

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

**FIPRONIL NA BIOENERGÉTICA DE MITOCÔNDRIAS
ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO**

Ivo Dias Ferreira da Palma
Farmacêutico-Bioquímico

ARAÇATUBA
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

**FIPRONIL NA BIOENERGÉTICA DE MITOCÔNDRIAS
ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO**

Ivo Dias Ferreira da Palma
Orientador: Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA - SP
2014

Catálogo na Publicação(CIP)

Palma, Ivo Dias Ferreira

P171f

Fipronil na bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato / Ivo Dias Ferreira Palma. -- Araçatuba: [s.n], 2014.

47 f. il.; + CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2014.

Orientador: Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto

1. Consumo de oxigênio. 2. Fígado. 3. Inseticidas. 4. Fosforilação oxidativa. 5. Ectoparasitas. 6. Toxicidade. T.

CDD 636.0892

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Fipronil na bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato.

AUTOR: IVO DIAS FERREIRA DA PALMA

ORIENTADOR: Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.


Dra. ANDRÉA FONTES GARCIA


Dr. SÉRGIO DINIZ GARCIA


Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Ivo Dias Ferreira da Palma, graduado em Farmácia-Bioquímica, Modalidade Análises Clínicas, pela Faculdade de Ciências Biológicas de Araras – Araras (SP), em dezembro de 1987. Bacharel em Direito pela FADAP – Faculdade de Direito da Alta Paulista – Tupã (SP) em dezembro de 1993. Especialista em Direito Processual Civil, na modalidade Grandes Transformações Processuais, pela UNAMA – Universidade do Amazonas (AM) em 2005. Mestrado em Ciência Animal pela UNESP de Araçatuba (SP), na área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, sob orientação do Prof. Adj. Dr. Fábio Erminio Mingatto, professor adjunto da disciplina de Bioquímica Animal e Química Geral do curso de graduação em Zootecnia da UNESP de Dracena. Atualmente é Perito Criminal, de 2º classe, da Superintendência da Polícia Técnico Científica do Estado de São Paulo, lotado na Equipe de Perícias Criminalísticas de Andradina (SP).

“A vida nos foi dada para as grandes coisas”.

Autor desconhecido

DEDICO:

Á minha esposa Vanessa Cristina, minha incentivadora e exemplo de mulher focada nos estudos bem como aos nossos filhos Victória, Yago e Pablo, motivo pelo qual dedico minha vida concedida por DEUS.

AGRADEÇO

À DEUS, pela saúde e coragem de enfrentar os obstáculos da vida.

Aos Meus Pais Donald e Annita, pelo amor maior e pela doação dos esforços proporcionados a mim bem como os ensinamentos transmitidos no decorrer de minha vida acadêmica, sempre no caminho do bem, da moral e dignidade humana.

Ao Professor Adj. Dr. Fábio Erminio Mingatto, pessoa de extrema sabedoria, bondade e conhecimento, exemplo de Pesquisador e Docente, o qual me orientou e me apoiou em todos os momentos e principalmente pela nova amizade conquistada.

Aos amigos Marcos Maioli, Hyllana Catarine Dias de Medeiros, Andréia Tieme de Santana, Marieli Guelfi, que me auxiliaram nas horas difíceis e sem os quais este trabalho não seria realizado.

Muito Obrigado.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Objetivo.....	18
1.1.1 Objetivo geral.....	18
1.1.2 Objetivo específico.....	18
1.2 Hipótese.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Fipronil.....	19
2.2 Mitocôndrias.....	20
2.2.1 Cadeia transportadora de elétrons (cadeia respiratória).....	21
2.2.2 FoF1-ATPase.....	21
2.2.3 Fosforilação oxidativa.....	23
2.3 Fígado e Hepatotoxicidade.....	24
3 MATERIAL E MÉTODO.....	26
3.1 Avaliação Ética.....	26
3.2 Animais.....	26
3.3 Reagentes.....	26
3.4 Fipronil.....	27
3.5 Isolamentos de mitocôndrias intactas e preparação de mitocôndrias rompidas.....	27
3.6 Dosagem das proteínas mitocondriais.....	28
3.7 Determinação do consumo de oxigênio.....	28
3.8 Determinações das atividades das enzimas relacionadas à cadeia respiratória mitocondrial (NADH desidrogenase e Succinato desidrogenase).....	29
3.9 Determinação do potencial elétrico da membrana mitocondrial($\Delta\Psi$).....	29
3.10 Determinação da concentração de ATP mitocondrial.....	30
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
5 RESULTADOS.....	32
5.1 Efeitos do fipronil sobre a respiração de mitocôndrias.....	32

5.2 Efeitos do fipronil sobre a atividade das enzimas NADH desidrogenase e succinato desidrogenase.....	35
5.3 Efeitos do fipronil sobre o potencial elétrico da membrana mitocondrial.	36
5.4 Efeito do fipronil sobre a concentração de ATP mitocondrial.....	37
6 DISCUSSÃO.....	39
7 CONCLUSÃO.....	42
8 REFERÊNCIAS.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\Delta\Psi$ =	Potencial elétrico de membrana mitocondrial interna
ADP =	Adenina 5'- difosfato
ATP =	Adenosina 5'- trifosfato
ATR =	Atractilosídeo
BSA =	Albumina de soro bovino
CCCP =	Carbonilcianeto-m-clorofenilhidrazona
DMSO =	Dimetilsulfóxido
EGTA =	Ácido etilenoglicol bis - (β -aminoetil éter) N,N,N',N' tetracético
EPM =	Erro padrão da média
Da =	Dalton
FAD =	Flavina adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
FADH ₂ =	Flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
FMN =	Flavina mononucleotídeo (forma oxidada)
GABA =	Complexo receptor do ácido gama-aminobutírico
H ⁺ =	Íon hidrogênio
H ₂ O =	Água
HEPES =	Ácido 2[4(2 hidroxietil) piperazinil(1)] etanossulfônico
kg =	Quilograma
mg =	Miligrama
mM =	Milimolar
NADH =	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
O ₂ =	Oxigênio
Oligo =	Oligomicina
pH =	Potencial hidrogeniônico
Pi =	Fosfato inorgânico
μ M =	Micromolar

$\mu\text{m} =$	Micrômetro
$\mu\text{g} =$	Micrograma
$\mu\text{L} =$	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1- Estrutura química do fipronil.....	15
FIGURA 2- Modelo esquemático do fluxo de elétrons, provenientes do NADH ou do succinato, por meio dos complexos I, II, III e IV da cadeia respiratória, até o oxigênio.....	21
FIGURA 3- FoF1- ATPase.....	22
FIGURA 4- Esquema representativo do transporte de elétrons e fosforilação oxidativa.....	23
FIGURA 5- Efeito do fipronil no estado 3 da respiração.....	32
FIGURA 6- Efeito do fipronil 25 μ M no estado 4 da respiração.....	33
FIGURA 7- Efeito do CCCP sobre o consumo de oxigênio.....	34
FIGURA 8 - Efeito da oligomicina, atractilosídeo ou fipronil no consumo de oxigênio.....	35
FIGURA 9- Efeitos do fipronil sobre NADH desidrogenase e succinato desidrogenase.....	36
FIGURA 10- Efeito do fipronil no potencial de membrana.....	37
FIGURA 11- Efeito do fipronil sobre a concentração de ATP.....	38

FIPRONIL NA BIOENERGÉTICA DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO

RESUMO - Fipronil é um inseticida e acaricida altamente efetivo pertencente à família dos fenilpirazóis e ultimamente vem sendo extensivamente utilizado para combater infestações parasitárias tais como pulgas, formigas, cupins, carrapatos e piolhos de cães, gatos e bovinos. De acordo com relatos apresentados na literatura científica, existem casos de intoxicação hepática em mamíferos devido à sua exposição acidental ou utilização equivocada. O fígado desempenha função central no metabolismo, recebe nutrientes e xenobióticos que são por ele absorvidos, transformados, armazenados e liberados no sangue. A mitocôndria é responsável pela síntese de quase a totalidade do ATP necessário à manutenção da estrutura e função celular. Neste trabalho foram avaliados os efeitos do fipronil sobre a bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Nas concentrações testadas (5 a 25 μM), o fipronil inibiu a respiração no Estado 3 da respiração em mitocôndrias energizadas com glutamato + malato, substratos do complexo I da cadeia respiratória, além de dissipar o potencial de membrana mitocondrial, acarretando a inibição da síntese de ATP pelas mitocôndrias. O efeito inibidor do fipronil sobre o complexo I foi confirmado pela inibição da atividade da enzima NADH desidrogenase. Esse efeito apresentado pelo fipronil sobre a bioenergética mitocondrial pode estar relacionado ao efeito tóxico apresentado pelo inseticida no fígado.

