

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CAMPUS DE ARAÇATUBA

EFEITOS DA ABAMECTINA NA BIOENERGÉTICA

DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS

DE FÍGADO DE RATO

Juliana Carla Castanha Zanolli
Farmacêutica-Bioquímica

ARAÇATUBA - SP
2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CAMPUS DE ARAÇATUBA

EFEITOS DA ABAMECTINA NA BIOENERGÉTICA

DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS

DE FÍGADO DE RATO

Juliana Carla Castanha Zanolli

Orientador: Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP - Campus de Araçatuba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA - SP

2011

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Z33e

Zanoli, Juliana Carla Castanha.

Efeitos da abamectina na bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato / Juliana Carla Castanha Zanoli. - Araçatuba : [s.n.], 2011

79 f. : il. + 1 CD-ROM

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

Orientador: Prof. Fábio Erminio Mingatto

1. Abamectina 2. F_0 - F_1 ATPase 3. Fosforilação oxidativa
4. Mitocôndria 5. Síntese de ATP

CDD 636.0896

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO:

Efeitos da Abamectina Na Biogênese
de Mitocôndrias Isoladas de Fígado de Rato

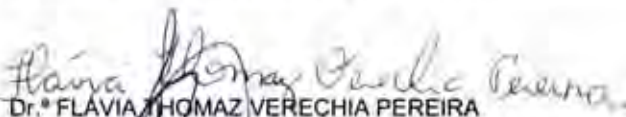
AUTORA:

JULIANA CARLA CASTANHA ZANOLI

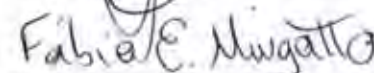
ORIENTADOR:

Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO

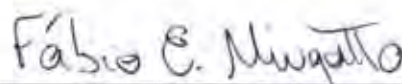
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.


Dr.ª FLÁVIA THOMAZ VERECHIA PEREIRA

Dr. TIAGO RODRIGUES


Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO

DATA DA REALIZAÇÃO: 08 de julho de 2011.



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

DADOS CURRICULARES

Juliana Carla Castanha Zanolí, graduada em Farmácia-Bioquímica, Modalidade Análises Clínicas, pela Universidade de São Paulo – USP – Ribeirão Preto (SP), em dezembro de 1997. Especialista em Terapia Floral, Homeopatia e Mestrado em Ciência Animal pela UNESP de Araçatuba (SP), na área de Área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, sob orientação do Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto, professor da disciplina de Bioquímica Animal e Química Geral do curso de graduação em Zootecnia da UNESP de Dracena. Atualmente é a farmacêutica responsável pela Farmácia de Manipulação FLORESSÊNCIA, situada à Rua Edson da Silveira Campos, n. 1042, CEP. 17900-000, Dracena (SP).

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original”.*

Albert Einstein

DEDICO:

*Ao meu esposo Renato, grande incentivador e exemplo
de Ser Humano e às nossas filhas Laís e Ana Luísa,
Tesouros Maiores concedidos por DEUS.*

AGRADEÇO

À DEUS, pelo Dom da Vida.

Aos Meus Pais Antônio e Sônia, pela oportunidade desta existência e ensinamentos transmitidos no decorrer dos anos, sempre visando o bem como objetivo final.

Ao Sr. Antenor e Sra. Elza, meu sogro e minha sogra, pelo apoio incondicional e cuidados dispensados às nossas filhas e ao meu marido, nas horas em que estive ausente.

Ao Professor Ass. Dr. Fábio Erminio Mingatto, exemplo de Pesquisador e Docente, pela oportunidade, confiança, acolhimento no meio científico, apoio em todos os momentos, ensinamentos transmitidos e principalmente pela amizade compartilhada.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e funcionários do Curso de Zootecnia da UNESP de Dracena, sem os quais esta dissertação não teria sido possível.

Muito Obrigada.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Objetivo.....	19
1.1.1 Objetivo geral.....	19
1.1.2 Objetivo específico.....	19
1.2 Hipótese.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 Avermectinas e Milbemicinas.....	20
2.1.1 Abamectina e ivermectina.....	23
2.1.2 Ações farmacológicas e toxicológicas.....	24
2.2 Mitocôndrias.....	28
2.2.1 Cadeia transportadora de elétrons ou cadeia respiratória.....	32
2.2.1.1 Complexo I.....	33
2.2.1.2 Complexo II.....	37
2.2.1.3 Complexo III.....	37
2.2.1.4 Complexo IV.....	40
2.2.1.5 Complexo V ou F ₀ F ₁ -ATPase.....	42
2.2.1.6 Fosforilação oxidativa	44
2.2.1.7 Desacopladores da fosforilação oxidativa.....	46
2.3 Generalidades Sobre o Fígado e Hepatotoxicidade	46
3 MATERIAL E MÉTODO.....	48
3.1 Avaliação Ética.....	48
3.2 Animais.....	48
3.3 Reagentes.....	48
3.4 Abamectina.....	48
3.5 Isolamentos de Mitocôndrias Intactas e Preparação de Mitocôndrias Rompidas.....	49
3.6 Determinações das Proteínas Mitocondriais.....	49
3.7 Determinação do Consumo de Oxigênio.....	50
3.8 Determinações das Atividades das Enzimas Relacionadas à Cadeia Respiratória Mitocondrial (NADH Desidrogenase e Succinato	

Desidrogenase).....	50
3.9 Determinação do Potencial Elétrico de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi$).....	51
3.10 Quantificação de ATP Mitocondrial.....	51
3.11 Determinação da Atividade da F_0F_1 -ATPase Mitocondrial.....	52
3.12 Determinação da Despolarização do Potencial de Membrana Induzida por ADP.....	52
3.13 Análise Estatística	53
4 RESULTADOS	54
4.1 Efeitos da Abamectina Sobre a Velocidade de Consumo de Oxigênio no Estado 3 em Mitocôndrias Isoladas de Fígado de Rato	54
4.2. Efeitos da Abamectina Sobre a Atividade das Enzimas NADH Desidrogenase e Succinato Desidrogenase	58
4.3 Efeitos da Abamectina Sobre o Potencial Elétrico de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi$).....	60
4.4. Efeitos da Abamectina Sobre a Síntese de ATP.....	61
4.5. Efeitos da Abamectina Sobre a Atividade da F_0F_1 -ATPase	61
4.6 Efeitos da Abamectina Sobre a Despolarização do Potencial de Membrana ($\Delta\Psi$) Induzida por ADP.....	63
5 DISCUSSÃO	64
6 CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	68
ANEXO.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\Delta\Psi$	Potencial elétrico de membrana mitocondrial interna
Aba	Abamectina
ADP	Adenosina 5'-difosfato
ANT	Translocador de ADP/ATP
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ATR	Atractilosídeo
BSA	Albumina de soro bovino
cATR	Carboxiatractilosídeo
CCCP	Carbonilcianeto- <i>m</i> -clorofenilhidrazona
Da	Dalton
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- <i>p</i> -trifluormetoxifenilhidrazona
FMN	Flavina mononucleotídeo (forma oxidada)
FMNH[•]	Radical semiquinona
FMNH₂	Flavina mononucleotídeo (forma reduzida)
G	Força gravitacional
GABA	Complexo receptor do ácido gama-aminobutírico
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
mg	Miligrama
mM	Milimolar
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
O⁻	Radical superóxido
O₂	Oxigênio molecular
O₂²⁻	Radical peróxido
OH[•]	Radical hidroxila
Oligo	Oligomicina
pH	Potencial hidrogeniônico
Pi	Fosfato inorgânico
Q ou UQ	Coenzima Q ou Ubiquinona
QH₂ ou UQH₂	Coenzima Q reduzida ou Ubiquinona reduzida ou Ubiquinol
QH⁻ ou UQH⁻	Semi Ubiquinona ou ânion semiquinona
TCA	Ácido tricloroacético
TMPD	N,N,N,N-tetrametil-p-fenileno-diamina
Tris	Tris-(hidroximetil) amino metano
μL	Microlitro
μM	Micromolar

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1- Estruturas químicas das milbemicinas.....	20
FIGURA 2- Estruturas químicas das avermectinas naturais.....	21
FIGURA 3- Sobreposição das moléculas de milbemicina D e avermectina B _{1a}	22
FIGURA 4- Estruturas químicas das abamectinas e ivermectinas.....	23
FIGURA 5- Representação simplificada da lançadeira malato- aspartato.....	30
FIGURA 6- Representação da lançadeira glicerol-3-fosfato.....	31
FIGURA 7- Translocador de ADP/ATP (1) e fosfato translocase (2)..	32
FIGURA 8- Modelo esquemático do fluxo de elétrons, provenientes do NADH ou do succinato, por meio dos complexos I, II, III e IV da cadeia respiratória, até o oxigênio.....	33
FIGURA 9- Complexo I (NADH-ubiquinona óxido-redutase).....	34
FIGURA 10- Estruturas químicas da flavina mononucleotídeo.....	34
FIGURA 11- Representação do centro ferro-enxofre do tipo Fe ₄ -S ₄	35
FIGURA 12- Representação das formas da coenzima Q.....	36
FIGURA 13- Complexo II (succinato-ubiquinona óxido-redutase).....	37
FIGURA 14- Modelo representativo do ciclo Q.....	39
FIGURA 15- Complexo IV (citocromo c oxidase).....	41
FIGURA 16- F ₀ F ₁ -ATPase.....	43
FIGURA 17- Esquema representativo do transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa.....	44
FIGURA 18- Efeitos da abamectina no estado 3 da respiração em mitocôndrias (1 mg/mL) isoladas de fígado de rato, energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM.....	54
FIGURA 19- Efeitos da abamectina no estado 3 da respiração em mitocôndrias (1 mg/mL) isoladas de fígado de rato, energizadas com succinato 5 mM (acrescido de rotenona 2,5 µM).....	55
FIGURA 20- Efeito da abamectina (Aba) 25 µM na respiração de estado 4, evidenciada após o consumo total de ADP em	

	mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1 mg/mL).....	56
FIGURA 21-	Efeito do CCCP (1 μ M) sobre o consumo de oxigênio de mitocôndrias (1 mg/mL) isoladas de fígado de rato energizadas com succinato 5 mM, inibido pela oligomicina (Oligo) 1 μ g/mL, atractilosídeo (ATR) 1 μ M ou abamectina (Aba) 25 μ M.....	57
FIGURA 22-	Efeitos da oligomicina (Oligo) 1 μ g/mL, atractilosídeo (ATR) 1 μ M ou abamectina (Aba) 25 μ M e KCN 1 μ M no consumo de oxigênio de mitocôndrias (1 mg/mL) isoladas de fígado de rato, energizadas com succinato 5 mM e desacopladas por CCCP 1 μ M.....	58
FIGURA 23-	Efeitos da abamectina (Aba) na atividade da enzima NADH desidrogenase em mitocôndrias rompidas (0,2 mg/mL) isoladas de fígado de rato.....	59
FIGURA 24-	Efeitos da abamectina (Aba) na atividade da enzima succinato desidrogenase em mitocôndrias rompidas (0,2 mg/mL) isoladas de fígado de rato.....	59
FIGURA 25-	Efeitos da adição de abamectina (Aba) 25 μ M, oligomicina (Oligo) 1 μ g/mL ou atractilosídeo (ATR) 1 μ M no potencial de membrana ($\Delta\Psi$) em mitocôndrias (1 mg/mL) isoladas de fígado de rato, energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM.....	60
FIGURA 26-	Efeitos da abamectina e oligomicina (Oligo) 1 μ g/mL na síntese mitocondrial de ATP.....	61
FIGURA 27-	Efeitos da abamectina e oligomicina 4 μ g/mL na atividade da enzima F_0F_1 -ATPase em mitocôndrias intactas (1 mg/mL) isoladas de fígado de rato e desacopladas com CCCP 1 μ M.....	62
FIGURA 28-	Efeitos da abamectina e oligomicina 4 μ g/mL na atividade da enzima F_0F_1 -ATPase em mitocôndrias rompidas (0,25 mg/mL) isoladas de fígado de rato.....	62
FIGURA 29-	Efeitos da abamectina sobre a despolarização do potencial de membrana ($\Delta\Psi$) induzida pelo ADP em	

mitocôndrias isoladas de fígado de rato.....	63
--	----

EFEITOS DA ABAMECTINA NA BIOENERGÉTICA DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO

RESUMO - Abamectina é uma lactona macrocíclica pertencente à família das avermectinas, utilizada mundialmente como agente antiparasitário em animais de criação e estimação, além do emprego agrícola como princípio ativo dos inseticidas e nematicidas. Mitocôndrias são responsáveis pela conversão da energia liberada pelo transporte de elétrons e armazenamento como energia de ligação na molécula de ATP, um componente metabólico essencial. Interferências em sua síntese ou utilização caracterizam mecanismos pelos quais os xenobióticos podem expressar toxicidade aguda ou crônica. Neste trabalho, os efeitos da abamectina na bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato foram avaliados. Nas concentrações utilizadas (5 a 25 μM), abamectina causou inibição da cadeia respiratória, sem afetar a atividade das enzimas NADH desidrogenase, succinato desidrogenase e o potencial de membrana, comportando-se de maneira semelhante à oligomicina e ao atractilosídeo. A principal atuação da abamectina foi reduzir o potencial mitocondrial de fosforilação oxidativa, diminuindo os níveis de ATP provavelmente como resultado de sua ação direta sobre a F_0F_1 -ATPase, uma vez que inibiu a atividade desta enzima, e/ou sobre o translocador de ADP/ATP. A inibição mais acentuada da atividade fosfohidrolase em mitocôndrias intactas desacopladas do que em mitocôndrias rompidas juntamente com a inibição da despolarização do potencial de membrana induzida pelo ADP sugerem que a abamectina atuou inibindo mais especificamente o translocador de ADP/ATP do que a F_0F_1 -ATPase.

Palavras-chave: abamectina, F_0F_1 -ATPase, fosforilação oxidativa, mitocôndria, respiração mitocondrial, síntese de ATP.

EFFECTS OF ABAMECTIN IN THE BIOENERGETICS OF ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA

SUMMARY - Abamectin is a macrocyclic lactone belonging to the avermectin family, used worldwide as antiparasitic agent in farm animals and pets, and agricultural employment as the active ingredient of insecticides and nematicides. Mitochondria are responsible for converting the energy released by electron transport and storage as the binding energy molecule ATP, an essential metabolic component. Interference in its synthesis or utilization characterize mechanisms by which xenobiotics can express acute or chronic toxicity. In this study, the effects of abamectin in the bioenergetics of mitochondria isolated from rat liver were evaluated. At the concentrations used (5-25 mM), abamectin caused inhibition of the respiratory chain without affecting the activity of enzymes NADH dehydrogenase, succinate dehydrogenase and the membrane potential, behaving similarly to oligomycin and Atractyloside. The main activity of abamectin was to reduce the potential of mitochondrial oxidative phosphorylation, decreasing ATP levels probably as a result of its direct action on the F_0F_1 ATPase, since it inhibited the activity of this enzyme, and/or the ADP/ATP translocator. The more pronounced inhibition of the fosfohydrolase activity in intact uncoupled mitochondria than in disrupted mitochondria, in addition to the inhibition of the ADP-stimulated depolarization of mitochondrial membrane potential suggest that abamectin acted more specifically by inhibiting the ADP/ATP translocator than the F_0F_1 -ATPase.

Keywords: abamectin, F_0F_1 -ATPase, mitochondria, oxidative phosphorylation, mitochondrial respiration, ATP synthesis.

1 INTRODUÇÃO

As parasitoses gastrintestinais, provocadas por endo e ectoparasitas, estão amplamente disseminadas na pecuária, desencadeando perdas na produtividade da bovinocultura brasileira. Animais com idade entre 5 e 18 meses são os mais acometidos, resultando em prejuízos econômicos (BIANCHIN et al., 1996).

Os parasiticidas mais utilizados e comercializados são as lactonas macrocíclicas, representadas pelo grupo das avermectinas (abamectina, ivermectina) e milbemicinas (SILVERS; FUENTEALBA, 2003). As avermectinas se destacam uma vez que apresentam maior número de produtos comerciais para todas as espécies animais. Há no Brasil, apenas para a abamectina, mais de 50 marcas comerciais disponíveis de diferentes laboratórios (SINDAN, 2007).

A abamectina é obtida pela fermentação natural do *Streptomyces avermitilis*, sendo composta por uma mistura de avermectinas, com concentração $\geq 80\%$ da avermectina B_{1a} e $\leq 20\%$ de avermectina B_{1b} (AGARWAL, 1998). Em 1985, foi introduzida no mercado como inseticida e antiparasitário (TAYLOR, 2001). Atualmente, é usada em vários países como agente antiparasitário em animais de criação como princípio ativo de nematicidas e inseticidas de uso agrícola (KOLAR et al., 2008).

A abamectina fez parte da lista dos componentes ativos propostos para reavaliação pela ANVISA conforme Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 10, de 22 de fevereiro de 2008. Estudos realizados evidenciaram resultados preocupantes com referência à toxicidade aguda e suspeita de toxicidade reprodutiva deste princípio ativo e seus metabólitos (BRASIL, 2008). De acordo com Seixas et al. (2006), intoxicação por abamectina provocou em quatro anos a morte de 57 animais.

Devido à sua interposição entre o trato digestivo e a circulação geral do organismo, o fígado tem uma importante função no metabolismo e na biotransformação de substâncias exógenas. Assim sendo, este órgão recebe grandes quantidades de nutrientes e xenobióticos que são absorvidos por meio do trato digestivo e veia porta, tornando-se alvo de várias classes de toxicantes e toxinas naturais ou sintéticas (GUILLOUZO, 1998). Toxicidade hepática, a nível celular e molecular, pode ser decorrente da interação específica do toxicante com

um componente celular fundamental (mitocôndria, por exemplo) e conseqüente modulação de sua função (MEYER; KULKARNI, 2001).

A intoxicação por abamectina pode prejudicar a função dos hepatócitos. Pesquisa realizada por Hsu et al. (2001) evidenciou elevações dos níveis da enzima aspartato aminotransferase (AST) no soro após exposição de ratos Wistar à abamectina por gavagem, com doses entre 1 e 20 mg/kg de peso vivo. A atividade máxima foi obtida com a dose de 20 mg/kg de peso vivo 1 hora após a ingestão da droga.

Mitocôndrias são organelas responsáveis pela síntese da quase totalidade do ATP necessário à manutenção da estrutura e função celular por meio da fosforilação oxidativa. É um processo que envolve fluxo de elétrons, doados por substratos oxidáveis como nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo (FADH₂), por uma cadeia de transportadores localizados na membrana mitocondrial interna, denominada cadeia respiratória (Complexos I a IV). Os elétrons são transferidos ao O₂, reduzindo-o a H₂O, etapa denominada de respiração mitocondrial. Este fluxo de elétrons também fornece energia livre, que está acoplada ao transporte de prótons para o espaço intermembranas. O fluxo dos prótons transmembrana, no sentido dos seus gradientes de concentração, via canais protéicos específicos, fornece energia livre para a síntese do ATP, que é catalisada pelo complexo protéico localizado na membrana mitocondrial interna, denominado ATP sintase (F₀F₁-ATPase), capaz de acoplar o fluxo de prótons à fosforilação oxidativa (NELSON; COX, 2002).

Evidências experimentais indicam que a mitocôndria representa um alvo preferencial e crítico para a ação de drogas e toxinas (GARCIA et al., 2010; MINGATTO et al., 1996; 2007). Existem xenobióticos capazes de inibir o fluxo de elétrons pela cadeia transportadora de elétrons. Esta inibição provoca uma diminuição na transferência de prótons para o espaço intermembranas, comprometendo o funcionamento da enzima F₀F₁-ATPase (BOELSTERLI, 2007), além de inibir as vias metabólicas que dependem da cadeia para a reoxidação de coenzimas (MARZZOCO; TORRES, 2007). Portanto, compostos que interagem com as mitocôndrias prejudicando a eficácia do transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa, promovem grandes déficits de energia, levando à perda de funções vitais importantes para a sobrevivência das células e organismos.

A escolha do agrotóxico abamectina como objeto deste estudo foi motivada pelo uso extensivo na medicina veterinária e em várias culturas agrícolas, como componente ativo de inseticidas, acaricidas e nematicidas disponíveis comercialmente e pelo fato de que os estudos dos mecanismos de toxicidade da abamectina se restringem em sua grande maioria ao sistema nervoso central. Outro fato de grande importância é que a intoxicação por abamectina pode provocar perdas ao agronegócio, devido à queda no desempenho produtivo dos animais ou até mesmo a perda de animais por morte.

1.1 Objetivo

1.1.1 Objetivo geral

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

1.1.2 Objetivo específico

Avaliar os efeitos da abamectina no consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas de fígado de rato (respiração mitocondrial); nas atividades das enzimas NADH desidrogenase e succinato desidrogenase presentes na cadeia respiratória nos complexos I e II, respectivamente; no potencial elétrico transmembrana ($\Delta\Psi$); na atividade da enzima F_0F_1 -ATPase mitocondrial; na síntese de ATP e na despolarização do potencial de membrana induzida por ADP.

