, et al. Work characteristics and pesticide exposures among migrant agricultural families: a communitybased research approach. *Environ Health Perspect* 2001;109:533–8.

Meinking TL, Vicaria M, Eyerdam DH, Villar ME, Reyna S, Suarez G. Efficacy of a reduced application time of Ovide lotion (0.5% malathion) compared to Nix creme rinse (1% permethrin) for the treatment of head lice. *Pediatr Dermatol*. 2004;21(6):670-4.

Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983;52:711-60.

Mello Filho AC, Hoffman ME, Meneghini R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem J* 1983;218:273-5.

Meydani, M. Nutrition Interventions in Aging and Age-Associated Disease. *Ann N Y Acad Sci* 2001;928:226-35.

Moraes ACL. Contribuição para o estudo das intoxicações por carbamatos: o caso do chumbinho no Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado)- Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública; 1999: 21-5.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-58.

Pedrajas JR, Peinado J, Lopez-Barea J. Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu,Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers. *Chem Biol Interact* 1995; 98:267-82.

Peter JV, Moran JL, Graham P. Oxime therapy and outcomes in human organophosphate poisoning: an evaluation using meta-analytic techniques. *Crit Care Med* 2006; 34:502-10.

Petroianu GA, Nurulain SM, Nagelkerke N, Al-Sultan MA, Kuca K, Kassa J. Five oximes (K-27, K-33, K-48, BI-6 and methoxime) in comparison with pralidoxime: survival in rats exposed to the organophosphate paraoxon. *J Appl Toxicol.* 2005;26(3):262-8.

Petroianu GA, Hasan MY, Nurulain SM, Shafiullah M, Sheen R, Nagelkerke N. Ranitidine in acute high-dose organophosphate exposure in rats: effect of the time-point of administration and comparison with pyridostigmine. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2006;99(4):312-6.

Pope CN. Organophosphorus pesticides: do they all have the same mechanism of toxicity? *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 1999;2(2):161-81.

Pope CN, Chakraborti TK. Dose-related inhibition of brain and plasma cholinesterase in neonatal and adult rats following sublethal organophosphate exposures. *Toxicology* 1992;73:35–43.

Pope CN, Chakraborti TK, Chapman ML, Farrar JD, Arthun D. Comparison of in vivo cholinesterase inhibition in neonatal and adult rats by three organophosphorothioate insecticides. *Toxicology* 1991;68:51–61.

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

Quinby GE. & Wash W. Further Therapeutic Experience With Pralidoximes in Organic Phosphorus Poisoning. *JAMA* 1964;187 (3):114-118.

Ray A, Banerjee BD. A comparative evaluation of immunotoxicity of malathion after subchronic exposure in experimental animals. *Indian J Exp Biol.* 1998;36(3):273-82.

Richardson JR, Chambers JE. Neurochemical effects of repeated gestational exposure to chlorpyrifos in developing rats. *Toxicol Sci.* 2004;77(1):83-90.

Roberts DM, Aaron CK. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *BMJ*. 2007;24;334(7594):629-34.

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

Rotenberg M. et al. Differentiation between organophosphate and carbamate poisoning. *Clinica Chimica Acta* 1995;234:11-21.

Rotilio G, Aquilano K, Ciriolo MR. Interplay of Cu,Zn superoxide dismutase and nitric oxide synthase in neurodegenerative processes. *IUBMB Life* 2003;55(10-11):629-34.

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

Salas JH, Gonzalez MM, Noa M, et al. Organophosphorus pesticide residues in Mexican commercial pasteurized milk. *J Agric Food Chem* 2003;51:4468– 71.

Sanghi R, Pillai MK, Jayalekshmi TR, Nair A. Organochlorine and organophosphorus pesticide residues in breast milk from Bhopal, Madhya Pradesh, India. *Hum Exp Toxicol* 2003;22:73–6.

Scott MD, Lubin BH, Zuo L, Kuypers FA. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. *J Lab Clin Med* 1991;118:7-16.

Shan X. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol Ther* 1990;47:61-71.

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

Simcox NJ, Camp J, Kalman D, et al. Farmworker exposure to organophosphorus pesticide residues during apple thinning in central Washington State. *Am Ind Hyg Assoc J* 1999;60:752–61.

Slezak BP, Hamm JT, Reyna J, Hurst CH, Birnbaum LS. TCDD-mediated oxidative stress in male rat pups following perinatal exposure. *J Biochem Mol Toxicol*. 2002;16(2):49-52.

Slotkin TA. Developmental cholinotoxicants: nicotine and chlorpyrifos. *Environ Health Perspect*. 2005;107 Suppl 1:71-80.

Slotkin TA. Guidelines for developmental neurotoxicity and their impact on organophosphate pesticides: a personal view from an academic perspective. *Neurotoxicology* 2004a;25:631–40.

Slotkin TA. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004b;198:132–51.

Slotkin TA, Seidler FJ. Comparative developmental neurotoxicity of organophosphates in vivo: transcriptional responses of pathways for brain cell development, cell signaling, cytotoxicity and neurotransmitter systems. *Brain Res Bull*. 2007 May 30;72(4-6):232-74.

Slotkin TA, Oliver CA, Seidler FJ. Critical periods for the role of oxidative stress in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos and terbutaline, alone or in combination. *Brain Res Dev Brain Res* 2005;157:172–80.

Slotkin TA, Levin ED, Seidler FJ. Comparative developmental neurotoxicity of organophosphate insecticides: effects on brain development are separable from systemic toxicity. *Environ Health Perspect*. 2006 May;114(5):746-51.

Song X, Seidler FJ, Saleh JL, Zhang J, Padilla S, Slotkin TA. Cellular mechanisms for developmental toxicity of chlorpyrifos: targeting the adenylyl cyclase signaling cascade. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;145:158–74.

Srikanth NS, Seth PK. Alterations in xenobiotic metabolizing enzymes in brain and liver of rats coexposed to endosulfan and malathion. *J Appl Toxicol* 1990;10:157-60.

Sudakin DL, Mullins ME, Horowitz BZ, Abshier V, Letzig L. Intermediate syndrome after malathion ingestion despite continuous infusion of pralidoxime. *J Toxicol Clin Toxicol*. 2000;38(1):47-50.

Thiermann H, Szinicz L, Eyer F, Worek F, Eyer P, Felgenhauer N, Zilker T. Modern Strategies in Therapy of Organophosphate Poisoning. *Toxicol Lett*. 1999;107(1-3):233-9.

Tsakiris S, Angelogianni P, Schulpis KH, Stavridis JC. Protective effect of L-phenylalanine on rat brain acetylcholinesterase inhibition induced by free radicals. *Clin Biochem*. 2000;33(2):103-6.

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

van Asbeck BS, Hoidal J, Vercellotti GM et al. Protection against lethal hyperoxia by tracheal insufflation of erythrocytes: role of red cell glutathione. *Science* 1985;277:756-9.

van Helden HP, Busker RW, Melchers BP, Bruijnzeel PL. Pharmacological effects of oximes: how relevant are they? *Arch Toxicol* 1996;70:779-86.

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

Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1981;77:325–33.

Whyatt RM, Camann DE, Kinney PL, et al. Residential pesticide use during pregnancy among a cohort of urban minority women. *Environ Health Perspect* 2002;110:507–14.

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

Wolf NJ. Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Prog Neurobiol.* 1991;37:475-524.

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

Zanin M, Nieweglowski AM, Medeiros ML, Slisz R, Fowler R, Cavalet V, Zappia V. *Agrotóxicos: a realidade do Paraná*. Curitiba: Edição da Secretaria do Meio Ambiente do Paraná 1992.93p.

9. ANEXOS

Manuscrito 1

Lactational exposure to malathion inhibits brain acetylcholinesterase in mice

Artigo publicado na revista ***Neurotoxicology*** em 2006

Brief communication

Lactational exposure to malathion inhibits brain acetylcholinesterase in mice

Aline Preve da Silva^a, Flávia Carla Meotti^b, Adair R.S. Santos^b, Marcelo Farina^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^bDepartamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

Received 25 January 2006; accepted 5 April 2006

Available online 28 April 2006

Abstract

The organophosphorus (OP) pesticide malathion is a highly neurotoxic compound. Although some studies have reported neurotoxicity signs after the in utero exposure to OP pesticides, there is no evidence of the exclusive contribution of the lactational exposure to malathion as a possible cause of neurotoxicity in the offspring. In this study, we investigated the exclusive contribution of malathion exposure through maternal milk on the activity of acetylcholinesterase (AChE), as well as on biochemical parameters related to the oxidative stress (glutathione levels, lipid peroxidation and glutathione reductase and glutathione peroxidase activities) in the brain of suckling mice. The same parameters were also evaluated in the brains of the respective mothers, which were directly exposed to malathion during the lactational period (daily s.c. injections; doses of 20, 60 and 200 mg/kg of body weight). Our results showed that the lactational exposure to malathion caused a high inhibitory effect of the brain AChE activity in the offspring, even when dams were exposed to the lowest malathion dose (20 mg/kg). Brain AChE activity was also inhibited in mothers; however, only at the highest malathion dose (200 mg/kg). No changes were observed in the biochemical parameters related to the oxidative stress for both dams and pups brains. The present study shows, for the first time, that the exposure of neonatal mice to malathion via lactation inhibits the activity of brain AChE in the offspring. These data, summed to the fact that OP pesticides are excreted in human milk, makes relevant the lactational exposure to these xenobiotics in terms of human health concerns.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Malathion; Organophosphorus; Lactational exposure; Acetylcholinesterase; Neurotoxicity

1. Introduction

The OP pesticide malathion (*O,O*-dimethyl-*S*-1,2-bis ethoxy carbonyl ethyl phosphorodithioate), like other OP compounds, is known to inhibit acetylcholinesterase (AChE) activity, an effect that is thought to underlie the neurotoxicity elicited by these compounds (Kwong, 2002). In this regard, studies have reported neurotoxic effects of malathion exposure in both humans (Komori et al., 1991; Vidair, 2004) and experimental animals (Abdel-Rahman et al., 2004; Brocardo et al., 2005).