Palavras-chave: consumo de oxigênio, fígado, inseticidas, fosforilação oxidativa, ectoparasitas, toxicidade

EFFECTS OF FIPRONIL IN THE BIOENERGETICS OF ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA

ABSTRACT - Fipronil is a highly effective insecticide and acaricide that belongs to the phenylpyrazole chemical family and it has been extensively used to control fleas, ticks and lice of dogs, cats and bovines. As reported by literature, there are intoxication cases due to the accidental exposure or mistaken fipronil application in mammals, it might affect including the liver that performs essential functions related to metabolism, due to the liver receives nutrients and xenobiotics that are absorbed, converted, stored and released into the blood. The mitochondria is responsible for almost entirety ATP synthase required to maintaining cellular structure and function. In this paper were evaluated the fipronil effects on bioenergetic of isolated rat-liver mitochondria. In the tested concentrations (5 to 25 μM), the fipronil inhibited State III of respiration to mitochondria energized with glutamate + malate, complex I substrates of respiratory chain, besides dissipate mitochondrial membrane potential, resulting in mitochondrial ATP synthase inhibition. The fipronil inhibitor effect about the complex I was confirmed by the inhibiting enzyme NADH dehydrogenase activity. The effect presented by fipronil about the mitochondrial bioenergetic may be related to the toxic effect showed by the insecticide on liver.

Keywords: oxygen consumption, liver, fipronil, oxidative phosphorylation, ectoparasites, toxicity

1 INTRODUÇÃO

O fipronil (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil]-4-[(trifluorometil)sulfinil]-1H-pirazol-3-carbonitril) (Figura 1) é um inseticida da família dos Fenilpirazóis, extensivamente utilizado para o controle de uma variedade de infestações, como baratas, mosquitos, cupins, formigas, gafanhotos, pulgas, carrapatos e piolhos de cães, gatos e bovinos (AAJOURD et al., 2003; CHANTON et al., 2001). Faz parte de uma nova geração de inseticidas desenvolvidos com o intuito de reduzir danos ao ambiente bem como aos mamíferos além de servirem como alternativa à resistência desenvolvida por alguns insetos a outros compostos inseticidas tais como os organofosfatos, piretróides e carbamatos, desempenhando assim, grande efetividade em doses inferiores aos agentes anteriormente citados (BOBE et al., 1997).

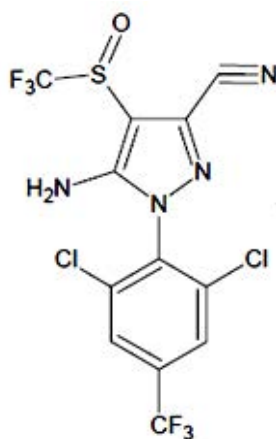


FIGURA 1- Estrutura química do fipronil.

A ação tóxica do fipronil é devida à sua habilidade de agir como um bloqueador não competitivo dos canais de Cl⁻ ligados aos receptores do ácido γ -aminobutírico (GABA), levando os insetos à morte por hiperexcitação neuronal e paralisia (ZHAO, 2004). Existem três principais vias de intoxicação causada pelo fipronil, sendo elas a oral, dermal e a inalação (FUNG et al., 2003; JENNINGS et al., 2002). Em primeira instância, o fipronil não aparenta

ser um agente tóxico severo aos mamíferos, todavia, qualquer espécie poderá ser afetada se a dose utilizada for maior que a recomendada pelos fabricantes. De acordo com relatos apresentados na literatura científica, existem casos de intoxicação devido à exposição acidental ou utilização equivocada do composto (CHODOROWSKI; ANAND, 2004). Um caso de intoxicação aguda após ingestão de uma elevada dose de fipronil acarretou óbito humano (MOHAMED et al., 2004).

Em estudo realizado por Silva (2008) avaliando os efeitos da exposição prolongada de ratos ao fipronil, foi observada tumefação das células hepáticas e aumento do peso do fígado em animais tratados com 10 mg/kg administrada via gavagem. A dose utilizada corresponde a um décimo da DL_{50} em ratos estabelecida por Hainzl e Casida (1996), a qual é de 100 mg/kg.

Uma vez circulando na corrente sanguínea, o fipronil é amplamente distribuído, particularmente em tecidos gordurosos e seus resíduos são distribuídos em tecidos gordurosos, onde permanecem até uma semana após sua administração oral (TINGLE et al., 2003). Foi constatado que a formação do metabólito sulfona, derivado de uma reação de oxidação, corresponda à principal via do metabolismo hepático deste composto (CABONI et al., 2003; TANG et al., 2004). De acordo com Leghait et al. (2009), essa reação de oxidação é catalisada pelas enzimas do complexo citocromo P450. Tanto o fipronil quanto seu metabólito sulfona induziram a morte celular em culturas de hepatócitos humanos e células HepG2 (DAS et al., 2006). Além disso, em estudo usando células intestinais Caco-2, Vidau et al., 2009 demonstraram que o fipronil e seus metabólitos sulfona e sulfeto exercem efeito citotóxico relacionado à diminuição do ATP.

É sabido que o fígado desempenha diversas funções relacionadas ao metabolismo animal e além disto, recebe tanto nutrientes como também xenobióticos que são absorvidos por meio do trato digestivo e veia porta. Em relação aos xenobióticos seu principal papel relaciona-se à biotransformação, mediada principalmente pelo complexo enzimático citocromo P450 que por meio de sucessivas reações químicas converte compostos hidrofóbicos em

compostos hidrossolúveis, mais facilmente eliminados pelo organismo (GUILLOUZO, 1998).

A mitocôndria é responsável pela síntese de quase a totalidade do ATP necessário à manutenção da estrutura e função celular. Na respiração mitocondrial os elétrons doados por substratos oxidáveis à cadeia respiratória na membrana mitocondrial interna, por meio de NADH ou FADH₂, são transferidos ao O₂ reduzindo-o a H₂O e a energia livre resultante é utilizada, através da fosforilação oxidativa, para sintetizar a molécula de ATP. De acordo com a hipótese quimiosmótica de Mitchell em associação com a hipótese do acoplamento conformacional de Boyer, o fluxo de elétrons é realizado através do bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, gerando um gradiente eletroquímico de H⁺. A energia livre liberada no retorno do H⁺ à matriz mitocondrial induz alteração conformacional no componente F₁ da F₀F₁-ATP sintase, liberando o ATP formado a partir de ADP e Pi em seus sítios catalíticos (BOYER et al., 1973; MITCHELL, 1961).

Evidências experimentais indicam que a mitocôndria representa um alvo preferencial e crítico para a ação de fármacos e toxinas. Os efeitos tóxicos sobre as mitocôndrias podem ocorrer por mecanismos diretos e indiretos, levando a disfunções mitocondriais, tais como alterações no transporte de elétrons na fosforilação oxidativa, na permeabilidade da membrana mitocondrial interna, no transporte de cálcio, no estado oxidativo, além de uma série de outros eventos que levam à depleção de ATP (CASTANHA-ZANOLI, 2012; GARCIA et al., 2010; SANTOS et al., 2009).

Diante do exposto acima, uma maior investigação experimental sobre a atividade tóxica do fipronil no fígado deve ser realizada uma vez que os estudos dos mecanismos de toxicidade do fipronil se restringem em sua grande maioria ao sistema nervoso central. Desta maneira, neste estudo foram avaliados os efeitos do fipronil sobre a bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato, com o objetivo de auxiliar na prevenção e tratamento de animais intoxicados pela substância.

1.1 Objetivo

1.1.1 Objetivo geral

Determinar os efeitos do fipronil sobre mitocôndrias isoladas de fígado de rato considerando parâmetros relacionados à bioenergética, visando contribuir para o conhecimento do mecanismo de ação tóxica deste inseticida.

1.1.2 Objetivo específico

Avaliar os efeitos do fipronil no consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas de fígado de rato (respiração mitocondrial); nas atividades das enzimas NADH desidrogenase e succinato desidrogenase presentes na cadeia respiratória nos complexos I e II, respectivamente; no potencial elétrico transmembrana ($\Delta\Psi$) e na síntese de ATP.

1.2 Hipótese

O fipronil afeta a bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato inibindo a síntese de ATP e comprometendo a função celular.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fipronil

O fipronil (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil]-4-[(trifluorometil)sulfinil]-1H-pirazol-3-carbonitril) é uma substância composta, de amplo espectro, derivado quimicamente da família dos fenilpirazóis.

É uma alternativa aos inseticidas organofosforados e pode ser encontrado com as seguintes denominações comerciais: Icon, Regent, Ascend, Chipco, Adonis e Frontline sob a forma de spray, iscas, granulados, pós e grânulos dispersores em água, líquidos, microgrânulos, sólido dispersível bem como emulsões aquosas (TINGLE et al., 2003).

