

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

**PAPEL DA MITOCÔNDRIA NA CITOTOXICIDADE
INDUZIDA PELA ABAMECTINA EM HEPATÓCITOS
ISOLADOS DE RATO**

Marcos Antonio Maioli
Zootecnista

ARAÇATUBA - SP
2012

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

**PAPEL DA MITOCÔNDRIA NA CITOTOXICIDADE
INDUZIDA PELA ABAMECTINA EM HEPATÓCITOS
ISOLADOS DE RATO**

Marcos Antonio Maioli
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
2012

M227p

Maioli, Marcos Antonio.

Papel da mitocôndria na citotoxicidade induzida pela abamectina em hepatócitos isolados de rato / Marcos Antonio Maioli. – Araçatuba : [s.n.], 2012.

95 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP. Faculdade de Medicina Veterinária. Araçatuba, SP, 2012.

Orientador: Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto.

Bibliografia

1. Biotransformação (Metabolismo). 2. Avermectinas. 3. Fosforilação. 4. Necrose. 5. Metabolismo. I. Título.

22. ed. 571.657

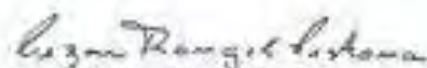
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: PAPEL DA MITOCÔNDRIA NA CITOTÓXIDADE INDUZIDA PELA ABAMECTINA EM
HEPATÓCITOS ISOLADOS DE RATO

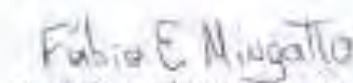
AUTOR: MARCOS ANTONIO MAIOLI

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.


Dr. CÉZAR RANGEL PESTANA


Dr. GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA


Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO

DATA DA REALIZAÇÃO: 21 de junho de 2012.



Presidente da Comissão Examinadora
Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO
- Orientador -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARCOS ANTONIO MAIOLI- nascido em Piracaia (SP) no dia 7 de abril de 1986, ingressou no curso de bacharelado em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista – UNESP - Campus de Dracena (SP) em agosto de 2005, obtendo o grau de zootecnista em julho de 2010. Esteve envolvido em atividades de pesquisa desde o início da graduação, desenvolvendo-as no Laboratório de Bioquímica Metabólica e Toxicológica (LaBMeT), atuando principalmente nas áreas de Bioquímica Toxicológica e Metabolismo. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) durante 2 anos e bolsista PIBIC, cota reitoria, por 9 meses. Ingressou no curso de Mestrado em Ciência Animal pela UNESP, Campus de Araçatuba (SP), em agosto de 2010 na área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica sob orientação do Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto, responsável pelas disciplinas de Bioquímica Animal e Química Geral do curso de graduação em Zootecnia da UNESP, Campus de Dracena. Ao longo do mestrado também foi bolsista FAPESP, concluindo o curso em Junho de 2012.

**“Cada um de nós nasce gênio.
Infelizmente a maioria morre na mediocridade”**

Robin Sharma

DEDICO:

**A meus pais, SÉRGIO MAIOLI e MARIA MADALENA DA SILVA PINTO MAIOLI,
grandes incentivadores e exemplos de vida a serem seguidos.**

**A minha noiva, CAMILA MEMARI TRAVA,
por todo incentivo, carinho e companheirismo.**

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelo caminho a mim traçado, pois ao longo de minha vida passei por situações que não entendia o motivo, mas agora vejo que foram importantes para meu engrandecimento espiritual.

Aos meus pais Sérgio Maioli e Maria Madalena da Silva Pinto Maioli, pelo carinho e amor incondicionais e pela formação pessoal que me proporcionaram, já que torna-se mais simples ser uma pessoa digna e com caráter quando se possui dois exemplos como esses em casa. Vocês significam o que há de mais importante na vida, que é uma base sólida, sobre a qual são construídos os princípios para se obter não só realizações profissionais, mas também pessoais.

A minha noiva Camila Memari Trava, que sempre esteve ao meu lado desde o início da graduação, que além de ser uma grande incentivadora é também minha grande motivação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto, exemplo de pesquisador e docente. Agradeço pela paciência, dedicação e amizade. Suas orientações foram essenciais para impulsionar meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus amigos que sempre torceram e ainda torcem pelo meu sucesso.

A equipe do laboratório que compreende os técnicos e alunos, tanto os atuais como os que já não estão mais atrelados ao laboratório, que tornaram possível o desenvolvimento das pesquisas graças ao trabalho em conjunto, pois trabalhando sozinho torna-se mais difícil a execução dos objetivos traçados.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento do presente trabalho e pela bolsa de mestrado concedida.

SUMÁRIO

	Página
I. INTRODUÇÃO	18
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 Generalidades sobre o fígado	22
2.2 Hepatotoxicidade	22
2.3 Biotransformação, participação do citocromo P450 e bioativação.....	23
2.4 Avermectinas.....	27
2.5 Abamectina, toxicidade e metabolismo.....	28
2.6 Mitocôndria	32
2.6.1 Mitocôndria e Função Energética	35
2.6.2 Inibidores e Desacopladores	37
2.6.3 Mitochondria e Homeostase Intracelular de Ca ²⁺	38
2.7 Morte celular por apoptose e necrose	40
III. OBJETIVOS.....	43
3.1 Objetivo geral.....	43
3.1.2 Objetivo específico.....	43
3.2 Hipótese	43
IV. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 Avaliação Ética	44
4.2 Animais.....	44
4.3 Reagentes	44
4.4 Abamectina	45
4.5 Isolamento dos Hepatócitos de Rato	45
4.6 Ensaio com Hepatócitos Isolados	49
4.6.1 Condições de Incubação dos Hepatócitos	49
4.6.2 Respiração Mitocondrial em Células Permeabilizadas	50
4.6.3 Determinação do Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	51
4.6.4 Níveis Celulares de ATP	52
4.6.5 Viabilidade Celular	53

4.6.6 Homeostase Intracelular de Ca^{2+}	54
4.6.7 Liberação de Citocromo <i>c</i>	55
4.6.8 Ativação da Caspase 3.....	55
4.6.9 Avaliação da Morte Celular por Necrose.....	56
4.7 Análise Estatística.....	57
V. RESULTADOS	58
5.1 Efeitos da Abamectina Sobre a Velocidade de Consumo de Oxigênio no Estado 3 em Hepatócitos Isolados de Rato.....	58
5.2 Efeitos da Abamectina Sobre o Potencial Elétrico de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em Hepatócitos Isolados de Rato.....	61
5.3 Efeitos da Abamectina Sobre os Níveis Intracelulares de ATP em Hepatócitos Isolados de Rato.....	63
5.4 Efeitos da Abamectina Sobre a Viabilidade Celular em Hepatócitos Isolados de Rato.....	65
5.5 Efeitos da Abamectina sobre a Homeostase Intracelular de Ca^{2+} em Hepatócitos Isolados de Rato.....	68
5.6 Efeitos da Abamectina Sobre a Liberação de Citocromo <i>c</i> em Hepatócitos Isolados de Rato.....	69
5.7 Efeitos da Abamectina Sobre a Ativação da Caspase 3 em Hepatócitos Isolados de Rato.....	70
5.8 Efeitos da Abamectina Sobre a Morte Celular por Necrose em Hepatócitos Isolados de Rato.....	71
VI. DISCUSSÃO	74
VII. CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\Psi_m$	Potencial elétrico de membrana mitocondrial interna
ABA	Abamectina
Ac-DEVD-MCA	Acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metilcumarínico
ADP	Adenosina 5'-difosfato
AMC	7-amino-4-metilcumarínico
ANT	Translocador de ADP/ATP
ALT	Alanina transaminase
AST	Aspartato transaminase
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ATR	Atractilosídeo
BSA	Albumina de soro bovino
$[Ca^{2+}]_c$	Concentração intracelular de Ca^{2+}
Cit. P450	Citocromo P450
CCCP	Carbonilcianeto-m-clorofenilhidrazona
Da	Dalton
DHM	Dehidromonocrotalina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNP	2,4-dinitrofenol
EGTA	Acido etilenoglicol bis-(β -aminoetil éter) N,N,N',N' tetracético
EPM	Erro padrão da média
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
FADH₂	Flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
FCCP	Carbonilcianeto-p-trifluormetoxifenilhidrazona
<i>g</i>	Força gravitacional
GABA	Complexo receptor do ácido gama-aminobutírico
GSH	Glutaciona reduzida
H⁺	Íon hidrogênio

H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HEPES	Ácido 2 [4(2 hidroxietil) piperazinil(1)] etanossulfônico
KCl	Cloreto de potássio
KCN	Cianeto de potássio
kg	Quilograma
KOH	Hidróxido de potássio
MCT	Monocrotalina
mg	Miligrama
mM	Milimolar
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
Olig	Oligomicina
pH	Potencial hidrogeniônico
Pi	Fosfato inorgânico
PTP	Poros de transição de permeabilidade
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Tris-(hidroximetil) amino metano
μL	Microlitro
μM	Micromolar
UP	Uniporter
TPM	Transição de permeabilidade mitocondrial

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1- Sequencia de reações para oxidação de xenobióticos catalisada pelo citocromo P450.....	25
Figura 2- Estruturas químicas das avermectinas naturais.....	27
Figura 3- Estruturas químicas das avermectinas B _{1a} e B _{1b} que compõem a abamectina. Destacadas em vermelho estão as principais diferenças.....	29
Figura 4- Principais metabólitos derivados Avermectina B _{1a} e as isoenzimas do citocromo P450 responsáveis por sua produção.....	31
Figura 5- Morfologia básica das mitocôndrias.....	33
Figura 6- Tomografia de mitocôndria isolada de fígado de rato com imagem 3D.....	34
Figura 7- Representação esquemática da cadeia respiratória mitocondrial acoplada a síntese de ATP.....	36
Figura 8- Representação do método polarográfico de avaliação da fosforilação oxidativa através da respiração mitocondrial de acordo com metodologia estabelecida por Chance e Willians (1956) e Moreland (2001).....	37
Figura 9- Representação do funcionamento dos canais do influxo de Ca ²⁺ pelo canal uniporter (UP) e efluxo pelo canal antiporter Ca ²⁺ /Na ⁺ e pelo poro de transição de permeabilidade (PTP).....	39
Figura 10- Representação esquemática do processo cirúrgico envolvido no isolamento de hepatócitos de rato.....	46
Figura 11- Representação simplificada da distribuição dos principais pontos onde ocorre a inserção de cânulas e/ou interrupção do fluxo sanguíneo ao longo da cirurgia.....	46
Figura 12- Imagem mostrando o sistema de perfusão do fígado para isolamento dos hepatócitos. A sequência de letras indica o	

	sentido do fluxo e os equipamentos responsáveis pela condução do líquido de perfusão até o fígado.....	47
Figura 13-	Câmara de Neubauer utilizada para avaliação da viabilidade celular por meio da exclusão do Trypan blue (0,16%) e contagem do número total de células.....	48
Figura 14-	Sistema de oxigenação das alíquotas celulares durante o processo de incubação.....	49
Figura 15-	Representação esquemática do oxímetro utilizado para o monitoramento do consumo de oxigênio pelos hepatócitos e do software usado para registrar e calcular as velocidades de consumo de oxigênio.....	51
Figura 16-	Efeito da abamectina (ABA) sobre o consumo de oxigênio em hepatócitos isolados de rato (10^6 células/mL) incubados a 37 °C.....	59
Figura 17-	Efeito da abamectina (ABA) sobre o consumo de oxigênio em hepatócitos isolados de rato (10^6 células/mL) incubados a 37 °C.....	60
Figura 18-	Efeitos da abamectina (ABA) sobre o potencial de membrana mitocondrial avaliado pela captação da sonda fluorescente Tetrametilrodamina Metil Éster (TMRM) em hepatócitos isolados de ratos (10^6 células/mL) na ausência (A) ou na presença (B) de proadifen 100 μ M.....	62
Figura 19-	Efeitos da abamectina (ABA) sobre a concentração intracelular de ATP em hepatócitos isolados de ratos (10^6 células/mL) na ausência (A) ou na presença (B) de proadifen 100 μ M.....	64
Figura 20-	Efeitos da abamectina (ABA) sobre a viabilidade celular avaliada pela liberação da enzima alanina transaminase (ALT) em hepatócitos isolados de ratos (10^6 células/mL) na ausência (A) ou na presença (B) de proadifen 100 μ M.....	66
Figura 21-	Efeitos da abamectina (ABA) sobre a viabilidade celular	

	avaliada pela liberação da enzima aspartato transaminase (AST) em hepatócitos isolados de ratos (10^6 células/mL) na ausência (A) ou na presença (B) de proadifen 100 μ M.....	67
Figura 22-	Efeitos da abamectina (ABA) sobre a homeostase intracelular de Ca^{2+} em hepatócitos isolados de ratos ($2 \cdot 10^6$ células/mL) permeabilizados com ácido plurônico (0,005%).....	68
Figura 23-	Efeitos da abamectina (ABA) sobre a liberação de citocromo c em hepatócitos isolados de ratos (2,7 mg de proteína/mL) permeabilizados com digitinina 0,002% (m/v) incubados a 25°C.....	69
Figura 24-	Efeitos da abamectina (ABA) sobre a ativação da caspase 3 em hepatócitos isolados de ratos (10^6 células/mL) na presença de proadifen 100 μ M.....	70
Figura 25-	Figuras representativas mostrando os efeitos da abamectina (ABA) sobre a morte celular por necrose ao 0 e 120 minutos do período experimental monitorado pelo corante fluorescente iodeto de propídio.....	72
Figura 26-	Efeitos da abamectina (ABA) sobre a morte celular por necrose em hepatócitos isolados de ratos (10^6 células/mL) na presença de proadifen 100 μ M.....	73
Figura 27-	Representação dos mecanismos de toxicidade da abamectina sobre hepatócitos isolados de rato.....	80

PAPEL DA MITOCÔNDRIA NA CITOTOXICIDADE INDUZIDA PELA ABAMECTINA EM HEPATÓCITOS ISOLADOS DE RATO

RESUMO - Abamectina (ABA), pertencente à família das avermectinas é utilizada mundialmente como parasiticida, porém a intoxicação por ABA pode prejudicar o funcionamento hepático. Existem substâncias que quando metabolizadas exercem atividade tóxica, afetando a função de importantes organelas como a mitocôndria, responsável por uma variedade de processos bioquímicos, como a produção de ATP e morte celular. O objetivo desse estudo foi caracterizar o mecanismo de toxicidade da ABA em hepatócitos isolados de ratos e avaliar se esse efeito é dependente do seu metabolismo. A toxicidade da ABA foi avaliada monitorando o consumo de oxigênio e o potencial de membrana mitocondrial, concentração intracelular de ATP, viabilidade celular por meio da liberação das enzimas ALT e AST, homeostase intracelular Ca^{2+} , liberação de citocromo *c*, atividade da caspase 3 e morte celular por necrose. A ABA reduz a respiração celular, tanto em células energizadas com glutamato mais malato quanto com succinato. O metabolismo da ABA reduz sua toxicidade, uma vez que hepatócitos previamente incubados com proadifen apresentam maior sensibilidade ao composto, sendo isto observado pelo rápido decréscimo da formação do potencial de membrana mitocondrial acompanhado pelas reduções das concentrações de ATP, viabilidade celular e ruptura da homeostase intracelular de Ca^{2+} com estabelecimento de necrose. Nossos resultados indicam que a toxicidade da ABA diminui com a sua biotransformação, e sua ação tóxica está relacionada com a inibição da atividade mitocondrial, levando à diminuição da síntese de ATP seguida pela morte da célula.

Palavras-chave: avermectinas, biotransformação, fosforilação oxidativa, necrose, ATP, metabolismo.

ROLE OF MITOCHONDRIA ON ABAMECTIN-INDUCED CYTOTOXICITY IN RAT ISOLATED HEPATOCYTES

SUMMARY- Abamectin (ABA), which belongs to the family of avermectinas, used worldwide as a parasiticide, but the ABA poisoning can impair the functioning liver. There are substances which exert toxic activity when metabolized, thus affecting the function of important organelles such as mitochondria, responsible for a variety of biochemical processes, such as ATP production and cell death. The aim of this study was to characterize the mechanism of toxicity of ABA in isolated rat hepatocytes and to evaluate whether this effect is dependent on your metabolism. The toxicity of ABA was assessed by monitoring oxygen consumption and mitochondrial membrane potential, intracellular concentration of ATP, cell viability by releasing enzymes ALT and AST, homeostasis intracellular Ca^{2+} , release of cytochrome c, activity of caspase 3 and cell death necrosis. The ABA reduces cellular respiration, both in cells energized with glutamate and succinate over malate. The metabolism of ABA reduces its toxicity, since hepatocytes pre-incubated with proadifen are more sensitive to the compound, this being observed by the formation of rapidly decreasing mitochondrial membrane potential accompanied by reductions in concentrations of ATP, cell viability and rupture of the intracellular homeostasis Ca^{2+} with the establishment of necrosis. Our results indicate that the toxicity decreases as the ABA its biotransformed and its toxic action is related to the inhibition of mitochondrial activity, leading to decreased synthesis of ATP followed by cell death.

Keywords: avermectins, biotransformation, oxidative phosphorylation, necrosis, ATP, metabolism.

I. INTRODUÇÃO

O aumento da eficiência da produção de alimentos de origem animal ocorreu devido ao desenvolvimento e transferência de tecnologias, principalmente na área voltada à saúde animal (MOLENTO, 2009). Nesse contexto, torna-se importante citar o parasitismo como um dos principais fatores que limitam a produtividade na pecuária.

Dentre as principais classes de fármacos disponíveis no mercado para o controle de parasitas estão os imidazotiazóis, benzimidazóis e lactonas macrocíclicas (SINDAN, 2007). No grupo das lactonas macrocíclicas, está o subgrupo químico das avermectinas que são basicamente divididas em quatro bases farmacológicas: ivermectina, abamectina, doramectina e eprinomectina.

As avermectinas são metabólitos derivados da fermentação do fungo *Streptomyces avermitilis* (FISHER; MROZIK, 1989; BURG et al. 1979), sendo a abamectina composta pela mistura das avermectinas B_{1a} e a B_{1b}, onde a primeira apresenta-se em uma concentração \geq a 80% e a segunda \leq a 20% (AGARWAL, 1998; ZENG et al., 1996; MEISTER, 1992). Essas duas avermectinas diferem-se quimicamente pela presença de um grupo metileno ou etileno no C-26 (ZENG et al., 1996) apresentando atividades biológicas e toxicológicas similares (HAYES; LAWS, 1990).

Esse composto é bastante utilizado devido a sua potente ação inseticida e antihelmíntica, além de apresentar grande espectro de ação. Como inseticida é utilizada no controle de pragas de citrus, cultura de castanheiras e também para o controle de pragas domésticas, como as formigas fogo (*Solenopsis invicta*) (ELBETIEHA; ISA DAAS, 2003). Na medicina veterinária é administrada de forma sistemática aos animais para o controle de endo e ectoparasitas (SHOOP et al., 1995).

No entanto, publicações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2008 levantaram a hipótese de que a abamectina, num total de 13 ingredientes ativos utilizados na produção de agrotóxicos, deveria ser submetida a uma reavaliação de seu grau de toxicidade. Isso se deve em

função da suspeita de que a abamectina e seus metabólitos apresentem toxicidade aguda e reprodutiva aos organismos expostos a agrotóxicos com base nesse ingrediente ativo (BRASIL, 2008).

Existem relatos que descrevem que a abamectina pode apresentar toxicidade quando utilizada em medicamentos para o controle parasitário, como relatado por Seixas et al. (2006), onde a abamectina provocou em quatro anos a morte de 57 bezerros. O autor ainda ressaltou que o número de casos devido a erro de dosagens durante a administração aos animais poderia estar subestimado, pois os sinais de intoxicação são de intensidade variável e muitos animais apresentaram rápida recuperação.

Outro fato de grande relevância apontado por Hsu et al. (2001), em trabalho desenvolvido com ratos, mostra que a intoxicação por abamectina pode prejudicar não só o sistema nervoso central, mas também a função dos hepatócitos, visto que houveram evidenciadas elevações dos níveis da enzima aspartato aminotransferase (AST) no soro sanguíneo após exposição de ratos Wistar à abamectina por gavagem, com doses entre 1 e 20 mg/kg de peso vivo

Em experimentos para avaliação dos quadros de intoxicação, os sintomas de envenenamento por abamectina em animais de laboratório incluem dilatação das pupilas, ataxia, vômito, convulsões, tremores e coma (LANKAS; GORDON, 1989). Em bovinos, os sinais clínicos observados foram tremores musculares, diminuição dos movimentos proprioceptivos, dificuldade de se manter em estação, protrusão da língua, sonolência e depressão profunda (SEIXAS et al., 2006).

Na literatura está amplamente descrito que a maioria das substâncias exógenas são submetidas à fase 1 de seu metabolismo pela mediação de uma ou mais enzimas do citocromo P450 (NELSON et al., 1996). Em mamíferos o principal órgão onde ocorre o metabolismo desses compostos é o fígado (IOANNIDES; LEWIS, 1996) o qual devido à sua interposição entre o trato digestivo e a circulação geral do organismo recebe grandes quantidades de nutrientes e xenobióticos que são absorvidos por meio do trato digestivo e veia porta (GUILLLOUZO, 1998).

O processo de metabolismo dos xenobióticos realizado pelo citocromo P450 no fígado é denominado biotransformação (OGA, 2008). Sua principal função é aumentar a polaridade das substâncias para que essas sejam excretadas mais facilmente. Todavia, esse processo tem sido apontado como responsável pelos efeitos tóxicos de inúmeros compostos químicos, visto que os metabólitos produzidos podem exercer atividades adversas ao organismo animal (IOANNIDES; LEWIS, 2004; MINGATTO et al, 2007; MAIOLI et al., 2011) por alterar, a nível celular e molecular, algum componente celular fundamental (mitocôndria, por exemplo) modulando assim sua função (MEYER; KULKARNI, 2001).