1.2 Hipótese

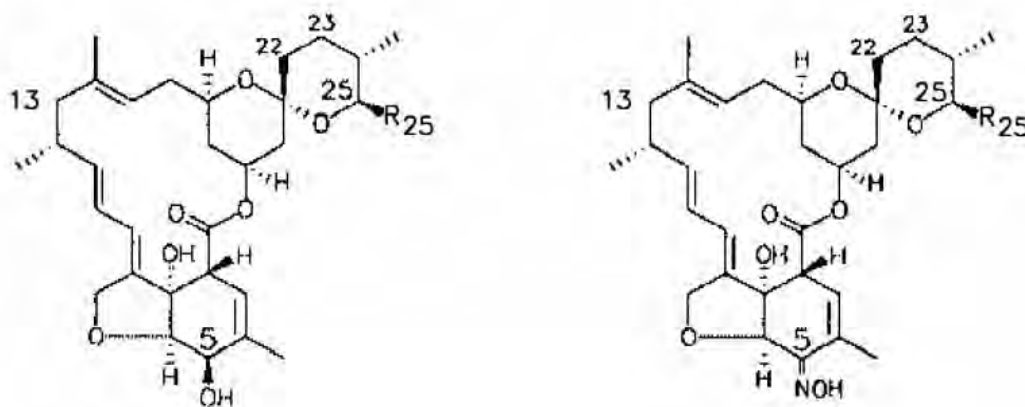
A abamectina afeta a bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato diminuindo a síntese de ATP e comprometendo a função celular.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Avermectinas e Milbemicinas

As avermectinas e milbemicinas são lactonas macrocíclicas produzidas pela fermentação de actinomicetos do gênero *Streptomyces* presentes no solo. Com atividades biológicas semelhantes, revolucionaram o controle antiparasitário e antipesticida durante a última década (SHOOP; MROZIK; FISHER, 1995).

As milbemicinas (Figura 1) (*milb*=ácaro + *myc*=fungo + *in*=produto farmacêutico) foram descobertas em 1973, por cientistas da Sankyo, com função acaricida e inseticida, visando proteger as culturas (SHOOP; MROZIK; FISHER, 1995). São produzidas pela fermentação de *Streptomyces hygroscopicus* e *Streptomyces cyanogriseus*, sendo a milbemicina D e a moxidectina, integrantes principais desta classe de fármacos (TAKIGUCHI et al., 1980).



Milbemicina α_1 (A_3) $R_{25} = CH_3$

Milbemicina α_3 (A_4) $R_{25} = CH_2CH_3$

Milbemicina D $R_{25} = CH(CH_3)_2$

Milbemicina Oxima $R_{25} = CH_3$ ou CH_2CH_3

FIGURA 1 - Estruturas químicas das milbemicinas (Fonte: FISHER; MROZIK, 1992).

O potencial químico das milbemicinas não foi explorado até a descoberta das avermectinas, com atividade acaricida, inseticida e nematocida, por cientistas do laboratório Merck, em 1975 (EGERTON et al., 1980; OSTLIND; CIFELLI; LANG, 1979). A adição desta última propriedade possibilitou uma nova oportunidade no tratamento de infecções por endoparasitas e infestações por ectoparasitas de animais e humanos (SHOOP; MROZIK; FISHER, 1995).

As avermectinas (*a*=sem + *verme*=verme + *ecto*=externo + *in*=produto farmacêutico) pertencem a uma família de 16 membros que apresentam semelhança estrutural aos antibióticos bacteriostáticos macrolídeos e anti-fúngicos polienos macrocíclicos. Apesar desta semelhança, não desempenham tais atividades (BURG et al., 1979; CAMPBELL et al., 1983; FISHER; MROZIK, 1989).

A fermentação de *Streptomyces avermitilis* produz oito tipos de avermectinas: A_{1a}, A_{1b}, A_{2a}, A_{2b}, B_{1a}, B_{1b}, B_{2a}, e B_{2b} (Figura 2), sendo que 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).

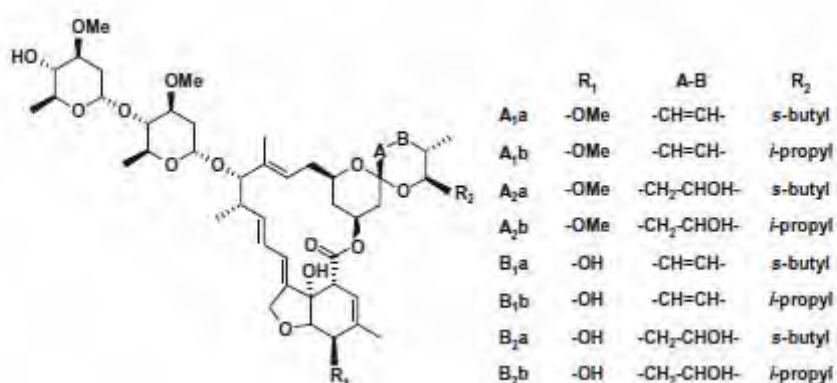


FIGURA 2 - Estruturas químicas das avermectinas naturais (Fonte: PITERNA et al., 2009).

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).

A diferença estrutural principal entre as avermectinas e as milbemicinas é a presença de um grupo dissacarídeo, encontrado no carbono de posição 13 do anel macrolídeo das avermectinas, sendo que esta posição não é substituída na milbemicina (FISHER; MROZIK, 1992). As estruturas moleculares são sobreponíveis (Figura 3), caracterizando as avermectinas como milbemicinas glicosiladas e as milbemicinas como avermectinas deglicosiladas (SHOOP; MROZIK; FISHER, 1995).

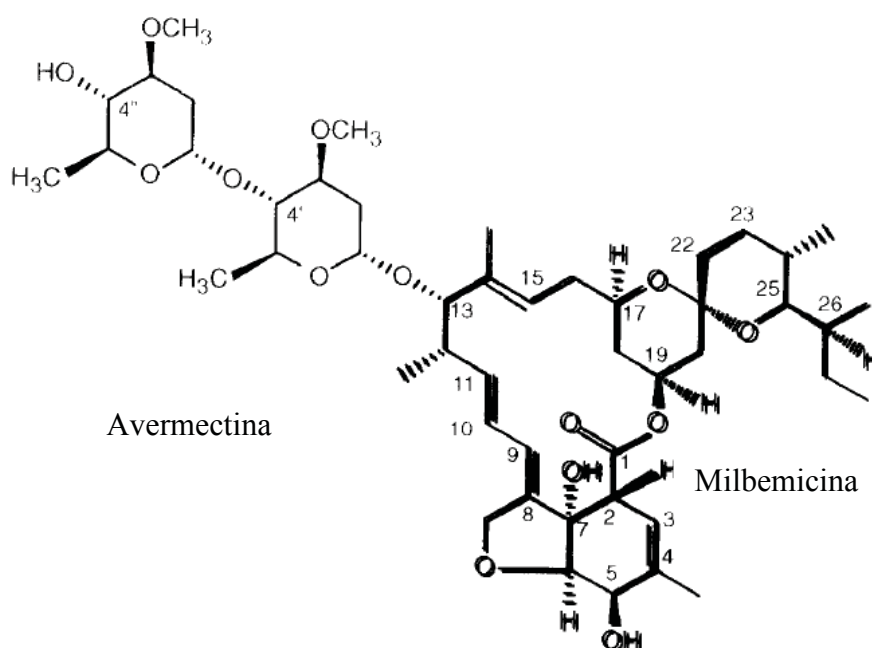


FIGURA 3 - Sobreposição das moléculas de milbemicina D e avermectina B_{1a} (SHOOP; MROZIK; FISHER, 1995).

O grupo das avermectinas é composto pela ivermectina, abamectina, doramectina, eprinomectina e selamectina (McKELLAR; BENCHAOUI, 1996).

isolaram amostras de solo japonês, localizado próximo a um campo de golfe em Kawana, Cidade de Ito, Shizuoka, Japão. O extrato de *Streptomyces avermectinius* presente na amostra mostrou ter atividade contra vermes parasitas em um modelo experimental empregando camundongos. O composto foi denominado avermectina. Estudos demonstraram, em 1975, a atividade da avermectina contra amplo número de vermes, aracnídeos e insetos, sendo os primeiros trabalhos sobre a avermectina e seus derivados (inclusive a ivermectina), publicados em 1979. A consagração da ivermetina ocorreu em 1981, com o lançamento do primeiro produto denominado Ivomec®, contendo este princípio ativo de amplo espectro, sendo empregado no uso veterinário (OMURA, 2007).

A ivermectina é eficaz contra uma ampla gama de endo e ectoparasitas (que acometem animais domésticos e selvagens) e sua alta potência permite formular formas farmacêuticas eficazes com diferentes apresentações, tais como administração oral, injeção subcutânea ou distribuição transdérmica tópica (FISHER; MROZIK, 1992). É a droga de escolha para bovinos, ovinos, caprinos, suínos e eqüinos, devido ao amplo espectro de ação, segurança clínica e eficácia (CAMPBELL; BENZ, 1984; CAMPBELL et al., 1983).

Em humanos, a ivermectina possui eficácia relevante no tratamento da esrongiloidose (GROVE, 1983) e atualmente, é a droga de escolha para a prevenção dos efeitos mais graves da infecção pelo nemátodo filarial *Onchocerca volvulus*, agente causador da doença oncocercose, conhecida também como cegueira de rio (TAYLOR; GREENE, 1989).

2.1.2 Ações farmacológicas e toxicológicas

Diversos compostos da família das lactonas macrocíclicas foram avaliados em ensaios de curto espectro de ação após o lançamento da ivermectina. Alguns apresentaram eficácia contra determinadas espécies de parasitos. Entretanto, o emprego de um composto que age apenas em uma espécie é desfavorável em relação a outro composto de amplo espectro. Assim sendo, princípios ativos eficientes contra o maior número possível de espécies de parasitos foram escolhidos (SHOOP; MROZIK; FISHER, 1995).

O mecanismo de ação das lactonas macrocíclicas ainda não foi elucidado. Esta dificuldade se deve às características das drogas, tais como, atuar em

diferentes organismos com sensibilidades distintas aos seus efeitos farmacológicos, exercer suas atividades em diversos locais de ação, bem como apresentar pouca solubilidade em soluções aquosas. Em experimentos distintos, respostas diversas foram encontradas. Ao injetar as avermectinas diretamente em *Ascaris suum*, ocorreu rápida paralisia sem rigidez e flacidez; na incubação com o nematóide vivo *Caenorhabditis elegans* ocorreu paralisia rígida e na incubação com *Haemonchous contortus*, não foram observados efeitos notáveis (TURNER; SCHAEFFER, 1989).

O primeiro mecanismo de ação proposto para as lactonas macrocíclicas sugere que estas drogas agem como agonistas do ácido gama amino butírico (GABA), aumentando a permeabilidade dos íons cloro (Cl^-), desencadeando paralisia muscular e eventual morte do parasito (ALBERT et al., 1986; MELLIN; BUSCH; WANG, 1983). Por este mecanismo, seria possível explicar porque as avermectinas não atuam sobre cestódeos e trematódeos uma vez que estes não possuem receptores GABA com alta afinidade para as avermectinas (SHOOP; MROZIK; FISHER, 1995).

O comportamento cinético da abamectina é semelhante ao comportamento descrito para várias formulações de ivermectinas. Entretanto, diferentes formulações de ivermectinas genéricas, quando administradas em bezerros, desencadeiam comportamentos cinéticos distintos, capazes de refletir na eficácia e persistência de suas atividades antiparasitárias. Assim sendo, faz-se necessário um controle de qualidade padronizado destas formulações endectocidas, contribuindo para um uso adequado e eficaz (LIFSCHITZ et al., 2004). A elucidação das vias pelas quais as avermectinas atingem os parasitos localizados no tubo gastrointestinal é importante para compreender a farmacodinâmica destas drogas (LIFSCHITZ et al., 1999).