É rapidamente metabolizado no organismo dos ratos e seus resíduos são distribuídos em tecidos gordurosos, onde permanecem até uma semana após sua administração oral (TINGLE et al., 2003). Além do fipronil, os metabólitos fipronil-sulfona e fipronil-desulfinil também são tóxicos para células do fígado e do intestino conforme estudos de Das et al., 2006 e Vidau et al., 2009.

Tingle et al., 2003 obtiveram resultados, em carne bovina, confirmando a lenta depuração do fipronil nos tecidos gordurosos. Segundo estes autores, a meia vida do fipronil em tecidos gordurosos fica em torno de 18 dias. Na veterinária é utilizado para combater infestação de carrapatos, pulgas e ácaros que atacam cães, gatos, equinos e bovinos (HUGNET et al., 1999; JENNINGS et al., 2002; PENALIGGON, 1997; POSTAL et al., 1995).

A molécula do fipronil é extremamente ativa e possui capacidade para agir no Sistema Nervoso Central dos insetos e mamíferos. A sua toxicidade está relacionada a sua habilidade para agir como um bloqueador não competitivo dos canais de Cl⁻ ligados aos receptores do ácido γ -aminobutírico (GABA), levando os insetos à morte por hiperexcitação neuronal e paralisia (ZHAO, 2004).

2.2 Mitocôndrias

As mitocôndrias são organelas intracelulares com dimensões e formas diversas, dependendo dos tecidos e estados metabólicos nos quais se localizam (DAUM, 1985). Podem apresentar de 0,2 a 1 μm de diâmetro, de 2 a 8 μm de comprimento e são responsáveis pela respiração celular (PIMENTEL, 2001).

A membrana mitocondrial externa possui superfície menor, sendo constituída principalmente por fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (DAUM, 1985). É permeável, permitindo a passagem dos substratos da cadeia respiratória (WALLACE; STARKOV, 2000), de pequenas moléculas ($D_a < 5000$) e íons que se deslocam facilmente por meio de canais transmembrana, formados por uma família de proteínas integrais denominadas porinas (NELSON; COX, 2011), dentre outros compostos.

O espaço intermembranas é muito pequeno e possui grande importância fisiológica. Neste espaço, localizam-se enzimas envolvidas no metabolismo energético como o citocromo c, creatina quinase e adenilato ciclase, além de proteínas regulatórias da viabilidade celular, como o citocromo c e o fator indutor de apoptose (FREY; MANNELLA, 2000).

Já a membrana mitocondrial interna é formada por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e cardiolipina (DAUM, 1985). É impermeável à maioria das moléculas pequenas e íons, sendo necessária a presença de transportadores específicos para que outras espécies químicas possam atravessá-la (NELSON; COX, 2011). É permeável ao oxigênio molecular, dióxido de carbono, óxido nítrico e água. Apresenta muitas invaginações ou cristas mitocondriais, recentemente reconstruídas tridimensionalmente, caracterizando grande complexidade (FREY; MANNELLA, 2000). Nestas cristas, localizam-se os componentes da cadeia respiratória e a enzima ATP sintase (NELSON; COX, 2011).

2.2.1 Cadeia transportadora de elétrons (cadeia respiratória)

A cadeia respiratória (Figura 2) é constituída por uma série de componentes transportadores de elétrons (geralmente proteínas integrais de membrana) que atuam seqüencialmente (NELSON; COX, 2011). Cada complexo apresenta diversas subunidades protéicas, associadas a grupos prostéticos capazes de aceitar ou doar um ou dois elétrons, tais como FMN, FAD, centros ferro-enxofre, grupos heme (presentes nos citocromos) e íons cobre (MARZZOCO; TORRES, 2007).

Os quatro complexos (I, II, III e IV) da cadeia respiratória se localizam nas cristas da membrana mitocondrial interna. Os complexos I e II catalisam a transferência de elétrons para a ubiquinona por meio de dois doadores diferentes: o NADH (complexo I) e o succinato (complexo II). O complexo III transporta os elétrons da ubiquinona ao citocromo c e o complexo IV, por sua vez, transfere os elétrons do citocromo c para umceptor final, ou seja, o oxigênio, reduzindo-o à água (NELSON; COX, 2011).

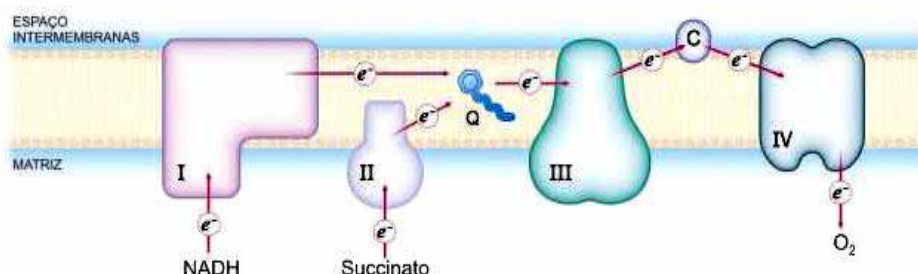


FIGURA 2 - Modelo esquemático do fluxo de elétrons, provenientes do NADH ou do succinato, por meio dos complexos I, II, III e IV da cadeia respiratória, até o oxigênio. C: citocromo c; Q: coenzima Q (Fonte: MARZZOCO; TORRES, 2007).

2.2.2 F_0F_1 -ATPase

A F_0F_1 -ATPase (Figura 3) possui duas estruturas protéicas distintas, sendo F_0 uma porção transmembrana através da qual os prótons H^+ retornam

para o interior da matriz mitocondrial e F_1 , uma proteína periférica que permite a síntese ou hidrólise de ATP (JUNGE et al.,1997). A letra o subscrita em F_o significa sensível à oligomicina e o número 1 em F_1 se refere ao nome a esta porção de fator de acoplamento 1 (MARZZOCO; TORRES, 2007; NELSON; COX, 2011).

A porção F_1 é formada por subunidades α_3 , β_3 , γ , δ e ϵ , projetando-se para a matriz mitocondrial, sendo que as seis subunidades maiores (três α e três β) alternam-se em um círculo ao redor da subunidade γ que, por sua vez, associa-se à subunidade ϵ . O hexâmero $\alpha_3\text{-}\beta_3$ interage com a subunidade δ . A porção F_o contém as subunidades a , b e c_{10} e está inserida na membrana interna. As 10 subunidades c formam estrutura em forma de anel e interagem com a subunidade a que, por sua vez, liga-se ao dímero b_2 . A união das duas porções ocorre por meio de um eixo central, formado por subunidades γ - ϵ e por um eixo lateral, contendo as subunidades δ - b_2 . Na porção F_o existe canais de passagem de prótons (entrada e saída) e na porção F_1 , ocorre a síntese de ATP por meio de três sítios ativos, presentes um em cada unidade β , junto a uma interface α/β (MARZZOCO; TORRES, 2007).

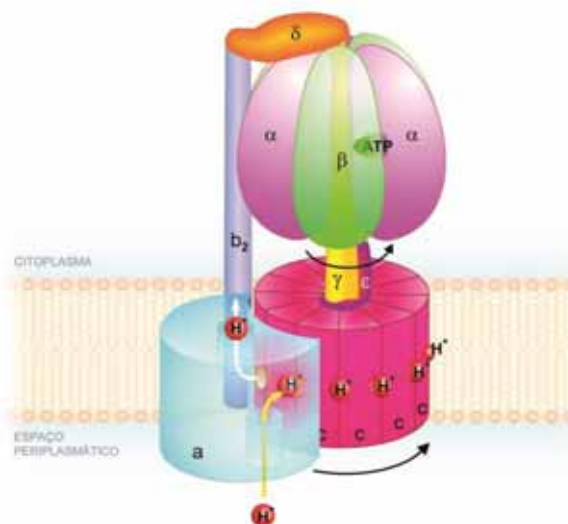


FIGURA 3 - F_oF_1 -ATPase (Fonte: MARZZOCO; TORRES, 2007).

Os inibidores da F_oF_1 -ATPase são a oligomicina, antibiótico isolado da espécie *Streptomyces diastochromogenes* e o diciclohexilcarbodiimida (DCCD)

Ambos reagem covalentemente com a subunidade *c* de F_0 , bloqueando o fluxo de prótons e inibindo a atividade da F_0F_1 -ATPase (PEDERSEN et al., 1978) e conseqüentemente, a síntese de ATP. Uma vez que os processos de síntese de ATP e transporte de elétrons são acoplados, o bloqueio de um deles reflete imediatamente no outro, ou seja, interrompe a síntese de ATP e o consumo de oxigênio, indicando interrupção no transporte de elétrons na cadeia respiratória.