A produção de energia pela mitocôndria, segundo a teoria quimiosmótica de Mitchell (1961) aliada à teoria do acoplamento de Boyer et al., (1973), ocorre pela oxidação dos substratos que têm seus elétrons doados à cadeia respiratória na membrana mitocondrial interna, por meio das coenzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo (FADH₂), cujos quais são transferidos ao O₂ reduzindo-o a H₂O. Aliado a esse processo, está o bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas que dá origem a um gradiente eletroquímico de prótons (H⁺), chamado de potencial de membrana. A energia livre liberada no retorno dos íons H⁺ à matriz mitocondrial possibilita que a adenosina trifosfato (ATP) seja formada nos sítios catalíticos da enzima F₀-F₁ATP sintase (ATPsintase), e que este seja liberado de seu sítio ativo para utilização em processos intracelulares.

Existem diversos compostos capazes de inibir o fluxo de elétrons em vários pontos da cadeia transportadora de elétrons, e em qualquer ponto que ocorra, o resultado será uma diminuição na função da bomba de prótons e conseqüentemente, inibição da F₀F₁-ATPase (BOELSTERLI, 2007), além de inibir as vias metabólicas dependentes da cadeia respiratória para a reoxidação de coenzimas (MARZZOCO; TORRES, 2007), o que dependendo da intensidade pode ocasionar a morte celular.

Devido a esses fatores, a abamectina foi escolhida como objeto desse estudo para que os mecanismos bioquímicos de ação do fármaco sejam caracterizados, contribuindo assim para o desenvolvimento de um possível método de intervenção nos casos de intoxicação de animais, diminuindo a toxicidade, interações adversas e perdas por mortes.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Generalidades sobre o fígado

Devido à sua interposição entre o trato digestivo e a circulação geral do organismo, o fígado desempenha uma função central no metabolismo. Ele recebe grandes quantidades de nutrientes e xenobióticos que são absorvidos por meio do trato digestivo e veia porta. Entre as principais funções hepáticas estão a captação de aminoácidos, lipídios, carboidratos e vitaminas, com subsequente armazenamento, conversão metabólica e liberação no sangue e bile. O fígado é também o principal órgão envolvido na biotransformação de substâncias exógenas (xenobióticos), com capacidade de converter compostos hidrofóbicos em hidrossolúveis, mais facilmente eliminados pelo organismo (GUILLOUZO, 1998).

Substâncias capazes de produzir danos aos hepatócitos são denominadas hepatotóxicas. Os hepatotóxicos intrínsecos afetam todos os indivíduos em uma forma dose-dependente e, portanto, previsivelmente, podendo interferir com o metabolismo celular (hepatotóxicos ativos) ou tornarem-se tóxicos após biotransformação (hepatotóxicos latentes). A hepatotoxicidade idiossincrática, por outro lado, é dose-independente, podendo ser uma consequência do metabolismo anormal do xenobiótico em indivíduos susceptíveis (idiossincrasia metabólica) ou ser provocada por lesão hepática mediada pelo sistema imune (hepatite alérgica); nesses casos, mesmo pequenas concentrações de um fármaco podem provocar toxicidade.

2.2 Hepatotoxicidade

Os diversos aspectos da lesão química ao fígado incluem a natureza dos agentes hepatotóxicos, a característica da lesão, o mecanismo para os efeitos hepatotóxicos, as circunstâncias de exposição e a importância médica e social. Algumas hepatotoxinas encontradas na natureza são produtos de plantas, metabolismo de fungos e bactérias ou são minerais (SCHOENTAL, 1963).

Muitos agentes hepatotóxicos são produtos da indústria química ou farmacêutica (TOLMAN; SIRRINE, 1998; ZIMMERMAN, 1998). Outros ainda são subprodutos ou resíduos de materiais industriais que, por poluir o ambiente, podem ter acesso a humanos e animais. A lesão hepatotóxica pode ter várias formas. Alguns agentes levam à necrose, esteatose, cirrose ou carcinoma (SCHOENTAL, 1963; TOLMAN; SIRRINE, 1998; ZIMMERMAN, 1998). Outros levam apenas a interferências na secreção biliar e icterícia, com pequena ou nenhuma lesão evidente ao parênquima hepático (ROUILLER, 1964; ZIMMERMAN, 1998). Alguns produzem curiosas lesões degenerativas ou vasculares.

A célula parenquimal (hepatócito) é a principal unidade funcional do fígado, constituindo 60% da população de células e 80% do volume total do fígado. Os hepatócitos isolados têm sido extensivamente utilizados para estudar o metabolismo e a toxicidade de uma grande variedade de drogas e substâncias químicas (GUILLOUZO, 1998; MINGATTO et al., 2002), uma vez que mantêm membranas intactas e têm altos níveis de várias enzimas do sistema de metabolismo de xenobióticos e seus cofatores sendo, portanto, úteis para o estudo da captação, alvos intracelulares e eventos que levam a danos celulares por substâncias químicas e seus metabólitos via biotransformação (MOLDÉUS, 1978).

2.3 Biotransformação, participação do citocromo P450 e bioativação

A biotransformação é definida como alteração química das substâncias por reações realizadas por organismos vivos, sendo o principal objetivo desse processo a excreção de substâncias absorvidas através da formação de metabólitos e/ou produtos solúveis em água (WILLIAMS; JAMES; ROBERTS, 2000).

De modo geral, as alterações realizadas nos xenobióticos são divididas em duas fases: transformações metabólicas (Fase I) que são catalisadas predominantemente por enzimas presentes no retículo endoplasmático; e

conjugação com constituintes naturais do organismo (Fase II) catalisadas por enzimas citoplasmáticas. Para eliminação, não é necessário que um composto seja submetido às duas fases, ou seja, apenas a fase I ou fase II podem ser suficientes para aumentar polaridade do composto (WILLIAMS; JAMES; ROBERTS, 2000).

As principais reações químicas envolvidas na fase I da biotransformação são oxidação, hidrólise ou redução; as da fase II são glucoridinação (principalmente em mamíferos), conjugação com a glutatona ou outros componentes celulares, como aminoácidos.

Os sistemas enzimáticos capazes de metabolizar xenobióticos têm sido identificados e extensivamente estudados (IOANNIDES, 2002). Sem dúvida, o mais importante é o citocromo P450, um sistema presente por todo organismo, porém em maior concentração no fígado, o que conseqüentemente torna esse órgão o centro do metabolismo de xenobióticos, sendo capaz de catalisar tanto vias de oxidação quanto de redução (DANIELSON, 2002).

A denominação citocromo P450 engloba uma superfamília composta por inúmeras enzimas que possuem especificidade a diferentes substratos. Essa superfamília do citocromo P450 é dividida em famílias e subfamílias que possuem uma ou mais enzimas (isoformas) (IOANNIDES, 2004). A nomenclatura das isoenzimas do citocromo P450 ocorre de acordo com o seguinte padrão: a sigla CYP, seguida de um algarismo que indica a família, uma letra que indica a subfamília e outro algarismo que indica o gene, como por exemplo, CYP3A2 que representa a isoenzima 2 da família 3 e subfamília A.

Pelo menos oito famílias de genes em mamíferos são conhecidas por codificarem as enzimas do citocromo P450, e as famílias de genes 1, 2, 3 e 4 são responsáveis por codificarem as isoenzimas do citocromo P450 hepático e extra-hepático que estão envolvidas nas reações da fase I da biotransformação (OGA, 2008).

A atuação da superfamília citocromo P450 durante o metabolismo dos xenobióticos é dependente de outras enzimas e coenzimas. Neste sistema, o

citocromo P450 é a enzima terminal com afinidade aos diversos substratos, enquanto a NADPH citocromo P450 redutase é a enzima intermediária responsável pela transferência de elétrons provenientes da fonte geradora, o NADPH, para o citocromo P450. O citocromo b5 acompanha o citocromo P450 e funciona como alternativa para transferência de elétrons da fonte para o citocromo P450 (OGA, 2008). A Figura 1 representa um exemplo hipotético da atuação sistema citocromo P450 durante uma reação de oxidação.

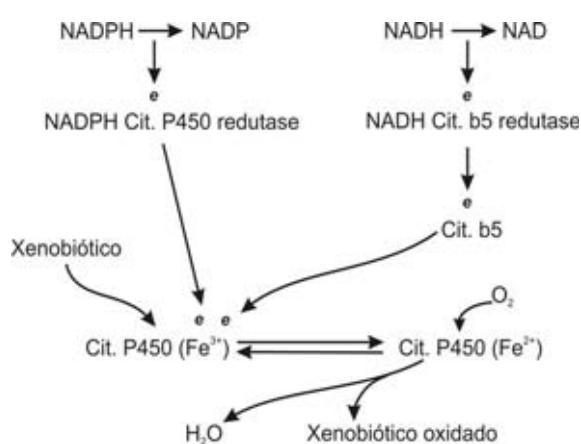


Figura 1 – Sequencia de reações para oxidação de xenobióticos catalisada pelo citocromo P450. O substrato complexa-se com a forma oxidada do citocromo P450 que recebe um elétron do NADPH, via NADPH citocromo P450 redutase. Esse elétron reduz o Fe^{3+} da fração heme do citocromo P450 a Fe^{2+} . O complexo agora liga-se à molécula de oxigênio e capta outro elétron procedente também de NADPH. O segundo elétron é, às vezes, pode ser proveniente do NADH e é transportado via citocromo b5. Ambos os elétrons são transferidos ao oxigênio molecular causando-lhe desmembramento em átomos de oxigênio altamente reativos e instáveis. Um desses átomos de oxigênio liga-se a molécula de substrato, resultando em substrato oxidado que se desliga do complexo enzimático, enquanto o outro átomo de oxigênio é utilizado na produção da molécula de água (Fonte: OGA, 2008).

Geralmente, os agentes tóxicos são inativados pela biotransformação, e por esse motivo os termos destoxificação ou desintoxicação eram utilizados para designação do processo em questão. No entanto, é sabido que inúmeras

substâncias tornam-se farmacologicamente ativas após o processo de biotransformação (WILLIAMS; JAMES; ROBERTS, 2000; OGA, 2008).

Um importante exemplo de hepatotoxicidade induzida por um metabólito reativo gerado durante o processo de biotransformação é o acetaminofen. Esse fármaco é amplamente utilizado como analgésico e antitérmico, todavia uma dose muito elevada pode causar grave hepatotoxicidade associada à necrose centrilobular (JAMES et al., 2003). O metabólito reativo do acetaminofen é o *N*-acetil-*p*-benzoquinona imina (NAPQI), gerado durante a fase I da biotransformação pelas isoenzimas do citocromo P450 2E1, 1A2 e 3A4 (RAUCY et al., 1989; THUMMEL et al., 1993).

O NAPQI pode inibir inúmeras enzimas celulares que são essenciais para os processos metabólicos e fisiológicos normais, como por exemplo, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, além disso, pode induzir de forma efetiva o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio danificando as membranas celulares e alterando a homeostase intracelular de Ca^{2+} (TSOKOS-KUHN et al., 1988; JOHANSSON et al., 1988).

A monocrotalina (MCT), um alcalóide pirrolizidínico presente nas plantas do gênero *Crotalaria*, representa outro exemplo de substância bioativada durante a biotransformação, pois a partir da MCT é produzido o metabólito pirrólico dehidromonocrotalina (DHM), (BUTLER et al., 1970; WILSON et al., 1992; PAN et al., 1993) um potente agente alquilante que se liga ao DNA e a proteínas (PETRY et al., 1984; HINCKS et al., 1991). Em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, a DHM inibe o complexo I da cadeia respiratória, reduz a produção de ATP pela organela, reduz o conteúdo de GSH e induz a liberação do citocromo *c* por abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MINGATTO et al., 2007, SANTOS et al., 2009). Em hepatócitos isolados a DHM diminui o conteúdo de grupos tiol de proteínas e induz a morte celular por apoptose (MAIOLI et al., 2011).

2.4 Avermectinas

As avermectinas (*a*=sem + *verme*=verme + *ecto*=externo + *in*=produto farmacêutico) são compostos pertencentes a classe das lactonas macrocíclicas, que são metabólitos produzidos durante a fermentação do fungo *Streptomyces avermitilis* (BURG et al. 1979). Existem oito tipos de avermectinas, sendo estas: A_{1a}, A_{1b}, A_{2a}, A_{2b}, B_{1a}, B_{1b}, B_{2a}, e B_{2b} (Figura 2), no entanto os tipos A_{2a}, B_{1a}, e B_{2a} são produzidos em maiores quantidades.

Os compostos “A” possuem um radical metoxi ligado ao carbono de número 5 enquanto os compostos “B”, um radical hidroxil; os do tipo 1 possuem dupla ligação entre os carbonos 22 e 23, sendo que os do tipo 2, uma ligação simples; o grupo “a” representa um radical butil (C₄H₉) ligado ao carbono 25 e o grupo “b”, um radical isopropil (C₃H₇) (FISHER; MROZIK, 1989).

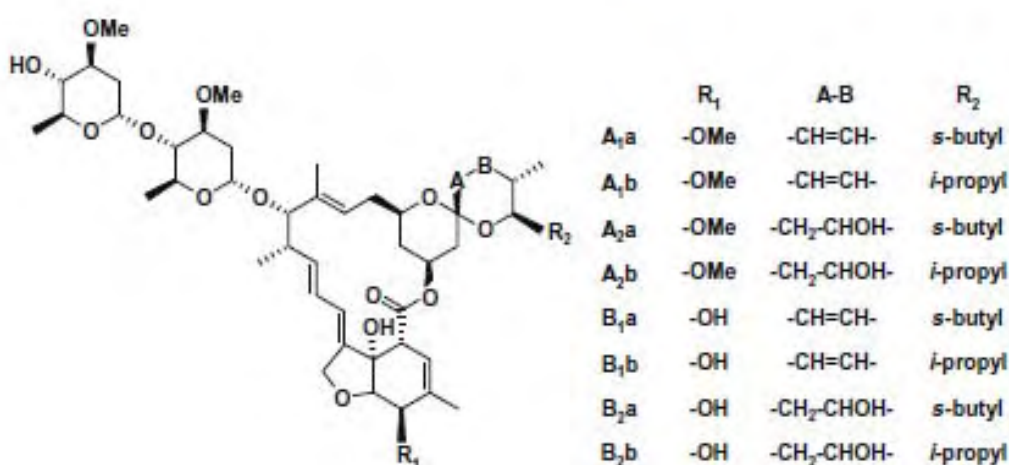


Figura 2 - Estruturas químicas das avermectinas naturais (Fonte: PITERNA et al., 2009).

As avermectinas do tipo B_{1a} são as mais importantes, devido ao amplo espectro de ação antiparasitária e eficácia elevada, e a separação dos grupos B_{1a} e B_{1b} em escala industrial é inviável, permitindo a fabricação e comercialização das formulações como uma mistura dos grupos “a” e “b”,

desempenhando atividade biológica praticamente idêntica à observada em cada grupo isoladamente (SHOOP; SOLL, 2002).

O grupo das avermectinas é composto pela ivermectina, abamectina, doramectina, eprinomectina e selamectina (McKELLAR; BENCHAOUI, 1996). Atualmente, as avermectinas estão entre os principais medicamentos utilizados para o controle de endo e ectoparasitas em animais de produção (CORWIN, 1999) e isso se deve, em especial, ao amplo espectro de ação e margem de segurança (FORBES, 1993, AYRES; ALMEIDA, 2002). Contudo, existem ressalvas quanto sua utilização que quando ignoradas efeitos adversos podem ocorrer.

2.5 Abamectina, toxicidade e metabolismo

A abamectina, um análogo da ivermectina, é uma mistura das avermectinas, contendo concentração $\geq 80\%$ da avermectina B_{1a} e $\leq 20\%$ de avermectina B_{1b} (Figura 3) (AGARWAL, 1998), sendo lançada como antiparasitário e inseticida em 1985 (BASÍLIO, 2005). Estes compostos, de maneira geral não apresentam efeitos tóxicos aos animais, visto que apresentam alto peso molecular, dificultando assim sua passagem pela barreira hematoencefálica (BHE) para atuarem no sistema nervoso central (LANKAS e GORDON, 1989; COURTNEY e ROBERSON, 1995). Todavia, qualquer espécie pode ser afetada se a dose for grande o suficiente para penetrar a BHE (ANDRADE e SANTARÉM, 2002).

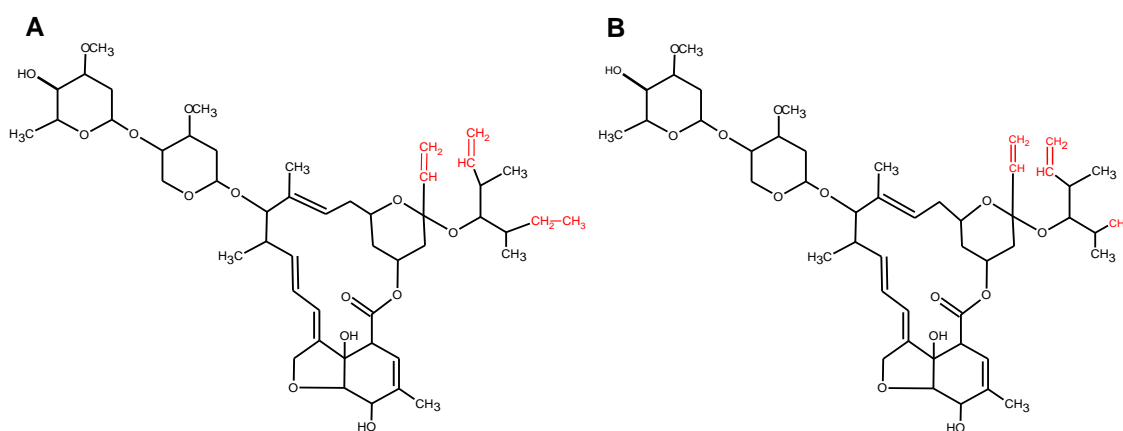


Figura 3 – Estruturas químicas das avermectinas B_{1a} e B_{1b} que compõem a abamectina. Destacadas em vermelho estão as principais diferenças.

De acordo com relatos apresentados na literatura, existem casos de intoxicação devido à exposição acidental ou utilização contrária à dose recomendada (MOORE, 1999), e grande parte dos trabalhos relacionados ao estudo do mecanismo de intoxicação no sistema nervoso central se deve à atuação das avermectinas sobre o sistema GABA e canais de Cl⁻. Por apresentarem ação sobre o sistema nervoso central, as avermectinas são contraindicadas em casos de doenças que causam danos a BHE (NOBMANN et al., 2001; TRACY e WEBSTER, 2001) e devem ser utilizados com cautela em pacientes submetidos a terapias com agentes depressores do SNC (TRACY e WEBSTER, 2001).

Certos animais apresentam maior susceptibilidade a intoxicação por fármacos desse grupo, estando entre eles bezerros com menos de quatro meses, roedores e coelhos gestantes (LANKAS e GORDON, 1989). Cães da raça Collie, Old English Sheepdog, Shetland Sheepdogs, Australian Sheepdogs e seus mestiços, bem como cães e gatos com idade inferior a 6 semanas (ANDRADE; SANTARÉM, 2002) também apresentam maior sensibilidade as avermectinas. A possível explicação para essa maior sensibilidade, é a deficiência de glicoproteína-P no cérebro desses animais, possivelmente por

um defeito genético autossômico recessivo (LANKAS; GORDON, 1989) que reduz o efluxo desse medicamento do sistema nervoso central.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) conforme Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 10, de 22 de fevereiro de 2008 publicou uma lista de componentes ativos utilizados para produção de inseticidas que seriam submetidos a reavaliação de seu grau de toxicidade, dentre dentre eles a abamectina. Estudos realizados evidenciaram resultados preocupantes com referência à toxicidade aguda e suspeita de toxicidade reprodutiva deste princípio ativo e seus metabólitos (BRASIL, 2008).

Em estudo realizado por Halley et al. (1992) observou-se que a abamectina é metabolizada quali e quantitativamente de maneira semelhante por bovinos, ovinos, suínos e ratos. Os principais metabólitos encontrados foram os derivados 24-hidroximetil B_{1a}(24-OHMe), 26-hidroximetil B_{1b} (26-OHMe) e 3''-O-desmetil (3''-ODMe) (Figura 4). Usando microsomas de fígado de ratos, Zeng et al. (1996) estudaram o papel das diferentes isoformas do citocromo P450 no metabolismo da abamectina e observaram uma inibição maior que 90% na sua biotransformação pelo composto SKF525A (Proadifen). Observaram ainda um expressivo aumento da biotransformação da abamectina quando os ratos foram previamente tratados com dexametasona, sugerindo uma participação importante do citocromo P450 3A nesse processo.

Segundo dados da The European Agency for Evaluation of Medicinal Products, Committee for Veterinary Medicinal Products, após administração oral da avermectina B_{1a} marcada em ratos, as maiores quantidades da substância foram encontradas no tecido adiposo e nos rins, seguido pelo fígado e músculo, sendo que o tempo de meia vida variou entre $1,2 \pm 0,3$ dias e quantidades maiores que 77% (fêmeas) e 82% (machos) do composto foram excretadas pelas fezes e apenas 0,3 a 1,1% pela urina. Os metabólitos 24-OHMe e 3''-ODMe também foram encontrados nestes tecidos.

Em trabalho realizado por Seixas et al., (2006) avaliando casos de intoxicação natural por abamectina em bovinos, 36 bezerros (20 fêmeas e 16 machos) com idade entre 8 e 12 meses com peso de 80 a 150 kg, foram

observadas alterações neurológicas de diferentes intensidades em 14 animais, sendo estas manifestadas após 5 horas da administração de 5 mL do medicamento, que corresponde a aproximadamente 1,6 a 3,1 vezes a dose terapêutica. Já em relato descrito por Riet-Correa (2006), 40 bovinos (12 jovens e 28 adultos) receberam abamectina na dose recomendada; 24 horas após a vermifugação todos os animais jovens, com idade de 2-3 meses adoeceram. Os sinais clínicos foram tremores musculares, diminuição dos movimentos proprioceptivos, dificuldade de se manter em estação, protrusão da língua, sonolência e depressão profunda. Dois dos cinco animais que adoeceram gravemente morreram; os outros sete se recuperaram em um período de 15 dias.