Although neurotoxicity signs have been reported after the in utero exposure to some OP pesticides (Chanda et al., 1995), there is no evidence of the exclusive contribution of the lactational exposure to malathion as a possible cause of neurotoxicity in the offspring. In this regard, it is noteworthy that many OP pesticides can be excreted in milk (Salas et al.,

2003; Battu et al., 2004). In addition, it has been reported the presence of OP pesticides, including malathion, in human milk (Sanghi et al., 2003), showing the relevance of the present issue in terms of human health concerns.

In addition to the inhibition of AChE activity, OP-induced toxicity is also related to the pro-oxidative properties of these compounds (Banerjee et al., 1999; Verma and Srivastava, 2001; Ranjbar et al., 2002). Of particular significance, malathion exposure increases lipid peroxidation in rodent erythrocytes, liver and brain (Hazarika et al., 2003; Akhgari et al., 2003). Other studies indicate that antioxidant enzyme activities were increased, reduced or not changed in the liver, brain and erythrocytes of animals treated with this compound (Srikanth and Seth, 1990; Pedrajas et al., 1995; Ahmed et al., 2000; John et al., 2001; Akhgari et al., 2003; Hazarika et al., 2003). The differences found may be due, e.g. to the malathion exposure regime employed (Brocardo et al., 2005).

Even though the beneficial effects of maternal milk to offspring are evident (Kunz et al., 1999; Oddy, 2000), it seems

* Corresponding author. Tel.: +55 48 3331 9795; fax: +55 48 3331 9672.
E-mail address: marcelofarina@zipmail.com.br (M. Farina).

reasonable and necessary to perform the correct evaluation of the contribution of the exclusive lactational exposure to OP pesticides as possible cause of neurotoxicity. Taking into account the absence of studies showing the real contribution of the lactational exposure to malathion toward the development of neurotoxicity in the offspring, and the relationship between the pro-oxidative properties of the OP pesticide malathion and its toxic effects, this study was aimed to investigate the neurotoxic effects of the exclusive lactational exposure to malathion in suckling mice. The activity of AChE, as well as biochemical parameters related to the oxidative stress, were analyzed in mice brain. These variables were evaluated in the weaning mice and dams in an attempt to detect possible differences of susceptibility to malathion-induced neurotoxicity between mature and developing brain.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Commercial-grade malathion (*O,O*-dimethyl-*S*-1,2-bis ethoxy carbonyl ethyl phosphorodithioate, 95% purity, CAS 121-75-5) was purchased from Dipil Chemical Ind. (Brazil). β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt reduced form, 5-5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic) acid, glutathione reductase from baker's yeast, and reduced glutathione were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other chemicals were of the highest grade available commercially.

2.2. Animals

Adult Swiss Albino mice (male and female), 90 days old, from our own breeding colony were maintained at 25 °C, on a 12 h light cycle:12 h dark cycle, with free access to food (Nuvital, PR, Brazil) and water. The breeding regimen consisted of grouping three virgin females with one male for 5 days. Pregnant mice were selected and housed individually in opaque plastic cages.

2.3. Treatment

In the first day after parturition (postnatal day 1), 20 dams were randomly assigned to one of the four groups (control, malathion 20 mg/kg, malathion 60 mg/kg and malathion 200 mg/kg) of five animals each. Pups (eight per litter) were maintained with their mothers, which were exposed to malathion (daily s.c. injections; doses of 20, 60 and 200 mg/kg) during the lactational period, postnatal day 1 to postnatal day 21. Commercial-grade malathion solution was dissolved in physiological saline (150 mM NaCl) and its dose was based on the study of Brocardo et al. (2005). Mothers from control group received daily injections of physiological saline (10 mL/kg). Since malathion and its metabolites are excreted mainly in urine (Bouchard et al., 2003), the possibility of dermal and oral transference of malathion from dams to pups was considered unimportant. Anyway, animals' cages were cleaned daily to minimize the contact of pups with potential contaminated

bedding. Thus, the exclusive and significant way of offspring exposure to malathion was through maternal milk. All experiments were conducted in accordance with the Guiding Principles in the Use of Animals in Toxicology, adopted by the Society of Toxicology in July 1989.

2.4. Tissue preparation

Twenty-four hours after the last injection, two randomly selected weaning mice, and their respective mothers, were killed by decapitation. Gender effects were not considered important in selecting pups for analysis, pups of both sexes were used. Brains were homogenized (1:5 w/v) in HEPES 25 mM, pH 7.4 buffer and the tissue homogenates were rapidly centrifuged at $20,000 \times g$, at 4 °C for 30 min. The supernatants obtained were used for the determinations of enzymatic activities, as well as for the quantifications of the levels of glutathione and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS).

2.5. Determination of acetylcholinesterase activity

Brain acetylcholinesterase activity was estimated by the method of Ellman et al. (1961), using acetylthiocholine iodide as a substrate. The rate of hydrolysis of acetylthiocholine iodide is measured at 412 nm through the release of the thiol compound which, when reacted with DTNB, produces the color-forming compound TNB.

2.6. Antioxidant enzyme assays

Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured by the Wendel (1981) method, using *tert*-butylhydroperoxide as a substrate. NADPH disappearance was monitored by a spectrophotometer at 340 nm. Glutathione reductase (GR) activity was determined by the method described by Carlberg and Mannervik (1985). The reduction of GSSG in the presence of NADPH was measured spectrophotometrically at 340 nm.

2.7. Glutathione levels and lipid peroxidation

Glutathione was measured as nonprotein thiols based on Ellman (1959) minor modifications (Farina et al., 2003). Lipid peroxidation was measured as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) based on Ohkawa et al. (1979).

2.8. Determination of protein

The protein content was quantified by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as a standard.

2.9. Statistical analysis

Differences between groups were evaluated by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range tests when appropriate.

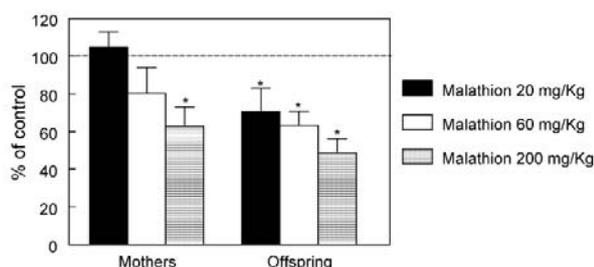


Fig. 1. Effects of malathion exposure on brain acetylcholinesterase activity. Acetylcholinesterase activity is expressed as percent of control. All data are represented as mean \pm S.E.M., except for the control groups whose means are showed as a traced line (100%). The actual activities of brain AChE for control mothers and pups were 49.1 and 60.3 nmol/min/mg protein, respectively. Two weaning mice were randomly selected from each litter and the means of their values of the biochemical parameters were used in statistical analysis as representative of the respective litter. Mothers ($n = 5$ per group). Offspring ($n = 5$ litters per group; two pups per litter). *Significantly different from control by one-way ANOVA ($p < 0.05$).

3. Results

Fig. 1 depicts the activity of brain acetylcholinesterase in lactating mice exposed to malathion, as well as in their respective offspring. Malathion exposure caused a significant inhibition of AChE activity in the brain of mothers; however, only at the highest malathion dose (200 mg/kg). Brain AChE activity was also inhibited in weaning mice lactationally exposed to malathion. It is noteworthy that this inhibitory effect observed even when mothers were directly exposed to the lowest malathion dose (20 mg/kg). In addition, the effect of the lactational exposure to malathion on brain AChE activity was dose-dependent. In fact, a significant Pearson correlation was evidenced for malathion dose \times brain AChE activity in the weaning mice (Pearson's coefficient = -0.499 ; $p = 0.006$). Even though the inhibitory effect of malathion on maternal brain AChE activity was observed only at the highest malathion dose, a significant Pearson correlation was also evidenced for malathion dose \times brain AChE activity in the dams (Pearson's coefficient = -0.616 ; $p = 0.019$).

The effects of malathion exposure on brain glutathione peroxidase and glutathione reductase activities, lipid peroxidation and glutathione levels are depicted in Table 1. No changes

were observed in these parameters for both dams and pups brains.

4. Discussion

There are studies showing that perinatal exposure to OP pesticides cause neurotoxicity in animals (Chanda et al., 1995; Slotkin et al., 2005). On the other hand, it has been reported that OP pesticides can be excreted in milk (Salas et al., 2003; Sanghi et al., 2003; Battu et al., 2004). However, to the best of our knowledge, there are no data in the literature showing lactational exposure to malathion as cause of neurotoxicity in the offspring. The results of our study confirm the incidence of neurotoxicity (inhibition of brain AChE) as consequence of the exclusive lactational malathion exposure in suckling mice. From a toxicological point of view, this result represents an important finding because they show, for the first time, that the exposure of mothers to malathion during the lactational period can, per se, cause neurotoxic effects in the offspring, without the need of previous in utero intoxication.