Outras propostas para o mecanismo de ação das lactonas macrocíclicas também são sugestivas. Em 1987, Scott e Duce evidenciaram que, em gafanhotos *Schistocerca gregaria*, os feixes musculares específicos que receberam apenas inervação excitatória não sensíveis ao GABA, mostraram resposta irreversível à ivermectina. Outras pesquisas observaram que a ivermectina não atua em canais GABA e sim em outros canais de cloro diferentes, quando empregaram um modelo experimental com *Ascaris suum* (MARTIN; PENNINGTON, 1988).

As avermectinas possuem alto peso molecular e afinidade acentuada por gorduras corpóreas, além de um grande volume de distribuição (McKELLAR; BENCHAOUI, 1996). A baixa solubilidade destas em soluções aquosas faz com que

veículos que proporcionam lenta absorção (no local de aplicação da droga) sejam empregados na tentativa de solubilizá-las, contribuindo para um efeito residual prolongado (LO et al., 1985).

Em pesquisa realizada por Palma et al. (2006), na qual bovinos foram tratados com abamectina por via oral, detectou-se resíduos de abamectina em maiores concentrações nos tecidos do fígado (após sete dias de tratamento), depois nos tecidos de gordura, rim e por último, nas amostras de tecidos musculares.

As avermectinas, devido ao alto peso molecular, não atravessam facilmente a barreira hematoencefálica (BHE). Geralmente não causam efeitos tóxicos aos animais devido à dificuldade de atuarem no sistema nervoso central (COURTNEY; ROBERSON, 1995; LANKAS; GORDON, 1989). Casos de intoxicação podem ocorrer se a dose ingerida pelo animal, por exposição acidental ou administração contrária às recomendadas (MOORE, 1999), for capaz de penetrar a BHE (ANDRADE; SANTARÉM, 2002; MOORE, 1999). São fármacos contra-indicados em casos de doenças que causam danos à BHE (NOBMANN; BAUER; FRICKER, 2001; TRACY; WEBSTER, 2001), devendo ser empregadas com cuidado em pacientes que fazem uso de agentes depressores do sistema nervoso central (TRACY; WEBSTER, 2001). Bezerros com menos de quatro meses, roedores e coelhos gestantes são algumas espécies de animais que possuem maior susceptibilidade à intoxicação por fármacos desta família (LANKAS; GORDON, 1989).

Ratos são empregados em diversos experimentos uma vez que servem como bons modelos de laboratório para avaliar toxicidade animal, conforme estudos desenvolvidos por Halley et al. (1992). Os destinos metabólicos da abamectina e ivermectina foram avaliados em diferentes espécies animais. Ambas são metabolizadas pelas mesmas vias de maneira qualitativa em bovinos, suínos, ovinos e ratos. Nestes animais, os metabólitos principais incluem os derivados 24-hidroximetil (24-OHMe) ou 3"-O-desmetil (3"-ODMe). Metabólitos não identificados menos importantes também foram observados em ratos e provavelmente em alguns animais de outras espécies (HALLEY et al., 1992; MAYNARD; WISLOCKI; KU, 1989). Porém, as enzimas envolvidas ainda não foram descritas em qualquer espécie. Esta informação é útil para determinar a relevância de enzimas responsáveis pelo metabolismo em outros animais, inclusive em seres humanos (ZENG et al., 1996).

Estudo prévio realizado por Hsu et al. (2001) demonstrou que a abamectina provoca elevação da atividade sérica da enzima aspartato aminotransferase (AST). O aumento da concentração desta enzima reflete maior permeabilidade da membrana plasmática das células do parênquima hepático, revelando danos (PLAA; HEWITT, 1982), sendo utilizada dessa maneira, na detecção de efeitos deletérios ao fígado (KLAASSEN; EARTON, 1991). Ainda, Maioli et al. (2010) avaliaram os efeitos *in vitro* da abamectina sobre hepatócitos isolados de rato, com relação à viabilidade celular e parâmetros associados à bioenergética, e sugeriram que a abamectina desencadeia toxicidade aos hepatócitos, induzindo a liberação da alanina aminotransferase (ALT) e da aspartato aminotransferase (AST), além de afetar a síntese de ATP. A inibição da síntese de ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato exercida pela abamectina e observada neste estudo indica uma capacidade do fármaco em diminuir o potencial de fosforilação oxidativa.

Intoxicações decorrentes do uso da abamectina podem ocorrer em seres humanos. Estudos conduzidos por Chung et al. (1999) avaliaram, entre os meses de setembro a dezembro de 1997, dezoito pacientes intoxicados por abamectina e um único, por ivermectina. A exposição ocorreu na maioria dos casos devido à tentativa de suicídio, sendo a ingestão oral a via de exposição mais comum. Destes pacientes, quatro não apresentaram sintomas, oito manifestaram sintomas leves (após ingestão de 4,2 a 67 mg/kg de abamectina, com ingestão média de 23 mg/kg) após contato dérmico ou inalatório. Sintomas graves ocorreram em sete pacientes que receberam cuidados intensivos. Os principais sintomas foram coma, insuficiência respiratória e hipotensão (após ingestão média de 11,7 mg/kg de avermectina, sendo 15,4 mg/kg para ivermectina e 114,9 mg/kg de abamectina). Apenas um paciente veio a óbito por falência múltipla dos órgãos. Os autores concluíram que ingestão de doses elevadas de avermectinas pode desencadear sintomas graves e levar o indivíduo à morte.

Em 2009, Sung et al. relataram intoxicação provocada por ingestão de dose elevada de abamectina (414,2 mg/kg). Além da toxicidade ao sistema nervoso central (em altas doses, a abamectina é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica), a intoxicação aguda desencadeou quadro de coma, mioclonia e polineuropatia. As manifestações clínicas e severidade da intoxicação dependem da quantidade ingerida sendo, portanto, dose-dependentes, ou seja, quanto maior a dose ingerida, maior a severidade da intoxicação com risco de morte.

Estudo proposto por Andrew e Halley (1996) evidenciou que a ivermectina não é metabolizada no rúmen de ovinos e bovinos uma vez que nenhum metabólito foi detectado ao longo de 24 horas de incubações *in vitro* a 38°C, do componente H₂B_{1a} de ivermectina marcado com trítio, no fluído ruminal.

A presença de drogas antihelmínticas no leite dos animais submetidos a tratamento é um processo complexo que depende das características físico-químicas e interações de membranas, até obtenção de equilíbrio reversível da droga entre o leite e o plasma sangüíneo, caracterizando perfis similares entre estes dois compartimentos (HENNESSY; ALVINERIE, 2002). A partição de drogas hidrofóbicas nos componentes do plasma desempenha um papel fundamental na distribuição do fármaco pelo organismo. No plasma sangüíneo, 96% das lactonas macrocíclicas interagem com as lipoproteínas, sendo que 80 a 90% de ligam preferencialmente às lipoproteínas de alta densidade (HDL). A abamectina, em comparação com outras lactonas macrocíclicas, está associada às lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) (BASSISSI; ALVINERIE; LESPINE, 2004).

Em 2007, Cerkenvenik-Flajs et al. avaliaram a cinética da disposição de abamectina no plasma sangüíneo e no leite de ovelhas leiteiras após administração subcutânea, empregando a dose terapêutica, e concluíram que, para garantir a qualidade do leite ao consumidor, animais tratados com abamectina deveriam ser retirados da cadeia alimentar por um período de um mês após o tratamento.

Cerca de 5% da dose administrada de lactonas macrocíclicas são excretadas pelo leite devido às suas características farmacocinéticas. Assim sendo, é proibido o uso nas fêmeas em lactação que fornecerem produtos para o consumo humano. A recomendação para vacas gestantes é de uma administração em até 28 dias antes do parto (ALVINERIE et al., 1994).

2.2 Mitocôndrias

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

Os avanços em técnicas de microscopia eletrônica permitiram observar a organização interna das mitocôndrias. Palade (1952) e Sjöstrand (1956) foram os

primeiros autores a descrevê-las como estruturas compostas por sistemas de membranas (FREY; MANELLA, 2000). O conhecimento atual permite dizer que a mitocôndria é constituída por duas membranas distintas, denominadas membrana mitocondrial externa e interna, definindo dois compartimentos, o espaço intermembranas e a matriz mitocondrial (PIMENTEL, 2001).

A membrana mitocondrial externa possui superfície menor, sendo constituída principalmente por fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (DAUM, 1985). É permeável, permitindo a passagem dos substratos da cadeia respiratória (WALLACE; STARKOV, 2000), de pequenas moléculas ($M_r < 5000$) e íons que se deslocam facilmente por meio de canais transmembrana, formados por uma família de proteínas integrais denominadas porinas (NELSON; COX, 2002), dentre outros compostos.

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

A membrana mitocondrial interna é formada por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e cardiolipina (DAUM, 1985). É impermeável à maioria das moléculas pequenas e íons, sendo necessária a presença de transportadores específicos para que outras espécies químicas possam atravessá-la (NELSON; COX, 2002). É permeável ao oxigênio molecular, dióxido de carbono, óxido nítrico e água. Apresenta muitas invaginações ou cristas mitocondriais, recentemente reconstruídas tridimensionalmente, caracterizando grande complexidade (FREY; MANELLA, 2000). Nestas cristas, localizam-se os componentes da cadeia respiratória e a ATP sintase (NELSON; COX, 2002).

A membrana interna mitocondrial também é impermeável ao NAD^+ e NADH. A oxidação do NADH citosólico não pode ocorrer diretamente na cadeia transportadora de elétrons necessitando assim, de um sistema denominado lançadeira malato-aspartato. Neste sistema, o NADH proveniente do citosol transfere seus equivalentes redutores ao oxaloacetato citosólico, originando malato (em uma reação catalisada pela enzima malato desidrogenase citosólica), que atravessa a membrana mitocondrial interna e é oxidado a oxaloacetato, ao transferir seus

equivalentes redutores ao NAD^+ , formando NADH , pela ação da malato desidrogenase matricial (Figura 5) (NELSON; COX, 2002).

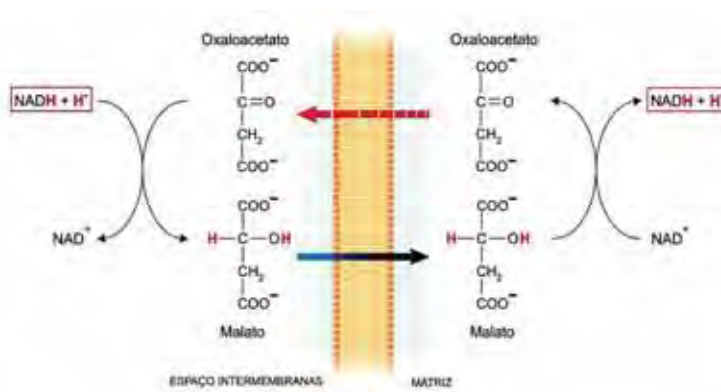


FIGURA 5 - Representação simplificada da lançadeira malato-aspartato. O malato é transportado para a matriz mitocondrial (seta azul) e o oxaloacetato é regenerado no citosol (seta vermelha tracejada) (Fonte: MARZZOCO; TORRES, 2007).