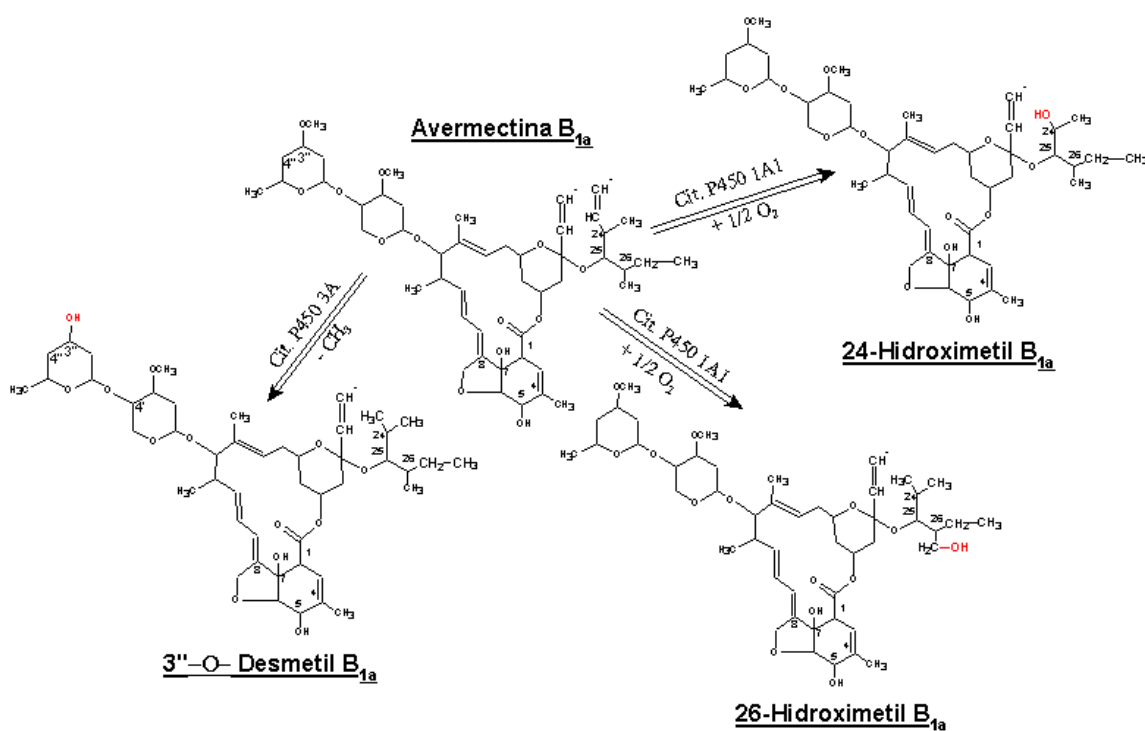


Figura 4 – Principais metabólitos derivados Avermectina B_{1a} e as isoenzimas do citocromo P450 responsáveis por sua produção.

Além do SNC outros órgãos podem ser afetados pelo tratamento com abamectina, dentre eles o fígado. Em estudo desenvolvido por Lowenstein et al. (1996), com bovinos, a abamectina provoca a elevação da concentração da enzima aspartato aminotransferase (AST) no soro sanguíneo, sendo este um

indicativo de dano hepático, e isso se deve pelo fato de que a AST é uma enzima citoplasmática específica dos hepatócitos (PLAA; HEWITT, 1992), e o aumento de sua concentração no plasma é utilizado como um indicador de dano às células do parênquima hepático (KLAASSEN; EATON, 1991).

Em concordância com os resultados obtidos por Lowenstein et al. (1996) com bovinos, Hsu et al., (2001) observaram que ratos Wistar tratados com abamectina, por gavagem, com doses entre 1 e 20 mg/kg de peso vivo, apresentaram um aumento na concentração da enzima AST no soro sanguíneo, sendo a atividade máxima observada com a dose de 20 mg/kg de peso vivo 1 hora após a ingestão de abamectina. Estudos prévios realizados por Lankas e Gordon (1989) indicaram que a DL₅₀ da abamectina em ratos é de 11 mg/kg de peso vivo.

2.6 Mitocôndria

As mitocôndrias são organelas intracelulares que não apresentam formas e dimensões fixas, sendo estas características dependentes do estado metabólico dos tecidos nos quais se localizam (DAUM, 1985). Tipicamente, as mitocôndrias existentes no parênquima hepático apresentam dimensões de 0,45 µm de diâmetro e 4,42 µm de comprimento. O número dessas organelas por hepatócitos varia de 800 (SCHEFFLER, 1999) a 1312 mitocôndrias/célula, o que representa em torno de 17% do volume celular (VAN GURP et al. 2003).

Essa organela apresenta características peculiares quando comparada as demais, visto que apresenta seu próprio DNA e RNA além de estarem diretamente ligadas à regulação de várias funções celulares dependentes de energia, como o metabolismo intermediário, regulação iônica, motilidade e proliferação celular (PEDERSEN, 1999).

Frey e Manella, (2000) descrevem que Palade em 1952 e Sjöstrand em 1956 foram os pioneiros a descrever a organização interna da mitocôndria, composta por um sistema duplo de membranas, as quais definem três classes

de compartimentos: as membranas externa e interna, o espaço intermembranar e a matriz mitocondrial.

Segundo modelo proposto por Frey e Mannela (2000) e Manella (2001), as cristas mitocondriais, ao oposto que se imaginava não constituem dobras com amplas aberturas para o espaço intermembranar, mas sim estruturas de diferentes formas, com regiões tubulares estreitas e longas que ligam os compartimentos internos (cristas) entre si e à periferia da membrana interna. As Figuras 5 e 6 exibem mais detalhadamente morfologia e organização estrutural básica das mitocôndrias.

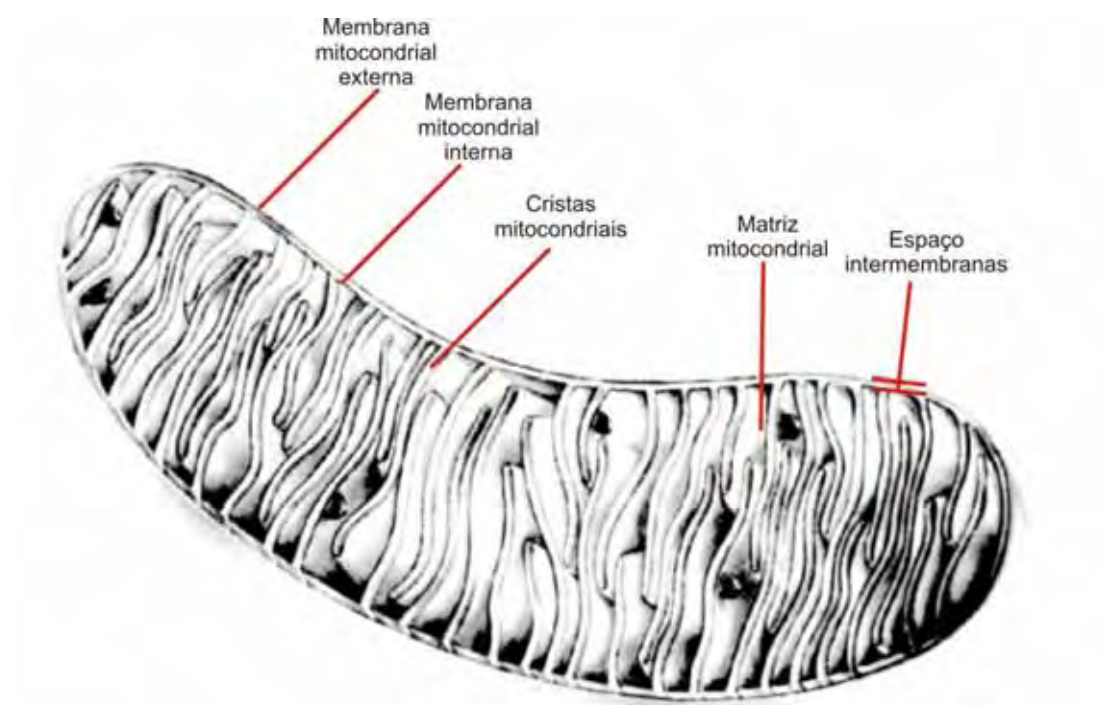


Figura 5 - Morfologia básica das mitocôndrias. (Fonte: SCHEFFLER, 1999).

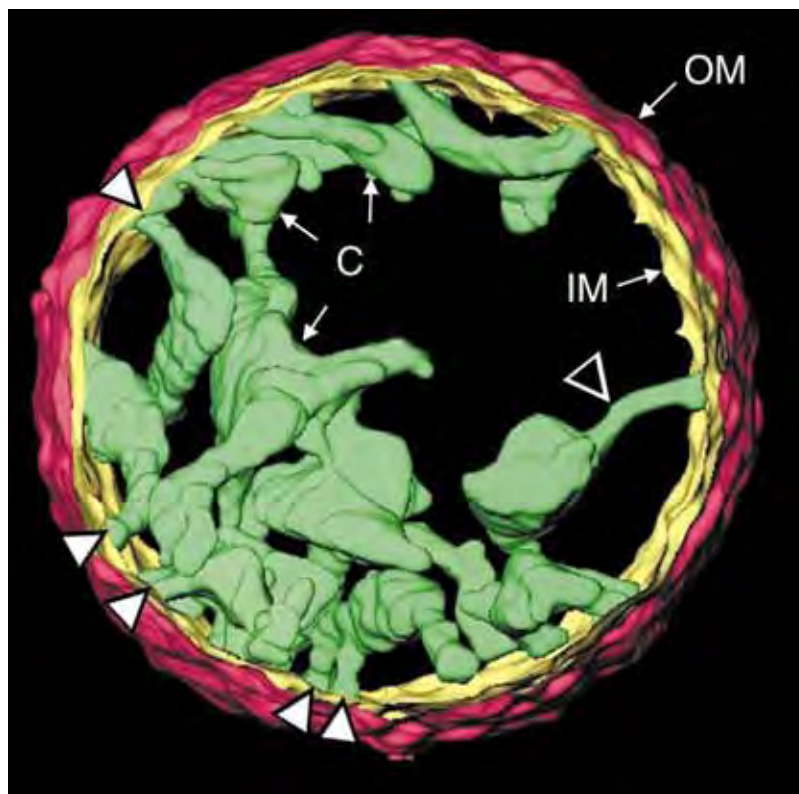


Figura 6 - Tomografia de mitocôndria isolada de fígado de rato com imagem 3D. C, cristas; IM, membrana interna; OM, membrana externa (Fonte: MANELLA, 2000).

A membrana mitocondrial externa encontra-se em contato com o citossol, apresentando permeabilidade à maior parte dos íons e moléculas pequenas ($PM < 1500$ Da) e aos substratos da cadeia respiratória (WALLACE; STARKOV, 2000), sendo constituída principalmente por fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (DAUM, 1985). A passagem desses íons e moléculas ocorre por meio de canais transmembrana, formados por uma família de proteínas integrais denominadas porinas (NELSON; COX, 2002).

O espaço intermembranas possui grande importância fisiológica. Neste pequeno espaço, porém de grande importância, 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). No espaço intermembranas, ocorre a formação do gradiente eletroquímico, um

elemento fundamental, utilizado em sistemas biológicos para produzir energia tanto via fosforilação oxidativa quanto por fotossíntese.

A membrana mitocondrial interna é composta por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e cardiolipina (DAUM, 1985) e permeável somente ao oxigênio molecular, dióxido de carbono, óxido nítrico e água. Apresenta estruturas de diferentes formas que originam as cristas mitondriais, onde localizam-se os componentes da cadeia respiratória e a ATP sintase (NELSON; COX, 2002). Por ser impermeável à maioria das moléculas pequenas e íons, incluindo prótons H^+ , existem sistemas transportadores específicos para que outras espécies químicas possam atravessá-la (NELSON; COX, 2002). A matriz mitocondrial, além do DNA, contém enzimas pertencentes ao ciclo de Krebs, β -oxidação de ácidos graxos e vias de oxidação dos aminoácidos (NELSON; COX, 2002).

2.6.1 Mitocôndria e Função Energética

A mitocôndria é responsável pela síntese da quase totalidade do ATP necessário à manutenção da estrutura e função celular. A produção do ATP pelas mitocôndrias ocorre através do acoplamento do funcionamento cadeia de transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa (Figura 7).

Os elétrons doados por substratos oxidáveis à cadeia respiratória na membrana mitocondrial interna, por meio de NADH ou $FADH_2$, são transferidos ao O_2 reduzindo-o a H_2O (respiração mitocondrial). A transferência dos elétrons das coenzimas NADH e $FADH_2$, ocorre através dos equivalentes redutores NADH desidrogenase (Complexo I) e succinato desidrogenase (complexo II), respectivamente. Os complexos I e II recebem e transferem os elétrons para a ubiquinona por meio de uma série de centros Fe-S, que por sua vez os transfere para a ubiquinona-citocromo c oxidorreductase (Complexo III), e este para a citocromo oxidase (Complexo IV) por meio do citocromo c, uma proteína que se localiza na face externa da membrana mitocondrial interna.

O fluxo de elétrons segue ao longo da cadeia respiratória resultando no bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial interna gerando um gradiente eletroquímico de H^+ . A energia livre liberada no retorno do H^+ à matriz mitocondrial induz alteração conformacional no componente F_1 da F_1F_0 -ATP sintase, liberando o ATP formado a partir de ADP e Pi em seus sítios catalíticos (MITCHELL, 1961; BOYER et al., 1973).

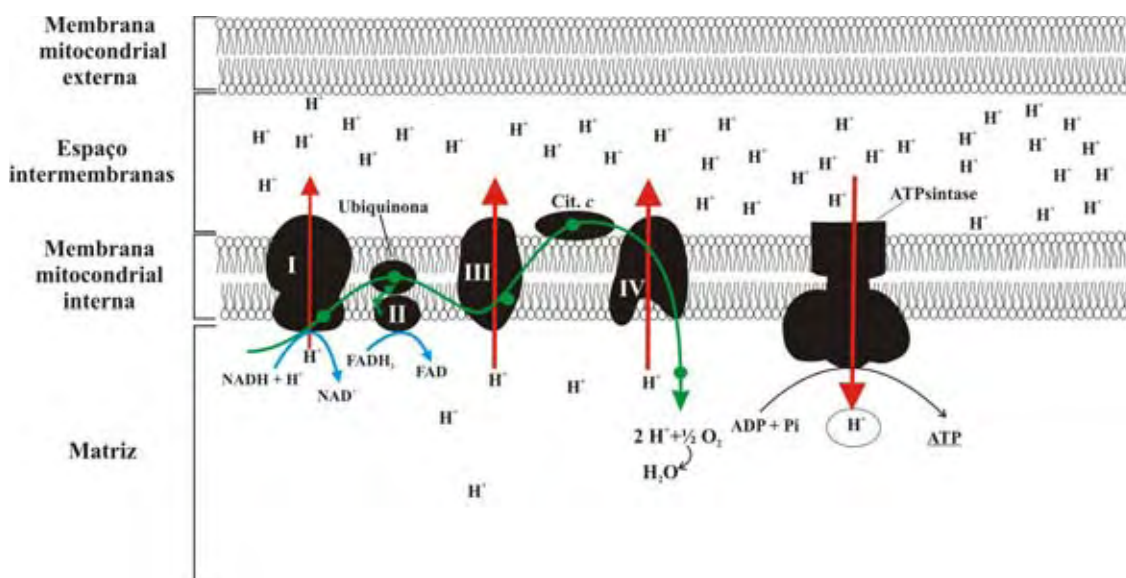


Figura 7 – Representação esquemática da cadeia respiratória mitocondrial acoplada a síntese de ATP.

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) (Figura 8). Em hepatócitos isolados a formação do estado 4 é induzido pela adição de Oligomicina, um inibidor da ATP sintase (MOREADITH e FISCKUM, 1984).

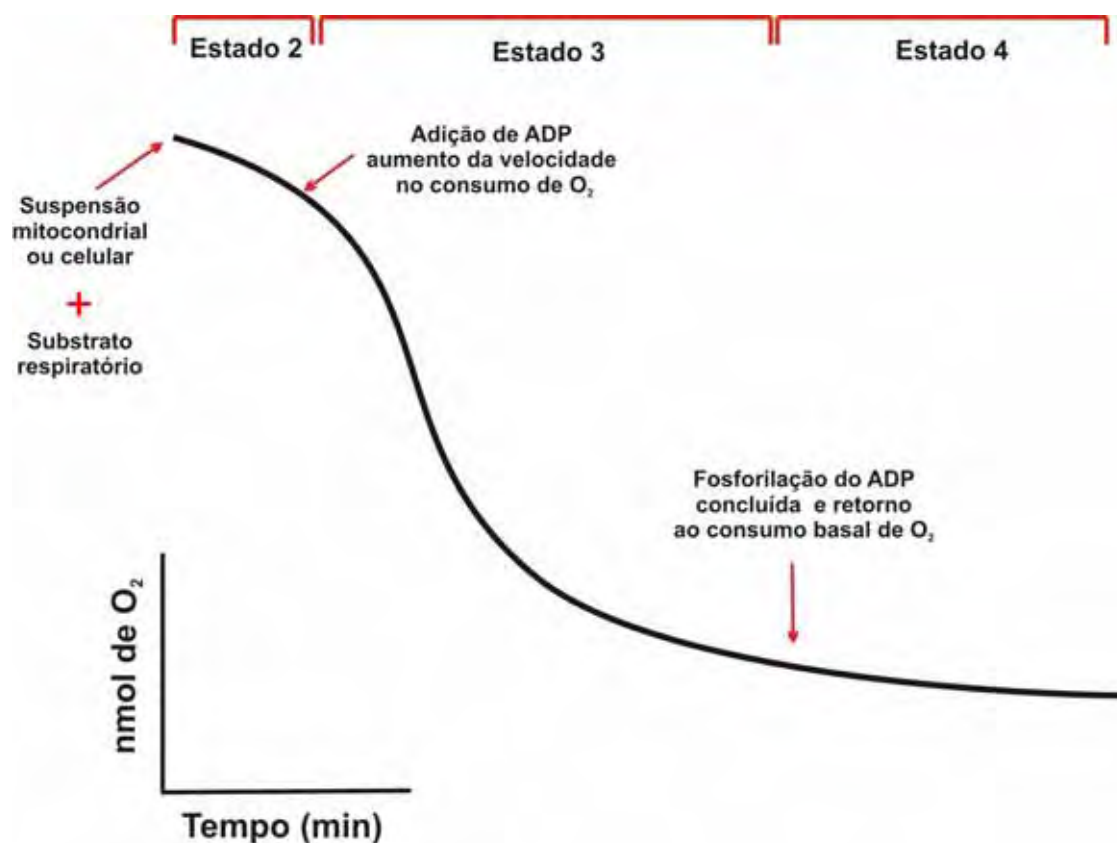


Figura 8 – Representação do método polarográfico de avaliação da fosforilação oxidativa através da respiração mitocondrial de acordo com metodologia estabelecida por Chance e Willians (1956) e Moreland (2001). Os espaços delimitados em vermelho representam os principais estados da respiração mitocondrial utilizados para avaliação da interferência de compostos sobre a fosforilação oxidativa.

2.6.2 Inibidores e Desacopladores

Como mencionado anteriormente, a produção de ATP via fosforilação oxidativa é dependente do acoplamento existente entre a cadeia de transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa, e inúmeras substâncias denominadas, de

maneira geral como inibidores e desacopladores diminuem ou impedem a fosforilação do ADP realizada pela ATP sintase.

Inibidores são substâncias que interagem com os complexos enzimáticos da cadeia respiratória, impedindo o transporte de elétrons e conseqüentemente reduzindo bombeamento de prótons para a formação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), refletindo em menor consumo de oxigênio. Dentre os clássicos exemplos de inibidores, pode-se citar a rotenona, a antimicina A e oligomicina que atuam sobre os complexos I, III e ATP sintase, respectivamente (NELSON; COX, 2002).

Os desacopladores são substâncias hidrofóbicas capazes de atravessar a membrana mitocondrial interna transportando prótons provenientes do espaço intermembranas até à matriz mitocondrial. Dessa maneira, impedem a formação do gradiente de prótons com dissipação da energia, na forma de calor, que seria empregada na síntese de ATP. O transporte dos elétrons na cadeia torna-se energeticamente mais favorável (pela falta de transporte de prótons contra este gradiente) e sua velocidade aumenta, elevando a velocidade de consumo de oxigênio (MARZZOCO; TORRES, 2007). Os representantes desta classe incluem o 2,4-dinitrofenol (DNP), o carbonilcianeto-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) e carbonilcianeto-m-clorofenilhidrazona (CCCP) e todos ácidos lipofílicos fracos, capazes de transportar prótons através da membrana mitocondrial interna e desfazer o gradiente necessário à síntese de ATP (KADENBACH, 2003; WALLACE; STARKOV, 2000).

2.6.3 Mitocondria e Homeostase Intracelular de Ca^{2+}

O íon cálcio é conhecido por ser importante na regulação de muitas reações enzimáticas, e o aumento da concentração do íon no citossol da ordem de $1 \cdot 10^{-7}$ M para $\geq 1 \cdot 10^{-6}$ M pode promover drásticas modificações em todo o padrão metabólico da célula eucariótica (SKULACHEV, 1999).