2.2.3 Fosforilação oxidativa

Conforme a teoria quimiosmótica proposta por Mitchell, associada à hipótese do acoplamento conformacional de Boyer, a passagem de elétrons na cadeia respiratória, através dos complexos I, III e IV permite a ejeção de prótons da matriz para o espaço intermembranas, originando um gradiente eletroquímico de prótons (Figura 4). A energia livre liberada pelo retorno destes prótons (através do canal de prótons localizados na porção F_0 da enzima F_0F_1 -ATPase) à matriz mitocondrial, promove uma alteração conformacional nos sítios catalíticos localizados na porção F_1 desta enzima, liberando o ATP formado a partir de ADP e P_i (BOYER et al., 1973; MITCHELL, 1961).

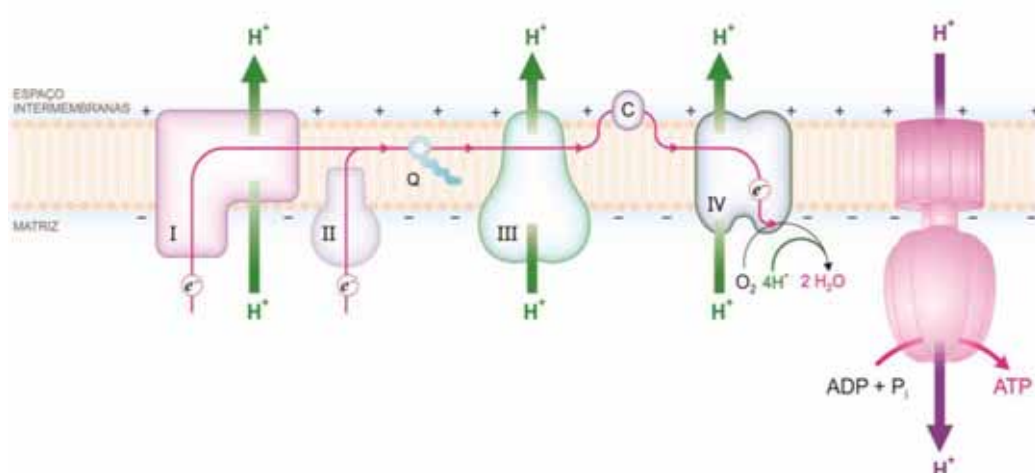


FIGURA 4 - Esquema representativo do transporte de elétrons e fosforilação oxidativa (Fonte: MARZZOCO; TORRES, 2007).

Em 1955, Chance e Williams descreveram a cinética de óxido/redução dos componentes da cadeia respiratória mitocondrial e definiram os conceitos operacionais do estado metabólico mitocondrial e controle respiratório. Em estudos desenvolvidos no ano seguinte, os pesquisadores desenvolveram o método polarográfico para medir a fosforilação oxidativa, estabelecendo cinco condições ou estados, capazes de controlar a velocidade da respiração mitocondrial. O estado 1 é caracterizado pela ausência de ADP e substrato respiratório; o estado 2 é aquele no qual o substrato respiratório é o fator limitante da respiração; o estado 3 contém todos os componentes em concentrações adequadas, sendo a velocidade de fosforilação do ADP o fator limitante; o estado 4 (basal), no qual a respiração é limitada pela disponibilidade de ADP e o estado 5, caracterizado pela ausência de oxigênio (MORELAND, 2001).

No interior da célula em condições normais, as mitocôndrias utilizam a energia acumulada na forma do gradiente de prótons para sintetizar ATP por meio da F_0F_1 -ATPase. Porém, na presença de quantidades elevadas de ATP, ausência de substratos oxidáveis e ausência de ADP, a enzima F_0F_1 -ATPase se comporta como uma fosfohidrolase e opera no sentido de hidrólise de ATP, ejetando prótons para o espaço intermembranas, com o objetivo de manter o gradiente eletroquímico de prótons semelhante ao gradiente proporcionado pela oxidação de substratos oxidáveis na cadeia respiratória (BRACHT; ISHII-IWAMOTO; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, 2003).

2.3 Fígado e Hepatotoxicidade

Vários fatores contribuem para a toxicidade química do fígado, tornando-o órgão alvo de várias classes de toxicantes e toxinas naturais, devido à sua função principal na biotransformação de substâncias exógenas (xenobióticos). Hepatócitos entram em contato com xenobióticos administrados oralmente sem sofrerem alteração sistêmica ou diluição, chegando ao fígado pela veia porta, que traz o sangue pobre em oxigênio, mas rico em nutrientes provenientes do

trato gastrointestinal. Nos hepatócitos, o processo metabólico de biotransformação destes xenobióticos hidrofóbicos pode gerar metabólitos ativos tóxicos não acoplados às reações conjugadas protetoras, responsáveis por transformá-los em substâncias hidrofílicas, capazes de serem eliminadas mais facilmente do organismo pela excreção renal (MEYER; KULKARNI, 2001). Os hepatócitos possuem, entretanto, mecanismos de defesa capazes para combatê-los e o resultado entre a bioativação, desintoxicação e mecanismos de defesa que evidencia se um composto desencadeia ou não toxicidade (GÓMEZ-LECHÓN et al., 2001).

A atividade anabólica dos hepatócitos também pode causar danos celulares, por meio de vários mecanismos, dentre eles, pelo comprometimento da produção de energia mitocondrial (MEYER; KULKARNI, 2001).

As hepatotoxicidades induzidas quimicamente são causadas por substâncias capazes de provocar danos aos hepatócitos, denominadas hepatotóxicas. Drogas hepatotóxicas intrínsecas dependem da relação dose-resposta, enquanto danos ao fígado causados por hepatotóxicas idiossincráticas, da susceptibilidade individual e resultam de reações de hipersensibilidade ou conversões metabólicas não usuais, as quais podem acontecer devido ao polimorfismo no gene metabólico de fármacos (MEYER; KULKARNI, 2001).

Outros mecanismos de interação do toxicante envolvem efeitos secundários, dentre eles, depleção de moléculas celulares tais como ATP e GSH; produção de radicais livres; danos oxidativos principalmente para a membrana lipídica; ligação covalente de metabólitos reativos em moléculas celulares importantes e colapso do gradiente de íons regulatórios (MEYER; KULKARNI, 2001).

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Avaliação Ética

A Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) do Campus Experimental da UNESP de Dracena certificou que os procedimentos utilizando animais estão de acordo com os “Princípios Éticos na Experimentação Animal” (Protocolo n.º. 34/2012).

3.2 Animais

Ratos Wistar machos, provenientes do Biotério Central da Unesp (Campus de Botucatu), ficaram alojados no Biotério do Campus Experimental de Dracena, em número máximo de quatro animais por caixa, com cobertura metálica e serragem de madeira. As caixas plásticas, com dimensões (CxLxA) 41x34x16 cm, foram armazenadas sob temperatura controlada de aproximadamente 22°C e os animais receberam alimento e água *ad libitum*, seguindo recomendações do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* - Institute for Laboratory Animal Research. Os animais não receberam tratamento prévio até o momento da decapitação uma vez que os experimentos com o fipronil foram realizados *in vitro*, empregando mitocôndrias isoladas de fígado.

3.3 Reagentes

Em todos os ensaios, reagentes de alto grau analítico disponíveis comercialmente foram empregados e as soluções foram preparadas com água ultra-filtrada em sistema purificador Millipore DirectQ-3[®] (Milli-Q[®]). As substâncias lipofílicas, incluindo o fipronil, foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO).

3.4 Fipronil

O fipronil foi gentilmente cedido pela empresa OURO FINO AGRONEGÓCIOS. Baseado em dados preliminares obtidos de testes realizados no laboratório, as doses selecionadas e empregadas nos experimentos *in vitro* foram de 5, 10, 15 e 25 μM .

3.5 Isolamentos de mitocôndrias intactas e preparação de mitocôndrias rompidas

O método da centrifugação diferencial (PEDERSEN et al., 1978) foi aplicado no isolamento das mitocôndrias provenientes de ratos Wistar machos, com 180-200 g, anestesiados com éter e eutanasiados por decaptação em guilhotina. A exposição do fígado ocorreu mediante incisão bilateral na cavidade abdominal, com remoção imediata, sendo picotado em pequenos fragmentos imersos rapidamente em 50 mL de meio contendo sacarose 250 mM, Ácido etilenoglicol bis(β aminoetil éter) N,N,N',N' tetraacético (EGTA) 1 mM e Ácido 2 [4(2 hidroxiletil) piperazinil(1)] etanossulfônico (HEPES)-KOH 10 mM, pH 7,2, a 4°C. Os fragmentos, após lavagens sucessivas no mesmo meio, foram homogeneizados três vezes por 15 segundos, com intervalos de 1 minuto, em homogeneizador Potter-Elvehjem. A suspensão obtida foi centrifugada a 770 g durante 5 minutos, a 4°C e o sobrenadante resultante, centrifugado a 9.800 g durante 10 minutos, a 4°C. O sedimento obtido foi ressuspenso em 10 mL de meio contendo sacarose 250 mM, EGTA 0,3 mM e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,2, e centrifugado a 4.500 g durante 15 minutos, a 4°C. O sedimento mitocondrial final resultante foi homogeneizado em 1 mL de meio contendo sacarose 250 M e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,2, mantido em temperatura de 4°C e utilizado por período máximo de 3 horas, após o isolamento.