In the recent years, a growing body of evidence indicates the high vulnerability of pregnant/lactating women concerning pesticide exposures (Hill et al., 1995; Whyatt et al., 2002; Berkowitz et al., 2003), with several studies suggesting that resident farm families and farm workers have higher exposures than do other populations (Simcox et al., 1999; McCauley et al., 2001; Curl et al., 2002; Fenske et al., 2002). These evidences, summed to our experimental data, which confirm the occurrence of neurotoxicity after the lactational exposure to an OP pesticide, make clear the need for attention of pregnant women on OP exposure not only during pregnancy, but also during lactational period. In particular, it is well known that the inhibition of the brain AChE by OP pesticides leads to the accumulation of acetylcholine in the synapses that, in turn, induces hyperactivity of cholinergic pathways. Since acetylcholine plays important trophic roles in brain development, one could assume that OP pesticides exposure during the developmental period can interfere with neurotransmitter function leading to neurodevelopmental abnormalities by disrupting the timing or intensity of neurotrophic actions (Slotkin, 2004a). On the other hand, it is noteworthy that OP pesticides have direct effects on cellular processes that are unique to brain development, and that these effects are

Table 1

Effects of malathion exposure on brain glutathione peroxidase and glutathione reductase activities, lipid peroxidation and glutathione levels

	Mothers				Offspring			
	GPx	GR	NPSH	TBARS	GPx	GR	NPSH	TBARS
Control	57.1 (2.8)	61.7 (2.8)	76.7 (2.2)	0.159 (0.01)	65.8 (3.4)	59.7 (1.7)	72.9 (3.8)	0.218 (0.04)
Malathion 20 mg/kg	53.2 (5.1)	56.7 (1.7)	73.4 (2.0)	0.156 (0.007)	60.3 (7.1)	58.9 (3.7)	73.9 (4.8)	0.212 (0.03)
Malathion 60 mg/kg	56.4 (7.1)	59.4 (3.0)	78.7 (2.7)	0.143 (0.01)	63.7 (7.5)	59.7 (6.3)	77.3 (6.7)	0.174 (0.01)
Malathion 200 mg/kg	55.2 (3.8)	56.9 (3.2)	72.3 (3.1)	0.153 (0.01)	60.3 (2.1)	52.6 (2.7)	74.2 (4.8)	0.196 (0.02)

Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are expressed as nmol of oxidized NADPH mg protein/min. Glutathione content was measured as nonprotein thiols and is expressed as nmol/mg protein. Lipid peroxidation (TBARS levels) is expressed as nmol of malondialdehyde (MDA)/mg protein. All data are represented as means with their respective S.E.M. between parentheses. Two weaning mice were randomly selected from each litter and the means of their values of AChE activity were used in statistical analysis as representative of the respective litter. Mothers ($n = 5$ per group). Offspring ($n = 5$ litters per group; two pups per litter).

mechanistically unrelated to inhibition of cholinesterase (Slotkin, 2004b).

Another important finding from our study is that the inhibitory effect of malathion on brain AChE activity was higher in weaning mice when compared to their respective mothers. In fact, even though dams were directly exposed to subcutaneous injections of malathion, only the highest dose (200 mg/kg) caused brain AChE inhibition. Conversely, in the suckling mice lactationally exposed to malathion, this inhibitory effect was observed even though mothers were exposed to the lowest malathion dose (20 mg/kg). Why the immature brain displays higher sensitivity to OP pesticides relative to the adult is not completely solved. However, evidence show that developing organisms recover more quickly from cholinesterase inhibition than do comparably exposed adults, largely due to the rapid synthesis of new cholinesterase molecules (Pope and Chakraborti, 1992; Pope et al., 1991; Song et al., 1997). Based on this evidence, one could suppose even higher inhibitory effects of brain AChE in suckling mice during treatment period at least for a brief time interval.

Oxidative stress has been postulated to represent a noncholinergic mechanism by which OP pesticides cause neurotoxicity (Abou-Donia, 2003; Brocardo et al., 2005). We were unable to find evidence of significant effects of malathion exposure on biochemical parameters related to oxidative stress in mice brain from either mothers or weaning animals. Based on our findings, one could ask if the sensitivities of the assays used were sufficient to detect biochemical relevant changes. In this regard, recent studies of our group have showed that the exclusive lactational exposure to methylmercury, a well known neurotoxicant, changed biochemical variables related to oxidative stress in weaning mice cerebellum (Manfroi et al., 2004; Franco et al., 2006). In addition, Brocardo et al. (2005) showed increased levels of thiobarbituric acid reactive substances and decreased glutathione reductase activity in rat cerebral cortex after acute exposure to malathion. Since the biochemical protocols used in this study were exactly the same of those used in our previous studies (Manfroi et al., 2004; Franco et al., 2006) and in the study of Brocardo et al. (2005), the negative findings of malathion effects on oxidative stress-related parameters can not be linked to low sensitivities of the used assays. The relationship between oxidative stress and OP pesticides-induced toxicity is still unsolved; there are several contradictory studies (Srikanth and Seth, 1990; Pedrajas et al., 1995; Ahmed et al., 2000; John et al., 2001; Akhgari et al., 2003; Hazarika et al., 2003). Divergent results may be related to different OP pesticide compounds and exposure regime employed, which refer mainly to different doses, different times of chronic administration and different ages of the animals at the time of exposure.

Concluding, the present study shows, for the first time, that the exposure of lactating mice to malathion inhibits the activity of brain AChE in the offspring. These data are extremely important because the inhibition of the brain AChE causes cholinergic hyperactivity, which may disrupt neurotrophic actions during development. Taking into account that OP pesticides – including malathion – are excreted in human milk,

the presented results become relevant in terms of human health concerns.

Acknowledgement

This study was supported by grants from CNPq to M. Farina (475329/2004-0).

References

- Abdel-Rahman A, Dechkovskaia AM, Goldstein LB, et al. Neurological deficits induced by malathion, DEET, and permethrin, alone or in combination in adult rats. *J Toxicol Environ Health A* 2004;67:331–56.
- Abou-Donia MB. Organophosphorus ester-induced chronic neurotoxicity. *Arch Environ Health* 2003;58:484–97.
- Ahmed RS, Seth V, Pasha ST, Banerjee BD. Influence of dietary ginger (*Zingiber officinale* Rosc) on oxidative stress induced by malathion in rats. *Food Chem Toxicol* 2000;38:443–50.
- Akhgari M, Abdollahi M, Kebryaezadeh A, Hosseini R, Sabzevari O. Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Hum Exp Toxicol* 2003;22:205–11.
- Banerjee BD, Seth V, Bhattacharya A, Pasha ST, Chakraborty AK. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicol Lett* 1999;107:33–47.
- Battu RS, Singh B, Kang BK. Contamination of liquid milk and butter with pesticide residues in the Ludhiana district of Punjab state, India. *Ecotoxicol Environ Saf* 2004;59:324–31.
- Berkowitz GS, Obel J, Deych E, et al. Exposure to indoor pesticides during pregnancy in a multiethnic, urban cohort. *Environ Health Perspect* 2003;111:79–84.
- Bouchard M, Gosselin NH, Brunet RC, Samuel O, et al. A toxicokinetic model of malathion and its metabolites as a tool to assess human exposure and risk through measurements of urinary biomarkers. *Toxicol Sci* 2003;73:182–94.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- Brocardo PS, Pandolfo P, Takahashi RN, Rodrigues AL, Dafre AL. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride. *Toxicology* 2005;207:283–91.
- Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 1985;113:484–90.
- Chanda SM, Harp P, Liu J, Pope CN. Comparative developmental and maternal neurotoxicity following acute gestational exposure to chlorpyrifos in rats. *J Toxicol Environ Health* 1995;44:189–202.
- Curl CL, Fenske RA, Kissel JC, et al. Evaluation of take-home organophosphorus pesticide exposure among agricultural workers and their children. *Environ Health Perspect* 2002;110:A787–92.
- Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70–7.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961;7:88–95.
- Farina M, Brandão R, de Lara FS, et al. Profile of nonprotein thiols, lipid peroxidation and delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in mouse kidney and liver in response to acute exposure to mercuric chloride and sodium selenite. *Toxicology* 2003;184:179–87.
- Franco JL, Teixeira A, Meotti FC, et al. Cerebellar thiol status and motor deficit after lactational exposure to methylmercury. *Environ Res* 2006;102:22–8.
- Fenske RA, Lu C, Barr D, Needham L. Children's exposure to chlorpyrifos and parathion in an agricultural community in central Washington State. *Environ Health Perspect* 2002;110:549–53.
- Hazarika A, Sarkar SN, Hajare S, Kataria M, Malik JK. Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study. *Toxicology* 2003;185:1–8.

