

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

**DISFUNÇÃO RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL E ESTRESSE OXIDATIVO
APÓS EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO MALATHION**

Eduardo Harley Brandão Delgado

Criciúma

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**DISFUNÇÃO RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL E ESTRESSE OXIDATIVO
APÓS EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO MALATHION**

Eduardo Harley Brandão Delgado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade do Extremo Sul Catarinense como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Ambientais.

Área de Concentração: Ecologia e Gestão de Ambientes Alterados.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol

Criciúma

2006

RESUMO

O contínuo e crescente uso de inseticidas organofosforados, dentre estes, o malathion, expõe não só trabalhadores rurais, mas também, virtualmente, toda a população, aos seus efeitos tóxicos, sejam eles por exposição aguda ou crônica. Estudos realizados relacionam o surgimento de alterações neuro-comportamentais em trabalhadores rurais após intoxicação aguda e, também em trabalhadores que não relatam episódio de intoxicação aguda, mas estiveram expostos a esse inseticida por longo tempo. Outros trabalhos objetivam relacionar doenças neuro-degenerativas à disfunção mitocondrial e, esta ao estresse oxidativo e os radicais livres. O malathion foi aplicado via intraperitoneal em ratos Wistar durante 28 dias. Após este período os animais foram sacrificados e seu sistema nervoso central isolado, também foram isoladas as mitocôndrias. A ação inibitória do malathion sobre os complexos II e IV da cadeia respiratória nas mitocôndrias e o efeito deste composto sobre a peroxidação de lipídios e a produção de superóxido nas estruturas do SNC foram verificados espectrofotometricamente. As análises revelaram um aumento na produção de superóxido no hipocampo na dose de 150 mg/kg, além disso, observou-se também um incremento significativo na peroxidação de lipídios no hipocampo em todas as doses e no estriado nas doses de 100 e 150 mg/kg. O malathion inibiu a cadeia respiratória mitocondrial ao nível do Complexo IV no hipocampo nas doses 25, 50, 100 e 150 mg/kg. Concluindo, este estudo demonstra que a exposição ao malathion pode levar a uma situação de estresse oxidativo com concomitante disfunção mitocondrial e, sugere que esta situação possa estar relacionada a neurotoxicidade do malathion.

ABSTRACT

Continuous and increasing use of organophosphates insecticides, among these, malathion, exposes to its toxic effects, that could be by acute or chronic exposure, workers in agriculture and virtually, all the population, as well. Many studies have reported as a result of acute poisoning of agricultural workers and, also in workers who didn't report any episode of acute poisoning, but, they had been exposed to this insecticide for a long time, the onset of Neuro-behavioral alterations. Other works aimed to relate Neuro-degenerative diseases to mitochondrial dysfunction and, this to oxidative stress and free radicals. Malathion was applied intra-peritoneally in Wistar rats for 28 days. After this period the animals had been sacrificed and its CNS had been isolated, mitochondria had also been isolated. The inhibitory action of malathion upon complexes II and IV of the mitochondrial respiratory chain and the effect of this compound on the lipid peroxidation and the superoxide production in the structures of the CNS had been verified spectrophotometrically. The analyses had disclosed an increase in the superoxide production in hippocampus in the dose of 150 mg/kg, moreover it also observed a significant increment in the lipid peroxidation in hippocampus in all the doses and in the striatum in the 100 and 150 mg/kg doses. Malathion inhibited the mitochondrial respiratory chain at the level of Complex IV in hippocampus in doses 25, 50, 100 and 150 mg/kg. Concluding, this study demonstrates that the exposure to malathion can lead to a situation of oxidative damage with concomitant mitochondrial respiratory inactivation at level os complexes II and IV, suggesting that this situation can be related to the malathion neurotoxicity.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| Lista de Figuras..... | vi |
| Lista de Tabelas..... | vii |
| Lista de Abreviaturas..... | viii |
| I INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1 PESTICIDAS..... | 1 |
| 1.1 Malathion..... | 1 |
| 2 RADICAIS LIVRES..... | 2 |
| 2.1 Definição..... | 2 |
| 2.2 Fontes de radicais livres/ERO e os danos da sua ação..... | 8 |
| 2.2.1 Lipoperoxidação (LPO)..... | 9 |
| 2.2.2 Dano Protéico..... | 10 |
| 2.2.3 Dano ao DNA..... | 11 |
| 3 SISTEMAS ANTIOXIDANTES..... | 11 |
| 3.1 Sistemas não- enzimáticos..... | 11 |
| 3.2 Sistemas enzimáticos..... | 12 |
| 3.2.1 Superóxido dismutase (SOD)..... | 13 |
| 3.2.2 Catalase (CAT)..... | 13 |
| 3.2.3 Glutation Peroxidase (GPx)..... | 14 |
| 4 ESTRESSE OXIDATIVO..... | 14 |
| 5 ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR XENOBIÓTICOS..... | 16 |
| 6 ESTRESSE OXIDATIVO E DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL..... | 17 |
| II OBJETIVOS..... | 19 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 19 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 19 |
| CAPÍTULO I Mitochondrial respiratory dysfunction and oxidative stress after Chronic Malathion exposure..... | 20 |
| III. DISCUSSÃO..... | 37 |
| IV. CONCLUSÕES..... | 39 |
| V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 40 |

LISTA DE FIGURAS

I INTRODUÇÃO

| | |
|--|----|
| Figura 1. Representação estrutural do malathion..... | 2 |
| Figura 2. Centro catalítico da acetilcolinesterase de mamíferos..... | 2 |
| Figura 3. Bio-transformação do malathion..... | 3 |
| Figura 4. Reação tipo Fenton..... | 5 |
| Figura 5. Produtos do dano pelos radicais livres..... | 9 |
| Figura 6. Peroxidação de lipídeos..... | 10 |
| Figura 7. Sistemas de defesa antioxidante..... | 13 |
| Figura 8. Estresse oxidativo..... | 15 |

CAPÍTULO I

| | |
|---|----|
| Figure 1. Effect of malathion exposure on mitochondrial superoxide production in cortex, hippocampus, cerebellum and striatum of Wistar rats. Four doses of malathion (25, 50, 100 and 150 mg/kg), dissolved in saline solution (0,9% NaCl), were administered intraperitoneally (i.p.) route once a day for 28 consecutive days. All of control rats received injections of saline solution (0,9% NaCl). CNS structures were isolated and mitochondrial superoxide production was evaluated after treatments as described in Materials and Methods. Values are expressed as mean \pm SD of six animals in each group. * Different from control, $P < 0,05$ | 34 |
| Figure 2. Effect of Malathion exposure on lipid peroxidation in cortex, hippocampus, cerebellum and striatum of Wistar rats. Four doses of malathion (25, 50, 100 and 150 mg/kg), dissolved in saline solution (0, 9% NaCl), were administered intraperitoneally (i.p.) route once a day for 28 consecutive days. All of control rats received injections of saline solution (0,9% NaCl). CNS structures were isolated and lipid peroxidation was evaluated after treatments as described in Materials and Methods. Values are expressed as mean \pm SD of six animals in each group. * Different from control, $P < 0,05$ | 34 |

- Figure 3. Effect of malathion exposure on mitochondrial respiratory chain complex IV in cortex, hippocampus, cerebellum and striatum of Wistar rats. Four doses of malathion (25, 50, 100 and 150 mg/kg), dissolved in saline solution (0,9% NaCl), were administered intraperitoneally (i.p.) route once a day for 28 consecutive days. All of control rats received injections of saline solution (0,9% NaCl). CNS structures were isolated and mitochondrial respiratory chain complex IV activity was evaluated after treatments as described in Materials and Methods. Values are expressed as mean \pm SD of six animals in each group. * Different from control, $P < 0,05$ 35
- Figure 4. Effect of malathion exposure on mitochondrial respiratory chain complex II in cortex, hippocampus, cerebellum and striatum of Wistar rats. Four doses of malathion (25, 50, 100 and 150 mg/kg), dissolved in saline solution (0,9% NaCl), were administered intraperitoneally (i.p.) route once a day for 28 consecutive days. All of control rats received injections of saline solution (0,9% NaCl). CNS structures were isolated and mitochondrial respiratory chain complex II activity was evaluated after treatments as described in Materials and Methods. Values are expressed as mean \pm SD of six animals in each group.* Different from control, $P < 0,05$ 35
- Figure 5. Effect of malathion exposure on succinate dehydrogenase (SDH) activity in cortex, hippocampus, cerebellum and striatum of Wistar rats. Four doses of malathion (25, 50, 100 and 150 mg/kg), dissolved in saline solution (0,9% NaCl), were administered intraperitoneally (i.p.) route once a day for 28 consecutive days. All of control rats received injections of saline solution (0,9% NaCl). CNS structures were isolated and succinate dehydrogenase (SDH) activity was evaluated after treatments as described in Materials and Methods. Values are expressed as mean \pm SD of six animals in each group. * Different from control, $P < 0,05$36

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Manifestações clínicas decorrentes da exposição ao malathion.....3

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|--|
| Ach | acetilcolina |
| AChE | acetilcolinesterase |
| ATP | adenosina trifosfato |
| CAT | catalase |
| CCl ₄ | tetracloroeto de carbono |
| Cu-Zn-SOD | cobre-zinco-superóxido dismutase |
| DNA | ácido desoxirribonucleico |
| DNPH | dinitrofenilhidrazina |
| ERO | espécies reativas do oxigênio |
| Fe ²⁺ | íon ferroso |
| Fe ³⁺ | íon férrico |
| GPx | glutathiona peroxidase |
| GSSG | glutathiona dissulfeto |
| H ⁺ | próton hidrogênio |
| H ₂ O | água |
| H ₂ O ₂ | peróxido de hidrogênio |
| HO ₂ ⁻ | radical hidroperoxil |
| MDA | dialdeído malônico |
| Mn-SOD | manganês-superóxido dismutase |
| NADH | nicotinamida-adenina dinuclotídeo reduzida |
| NO [•] | radical óxido nítrico |
| ¹ O ₂ | oxigênio singlet |
| O ₂ | oxigênio molecular |
| O ₂ ^{•-} | radical superóxido |
| OH ⁻ | ânion hidroxila |
| OH [•] | radical hidroxil |
| ONOO ⁻ | peroxinitrito |
| SNC | sistema nervoso central |
| SOD | superóxido dismutase |
| TBA | ácido tiobarbitúrico |
| TBAR | substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico |

INTRODUÇÃO

1 PESTICIDAS

Pesticida é uma substância, formulação ou organismo vivo que é utilizado em todos os níveis do ambiente com o intuito de controlar ou erradicar pestes, como insetos, plantas indesejadas em determinadas culturas, roedores e insetos. O termo pesticida inclui inseticidas, herbicidas, rodenticidas, bem como desinfetantes e fumigantes. Estes compostos têm um papel vital no controle de pestes na agricultura, indústria, lares e na saúde pública. Devido aos seus benefícios à saúde pública e uma relação custo-benefício – benefício econômico - bastante vantajosa, nota-se, até hoje, certa tolerância por parte da sociedade como um todo, apesar do seu mau uso. Mau uso este, que leva a contaminação dos mananciais de água, solos, alimentos, animais silvestres e domésticos e também do homem.

O gasto mundial com pesticidas, em 2001, foi na ordem de US\$ 32 bilhões, sendo que 40% com herbicidas, seguido pelos gastos com inseticidas, fungicidas e outros pesticidas, respectivamente. Entre os inseticidas, os mais utilizados nos EUA, são os organofosforados, cerca de 70% do total de inseticidas. No Brasil, foram utilizadas 7.627 toneladas cúbicas de pesticidas em 2001 (USEPA, 2001; FAO, 2004).

Os organofosforados são substâncias químicas originalmente produzidas a partir da reação de álcoois e ácido fosfórico. Nos anos de 1940, eram utilizados como inseticidas que depois, foram utilizados como substâncias neurotóxicas na 2ª Guerra Mundial. Dentre os inseticidas organofosforados, o malathion é um dos mais utilizados.

1.1 Malathion

O Malathion (O, O-dimetil S1-2-di (etoxicarbonil) etilfosforoditioato) (Figura 1) é um inseticida organofosforado com ampla utilização na agricultura e uso domiciliar, bem como em programas de saúde pública no controle de vetores de doenças.

No Brasil, sendo ainda responsável por grande número de intoxicações e mortes. (SUCEN, 2004).

Como desdobramento das políticas governamentais para a agricultura e a adoção do modelo vigente – baseado principalmente na monocultura – o consumo desses agrotóxicos no país, no período compreendido entre 1991 e 2001, passou de 1.850 para 7.627 toneladas cúbicas (FAO, 2004).

Concomitante ao crescimento do consumo desses inseticidas, deu-se também o aumento das notificações de intoxicações por esses compostos. Foram notificadas ao Centro de Informações Toxicológicas de Santa Catarina (CIT-SC), no período de 1994 a 2003, 4067 intoxicações por agrotóxicos ou domissanitários, destas, 825 foram por organofosforados. No mesmo período foram registrados 199 óbitos em decorrência de intoxicação por agrotóxicos (UFSC-CIT/SC, 2004).