A mitocôndria além de estar envolvida no processo de produção energética, juntamente com o retículo endoplasmático, ativamente sobre a homeostase intracelular de Ca^{2+} , pois dependendo da concentração do íon no citossol e da necessidade da célula, a mitocôndria pode tanto captá-lo quanto liberá-lo. São três os mecanismos utilizados pela organela para o transporte do cálcio: canal uniporter, o antiporter $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ e o antiporter $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ (SKULACHEV, 1999).

Os canais uniporter e antiporter são responsáveis pelo influxo e efluxo de Ca^{2+} da mitocôndria, respectivamente. O influxo do cálcio através da membrana mitocondrial interna pelo canal uniporter é impulsionado pelo potencial de membrana mitocondrial, ou seja, a captação do íon cálcio por esse canal consome o potencial de membrana formado (BROOKES et al., 2004; GUNTER, 1994). O efluxo, por sua vez, é mediado pelos canais antiporter $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ e $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ que operam através de trocas eletroneutras (GUNTER et al., 1994). Além dos dois canais antiporter, o poro associado à transição de permeabilidade mitocondrial (PTP) compõe outra via de efluxo de cálcio (Figura 9).

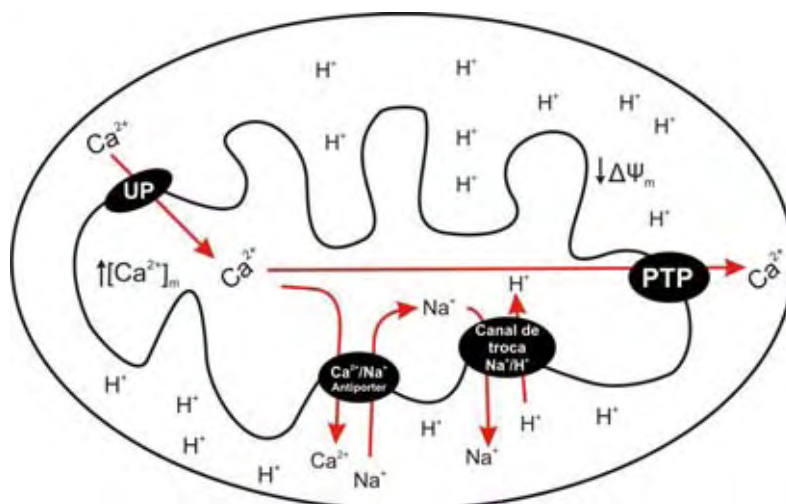


Figura 9 – Representação do funcionamento dos canais do influxo de Ca^{2+} pelo canal uniporter (UP) e efluxo pelo canal antiporter $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ e pelo poro de transição de permeabilidade (PTP). $[\text{Ca}^{2+}]_m$ concentração mitocondrial de cálcio. (Fonte: Adaptado de BOOKES et al., 2004).

2.7 Morte celular por apoptose e necrose

A apoptose e a necrose são processos que resultam em morte da célula, no entanto, a sequência de eventos que envolve cada processo os tornam diferentes.

A necrose é caracterizada pela diminuição do ATP causada por severas desordens metabólicas, o que causa a quebra da regulação osmótica e integridade do citoesqueleto, resultando em aumento do volume celular acompanhado de aparecimento de bolhas na membrana plasmática (GORES et al., 1990; EGUCHI, 1997). Essas modificações ainda podem ser revertidas, contudo se a desordem metabólica prosseguir as frações celulares residuais entram em colapso, induzindo um irreversível distúrbio da membrana plasmática (HERMAN et al., 1988), que permite que enzimas citoplasmáticas (hidrolases, fosfolipases e proteases) sejam liberadas na matriz extracelular e danifiquem as células ao redor, além disso a liberação de potássio após o rompimento da membrana estimula o processo inflamatório (SAHU, 2007).

A morte celular por apoptose por outro lado, é caracterizada por alterações morfológicas como condensação da cromatina, fragmentação nuclear e degradação do DNA, redução do volume celular, aparecimento de bolhas na membrana plasmática bem como a formação dos corpos apoptóticos (vesículas envoltas por fragmentos da membrana plasmática que armazenam conteúdo celular) (SAHU, 2007). A apoptose pode ocorrer por duas vias efetoras, a extrínseca e a intrínseca.

A via extrínseca é induzida por ligantes externos que levam a ativação dos chamados receptores de morte. Os principais receptores dessas proteínas efetoras do processo apoptótico são os receptores Fas, ativados por ligação com os ligantes Fas; receptor 1 do fator de necrose tumoral (receptor TNF- α , TNFR1); e receptores dos ligantes 1 e 2 relacionados ao fator de necrose tumoral indutores de apoptose (TRAIL-R1 e TRAIL-R2). Em resposta a seus respectivos ligantes, os receptores formam oligômeros que levam a ativação

das caspases 2, 8, 9, 10, proteases cisteína-aspartato específicas, envolvidas na cascata de eventos apoptóticos (FAUVION; GORES, 1999).

A via intrínseca de ativação das caspases, por outro lado é resultado de danos ao DNA e mitocôndria com subsequente ligação entre os fatores pró-apoptóticos no citosol. Isso inclui, dentre outros, a liberação do citocromo *c* mitocondrial, SMAC/DIABLO e o fator de indução de apoptose (DU et al., 2000; WIDLAK; GERRARD, 2005).

O citocromo *c*, ao ser liberado no citosol liga-se ao Apaf-1 aumentando sua afinidade por ATP/dATP. A ligação desses nucleotídeos ao complexo citocromo *c*/Apaf-1 promove sua oligomerização formando o apoptossoma, o qual recruta moléculas de pró-caspase-9, promovendo sua auto clivagem em caspase 9. Somente as moléculas de caspase-9 que estão ligadas ao apoptossoma são capazes de clivar e ativar caspases efetoras, como caspase-3, tornando-as hábeis em clivar macromoléculas celulares desencadeando a apoptose (ZOU et al., 1999; KROEMER, 2003). A Smac/Diablo também desempenha papel na ativação da caspase-3.

O fator de indução de apoptose (FIA) não depende da ativação das caspases efetoras, visto que ao ser liberado no citosol, é conduzido ao núcleo onde promove fragmentação parcial do DNA e condensação da cromatina.

A transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) consiste um importante mecanismo tanto na indução da apoptose quanto da necrose (KIM et al., 2003). Existe a possibilidade de que os dois tipos de morte celular compartilhem vias em comum, sendo alguns fatores determinantes para o estabelecimento da necrose ou apoptose, como por exemplo, a drástica redução da concentração intracelular de ATP (LEMASTERS, 1999). Devido ao compartilhamento entre os dois processos de morte, Lemasters (1999) introduziu o termo necroapoptose, já que a célula pode apresentar a ativação das caspases, no entanto devido a alguma alteração intracelular não houve ativação de todas as proteínas necessárias para o estabelecimento da apoptose, tornando-se assim necrose.

A composição molecular do poro de transição de permeabilidade mitocondrial não está bem estabelecida. Existem inúmeros estudos que objetivam elucidar quais são as proteínas envolvidas em sua formação, dentre eles alguns realizados com animais knockout para alguns dos genes ou inibição específica das proteínas apontadas como componentes do poro e notou-se que mesmo nessas condições a transição de permeabilidade mitocondrial ainda ocorre, visto que há substituição dos componentes ausentes ou inibidos (HALESTRAP, 2009; RASOLI et al., 2010).

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar os efeitos da abamectina sobre hepatócitos isolados de rato considerando parâmetros relacionados à bioenergética, morte celular e biotransformação desse princípio ativo, visando contribuir para o conhecimento do mecanismo de ação tóxica deste antiparasitário.

3.1.2 Objetivo específico

Avaliar os efeitos da abamectina no consumo de oxigênio de hepatócitos isolados de rato (respiração mitocondrial); no potencial elétrico transmembrana ($\Delta\Psi_m$); na síntese de ATP, viabilidade celular; homeostase intracelular de cálcio ($[Ca^{2+}]_c$); liberação de citocromo *c*; atividade da caspase 3 e morte celular por necrose.

1.2 Hipótese

A abamectina afeta a bioenergética de hepatócitos isolados de rato diminuindo a síntese de ATP e aumentando a morte celular, sendo sua toxicidade dependente do processo de bioativação.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Avaliação Ética

A Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Campus Experimental da UNESP de Dracena certificou que os procedimentos utilizando animais estão de acordo com os “Princípios Éticos na Experimentação Animal” (Protocolo nº. 05/2010).

4.2 Animais

Ratos Wistar machos com aproximadamente 200 g de peso vivo, 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 decaptação uma vez que os experimentos com a abamectina foram realizados *in vitro*, empregando hepatócitos isolados.

4.3 Reagentes

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

4.4 Abamectina

Abamectina (ABA) foi gentilmente cedida pela empresa OURO FINO AGRONEGÓCIOS, contendo 92,4% de avermectina B_{1a} e 1,61% de avermectina B_{1b}. Considerando-se dados preliminares de testes realizados no laboratório, as doses selecionadas e empregadas foram de 5, 10, 15 e 25 µM nos experimentos que avaliaram a interferência da abamectina sobre a respiração mitocondrial de células permeabilizadas com digitonina 0,002% e 25, 50, 75 e 100 µM nos demais experimentos.

4.5 Isolamento dos Hepatócitos de Rato

Os ratos foram anestesiados por injeção intraperitoneal de tiopental sódico 50 mg/kg e a cavidade peritoneal foi aberta por incisão bilateral. O fígado foi canulado e perfundido através da veia porta com uma solução de NaCl 160,8 mM, KCl 3,15 mM, EGTA 0,5 mM L, Na₂HPO₄.12H₂O 0,7 mM, glicose 5 mM e HEPES-KOH 33 mM, pH 7,65 (meio 1), a 37°C, com um fluxo de 30 mL/min durante 15 minutos. Em seguida, o fígado foi perfundido com uma solução composta pelo meio 1 adicionado de colagenase tipo IV 0,025% (p/v) e CaCl₂ 1 mM, com um fluxo de 20 mL/min durante 15 minutos (Figuras 10, 11 e 12). Ao término da perfusão as células foram separadas (liberadas dos lóbulos) no meio de Krebs-Henseleit, composto por NaCl 119 mM, KCl 4,9 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2,6 mM, NaHCO₃ 25 mM, MgSO₄ 1,2 mM e glicose 5 mM, adicionado de BSA 0,1% (p/v) e HEPES 12,5 mM, pH 7,4. A suspensão foi filtrada em gaze e centrifugada 2 vezes a 50 g por 3 minutos. Os hepatócitos foram ressuspendidos em meio de Krebs-Henseleit (GUGUEN-GUILLOUZO, 1992).

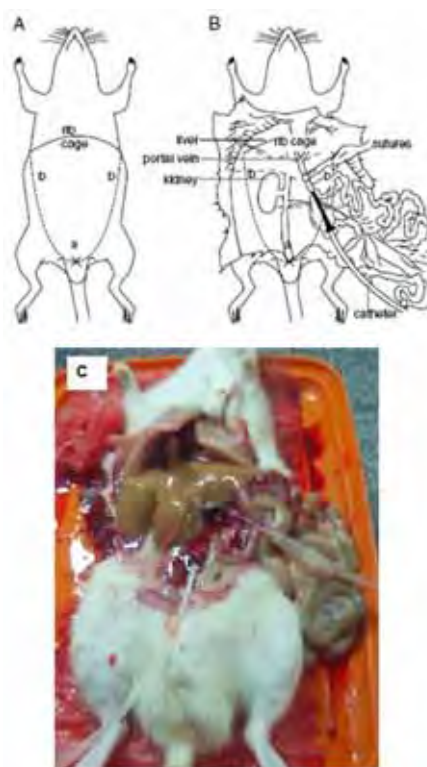


Figura 10 - Representação esquemática do processo cirúrgico envolvido no isolamento de hepatócitos de rato. Incisão bilateral no abdômen do animal (A) e inserção da cânula na veia porta hepática (B). Imagem real das cânulas inseridas na veia porta e na veia cava inferior (C). Adaptado de Current Protocols in Toxicology, (2005).

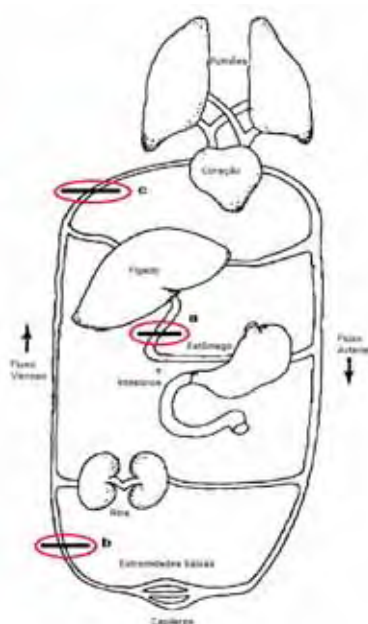


Figura 11 - Representação simplificada da distribuição dos principais pontos onde ocorreu a inserção de cânulas e/ou interrupção do fluxo sanguíneo ao longo da cirurgia. Veia

porta hepática (a), veia cava inferior (b), veia cava superior (c). Adaptado de Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications, (2000).

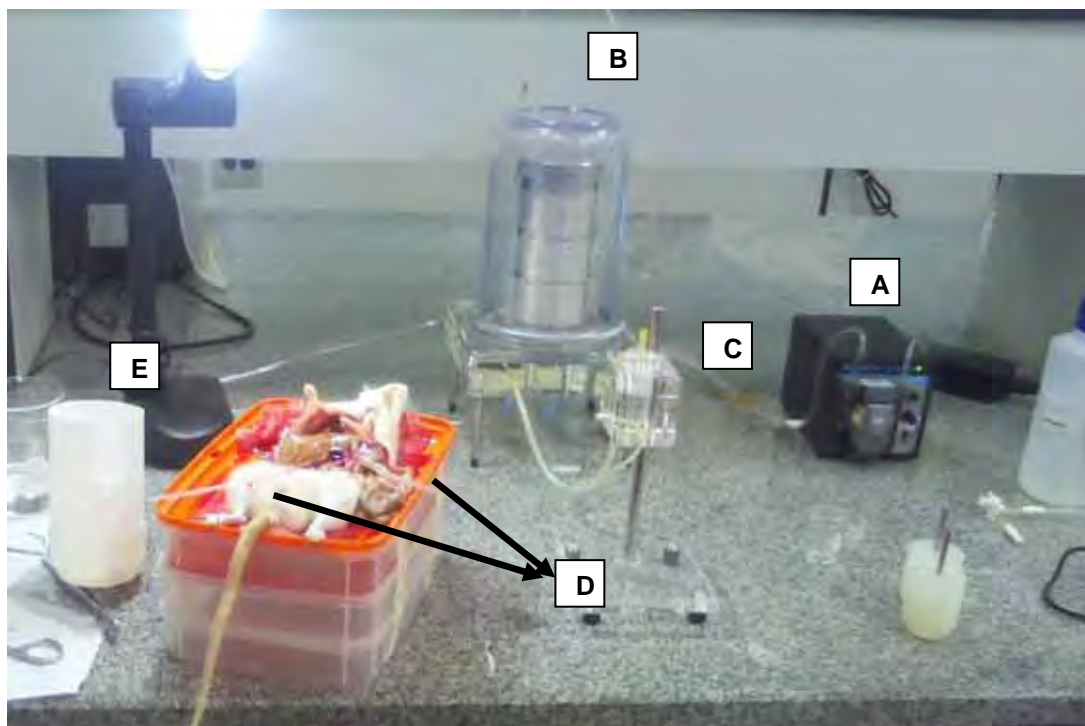


Figura 12 - Imagem mostrando o sistema de perfusão do fígado para isolamento dos hepatócitos. A sequência de letras indica o sentido do fluxo e os equipamentos responsáveis pela condução do líquido de perfusão até o fígado. (A) bomba peristáltica, (B) câmara oxigenadora e aquecedora, (C) captador de bolhas, (D) cânulas de entrada e saída do líquido de perfusão e (E) copo coletor do líquido de perfusão para a recirculação após a inserção do meio 1 acrescido de colagenase IV.

Após a ressuspensão, o número de células foi verificado por contagem em câmara de Neubauer (Figura 13). Para isso a suspensão celular obtida teve de ser diluída inicialmente com meio de Krebs, sendo esta diluição variável em função do número de células presentes, visto que durante a contagem na câmara, não se pode exceder o limite de 200 células em cada quadrante, pois a presença de um número maior de células diminui a confiabilidade da contagem. Em seguida a suspensão sofreu nova diluição, de 10 vezes, com Trypan Blue 0,16% (p/v) (MOLDEÚS et al., 1978) para avaliar a viabilidade

celular pelo teste de exclusão, pois simultaneamente à contagem do número total de células é obtido também o número de células viáveis. Apenas preparações com viabilidade celular inicial $\geq 85\%$ foram utilizadas para os experimentos.

Ao término da contagem das células na câmara, para obter o número de células por mL de suspensão, o valor obtido na contagem é colocado na seguinte fórmula:

Nº de células x fator de diluição x 10.000 = nº de células/mL de suspensão

4

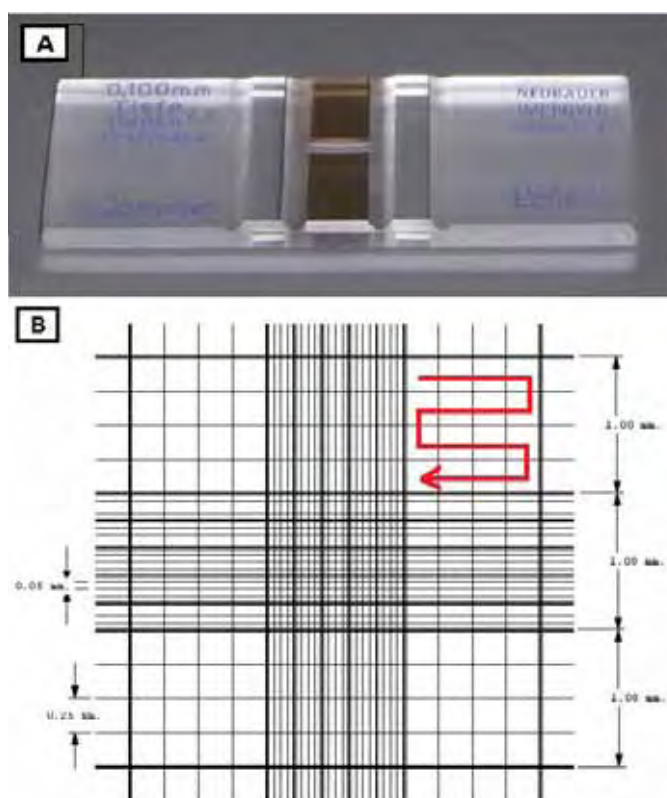


Figura 13 - Câmara de Neubauer utilizada para avaliação da viabilidade celular por meio da exclusão do Trypan blue (0,16%) e contagem do número total de células. (A) visão macroscópica da câmara; (B) visão microscópica da organização dos quadrantes utilizados para a contagem das células.

4.6 Ensaios com Hepatócitos Isolados

4.6.1 Condições de Incubação dos Hepatócitos

Os hepatócitos (10^6 células/mL) foram incubados na ausência (controle) ou na presença de abamectina (25, 50, 100 e 150 μ M) em frascos tipo erlenmeyer de 25 mL, em um volume final de 10 mL, no meio de Krebs-Henseleit adicionado de BSA 0,1% (p/v) e HEPES 12,5 mM, pH 7,4, e mantidos sob agitação constante (30 rpm), a 37°C, em atmosfera com 95% O₂ e 5% CO₂ (Mingatto et al., 2002) (Figura 14). As coletas de amostras foram realizadas nos tempos: 0 (logo após a adição do fármaco à suspensão celular), 30, 60, 90 e 120 minutos de incubação. Em alguns experimentos as células foram incubadas com proadifen 100 μ M 15 minutos antes da adição da ABA.

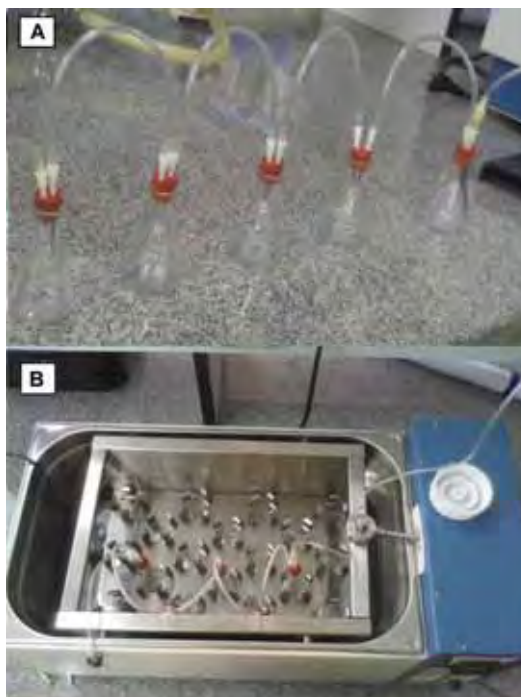


Figura 14 - Sistema de oxigenação das alíquotas celulares durante o processo de incubação.

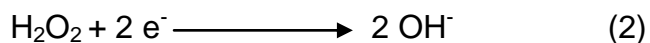
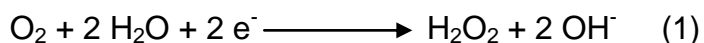
(A) A mistura carbogênica é inserida ao sistema, o excedente é transferido de um erlenmeyer para o outro após a saturação do recipiente onde estão contidas as células. (B) Organização dos erlenmeyers no banho-maria tipo Dubnoff utilizado para manter a suspensão celular homogênea e em temperatura adequada para seu funcionamento (37°C).