- Hill RH Jr, Head SL, Baker S, et al. Pesticide residues in urine of adults living in the United States: reference range concentrations. *Environ Res* 1995;71:99–108.
- John S, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J Nutr Biochem* 2001;12:500–4.
- Komori T, Yamane K, Nagayama T, Shibata K, Nozaki H, Takeuchi M. A case of delayed myeloneuropathy due to malathion intoxication. *No To Shinkei* 1991;43:969–74.
- Kunz C, Rodriguez-Palmero M, Koletzko B, Jensen R. Nutritional and biochemical properties of human milk. Part I. General aspects, proteins, and carbohydrates. *Clin Perinatol* 1999;26:307–33.
- Kwong TC. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Ther Drug Monit* 2002;24:144–9.
- Manfroi CB, Schwalm FD, Cereser V, et al. Maternal milk as methylmercury source for suckling mice: neurotoxic effects involved with the cerebellar glutamatergic system. *Toxicol Sci* 2004;81:172–8.
- McCauley LA, Lasarev MR, Higgins G, et al. Work characteristics and pesticide exposures among migrant agricultural families: a community-based research approach. *Environ Health Perspect* 2001;109:533–8.
- Oddy WH. Breastfeeding and asthma in children: findings from a West Australian study. *Breastfeed Rev* 2000;8:5–11.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351–8.
- Pedrajas JR, Peinado J, Lopez-Barea J. Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu,Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers. *Chem Biol Interact* 1995;98:267–82.
- Pope CN, Chakraborti TK. Dose-related inhibition of brain and plasma cholinesterase in neonatal and adult rats following sublethal organophosphate exposures. *Toxicology* 1992;73:35–43.
- Pope CN, Chakraborti TK, Chapman ML, Farrar JD, Arthun D. Comparison of in vivo cholinesterase inhibition in neonatal and adult rats by three organophosphorothioate insecticides. *Toxicology* 1991;68:51–61.
- Ranjbar A, Pasalar P, Abdollahi M. Induction of oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in organophosphorous pesticide manufacturing workers. *Hum Exp Toxicol* 2002;21:179–82.
- Salas JH, Gonzalez MM, Noa M, et al. Organophosphorus pesticide residues in Mexican commercial pasteurized milk. *J Agric Food Chem* 2003;51:4468–71.
- Sanghi R, Pillai MK, Jayalekshmi TR, Nair A. Organochlorine and organophosphorus pesticide residues in breast milk from Bhopal, Madhya Pradesh, India. *Hum Exp Toxicol* 2003;22:73–6.
- Simcox NJ, Camp J, Kalman D, et al. Farmworker exposure to organophosphorus pesticide residues during apple thinning in central Washington State. *Am Ind Hyg Assoc J* 1999;60:752–61.
- Slotkin TA. Guidelines for developmental neurotoxicity and their impact on organophosphate pesticides: a personal view from an academic perspective. *Neurotoxicology* 2004a;25:631–40.
- Slotkin TA. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004b;198:132–51.
- Slotkin TA, Oliver CA, Seidler FJ. Critical periods for the role of oxidative stress in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos and terbutaline, alone or in combination. *Brain Res Dev Brain Res* 2005;157:172–80.
- Song X, Seidler FJ, Saleh JL, Zhang J, Padilla S, Slotkin TA. Cellular mechanisms for developmental toxicity of chlorpyrifos: targeting the adenylyl cyclase signaling cascade. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;145:158–74.
- Srikanth NS, Seth PK. Alterations in xenobiotic metabolizing enzymes in brain and liver of rats coexposed to endosulfan and malathion. *J Appl Toxicol* 1990;10:157–60.
- Verma RS, Srivastava N. Chlorpyrifos induced alterations in levels of thiobarbituric acid reactive substances and glutathione in rat brain. *Indian J Exp Biol* 2001;39:174–7.
- Vidair CA. Age dependence of organophosphate and carbamate neurotoxicity in the postnatal rat: extrapolation to the human. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;196:287–302.
- Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1981;77:325–33.
- Whyatt RM, Camann DE, Kinney PL, et al. Residential pesticide use during pregnancy among a cohort of urban minority women. *Environ Health Perspect* 2002;110:507–14.

Manuscrito 2

Temporal effects of newly developed oximes (K027, K048) on malathion- induced acetylcholinesterase inhibition and lipid peroxidation in mouse prefrontal cortex

Artigo aceito para publicação na revista ***Neurotoxicology*** em outubro de 2007

Temporal effects of newly developed oximes (K027, K048) on malathion-induced acetylcholinesterase inhibition and lipid peroxidation in mouse prefrontal cortex

Aline P. da Silva¹, Marcelo Farina^{1#}, Jeferson L. Franco¹,
Alcir L. Dafre², Jiri Kassa³, Kamil Kuca³

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

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

Corresponding author:

Farina M,
Departamento de Bioquímica,
Centro de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Santa Catarina,
88040-900, Campus Trindade,
Florianópolis, SC, Brazil
Tel. + 55 48 3721 9795
FAX + 55 48 3721 9672
E-mail: farina@ccb.ufsc.br

Abstract

The potency of newly developed asymmetric bispyridinium oximes (K027, K048) in reactivating acetylcholinesterase and in eliminating oxidative stress induced by acute exposure to malathion was evaluated in mouse prefrontal cortex using *in vivo* methods. Malathion (1 g/kg, dissolved in saline) was administered subcutaneously. The asymmetric bispyridinium oximes K027 or K048 (1/4 of LD₅₀, dissolved in saline, i.p.) were administered immediately after malathion and atropine sulfate (20 mg/kg, dissolved in saline, i.p.). Control group received saline instead of malathion and antidotes. Acetylcholinesterase activity and biochemical parameters related to oxidative stress (glutathione levels, glutathione peroxidase and glutathione reductase activity, and lipid peroxidation) were evaluated in mouse prefrontal cortex at two different timepoints (3 or 24 h after malathion poisoning). Malathion administration markedly inhibited cortical acetylcholinesterase activity (around 55%) at 3 h after malathion challenge and such inhibition was maintained till 24 h after poisoning. Although neither atropine sulfate nor oximes were able to eliminate cortical acetylcholinesterase inhibition at 3 h after malathion poisoning, K027 (in combination with atropine) completely eliminated the inhibitory effect of malathion exposure on cortical acetylcholinesterase activity at 24 h after malathion administration. K048 (in combination with atropine) significantly decreased acetylcholinesterase inhibition at 24 h after malathion poisoning. Even though glutathione levels and glutathione peroxidase and glutathione reductase activities were not affected, malathion administration markedly increased lipid peroxidation in the prefrontal cortex at 24 h after poisoning and the oxime K027 (in combination with atropine) was able to significantly decrease such phenomenon. Thus, our results clearly demonstrate that the newly developed asymmetric bispyridinium oximes K027 and K048 are able to reverse malathion-induced acetylcholinesterase inhibition in mouse prefrontal cortex. Moreover, the ameliorative effect of the oxime K027 on the increased lipid peroxidation observed at 24 h after malathion poisoning suggests a potential link between the hyperstimulation of cholinergic system and oxidative stress in the mouse prefrontal cortex after malathion exposure.

Keywords: Malathion, organophosphorus compounds, acetylcholinesterase, oximes, neurotoxicity, oxidative stress.

Introduction

The organophosphorus (OP) pesticide malathion (O,O-dimethyl-S-1,2-bis ethoxy carbonyl ethyl phosphorodithioate), after bioactivation to malaoxon (Forsyth and Chambers, 1989; Buratti et al., 2006), exerts its toxic effects by phosphorylation and subsequent inactivation of acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7). The inhibition of this enzyme allows the accumulation of acetylcholine in the synaptic terminals of the central and peripheral nervous system with subsequent widespread overstimulation of cholinergic receptors. This effect is thought to underlie the neurotoxicity elicited by OP compounds (Kwong, 2002). Various studies have reported neurotoxic effects of malathion exposure in both humans (Komori et al., 1991; Vidair, 2004) and experimental animals (Abdel-Rahman et al., 2004; Brocardo et al., 2005; da Silva et al., 2006). Malathion has been pointed as one of the main contaminants in cases of OP intoxication in Santa Catarina, a state in Southern Brazil, according to unpublished data obtained from Toxicological Information Center (Centro de Informações Toxicológicas - CIT) hosted by the Hospital Universitário, Florianópolis, SC.

In addition to the inhibition of AChE activity, OP compounds-induced toxicity is also related to the pro-oxidative properties of these compounds (Banerjee et al., 1999; Verma and Srivastava, 2001; Ranjbar et al., 2002). It was described that malathion exposure increases lipid peroxidation in rodent erythrocytes, liver and brain (Hazarika et al., 2003; Akhgari et al., 2003). Other studies indicate that the activities of antioxidant enzymes were increased, reduced or not changed in the liver, brain and erythrocytes of animals poisoned with this compound (Srikanth and Seth, 1990; Pedrajas et al., 1995; Ahmed et al., 2000; John et al., 2001; Akhgari et al., 2003; Hazarika et al., 2003). The differences found may be due, e.g. to the malathion exposure regime employed (Brocardo et al., 2005).

Even though malathion exposure in Brazil represents an important problem with respects to human health (Brocardo et al., 2007), the antidotal treatment of malathion poisoning is not sufficiently effective. In fact, malathion poisoning is conventionally treated by a combination of atropine (a cholinolytic drug) to antagonize the overstimulation of cholinergic muscarinic receptors and AChE reactivators (pralidoxime mainly) to reactivate inhibited enzyme. However, clinical experience with pralidoxime is disappointing (Sudakin et al., 2000) and its routine use has been questioned. In this

regard, there is a clear demand for “broad spectrum” AChE reactivators with a higher efficacy than those clinically available (Kassa, 2002).

Recently, new potential reactivators (K027 and K048) of inhibited AChE were developed at the Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, Hradec Kralove, Czech Republic (Figure 1). These oximes have been reported as excellent reactivators of OP compounds-inhibited AChE under *in vitro* conditions (Kuca et al., 2005; Petroianu et al., 2007a). Moreover, these oximes have also displayed protective effects against OP poisoning under *in vivo* conditions (Kuca et al., 2005; Petroianu et al., 2007b). It is noteworthy that their antidotal effectiveness against OP-induced toxicity/AChE inhibition has been shown to be higher when compared to commercially available oximes (Kuca et al., 2004, Kuca et al., 2005).