Este inseticida é um agente inibidor da acetil colinesterase (ACh), que exerce suas ações inibitórias irreversíveis, ao fosforilar o centro catalítico ativo da enzima, que contém serina (Figura 2). As manifestações clínicas da intoxicação aguda pelo malathion (Tabela 1) são causadas pelo acúmulo de Acetil-colina (ACh) nas sinapses e terminações nervosas. Fato este que acarreta a paralisia da transmissão colinérgica no SNC, nos gânglios autônomos, nas terminações nervosas para-simpáticas e nas junções neuro-musculares (TAYLOR, 2001).

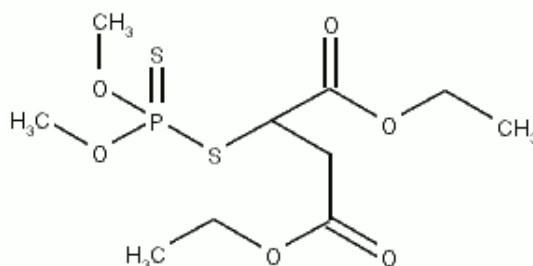


Figura 1. Representação estrutural do malathion. Adaptado de ATSDR (2003).

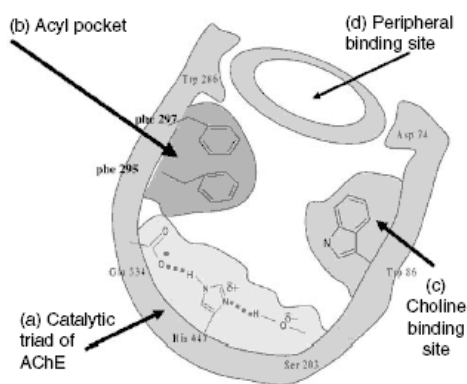


Figura 2. Centro catalítico da acetilcolinesterase de mamíferos. (ABOU-DONIA, 2003).

Tabela 1.

| | |
|--|---|
| <u>Efeitos cardiovasculares</u> | bradicardia hipotensão |
| <u>Efeitos gastrintestinais</u> | náuseas vômitos diarréia salivação excessiva |
| <u>Efeitos respiratórios</u> | dispnéia broncorréia |
| <u>Efeitos oculares</u> | miose lacrimejamento |

Fonte: ATSDR (2003).

A baixa toxicidade do malathion é atribuída à sua rápida detoxificação pelas carboxilesterases presentes no fígado e outros órgãos (TOS-LUT et al., 2003; BARNETT E RODGERS, 1994). O malathion é bio-transformado a malaixon e degradado rapidamente pelo corpo (Figura 3). Os efeitos agudos do malathion devem-se principalmente à sua pureza, via de administração e a dose (ExToxNet, 1998).

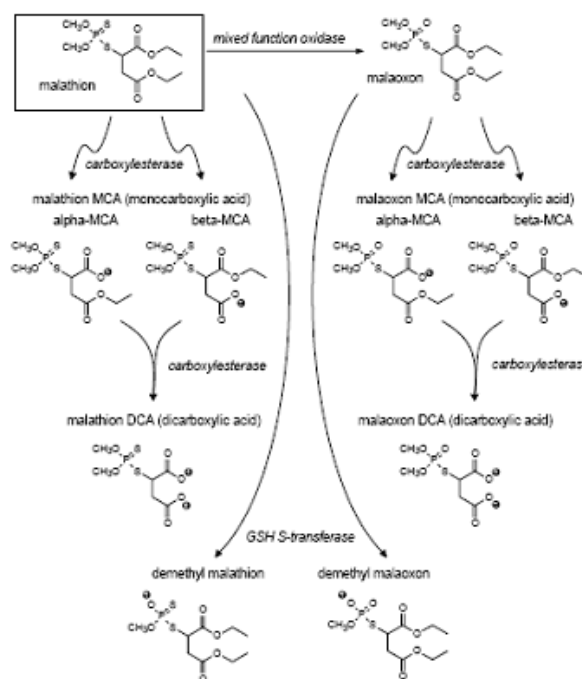


Figura 3. Bio-transformação do malathion. Adaptado de ATSDR (2003).

A utilização de quantidades cada vez maiores destas substâncias faz com que as pessoas sejam expostas, no ar que respiram, no alimento que comem e na água que bebem.

Além da neurotoxicidade colinérgica, os compostos organofosforados exercem sua ação neurotóxica por outras duas vias: OPIDN (do inglês, organophosphorus Ester-induced delayed neurotoxicity) e OPICN (do inglês, organophosphorus Ester-induced chronic neurotoxicity), que levam à morte neuronal, por necrose ou por um processo de apoptose retardado, dependendo do grau de exposição a estes compostos: uma única grande dose tóxica ou pequenas doses sub-clínicas respectivamente. Estas duas vias são caracterizadas por alterações neurológicas e neuro-comportamentais como mudanças freqüentes no humor, tendências suicidas, deficiências cognitivas e motoras, que podem ser exacerbadas pela exposição a situações de stress ou a substâncias que levam à morte de células neuronais ou ainda que desencadeiem processos de stress oxidativo e sem evidência de inibição da acetilcolinesterase (AChE) e suas manifestações clínicas (ABOU-DONIA, 2003; DAVIES, R., 2000; SALVI et al., 2003).

Um dos mecanismos para a toxicidade do malathion é formação de radicais livres que desencadeariam processos de dano oxidativo (ABDOLLAHI et al., 2004; JOHN et al. 2001).

Mecanismos bem estabelecidos apontam para ligações diretas entre o processo de envelhecimento, doenças degenerativas com a ação dos radicais livres causando dano oxidativo (HALLIWELL, 1999; SOHAL et al. 2002). Vários estudos têm demonstrado dano oxidativo às principais biomoléculas no cérebro de pacientes com Doença de Alzheimer e outras doenças neuro-degenerativas (HALLIWELL, 2001; LIU et al. 2003).

NAVA et al. (1999), descrevem ainda, outros efeitos neurotóxicos do malathion como: a presença de cefaléia, irritabilidade, insônia e fadiga crônica, sem que haja, no entanto, alteração simultânea da atividade da AChE.

Como efeitos da exposição, via dérmica, de ratos Sprague-Dawley ao Malathion, DEET (N, N-dietil-m-toluamida) e Permetrina ([(+/-) cis/trans-3-(2,2dicloro etenil)-2,2-dimetil ciclopropanol acido carboxílico (3-fenoxifenil) metil ester] foram demonstradas tanto modificações no âmbito neuro-comportamental - alterações nos testes de funções sensorial-motoras como beam-walking-score, beam-walking time, plano inclinado e grip response quanto evidências de

degeneração neuronal no cérebro, confirmadas pela diminuição da densidade dos neurônios que sobreviveram aos tratamentos, no cerebelo, hipocampo e outras regiões, sem, no entanto, produzir sinais visíveis de neurotoxicidade colinérgica (ABDEL-RAHMAN et al. 2004) .

A exposição ao malathion e seus metabólitos também pode ser relacionada a alterações bioquímicas como alterações cromossômicas (FLESSEL et al., 1993) e a dano sobre o DNA de linfócitos in vitro (BLASIAK et al., 1999).

PAZDERNIK et al. (2001), demonstram que ratos expostos ao Soman (O-2, 2- trimetilpropil metilfosfona fluorato), um potente agente inibidor da acetilcolinesterase, apresentavam após episódios convulsivos, aumento do Cálcio intracelular, edema celular e mobilização de íons metálicos. A mobilização de íons férricos poderia catalisar reações tipo Fenton (Figura 4), causando dano celular progressivo por meio de produtos de radicais livres.

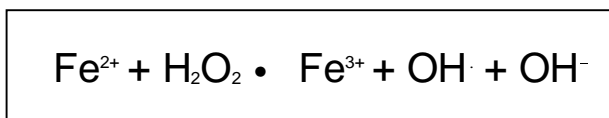


Figura 4. Reação tipo Fenton. IUPAC Compendium of Chemical Terminology 2003

Após a exposição a níveis sub-crônicos de malathion, observações do aumento de espécies reativas do ácido tio-barbitúrico (TBARS), do aumento na atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT) e ainda na concentração de Dialdeído Malônico (MDA), nos eritrócitos, saliva e fígado de ratos, apontam para um processo de stress oxidativo desencadeado por este composto. (AKHGARI et al., 2003; ABDOLLAHI et al., 2004).

CICCHETTI E ARGENTIN (2003), postulam a hipótese de que o dano sobre o DNA de fibroblastos pulmonares em cultura, expostos a fosphamidon ((EZ)-2-cloro-2-dietilcarbamoil-1-metilvinil dimetil fosfato), um inseticida organofosforado e dieldrin (1,2,3,4,10,10-hexacloro-6,7-epoxi-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidro-*endo*-1,4-*exo*-5,8-dimetanonaftaleno) possa ser decorrente da geração de radicais livres. Os autores fundamentam-se no seguinte fato: ao se adicionar inibidores das enzimas antioxidantes, catalase e glutaciona peroxidase – 3-aminotriazol e mercaptosuccinato, respectivamente - o dano observado sobre o

DNA destas células é maior do que na ausência destes inibidores, sugerindo que a via pela qual esses compostos danificam o DNA seja o stress oxidativo.

2 RADICAIS LIVRES

2.1 Definição

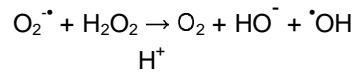
Um radical livre é definido como qualquer entidade química de existência independente que possui um ou mais elétrons não pareados em seu orbital mais externo e, portanto, capaz de participar de reações de transferência de elétrons (HALLIWELL, B., 1999; DRÖGE, 2002; URSO, 2003). A presença destes elétrons desemparelhados faz com que estes radicais apresentem-se altamente reativos, embora a reatividade destes, varie ao longo de um amplo espectro. São exemplos destes radicais, substâncias que podem apresentar o elétron livre centrado em átomos de oxigênio, nitrogênio, hidrogênio, carbono ou enxofre, além de átomos de metais de transição. Dada a sua alta reatividade estas substâncias podem infringir dano a diversas biomoléculas como lipídios, proteínas e os ácidos nucleicos (SHIGENAGA et al., 1994; HALLIWELL, 1999; GILGUN-SHERKI et al., 2002).

Muitas dessas espécies reativas são formadas quando da metabolização de xenobióticos a um ou mais de seus intermediários reativos. O que geralmente ocorre é a ruptura do sistema da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, que é, em última análise, quem metaboliza o oxigênio molecular. Espécies reativas do oxigênio (ERO) – que são radicais livres, podem então ser formadas (TURRENS, 2003). Estes incluem espécies como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila ($\cdot OH$), radicais hidroperoxil (HO_2^{\cdot}) e oxigênio singlet (1O_2).

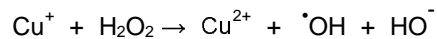
Radicais superóxido podem favorecer a formação de muitas outras espécies reativas, incluindo radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio e radicais hidroperoxil. O radical hidroxila é virtualmente o oxidante mais potente encontrado em sistemas biológicos e pode reagir prontamente com uma variedade de moléculas, tais como lipídeos, DNA e proteínas (KEYER AND IMLAY, 1996). Radicais hidroxila são formados via Reação de Fenton:



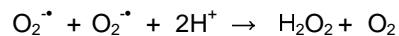
ou pela interação com o superóxido na Reação Haber-Weiss



Similarmente à Reação de Fenton, outros metais de transição reduzidos, como o cobre, interagem com o H_2O_2 para gerar $\cdot\text{OH}$:



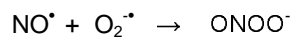
O peróxido de hidrogênio, por definição, não é um radical livre centrado no oxigênio, mas é uma ERO com potencial oxidativo. É um produto secundário da redução de um elétron do $\text{O}_2^{\cdot -}$:



Esta reação é denominada dismutação do superóxido e é catalisada pela superóxido dismutase (SOD) quase sempre a uma taxa de difusão limitada ($k=3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (MCCORD E FRIDOVICH, 1988). O oxigênio singlet assim como o H_2O_2 , não é um radical livre, apesar de possuir propriedades oxidantes. Apresenta uma meia-vida muito curta, embora sua formação em sistemas biológicos tenha sido longamente discutida, há evidências de sua ocorrência durante a fagocitose (BABIOR, 2000; KIM et al., 2004).

Juntamente com os radicais centrados no oxigênio, radicais centrados no carbono podem ser formados a partir da extração do hidrogênio de ligações insaturadas de ácidos graxos durante a peroxidação de lipídeos ou o metabolismo de certos xenobióticos (KEHRER, 1993; TURRENS, 2003).

Por fim, radicais centrados no nitrogênio ocorrem naturalmente em mamíferos e são utilizados em numerosos processos fisiológicos. Como exemplo pode-se citar o óxido nítrico (NO^{\cdot}) que é uma molécula sinalizadora para o sistema imune, é importante para diversos processos metabólicos e é um mensageiro parácrino (vaso-regulador). Excessos de NO^{\cdot} , todavia, podem resultar em citotoxicidade e dano tecidual, particularmente se reage com $\text{O}_2^{\cdot -}$ para formar peroxinitrito (ONOO^{\cdot}):



Peroxinitrito não é um radical livre, embora seja muito reativo e possa induzir uma reação em cadeia de eventos como dano biológico direto pela oxidação excessiva de grupamentos -SH (antioxidantes) e também levando à formação de óxido nítrico que é um potente iniciador da peroxidação dos lipídeos (HALLIWELL, 1999; LIOCHEV E FRIDOVICH, 1999).