4.6.2 Respiração Mitocondrial em Células Permeabilizadas

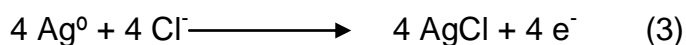
A respiração mitocondrial foi avaliada utilizando um medidor de oxigênio dissolvido (Strathkelvin Precision Dissolved Oxygen Respirometer, Strathkelvin Instruments Limited, Glasgow, Scotland, UK) equipado com um eletrodo do tipo Clark (Figura 15). Os hepatócitos (10^6 células/mL) foram incubados em meio contendo sacarose 250 mM, KH_2PO_4 2 mM, HEPES 10 mM, EGTA 0,5 mM, BSA 0,5% (m/v), MgCl_2 5 mM, pH 7,2, a 37°C . As células foram permeabilizadas com digitonina 0,002% (m/v), um detergente que facilita a entrada do substrato na célula. Os substratos utilizados foram glutamato 5 mM + malato 5 mM ou succinato de potássio 5 mM acrescido de rotenona $2,5 \mu\text{M}$. A respiração de estado 3 foi iniciada pela adição de ADP 2 mM e a respiração de estado 4 foi estabelecida pela adição de oligomicina $1 \mu\text{g/mL}$ (MOREADITH e FISCKUM, 1984).

As velocidades de respiração de estado 3 e 4 foram determinadas por meio do software Strathkelvin Oxygen 782 System (versão 3.0, 2005) e expressas como $\text{nmol O}_2/\text{min}/10^6$ células.

Princípio: O eletrodo de Clark é constituído por um cátodo de platina acoplado a dois ânodos de prata por meio de uma ponte de KCl saturada, e cobertos por uma membrana de teflon. Quando polarizado com 0,8 V o oxigênio dissolvido no meio de incubação é reduzido no cátodo de platina a íons OH^- , de acordo com as equações (1) e (2):



O circuito se completa pela reação seguinte, que ocorre no ânodo de prata:



Assim, o fluxo de elétrons do ânodo de prata para o cátodo de platina produz uma corrente elétrica diretamente proporcional à quantidade de oxigênio no meio, que se difunde através da membrana de teflon, sendo amplificada e registrada por meio de um potenciômetro (CAIN e SKILLETER, 1987).

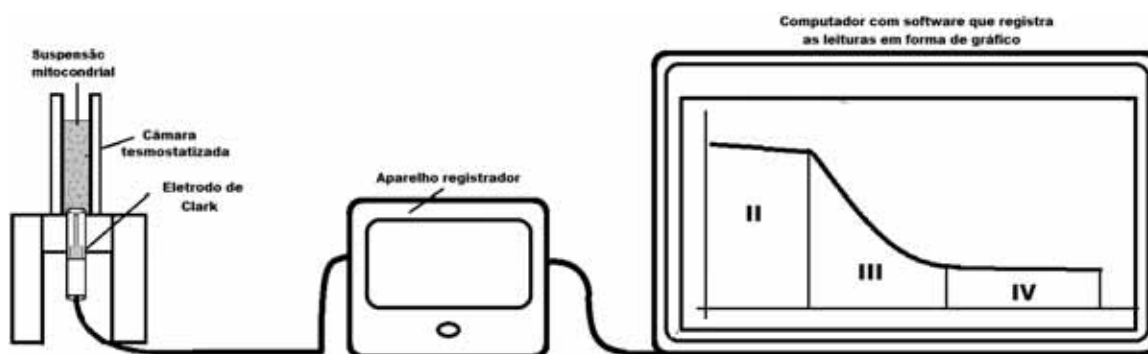


Figura 15 – Representação esquemática do oxímetro utilizado para o monitoramento do consumo de oxigênio pelos hepatócitos e do software usado para registrar e calcular as velocidades de consumo de oxigênio.

4.6.3 Determinação do Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

O potencial de membrana mitocondrial foi determinado por espectrofluorimetria monitorando a captação da sonda fluorescente Tetrametilrodamina Metil Ester (TMRM). Amostras da suspensão celular incubadas com diferentes concentrações de abamectina foram submetidas a centrifugação a 50 g por 5 min. O precipitado resultante da centrifugação ressuspenso em 1 mL de meio de Krebs adicionado de 6,6 μ M de TMRM e incubado por 10 minutos a 37°C. Após a captação, foram realizadas duas lavagens com meio de Krebs e ao precipitado resultante adicionou-se 1 mL de Triton X-100 a 0,1%(v/v). Após centrifugação a 2000 g por 5 min a fluorescência da TMRM captada pelos hepatócitos foi determinada em um espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301 PC (Tokyo, Japan) a 485 e 590 nm,

respectivamente para excitação e emissão. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao grupo controle.

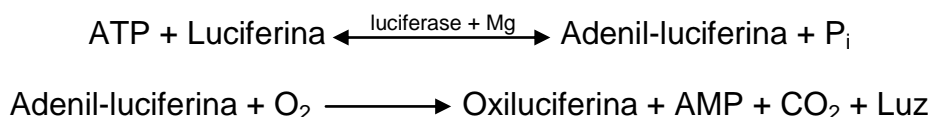
Princípio: A técnica consiste no monitoramento das alterações da fluorescência da sonda TMRM, um composto catiônico permeável à membrana celular que é rapidamente captado pelas mitocôndrias intactas das células. A intensidade de fluorescência estabelece uma relação estequiométrica com o potencial de membrana mitocondrial, ou seja, quanto maior for a polarização mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) maior será a fluorescência.

4.6.4 Níveis Celulares de ATP

Os hepatócitos (10^6 células/mL) foram incubados com diferentes concentrações de abamectina, a 37°C , sob agitação em banho tipo Dubnoff e amostras de 1 mL foram coletadas a cada intervalo de 30 minutos até o tempo final de 120 minutos. As amostras foram centrifugadas a 50 g, por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento tratado com 1 mL de HClO_4 1 M gelado (4°C). Após centrifugação a 2000 g por 10 minutos, a 4°C , uma alíquota de 0,1 mL do sobrenadante foi retirada, neutralizada com KOH 2 M e acrescida de Tris-HCl 100 mM, pH 7,8 (q.s.p. 1 mL). A amostra neutralizada foi novamente centrifugada a 15000 g por 10 minutos, e o conteúdo de ATP foi determinado por bioluminescência a partir de uma alíquota de 100 μL , obtida após a última centrifugação, utilizando-se o sistema luciferina-luciferase por meio do kit "ATP BIOLUMINESCENT ASSAY KIT" (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) em um aparelho Luminômetro (modelo Sirius I, Berthold Detection Systems, Pforzheim, Alemanha). Os resultados após as conversões são expressos em nmol de ATP/ 10^6 células.

Princípio: O método consiste na quebra do ATP pela luciferase e a união do ADP à luciferina, formando assim a adenil-luciferina. Essa por sua vez reage com o oxigênio emitindo luz, sendo essa intensidade de luz captada pelo

aparelho. Por meio de uma curva padrão consegue-se realizar a quantificação do ATP presente na amostra. O ATP é o fator limitante da reação para a emissão de luz, ou seja, a quantidade de luz emitida é diretamente proporcional à quantidade de ATP na amostra.

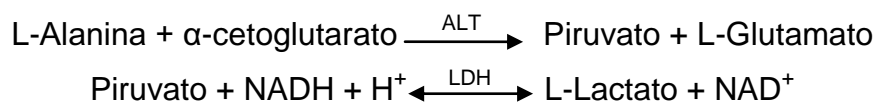


4.6.5 Viabilidade Celular

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 50 *g* por 5 minutos, a 4°C, e a atividade das enzimas ALT e AST determinada no sobrenadante utilizando-se “kits” comerciais (Bioclin®) específicos para cada enzima. As dosagens foram realizadas em comprimento de onda de 340 nm em um espectrofotômetro (Beckman Coulter, modelo DU800) sob agitação e temperatura (37°C) controladas. A quantificação foi realizada por meio da diferença da absorvância medida a cada minuto e a citotoxicidade foi expressa em porcentagem da atividade total das enzimas, determinada em células tratadas com Triton X-100 0,5% (v/v).

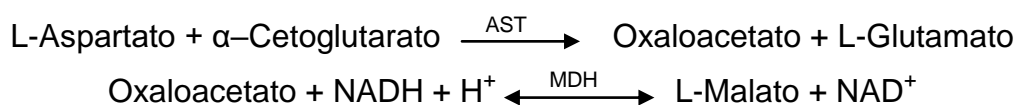
Princípio:

- Alanina transaminase



A ALT catalisa a transferência do grupo amina da alanina para α-cetogluturato, levando à formação de piruvato e glutamato. O piruvato em presença da lactato desidrogenase (LDH) reage com o NADH, sendo reduzido a lactato e o NADH é oxidado a NAD⁺. A velocidade de oxidação do NADH é proporcional à atividade da ALT na amostra.

- Aspartato transaminase



A AST catalisa a transferência do grupo amina do aspartato para o α -cetogluturato, levando à formação de glutamato e oxalacetato. O oxalacetato em presença da malato desidrogenase (MDH) reage com o NADH, produzindo malato e oxidando o NADH a NAD^+ . A velocidade de oxidação do NADH é proporcional à atividade da AST na amostra.

4.6.6 Homeostase Intracelular de Ca^{2+}

Os hepatócitos ($2 \cdot 10^6$ células/mL) foram incubados em frascos tipo erlenmeyer de 25 mL (volume final de 10 mL) em meio de Krebs-Henseleit adicionado de BSA 2% (p/v), HEPES 12,5 mM e glicose 10 mM, pH 7,4. A esse meio foi adicionado ácido plurônico 0,005% e a sonda fluorescente Fura-2 acetoximetil éster (Fura-2 AM) 5 μM . Os hepatócitos foram mantidos sob agitação constante (30 rpm), a 32°C, em atmosfera com 95% O_2 e 5% CO_2 durante 60 minutos para que houvesse a captação da sonda pelos hepatócitos.

Após o período de captação, a suspensão de células carregadas com Fura-2 AM foi coletada e submetida a duas centrifugações a 50 g por 3 min para remoção do Fura-2 AM residual, sendo finalmente ressuspenso em meio de Krebs-Henseleit adicionado de BSA 2% (p/v), HEPES 12,5 mM e glicose 10 mM, pH 7,4 e mantida a 4°C para posterior utilização. A fluorescência do Ca^{2+} foi determinada em suspensões de $2 \cdot 10^6$ células/mL pela razão dos comprimentos de onda de excitação a 340 e 380 nm e emissão de 505 nm utilizando-se o espectrofluorímetro Shimadzu (modelo RF-5301PC, Tóquio, Japão). A calibração e os cálculos da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ foram realizados de acordo com o procedimento descrito por Grynkiewicz et al. (1985). F_{max} foi obtido pela adição de Triton X-100 na concentração final de 1% e F_{min} pela adição de EGTA na concentração de 10 mM. A constante de equilíbrio utilizada para os cálculos foi de 225 nM (Grynkiewicz et al., 1985). As alterações nas $[\text{Ca}^{2+}]_c$ livre no citoplasma dos hepatócitos foram avaliadas 300 segundos após o início das

leituras com adições crescentes de ABA (25, 50, 75 e 100 μM) a cada 300 segundos.

Princípio: Fura-2 AM éster é um composto não sensível ao cálcio livre quando se encontra fora do ambiente intracelular, no entanto quando ultrapassa a membrana e passa para o interior da célula, as esterases distribuídas por todo citoplasma hidrolisam o composto a Fura-2, tornando-o sensível ao íon cálcio por estar carregado com carga negativa. Devido a essa carga aniônica, o Fura-2 não consegue atravessar novamente a membrana, permanecendo assim no citoplasma da célula.

4.6.7 Liberação de Citocromo c

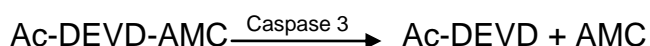
A liberação de citocromo c foi determinada de acordo com metodologia proposta por Appaix et al. (2000). Os hepatócitos (2,7 mg de proteína/mL) após serem adicionados ao meio de Krebs acrescido de albumina (2 mg/mL) e digitonina 0,002% (m/v), foram incubados com as diferentes concentrações de abamectina a 25°C por 30 min. Ao término do período de incubação as células foram centrifugadas a 10000 g por 30 min a 4°C, e o sobrenadante recolhido e filtrado em membrana Millipore de 0,2 μm . A absorvância foi determinada em espectrofotômetro (Beckman Coulter, modelo DU800) pela diferença das absorvâncias medidas nos comprimentos de onda de 414 nm e 600 nm, respectivamente. Os resultados foram expressos em nmol de citocromo c liberado/ 10^6 células utilizando o coeficiente de extinção molar (ϵ) de $100 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.6.8 Ativação da Caspase 3

A avaliação da atividade da Caspase 3 foi realizada por meio do kit Caspase 3 Assay (Sigma). Os hepatócitos após serem coletados nos determinados tempos foram centrifugados a 600 g por 5 min e ressuspensos

em 1 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS). Nova centrifugação foi realizada e o precipitado resultante incubado por 15 min a 4°C com 200 µL de tampão de lise para a liberação da caspase 3, sendo em seguida adicionados 300 µL de PBS. A suspensão celular lisada foi centrifugada a 14000 g por 15 min a 4°C e o sobrenadante recolhido. Alíquotas de 50 µL do sobrenadante foram utilizadas para avaliação da atividade da caspase 3 de acordo com as instruções do fabricante. A fluorescência foi determinada em um espectrofluorímetro Shimadzu (modelo RF-5301PC, Tóquio, Japão) nos comprimentos de onda de 360 e 460 para excitação e emissão, respectivamente. Os resultados foram expressos em pmol de AMC/min/mL.

Princípio:



O método se baseia na hidrólise do substrato acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metilcumarínico (Ac-DEVD-MCA) que resulta na liberação do 7-amino-4-metilcumarínico (AMC) que emite fluorescência. Portanto, quanto maior a quantidade da caspase 3 ativa, maior a fluorescência.

4.6.9 Avaliação da Morte Celular por Necrose

Amostras de células (200 µL) foram coletadas e centrifugadas a 50 g por 5 minutos; em seguida o precipitado foi ressuspensado em meio de Krebs/Henseleit, pH 7,4 e incubado com os corantes Hoechst 33342 8 µg/mL e Iodeto de Propídio 5 µM por 15 minutos ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Ao término do período de incubação, foram efetuadas duas centrifugações a 50 g por 5 minutos para que o excesso dos corantes fosse removido. Após a última centrifugação, os hepatócitos foram ressuspensos em 50 µL de meio Krebs/Henseleit, pH 7,4. Para a montagem das lâminas, uma gota de glicerol foi colocada sobre uma lâmina e 40 µL da suspensão celular marcada com os corantes foi adicionada. As observações foram efetuadas

utilizando um Microscópio de Fluorescência marca Leica modelo DM 2500, do Laboratório de Morfofisiologia da Placenta e Embrião (L@MPE) do Campus de Dracena-Unesp. As contagens das células foram realizadas por meio do software Leica QWin 3.0.

Princípio: O Hoechst 33342 é um corante fluorescente permeável à membrana celular capaz de ligar-se aos ácidos nucléicos que compõem o DNA celular, sendo muito utilizado para a determinação de fragmentos nucleares formados na apoptose (POLLACK; CIANCIO, 1991). Já o iodeto de propídio não possui a capacidade de se aderir ao DNA de células que apresentam a membrana intacta, corando assim apenas células que apresentam rompimento da membrana plasmática (necrose).

4.7 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 e os resultados com valores de $P < 0,05$ considerados estatisticamente significantes. As análises foram realizadas aplicando o programa GraphPad Prism, versão 4.0 para Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, USA 03/04/2003).

V. RESULTADOS

5.1 Efeitos da Abamectina Sobre a Velocidade de Consumo de Oxigênio no Estado 3 em Hepatócitos Isolados de Rato

No primeiro experimento, os substratos oxidáveis foram glutamato 5 mM juntamente com malato 5 mM (Figura 16A e B). No segundo, o substrato oxidável foi o succinato de potássio 5 mM e o complexo I foi inibido pela rotenona 2,5 μ M (Figura 17A e B). Ao observar as Figuras 16B e 17B, é possível notar uma diminuição drástica no consumo de oxigênio da respiração de estado 3 na concentração 25 μ M de ABA. Por esse motivo, os experimentos de respiração foram desenvolvidos com as concentrações de 5, 10, 15 e 25 μ M.

A ABA inibiu a respiração mitocondrial de estado 3 de maneira dose-dependente tanto com substratos do complexo I da cadeia respiratória (glutamato + malato) quanto com substrato do complexo II (succinato).

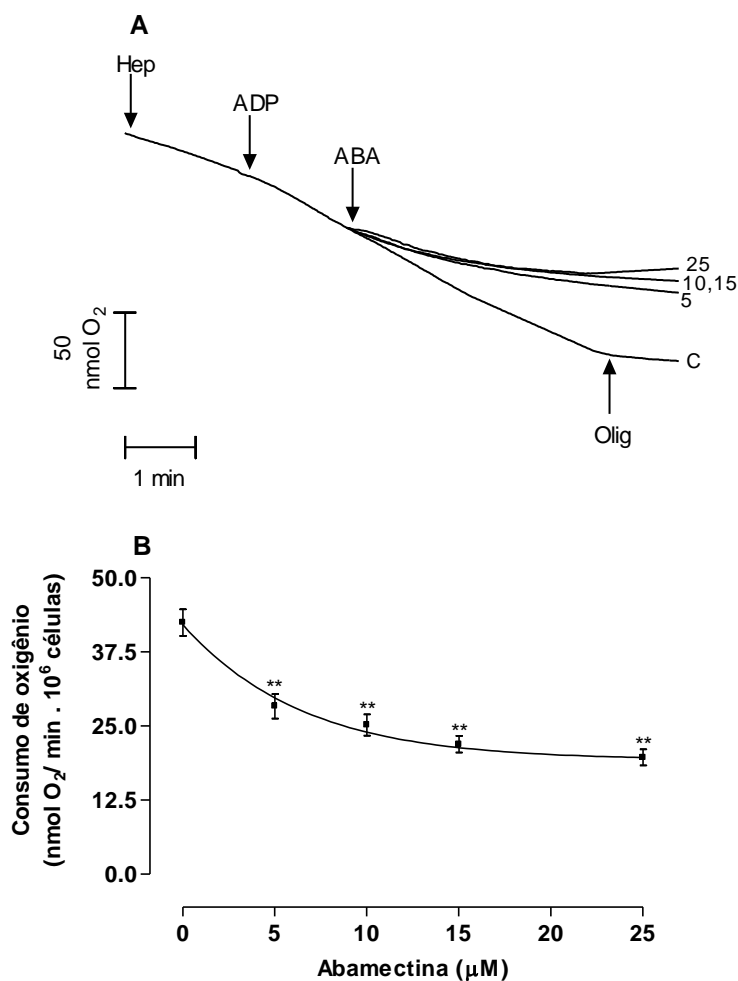


Figura 16 - Efeito da abamectina (ABA) sobre o consumo de oxigênio em hepatócitos isolados de rato (10^6 células/mL) incubados a 37°C em meio de respiração descrito em Material e Métodos. As células foram permeabilizadas com digitonina 0,002% e os substratos utilizados foram glutamato 5 mM + malato 5 mM. (A) Representação esquemática da respiração mitocondrial; o experimento teve início com a adição dos hepatócitos (Hep), a formação do estado 3 da respiração ocorreu após a adição de ADP 2 mM e a formação do estado 4 foi induzida pela adição de oligomicina (Olig) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A ABA nas diferentes concentrações (5, 10, 15 e 25 μM) foi adicionada durante o estado 3 da respiração mitocondrial, e a velocidade máxima de consumo de O_2 está indicada pelo controle (C). (B) Representação quantitativa da inibição do estado 3 da respiração mitocondrial após a adição das diferentes concentrações de ABA. Os resultados representam a média \pm EPM de 3 experimentos com preparações diferentes. **Significativamente diferente do controle ($P < 0,01$).

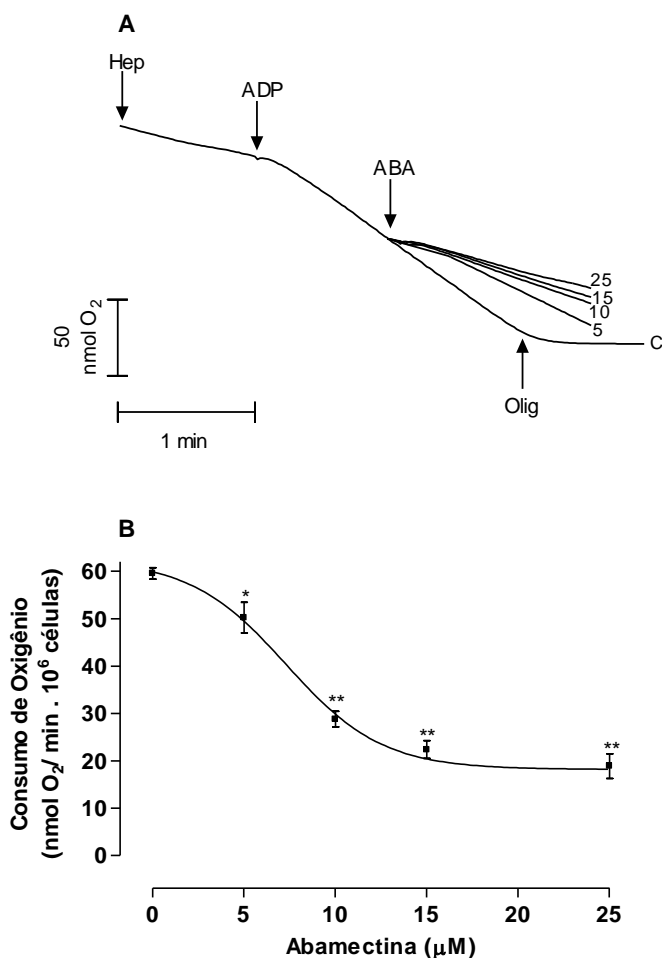


Figura 17 – Efeito da abamectina (ABA) sobre o consumo de oxigênio em hepatócitos isolados de rato (10^6 células/mL) incubados a 37°C em meio de respiração descrito em Material e Métodos. As células foram permeabilizadas com digitonina 0,002% e o substrato utilizado foi succinato de potássio 5 mM acrescido de rotenona $2,5 \mu\text{M}$. (A) Representação esquemática da respiração mitocondrial; o experimento teve início com a adição dos hepatócitos (Hep), a formação do estado 3 da respiração ocorreu após a adição de ADP 2 mM e a formação do estado 4 induzida pela adição de oligomicina (Olig) $1 \mu\text{g/mL}$. A ABA nas diferentes concentrações (5, 10, 15 e $25 \mu\text{M}$) foi adicionada durante o estado 3 da respiração mitocondrial, e a velocidade máxima de consumo de O_2 está indicada pelo controle (C). (B) Representação quantitativa da inibição do estado 3 da respiração mitocondrial após a adição das diferentes concentrações de ABA. Os resultados representam a média \pm EPM de 3 experimentos com preparações diferentes. *,**Significativamente diferente do controle ($P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente).