As mitocôndrias rompidas foram obtidas a partir das intactas isoladas, por meio de choque térmico, após três ciclos consecutivos de congelamento

em nitrogênio líquido e descongelamento em banho aquecido a 37°C. Em seguida, os fragmentos de membrana foram mantidos a 4°C e utilizados na avaliação das atividades enzimáticas mitocondriais em um período máximo de 3 horas.

3.6 Dosagem das proteínas mitocondriais

A concentração das proteínas mitocondriais foi determinada com o uso do espectrofotômetro do modelo DU-800 (Beckman Coulter, Fullerton, CA), empregando-se a reação do biureto, conforme Cain e Skilleter (1987). Uma alíquota de 10 µL da suspensão mitocondrial foi solubilizada em 100 µL de ácido deoxicólico 5% (m/v), seguido de 1390 µL de água Milli-Q® e 1500 µL de reagente Biureto 0,15% (m/v). A concentração de proteína foi determinada em comprimento de onda de 540 nm por meio da curva de calibração com a albumina de soro bovino (BSA) como padrão, preparada nas mesmas condições das amostras.

3.7 Determinação do consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio por mitocôndrias intactas foi monitorado polarograficamente, em oxímetro equipado com eletrodo de oxigênio do tipo Clark (Strathkelvin Precision Dissolved Oxygen Respirometer, Strathkelvin Instruments Limited, Glasgow, Scotland, UK) e os parâmetros respiratórios foram determinados conforme Chance e Willians (1955). As mitocôndrias intactas (1mg/mL) foram incubadas sob agitação (volume final de 1 mL), em uma câmara fechada e termostatizada a 30°C, no meio de respiração contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM e HEPES-KOH 10 mM, acrescido de EGTA 0,5 mM e K₂HPO₄ 10 mM (pH=7,4) e energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM ou succinato de potássio 5 mM (acrescido de rotenona 2,5 µM) ou N,N,N,N-tetrametil-p-fenileno-diamina (TMPD) 200 µM + ascorbato 3 mM. Diferentes concentrações (5, 10, 15 e 25 µM) do fipronil foram adicionadas e as

velocidades de consumo de oxigênio, determinadas por meio do software Strathkelvin Oxygen 782 System (versão 3.0, 2005), expressas como nmol O₂ consumido/min. mg de proteína. A respiração do estado 3 teve início após a adição de 400 nmols de ADP.

3.8 Determinações das atividades das enzimas relacionadas à cadeia respiratória mitocondrial (NADH desidrogenase e succinato desidrogenase)

As atividades das enzimas NADH desidrogenase e succinato desidrogenase foram medidas espectrofotometricamente de acordo com Bracht et al., 2003, utilizando espectrofotômetro. O meio de reação (volume final de 1,5 mL) continha TRIS 20 mM, pH 7,4 e antimicina A 1 µM. Mitocôndrias rompidas (0,2 mg/mL) foram acrescidas, juntamente com diferentes concentrações de fipronil (5, 10, 15 e 25 µM), NADH 1 mM ou succinato 10 mM e ferricianeto de potássio 0,4 mM, como aceptor de elétrons. A quantidade de ferricianeto reduzido foi determinada pelo decréscimo da absorvância em comprimento de onda de 420 nm e a atividade das enzimas foi representada em nmol/min. mg de proteína, considerando o coeficiente de extinção molar do ferricianeto de 1,04 mM⁻¹.

3.9 Determinação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$)

O potencial elétrico de membrana das mitocôndrias intactas foi determinado em espectrofluorímetro modelo RFPC 5301 (Shimadzu, Tokyo, Japão), monitorando-se as variações de fluorescência promovida pela captação de safranina O, nos comprimentos de onda de 505 e 535 nm para excitação e emissão, respectivamente. As mitocôndrias intactas (1 mg/mL) foram incubadas a 30°C em meio de reação (volume final de 2 mL) contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, EGTA 0,5 mM, HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4, e o indicador safranina O 4 µM. Os substratos usados foram glutamato 5 mM +

malato 5 mM ou succinato 5 mM (acrescido de rotenona 2,5 μ M). Os resultados foram expressos como porcentagem em relação à fluorescência da amostra controle, ou seja, sem adição de fipronil.

3.10 Determinação da concentração de ATP mitocondrial

O método de quimioluminescência (sistema luciferina-luciferase de vaga-lume) foi utilizado na quantificação de ATP mitocondrial, por meio do kit Bioluminescent Assay Kit Sigma (St. Louis, MO, USA) em um aparelho Luminômetro modelo Sirius I (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Alemanha). O meio de reação (volume final de 1 mL) continha sacarose 125 mM, KCl 65 mM, EGTA 0,5 mM, HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4, acrescido de glutamato 5 mM e malato 5 mM como substratos. Diferentes concentrações (5, 10, 15 e 25 μ M) de fipronil foram adicionadas, além da suspensão mitocondrial intacta (1 mg de proteína/mL). Após homogeneização, as amostras ficaram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 9.000 *g* durante 5 minutos, a 4°C. Os sedimentos resultantes foram solubilizados em 1 mL de ácido percloroacético 1 M gelado e centrifugados a 12.000 *g* durante 15 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, foram coletados 100 μ L de cada amostra e neutralizados (pH=7,0) com KOH 2 M, seguido da adição de Tris-HCl 100 M, pH 7,8 (volume final de 1 mL) e centrifugação a 12.000 *g*, durante 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes resultantes (100 μ L de cada) foram avaliados em triplicata no Luminômetro, de acordo com as recomendações do fabricante do kit.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância estatística dos dados experimentais foi determinada pelo teste de análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Dunnet, comparando o grupo tratado e o controle, sendo considerados estatisticamente significantes resultados com valores de $P < 0,05$. As análises foram realizadas aplicando o programa GraphPad Prism, versão 4.0 para Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, USA 03/04/2003).

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos do fipronil sobre a respiração de mitocôndrias isoladas de fígado de rato

Os efeitos do fipronil causados com a adição das doses de 5 a 25 μM sobre a velocidade de consumo de oxigênio no estado 3 foi avaliada em dois protocolos experimentais: no primeiro, o substrato oxidável foi o glutamato acrescido de malato (Figura 5A); no segundo, o substrato oxidável foi o succinato e o complexo I foi inibido pela rotenona (Figura 5B). O fipronil inibiu a velocidade respiratória no complexo I de maneira dose-dependente, porém apenas nas mitocôndrias energizadas com os substratos do complexo I.

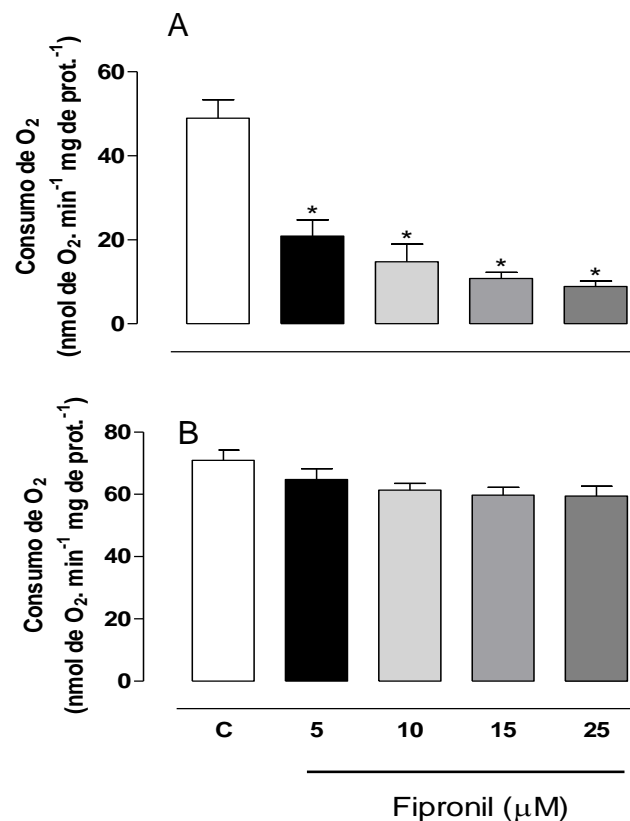


FIGURA 5 - efeito do fipronil no estado 3 da respiração em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM (A) ou succinato 5 mM (acrescido de rotenona 50 nM) (B). Valores representam

a média \pm EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. *Significativamente diferente do controle ($P < 0,05$).