2.2 Fontes de radicais livres/ERO e os danos da sua ação

Sob condições normais de metabolismo, a formação contínua de ERO e outros radicais livres é importante para várias funções fisiológicas (por exemplo, geração de ATP, processos metabólicos) e reações de redox celulares. Todavia, a produção excessiva de radicais livres pode ocorrer devido a fatores biológicos endógenos ou fatores ambientais exógenos, como exposição a agentes químicos, poluição ou radiação (De ZWART et al., 1999). As principais fontes endógenas de ERO são via: a) constituintes celulares solúveis (tais como tióis, metais de transição, epinefrina, metaloproteínas, hemoproteínas e flavoproteínas) que podem ativar o O_2 durante reações de auto-oxidação e liberar ERO (MISRA E FRIDOVICH, 1971); b) enzimas solúveis do citosol (tais como a xantina oxidase e ácido dihidro-orótico desidrogenase), que podem gerar ERO ($\text{O}_2^{\bullet-}$, $^{\bullet}\text{OH}$) através da redução do oxigênio molecular em suas vias catalíticas (HALLIWELL, 1999); c) enzimas de membrana (como a NADPH oxidase) e sistemas de transporte de elétrons (por exemplo, MFO), que podem deixar escapar ERO; d) enzimas do retículo endoplasmático que metabolizam xenobióticos (tais como a mono-oxigenase cyt P-450-dependente, cyt b_5 e citocromooxidases NADPH-dependentes), que podem também ativar o oxigênio molecular e permitir que o superóxido “vaze”; e) células fagocíticas envolvidas na inflamação, “respiratory burst” (tais como neutrófilos, macrófagos e monócitos) e na remoção de agentes tóxicos, que podem gerar ERO (HALLIWELL, 1999; YU, 1994); f) isquemia/reperfusão seguida de cirurgia ou bloqueio arterial, que podem aumentar significativamente os níveis de ERO (BERTUGLIA E GIUSTI, 2003); e g) inibição/redução das enzimas e moléculas do aparato antioxidante, o que reduz a capacidade do organismo lidar com níveis aumentados de radicais livres (HALLIWELL, 1999; COBB et al., 1996).

Níveis aumentados de radicais livres e ERO certamente levarão a uma situação de dano às biomoléculas que abrangem desde dano ao DNA, dano protéico e a peroxidação de lipídeos (Figura 5; KEYER AND IMLAY, 1996; KEHRER, 1993; TURRENS, 2003).

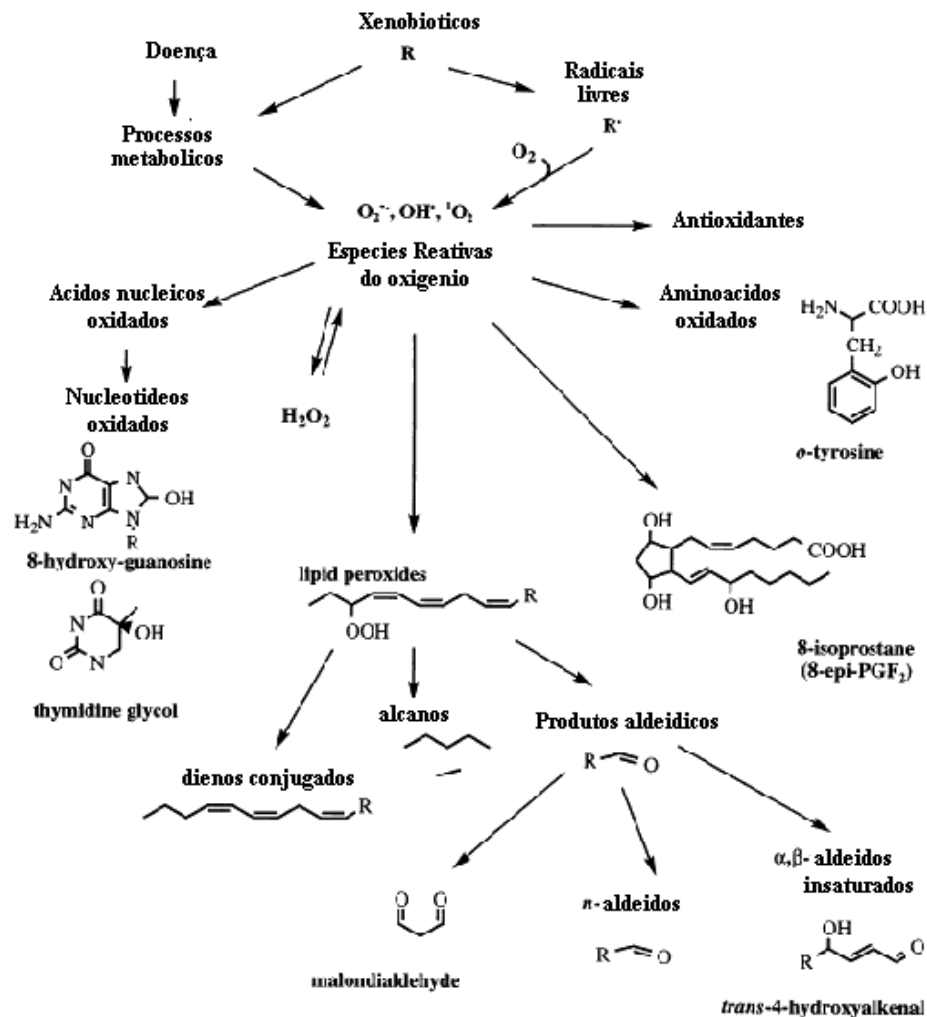


Figura 5. Produtos do dano pelos radicais livres. Os radicais livres podem reagir com diferentes macromoléculas celulares. Adaptado de (De ZWART Et al., 1999).

2.2.1 Lipoperoxidação (LPO)

As membranas que envolvem as células e suas organelas (mitocôndrias, lisossomos) são formadas em grande parte por proteínas e apresentam grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados – possuem pelo menos duas

ligações duplas carbono-carbono $> C=C <$. Quanto maior a especialização da membrana, maior a quantidade de proteína, por exemplo, enquanto a bainha axonal apresenta 20% de seu peso seco em proteínas, a membrana interna das mitocôndrias chega a apresentar 80% do peso seco em proteínas (HALLIWELL, 1999). A presença abundante de membranas fosfolipídicas nos locais onde os radicais, e mais precisamente ERO e radicais livres são formados, fazem destas, um alvo fácil para a ação destes radicais (Figura 6; De ZWART et al., 1999).

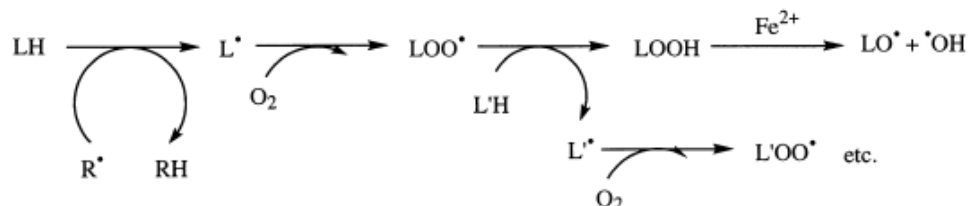


Figura 6. Peroxidação de lipídeos - reações em cadeia resultando na formação de muitos radicais peroxilipídicos. Adaptado de (De ZWART et al., 1999).

Em virtude dessas reações em cadeia, um radical (R^\bullet) como substrato, pode resultar na formação de muitos equivalentes de radicais peroxilipídicos (LOOH). E, pela propagação dessas reações nas membranas lipídicas geralmente são acompanhadas por uma ampla variedade de produtos, incluindo alcanos e compostos carbonilados (HALLIWELL, 1999; De ZWART et al., 1999).

As conseqüências biofísicas da peroxidação lipídica das membranas podem, em última instância, levar a danos irreversíveis tanto estruturais quanto funcionais das células e suas organelas, tendo a morte celular como resultado (RICHTER, 1987).

Os produtos resultantes da peroxidação de lipídios são parâmetros atrativos para a monitoração do dano causado pelos radicais livres e, um dos testes mais utilizados é a mensuração da formação de dialdeído malônico (MDA) pela reação com o ácido tio-barbitúrico (TBA) (GUTTERIDGE E QUINLAN, 1983; HALLIWELL E CHIRICO, 1993; HALLIWELL, 1999; De ZWART et al., 1999).

2.2.2 Dano Protéico

As proteínas estão presentes em grande quantidade e em todos os sistemas fisiológicos, assim sendo, podem ser e são alvos da ação deletéria dos

radicais livres e das ERO. As conseqüências da oxidação das proteínas são as mais diversas e nos mais diversos níveis: oxidação de cadeias laterais – que podem ser utilizados como bio-marcadores de dano oxidativo, formação de novas espécies reativas (peróxidos), liberação de radicais provocando reações em cadeia, dimerização ou agregação, mudanças conformacionais, danos estruturais e funcionais, efeitos sobre a regulação genética e sua expressão, modulação da sinalização celular e indução à necrose e apoptose (HAWKINS E DAVIES, 2001; DAVIES E TRUSCOTT, 2001). Um dos marcadores do dano oxidativo sofrido pelas proteínas são os resíduos carbonilados de aminoácidos como a histidina, arginina, cisteína, metionina e prolina (DEAN et al., 1997) que podem ser mensurados pela reação com a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (DAS et al., 2001).

2.2.3 Dano ao DNA

Espécies reativas do oxigênio, principalmente os radicais $\cdot\text{OH}$ (HALLIWELL, 1999) podem atacar quase todas as estruturas celulares ou moléculas. Todavia, com respeito ao envelhecimento e ao câncer, o DNA é o alvo maior. (AMES E GOLD, 1991). As ERO podem causar ligações cruzadas entre DNA e proteínas, dano à estrutura das desoxirriboses-fosfato, bem como modificações químicas das bases purínicas e pirimidínicas (DIZDAROGLU, 1991; SHIGENAGA E AMES, 1991; De ZWART et al., 1999).

3 SISTEMAS ANTIOXIDANTES

O organismo tem ao seu dispor inúmeros sistemas de defesa celular que, sob condições metabólicas normais, regulam os níveis das ERO e protegem dos efeitos deletérios destes radicais. HALLIWELL, 1999, define antioxidante como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, retarda significativamente ou previne a oxidação deste substrato. Deste modo, as reações em cadeia propagadas pelas ERO são impedidas, protegendo biomoléculas e membranas dos efeitos adversos inerentes a estas substâncias altamente reativas.

Os sistemas antioxidantes são numerosos e complexos podendo ser enzimáticos ou não-enzimáticos conforme a sua estrutura.

3.1 Sistemas não-enzimáticos

As defesas primárias consistem de dois grupos, os compostos antioxidantes e as enzimas que transformam radicais livres em outros radicais menos reativos ou, neutralizam totalmente estes radicais absorvendo sua energia de excitação (Figura 7). Compostos antioxidantes incluem macromoléculas como a albumina, ceruloplasmina e ferritina; e uma coleção de pequenas moléculas, incluindo, ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, ubiquinol-10, glutathiona reduzida, metionina, ácido úrico e bilirrubina (DAVIES, 1986; YU, 1994; CAO E PRIOR, 1998).

A albumina é um importante antioxidante extracelular. Liga-se a heme grupamentos e íons Cobre. Albumina -SH reage rapidamente com o ácido peroxinitroso e HOCl, e lentamente com H_2O_2 (HALLIWELL, 1999; QUINLAN et al., 2004). A ferritina apresenta-se como fator protetor contra injúria oxidativa endotelial ao seqüestrar ferro livre do citosol inibindo a citólise mediada pelos pro - oxidantes (BALLA et al. 1992; OBERLE et al. 1998). Vitamina E – α -tocoferol, está inserida na membrana celular onde atua como antioxidante, na qual efetivamente inibe a peroxidação de lipídios, convertendo $\cdot OH$, $O_2^{\cdot -}$ e $LOO^{\cdot -}$ em formas menos reativas (PACKER et al. 2001). A vitamina C – ácido ascórbico – também atua como efetivo antioxidante extracelular devido a sua natureza hidrofílica e sua ampla distribuição no corpo. Ela retira $\cdot OH$, $O_2^{\cdot -}$, neutraliza oxidantes advindos dos neutrófilos e ainda favorece a regeneração da vitamina E do seu estado oxidado (HALLIWELL, 1999; MENDIRATTA et al, 1998). Sendo lipofílico o β -caroteno pode retirar radicais $O_2^{\cdot -}$, ou reagir com radicais peroxil. O ácido úrico é hidrofílico e retira $\cdot OH$, $O_2^{\cdot -}$ e radicais peroxil, além de ligar-se à metais de transição prevenindo a oxidação da vitamina C (SEVANIAN et al. 1991). A glutathiona é um tripeptídeo hidrofílico que é crítico para o ciclo redox e para regulação enzimática. Reage diretamente com $\cdot OH$, $O_2^{\cdot -}$, ou radicais livres orgânicos (R^{\cdot} , $RCOO^{\cdot}$) e também é fundamental nos processos de detoxificação no metabolismo dos xenobióticos (YU, 1994; HALLIWELL, 1999).

3.2 Sistemas enzimáticos

As principais enzimas antioxidantes incluem superóxido dismutase, catalase, glutathiona peroxidase e glutathiona redutase.