Nos músculos esqueléticos e cérebros de mamíferos, o NADH proveniente do citoplasma entra na cadeia respiratória localizada na membrana interna da mitocôndria por meio da lançadeira do glicerol-3-fosfato (Figura 6). Neste sistema, o NADH citosólico reduz diidroxiacetona fosfato a glicerol 3-fosfato, em uma reação catalisada pela enzima glicerol 3-fosfato desidrogenase, que contém FAD como grupo prostético. Em seguida, a diidrohdroxicetona é regenerada, produzindo FADH_2 , que doa seus elétrons à coenzima Q . Cada NADH origina apenas 2 ATP (MARZZOCO; TORRES, 2007).

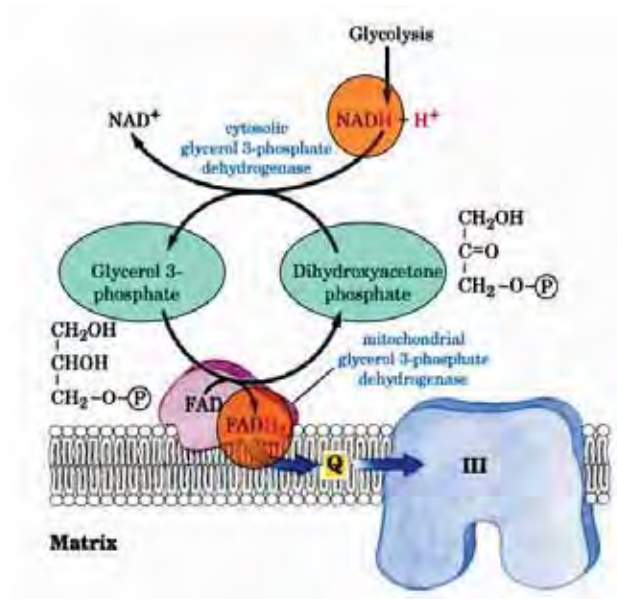


FIGURA 6 - Representação da lançadeira glicerol-3-fosfato (Fonte: NELSON; COX, 2002).

Outros compostos como ATP e ADP atravessam a membrana interna mitocondrial por meio de um sistema de transporte denominado adenina nucleotídeo translocase (ANT) ou translocador de ADP/ATP. Esta translocase é uma proteína de membrana muito abundante, correspondendo a 15% do conteúdo protéico da membrana mitocondrial interna e permite a troca de uma molécula de ATP da matriz mitocondrial por uma molécula de ADP proveniente do citosol. O ATP sintetizado, transportado ao citosol, será utilizado na maioria dos processos que consomem energia. Um composto capaz de inibir esta translocase é o atractilosídeo (glicosídeo tóxico extraído de uma espécie de erva daninha existente em pastagens), capaz de bloquear a fosforilação oxidativa por falta de substratos. Outra translocase muito importante é a fosfato translocase que catalisa o cotransporte (simporte) de fosfato inorgânico (P_i) e íons H^+ provenientes do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial. Estes dois sistemas (Figura 7) em conjunto fornecem os substratos ADP e P_i à ATP sintase, permitindo assim, a síntese de ATP (MARZZOCO; TORRES, 2007).

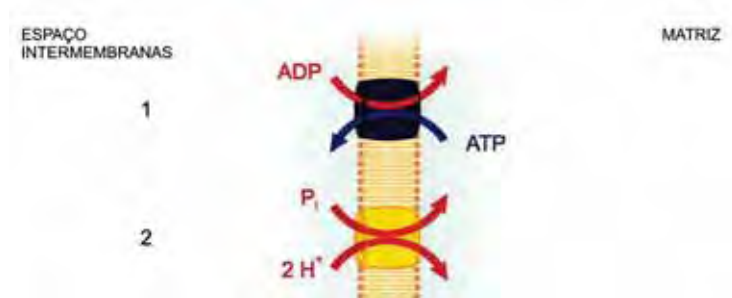


FIGURA 7 - Translocador de ADP/ATP (1) e fosfato translocase (2). (Fonte: MARZZOCO; TORRES, 2007).

A matriz mitocondrial contém ácidos nucleicos (PIMENTEL, 2001), enzimas pertencentes ao ciclo do ácido cítrico, a via da β -oxidação dos ácidos graxos, o complexo da piruvato desidrogenase e as vias de oxidação dos aminoácidos, exceto a glicólise, que ocorre no citosol (NELSON; COX, 2002).

Mitocôndrias são responsáveis pela conversão da energia liberada pelo transporte de elétrons e armazenamento como energia de ligação na molécula de ATP. Esta energia armazenada é utilizada pelas células para realizar trabalhos mecânicos, de transporte ou de biossíntese (MEYER; KULKARNI, 2001).

Em mamíferos principalmente, o mecanismo patogênico de algumas toxicidades envolve uma disfunção mitocondrial, especialmente se o órgão acometido for o fígado (AMACHER, 2005; SZEWCZYK; WOJTCZAK, 2002), diminuindo os níveis de ATP celulares, podendo desencadear morte celular por necrose ou apoptose (NICOTERA; LEIST; FERRANDO-MAY, 1998; SZEWCZYK; WOJTCZAK, 2002; WALLACE; STARKOV, 2000).

2.2.1 Cadeia transportadora de elétrons ou cadeia respiratória

A cadeia respiratória (Figura 8) é constituída por uma série de transportadores de elétrons (geralmente proteínas integrais de membrana) que atuam sequencialmente (NELSON; COX, 2002). Cada complexo apresenta diversas subunidades protéicas, associadas a grupos prostéticos capazes de aceitar ou doar um ou dois elétrons, tais como FMN, FAD, centros ferro-enxofre, grupos heme (presentes nos citocromos) e íons cobre (MARZZOCO; TORRES, 2007).

Os quatro complexos (I, II, III e IV) da cadeia respiratória se localizam nas cristas da membrana mitocondrial interna. Os complexos I e II catalisam a transferência de elétrons para a ubiquinona por meio de dois doadores diferentes: o NADH (complexo I) e o succinato (complexo II). O complexo III transporta os elétrons da ubiquinona ao citocromo c e o complexo IV, por sua vez, transfere os elétrons do citocromo c para um aceptor final, ou seja, o oxigênio, reduzindo-o à água (NELSON; COX, 2002).

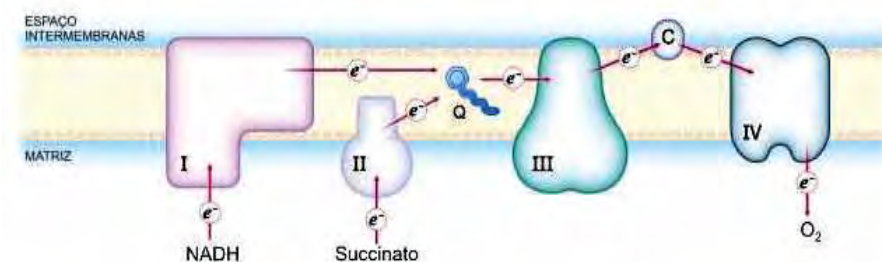


FIGURA 8 - Modelo esquemático do fluxo de elétrons, provenientes do NADH ou do succinato, por meio dos complexos I, II, III e IV da cadeia respiratória, até o oxigênio. C: citocromo c; Q: coenzima Q (Fonte: MARZZOCO; TORRES, 2007).

2.2.1.1 Complexo I

O complexo I, denominado NADH-ubiquinona oxido-redutase (Figura 9), está presente na cadeia respiratória mitocondrial e é constituído por um complexo estrutural enzimático, composto por 42 cadeias polipeptídicas diferentes (NELSON; COX, 2002).

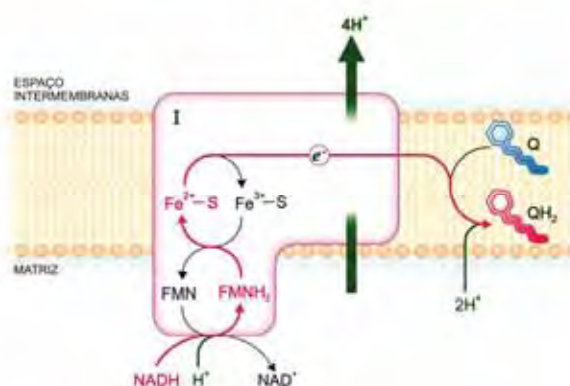


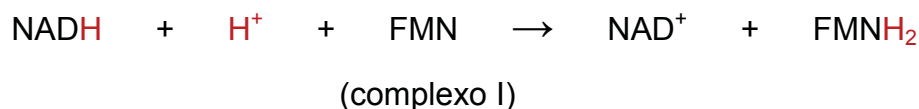
FIGURA 9 - Complexo I (NADH-ubiquinona óxido-redutase) (Fonte: MARZZOCO; TORRES, 2007).

O complexo I contém a FMN (flavina mononucleotídeo), um derivado da vitamina riboflavina, capaz de receber dois prótons e dois elétrons doados pelo NADH (proveniente de várias reações metabólicas), originando a forma reduzida FMNH₂. Este processo ocorre quando a forma oxidada do FMN reage com um próton e um elétron originando a forma semiquinona (FMNH[•]), um radical livre, que reage com mais um próton e um elétron, gerando a forma reduzida FMNH₂ (Figura 10) (MARZZOCO; TORRES, 2007).



FIGURA 10 - Estruturas químicas da flavina mononucleotídeo. A reação da forma oxidada (FMN) com um próton e um elétron origina a forma semiquinona (FMNH[•]) que incorpora mais um próton e um elétron, gerando a forma reduzida (FMNH₂) (Fonte: MARZZOCO; TORRES, 2007).

A reação processada na oxidação do NADH é:



A redução do FMN permite a passagem de um próton da matriz para o espaço intermembranas. Em seguida, os elétrons do FMNH₂ são transferidos aos centros ferro-enxofre e destes, para a ubiquinona ou coenzima Q, deixando o complexo I (MARZZOCO; TORRES, 2007).

Os centros ferro-enxofre (Fe-S) (Figura 11) são formados por íons de ferro e enxofre e estão presentes nos complexos I, II e III. Apresentam configurações variadas (Fe-S, Fe₂-S₂, Fe₄-S₄) e geralmente estão ligados aos resíduos de cisteína, presentes nas cadeias polipeptídicas. Estes centros não recebem prótons, sendo basicamente transportadores de elétrons que são recebidos e doados pelo íon ferro, cuja valência varia entre Fe³⁺ e Fe²⁺ (MARZZOCO; TORRES, 2007).