Taking into account (i) the high incidence of malathion poisoning in Brazil; (ii) the low effectiveness of the current antidotal treatment of malathion poisoning; and (iii) the evident beneficial effects of the oximes K027 and K048 on poisonings with OP compounds others than malathion, the aim of this study was to investigate the potential protective effects of the asymmetric bispyridinium oximes (K027 and K048) in reactivating inhibited AChE in mouse prefrontal cortex after acute malathion poisoning. Since oxidative stress has been pointed as an important mechanism involved with malathion toxicity, the potency of K027 and K048 to counteract this phenomenon was also evaluated.

Materials and methods

Chemicals

Commercial-grade malathion (*O,O*-dimethyl-*S*-1,2-bis ethoxy carbonyl ethyl phosphorodithioate, 95% purity, CAS 121-75-5) was purchased from Dipil Chemical Ind. (Brazil). β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt reduced form, 5-5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic) acid, glutathione reductase from baker's yeast, and reduced glutathione were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). The newly synthesized oximes were designated as K027 (1-(4-hydroxyiminomethyl pyridinium)-3-(4-carbamoylpyridinium) propane dibromide) and K048 (1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-4-(4-carbamoylpyridinium) butane dibromide). Their chemical structures (Figure 1) were derived from the structures of currently used AChE reactivators, especially HI-6. Their synthesis was described previously (Kuca et al., 2003a, b). All other chemicals were of the highest grade available commercially

Animals

Adult Swiss Albino mice (female), 60 days old, from our own breeding colony were maintained at 25 °C, on a 12 h light cycle:12 h dark cycle, with free access to food (Nuvital, PR, Brazil) and water. All used animals were originated from sibling mothers and fathers. Mice were randomly divided in five different experimental groups. All experiments were conducted in accordance with the Guiding Principles in the Use of Animals in Toxicology, adopted by the Society of Toxicology (1989) and were approved by our ethics committee for animal use at the Universidade Federal de Santa Catarina (313/CEUA; 23080.026023/2004-39/UFSC).

Treatment

Sixty animals were randomly divided in five groups (A-E) with 12 animals each. Animals from groups B-E received a single subcutaneous (s.c.) injection of malathion (1 g/kg, 1/3 LD₅₀, dissolved in saline). Animals from groups C-E received a single intraperitoneal (i.p.) injection of atropine sulfate (20 mg/kg, dissolved in saline). The asymmetric bispyridinium oximes K027 (150 mg/kg; ¼ da DL₅₀) or K048 (180 mg/kg; ¼ da DL₅₀, dissolved in saline) were administered intraperitoneally to animals from groups D and E, respectively. DL₅₀ were based on a previous study (Kuca et al., 2005a). All compounds

were administered almost simultaneously, with 10 seconds intervals between each administration. The order of administration was malathion or saline (s.c.), followed by atropine or saline (i.p.), followed by oxime or saline (i.p.). So, all animals received one subcutaneous and two intraperitoneal injections. Control group (A) received only vehicle (saline, 10 ml/kg) instead of malathion, atropine and oxime.

Tissue preparation for biochemical analyses

At two different timepoints (3 or 24 h after treatment), animals were killed by decapitation: 6 animals per group per timepoint. The prefrontal cortices were homogenized (1:5 w/v) in HEPES 25 mM, pH 7.4 buffer and the tissue homogenates were rapidly centrifuged at $20,000 \times g$, at 4 °C for 30 min. The supernatants obtained were used for the determination of enzymatic activities and for the quantification of the level of glutathione and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS).

Biochemical analyses

Acetylcholinesterase activity: Brain acetylcholinesterase activity was estimated by the method of Ellman et al. (1961), using acetylthiocholine iodide as a substrate. The rate of hydrolysis of acetylthiocholine iodide is measured at 412 nm through the release of the thiol compound which, when reacted with DTNB, produces the color-forming compound TNB.

Antioxidant enzymes: Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured by the Wendel (1981) method, using tert-butylhydroperoxide as a substrate. NADPH disappearance was monitored by a spectrophotometer at 340 nm. Glutathione reductase (GR) activity was determined by the method described by Carlberg and Mannervik (1985). The rate of GSSG reduction was indirectly determined through monitoring the NADPH disappearance at 340 nm.

Glutathione levels and lipid peroxidation: Glutathione was measured as nonprotein thiols based on Ellman (1959) minor modifications (Farina et al., 2003). Lipid peroxidation was measured as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) based on Ohkawa et al. (1979).

Determination of protein: The protein content was quantified by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as a standard.

Statistical analysis

Differences between groups were evaluated by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range tests when appropriate.

Results

Figure 2 describes the effects of the exposures to malathion and the oximes K027 or K048 (in combination with atropine) on prefrontal cortical AChE activity at 3 h (Figure 2A) and 24 h (Figure 2B) after poisoning. Malathion exposure markedly inhibited cortical AChE activity (around 55%) at 3 h and such inhibition was maintained until 24 h after malathion challenge. Although neither atropine nor oximes were able to eliminate cortical AChE inhibition at 3 h after malathion treatment, K027 completely reversed the inhibitory effect of malathion exposure on prefrontal cortical AChE activity at 24 h after poisoning. The oxime K048 (in combination with atropine) significantly decreased AChE inhibition at 24 h after malathion poisoning but it was not be able to eliminate AChE inhibition completely.

Figure 3 shows the effects of the exposures to malathion and the oximes K027 or K048 (in combination with atropine) on prefrontal cortical thiobarbituric acid reactive substances (TBARS, marker of lipid peroxidation) at 3 h (Figure 3A) and 24 h (Figure 3B) after poisoning. Malathion exposure significantly increased lipid peroxidation in the prefrontal cortex, but this effect was observed only at 24 h after malathion administration. The oxime K027, which completely reactivated AChE at 24 h after malathion poisoning, was able to significantly decrease the induced lipid peroxidation at this timepoint.

Biochemical parameters related to the glutathione antioxidant system (glutathione levels and glutathione peroxidase and glutathione reductase activities) were not changed in the prefrontal cortex at 3 h as well as 24 h after poisoning with malathion (Table 1).

Discussion

Malathion, which is an organophosphorothionate pesticide with relative low toxicity, can be activated by the cytochrome P450 system by oxidative desulfuration to form malaoxon, an effective inhibitor of AChE (Forsyth and Chambers, 1989; Buratti et al., 2006). Malathion has been pointed as one of the main contaminants in cases of organophosphorus (OP) intoxication in Santa Catarina, a state in Southern Brazil, according to unpublished data obtained from Toxicological Information Center (Centro de Informações Toxicológicas - CIT) hosted by the Hospital Universitário, Florianópolis, SC. However, the antidotal treatment of malathion poisonings is not sufficiently effective (Sudakin et al., 2000). In fact, there are biochemical and clinical evidences that pralidoxime, a widely used oxime in OP poisoning, does not reactivate human AChE inhibited by malathion exposure (Ganendran & Balabaskaran, 1976). Therefore, there is a clear demand for more effective AChE reactivators in comparison with currently available oximes (van Helden et al., 1996; Kassa, 2002; Peter et al., 2006). Our results clearly demonstrated that both oximes from the K-series (developed by Kuca from Department of Toxicology of the Faculty of Military Health Sciences, Hradec Kralove, Czech Republic - Kuca et al., 2003a,b), namely K027 and K048, were able to reactivate inhibited AChE in prefrontal cortex of mice acutely exposed to malathion. Even though the oximes K027 and K048 represent closely related chemical structures, K027 was markedly more effective AChE reactivator than K048. Indeed, K027 completely reactivated the inhibited AChE at 24 h after malathion exposure while K048 only partially reactivated the enzyme at this timepoint. Such data are extremely important because they render asymmetric bispyridinium oximes of the K-series as promising compounds for pharmacological studies on AChE reactivation after malathion poisoning.

The effectiveness of oxime reactivation is primarily attributed to the nucleophilic displacement rate of organophosphates, but the efficiency varies with the chemical structure of the OP compound, the source of enzyme, the chemical structure of the oxime and the rate of post-inhibitory dealkylation known as aging (Worek et al., 2002; Kovarik et al., 2004). The aging is a process that proceeds through P-O bond scission, which results in formation of a negatively charged phosphonyl-cholinesterase complex (Elhanany et al., 2001), thwarting nucleophilic attack by an oxime. An interesting finding of our study was the temporal effect of the oximes in reactivating the inhibited AChE

after malathion poisoning in mouse prefrontal cortex. Even though the oximes had no reactivating effects at 3 h, the complete reactivation of mouse prefrontal cortical AChE activity at 24 h after malathion poisoning and K027 treatment indicate that its pharmacological effects appear to be fast enough to avoid AChE aging. From a pharmacological point of view, this information is interesting and it is in agreement with previous studies that have shown decreased lethality and neurotoxicity in OP-exposed animals treated with K027 (Kassa, 2006; Kassa & Kunesova, 2006).