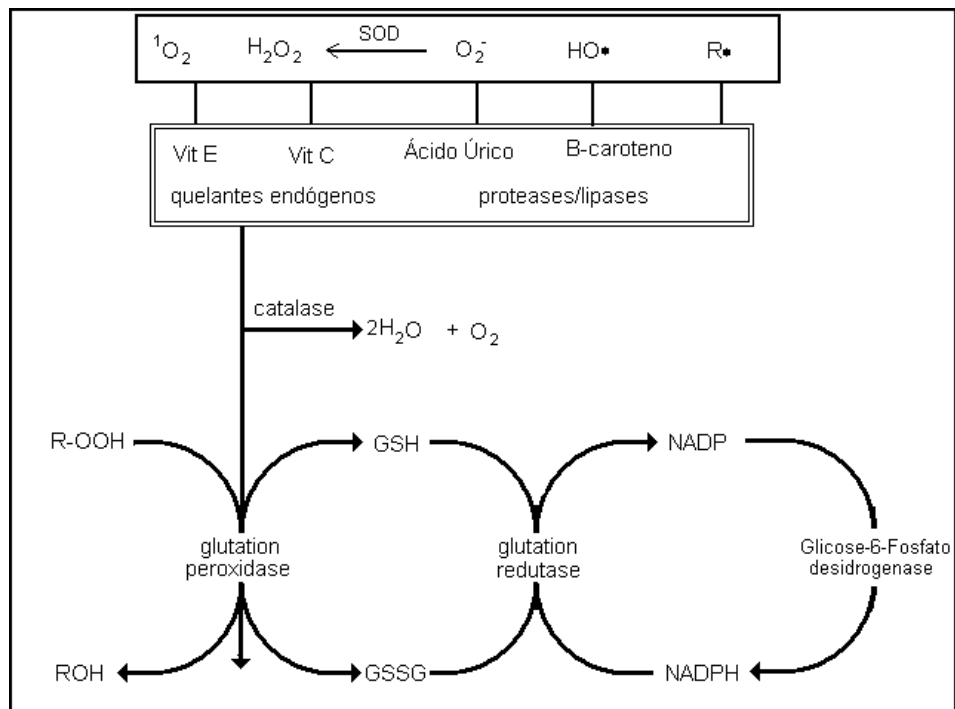


Figura 7. Sistemas de defesa antioxidante. Adaptado de KEHRER, 1993.

3.2.1 Superóxido dismutase (SOD)

Esta metaloenzima dismuta o ânion superóxido, formando H_2O_2 e O_2 . (FRIDOVICH, 1995). A atividade da SOD varia entre os tecidos, mas atividades mais expressivas são observadas no fígado, glândula adrenal, rim e baço.

Ocorre em três formas diferentes dependendo da sua localização e do metal componente. Mn-SOD com manganês no seu sítio ativo é encontrada na matriz mitocondrial e elimina $\text{O}_2^- \cdot$ formado na matriz ou no lado interno da membrana mitocondrial interna. Sua expressão é induzida por agentes causadores de estresse oxidativo, incluindo radiação e hiperóxia (PITKÄNEN E ROBINSON, 1996; DAS et al., 1995). Cu-Zn-SOD apresenta os metais cobre e zinco no seu sítio ativo e é eminentemente encontrada no citosol, embora possa ser encontrada também em lisossomos e no espaço intermembranas mitocondrial (MCCORD E FRIDOVICH, 1969; FRIDOVICH, 1995).

3.2.2 Catalase (CAT)

A CAT é uma heme proteína presente nos peroxissomos de quase todas as células aeróbicas, protegendo estas células dos efeitos deletérios do H_2O_2 catalisando sua decomposição em O_2 e H_2O sem a produção de radicais livres (VAINSHTEIN et al., 1981). Esta enzima é mais eficaz em concentrações de H_2O_2 relativamente mais altas, enquanto que em concentrações micromolares a glutatión peroxidase catalisa a reação muito mais eficientemente (YU, 1994).

3.2.3 Glutathione Peroxidase (GPx)

Atua nos mecanismos envolvidos na proteção do corpo frente ao estresse oxidativo. É um tripeptídeo, L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina, selênio-dependente que catalisa a conversão da glutatión reduzida a dissulfeto de glutatión, removendo H_2O_2 e formando H_2O e também faz a decomposição de hidroperóxidos orgânicos (SIES, 1999). A glutatión redutase catalisa a redução de dissulfetos de baixo peso molecular (como o GSSG – dissulfeto de glutatión) utilizando NADH como fonte de um elétron (YU, 1994).

4 ESTRESSE OXIDATIVO

A despeito dos inúmeros sistemas de defesa antioxidantes, a geração de radicais livres tem o potencial de desencadear uma situação de estresse oxidativo.

A ocorrência das ERO, também conhecidas como prooxidantes, é uma consequência natural do metabolismo aeróbico. A taxa de formação dos pró-oxidantes é balanceada por uma taxa similar de retirada destes, pelos antioxidantes, que podem ser enzimáticos e/ou não enzimáticos. Sendo assim, Estresse Oxidativo pode ser definido como o desequilíbrio na relação pró-oxidantes versus antioxidantes (Figura 8), em favor dos pró-oxidantes, resultando em dano às biomembranas, ao DNA, inchaço e lise mitocondrial e peroxidação de lipídios (SIES, 1991; AMES et al.; HALIWELL, 1999).

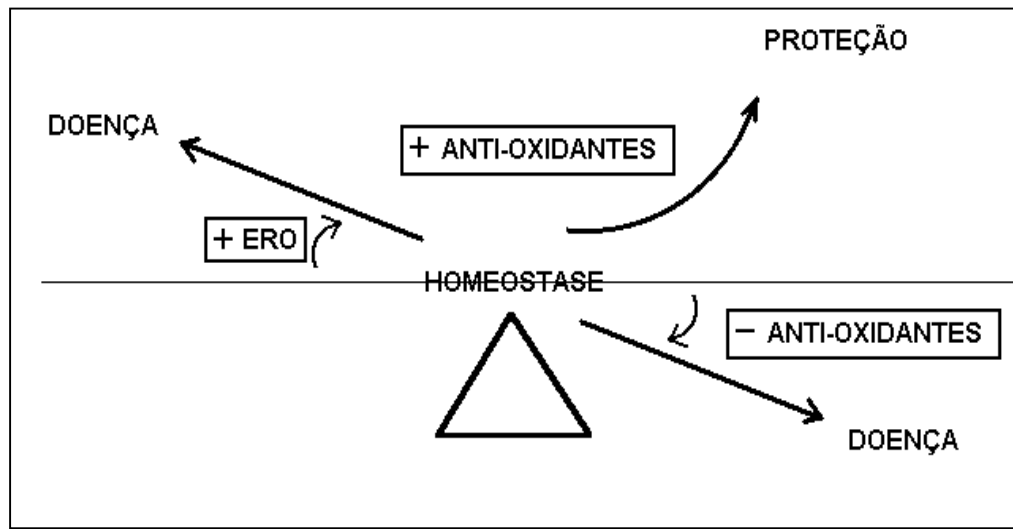


Figura 8. Estresse Oxidativo

A princípio, o estresse oxidativo pode resultar de: a) Defesas antioxidantes diminuídas, por exemplo, mutações que afetem enzimas antioxidantes (CuZnSOD, MnSOD ou glutathion peroxidase (GPx); b) Produção aumentada de ERO, pela exposição a níveis elevados de oxigênio ou pela presença de toxinas que ao serem metabolizadas produzem ERO (HALLIWELL, 1999).

O estresse oxidativo pode resultar em adaptação e lesão ou morte celular.

- a) *Adaptação*: Em resposta a inúmeros tipos de estímulo, células e organismos podem detectar o mesmo grau de mudança em um mesmo sinal dentro uma larga faixa de estímulos. Isso requer que as células-alvo sofram um processo reversível de adaptação, ou dessensibilização, enquanto que a exposição a estímulos prolongados, faz com que a resposta da célula àqueles níveis de exposição sejam menores (ALBERTS et al., 2002). Em cenários de estresse oxidativo moderado, a resposta celular pode ser no sentido de uma regulação positiva da síntese de sistemas antioxidantes de defesa na tentativa de restabelecer o equilíbrio pró-oxidantes versus antioxidantes. Todavia, nem todos os processos de adaptação ao estresse oxidativo envolvem aumento das defesas antioxidantes. Uma célula exposta a um estresse oxidativo severo pode morrer (HALIWELL, 1999; MELOV, 1999).
- b) *Injúria celular*: Pode ser definida como um estímulo físico ou químico, tanto em excesso quanto deficiente que altera, transitória ou permanentemente, a homeostase celular (NICOTERA E ORRENIUS, 1994). Aquelas células que,

quando submetidas ao estresse oxidativo não forem capazes de adaptar-se, sofrerão injúrias no âmbito de biomoléculas, como DNA, proteínas e peroxidação dos lipídios. Podem ser observados também, efeitos sobre o metabolismo do cálcio (HALIWELL, 1999; PAZDERNIK et al., 2001).

- c) *Morte celular*. Em situações de homeostase a morte celular é programada, por um processo denominado apoptose, que é uma seqüência bem definida de modificações morfológicas. Células neste processo primeiro encolhem, a seguir condensam e então fragmentam-se, liberando assim, os corpos apoptóticos, sem no entanto, liberar os constituintes intra-celulares para o meio extra-celular. A liberação desses constituintes poderia acarretar efeitos deletérios para as células adjacentes. Ao contrário, aquelas células que morrem em resposta ao dano tecidual apresentam modificações morfológicas de grande diversidade, processo denominado de necrose. Neste processo as células incham pra depois sofrerem uma citólise, liberando os constituintes extracelulares que, geralmente causarão danos às células vizinhas e causando resposta inflamatória (HALLIWELL, 1999; LODISH et al., 2000; KERN E KEHRER, 2005).

Com a liberação do conteúdo intracelular, alguns pró-oxidantes como íons Ferro e Cobre, além de grupamentos protéicos do tipo heme, podem criar um ambiente de estresse oxidativo para as células adjacentes. O processo de apoptose pode ainda ser acelerado em condições de estresse oxidativo (HALLIWELL, 1999). A exposição prolongada a determinados xenobióticos como drogas anticâncer e pesticidas desencadeiam processos de estresse oxidativo com concomitantes dano e morte celular (TURRENS, 2003).

5 ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR XENOBIÓTICOS

Como já foi mencionada, a maior fonte de radicais livres orgânicos e ERO, é endógena, particularmente via metabolismo e bioativação de xenobióticos ou a reatividade do composto original. A conseqüência de concentrações aumentadas de radicais livres tanto pode ser a lesão celular como a perda da função fisiológica. Muitos compostos já foram relacionados como indutores da produção de radicais

livres e têm o potencial de promover estes tipos de lesão. Por exemplo, diquat e paraquat, herbicidas bupiridílicos, induzem a formação intracelular de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 (YUMINO et al., 2002; BONNEH-BARKAY et al., 2005). Também, o CCl_4 , tetracloreto de carbono por dehalogenação forma um radical reativo triclorometil. Este metabólito interage com biomoléculas e pode abstrair H^+ das membranas e gerar mais radical livre (HALLIWELL, 1999). Adriamicina forma complexos Fe-antraciclina que geram radicais livres com severos danos à membrana celular (MUKHERJEE et al. 2003). Por fim, outros compostos como a bleomicina, um agente quimioterápico, e o etanol tem a capacidade de induzir toxicidade via ativação do oxigênio molecular (BOWLER et al., 2002).

Estes são somente alguns dos inúmeros xenobióticos que têm sido implicados na indução ou promoção de estados de estresse oxidativo.

6 ESTRESSE OXIDATIVO E DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL

Uma vez estabelecidas ligações coerentes entre a intoxicação por organofosforados e a produção de radicais livres com concomitante estresse/dano oxidativo, busca-se agora investigar a origem destes. Muitos autores defendem a hipótese de ser a mitocôndria, a maior fonte das espécies reativas de oxigênio no compartimento intracelular, via cadeia respiratória.

As células humanas apóiam sobre a produção de ATP pela mitocôndria, a execução de seus processos de crescimento, diferenciação e respostas aos estímulos do ambiente (LEE, 2002).

Pelo fato do metabolismo mitocondrial não ser responsável apenas pela geração de energia, mas também de radicais livres, foi sugerido que defeitos mitocondriais, congênitos ou adquiridos, poderiam ser a causa de degeneração neuronal como conseqüência de defeitos no metabolismo energético ou por ação de radicais livres (BEAL, 1998).

A interação de vários xenobióticos com a cadeia de transporte de elétrons leva a um aumento nas taxas de superóxido através de dois diferentes mecanismos: 1) Alguns desses compostos estimulariam o estresse oxidativo ao bloquearem o transporte de elétrons, diminuindo a disponibilidade de carreadores em níveis acima do local da inibição. Outros, porém, estimulariam a produção de superóxido, ao aceitarem um elétron de um carreador da cadeia respiratória e

depois fazendo a transferência deste elétron para o O₂, estimulando a formação de superóxido sem, no entanto, inibir a cadeia respiratória. Ao longo dos últimos 40 anos vários laboratórios identificaram uma variedade de fontes mitocondriais de superóxido, incluindo complexos da cadeia respiratória e enzimas (TURRENS, 2003) .

O dano oxidativo sobre a mitocôndria tem sido implicado em muitas doenças. Dentre os eventos oxidativos implicados no estresse oxidativo mitocondrial estão a alteração nos lipídios mitocondriais (por exemplo, a cardiolipina), DNA mitocondrial, e proteínas mitocondriais (aconitase, proteína desacopladora 2) (FARISS et al., 2005).