5.2 Efeitos da Abamectina Sobre o Potencial Elétrico de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em Hepatócitos Isolados de Rato

Os hepatócitos sem prévia incubação com proadifen (Figura 18A) apresentaram redução significativa no potencial de membrana mitocondrial apenas nas concentrações mais elevadas de ABA (75 e 100 μM), sendo que na concentração de 100 μM houve uma redução significativa no potencial de membrana já aos 30 minutos, permanecendo até o término do período de incubação. Para a concentração 75 μM de ABA a dissipação do potencial de membrana passou a ser observada somente após 90 minutos de incubação.

Os hepatócitos previamente incubados com proadifen (Figura 18B) mostraram-se mais sensíveis à ação do fármaco, visto que já aos 30 minutos de incubação a adição de 75 μM de ABA apresentou redução significativa no potencial de membrana mitocondrial e a adição de 50 μM passou a afetar de maneira significativa este parâmetro a partir dos 60 minutos, efeitos esses não observados no caso anterior.

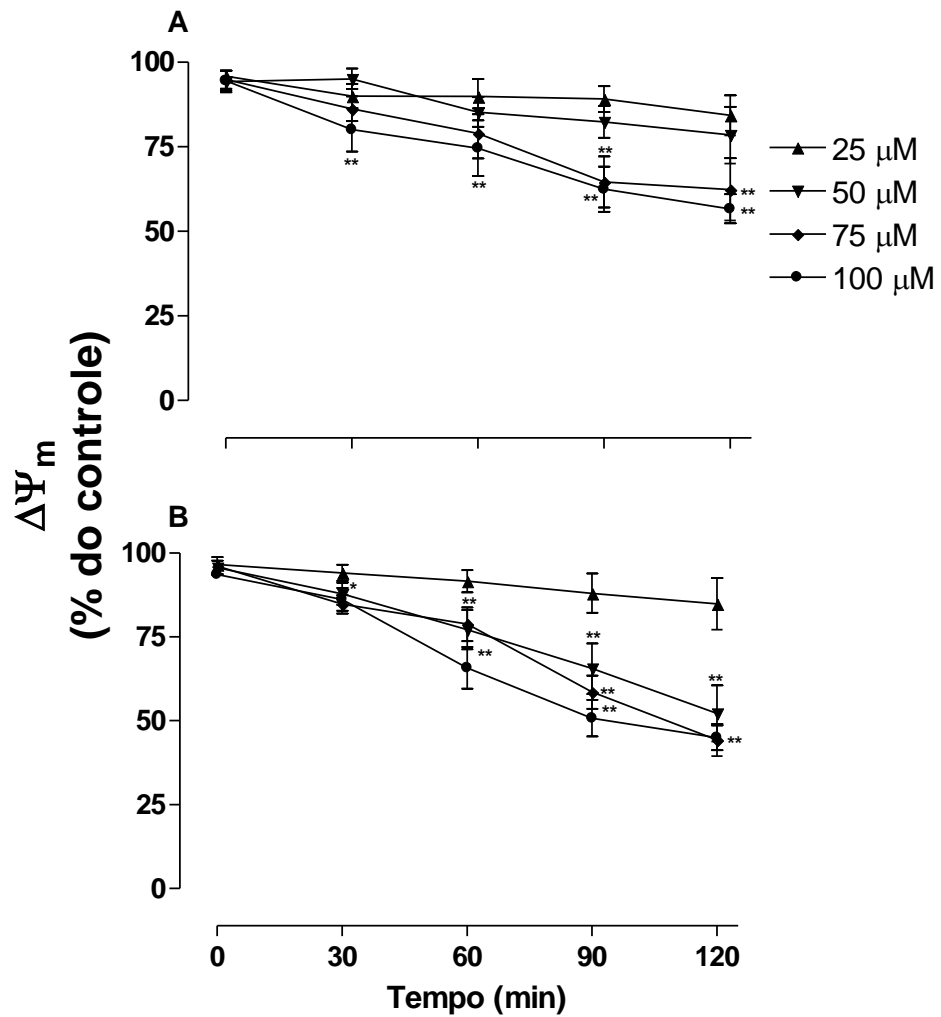


Figura 18 – Efeitos da abamectina (ABA) sobre o potencial de membrana mitocondrial avaliado pela captação da sonda fluorescente Tetrametilrodamina Metil Éster (TMRM) em hepatócitos isolados de ratos (10^6 células/mL) na ausência (A) ou na presença (B) de proadifen 100 μM conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados representam a média \pm EPM de 6 experimentos com preparações diferentes. *, **Significativamente diferente do controle (sem ABA) nos tempos correspondentes ($P < 0,05$, $P < 0,01$ respectivamente).

5.3 Efeitos da Abamectina Sobre os Níveis Intracelulares de ATP em Hepatócitos Isolados de Rato

Nos experimentos realizados para monitorar as alterações induzidas pela ABA nas concentrações intracelulares de ATP foi utilizada a mesma faixa de concentração da variável descrita anteriormente (Figura 19). As concentrações de ATP foram monitoradas em células na ausência (A) ou presença (B) de proadifen 100 μM .

Uma redução significativa da concentração de ATP em células sem incubação prévia com proadifen (Figura 19A) iniciou-se aos 60 minutos após o início do período experimental em hepatócitos expostos às concentrações de 50, 75 e 100 μM de ABA de maneira dose-dependente. Nas coletas subsequentes (90 e 120 minutos), as mesmas concentrações continuaram a causar reduções tempo e dose-dependentes na produção de ATP.

As células previamente tratadas com 100 μM de proadifen (Figura 19B) apresentaram redução significativa nos níveis de ATP logo aos 30 minutos do período experimental na concentração mais elevada de ABA. Nas coletas posteriores (60, 90 e 120 minutos), todas as concentrações utilizadas (25, 50, 75 e 100 μM) reduziram o conteúdo de ATP intracelular, e esta queda ampliou-se em função do aumento do tempo de exposição ao composto, com exceção das concentrações mais elevadas (75 e 100 μM) que promoveram inibição máxima aos 90 e 60 minutos, respectivamente.

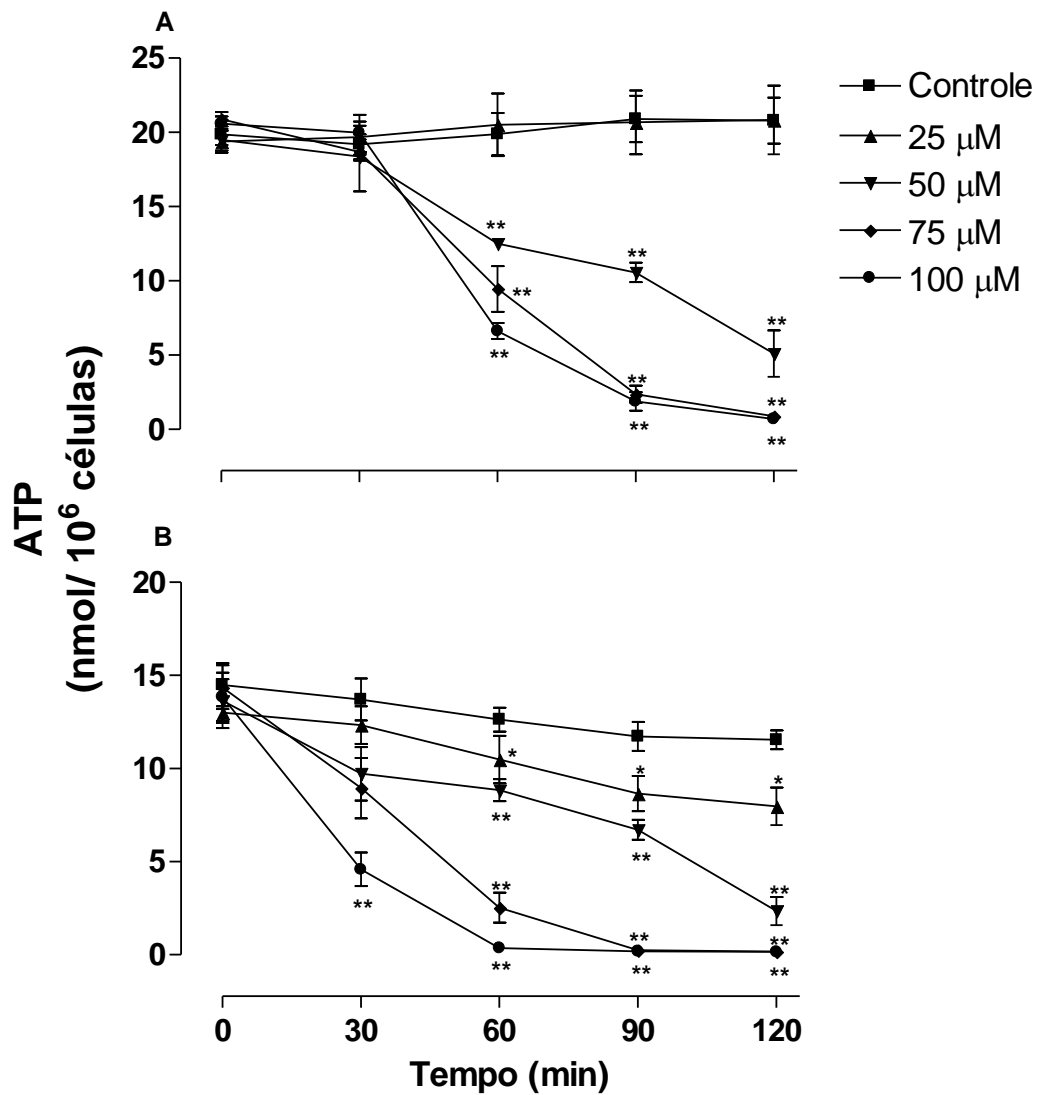


Figura 19 – Efeitos da abamectina (ABA) sobre a concentração intracelular de ATP em hepatócitos isolados de ratos (10^6 células/mL) na ausência (A) ou na presença (B) de proadifen 100 μ M conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados representam a média \pm EPM de 4 preparações diferentes em (A) e 6 em (B). *, **Significativamente diferente do controle (sem ABA) no tempo correspondente ($P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente).

5.4 Efeitos da Abamectina Sobre a Viabilidade Celular em Hepatócitos Isolados de Rato

A atividade das enzimas alanina transaminase (ALT) (Figura 20) e aspartato transaminase (AST) (Figura 21) foi utilizada como forma de monitoramento da viabilidade dos hepatócitos quando expostos a diferentes concentrações de ABA (25 a 100 μM) e avaliada tanto em células na ausência (A) como na presença de 100 μM de proadifen (B).

Na Figura 20A, pode ser observado um aumento significativo na atividade da ALT apenas aos 90 minutos, nas concentrações de 75 e 100 μM ABA de forma dose-dependente, permanecendo até o final do período experimental. Os hepatócitos previamente incubados com proadifen (Figura 20B) apresentaram um aumento significativo na liberação da enzima já aos 60 minutos nas concentrações de 75 e 100 μM de ABA e aos 90 minutos para a concentração 50 μM . O efeito máximo atingido pela ABA 75 e 100 μM ocorreu aos 90 e 120 minutos, respectivamente.

A liberação da AST em hepatócitos não tratados com proadifen está representada na Figura 21A. As concentrações de ABA 50, 75 e 100 μM diminuíram a viabilidade dos hepatócitos a partir dos 90 minutos de incubação, permanecendo até os 120 minutos. Na presença do inibidor (Figura 21B) as células apresentaram uma redução significativa em sua viabilidade a partir dos 30 minutos de incubação, permanecendo até o término do experimento, apresentando característica tempo e dose-dependente. A ABA 50 μM apresentou atividade tóxica aos hepatócitos tratados com proadifen nos mesmos períodos quando comparados às células na ausência do inibidor. Por fim, a concentração de 75 μM mostrou atividade tóxica desde os 60 minutos até o final do período experimental.

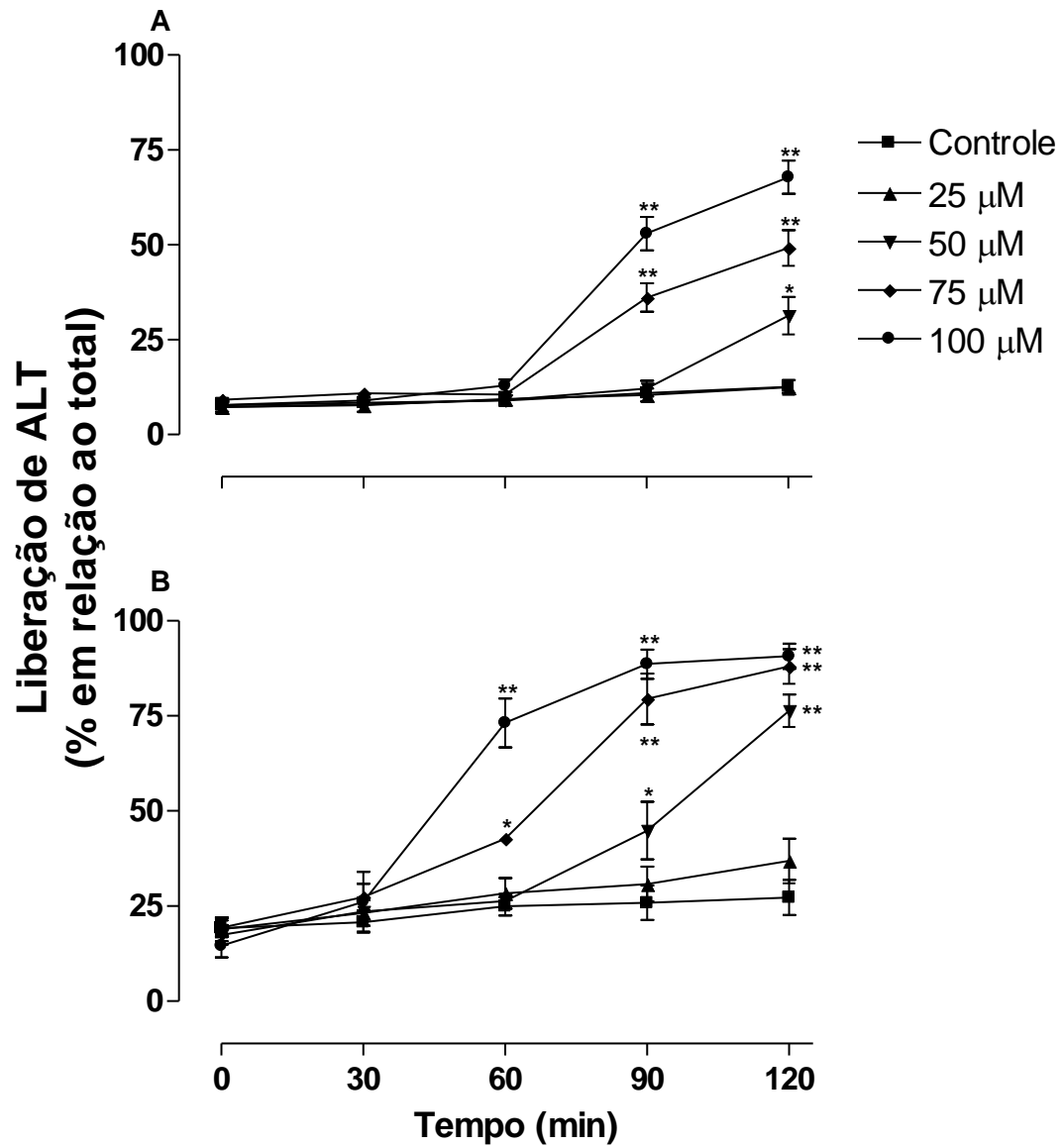


Figura 20 – Efeitos da abamectina (ABA) sobre a viabilidade celular avaliada pela liberação da enzima alanina transaminase (ALT) em hepatócitos isolados de ratos (10^6 células/mL) na ausência (A) ou na presença (B) de proadifen $100 \mu\text{M}$ conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados representam a média \pm EPM de 5 experimentos com preparações diferentes. *,**Significativamente diferente do controle (sem ABA) nos tempos correspondentes ($P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente).

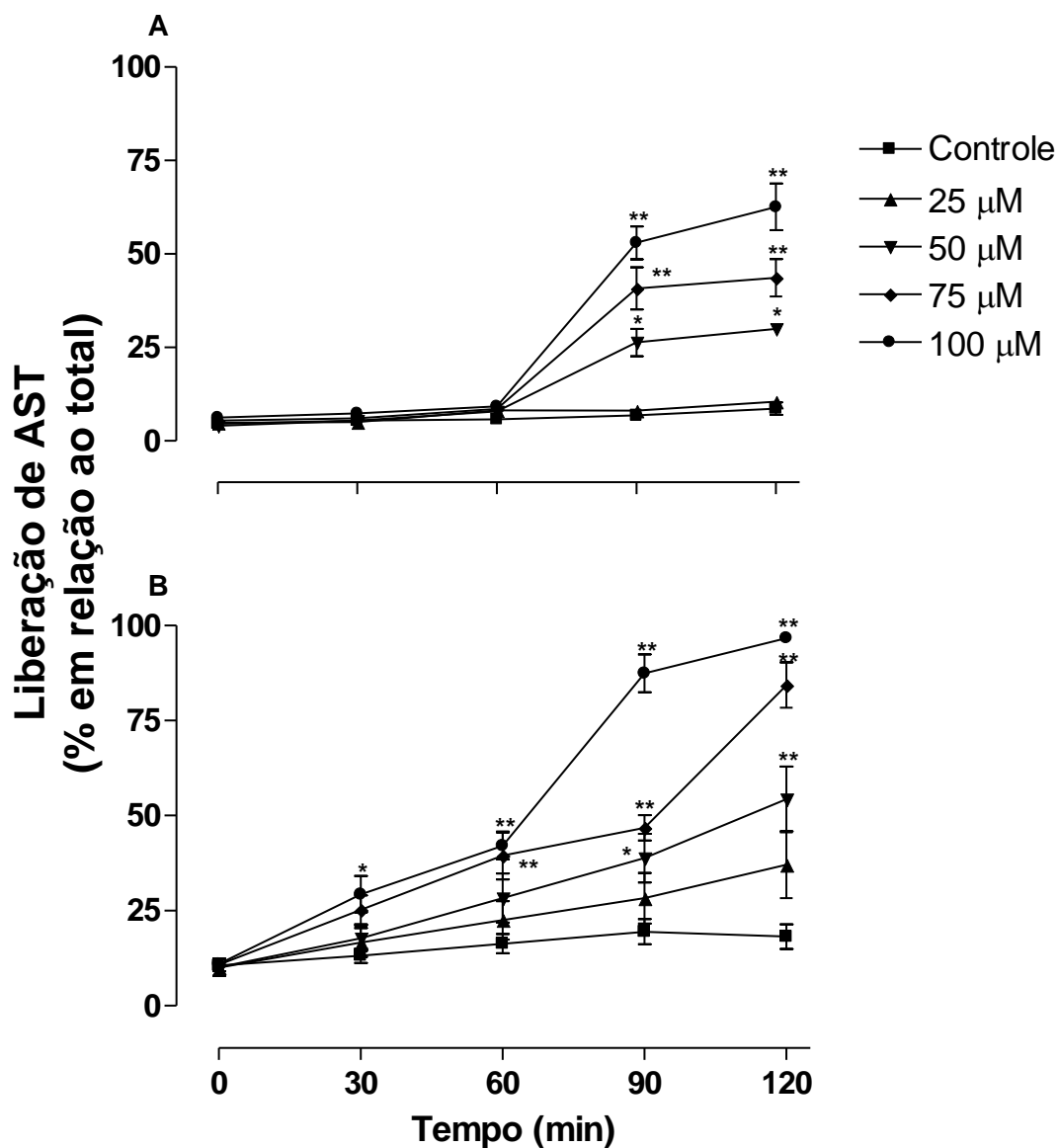


Figura 21 – Efeitos da abamectina (ABA) sobre a viabilidade celular avaliada pela liberação da enzima aspartato transaminase (AST) em hepatócitos isolados de ratos (10^6 células/mL) na ausência (A) ou na presença (B) de proadifen 100 μ M conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados representam a média \pm EPM de 6 experimentos com preparações diferentes. *,**Significativamente diferente do controle (sem ABA) nos tempos correspondentes ($P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente).

5.5 Efeitos da Abamectina sobre a Homeostase Intracelular de Ca^{2+} em Hepatócitos Isolados de Rato

A homeostase intracelular de Ca^{2+} foi determinada pelas alterações na fluorescência da sonda Fura-2 em hepatócitos expostos a concentrações crescentes de abamectina (25 a 100 μM) sem a adição de proadifen 100 μM .

Ao observar a Figura 22, é possível notar um aumento na concentração citoplasmática de Ca^{2+} após a exposição dos hepatócitos a abamectina 25 μM . A adição das demais concentrações de ABA (50, 75 e 100 μM) não provocaram alterações superiores àquela observada na menor concentração adicionada (25 μM).