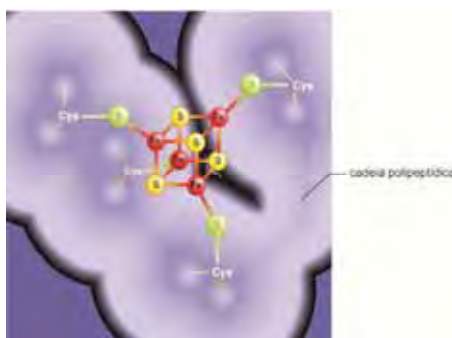


FIGURA 11 - Representação do centro ferro-enxofre do tipo Fe₄-S₄ (Fonte: MARZZOCO; TORRES, 2007).

A ubiquinona tem característica hidrofóbica, permitindo sua mobilidade na fase lipídica da membrana mitocondrial interna (MARZZOCO; TORRES, 2007). A ubiquinona recebe apenas um elétron inicialmente, originando um radical livre denominado semiquinona (FREITAS, 2006).

Posteriormente, este intermediário recebe outro elétron, gerando o ubiquinol (QH_2) (Figura 12). O fluxo dos dois elétrons para o ubiquinol permite o bombeamento de quatro H^+ da matriz mitocondrial para o espaço denominado intermembranas, compreendido entre a membrana mitocondrial interna e a externa. O complexo I contribui com a formação do gradiente de prótons, atuando como uma bomba de prótons movida pelas reações redox, uma vez que são retirados prótons da matriz e introduzidos no espaço intermembranas (MARZZOCO; TORRES, 2007).

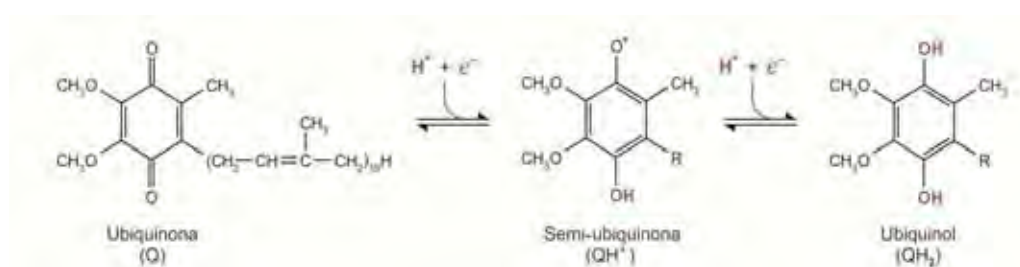


FIGURA 12 - Representação das formas da coenzima Q. Ao receber um próton e um elétron, a ubiquinona (Q) gera a semi-ubiquinona ($\text{QH}^\bullet$) que, ao reagir com mais um próton e um elétron, origina a forma reduzida ubiquinol (QH_2) (Fonte: MARZZOCO; TORRES, 2007).

O complexo I pode ser inibido por inibidores não específicos (compostos que inibem as desidrogenases) ou por inibidores específicos, que interagem com uma subunidade do complexo. Um desses inibidores específicos é a rotenona. A rotenona é um composto que ocorre naturalmente, altamente tóxico, muito utilizado como instrumento experimental para estudar o papel da mitocôndria na toxicidade de xenobióticos. Inibe seletivamente o complexo I (NADH: ubiquinona oxidoreductase), bloqueando a cadeia transportadora de elétrons e rapidamente depletando o fornecimento de energia celular. Sua característica comum é uma semelhança estrutural à ubiquinona (um aceptor fisiológico de elétrons), ou seja, contém uma cabeça cíclica e uma cauda hidrofóbica (BOELSTERLI, 2007).

Outros inibidores do complexo I, capazes de bloquear o transporte de elétrons do NADH para a ubiquinona, são o amital e o antibiótico piericidina A (ESPOSTI, 1998; LÜMMEN, 1998).

2.2.1.2 Complexo II

O complexo II (Figura 13) contém a enzima succinato desidrogenase, única enzima do ciclo de krebs ligada à membrana mitocondrial interna, responsável pela oxidação do succinato a fumarato, cujos elétrons e prótons passam para o FAD, reduzindo-o a FADH₂ (NELSON; COX, 2002). Os elétrons do FADH₂ passam pelos centros Fe-S, sendo transferidos à ubiquinona. Uma vez que os centros Fe-S não recebem prótons, estes são devolvidos à matriz mitocondrial (MARZZOCO; TORRES, 2007).

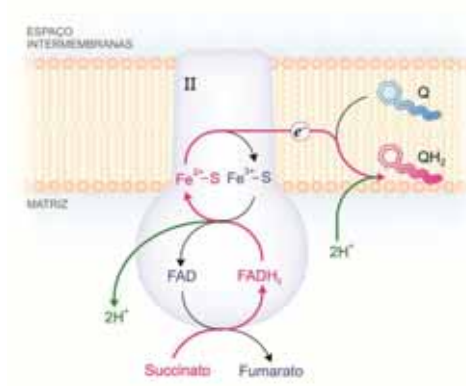


FIGURA 13 - Complexo II (succinato-ubiquinona óxido-redutase) (Fonte: MARZZOCO; TORRES, 2007).

De acordo com Luciani (1971), a estrutura química sintética 2-tenoiltrofluoroacetona é um inibidor específico do complexo II. Interage com um dos centros Fe-S do complexo II e bloqueia a transferência de equivalentes redutores a partir de FAD (MEYER; KULKARNI, 2001)

2.2.1.3 Complexo III

Neste complexo, denominado complexo dos citocromos *bc₁* ou ubiquinona-citocromo *c* oxidoreductase, o ubiquinol transfere seus elétrons para o citocromo *c*, com transporte de prótons da matriz para o espaço intermembranas. O citocromo *c* é

uma proteína solúvel e o seu grupo heme aceita um elétron do complexo III, movendo-se em direção ao complexo IV para doar o elétron a um centro de cobre binuclear nessa enzima (NELSON; COX, 2002).

O acoplamento do transporte de elétrons à translocação de prótons pelo complexo III ocorre em duas etapas (Figura 14), sendo denominado ciclo Q. Na primeira etapa, o ubiquinol (QH_2) perde um elétron e um próton, originando o radical semi-ubiquinona ($\text{QH}^\bullet$), sendo que o elétron segue o caminho $\text{QH}_2 \rightarrow \text{Fe-S} \rightarrow \text{citocromo } c_1 \rightarrow \text{citocromo } c$ e o próton H^+ é liberado no espaço intermembranas. O radical $\text{QH}^\bullet$ transfere seu elétron aos citocromos b e promove a extrusão do próton, convertendo-se em sua forma oxidada, a ubiquinona (Q), que se desloca ao sítio catalítico interno (seta pontilhada), recebendo novamente o elétron do citocromo b_{562} e reagindo com um H^+ da matriz, recuperando $\text{QH}^\bullet$. Na segunda etapa, outra molécula de ubiquinol realiza o mesmo trajeto descrito acima até a passagem do elétron para os citocromos b e formação de ubiquinona, que sai do complexo III e retorna à bicamada lipídica (seta pontilhada). Em seguida, o elétron é transferido do citocromo b_{562} para o radical $\text{QH}^\bullet$ formado na primeira etapa e regenera QH_2 , com consumo de um H^+ da matriz mitocondrial. A segunda molécula de citocromo c , ao se reduzir, promove a extrusão de mais dois H^+ , consome outro H^+ da matriz, regenera a molécula de QH_2 consumida e produz a forma oxidada, ubiquinona, capaz de receber novamente elétrons dos complexos da cadeia que a antecedem (MARZZOCO; TORRES, 2007).

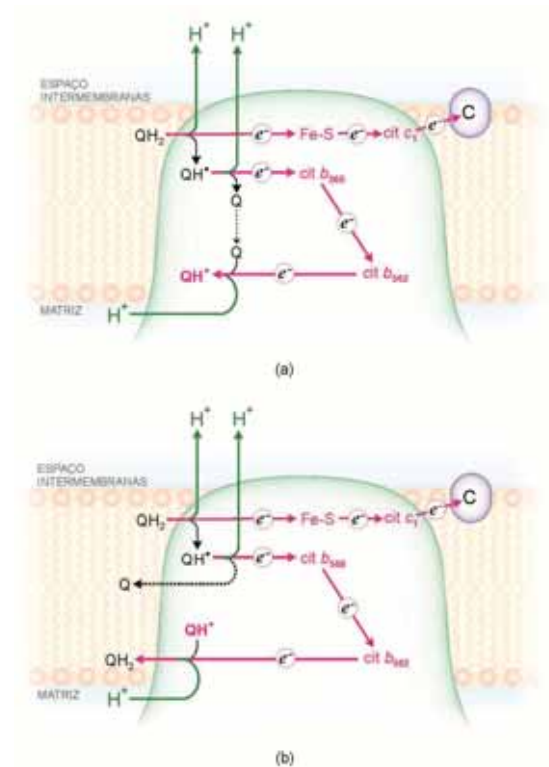
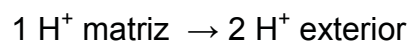
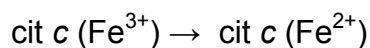
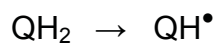


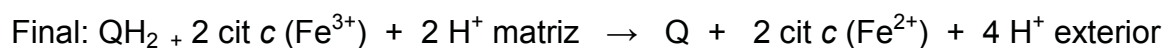
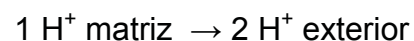
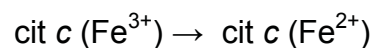
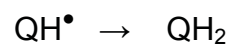
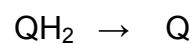
FIGURA 14 - Modelo representativo do ciclo Q (Fonte: MARZZOCO; TORRES, 2007).

A redução do citocromo *c* e a oxidação do ubiquinol no complexo III promovem a retirada de dois prótons da matriz e bombeia quatro prótons para o espaço intermembranar (MARZZOCO; TORRES, 2007). As reações que caracterizam o ciclo Q são:

Primeira etapa



Segunda etapa



O mixotiazol e a antimicina A são inibidores do complexo III. O mixotiazol provém da bactéria *Myxococcus fulvus* e bloqueia a oxidação do ubiquinol. A antimicina A, um antibiótico produzido por várias espécies de fungos *Streptomyces*, inibe a transferência do elétron do grupo heme *b* para a molécula de quinona ou semiquinona (WALLACE; STARKOV, 2000).

2.2.1.4 Complexo IV

O complexo IV ou citocromo-oxidase é uma proteína contida na membrana mitocondrial interna que contém 13 subunidades. Transporta dois elétrons do citocromo *c* para um aceptor final, o oxigênio molecular, reduzindo-o a água (NELSON; COX, 2002).

Nos eucariotos, a proteína que compõe o complexo IV constitui um dímero, sendo que cada monômero contendo 13 subunidades protéicas e estão associados a dois grupos heme (tipo *a* e *a*₃) e três íons de cobre, organizados em dois centros, denominados Cu_A/Cu_A (contendo dois íons de cobre) e Cu_B (contendo um íon de cobre). Estes íons se alternam entre os estados de oxidação Cu²⁺ e Cu⁺. O grupo heme *a*₃ e o centro Cu_B são muito próximos, originando o centro ativo no qual o oxigênio é reduzido à água (MARZZOCO; TORRES, 2007).