A mitocôndria é o alvo sub-celular primário dos compostos organofosforados que inibem a atividade enzimática, a cadeia respiratória, a geração de ATP, além de causarem alterações estruturais da matriz – mitochondrial swelling (CARLSON E EHRICH 1999; TOS-LUTY et al., 2003) .

A formação de grande parte de superóxido no cérebro, sob condições normais, pode ser atribuída, primariamente, ao Complexo I da cadeia respiratória. Além do mais, o Complexo I é a fonte primária de ROS em uma variedade processos patológicos que abrangem desde o processo de envelhecimento até a Doença de Parkinson. (BARJA E HERRERO 1998; BARJA 1999).

GASSNER et al. (1997) demonstraram que inseticidas piretróides inibem a cadeia respiratória em mitocôndrias de ratos na altura do Complexo I.

Rotenona, inseticida e inibidor da cadeia respiratória ao nível de Complexo I, em doses subletais, favorece a formação de superóxido que, por sua vez, desencadeia um processo de apoptose que têm como resultado, a Doença de Parkinson, ou ainda, pela mesma via de inibição da cadeia de transporte de elétrons, é responsável pela formação de depósitos de α -sinucleína no cérebro, similares aos encontrados na amiloidose, sugerindo que o complexo I possa ter importante papel em outras neuropatias. (TROJANOWSKI 2003; SHERER et al. 2003a; SHERER et al. 2003b).

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a relação entre a intoxicação crônica por malathion, dano oxidativo mitocondrial e inativação da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial no nível dos complexos II e IV.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a produção de superóxido nas diversas estruturas do SNC de ratos submetidos ao tratamento crônico com malathion.
- Verificar se o tratamento crônico com malathion tem efeito sobre a peroxidação de lipídios das mitocôndrias das estruturas do SNC dos ratos.
- Avaliar os efeitos da intoxicação crônica por malathion sobre a cadeia respiratória mitocondrial.

CAPÍTULO I

MITOCHONDRIAL RESPIRATORY DYSFUNCTION AND OXIDATIVE STRESS AFTER CHRONIC MALATHION EXPOSURE

Eduardo H. B. Delgado, Emílio L. Streck, João Quevedo, Felipe Dal-Pizzol

Toxicology (2006), submitted

**MITOCHONDRIAL RESPIRATORY DYSFUNCTION AND
OXIDATIVE STRESS AFTER CHRONIC MALATHION
EXPOSURE**

Eduardo H. B. Delgado¹, Emílio L. Streck³, João Quevedo², Felipe Dal-Pizzol¹

¹Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul
Catarinense, 88806-000, Criciúma, SC, Brasil.

²Laboratório de Neurociências, Universidade do Extremo Sul Catarinense,
88806-000, Criciúma, SC, Brasil;

³Laboratório de Bioquímica Experimental, Universidade do Extremo Sul
Catarinense, 88806-000, Criciúma, SC, Brasil;

Corresponding author. Prof. Felipe Dal-Pizzol, M.D., Ph.D – Laboratório de
Neurociências, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000,
Criciúma, SC. Phone: 55 48 3431 2579. E-mail: piz@unesc.net

ABSTRACT

Malathion is a pesticide used in large scale and with high potential risk for human exposure. However, it is reasonable to hypothesize that during the Malathion metabolism reactive oxygen species (ROS) can be generated and a subsequently onset of an oxidative stress situation in CNS structures: hippocampus, cortex, striatum and cerebellum of intoxicated rats due to mitochondrial respiratory chain dysfunctions. The present study was therefore, undertaken to evaluate malathion-induced lipid peroxidation (LPO), superoxide production from sub-mitochondrial particles and the activity of complexes II and IV of the mitochondrial respiratory chain. Malathion was administered in doses of 25, 50, 100 and 150 mg malathion/Kg. After Malathion exposure we could demonstrate an increased LPO in hippocampus (all doses) and striatum (100 e 150 mg/Kg). This was accompanied by an increase in superoxide formation in sub mitochondrial particles in hippocampus. Complex IV suffered significantly inhibition of its activity. We could demonstrate in this study that Malathion induces oxidative stress and it could be due to inactivation of mitochondrial respiratory complexes.

Key Words: Malathion, Oxidative stress, superoxide, mitochondria, respiratory chain complexes.

INTRODUCTION

Organophosphorus insecticides had been recognized initially for their inhibition of the cholinergic transmission in the mammals (Forsyth and Chambers, 1989). Studies demonstrate other effects of these insecticides in the biochemical scope, without however, to be related directly to the inhibition of AChE (Brown and Brix, 1998; Abou-donia, 2003). In this way, the exposure to some xenobiotics as anti-cancer drugs and pesticides triggers processes of oxidative stress with concomitant damage and cellular death (Turrens, 2003).

Malathion (O-dimethyl S1-2-di (etoxy-carbonyl) ethylphosphorodithioate) is an organophosphorus insecticide widely used in agriculture and houses, as well as in programs of public health in the control of vectors of diseases, being still responsible for great number of poisonings and deaths, mainly in developing countries (WHO, 2003). Recent studies relate the acute and chronic exposition to Malathion and its effect to the induction of oxidative stress in the blood and liver of rats (Abdollahi et al., 2004; Akhgari et al. 2003; Banerjee et al. 1999).

Mitochondria is the primary sub-cellular target of the organophosphorus compounds, that inhibit the enzymatic activity, the ATP generation, besides causing structural alterations of the matrix and mitochondrial swelling (Carlson & Ehrich, 1999; Tos-luty et al., 2003). Mitochondrial metabolism is responsible not only for the generation of energy, but also of free radicals (Beal, 1998). Thus, some studies suggest that the exposure to a wide range of pesticides could result in the production of free radicals and the inactivation of components of the mitochondrial respiratory chain (Barja & Herrero 1998; Barja 1999; Gassner et al. 1997; Turrens, 2003).

In this way, the aim of this study was to determine if it has relationship between the sub-acute poisoning with Malathion, the induction of oxidative stress and concomitant dysfunction of the mitochondrial respiratory chain to the level of complexes II and IV, in different regions of the CNS of rats.

MATERIALS AND METHODS

In vivo studies were performed in accordance with National Institutes of Health guidelines and with the approval of the ethics committee of Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil.

Animals

A total of 30 male Wistar rats (age, 2-3 months; weight, 250-320 g) were used (n=6). They were housed five to cage to a cage with food and water available ad libitum, and were maintained on a 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 am) in a temperature controlled (22°C) colony room. These conditions were maintained constant throughout the experiments.

Treatment

Four doses of malathion (25, 50, 100 and 150 mg/Kg), dissolved in saline solution (0,9% NaCl), were administered intraperitoneally (i.p.) once a day for 28 consecutive days. All of control rats received injections of saline solution (0,9% NaCl).

Oxidative stress analysis

Wistar rats were killed by decapitation 24 h after the last Malathion administration. Brains were removed from the skulls and the cortex, striatum, hippocampus and cerebellum were dissected and homogenate. An aliquot of these homogenates were immediately stored at – 80°C to the determination of mitochondrial respiratory chain activities (see above). An aliquot of these homogenate was used to the isolation of sub-mitochondrial particles to the determination of lipid peroxidation and superoxide production (see above). All the results were normalized by the protein content (Lowry et al., 1951)

As an index of lipid peroxidation we used the formation of TBARS during an acid-heating reaction, which is widely adopted as a sensitive method for measurement of lipid peroxidation (LPO), as previously described (Draper and Hadley, 1990). Briefly, the samples were mixed with 1 mL of trichloroacetic acid

10% and 1 mL of Thiobarbituric acid 0,67%, then heated in a boiling water bath for 15 minutes. TBARS were determined by the absorbance at 535 nm.

Mitochondrial superoxide production from adrenaline auto-oxidation in sub-mitochondrial particles incubated with succinate were measured spectrophotometrically as previously described (MISRA & FRIDOVICH, 1972).

Mitochondrial respiratory chain analysis

Activities of the mitochondrial respiratory chain enzymatic complexes: The complex II + succinate dehydrogenase (SDH) activities will be measured by the 2,6-DCIP decrease in absorbance at 600 nm as previously described (FISCHER et al., 1985). For the calculation of the SDH the same incubation system will be used, in the presence of phenazine metasulphate. The activity of complex IV will be determined in accordance with Rustin et al. (1994), and the oxidation of reduced cytochrome c will be evaluated by the decrease in absorbance at 550 nm.

Reagents

Thiobarbituric acid, dinitrophenylhydrazine, adrenaline, succinate, 2,6 – DCIP, phenazine metasulphate and cytochrome c were purchased from Sigma, St. Louis, MO, USA.

Statistical analysis

Results are expressed as means: *P* values were considered significant when $P < 0,05$. Differences in experimental groups were determined by one-way analysis of variance (ANOVA). Comparison between means was carried out using Newman-Keuls test.

RESULTS

Mitochondrial superoxide production

We demonstrated a significantly increase in superoxide production from sub-mitochondrial particles only in the hippocampus (150 mg/kg). In contrast, in all other CNS structures analyzed we could not demonstrate differences between control and Malathion exposed animals (Figure 1).

Measurement of TBARS

In our study, TBARS concentration in sub mitochondrial particles was significantly increased in hippocampus (all doses) and striatum (100 e 150 mg/kg), but not in the cortex and cerebellum (Figure 2).

Measurement of Complex IV activity

Malathion treatment decreased complex IV activity in hippocampus (all doses). In contrast, in the striatum we demonstrated an increase in the activity of complex IV (50, 100 e 150 mg/kg). None alterations were observed in the cortex and cerebellum (Figure 3).

Measurement of Complex II and succinate dehydrogenase (SDH) activities

Complex II and SDH activities were not different from control in all doses and structures analyzed (Figure 4 and Figure 5).

DISCUSSION

Various experimental models have described the implications of oxidative stress on the physiology/pathology of the brain (ABOU-DONIA, 2003; DAVIES et al., 2000; SALVI et al., 2003). CNS structures have the propensity to suffer significant oxidative damage due to its lipid composition, which is easily oxidized due to its high oxygen consumption and relatively low concentration of antioxidant substances (HALIWELL, 1999; De ZWART et al., 1999; MATES, 2000).

Accordingly, this work primarily attempted to investigate the degree of oxidative damage imposed by the chronic exposition to Malathion in terms of superoxide production and lipid peroxidation. In the present study, we demonstrate

that there is an increase of the superoxide production in the hippocampus of rats sub-acute exposed to malathion (150 mg/kg), as well as an increase of the lipid peroxidation, in the hippocampus (25, 50, 100 and 150 mg/kg) and in the striatum (100 and 150 mg/kg). Neuro-behavioral alterations are attributed to the exposure to Malathion (ABDEL-RAHMAN et al., 2004; SALVI et al., 2003; UNESC, unpublished data) and the demonstrated oxidative damage to brain mitochondria could, in part, be responsible to these behavioral effects of Malathion exposure.

Evidences show that mitochondria are the preferential sub-cellular target of the organophosphorus insecticides and also as generating source of free radicals (CARLSON AND EHRICH, 1999; TOS-LUTY et al., 2003; BEAL, 1998). During several xenobiotics metabolism, interactions between xenobiotics and the mitochondrial respiratory chain could happen. In this way superoxide could be generated by the blockade of electron transport chain or they may accept an electron from a respiratory carrier and transfer it to molecular oxygen stimulating superoxide formation (TURRENS, 2003). Previous works had been able to demonstrate increases in the superoxide production due to the inhibition of the respiratory chain to the level of the complex I. Moreover the complex I are the primary source of ROS in a variety of pathological processes (BARJA and HERRERO 1998; BARJA 1999; GASSNER et al., 1997; TROJANOWSKI, 2003; SHERER et al., 2000a; SHERER et al., 2003b). It is reasonable then, to speculate that the respiratory chain can be inhibited in other levels, as complexes II and IV, resulting in oxidative stress after the exposure to Malathion. In this study we also attempted to investigate the possibility of the increased superoxide production and the increase of the lipid peroxidation being resulted of the inhibition of complexes II and IV. We demonstrate the inhibition of the respiratory chain to the level of complex IV in hippocampus regardless of doses. In view of this fact plus the increased superoxide production, it is quite reasonable to consider our hypothesis that mitochondria dysfunction could trigger oxidative stress scenarios. The relationship between tissue injury and oxidative stress has been easier to consider than to demonstrate, due to several difficulties. The biggest difficulty inhabits in the continuous problem in demonstrating that if oxidative stress is the cause of the injury, instead of being the consequence (GUTTERIDGE AND HALIWELL, 2000). We still observed that the activity of complex IV increased in the striatum, such situation could be an indicative of an adaptation of oxidative stress, once we did not observe increases in the superoxide production in this structure. Interestingly, other

CNS structures studied had not showed significant results in the pointers of oxidative stress and mitochondrial dysfunction, suggesting that they could have better resistance mechanisms or more refined capacity of adaptation. The Malathion toxicity mechanisms are not clear. However, we can affirm that chronic exposure to this insecticide imposes to CNS situations of oxidative stress and mitochondrial dysfunction, yet we can not affirm if the mitochondrial dysfunction is cause or effect of oxidative stress or vice-versa. Further studies employing this model should aim to well characterize the relationships among Malathion neutotoxicity, oxidative stress and mitochondrial dysfunction.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants of CNPq and UNESC.