Após observar que o fipronil inibiu o consumo de oxigênio no complexo I da cadeia respiratória, um ensaio foi realizado para avaliar sua atuação como agente desacoplador, empregando glutamato + malato como substratos. A adição do fipronil ocorreu após o consumo total do ADP quando se inicia o estado 4 e observou-se que a substância não estimulou o consumo de oxigênio (Figura 6).

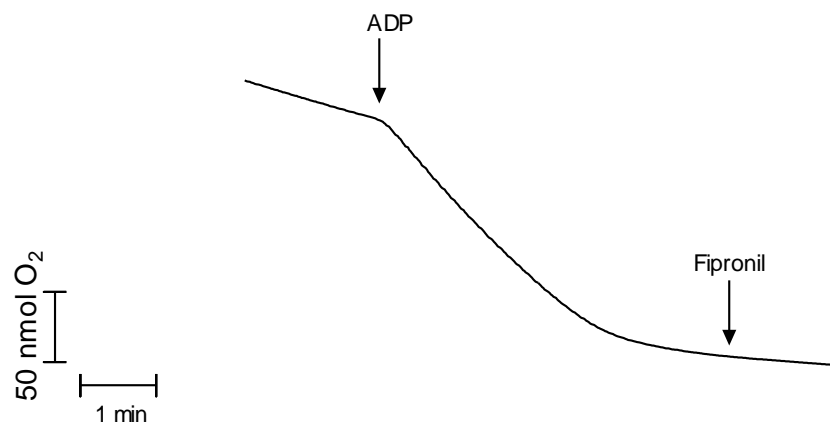


FIGURA 6 - Efeito do fipronil 25 μM no estado 4 da respiração, evidenciada após o consumo total de ADP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM.

Com o objetivo de verificar se o fipronil atua diretamente sobre os complexos da cadeia transportadora de elétrons, foram realizados dois experimentos. O primeiro consistiu em empregar os substratos glutamato + malato, iniciando a respiração com 400 nmols de ADP. Após alguns minutos do início da respiração do complexo III, oligomicina (inibidor da F_0F_1 -ATPase) ou atractilosídeo (inibidor do translocador de nucleotídeos de adenina; ADP/ATP)

ou fipronil foram inseridos no meio, inibindo a respiração mitocondrial. Em seguida, o desacoplador CCCP foi adicionado, sendo que o mesmo estimulou a velocidade de consumo de oxigênio quando foram usados a oligomicina e o atractilosídeo, mas não reverteu a inibição promovida pelo fipronil (Figura 7).

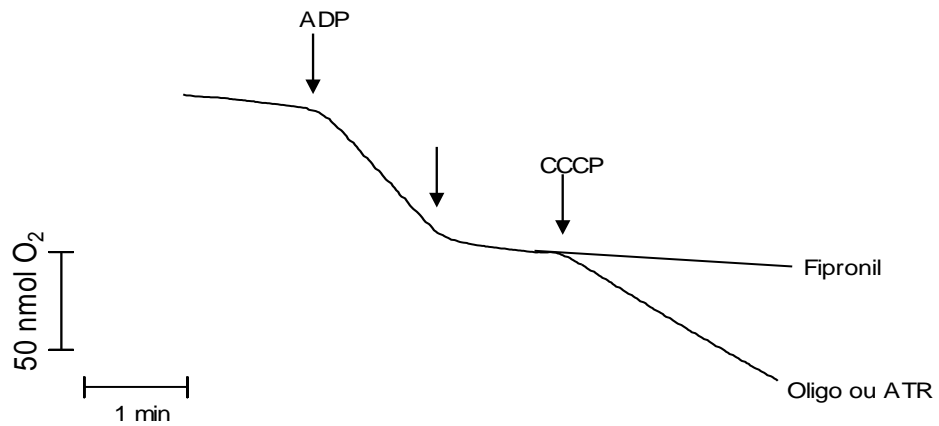
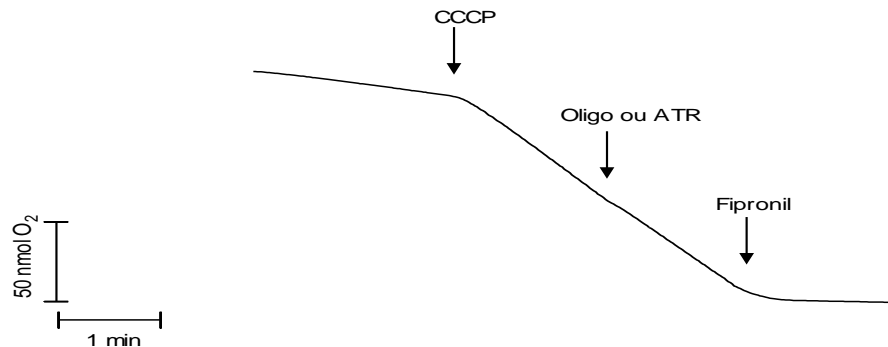


FIGURA 7 - Efeito do CCCP (1 μ M) sobre o consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM, inibido pela oligomicina (Oligo) 1 μ g/mL, atractilosídeo (ATR) 1 μ M ou fipronil 25 μ M.

No segundo, CCCP foi utilizado como agente desacoplador e o substrato oxidável foi o glutamato + malato. Após alguns minutos, oligomicina, ou atractilosídeo foram adicionados e não inibiram o consumo de oxigênio. Em seguida, fipronil foi adicionado e o mesmo inibiu o consumo de oxigênio (Figura



8).

FIGURA 8 - Efeito da oligomicina (Oligo) $1 \mu\text{g/mL}$, atractilosídeo (ATR) $1 \mu\text{M}$ ou fipronil $25 \mu\text{M}$ no consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas de fígado de rato, energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM e desacopladas por CCCP $1 \mu\text{M}$.

5.2 Efeitos do fipronil sobre a atividade das enzimas NADH desidrogenase e succinato desidrogenase

Os efeitos do fipronil na atividade das enzimas NADH desidrogenase e succinato desidrogenase foram avaliados em mitocôndrias rompidas. O fipronil, nas concentrações de 5 a $25 \mu\text{M}$, promoveu uma inibição dose-dependente sobre a atividade da NADH desidrogenase (Figura 9A) apresentando efeito significativo a partir de $15 \mu\text{M}$. Não foram observadas alterações significativas na atividade da succinato desidrogenase (Figura 9B).

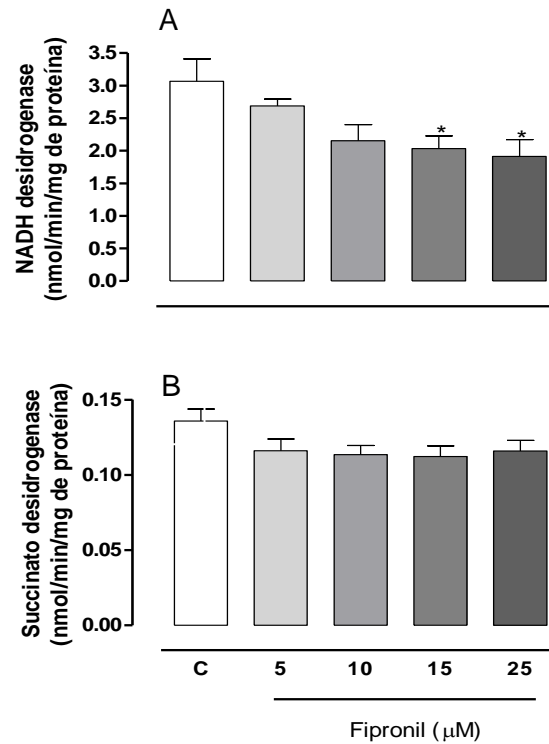


FIGURA 9 - Efeitos do fipronil na atividade das enzimas NADH desidrogenase (A) e succinato desidrogenase (B) em mitocôndrias rompidas (0,2 mg de proteína/mL) isoladas de fígado de rato. Valores representam a média \pm EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. *Significativamente diferente do controle ($P < 0,05$). (C = controle, sem adição de fipronil)

5.3 Efeitos do fipronil sobre o potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$)

O potencial de membrana em mitocôndrias intactas de fígado de rato foi avaliado por espectrofluorimetria, utilizando-se a captação da safranina O como indicador do potencial e glutamato + malato (Figura 10A) ou succinato (Figura 10B) como substratos oxidáveis. Com a adição das mitocôndrias ocorreu a formação do potencial de membrana e após 120 segundos, diferentes concentrações de fipronil (5 a 25 μM) foram adicionados em experimentos independentes. O fipronil dissipou o potencial elétrico de membrana de maneira

dose-dependente, mas somente nas mitocôndrias energizadas com glutamato + malato.