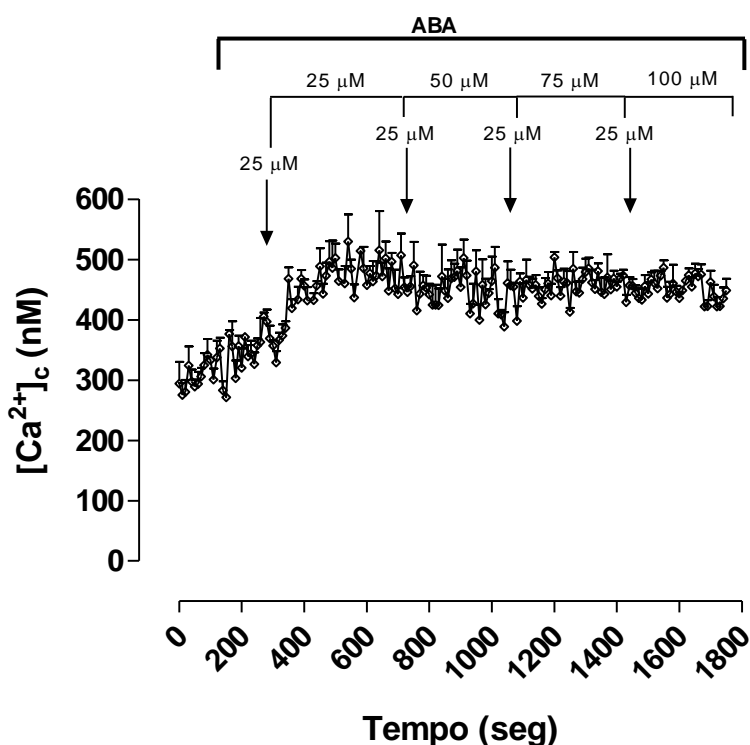


Figura 22 – Efeitos da abamectina (ABA) sobre a homeostase intracelular de Ca^{2+} em hepatócitos isolados de ratos ($2 \cdot 10^6$ células/mL) permeabilizados com ácido plurônico (0,005%) conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados representam a média \pm EPM de 5 experimentos com preparações diferentes.

5.6 Efeitos da Abamectina Sobre a Liberação de Citocromo c em Hepatócitos Isolados de Rato

A liberação de citocromo c foi determinada em hepatócitos expostos a concentrações crescentes de abamectina (25 a 100 μM) sem a adição de proadifen 100 μM . A adição de ABA ao meio de incubação dos hepatócitos não resultou em liberação significativa do citocromo c pelas mitocôndrias (Figura 23).

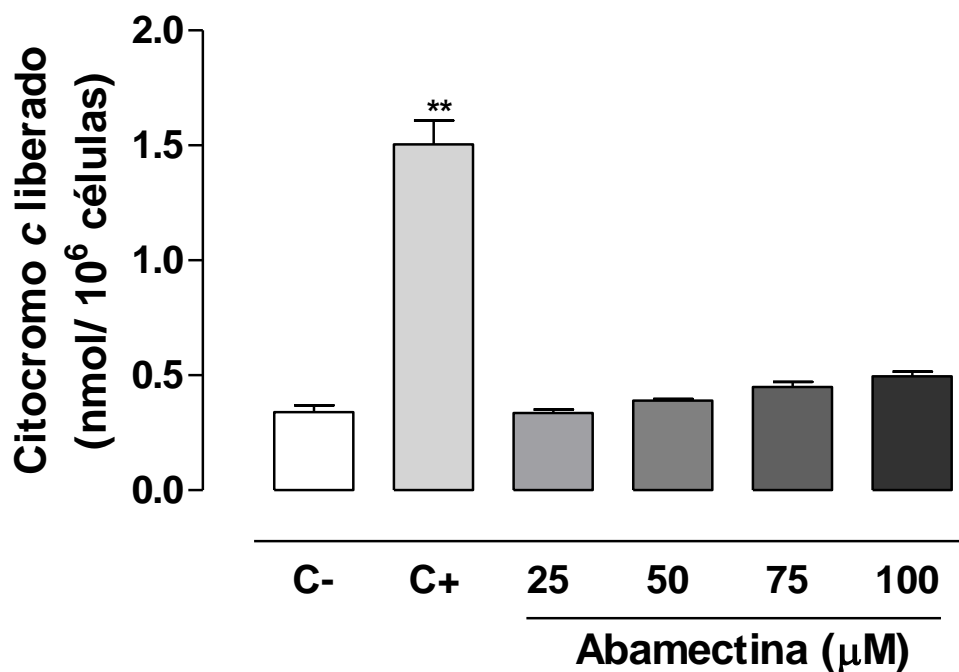


Figura 23 – Efeitos da abamectina (ABA) sobre a liberação de citocromo c em hepatócitos isolados de ratos (2,7 mg de proteína/mL) permeabilizados com digitinina 0,002% (m/v) incubados a 25°C em meio descrito em Material e Métodos. (C-) controle, sem ABA; (C+) células tratadas com Triton X-100 a 0,1% (v/v). Os resultados representam a média \pm EPM de 4 experimentos com preparações diferentes. **Significativamente diferente do controle ($P < 0,01$).

5.7 Efeitos da Abamectina Sobre a Ativação da Caspase 3 em Hepatócitos Isolados de Rato

A ativação da caspase 3 foi avaliada em hepatócitos expostos a concentrações crescentes de ABA (25 a 100 μM) na presença de 100 μM de proadifen, um inibidor das enzimas do citocromo P450, uma vez que, como observado anteriormente, a citotoxicidade exercida pela ABA torna-se mais elevada nessas condições. Porém, como observado na Figura 24, a adição de ABA ao meio de incubação dos hepatócitos não provocou ativação da caspase 3 nos hepatócitos durante o período experimental (120 minutos).

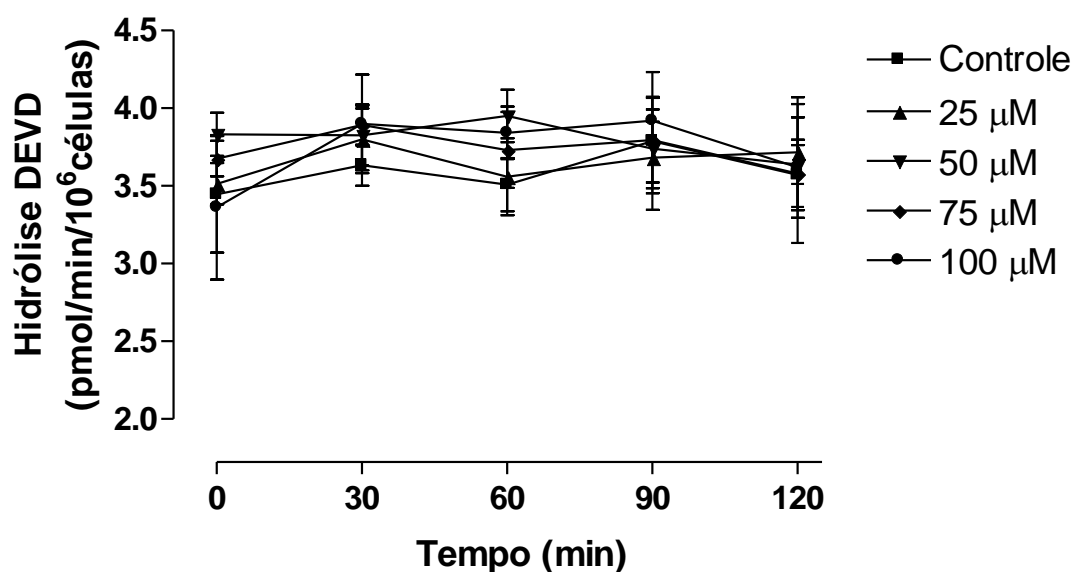


Figura 24 – Efeitos da abamectina (ABA) sobre a ativação da caspase 3 em hepatócitos isolados de ratos (10^6 células/mL) na presença de proadifen 100 μM conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados representam a média \pm EPM de 3 experimentos com preparações diferentes.

5.8 Efeitos da Abamectina Sobre a Morte Celular por Necrose em Hepatócitos Isolados de Rato

Para avaliar os efeitos da ABA sobre a morte celular por necrose, as células foram marcadas com dois corantes, o Hoechst 33342 utilizado para a determinação do número total de células e o iodeto de propídio, que possui capacidade de permanecer aderido apenas a células em processo de necrose. Nesse experimento, foram utilizadas apenas células concomitantemente expostas a diferentes concentrações de ABA e 100 μM de proadifen (Figura 25).

De acordo com as observações realizadas (Figura 26), a ABA desencadeia o a morte celular por necrose nos hepatócitos a partir de 60 minutos do período experimental de maneira dose-dependente nas concentrações de 75 e 100 μM , permanecendo até o término do processo de incubação. A ABA 50 μM desencadeou o processo de necrose apenas aos 120 minutos de incubação.

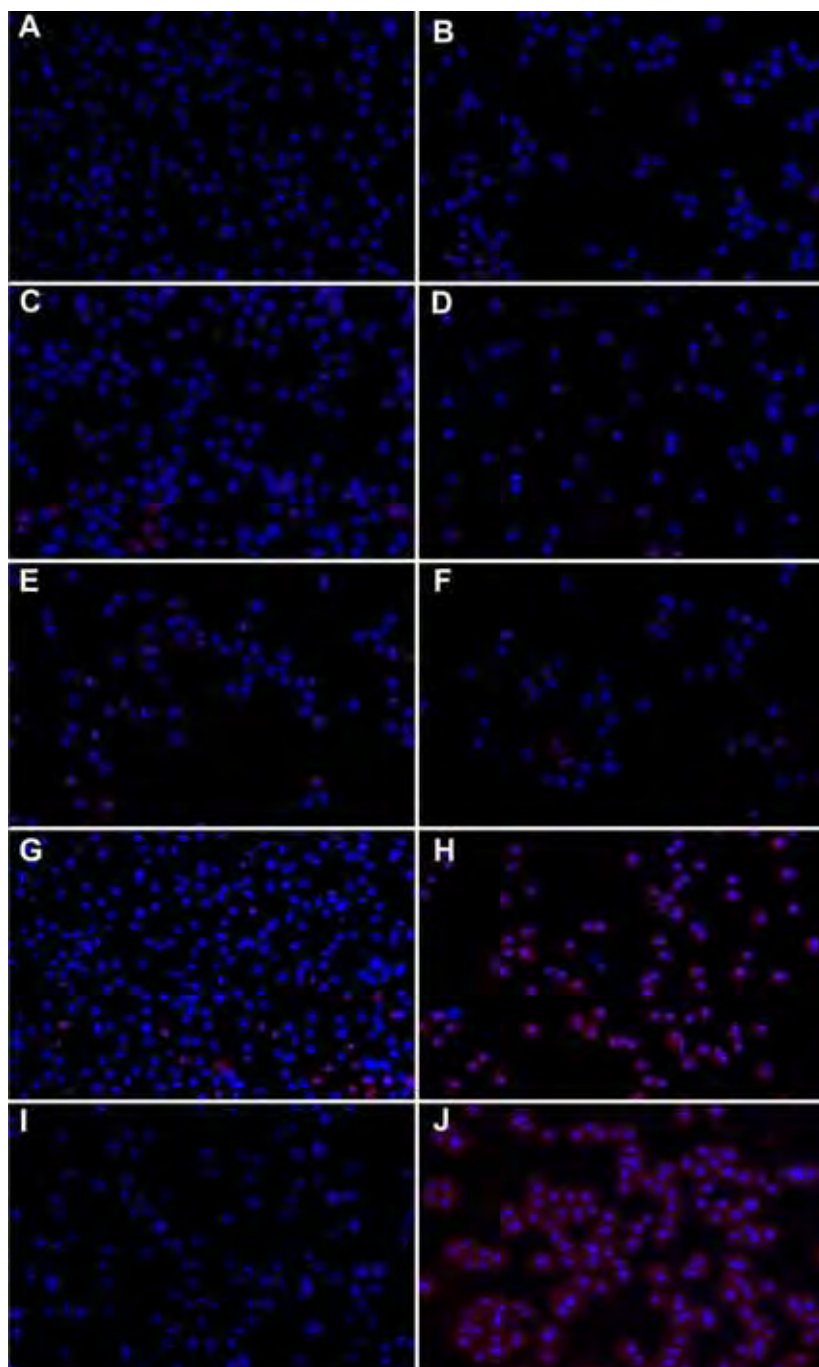


Figura 25 – Figuras representativas mostrando os efeitos da abamectina (ABA) sobre a morte celular por necrose ao 0 e 120 minutos do período experimental monitorado pelo corante fluorescente iodeto de propídio. (A e B) Controles, sem ABA; (C e D) ABA 25 μM ; (E e F) ABA 50 μM ; (G e H) ABA 75 μM ; (I e J) ABA 100 μM . Os resultados são representativos de 3 experimentos com preparações diferentes.

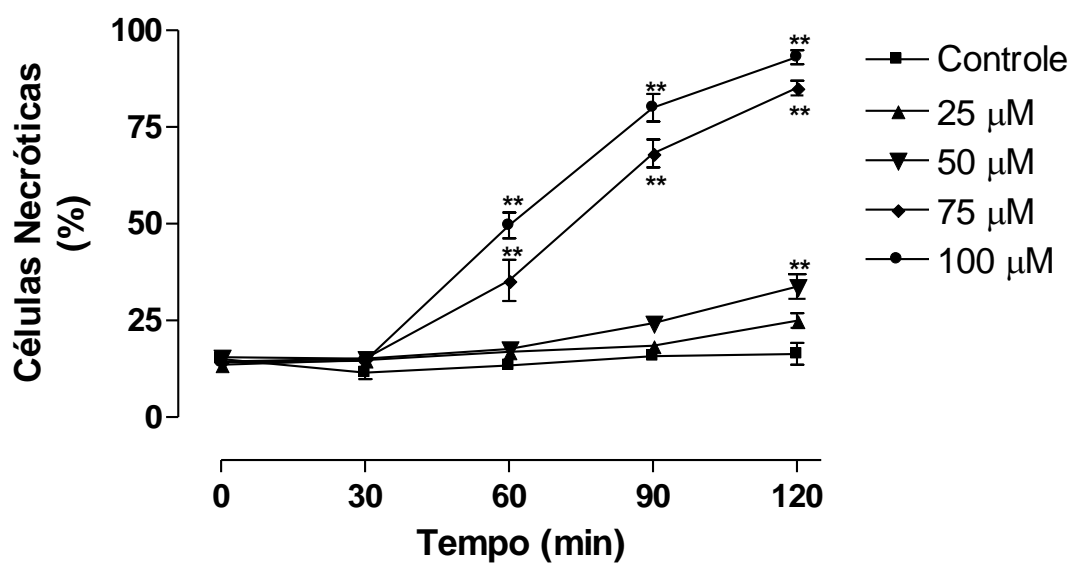


Figura 26 – Efeitos da abamectina (ABA) sobre a morte celular por necrose em hepatócitos isolados de ratos (10^6 células/mL) na presença de proadifen $100 \mu\text{M}$ conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados representam a média \pm EPM de 3 experimentos com preparações diferentes. **Significativamente diferente do controle (sem ABA) nos tempos correspondentes ($P < 0,01$).

VI. DISCUSSÃO

A interferência da abamectina no funcionamento da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial em hepatócitos isolados de rato foi monitorada pelo consumo de oxigênio. A análise dos resultados mostrou uma clara inibição da cadeia de transporte de elétrons pelo composto, pois ocorreu diminuição na velocidade de consumo de oxigênio no estado 3 da respiração mitocondrial tanto com substratos do complexo I (glutamato + malato) quanto com substrato do complexo II (succinato), em todas as concentrações avaliadas (5 a 25 μM). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Zanoli et al., (2011), que avaliaram os efeitos da abamectina sobre mitocôndrias isoladas de fígado de rato.

Durante a biotransformação de xenobióticos no fígado, os metabólitos gerados podem ser ainda mais tóxicos que o composto de origem (IOANNIDES E LEWIS, 2004). De acordo com Zeng et al. (1996) em trabalho realizado com microsossomos extraídos de fígado de ratos, os principais metabólitos produzidos a partir da abamectina são o 3''-O- Desmetil B_{1a} (3''-ODMe B_{1a}), 24-Hidroxi metil B_{1a} (24-OHMe B_{1a}) e 26-Hidroxi metil B_{1a} (26-OHMe B_{1a}). Os autores apontam as isoformas do citocromo P450 3A e 1A1 como responsáveis pelo metabolismo da abamectina, sendo a produção do metabólito 3''-ODMe B_{1a}, realizada pela isoforma 3A, e a produção dos metabólitos 24-OHMe B_{1a} e 26-OHMe B_{1a} pela isoforma 1A1.

Portanto, para avaliar o efeito da biotransformação sobre a toxicidade da abamectina foram realizados experimentos com hepatócitos submetidos a um processo de incubação na ausência ou na presença de 100 μM de proadifen, um clássico inibidor das enzimas do citocromo P450 (BORT et al., 1998; ANDERS e MANNERING, 1996; MINGATTO et al., 2002; SOMCHIT et al., 2009) além das diferentes concentrações de abamectina (25 a 100 μM) por um período máximo de 120 minutos.

A biotransformação afetou o efeito da abamectina sobre o potencial de membrana mitocondrial, visto que foram observadas reduções significativas

neste parâmetro tanto em hepatócitos na ausência ou na presença de proadifen, porém, esse se tornou mais evidente em hepatócitos pré-incubados com o inibidor do citocromo P450, pois enquanto as células com metabolismo normal apresentaram efeitos apenas nas concentrações mais elevadas (75 e 100 μM), os hepatócitos com metabolismo inibido apresentaram toxicidade nas concentrações de 50, 75 e 100 μM de abamectina.

Ao inibir a cadeia de transporte de elétrons e a formação do potencial de membrana mitocondrial, é esperado que a abamectina reduzisse a concentração intracelular de ATP. Esse efeito foi observado em hepatócitos incubados ou não com proadifen. Em células com capacidade metabólica normal o fármaco reduziu as concentrações intracelulares de ATP desde os 60 minutos de incubação até o término (120 minutos) nas concentrações de 50, 75 e 100 μM apresentando comportamento tempo e dose-dependente. Já nos hepatócitos expostos ao proadifen as reduções nas concentrações intracelulares de ATP foram mais abruptas, pois logo aos 30 minutos do período experimental a adição de 100 μM de abamectina ao líquido de incubação provocou uma grande diminuição, e a partir daí nas coletas subsequentes todas as concentrações estudadas levaram a reduções significativas na concentração de ATP.

De acordo com Zanolli et al. (2011), a abamectina possui atividade inibidora sobre a enzima responsável pela síntese de ATP (F_0F_1 -ATPase) e o translocador de nucleotídeos de adenina (ANT) bloqueando assim a fosforilação oxidativa, no entanto os autores não observaram diminuições na formação do potencial de membrana mitocondrial, como encontrado neste trabalho.

A possível explicação para a dissipação no potencial de membrana provocado pela abamectina em hepatócitos isolados pode estar relacionada à ruptura da homeostase intracelular de Ca^{2+} (SKULACHEV, 1999). Quando os hepatócitos estão expostos à abamectina a partir da concentração de 25 μM , ocorre a ruptura da homeostase intracelular do íon. Ao ter sua concentração aumentada no citoplasma da célula a mitocôndria capta os excedentes por um

canal chamado uniporter (UP). Segundo BROOKES et al. (2004) a captação do íon pelo UP é dependente do potencial de membrana, portanto, o movimento de cargas devido à captação do cálcio consome o potencial de membrana formado.

Além disso, a disfunção mitocondrial induzida pela abamectina ao reduzir os níveis celulares de ATP pode ter promovido, em outras organelas como o retículo endoplasmático, a inativação das bombas responsáveis pela manutenção do gradiente iônico do Ca^{2+} no citoplasma. Invariavelmente, o resultado dessa inibição do sistema de transporte é a ruptura da homeostase intracelular do cálcio. O aumento das concentrações intracelulares de Ca^{2+} podem ativar proteases, fosfolipases e endonucleases dependentes do íon (TRUMP; BERZESKY, 1992).

A ativação de proteases e fosfolipases induzem a alterações no citoesqueleto e na membrana plasmática e esses processos, quando combinados, culminam em ruptura das interações citoesqueleto-membrana plasmática, ocasionando desestabilização da bicamada lipídica, formação de bolhas na superfície celular e em casos mais severos ruptura e necrose celular (NICOTERA et al., 1986; SAKAIDA et al., 1992; GORES et al., 1990).

As enzimas alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST) são reconhecidamente utilizadas como um indicativo de dano às células do parênquima hepático (KLAASSEN; EATON, 1991; KAPLOWITZ, 2001). De acordo com Grisham (1979), o efluxo dessas enzimas para o líquido de incubação de células em cultura indica que houve perda de integridade da membrana plasmática. Todavia essa não está associada apenas à lise ou morte das células, mas também a alterações reversíveis que aumentam sua permeabilidade (GRISHAN; SMITH, 1984).

A abamectina aumentou a concentração da ALT no líquido de incubação dos hepatócitos, e este efeito foi influenciado pela incubação das células com o proadifen, pois na ausência do inibidor houve liberação significativa da enzima apenas aos 90 minutos de incubação nas concentrações de 75 e 100 μM enquanto que a incubação dos hepatócitos com o inibidor proadifen provocou a

liberação significativa da enzima já aos 60 minutos na presença de abamectina 75 e 100 μM .

Com relação à liberação da AST, o efeito da abamectina foi semelhante pois em hepatócitos na ausência de proadifen, ocorreu aumento significativo na liberação da enzima nas concentrações de 50, 75 e 100 μM , apenas aos 90 e 120 minutos. As células na presença do inibidor mostraram uma redução em sua viabilidade já aos 30 e 60 minutos do processo de incubação após a adição de 100 e 75 μM do fármaco, respectivamente.