REFERENCES

Abdel-Rahman, A.; Dechkovskaia, A. M.; Goldstein, L. B.; Bullman, S. H.; Khan, W.; El-Masry, E. M.; Abou-Donia, M. B. (2004) Neurological deficits induced by malathion, DEET, and permethrin, alone or in combination in adult rats. *J Toxicol Environ Health A.*, 67, 331-356.

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

Abou-Donia, M. B. Organophosphorus ester-induced chronic neurotoxicity. (2003) *Arch Environ Health.* 58, 484-497.

Akhgari, M; Abdollahi, M.; Kebryaezadeh, A.; Hosseini, R.; Sabzevari, O. (2003) 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.* 22, 205-211.

Barja, G. (1999) Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity . *J Bioenerg Biomembr.*, 31, 347-366.

Barja, G. & A. Herrero. (1998) Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon *J Bioenerg Biomembr.*, 30, 235-243.

Banerjee, B.D., Seth, V., Bharracharya, A., Pasha, S.T., Chakraborty, A.K. (1999) Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free radical scavengers . *Toxicology Letters.* 107, 33-47.

Brown, M.A., and Brix, K.A. (1998) Review of health consequences from high-, intermediate-, and low-level exposure to organophosphorus nerve agents. *J. Appl. Toxicol.* 18, 393-408

Carlson, K. & Ehrich, M. (1999) Organophosphorus Compound-Induced Modification of SH-SY5Y Human Neuroblastoma Mitochondrial Transmembrane Potential. *Toxicol Appl Pharmacol.* 160, 33-42.

Dal-Pizzol, F., Klamt, F., Frota Jr., M.L.C., Andrades, M.E., Caregnato, F.F., Vianna, M.M.R., Quevedo, J., Izquierdo, I., Archer, T., Moreira, J.C.F. (2001) Neonatal iron exposure induces oxidative stress in adult Wistar rats. *Dev Brain Res.* 130, 109-114.

Davies, R., Ahmed, G., Freer, T. (2000) Chronic exposure to organophosphates: background and clinical picture. *Advances in Psychiatric Treatment.* 6, 187-192.

Drapper, H.H., Hadley, M. (1990) Malonyldialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186, 421-421.

de Zwart, L.L., Meerman, J.H., Commandeur, J.N., Vermeulen, N.P. (1999) Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med.* 26, 202-226.

Fischer, J.C.; Ruitenbeek, W.; Berden, J.A.; Trijbels, J.M.; Veerkamp, J.H.; Stadhouders, M.S.; Sengers, R.C.; Jansen, A.J.(1985) Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clinica Chimica Acta*, 153, 23-26

Forsyth. C.S., and Chambers, J.E. (1989) Activation and degradation of the phosphorothionate insecticides parathion and EPN by rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 38, 1597-1603

Gassner, B.; Wuthrich, A.; Scholtysik, G.; Solioz, M. (1997) The pyrethroids permethrin and cyhalothrin are potent inhibitors of the mitochondrial complex I. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281, 855-860.

Gutteridge, J.M. and Halliwell, B. (2000) Free radicals and antioxidants in the year 2000 – A historical look to the future. *Ann NY Acad Sci.* 899, 136-147.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (1999) Oxidative stress and disorders of the nervous system: general principles. In: *Free Radicals in Biology and Medicine.* 726-728.

Lowry, O.H., Rosenbrogh, N.J., Farr, A.L., Randal, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Mates, J.M. (2000) Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology.* 153, 83-104.

Misra, H.P. & Fridovich, I. (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170-3175.

Rustin, P.; Chretien, D.; Bourgeron, T.; Gerard, B.; Rotig, A.; Saudubray, J.M.; Munnich, A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clinica Chimica Acta*, v.228, p.35-51, 1994.

Salvi, R.M., Lara, D.R., Ghisolfi, E.S., Portela, L.V., Dias, R.D., Souza, D.O. (2003) Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol Sci.* 72, 267-71.

Sherer, T. B.; Betarbet, R.; Kim, J. H.; Greenamyre, J. T. (2003a) Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 341, 87-90.

Sherer, T. B.; Betarbet, R.; Kim, J. H.; Greenamyre, J. T. (2003b) Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol.*, 179, 9-16.

Tos-Luty, S; Obuchowska-Przebi, D.; Latuszynska, J.; Tokarska-Rodak, M.; Haratym-Maj, A. (2003) Dermal and oral toxicity of Malathion in rats *Ann Agric Environ Med.* 10, 101-106.

Trojanowski, J. Q. (2003) Rotenone neurotoxicity: a new window on environmental causes of Parkinson's disease and related brain amyloidosis. *Exp Neurol.*, 179, 6-8 .

Turrens, J. F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335-344.

WHO (2003) Lindane in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. Geneva, World Health Organization (WHO/SDE/WSH/03.04/102).

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Effect of Malathion exposure on mitochondrial superoxide production in cortex, hippocampus, cerebellum and striatum of Wistar rats. Four doses of malathion (25, 50, 100 and 150 mg/kg), dissolved in saline solution (0,9% NaCl), were administered intraperitoneally (i.p.) route once a day for 28 consecutive days. All of control rats received injections of saline solution (0,9% NaCl). Cerebellum was isolated and mitochondrial superoxide production was evaluated after treatments as described in Materials and Methods. Values are expressed as mean \pm SD of six animals in each group. * Different from control, $P < 0,05$.

Figure 2. Effect of Malathion exposure on lipid peroxidation (in MDA nmol/mg protein) in cortex, hippocampus, cerebellum and striatum of Wistar rats. Four doses of malathion (25, 50, 100 and 150 mg/kg), dissolved in saline solution (0,9% NaCl), were administered intraperitoneally (i.p.) route once a day for 28 consecutive days. All of control rats received injections of saline solution (0,9% NaCl). CNS structures were isolated and lipid peroxidation was evaluated after treatments as described in Materials and Methods. Values are expressed as mean \pm SD of six animals in each group. * Different from control, $P < 0, 05$.

Figure 3. Effect of Malathion exposure on Complex IV activity in cortex, hippocampus, cerebellum and striatum of Wistar rats. Four doses of malathion (25, 50, 100 and 150 mg/kg), dissolved in saline solution (0,9% NaCl), were administered intraperitoneally (i.p.) route once a day for 28 consecutive days. All of control rats received injections of saline solution (0,9% NaCl). CNS structures were isolated and Complex IV activity was evaluated after treatments as described in Materials and Methods. Values are expressed as mean \pm SD of six animals in each group. * Different from control, $P < 0, 05$.

Figure 4. Effect of Malathion exposure on mitochondrial respiratory chain complex II activity in cortex, hippocampus, cerebellum and striatum of Wistar rats. Four doses of malathion (25, 50, 100 and 150 mg/kg), dissolved in saline solution (0,9% NaCl), were administered intraperitoneally (i.p.) route once a day for 28 consecutive days. All of control rats received injections of saline solution (0,9% NaCl). CNS structures

were isolated and mitochondrial respiratory chain complex II activity was evaluated after treatments as described in Materials and Methods. Values are expressed as mean \pm SD of six animals in each group. * Different from control, $P < 0,05$.

Figure 5. Effect of Malathion exposure on succinate dehydrogenase (SDH) activity in cortex, hippocampus, cerebellum and striatum of Wistar rats. Four doses of malathion (25, 50, 100 and 150 mg/kg), dissolved in saline solution (0,9% NaCl), were administered intraperitoneally (i.p.) route once a day for 28 consecutive days. All of control rats received injections of saline solution (0,9% NaCl). CNS structures were isolated and succinate dehydrogenase (SDH) activity was evaluated after treatments as described in Materials and Methods. Values are expressed as mean \pm SD of six animals in each group. * Different from control, $P < 0, 05$.