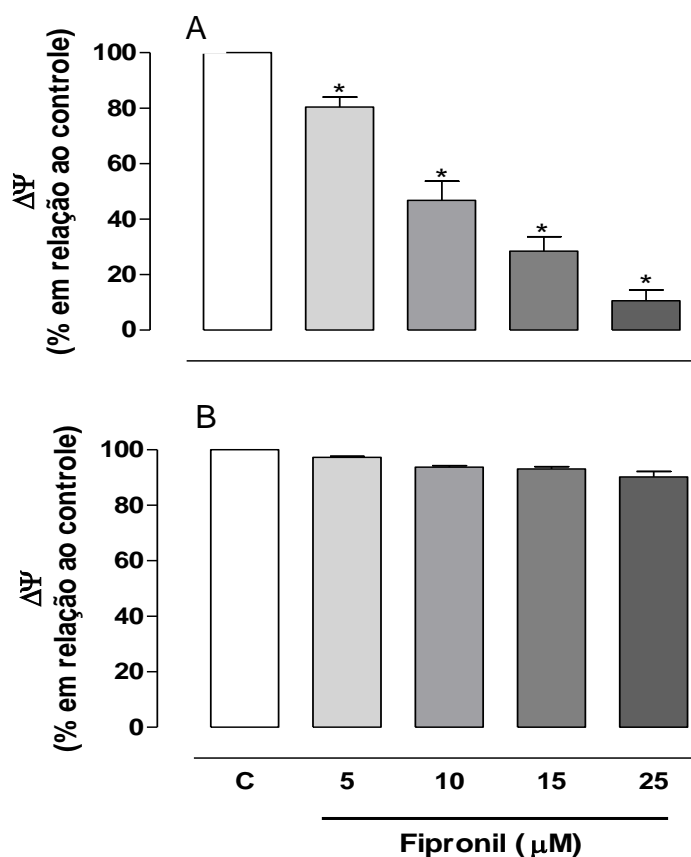


FIGURA 10 - Efeito da adição de fipronil no potencial de membrana em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM (A) ou succinato 5 mM (+ 2,5 µM de rotenona) (B). *Significativamente diferente do controle ($P < 0,05$).

5.4 Efeito do fipronil sobre a concentração de ATP mitocondrial

O efeito do fipronil na síntese de ATP pelas mitocôndrias isoladas foi avaliado pelo método de quimioluminescência (sistema luciferina-luciferase de vagalume), por meio do kit “Bioluminescent Assay Kit” da marca Sigma-Aldrich. O Fipronil inibiu significativamente a síntese de ATP a partir da concentração 10 µM, apresentando efeito dose-dependente (Figura 11). A substância inibidora do complexo I, rotenona, foi usada como controle positivo.

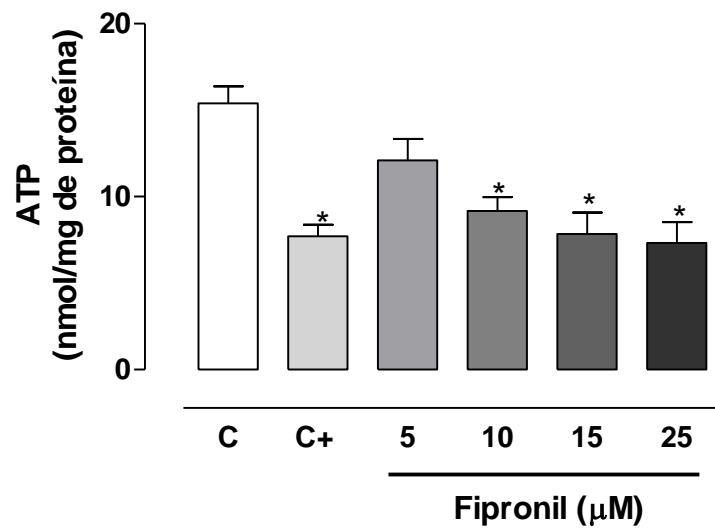


FIGURA 11 - Efeitos do fipronil na concentração de ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM. Valores representam a média \pm EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. *Significativamente diferente do controle ($P < 0,05$). (C = controle, sem adição de fipronil ou rotenona; C+ = rotenona 2,5 μ M).

6 DISCUSSÃO

As mitocôndrias são importantes organelas celulares por serem responsáveis pela maior parte da energia gerada e utilizada pelas células (NICHOLLS; FERGUSON, 2002). Estas desempenham papel fundamental na sobrevivência celular por representarem o principal sítio do metabolismo oxidativo dos eucariotos e também por participarem de vias apoptóticas e necróticas (DESAGUER; MARTINOU, 2000; LIU et al., 1996; NICHOLLS; FERGUSON, 2002).

A fosforilação oxidativa é um processo que envolve fluxo de elétrons, doados por substratos oxidáveis como nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo ($FADH_2$), por uma cadeia de transportadores ligados à membrana mitocondrial interna, denominada cadeia respiratória (Complexos I a IV) (NELSON; COX, 2002).

Vários compostos capazes de promover alterações na fosforilação oxidativa têm sido descritos na literatura científica (WALLACE; STARKOV, 2000). Entre estes, os denominados agentes desacopladores, os quais aumentam a permeabilidade da membrana mitocondrial interna aos prótons, comprometendo assim a formação do gradiente eletroquímico de prótons e conseqüentemente a produção de ATP (NICHOLLS; FERGUSON, 2002). Os agentes inibidores interferem na respiração acoplada à síntese de ATP, atuando preferencialmente nos complexos da cadeia respiratória ou na F_0F_1 -ATPase (NELSON; COX, 2002).

Estudos anteriores demonstraram que o fipronil e seus metabólitos apresentam toxicidade em diferentes modelos de células e que este efeito pode estar relacionado a uma diminuição na produção de ATP (DAS et al., 2006; VIDAU et al., 2009). Um trabalho realizado por Vidau et al., 2011 indicou que o fipronil atuaria como desacoplador da fosforilação oxidativa induzindo apoptose em células neuronais. Nesse sentido, no presente trabalho, foram avaliados os efeitos do fipronil sobre a bioenergética mitocondrial para ajudar na elucidação dos mecanismos de toxicidade da substância.

Os resultados obtidos na respiração mitocondrial de estado 3, empregando mitocôndrias energizadas com glutamato + malato, doadores de elétrons para o complexo I ou succinato, doador de elétrons para o complexo II, mostraram que o fipronil inibiu a cadeia respiratória de maneira dose-dependente. Conforme Chance e Williams (1955), o estado 3 contém mitocôndria, substrato respiratório e ADP, sendo que a velocidade de fosforilação do ADP é o fator limitante da respiração. Esta inibição observada nos experimentos poderiam decorrer da atuação do fipronil diretamente na cadeia respiratória ou ainda, por inibição da F_0F_1 -ATPase ou do translocador de ADP/ATP.

Para avaliar a atuação do fipronil como agente desacoplador, o composto foi adicionado ao estado 4 da respiração, após o consumo do ADP. Substâncias desacopladoras são capazes de atuar sobre o acoplamento da síntese de ATP com o transporte de elétrons (MARZZOCO; TORRES, 2007). Quando a membrana mitocondrial torna-se permeável a H^+ , ocorre dissipação do potencial de membrana, aumentando a velocidade de respiração do estado 4; nestas condições (desacoplamento), a capacidade da mitocôndria de sintetizar ATP é comprometida (MITCHELL, 1961; NICHOLLS, 1982). Ao acrescentar o fipronil 25 μ M, após o consumo total do ADP, observou-se que este não estimulou a respiração do estado 4 (basal), no qual a respiração é limitada pela disponibilidade de ADP (MORELAND, 2001), descartando a hipótese de sua atuação como agente desacoplador, em desacordo ao efeito apresentado por Vidau et al., 2011. Os demais experimentos de respiração comprovaram que o efeito do fipronil é diretamente sobre o complexo I da cadeia respiratória, descartando-se um possível efeito sobre a F_0F_1 -ATPase ou sobre o translocador de ADP/ATP.

Em relação a atuação do fipronil, administrado em doses de 5 a 25 μ M, sobre a NADH desidrogenase foi observada uma inibição do tipo dose-dependente evidenciando o efeito inibidor do composto sobre a enzima localizada no complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. Já em relação à

atividade sobre a succinato desidrogenase não foram observadas alterações significativas, confirmando que o composto não atua no complexo II.

O fipronil dissipou significativamente o potencial de membrana de mitocôndrias energizadas com glutamato + malato de maneira dose-dependente, efeito este desencadeado por inibidores dos complexos da cadeia respiratória, como a rotenona e por substâncias desacopladoras, como o CCCP, ou seja, aquelas capazes de atuar sobre o acoplamento da síntese de ATP com o transporte de elétrons (MARZZOCO; TORRES, 2007). Esses resultados corroboram com a hipótese proposta anteriormente, indicando que o seu mecanismo tóxico poderia ser por sua atuação diretamente sobre o complexo I da cadeia respiratória.