No complexo IV (Figura 15), os elétrons são transferidos do citocromo *c* para o centro Cu_A, do heme *a* para o heme *a*₃-centro Cu_B e em seguida, para o O₂. Para cada quatro elétrons que atravessam este complexo, há o consumo pela enzima, de quatro H⁺ da matriz, convertendo o oxigênio (O₂) em duas moléculas de água. A energia dessa reação redox é utilizada para bombear um próton ao espaço intermembranas para cada elétron transportado, aumentando o potencial eletroquímico gerado pelo transporte de prótons através dos complexos I e III, induzidos pelas reações redox (NELSON; COX, 2002).

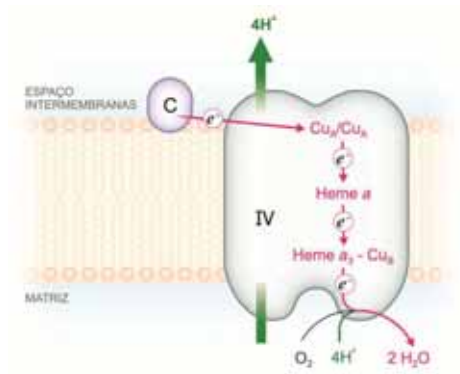
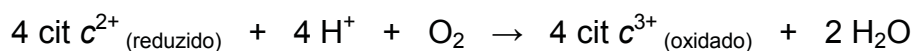
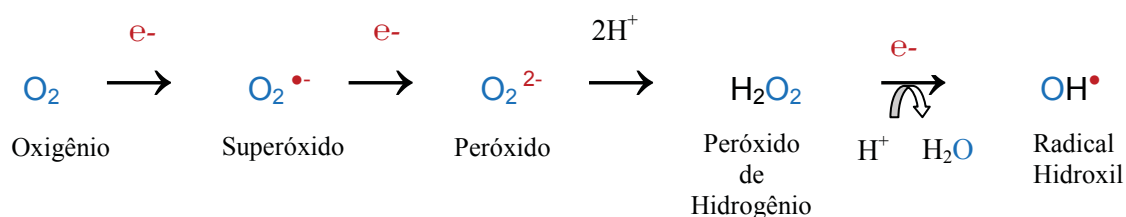


FIGURA 15 - Complexo IV (citocromo c oxidase) (Fonte: MARZZOCO; TORRES, 2007).

O complexo IV contribui para o gradiente de prótons e utiliza em torno de 95% de todo o oxigênio consumido pelo organismo humano, produzindo cerca de 300 mL de H₂O diariamente (MARZZOCO; TORRES, 2007). A reação de redução de quatro elétrons do oxigênio e oxidação de quatro moléculas de citocromo c reduzido é:



A redução de quatro elétrons do O₂ não pode gerar intermediários incompletamente reduzidos, como peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil livres, espécies reativas capazes de danificar os componentes celulares. Os intermediários ficam ligados ao complexo IV até serem completamente convertidos em água (NELSON; COX, 2002). Entretanto, evidências indicam que há formação do radical superóxido nos complexos I e III devido à reação da forma semiquinona da coenzima Q ou do FMN com o oxigênio. Este processo se intensificaria na falta de ADP, quando o gradiente eletroquímico aumenta. Uma inibição na cadeia transportadora de elétrons desencadearia um aumento na meia-vida de intermediários com elétrons desemparelhados, capazes de reduzir oxigênio molecular a íons superóxidos. A redução parcial do oxigênio molecular, por adição de um elétron, gera íon superóxido que reage com outro elétron, originando o íon peróxido que protona-se gerando peróxido de hidrogênio. Este, embora não seja um radical livre, é um potente oxidante podendo gerar um radical muito reativo, o hidroxil (MARZZOCO; TORRES, 2007).



A cadeia transportadora de elétrons é considerada a maior fonte endógena de espécies reativas de oxigênio, além dos peroxissomos, retículo endoplasmático e células do sistema imunológico (onde a produção é fundamental para combater agentes agressores externos como as bactérias, por exemplo). Estas espécies reativas interagem com proteínas e DNA modificando suas estruturas e com lipídios, transformando-os em peróxidos, por reação com duplas ligações pertencentes às moléculas dos ácidos graxos componentes das membranas, podendo desencadear lise celular (MARZZOCO; TORRES, 2007).

Compostos clássicos inibidores deste complexo incluem o cianeto, a azida e o monóxido de carbono (CO). Os dois primeiros se ligam à forma férrica do citocromo a_3 , de maneira não competitiva ao oxigênio, e o CO liga-se à forma ferrosa, competindo com o oxigênio (WALLACE; STARKOV, 2000).

2.2.1.5 Complexo V ou F_0F_1 -ATPase

O complexo V ou F_0F_1 -ATPase possui duas estruturas protéicas distintas, sendo F_0 uma porção transmembrana através da qual os prótons H^+ retornam para o interior da matriz mitocondrial e F_1 , uma proteína periférica que permite a síntese ou hidrólise de ATP (JUNGE; LILL; ENGELBRECHT, 1997). A letra o subscrita em F_0 significa sensível à oligomicina (NELSON; COX, 2002) e o número 1 em F_1 se refere ao nome a esta porção de fator de acoplamento 1 (MARZZOCO; TORRES, 2007).

O modelo proposto para a ATP sintase (Figura 16) provém da *Escherichia coli*. A porção F_1 é formada por subunidades α_3 , β_3 , γ , δ e ϵ , projetando-se para a matriz mitocondrial, sendo que as seis subunidades maiores (três α e três β) alternam-se em um círculo ao redor da subunidade γ que, por sua vez, associa-se à subunidade ϵ . O hexâmero $\alpha_3\beta_3$ interage com a subunidade δ . A porção F_0 contém as subunidades a , b e c_{10} e está inserida na membrana interna. As 10 subunidades c

formam estrutura em forma de anel e interagem com a subunidade a que, por sua vez, liga-se ao dímero b_2 . A união das duas porções ocorre por meio de um eixo central, formado por subunidades γ - ϵ e por um eixo lateral, contendo as subunidades δ - b_2 . Na porção F_o existem canais de passagem de prótons (entrada e saída) e na porção F_1 , ocorre a síntese de ATP por meio de três sítios ativos, presentes um em cada unidade β , junto a uma interface α/β (MARZZOCO; TORRES, 2007).

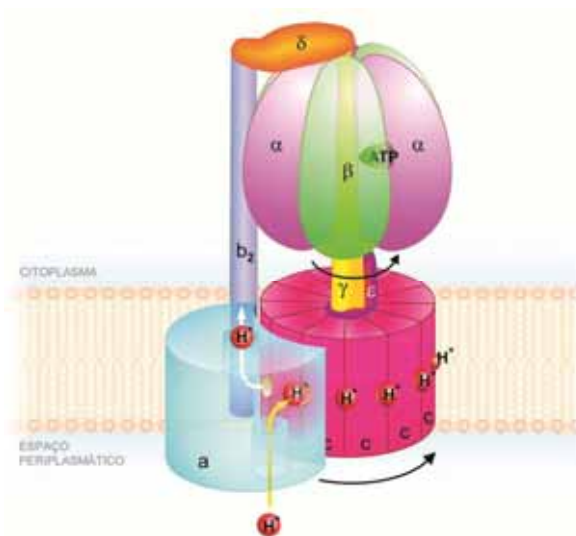


FIGURA 16 - F_oF_1 -ATPase (Fonte: MARZZOCO; TORRES, 2007).

Os inibidores da F_oF_1 -ATPase são a oligomicina, antibiótico isolado da espécie *Streptomyces diastochromogenes* e o diciclohexilcarbodiimida (DCCD) (SOPER; PEDERSEN, 1976). Ambos reagem covalentemente com a subunidade c de F_o , bloqueando o fluxo de prótons e inibindo a atividade da F_oF_1 -ATPase (SOPER; PEDERSEN, 1976) e conseqüentemente, a síntese de ATP. Uma vez que os processos de síntese de ATP e transporte de elétrons são acoplados, o bloqueio de um deles reflete imediatamente no outro, ou seja, interrompe a síntese de ATP e o consumo de oxigênio, indicando interrupção no transporte de elétrons na cadeia respiratória.

2.2.1.6 Fosforilação oxidativa

Conforme a teoria quimiosmótica proposta por Mitchell, associada à hipótese do acoplamento conformacional de Boyer, a passagem de elétrons na cadeia respiratória, através dos complexos I, III e IV permite a ejeção de prótons da matriz para o espaço intermembranas, originando um gradiente eletroquímico de prótons (Figura 17). A energia livre liberada pelo retorno destes prótons (através do canal de prótons localizados na porção F_o da enzima F_oF_1 -ATPase) à matriz mitocondrial, promove uma alteração conformacional nos sítios catalíticos localizados na porção F_1 desta enzima, liberando o ATP formado a partir de ADP e P_i (BOYER et al., 1973; MITCHELL, 1961).

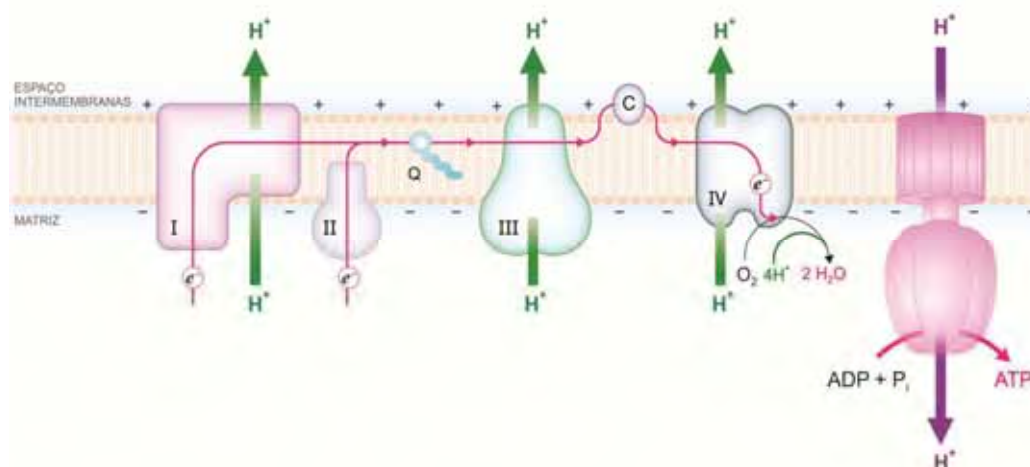


FIGURA 17 - Esquema representativo do o transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa (Fonte: MARZZOCO; TORRES, 2007).