Figure 1
Superoxide

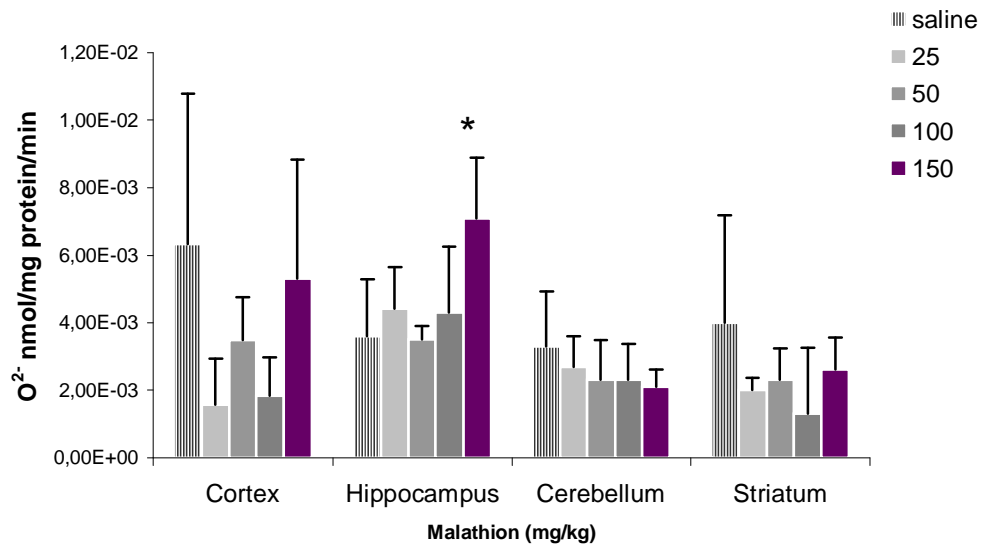


Figure 2
TBARS

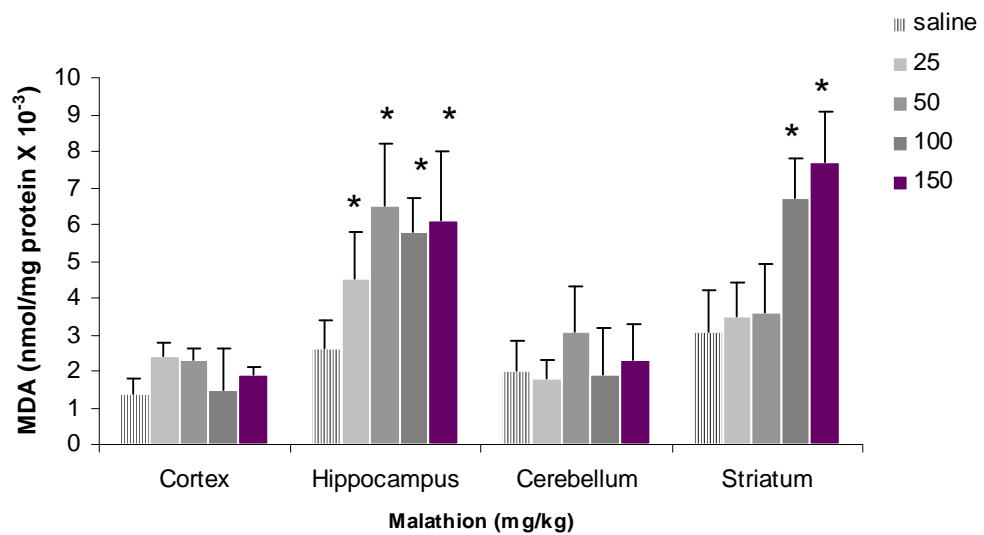


Figure 3
Complex IV

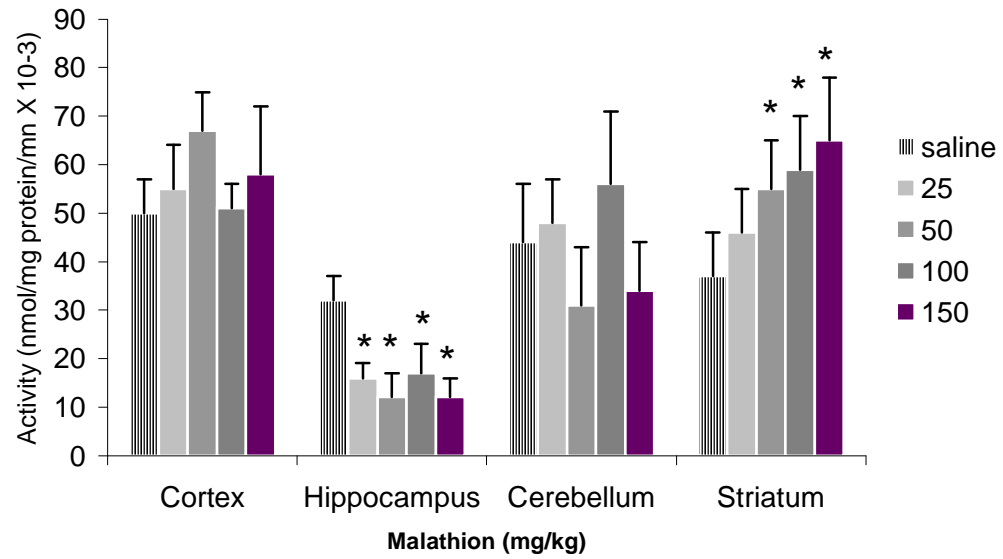


Figure 4
Complex II

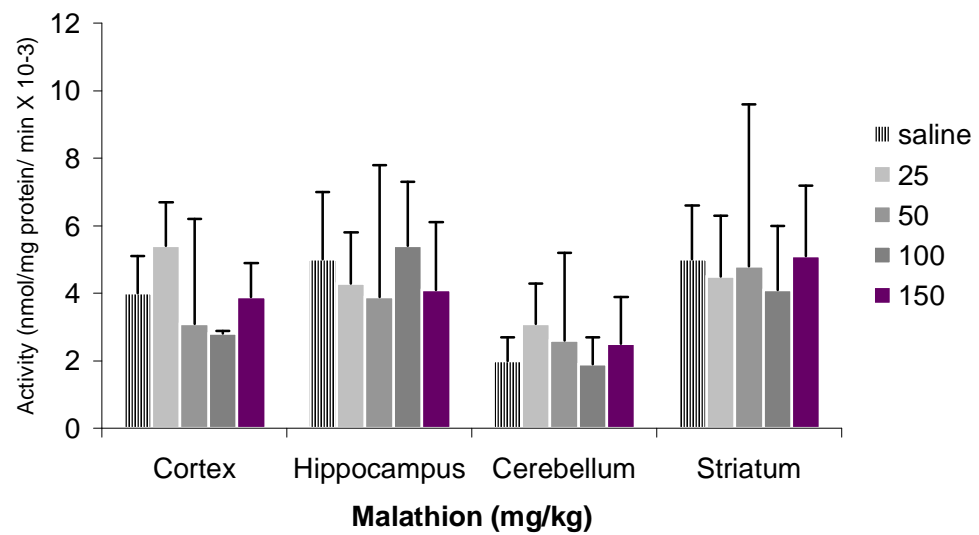
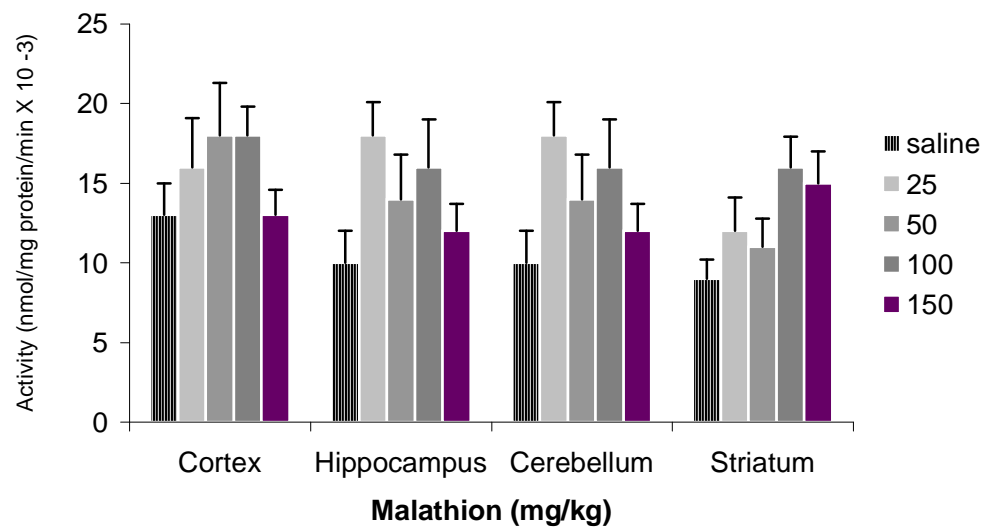


Figure 5
SDH



III. DISCUSSÃO

Vários modelos experimentais têm demonstrado as implicações do estresse oxidativo sobre a fisiologia do cérebro (ABOU-DONIA, 2003; DAVIES, R., 2000; SALVI et al., 2003). As estruturas do SNC, dada a sua composição lipídica facilmente oxidável, as altas taxas de oxigênio consumidas e defesas antioxidantes relativamente baixas, são mais suscetíveis a processos de estresse oxidativo (HALIWELL, 1999; De ZWART et al., 1999; MATES, 2000).

Assim sendo, este trabalho primeiramente tenta investigar o grau de dano oxidativo imposto pela exposição crônica ao malathion em termos de produção de superóxido e peroxidação de lipídeos. No presente estudo, demonstramos que há um aumento da produção de superóxido pelo hipocampo de ratos cronicamente expostos ao malathion (150 mg/kg), bem como um aumento da peroxidação lipídica, tanto no hipocampo (25, 50, 100 e 150 mg/kg) quanto no estriado (100 e 150 mg/kg) destes mesmos ratos. Tal fato poderia ser resultado da baixa capacidade antioxidante dos tecidos do SNC (HALIWELL, 1999). Alterações neuro-comportamentais – efeitos extrapiramidais - também são atribuídas à exposição ao malathion (ABDEL-RAHMAN et al., 2004; SALVI et al., 2003; UNESC, dados não publicados)

Evidências apontam para a mitocôndria como o alvo sub-celular preferencial dos organofosforados e também como fonte geradora de radicais livres (CARLSON AND EHRICH, 1999; TOS-LUT et al., 2003; BEAL, 1998). Durante o metabolismo de xenobióticos podem acontecer interações entre estes e a cadeia respiratória mitocondrial. O superóxido poderia ser gerado tanto pelo bloqueio da cadeia de transporte de elétrons quanto pela transferência de um elétron advindo da cadeia respiratória que, primeiramente é aceito pelo xenobiótico em questão e então é repassado ao oxigênio molecular para formação do superóxido (TURRENS, 2003). Trabalhos anteriores puderam demonstrar aumentos na produção de superóxido a partir da inibição da cadeia respiratória ao nível do complexo I. Além disso o complexo I é a fonte primária de ERO em uma variedade de processos patológicos (BARJA E HERRERO 1998; BARJA 1999; GASSNER et al., 1997; TROJANOWSKI, 2003; SHERER et al., 2003a; SHERER et al., 2003b). É razoável então, especular que a cadeia respiratória possa estar inibida em outros níveis, como os complexos II e IV, resultando em estresse oxidativo após a exposição ao malathion. Neste estudo procuramos investigar também a possibilidade de a

produção aumentada de superóxido e o aumento da lipoperoxidação observadas, sejam resultados da inibição dos complexos II e IV. Nós demonstramos a inibição da cadeia respiratória ao nível do complexo IV no hipocampo independentemente da dose. Fato esse que juntamente com a produção aumentada de superóxido falaria a favor de nossa hipótese, disfunção mitocondrial levando a situações de dano oxidativo. A relação causal entre lesão tecidual e estresse oxidativo tem sido mais fácil propor do que demonstrar devido a várias dificuldades. A maior dificuldade reside no contínuo problema em demonstrar que o estresse oxidativo é a causa da injúria, ao invés de ser a consequência (GUTTERIDGE AND HALIWELL, 2000). Observamos ainda que a atividade do complexo IV aumentou no estriado, o que poderia ser um indicativo de uma adaptação a situação de estresse oxidativo, uma vez que não observamos aumentos na produção de superóxido nesta estrutura.

As demais estruturas estudadas não apresentaram resultados significativos nos indicadores de estresse oxidativo e nos indicadores de disfunção mitocondrial, sugerindo que possa haver uma resistência maior a situações de estresse oxidativo ou ainda uma capacidade mais apurada de adaptação.

Não ficam claros os mecanismos pelos quais o malathion exerce sua toxicidade. Todavia, pode-se afirmar que a exposição crônica a este inseticida impõe ao SNC situações de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, muito embora ainda não possamos afirmar se a disfunção mitocondrial é causa ou efeito do estresse oxidativo. Estudos futuros podem ser de grande utilidade para melhor estabelecer relações entre a neurotoxicidade do malathion, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial.

IV. CONCLUSÕES

Com os resultados apresentados neste estudo é possível concluir que:

a) O tratamento crônico com malathion foi capaz de causar uma elevação na produção de superóxido no hipocampo, redundando em um aumento nos radicais livres.

b) A lipoperoxidação, após a exposição crônica ao malathion, foi aumentada no hipocampo e no estriado, indicando uma situação de dano oxidativo.

c) No hipocampo ficou demonstrada a inibição da cadeia respiratória mitocondrial ao nível do complexo IV, sugerindo que a situação de estresse oxidativo observada possa ter origem desta inibição.

d) O tratamento crônico com malathion parece não afetar o complexo II da cadeia respiratória mitocondrial.

e) O tratamento crônico com malathion proporcionou o aumento de radicais livres, desencadeou um processo de dano oxidativo e ainda inibiu a cadeia respiratória mitocondrial.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, A.; DECHKOVSKAIA, A. M.; GOLDSTEIN, L. B.; BULLMAN, S. H.; KHAN, W.; EL-MASRY, E. M.; ABOU-DONIA, M. B. Neurological deficits induced by malathion, DEET, and permethrin, alone or in combination in adult rats. **J Toxicol Environ Health A.**, v. 67, n. 1, p. 331-356, Fev. 2004.

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**, v. 137, n. 1, p. 29-34, Jan. 2004.

ABOU-DONIA, M. B. Organophosphorus ester-induced chronic neurotoxicity. **Arch Environ Health.**, v. 58, n. 8, p. 484-497, Ago. 2003.

AKHGARI, M; ABDOLLAHI, M.; KEBRYAEEZADEH, 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**, v.22, n. 4, p. 205-211, Abr. 2003.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**, 4^a ed.. New York, Garland Publishing; 2002.

AMES, B.N., GOLD, L.S. Endogenous mutagens and causes of aging and cancer. **Mutat. Res.** v. 250, p. 3-16, 1991.

AMES, B.N., SHIGENAGA, M.K. E HAGEN, T.M. Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 90, p. 7915-7922, Set 1993

BABIOR, B.M. Phagocytes and oxidative stress. **Am. J. Med.** v.109, n.1, p. 33-44, Jul 2000.

BALLA, G., JACOB, H.S., BALLA, J., ROSENBERG, M., NATH, K., APPLE, F., EATON, J.W., VERCELLOTTI, G.M. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. **J Biol Chem.** v. 267, n. 25, p. 18148-18153. Set. 1992.

BANERJEE, BD., SET, V., BHARRACHARYA, A., PASHA, S.T., CHAKRABORTY, A.K. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free radical scavengers. **Toxicology Letters.** v. 107, , p. 33-47. 1999.

BARJA, G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. **J Bioenerg Biomembr.**, v. 31, n. 4, p. 347-366, Ago. 1999.

BARJA, G. & A. HERRERO. Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon. **J Bioenerg Biomembr.**, v. 30, n. 3, p. 235-243, Jun. 1998.

BARNETT, JB AND KE RODGERS. Pesticides. In: DEAN, JH., LUSTER, MI., MUNSON, AE. AND KIMBER, I. (Ed). **Immunotoxicology and Immunopharmacology**. New York: Raven Press, Ltd 2nd edition. 1994. p.191-212.

BEAL, M. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1366, n. 1-2, p. 211-223, Ago. 1998.

BERTUGLIA, S.E. GIUSTI, A. Microvascular oxygenation, oxidative stress, NO suppression and superoxide dismutase during postischemic reperfusion. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** n.285, p. 1064-1071, 2003.

BONNEH-BARKAY, D., LANGSTON, W.J., DI MONTE, D.A. Toxicity of redox cycling pesticides in primary mesencephalic cultures. **Antioxid Redox Signal.** v. 7, n. 5-6, p. 649-653, Mai 2005.

BOWLER, R. P., NICKS, M., WARNICK, K., CRAPO, J.D. Role of extracellular superoxide dismutase in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** v. 282, n. 4, p. 719-726, 2002.

BLASIAK, J., JALOSZYNSKI, P., TRZECIAK, A., SZYFTER, K. In vitro studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. **Mutat Res.** V. 445, n. 2, p. 275-283, Set. 1999.

CAO, G E PRIOR, R.L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. **Clin Chem.** v. 44, n. 6, p. 1309-1315, 1998.

CARLSON, K. & EHRICH, M. Organophosphorus Compound-Induced Modification of SH-SY5Y Human Neuroblastoma Mitochondrial Transmembrane Potential. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 160, n. 1, p. 33-42, Out. 1999.

CICCHETTI, R. & G. ARGENTIN. The role of oxidative stress in the in vitro induction of micronuclei by pesticides in mouse lung fibroblasts. **Mutagenesis**, v. 18, n. 2, p. 127-132, Mar. 2003.

COBB, J.P., HOTCHKISS, R.S., KARL, I.E., BUCHMAN, T.G. Mechanisms of cell injury and death. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** n.77, p. 3-10, 1996.

DAL-PIZZOL, F., KLAMT, F., VIANNA, M.M.R., SCHRODER, N., QUEVEDO, J., BENFATO, M.S., MOREIRA, J.C., WALZ, R. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. **Neurosci Lett**, n. 291, p.179-182, 2000.

DAL-PIZZOL, F., KLAMT, F., FROTA Jr., M.L.C., ANDRADES, M.E., CAREGNATO, F.F., VIANNA, M.M.R., QUEVEDO, J., IZQUIERDO, I., ARCHER, T., MOREIRA, J.C.F. Neonatal iron exposure induces oxidative stress in adult Wistar rats. **Dev Brain Res**, n. 130, p.109-114, 2001b.

DAS, N., LEVINE, R.L., ORR, W.C., SOHAL, R.S. Selectivity of protein oxidative damage during aging in *Drosophila melanogaster*. **Biochem. J.** v.360, p. 209-216, 2001.

DAS, K.C., LEWIS-MOLOCK, Y., WHITE, C.W. Thiol modulation of TNF- α and IL-1 induced MnSOD gene expression and activation of NF-kappa β . **Mol. Cell. Biochem.** v. 148, p. 45-57, 1995.