Even though several studies have shown that malathion exposure induces oxidative stress (Akhgari et al., 2003; Hazarika et al., 2003; Brocardo et al., 2005; Fortunato et al., 2006a), the molecular mechanisms involved in this phenomenon are not completely understood. In this regard, Fortunato and his co-workers (2006b) have proposed that malathion-induced oxidative stress in rat brain is associated to the modulation of the antioxidant enzymes catalase and superoxide dismutase. In addition, it was shown that malathion increased the in vitro formation of superoxide anion in the mitochondria of rat brain regions (Delgado et al., 2006). In our experiments, a high oxidative damage toward lipids of the prefrontal cortex of malathion-exposed mice was observed. It is noteworthy that this phenomenon was not observed at 3 h after poisoning, but at 24 h, suggesting that it is not an immediate event. Even though the exact molecular mechanism related to such process is not clear, our results suggest that the observed increased lipid peroxidation in animals poisoned with malathion is not related to a potential dyshomeostasis of the glutathione antioxidant system.

A remarkable finding of our study is that, beside its beneficial effects in reactivating the inhibited AChE in mouse prefrontal cortex at 24 h after malathion poisoning, K027 also decreased the induced lipid peroxidation at this timepoint. These results suggest a potential link between the hyperstimulation of cholinergic system and oxidative stress in the mouse prefrontal cortex after malathion exposure. In this regard, it has been evidenced that the overstimulation of muscarinic (M_1) receptors in the frontal cortex could lead to increased extracellular glutamate concentrations (Dijk et al., 1995), suggesting that acetylcholine produces excitatory effects in the prefrontal cortex. Taking into account that excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system are events that stimulate each other (Aschner et al., 2007), one could suppose that the observed lipid peroxidation after malathion exposure is related to excitotoxic events. However, additional studies are necessary to confirm such hypothesis.

In summary, the present study indicates that the newly developed asymmetric bispyridinium oximes K027 and K048 are able to reactivate inhibited AChE in mouse prefrontal cortex after acute malathion exposure. Moreover, the ameliorative effect of the oxime K027 on the induced lipid peroxidation at 24 h after malathion poisoning suggests a potential link between the overstimulation of cholinergic system and oxidative stress in the mouse prefrontal cortex after malathion exposure. Since the available oxime-based treatment of malathion poisonings appear to be ineffective, the present data are very important because they render asymmetric bispyridinium oximes of the K-series as promising antidotes for malathion poisoning.

Acknowledgements: This study was supported by grants from CNPq to M. Farina (475329/2004-0 and 474796/2006-0) and by the FINEP research grant “Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)” # 01.06.0842-00.

Legends

Figure 1: Chemical Structure of oximes used.

Figure 2: Effects of malathion, atropine and the oximes K027 or K048 on mouse prefrontal cortex acetylcholinesterase activity. Animals were sacrificed at 3 h (A) or 24 h (B) after malathion poisoning. Acetylcholinesterase activity is expressed as nmol of substrate hydrolyzed/min/mg protein and represented as mean \pm SD (n = 6 animals per group). Different symbols above the bars indicate significant differences ($p < 0.05$) by analysis of variance followed by Duncan multiple range test.

Figure 3: Effects of malathion, atropine and the oximes K027 or K048 on mouse prefrontal cortex lipid peroxidation. Animals were sacrificed at 3 h (A) or 24 h (B) after malathion poisoning. Lipid peroxidation was measured as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Data are expressed as nmol of malondialdehyde (MDA)/mg protein and represented as mean \pm SD (n = 6 animals per group). Different symbols above the bars indicate significant differences ($p < 0.05$) by analysis of variance followed by Duncan multiple range test.

Table 1: Effects of malathion, atropine and the oximes K027 or K048 on mouse prefrontal cortex glutathione levels and glutathione peroxidase and glutathione reductase activities. Animals were sacrificed at 3 h (A) or 24 h (B) after malathion poisoning. Glutathione (GSH) levels are expressed as nmol/mg protein. Glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) activities are expressed as nmol of NADPH oxidized/min/mg protein. Data are represented as mean \pm SD (n = 6 animals per group). Significant differences ($p < 0.05$) between groups were not found.

References

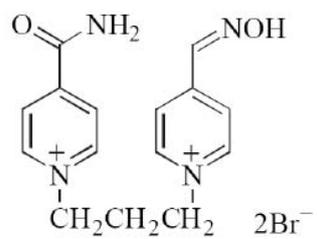
- Abdel-Rahman A, Dechkovskaia AM, Goldstein LB, Bullman SH, Khan W, El-Masry EM, Abou-Donia MB. Neurological deficits induced by malathion, DEET, and permethrin, alone or in combination in adult rats. *J Toxicol Environ Health A* 2004; 67:331-56.
- Ahmed RS, Seth V, Pasha ST, Banerjee BD. Influence of dietary ginger (*Zingiber officinales* Rosc) on oxidative stress induced by malathion in rats. *Food Chem Toxicol* 2000; 38:443-50.
- Akhgari M, Abdollahi M, Kebryaezadeh A, Hosseini R, Sabzevari O. Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Hum Exp Toxicol* 2003; 22:205-11.
- Aschner M, Syversen T, Souza DO, Rocha JB, Farina M. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40:285-91.
- Banerjee BD, Seth V, Bhattacharya A, Pasha ST, Chakraborty AK. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicol Lett* 1999; 107:33-47.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 1976; 72:248-54.
- Brocardo PS, Assini F, Franco JL, Pandolfo P, Muller YM, Takahashi RN, Dafre AL, Rodrigues AL. Zinc attenuates malathion-induced depressant-like behavior, and confers neuroprotection in the rat brain. *Toxicol Sci* 2007 [Epub ahead of print].
- Brocardo PS, Pandolfo P, Takahashi RN, Rodrigues AL, Dafre AL. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride. *Toxicology* 2005; 207:283-91.
- Buratti FM, Leoni C, Testai E. Foetal and adult human CYP3A isoforms in the bioactivation of organophosphorothionate insecticides. *Toxicol Lett* 2006; 167:245-55.
- Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 1985; 113:484-90.
- da Silva AP, Meotti FC, Santos AR, Farina M. Lactational exposure to malathion inhibits brain acetylcholinesterase in mice. *NeuroToxicology* 2006; 27:1101-05.
- Delgado EH, Streck EL, Quevedo JL, Dal-Pizzol F. Mitochondrial respiratory dysfunction and oxidative stress after chronic malathion exposure. *Neurochem Res* 2006; 31:1021-25.
- Dijk SN, Francis PT, Stratmann GC, Bowen DM. Cholinomimetics increase glutamate outflow via an action on the corticostriatal pathway: implications for Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1995; 65:2165-69.
- Elhanany E, Ordentlich A, Dgany O, Kaplan D, Segall Y, Barak R, Velan B, Shafferman A. Resolving pathways of interaction of covalent inhibitors with the active site of acetylcholinesterases: MALDI-TOF/MS analysis of various nerve agent phosphyl adducts. *Chem Res Toxicol* 2001; 14:912-18.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7:88-95.
- Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82:70-77.
- Farina M, Brandao R, Lara FS, Soares FA, Souza DO, Rocha JB. Mechanisms of the inhibitory effects of selenium and mercury on the activity of delta-aminolevulinic acid dehydratase from mouse liver, kidney and brain. *Toxicol Lett* 2003; 139:55-66.

- Forsyth CS, Chambers JE. Activation and degradation of the phosphorothionate insecticides parathion and EPN by rat brain. *Biochem Pharmacol* 1989; 38:1597-603.
- Fortunato JJ, Agostinho FR, Réus GZ, Petronilho FC, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Lipid peroxidative damage on malathion exposure in rats. *Neurotox Res* 2006a; 9:23-8.
- Fortunato JJ, Feier G, Vitali AM, Petronilho FC, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Malathion-induced oxidative stress in rat brain regions. *Neurochem Res* 2006b; 31:671-78.
- Ganendran A, Balabaskaran S. Reactivation studies on organophosphate inhibited human cholinesterases by pralidoxime (P-2-AM). *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1976; 7:417-23.
- Hazarika A, Sarkar SN, Hajare S, Kataria M, Malik JK. Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study. *Toxicology* 2003; 185:1-8.
- John S, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J Nutr Biochem* 2001; 12:500-04.
- Kassa J, Kunesova G. A comparison of the potency of newly developed oximes (K027, K048) and commonly used oximes (obidoxime, HI-6) to counteract tabun-induced neurotoxicity in rats. *J Appl Toxicol* 2006a; 26:309-16.
- Kassa J. Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *J Toxicol Clin Toxicol* 2002b; 40:803-16.
- Kassa J. The influence of oxime and anticholinergic drug selection on the potency of antidotal treatment to counteract acute toxic effects of tabun in mice. *Neurotox Res* 2006c; 9:59-62.
- Komori T, Yamane K, Nagayama T, Shibata K, Nozaki H, Takeuchi M. A case of delayed myeloneuropathy due to malathion intoxication. *No To Shinkei* 1991; 43:969-74.
- Kovarik Z, Radic Z, Berman HA, Simeon-Rudolf V, Reiner E, Taylor P. Mutant cholinesterases possessing enhanced capacity for reactivation of their phosphorylated conjugates. *Biochemistry* 2004; 43:3222-29.
- Kuca K, Bartosova L, Jun D, Patocka J, Cabal J, Kassa J, Kunesova G. New quaternary pyridine aldoximes as casual antidotes against nerve agents intoxications. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2005b; 149:75-82.
- Kuca K, Bartosova L, Kassa J, Cabal J, Bajgar J, Kunesova G, Jun D. Comparison of the potency of newly developed and currently available oximes to reactivate nerve agent-inhibited acetylcholinesterase in vitro and in vivo. *Chem Biol Interact* 2005a.; 157-158:367-68.
- Kuca K, Bielavský J, Cabal J, Bielavska M. Synthesis of a potential reactivator of acetylcholinesterase 1-(4-hydroxyiminomethyl pyridinium)-3-(carbamoyl- pyridinium) propane dibromide. *Tetrahedron Lett* 2003a; 44:3123-25.
- Kuca K, Bielavský J, Cabal J, Kassa J. Synthesis of a new reactivator of tabun-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg Med Chem Lett* 2003b; 13:3545-47.
- Kuca K, Cabal J, Kassa J. A comparison of the potency of newly developed oximes (K005, K027, K033, K048) and currently used oximes (pralidoxime, obidoxime, HI-6) to reactivate sarin-inhibited rat brain acetylcholinesterase by in vitro methods. *J Toxicol Environ Health A* 2005; 68:677-86.
- Kuca K, Cabal J. In vitro reactivation of tabun-inhibited acetylcholinesterase using new oximes- K027, K005, K033 and K048. *Cent Eur J Public Health* 2004; 12 Suppl:S59-61.