O fipronil inibiu significativamente a síntese de ATP de mitocôndrias energizadas com glutamato + malato a partir da concentração de 10 μM confirmando os dados obtidos na respiração, indicando uma capacidade desta substância em diminuir o potencial de fosforilação oxidativa. Uma vez que o ATP é um componente metabólico essencial, interferências em sua síntese ou utilização caracterizam mecanismos pelo quais os xenobióticos podem expressar toxicidade aguda ou crônica (MEYER; KULKARNI, 2001).

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o fipronil afeta a bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato, energizadas com glutamato e malato, inibindo o complexo I da cadeia respiratória por meio da inibição da enzima NADH desidrogenase e dissipa o potencial de membrana, reduzindo a capacidade mitocondrial de fosforilação oxidativa, o que resulta na diminuição da produção de ATP. Esses efeitos podem estar relacionados com a intoxicação hepática de animais que fizeram uso de fipronil.

8 REFERÊNCIAS

- AAJOUD, A.; RAVANEL, P.; TISSUT, M. Fipronil metabolism and dissipation in a simplified aquatic ecosystem. **J. of agric. and food chem**, v.51, p.1347-1352, 2003.
- BOBE, A.; COSTE, C.M.; COOPER, J.F. Factors influencing the adsorption of fipronil on soils. **J. of agric. and food chem**, v.45, p.4861-4865, 1997.
- BOYER, P.D.; CROSS, R.L.; MOMSEN, W. A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions. **Proc. of nat. acad. of sci. USA**, v.70, p.2837-2839, 1973.
- BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, C.L. Estudo do metabolismo energético em mitocôndrias isoladas de tecido animal In: BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.L. (Eds.) **Métodos de laboratório em bioquímica**, Barueri: Manole, 2003. Cap 9, p.227-247.
- CABONI, P.; SAMMELSON, R.E.; CASIDA, J.E. Phenylpyrazole insecticide photochemistry, metabolism, and GABAergic action: ethiprole compared with fipronil. **J. of agric. and food chem**, v.51, p.7055-7061, 2003.
- CAIN, K.; SKILLETER, D.N. Preparation and use of mitochondria in oxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B., (Eds.). **Biochem. Toxicol**, Oxford: IRL Press, p.217-254, 1987.
- CASTANHA ZANOLI, J.C. et al. Abamectin affects the bioenergetics of liver mitochondria: A potential mechanism of hepatotoxicity. **Toxicol. in vit**, v.26, p.51-56, 2012.
- CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. **Nature**, v. 175, p. 1120-1121, 1955.
- CHANTON, P.F. et al. Toxicity and bioaccumulation of fipronil in the nontarget arthropodan fauna associated with subalpine mosquito breeding. **Ecotoxicol. and environ. saf**, v.52, p.8-12, 2001.
- CHODOROWSKI, Z.; ANAND, J.S. Accidental dermal and inhalation exposure with fipronil – a case report. **J. of toxicol**, v.42, n.2, p.189-190, 2004.

- DAUM, G. Lipids of mitochondria. **Biochim. biophys. acta**, v. 822, n. 1, p. 1-42, 1985.
- DAS, P.C. et al. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. **Chem. biol. interac.**, v.164, p.200-214, 2006.
- DESAGUER, S.; MARTINOU, J.C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends. Cell. biol**, v.10, p.369-377, 2000.
- FUNG, H.T. et al. A case of accidental ingestion of ant bait containing fipronil. **J. toxicol. clin**, v.41; n.3; p.245– 248, 2003.
- FREY, T.G.; MANELLA, C.A. The internal structure of mitochondria. **Trends biochem. sci.**, v. 25, n. 7, p. 319-324, 2000.
- GARCIA, A.F. et al. Comparative effects of lantadene A and its reduced metabolite on mitochondrial bioenergetics. **Toxicol**, v. 55, n. 7, p. 1331–1337, 2010.
- GÓMEZ-LECHÓN, M.J. et al. The use of cultured hepatocytes to investigate the metabolism of drugs and mechanisms of drug hepatotoxicity. **Altern. lab. anim.**, v. 29, n. 3, p. 225-231, 2001.
- GUILLOUZO, A. Liver cell models in *in vitro* toxicology. **Envirom. health perspect.**, Washington, v.106, supl. 2, p.511-532, 1998.
- HAINZL, D.; CASIDA J.E. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **Proc. nat. acad. sci.**, v.93, p.12746-12767, 1996.
- HUGNET, C.; CADORE, J.L.; BORDOISEAU, G. Use of fipronil spray 025% for the treatment of Damalínia equi (*Wereckella equi*) infestation. **Prat. vet. equi**, V. 31, p. 65-68, 1999.
- JENNINGS K.A. et al. Human exposure to fipronil from dogs treated with frontline. **Vet. hum. toxicol.**, v.44, n. 5, p.301–303, 2002.
- JUNGE, W.; LILL, H.; ENGELBRECHT, S. ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics. **Trends biochem. sci.**, v.22, p.420-423, 1997.

- LEGHAIT, J. et al. Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. **Toxicology**, v.255, p.38-44, 2009.
- LIU, X. et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for ATP and cytochrome c. **Cell**, p.86, v.147-157, 1996.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. Cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa. In: MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica básica**, 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. Cap. 11, p. 132-155.
- MEYER, S.A; KULKARNI, A.P. Hepatotoxicity. In: HODGSON, E.; SMART, R.C. (eds.) **Introduction to biochemical toxicology**, 3 ed. New York: John Wiley & Sons, 2001. p.487-507.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. **Nature**, v.191, p.144-148, 1961.
- MOHAMED, F. et al. Acute human self-poisoning with the *N*-phenylpyrazole insecticide fipronil – a GABA_A-gated chloride channel blocker. **J. toxicol.**, v.42, n.7, p.955-963, 2004.
- MORELAND, D.E. Effects of toxicants on electron transport and oxidative phosphorylation. In: HODGSON, E.; SMART, R.C. **Introduction to biochemical toxicology**, 3 ed. New York; John Wiley; Sons, 2001. p.309-323.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. Fosforilação oxidativa e fotofosforilação. In: **Princípios de bioquímica de Lehninger**, 5a. ed., Porto Alegre: ARTMED, 2011. p.707-772.
- NICHOLLS, D.G. Bioenergetics. **An introduction to the chemiosmotic theory**, London: Academic Press, 1982. p.25-96.
- NICHOLLS, D.G.; FERGUSON, S.J. **Bioenergetics**, 3. San Diego: Academic Press, 2002.
- PEDERSEN, P.L. et al. Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues. **Methods cell. biol.**, v.20, p.411-481, 1978.
- PENALIGGON, J. Getting to grips with fleas on pet dogs and cats. **Pestic. outl.**, v.8, p.19-23, 1997.

PIMENTEL, E.R. Mitocôndria. In: CARVALHO, H.S.; RECCO-PIMENTEL, S.M. (Ed.) **A célula**. 1. ed. Barueri: Manole, 2001. Cap. 14, p. 160-171.

POSTAL, J.M.R.; JEANIN, P.C.; CONSALVI, P.J. Field efficacy of a mechanical pump spray formulation containing 0,25 % fipronil in the treatment and control of flea infestation and associated dermatological signs in dogs and cats. **Vet. dermatol.**, v 6, p. 153-158, 1995.

SANTOS, A.B. et al. Dehydromonocrotaline induces cyclosporine A-insensitive mitochondrial permeability transition/cytochrome c release. **Toxicol.**, v.54, p.16-22, 2009.

SILVA, S.A. **Efeitos neurocomportamentais da exposição prolongada de ratos ao fipronil**. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas). 2008. p.108 – Faculdade de ciências farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

TANG, J. et al. In vitro metabolism of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam. **Chemico-biological interactions**, v.147, p.319-329, 2004.

TINGLE, C.C. et al. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. **Review environmental contaminants and toxicology**, v.176, p.1–66, 2003.

VIDAU, C. et al. Phenylpyrazole insecticides induce cytotoxicity by altering mechanisms involved in cellular energy supply in the human epithelial cell model Caco-2. **Toxicology in vitro**, v.23, p.589-597, 2009.

VIDAU, C. et al. Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y. **Neurotoxicology**, v.32, p.935-943, 2011.

WALLACE, K.B.; STARKOV, A.A. Mitochondrial targets of drug toxicity. **Annu. rev. pharmacol. toxicol.**, v.40, p.353-388, 2000.

ZHAO, X.; et al, T. Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. **The jour. of pharm. and exper. therap.**, v.310, n.1, p.192-201, 2004.