DAVIES, K.J. Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defenses: an hypothesis. **J Free Radic Biol Med.** v. 2, n. 3, p. 155-173, 1986.

DAVIES, R., AHMED, G., FREER, T. Chronic exposure to organophosphates: background and clinical picture. **Advances in Psychiatric Treatment**, v.6, p. 187-192, 2000.

DAVIES, M.J., TRUSCOTT, R.J.W. Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis. **J. Photochem. Photobiol.** v. 63, p. 114-125, 2001.

DEAN, R. T., FU, S., STOCKER, R., DAVIES M.J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **Biochem. J.** v. 324, p. 1-18, 1997.

DE ZWART, L.L., MEERMAN, J.H., COMMANDEUR, J.N., VERMEULEN, N.P. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Radic Biol Med.** v.26, n.1-2, p. 202-226, 1999.

DELWING, D., TAGLIARI, B., STRECK, E.L., WANNAMACHER, C.M., WAJNER, M., WYSE, R. Reduction of energy metabolism in rat hippocampus by arginine administration. **Brain Res.** v. 983, n. 1-2, p. 58-63. Set. 2003.

DIZDAROGLU, M. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. **Free Radic Biol Med.** v.10, n. 3-4, p.225-242, 1991.

DRAPPER, H.H., HADLEY, M. Malonyldialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol.** v. 186, p. 421-421, 1990.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.** n. 82, p.47-95, 2002.

EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK (ExToxNet). 1998. Cornell University.
<http://extoxnet.orst.edu/pips/malathio.htm>. Acesso em 16 de Nov. 2005.

FAO. **Agricultural stathystics**. Disponível em:
http://www.fao.org/waicent/portal/statistics_en.asp Acesso em 13 nov. 2004.

FARISS, M. W., CHAN, C. B., PATEL, M., VAN HOUTEN, B., ORRENIUS, S. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. **Mol. Interv.** v. 5, p. 94-111, 2005.

FISCHER, J.C.; RUITENBEEK, W.; BERDEN, J.A.; TRIJBELS, J.M.; VEERKAMP, J.H.; STADHOUDERS, M.S.; SENGERS, R.C.; JANSEN, A.J. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clinica Chimica Acta**, v.153, p.23-26, 1985.

FLESSEL, P., QUINTANA, P.J., HOOPER, K. Genetic toxicity of malathion: a review. **Environ Mol Mutagen**, v. 22, n. 1, p. 7-17, 1993.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annu. Rev. Biochem.** v. 64, p. 97-112.

GASSNER, B.; WUTHRICH, A.; SCHOLTYSIK, G.; SOLIOZ, M. The pyrethroids permethrin and cyhalothrin are potent inhibitors of the mitochondrial complex I. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 281, n. 2, p. 855-860, Maio 1997.

GILGUN-SHERKI, Y., ROSENBAUM, Z., MELAMED, E., OFFEN, D. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. **Pharmacol Rev.** v. 54, n.2, p.271-284, Jun. 2002.

GUTTERIDGE, JM, QUINLAN, GJ. Malondialdehyde formation from lipid peroxides in the thiobarbituric acid test: the role of lipid radicals, iron salts, and metal chelators. **J Appl Biochem.** v.5, n. 4-5, p. 293-299, Aug-Oct 1983.

GUTTERIDGE, J.M. AND HALIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000 – A historical look to the future. **Ann NY Acad Sci.**v. 899, p 136-147, 2000.

HALLIWELL, B. E CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 57S, p. 715-725, 1993.

HALLIWELL, B. E GUTTERIDGE, J.M. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging**, v. 18, n. 9, p. 685-716, Jan.2001.

HAWKINS, C.L., DAVIES, M.J. Generation and propagation of radical reactions on proteins. **Biochim Biophys Acta**. v. 1504, p. 196-219, 2001.

IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 2003
<http://www.iupac.org/goldbook/FT06786.pdf>. Acesso em 16 Nov. 2005.

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**. v. 12, n. 9, p. 500-504.

KEHRER, J.P. Free radicals as mediators in tissue injury and disease. **Crit. Rev. Toxicol**. v. 23, p. 21-48, 1993.

KERN, J.C., KEHRER, J.P. Free radicals and apoptosis: relationships with glutathione, thioredoxin, and the BCL family of proteins.. **Front Biosci**. v. 1, n. 10, p. 1727-1738, Maio 2005.

KEYER, K., IMLAY, J.A. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. **Proc. Natl. Acad. Sci**. v.93, p. 13635-13640, Nov. 1996.

KIM, J.S., DIEBOLD, B.A., KIM, J.I., KIM, J., LEE, J.Y., PARK, J.B. Rho is involved in superoxide formation during phagocytosis of opsonized zymosans. **J Biol Chem**. v.279, n.20, p. 21589-21597, Maio 2004.

KLAMT, F., DAL-PIZZOL, F., FROTA Jr., M.L.C., WALZ, R., ANDRADES, M.E., SILVA, E.G., BRENTANI, R.R., IZQUIERDO, I., MOREIRA, J.C.F. Imbalance of antioxidant defence in mice lacking cellular prion protein. **Free Radic Biol Med**, n. 30, p.1137-1144, 2001.

LEVINE, R.L., GARLAND, D., OLIVER, C.N. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**. v. 186, p. 464-478, 1990.

LIOCHEV, S.I., FRIDOVICH, I. Superoxide and iron: partners in crime. **IUBMB Life**. v. 48, n.2, p. 157-161, Ago. 1999.

LIU, Q.; RAINA, A. K.; SMITH, M. A.; SAYRE, L. M.; PERRY, G. Hydroxynonenal, toxic carbonyls, and Alzheimer disease. **Mol Aspects Méd**, v. 24, n.4-5, p. 305-313, Ago. 2003.

LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S. L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D., DARNELL, J. E. **Molecular Cell Biology**. 4^a Ed. New York, W. H. Freeman & Co, 2000.

LOWRY, O.H., ROSEBROGH, N.J., FARR, A.L., RANDAL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**. v. 193, p. 265-275, 1951.

- MATES, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**. v. 153, p. 83-104, 2000.
- MCCORD, J.M., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). **Free Radic Biol Med**. v. 5, n. 5-6, p.363-369, 1988.
- MELOV, S. Mitochondrial oxidative stress. Physiologic consequences and a potential for a role in aging. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 908, p. 219-225, Jun 2001.
- MENDIRATTA, S., QU, Z.C., MAY, J.M Erythrocyte ascorbate recycling: antioxidant effects in blood. **Free Radic Biol Med**., v. 24, n. 5, p. 789-797, Mar 1998.
- MISRA, H.P., FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. **J. Biol. Chem.** v. 246, n.22, p. 6886-6890, 1971.
- MISRA, H.P. E FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J. Biol. Chem.** 247, 3170-3175, 1972
- MUKHERJEE, S., BANERJEE, S.K., MAULIK, M., DINDA, A.K., TALWAR, K.K., MAULIK, S.K. Protection against acute adriamycin-induced cardiotoxicity by garlic: Role of endogenous antioxidants and inhibition of TNF- α expression. **BMC Pharmacol.** v. 20, p. 3-16, 2003.
- NAVA, ME., ROMAN, PP., ROBLES, SH., ALVARADO, SM. Sintomatologia persistente en trabajadores industrialmente expuestos a plaguicidas organofosforados. **Salud Publica Mex** n. 41, p. 55-61, 1999.
- NICOTERA, P. E ORRENIUS, S. Molecular mechanisms of toxic cell death; an overview. **Methods Toxicol.** v. 1B, p. 23, 1994.
- OBERLE, S., POLTE, T., ABATE, A., PODHAISKY, H.P., SCHRODER, H. Aspirin increases ferritin synthesis in endothelial cells: a novel antioxidant pathway. **Circ Res.** v. 82, n. 9, p. 1016-20, Maio 1998.
- PACKER, L., WEBER, S.U., RIMBACH, G. Molecular Aspects of α -Tocotrienol Antioxidant Action and Cell Signalling. **J Nutr.** v. 131, n. 2, p. 369S-373S, Fev 2001.
- PAZDERNIK, T. L.; EMERSON, M. R.; CROSS, R.; NELSON, S. R.; SAMSON, F. E. Soman-induced seizures: limbic activity, oxidative stress and neuroprotective proteins. **J Appl Toxicol**, v. 21, supl. 1, p. S87-94, Dez. 2001.
- PITKÄNEN, S. E ROBINSON, B.H. Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. **J. Clin. Invest.** V. 98, n. 2, p. 345-351, 1996.

QUINLAN, G. J., MUMBY, S., MARTIN, G., BERNARD, G. R., GUTTERIDGE, J. M. C., EVANS, T. W. Albumin influences total plasma antioxidant capacity favorably in patients with acute lung injury. **Critical Care Medicine**. v. 32, n. 3, p. 755-759, Mar 2004.

RICHTER, C. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. **Chem. Phys. Lipids**. v. 44, n. 1-2, p. 175-189, Jul-Set 1987.

RIOBO, N. A.; CLEMENTI, E.; MELANI, M.; BOVERIS, A.; CADENAS, E.; MONCADA, S.; PODEROSO, J. J. Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. **Biochem J**, v. 359, n. Pt1, p. 139-145, Oct. 2001.

RUSTIN, P.; CHRETIEN, D.; BOURGERON, T.; GERARD, B.; RÖTIG, A.; SAUDUBRAY, J.M.; MUNNICH, A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. **Clinica Chimica Acta**, v.228, p.35-51, 1994.

SALVI, RM., LARA, DR., GHISOLFI, ES., PORTELA, LV., DIAS, RD., SOUZA, DO. Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides. **Toxicol Sci**. 72(2), p. 267-71, Abr. 2003.

SCHMIDT, H. H.H.W. AND WALTER, U. NO at work. **Cell**. N. 78, p. 919-925.

SEVANI, A., DAVIES, K.J., HOCHSTEIN, O. Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. **Am J Clin Nutr**. v. 54, n. 6, p. 1129-1134. 1991.

SOHAL, R. S.; MOCKETT, R. J.; ORR, W. C. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. **Free Radic Biol Med**, v. 33, n. 5, p. 575-586, Set. 2002.

SHERER, T. B.; BETARBET, R.; KIM, J. H.; GREENAMYRE, J. T. Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. **Neurosci Lett**. v. 341, n. 2, p. 87-90, Maio 2003a.

SHERER, T. B.; BETARBET, R.; KIM, J. H.; GREENAMYRE, J. T. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. **Exp Neurol**, v. 179, n. 1, p. 9-16, Jan. 2003b.

SHIGENAGA, M.K., AMES, B.N. Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: A biomarker of in vivo oxidative DNA damage. **Free Radic Biol Med**. v.10, p. 211-216, 1991.

SHIGENAGA, M.K., HAGEN, T.M., AMES, B.N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. **Proc. Natl. Acad. Sci**. v.91, n.23, p. 10771-10778, 1994.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **Free Radic Biol Med**. v. 27, n. 9-10, p. 916-921. 1999.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Am J Med.** v. 30, n. 91(3C), p. 31S-38S. Sep 1991

SUCEN. **Classificação de praguicidas.** Disponível em:
http://www.sucen.sp.gov.br/docs_tec/seguranca/cap12cla.pdf Acesso em 27 out. 2004.

TAYLOR, P. Anticholinesterase agents. In: GILMAN, A., HARDMAN, J. & LIMBIRD, L. (Ed). **Goodman and Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics.** New York: McGraw-Hill Press, 2001. p. 175-181.

TOS-LUTY, S; OBUCHOWSKA-PRZEBI, D.; LATUSZYNSKA, J.; TOKARSKA-RODAK, M.; HARATYM-MAJ, A. Dermal and oral toxicity of Malathion in rats. **Ann Agric Environ Med.** v. 10, n.1, p. 101-106, Jan. 2003.

TROJANOWSKI, J. Q. Rotenone neurotoxicity: a new window on environmental causes of Parkinson's disease and related brain amyloidosis. **Exp Neurol.**, v. 179, n. 1, p. 6-8, Jan. 2003.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J. Physiol.** v. 552, n. 2, p. 335-344, Out. 2003.

UFSC – CIT-SC – Estatísticas recebidas pelo correio eletrônico.

URSO, M.L., CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology.** v. 189, n. 1, p. 41-54, 2003.

VAINSHTEIN, B.K., MELIK-ADAMYAN, W.R., BARYNIN, V.V., VAGIN, A.A., GREBENKO, A.I. Three-dimensional structure of the enzyme catalase. **Nature.** v. 293, n. 5831, p. 411-412, Out 1981.

VIDYSAGAR, J., KARUNAKAR, N., REDDY, M.S., RAJNARAYANA, K., SURENDER, T, KRISHNA, D.R. Oxidative stress and oxidative status in acute organophosphorous insecticide poisoning. **Indian J Pharmacol.** v. 36, n. 2, p. 76-79, Abril 2002.

YAU-HUEIWEI & HSIN-CHEN LEE. Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Mutation, and Impairment of Antioxidant Enzymes in Aging. **Exp Biol Med.**, n.227, p. 671-682, Out. 2002.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol Rev.** v. 74, n. 1, p.139-62, Jan.1994 .

YUMINO,K, KAWAKAMI, I., TAMURA, M., HAYASHI, T., NAKAMURA , M. Paraquat- and diquat-induced oxygen radical generation and lipid peroxidation in rat brain microsomes. **J. Biochem.**, v. 131, n. 4, p. 565-570, 2002

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)