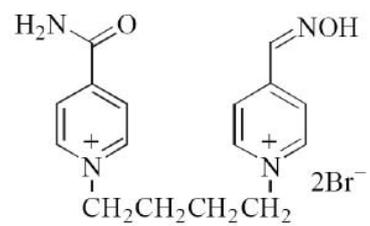
- Kwong TC. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Ther Drug Monit* 2002; 24:144-49.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95:351-58.
- Pedrajas JR, Peinado J, Lopez-Barea J. Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu,Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers. *Chem Biol Interact* 1995; 98:267-82.
- Peter JV, Moran JL, Graham P. Oxime therapy and outcomes in human organophosphate poisoning: an evaluation using meta-analytic techniques. *Crit Care Med* 2006; 34:502-10.
- Petroianu GA, Arafat K, Nurulain SM, Kuca K, Kassa J. In vitro oxime reactivation of red blood cell acetylcholinesterase inhibited by methyl-paraoxon. *J Appl Toxicol* 2007a; 27:168-75.
- Petroianu GA, Nurulain SM, Nagelkerke N, Shafiullah M, Kassa J, Kuca K. Five oximes (K-27, K-48, obidoxime, HI-6 and trimedoxime) in comparison with pralidoxime: survival in rats exposed to methyl-paraoxon. *J Appl Toxicol* 2007b; Feb 16: [Epub ahead of print].
- Ranjbar A, Pasalar P, Abdollahi M. Induction of oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in organophosphorous pesticide manufacturing workers. *Hum Exp Toxicol* 2002; 21:179-82.
- Srikanth NS, Seth PK. Alterations in xenobiotic metabolizing enzymes in brain and liver of rats coexposed to endosulfan and malathion. *J Appl Toxicol* 1990; 10:157-60.
- Sudakin DL, Mullins ME, Horowitz BZ, Abshier V, Letzig L. Intermediate syndrome after malathion ingestion despite continuous infusion of pralidoxime. *J Toxicol Clin Toxicol* 2002; 38:47-50.
- van Helden HP, Busker RW, Melchers BP, Bruijnzeel PL. Pharmacological effects of oximes: how relevant are they? *Arch Toxicol* 1996; 70:779-86.
- Verma RS, Srivastava N. Chlorpyrifos induced alterations in levels of thiobarbituric acid reactive substances and glutathione in rat brain. *Indian J Exp Biol* 2001; 39:174-77.
- Vidair CA. Age dependence of organophosphate and carbamate neurotoxicity in the postnatal rat: extrapolation to the human. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 196:287-302.
- Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1981; 77:325-33.
- Worek F, Reiter G, Eyer P, Szinicz L. Reactivation kinetics of acetylcholinesterase from different species inhibited by highly toxic organophosphates. *Arch Toxicol* 2002; 76:523-29.

Figure 1

Figure 1



K027



K048

Figure 2

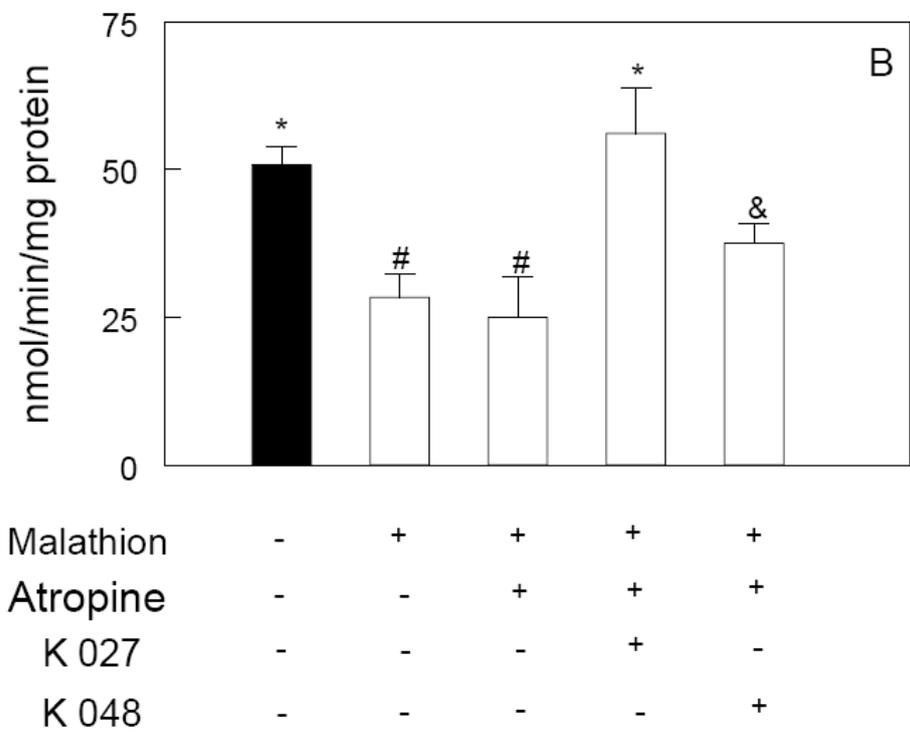
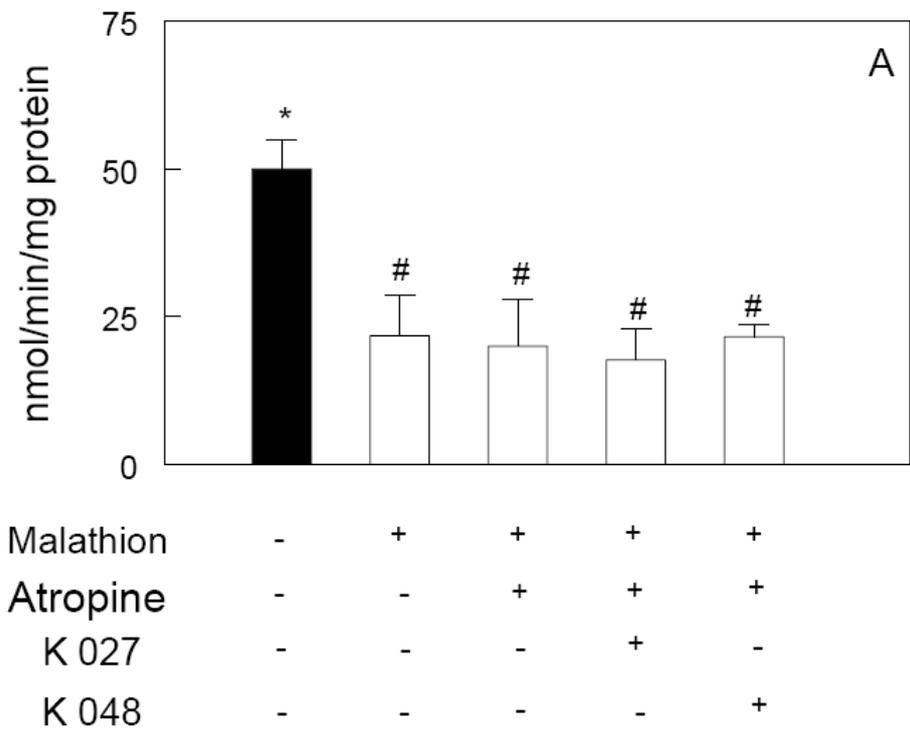