As alterações observadas nos padrões de liberação das enzimas ALT e AST no líquido de incubação podem ser um reflexo da influência exercida pela abamectina sobre a atividade mitocondrial. A diminuição da eficiência de produção de energia pela organela afeta funções celulares dependentes de energia, fato esse que pode ter acarretado a morte celular (NICOTERA et al., 1998; SZEWCZYK; WOJTCZAK, 2002; WALLACE; STARKOV, 2000).

Em estudos *in vivo* realizados por Lowenstein et al. (1996) e Hsu et al., (2001), a abamectina provocou a elevação da concentração da enzima aspartato transaminase (AST) no soro sanguíneo. Além desses trabalhos desenvolvidos *in vivo*, El-Shenawy (2010) publicou um estudo com hepatócitos isolados de rato, no qual realizou um comparativo da ação tóxica *in vitro* de alguns inseticidas, dentre eles a abamectina, utilizada nas concentrações de 10 e 100 μM . Os resultados obtidos por El-Shenawy (2010), mostraram aumento significativo das enzimas ALT e AST quando os hepatócitos foram incubados com abamectina 10 e 100 μM a partir dos 30 minutos de incubação, persistindo até os 120 minutos (período final da coleta das amostras).

Dentre os tipos de morte celular, estão a necrose e a apoptose. Sendo assim, nesse trabalho foram monitorados parâmetros relacionados a ambos os tipos de morte celular, tornando-se assim possível a distinção do processo de morte desencadeado pela abamectina em hepatócitos isolados.

A liberação do citocromo *c* e a ativação da caspase 3 são etapas determinantes da via intrínseca para o estabelecimento da apoptose (KASS et al., 1996; BARROS et al., 2003). Em ambos os parâmetros não foram

encontradas variações significativas que indicassem a indução da apoptose em hepatócitos expostos à abamectina.

A necrose é caracterizada por alterações que causam depleção do ATP, quebra do equilíbrio iônico, intumescimento mitocondrial e celular, além de ativação de enzimas degradativas, resultando em ruptura da membrana plasmática, perda de proteínas, metabólitos e íons intracelulares (EGUCHI et al., 1997; LEMASTERS et al., 1999; NICOTERA et al., 1998).

Após avaliações microscópicas, com a utilização do corante fluorescente iodeto de propídio, confirmou-se que a abamectina induz o estabelecimento do processo de necrose, sendo esta observada inicialmente aos 60 minutos do período experimental de maneira tempo e dose-dependente após a adição de 75 e 100 μM .

Além disso, esse estudo comprova que o metabolismo da abamectina, realizado pelas enzimas do citocromo P450 no fígado, influencia na sua toxicidade, pois em todas as variáveis analisadas onde havia a condição de inibição do processo de biotransformação houve um aumento em seu potencial tóxico, indicando que o fármaco tem maior potencial toxicológico do que seus metabólitos.

VII. CONCLUSÃO

O mecanismo de toxicidade da abamectina em hepatócitos isolados de rato consiste na diminuição da atividade mitocondrial, levando assim a reduções progressivas na produção de ATP e alterações na homeostase intracelular de cálcio, que somadas culminam na morte celular por necrose (Figura 27). Por fim, o processo de biotransformação, realizado pelas enzimas do citocromo P450, influencia na citotoxicidade exercida pelo fármaco.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.K., Avermectin. In: WEXLER, P. (Ed.). **Encyclopedia of Toxicology**. San Diego: Academic Press, 1998, p. 89–90.

ANDERS, M.W.; MANNERING, G.J. Inhibition of Drug Metabolism: Kinetics of the inhibition of the N-Demethylation of ethylmorphine by 2-Diethylaminoethyl 2,2-Diphenylvalerate HCl (SKF 525-A) and related compounds. **Mol. Pharmacol.**, v. 2, p. 319-327, 1966.

ANDRADE, S.F.; SANTARÉM, V.A. Endoparasitocida e ectoparasitocida. In: Andrade S.F. (ed.) **Manual Terapêutica Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2002. p.469-470.

APPAIX, F. et al. Rapid spectrophotometric method for quantification of cytochrome *c* release from isolated mitochondria or permeabilized cells revisited. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1457, p. 175-181, 2000.

AYRES, M.C.C.; ALMEIDA, M.A.O. **Considerações gerais sobre os anti-helmínticos**. In: SPINOSA H.S., GÓRNIAC S.L. & BERNADI M.M. (Ed.). **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

BARROS, L. F. et al. Apoptotic and necrotic blebs in epithelial cells display similar neck diameters but different kinase dependency. **Cell Death Differ.**, v.10, p. 687–697, 2003.

BASÍLIO J. **A revolucionária descoberta**. 2005. Disponível em:<
http://www.vaquejadas.com./index.php?fa.mat.infmatéria&mat_id=1168>.
Acesso em: 08 fev. 2005.

BOELSTERLI, U.A. Disruption of mitochondrial function and mitochondria-mediated toxicity. In: **MECHANISTIC toxicology: the molecular basis of how chemicals disrupt biological targets.** 2 ed., Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 357-389.

BORT , R. et al. Diclofenac toxicity to hepatocytes: a role for drug metabolism in cell toxicity. **The J. of Pharmacol. and Exp. Therap.**, v. 288, p. 65-72, 1998.

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. Natl. Acad. Sci. USA**, v.70, p.2837-2839, 1973.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 10, de 22 de fevereiro de 2008.** Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2008/res0010_22_02_2008.html>. Acesso em: 15 abr. 2012.

BROOKES, P.S. et al. Calcium, ATP and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. **Am. J. Physiol.**, v. 287, p. C817-C833, 2004.

BURG R.W. et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 15, p. 361-367, 1979.

BUTLER, W. H.; MATTOCKS, A. R.;BARNES, J. M. Lesions in the liver and lungs of rats given pyrrole derivatives of pyrrolizidine alkaloids. **J. Pathol.**, v.100, p.169–175, 1970.

CAIN, K.; SKILLETER, D.N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (Eds). **Biochemical Toxicology.** Oxford: IRL Press, p. 217-254, 1987.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. **Nature**, v. 175, p. 1120-1121, 1955.

CORWIN, R. M.. **Special therapy, Anthelmintic therapy** In: Current veterinary therapy, food animal practice. HOWARD J.M. & SMITH R.A. (Ed.). 4 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999.

COURTNEY, C.H.; ROBERSON, E.L.. Chemotherapy of parasitic disease. Antinematodal drugs. In: VETERINARY pharmacology and therapeutics. 7 ed., Ames: Iowa State University Press, 1995, p.916-922.

DANIELSON, P.B. The cytochrome P450 superfamily: Biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. **Curr. Drug Met.**, v. 3, p. 561-597, 2002.

DAUM, G. Lipids of mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 822, p. 1-42, 1985.

DU, C. et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome *c*-dependence caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**, v. 102, p. 33-42, 2000.

EGUCHI, Y.; SHIMIZU, S.; TSUJIMOTO, Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. **Cancer Res.**, v.57, p.1835–1840, 1997.

ELBETIEHA, A.; ISA DAAS, S. Assessment of antifertility activities of ABM pesticide in male rats. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, v.55, p. 307–313, 2003.

EL-SHENAWY, NAHLA S. Effects of insecticides fenitrothion, endosulfan and abamectin on antioxidant parameters of isolated rat hepatocytes. **Toxicol. Vitro**, v.24, p. 1148–1157, 2010.

FAUVION, W.A.; GORES, G.J. Death receptors in liver biology and pathobiology. **Hepatol.**, v. 29, p. 1-4, 1999.

FISHER, M. H.; MROZIK, H. Chemistry. In: CAMPBELL, W. C. (Ed), **Ivermectin and Avermectin**. Nova Iorque: Springer-Verlag., 1989. p. 1-23.

FORBES, A.B. A review of regional and temporal use of avermectinas in cattle and horses worldwide. **Vet. Parasitol.**, v. 48, p. 19-28, 1993.

FREY, T.G.; MANELLA, C.A. The internal structure of mitochondria. **Trends Biochem. Sci.**, v. 25, n. 7, p. 319-324, 2000.

GORES, G.J.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J.J. Plasma membrane bleb formation and rupture: a common feature of hepatocellular injury. **Hepatol.**, v. 11, p. 690-698, 1990.

GRISHAM, J.W. Use of hepatic cell cultures to detect and evaluate the mechanisms of action of toxic chemicals. **Int. Rev. Exp. Pathol.**, v. 20, p. 123–209, 1979.

GRISHAM, J.W.; SMITH, G.J. Predictive and mechanistic evaluation of toxic responses in mammalian cell culture systems. **Pharmacol. Rev.**, v. 36, p.1515, 1984.

GRYNKIEWICZ, G.; POENIE, M.; TSIEN, R.Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. **J. Biol. Chem.**, v. 260, p. 3440–3450, 1985.

GUGUEN-GUILLOUZO, C. Isolation and culture of animal and human hepatocytes. In: FRESHNEY, R.I., (Ed.). **Culture of epithelial cells**. New York: Wiley-Liss, p.197-223, 1992.

GUILLOUZO, A. Liver cell models in vitro toxicology. **Environ. Health Perspect.**, v. 106, suppl. 2, p. 511-532, 1998.

GUNTER, T.E. et al. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. **Am. J. Physiol.**, v. 267, p. C313-C339, 1994.

HALESTRAP, A.P. What is the mitochondrial permeability transition pore? **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 46, p. 821-831, 2009.

HALLEY, B.A. et al. Ivermectin and abamectin metabolism: differences and similarities. In HUTSON, D.H. et al. (Eds.); **Xenobiotics and Food-producing Animals: Metabolism and Residues**. Washington, DC: American Chemical Society: 1992. p. 203-216. (ACS Symposium Series, n.503)

HAYES, W.J.; LAWS, E.R. **Handbook of pesticide toxicology classes of pesticides**, 1. ed. New York: Academic Press Inc., 1990. v. 2, p. 3.

HERMAN, B. et al. Irreversible injury in anoxic hepatocytes precipitated an abrupt increase in plasma membrane permeability. **FASEB J.**, v. 2, p. 146-151, 1988.

HINCKS, J.R. et al. DNA cross-linking in mammalian cells by pyrrolizidine alkaloids: structure-activity relationships. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.111, p.90-98, 1991.

HSU, D.Z. et al. Abamectin effects on aspartate aminotransferase and nitric oxide in rats. **Toxicology**, v. 165, p. 189–193, 2001.

IOANNIDES, C. **Cytochromes P450: metabolic and toxicological aspects**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 1996. p. 432.

IOANNIDES, C. **Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics**. IOANNIDES, C. (Ed). 1 ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2002.

IOANNIDES, C.; LEWIS, D.F.V. Cytochromes P450 in the bioactivation of chemicals. **Curr. Topics in Med. Chem.**, v. 4, p. 1767-1788, 2004.

JAMES, L.P.; MEYEUX, P.R.; HINSON, J.A. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Drug Metab. Dispos.**, v. 31, p. 10647-10653, 2003.

JOHANSSON, I. et al. Ethanol-fasting- and acetone-inducible cytochromes P-450 in rat liver: regulation and characteristics of enzymes belonging to the IIB and IIE gene subfamilies. **Biochem.**, v. 27, p. 1925-1934, 1988.

KADENBACH, B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1604, n. 2, p. 77-94, 2003.

KAPLOWITZ, N. Drug-Induced Liver Disorders Implications for Drug Development and Regulation. **Drug Saf.**, v. 24, p. 483-490, 2001.

KASS, G.E.N et al. Chromatin condensation during apoptosis requires ATP. **Biochem. J.**, v. 318, p. 749-752, 1996.

KIM, J.S.; QIAN, T.; LEMASTERS, J.J. Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes. **Gastroenterol.**, v. 124, p. 494-503.

KLAASSEN, C.D., EATON, D.L. Principles of toxicology. In: AMDUR, M.O., DOULL, J., KLAASSEN, C.D. (Ed.), **Toxicology**, 4. ed. New York: McGraw-Hill, 1991, p. 12-49.

KROEMER, G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 304, p. 433-435, 2003.

LANKAS, G.R.; GORDON, L.R. Toxicology. In: CAMPBELL, W.C. (Ed.) **Ivermectin and Abamectin**. Nova York: Springer-Verlag, p. 102-107, 1989.

LEMASTERS, J.J. *V. Necrapoptosis* and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. **Am. J. Physiol.**, v. 276, p. G1-G6, 1999.

LEMASTERS, J.J. et al. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 31, p. 305–319, 1999.

LEWIS, D.F.V. **Cytochromes P450: structure, function and mechanism**. 1. ed. London: Taylor and Francis, 1996. p.348.

LOWENSTEIN, M. et al. Histology of the skin and determination of blood and serum parameters during the recovery phase of sarcoptic mange in cattle after avermectin (Ivomec) treatment. **Appl. Parasitol.**, v. 37, p. 77–86, 1996.

MAIOLI, M.A. et al. Cytotoxicity of monocrotaline in isolated rat hepatocytes: Effects of dithiothreitol and fructose. **Toxicol.**, v. 57, p.1057–1064, 2011.

MANNELA, C.A. Application of electron tomography to mitochondrial research. **Methods Cell Biol.**, v. 65, p. 245-256, 2001.

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.

McKELLAR, Q.A.; BENCHAOUI, H. Avermectins and milbemycins. **Journal Veterinary Pharmacology Therapy**, v.19, p. 331-351, 1996.

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. Cap. 20, p. 487-507.

MINGATTO, F.E. et al. Dehydromonocrotaline inhibits mitochondrial complex I. A potential mechanism accounting for hepatotoxicity of monocrotaline. **Toxicol.**, v. 50, p. 724–730, 2007.

MINGATTO, F.E. et al. The Critical Role of Mitochondrial Energetic Impairment in the toxicity of Nimesulide to Hepatocytes. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v. 303, p. 601-607, 2002.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. **Nature**, v.191, p.144-148, 1961.

MOLDÉUS, P.; HÖGBERG, J.; ORRENIUS, S. Isolation and use of liver cells. In: FLEISCHER, S., PACKER, L. **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press, v.52, p.60-71, 1978.

MOLENTO, M.B. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. **Vet. Parasitol.**, v. 163, p. 229–234, 2009.

MOORE, L.F. Dermatologic disease. External parasites. In: Corviw R.M. (ed.) **Current Veterinary Therapy, Food Animal Praticce**. 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999. p.731.

MOREADITH, R.W.; FISCKUM, G. Isolation of mitochondria from ascites tumor cells permeabilized with digitonin. **Anal. Biochem.**, v.137, p.360-367, 1984.

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. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. Traduzido por Arnaldo Antônio Simões. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. Cap. 19, p. 515-537.

NELSON, D.R. et al. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**, v. 6, p. 1-42, 1996.

NICOTERA, P. et al. The formation of plasma membrane blebs in hepatocytes exposed to agentes that increase cytosolic Ca^{2+} is mediated by the activation of a nonlysosomal proteolytic system. **FEBS Lett.**, v. 209, p. 139-144, 1986.

NICOTERA, P.; LEIST, M.; FERRANDO-MAY, E. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. **Toxicol. Lett.**, v. 102-103, p. 139-142, 1998.

NOBMANN, S.; BAUER, B.; FRICKER, G. Ivermectin excretion by isolates functionally intact brain endothelial capillaries. **Brit. J. Pharmacol.**, v. 132, p. 722-728, 2001.

OGA, S. (ed) **Fundamentos de toxicologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2008, Inc., 2008. Volume I. Cap. 1.2: Toxicocinética., p. 11-25.

PAN, L.C. et al. COR pulmonale is caused by monocrotaline and dehydromonocrotaline but not by glutathione or cysteine conjugates of dihydropyrrolizine. **Toxicol. Appl. Pharmacol**, v.118, p.87-97, 1993.

PEDERSEN, P. L. Mitochondrial events in the life and death of animal cells: A brief overview. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 31, p. 291-304, 1999.

PETRY, T.W. et al. Characterization of hepatic DNA damage induced in rats by the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline. **Cancer Res.**, v. 44, p.1505-1509, 1984.

PLAA, G.L.; HEWITT, W.R. Detection and evaluation of chemically induced liver injury. In: HAYES, W. **Principles and Methods of Toxicology**. New York: Raven Press, 1982. p. 407–445.

POLLACK, A.; CIANCIO, G. Cell cycle phase-specific analysis of cell viability using Hoechst 33342 and propidium iodide after ethanol preservation. In: Z Darzyn Kiewin and HA Crissman (Eds). **Flow Cytometer**, San Diego: Academic Press, p. 19-24, 1991.

R.T. Meister (Ed.), **Farm Chemicals Handbook '92**, Meister Publishing Company, Willoughby, OH (1992).

RASOLA, A. et al. Signal transduction to the permeability transition pore. **FEBS Lett.**, v. 584, p. 1989-1996, 2010.

RAUCY, J.L. et al. Acetaminophen activation by human liver cytochromes P450IIE1 and P450IA2. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 271, p. 449-458, 1989.

RIET-CORREA, F. **Comunicação pessoal** (Hospital Veterinário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB), 2006.

ROUILLER, C.H. Experimental toxic injury of the liver. In: Rouiller CH, ed. **The liver**, New York, Academic Press, v.II, p.335-476, 1964.

SAHU, S.C. **Hepatotoxicity: from genomics to *in vitro* and *in vivo* models**. 1. ed. Hoboken: John Wiley and Sons Inc., 2007. 704 p.

SAKAIDA, I.; THOMAS, A.P.; FARBER, J.L. Phospholipid metabolism and intracellular Ca^{2+} homeostasis in cultured rat hepatocytes intoxicated with cyanide. **Am. J. Physiol.**, v.263, p. C684-C690, 1992.

SANTOS, A. B. et al. Dehydromonocrotaline induces cyclosporine A-insensitive mitochondrial permeability transition/cytochrome c release. **Toxicon**, p. 1-7, 2009.

SCHEFFLER, I.E. **Mitochondria**. 2. ed. Hoboken: John Wiley and Sons Inc., 2008. 378 p.

SCHOENTAL, R. Liver Disease and "natural" hepatotoxins. **Bull. World Health Organ.**, v.29, p.823-833, 1963.

SEIXAS, J.N. et al. Aspectos clínicos e patogênicos da intoxicação por abamectina em bezerros. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 26, p.161-166, 2006.

SHOOP, W.; MROZIK, H.; FISHER, M. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. **Vet. Parasitol.**, v.59, p. 139–156, 1995.

SHOOP, W.L.; SOLL, M. Chemistry, pharmacology and safety of the macrocyclic lactones. In: VERCRUYSSSE-J; REW-RS (ed.), **Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy**. CAB International, Wallingford, UK, p. 1-29, 2002.

SINDAN (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos Para Saúde Animal) 2007. **Compêndio de Produtos Veterinários**. Disponível em <<http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html>> Acesso em: 28 nov. 2010.

SKULACHEV, V.P. Mitochondrial physiology and pathology: concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. **Mol. Aspects Med.**, v. 20, p. 139-184, 1999.

SOMCHIT, N. et al. Effects of Cytochrome P450 Inhibitors on Itraconazole and Fluconazole Induced cytotoxicity in Hepatocytes. **Journal of Toxicology**, v. 2009, p. 1-7, 2009.

SZEWCZYK, A.; WOJTCZAK, L. Mitochondria as a pharmacological target. **Pharmacol. Rev.**, v. 54, n. 1, p. 101-127, 2002.

THE EUROPEAN AGENCY FOR EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS. **Committee for Veterinary Medicinal Products**. Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/pdfs/vet/mrls/Abamectin1.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2010.

THUMMEL, K.E. et al. Oxidation of acetaminophen to *N*-acetyl-*p*-aminobenzoquinone imine by human CYP3A4. **Biochem. Pharmacol.**, v. 45, p.1563-1569, 1993.

TOLMAN, K.G.; SIRRINE, R.W. Occupational hepatotoxicity. **Clin. Liver Dis.**, v. 2, p.563, 1998.

TRACY, J.M.; WEBSTER, L.T.J.R. Drugs used in the chemotherapy of helminthiasis, p.1131-1133. In: HARMAN J.G., LIMBIRD L.E & GILMAN G.A. (ed.) **The pharmacological basis of therapeutics**. 10. ed. New York: Goodman & Gilman's, 2001.

TRUMP, B.F, BERZESKY, I.K. The role of cytosolic Ca²⁺ in cell injury, necrosis and apoptosis. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 4, p.227-232, 1992.

TSOKOS-KUHN, J.O. et al. Alkylation of the liver plasma membrane and inhibition of the Ca²⁺ ATPase by acetaminophen. **Biochem. Pharmacol.**, v. 37, p. 2125-2131, 1988.

VAN GURP, M. et al. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 304, n. 3, p. 487-497, 2003.

WALLACE, K.B.; STARKOV, A.A. Mitochondrial targets of drug toxicity. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 40, p. 353-388, 2000.

WIDLAK, P.; GARRARD, W.T. Discovery, regulation and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. **J. Cell Biochem.**, v. 94, p. 1078-1087, 2005.

WILLIAMS, P.L.; JAMES, R.C.; ROBERTS, S.M. **Principles of toxicology: environmental and industrial applications**. 2. ed. Nova Iorque: John Wiley &

Sons, Inc., 2000. 603. cap. 3: Biotransformation: A Balance between Bioactivation and Detoxification. p.57.

WILSON, D. W. et al. Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 22, p. 307–325, 1992.

ZANOLI, J.C.C. et al. Abamectin affects the bioenergetics of liver mitochondria: A potential mechanism of hepatotoxicity. **Toxicology in Vitro**, v. 26, p. 51-56, 2011.

ZENG, Z. et al. Role of cytochrome P450 isoforms in the metabolism of abamectina and ivermectina in rats. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, p. 3374-3378, 1996.

ZIMMERMAN, H.J. Drug-induced liver disease. In: SCHIFF, E.R., SORREL, M.F., MADDREY, W.C., (Ed). **Diseases of the liver**, Philadelphia: JB Lippincott, p.973-1964, 1998.

ZOU, H. et al. Na APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional is a fundamental apoptosome that activates procaspase-9. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 11549-11556, 1999.