Figure 3

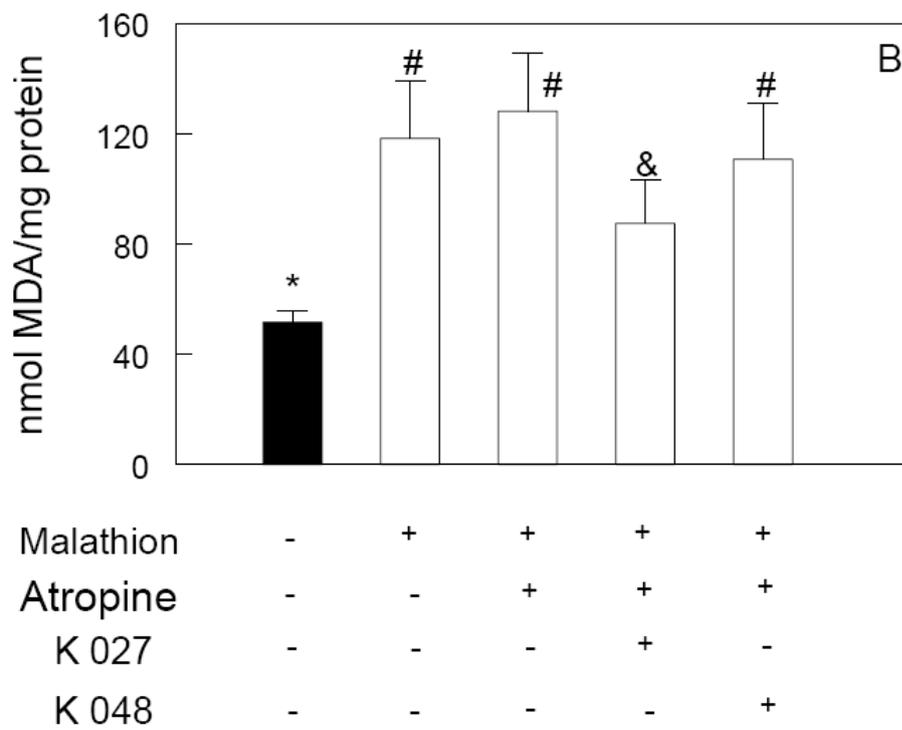
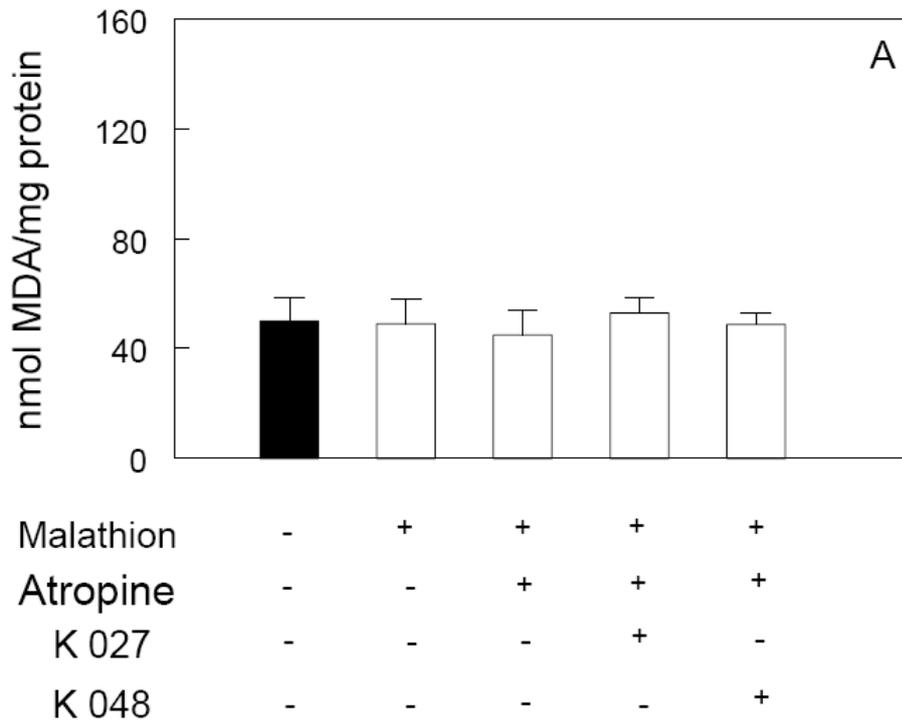


Table 1

Timepoint	Groups	GSH	GPx	GR
3 h	Control	42.7 ± 3.5	58.0 ± 6.7	89.9 ± 3.2
	Malathion	48.6 ± 4.6	45.6 ± 9.9	97.4 ± 5.8
	Malathion + Atropine	40.4 ± 4.5	44.3 ± 3.5	85.4 ± 4.4
	Malathion + Atropine + Oxime K 027	45.7 ± 4.3	53.1 ± 5.7	91.2 ± 3.0
	Malathion + Atropine + Oxime K 048	41.9 ± 2.2	44.9 ± 2.8	78.8 ± 7.3
24 h	Control	48.2 ± 5.0	43.5 ± 3.5	85.5 ± 7.9
	Malathion	42.9 ± 6.3	39.9 ± 3.4	82.3 ± 1.8
	Malathion + Atropine	42.0 ± 4.3	41.5 ± 5.5	82.4 ± 4.4
	Malathion + Atropine + Oxime K 027	48.4 ± 2.0	48.4 ± 3.6	86.3 ± 3.7
	Malathion + Atropine + Oxime K 048	39.2 ± 3.7	40.3 ± 1.3	82.8 ± 2.5

Referências Bibliográficas e Resumo para Base de Dados e Bibliografia anotada

SILVA, Aline Preve da. Avanços sobre a neurotoxicidade induzida pelo pesticida organofosforado malation em modelos experimentais com camundongos . Florianópolis. 2007. 108p. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Curso de Pós-Graduação em Neurociências. Universidade Federal de Santa Catarina.

O pesticida organofosforado (OF) Malation é um composto utilizado como inseticida em áreas urbanas e rurais. Sabe-se que a toxicidade dos OFs é atribuída à inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), causando neurotoxicidade tanto em humanos quanto em animais. Além da inibição da AChE, a toxicidade dos OFs está também relacionada com as propriedades pró-oxidantes desses compostos. Um dos objetivos deste trabalho foi investigar a contribuição exclusiva da exposição ao malation através do leite materno sobre a atividade da AChE, bem como sobre parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo (níveis de glutatona, peroxidação de lipídeos e atividade das enzimas glutatona peroxidase e glutatona redutase), no encéfalo de camundongos (genitoras e prole). As genitoras foram expostas ao malation através de injeções diárias e subcutâneas nas doses de 20, 60 e 200 mg/kg do peso corporal, durante o período lactacional (1º ao 21º dia pós-natal). Após a última injeção, dois animais de cada prole e suas respectivas genitoras foram sacrificados por decapitação. Removeu-se o encéfalo para a análise das variáveis bioquímicas. Os resultados mostraram que a exposição lactacional ao malation causou um alto efeito inibitório na atividade do AChE no cérebro da prole, mesmo quando as mães foram expostas à menor dose do malation (20 mg/kg). A atividade da AChE cerebral também foi inibida nas mães; entretanto, somente na dose mais elevada do composto (200 mg/kg). Nenhuma mudança foi observada nos parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo, tanto nas mães quanto nas proles. Esta fase do estudo mostra que a exposição (via lactação) de camundongos neonatos ao malation inibe a atividade da AChE no cérebro da prole. Este dado, somado ao fato de que os pesticidas OF são excretados no leite materno, torna relevante a exposição lactacional a estes xenobióticos em termos de interesses a saúde humana.

Sabe-se que o tratamento antídoto para a intoxicação por malation, que é baseado na combinação de atropina e um reativador da enzima acetilcolinesterase (principalmente a pralidoxima), não é suficientemente eficaz. Desta forma, o outro objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial efeito benéfico de duas oximas inéditas (K027 e K048) na reversão do efeito inibitório na atividade da AChE e na eliminação do estresse oxidativo em córtex pré-frontal de camundongos expostos ao malation. Para este propósito, utilizaram-se camundongos adultos. O malation foi administrado subcutaneamente na dose de 1 g/kg. As oximas inéditas K027 e K048 (1/4 da LD₅₀, dissolvidas em salina, i.p) foram administradas imediatamente após o malation e o sulfato de atropina (20 mg/kg, dissolvido em salina i.p). A atividade da AChE e os parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo (níveis glutatona, atividade da glutatona peroxidase e redutase, e peroxidação lipídica) foram avaliados no córtex pré-frontal destes camundongos em dois tempos diferentes (3 e 24 horas após a exposição). Os resultados do experimento mostraram que atividade da AChE cérebrotical de camundongos adultos foi consideravelmente inibida (em torno de 55 %) em 3 horas e se manteve inibida até 24 horas após a exposição ao malation. Nem a atropina nem as oximas foram capazes de eliminar a inibição da AChE cortical provocada pelo malation em 3 horas após o tratamento. A oxima K027 (em combinação com a atropina) impediu completamente a ocorrência de efeito inibitório do malation na atividade da AChE no córtex pré-frontal em 24 horas após o envenenamento. A oxima K048 (em combinação com a atropina) diminuiu significativamente, mas não completamente, o efeito inibitório do malation na atividade da AChE no córtex pré-frontal em 24 horas após envenenamento. A

exposição aguda ao OF malation causou um aumento significativo na peroxidação de lipídeos no córtex pré-frontal dos animais. O aumento da peroxidação lipídica foi observado somente em 24 h após a administração do malation. A oxima K027 foi capaz de diminuir notavelmente a peroxidação lipídica no córtex pré-frontal de camundongos adultos em 24 h após intoxicação com malation. Estes resultados demonstraram que as oximas inéditas K027 e K048 foram capazes de reativar a enzima AChE no córtex pré-frontal de camundongos expostos ao malation. Além disso, o efeito benéfico da oxima K027 sobre a peroxidação lipídica induzida pelo malation em 24 horas sugere uma possível ligação entre a superestimulação do sistema colinérgico e o estresse oxidativo no córtex pré-frontal de camundongos após a exposição ao malation. Tendo em vista que os tratamentos disponíveis (baseados em oximas) para intoxicações por malation parecem ser pouco eficazes, os dados do presente estudo são muito importantes porque apontam para as oximas assimétricas da série K como antídotos promissores para os casos de intoxicação por este pesticida.

Palavra- chave: malation; organofosforados; exposição lactacional; acetilcolinesterase; neurotoxicidade; oximas; estresse oxidativo.