Em 1955, Chance e Williams descreveram a cinética de óxido/redução dos componentes da cadeia respiratória mitocondrial e definiram os conceitos operacionais do estado metabólico mitocondrial e controle respiratório. Em estudos desenvolvidos no ano seguinte, os pesquisadores desenvolveram o método polarográfico para medir a fosforilação oxidativa, estabelecendo cinco condições ou estados, capazes de controlar a velocidade da respiração mitocondrial. O estado 1 é caracterizado pela ausência de ADP e substrato respiratório; o estado 2 é aquele no

qual o substrato respiratório é o fator limitante da respiração; o estado 3 contém todos os componentes em concentrações adequadas, sendo a velocidade de fosforilação do ADP o fator limitante; o estado 4 (basal), no qual a respiração é limitada pela disponibilidade de ADP e o estado 5, caracterizado pela ausência de oxigênio (MORELAND, 2001).

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

A atividade ATPásica (fosfohidrolase) da F_0F_1 -ATPase pode ser medida pela quantidade de fosfato liberado utilizando mitocôndrias isoladas de fígado de rato intactas, desacopladas com CCCP ou mitocôndrias rompidas. Nestas três preparações distintas, diferentes fatores controlam a atividade da F_0F_1 -ATPase e os resultados obtidos nos experimentos permitem avaliar o efeito de drogas ou inibidores específicos, auxiliando na elucidação dos mecanismos de ação destas substâncias. Assim sendo, em mitocôndrias intactas, a atividade ATPásica da F_0F_1 -ATPase é controlada retroativamente pelo potencial eletroquímico de prótons e a velocidade de hidrólise de ATP deve ser lenta, decorrente apenas da compensação de um pequeno escoamento natural de prótons que retornam à matriz mitocondrial. Em mitocôndrias intactas desacopladas, a velocidade de catálise de ATP pela F_0F_1 -ATPase dependerá apenas da capacidade desta enzima em hidrolisar ATP e da velocidade de troca de ADP por ATP pelo translocador de ADP/ATP. Assim sendo, Inibidores específicos da F_0F_1 -ATPase (oligomicina) ou do translocador de ADP/ATP (atractilosídeo) promovem diminuição da velocidade de hidrólise de ATP. Já em mitocôndrias rompidas, o ATP passa a ter livre acesso à F_0F_1 -ATPase e a velocidade de hidrólise de ATP dependerá exclusivamente de sua própria atividade. Portanto, somente substâncias que agem diretamente sobre esta enzima poderão promover inibição da atividade ATPásica (BRACHT; ISHII-IWAMOTO; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, 2003)..

2.2.1.7 Desacopladores da fosforilação oxidativa

Desacopladores são substâncias hidrofóbicas capazes de atravessar a membrana mitocondrial interna transportando prótons provenientes do espaço intermembranas (atividade denominada protonoforética) 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, aumentando 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), todos ácidos lipofílicos fracos, capazes de transportar prótons através da membrana mitocondrial interna e desfazer o gradiente necessário à síntese de ATP. Trabalhos desenvolvidos anteriormente evidenciaram outras substâncias com capacidades desacopladoras como ionóforos (KADENBACH, 2003; WALLACE; STARKOV, 2000) e antiinflamatórios não-esteroidais, dentre eles, o diclofenaco de sódio, ácido mefenâmico e a nimesulida (CAPARROZ-ASSEF et al., 2001; MINGATTO et al., 1996; 2000).

2.3 Generalidades Sobre o Fígado e Hepatotoxicidade

Vários fatores contribuem para a toxicidade química do fígado, tornando-o órgão alvo de várias classes de toxicantes e toxinas naturais, devido à sua função principal na biotransformação de substâncias exógenas (xenobióticos). Hepatócitos entram em contato com xenobióticos administrados oralmente sem sofrerem alteração sistêmica ou diluição, chegando ao fígado pela veia porta, que traz o sangue pobre em oxigênio, mas rico em nutrientes provenientes do trato gastrointestinal. Nos hepatócitos, o processo metabólico de biotransformação destes xenobióticos hidrofóbicos pode gerar metabólitos ativos tóxicos não acoplados às reações conjugadas protetoras, responsáveis por transformá-los em substâncias hidrofílicas, capazes de serem eliminadas mais facilmente do organismo pela excreção renal (MEYER; KULKARNI, 2001). Os hepatócitos possuem, entretanto, mecanismos de defesa capazes para combatê-los e o resultado entre a bioativação,

desintoxicação e mecanismos de defesa que evidencia se um composto desencadeia ou não toxicidade (GÓMEZ-LECHÓN et al., 2001).

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

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

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

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Avaliação Ética

A Comissão de Ética em 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. 03/2010).

3.2 Animais

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

3.3 Reagentes

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

3.4 Abamectina

Abamectina foi gentilmente cedida pela empresa OURO FINO AGRONEGÓCIOS, contendo 92% de avermectina B_{1a} e 8 % de avermectina B_{1b}.

Considerando-se dados preliminares de testes realizados no laboratório, as doses selecionadas e empregadas nos experimentos *in vitro* foram de 5, 10, 15 e 25 μ M.

3.5 Isolamentos de Mitocôndrias Intactas e Preparação de Mitocôndrias Rompidas

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

As mitocôndrias rompidas foram obtidas a partir das intactas isoladas, por meio de choque térmico, após três ciclos consecutivos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho aquecido a 37°C. Em seguida, os fragmentos de membrana foram mantidos a 4°C e utilizados na avaliação das atividades enzimáticas mitocondriais em um período máximo de 3 horas.

3.6 Determinações das Proteínas Mitocondrias

As proteínas mitocôndrias foram determinadas espectrofotometricamente, empregando-se a reação do biureto, conforme Cain e Skilleter (1987). Uma alíquota de 10 μ L da suspensão mitocondrial foi solubilizada em 100 μ L de ácido deoxicólico

5% (m/v), seguido de 1390 μL de água Milli-Q[®] e 1500 μL de reagente Biureto 0,15% (m/v). A concentração de proteína foi determinada em comprimento de onda de 540 nm por meio da curva de calibração com a albumina de soro bovino (BSA) como padrão, preparada nas mesmas condições das amostras.

3.7 Determinação do Consumo de Oxigênio

O consumo de oxigênio por mitocôndrias intactas foi monitorado polarograficamente, em oxímetro equipado com eletrodo de oxigênio do tipo Clark (Strathkelvin Precision Dissolved Oxygen Respirometer, Strathkelvin Instruments Limited, Glasgow, Scotland, UK) e os parâmetros respiratórios foram determinados conforme Chance e Willians (1955). As mitocôndrias intactas (1mg/mL) foram incubadas sob agitação (volume final de 1 mL), em uma câmara fechada e termostatizada a 30°C, no meio de respiração contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM e HEPES-KOH 10 mM, acrescido de EGTA 0,5 mM e K_2HPO_4 10 mM (pH=7,4) e energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM ou succinato de potássio 5 mM (acrescido de rotenona 2,5 μM) ou N,N,N,N-tetrametil-p-fenileno-diamina (TMPD) 200 μM + ascorbato 3 mM. Diferentes concentrações (5, 10, 15 e 25 μM) da abamectina foram adicionadas e as velocidades de consumo de oxigênio, determinadas por meio do software Strathkelvin Oxygen 782 System (versão 3.0, 2005), expressas como nmol O_2 consumido/min. mg de proteína. A respiração do estado 3 teve início após a adição de 400 nmols de ADP.

3.8 Determinações das Atividades das Enzimas Relacionadas à Cadeia Respiratória Mitocondrial (NADH Desidrogenase e Succinato Desidrogenase)

As atividades das enzimas NADH desidrogenase e succinato desidrogenase foram medidas espectrofotometricamente de acordo com Bracht, Ishii-Iwamoto e Salgueiro-Pagadigorria (2003), utilizando espectrofotômetro modelo DU-800 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). O meio de reação (volume final de 1,5 mL) continha TRIS 20 mM, pH 7,4 e antimicina A 1 μM . Mitocôndrias rompidas (0,2 mg/mL) foram acrescidas, juntamente com diferentes concentrações de abamectina (5, 10, 15 e 25 μM), NADH 1 mM ou succinato 10 mM e ferricianeto de potássio 0,4 mM, comoceptor de elétrons. A quantidade de ferricianeto reduzido foi

determinada pelo decréscimo da absorvância em comprimento de onda de 420 nm e a atividade das enzimas foi representada em nmol/min. mg de proteína, considerando o coeficiente de extinção molar do ferricianeto de $1,04 \text{ mM}^{-1}$.

3.9 Determinação do Potencial Elétrico de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi$)

O potencial elétrico de membrana das mitocôndrias intactas foi determinado em espectrofluorímetro modelo RFPC 5301 (Shimadzu, Tokyo, Japão), monitorando-se as variações de fluorescência promovida pela captação de safranina O, nos comprimentos de onda de 505 e 535 nm para excitação e emissão, respectivamente. As mitocôndrias intactas (1 mg/mL) foram incubadas a 30°C em meio de reação (volume final de 2 mL) contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, EGTA 0,5 mM, HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4, e o indicador safranina O 4 μM . Os substratos usados foram glutamato 5 mM + malato 5 mM ou succinato 5 mM (acrescido de rotenona 2,5 μM). A abamectina foi testada na concentração de 25 μM . Os resultados foram expressos como porcentagem em relação à fluorescência da amostra controle, ou seja, sem adição de abamectina.

3.10 Quantificação de ATP Mitocondrial

O método de quimioluminescência (sistema luciferina-luciferase de vaga-lume) foi utilizado na quantificação de ATP mitocondrial, por meio do kit Bioluminescent Assay Kit Sigma (St. Louis, MO, USA) em um aparelho Luminômetro modelo Sirius I (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Alemanha). O meio de reação (volume final de 1 mL) continha sacarose 125 mM, KCl 65 mM, EGTA 0,5 mM, HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4, acrescido de glutamato 5 mM e malato 5 mM como substratos. Diferentes concentrações (5, 10, 15 e 25 μM) de abamectina foram adicionadas, além da suspensão mitocondrial intacta (1mg/mL). Após homogeneização, as amostras ficaram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 9.000 g durante 5 minutos, a 4°C. Os sedimentos resultantes foram solubilizados em 1 mL de ácido percloroacético 1 M gelado e centrifugados a 12.000 g durante 15 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, foram coletados 100 μL de cada amostra e neutralizados (pH=7,0) com KOH 2 M, seguido da adição de Tris-HCl 100 M, pH 7,8 (volume final de 1 mL) e centrifugação

a 12.000 g, durante 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes resultantes (100 µL de cada) foram avaliados em triplicata no Luminômetro, de acordo com as recomendações do fabricante do kit.

3.11 Determinação da Atividade da F₀F₁-ATPase Mitocondrial

A atividade da F₀F₁-ATPase foi determinada conforme Bracht, Ishii-Iwamoto e Salgueiro-Pagadigorria (2003), em preparações de mitocôndrias intactas desacopladas e mitocôndrias rompidas. As mitocôndrias intactas (1 mg/mL) foram desacopladas com carbonilcianeto-m-clorofenilhidrazona (CCCP) 2 µM, e o meio empregado continha sacarose 125 mM, KCl 65 mM, EGTA 0,5 mM, HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4. Em mitocôndrias rompidas (0,25 mg/mL) o meio continha tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,2.

O procedimento foi o mesmo nas duas preparações e consistiu em incubar as mitocôndrias nos respectivos meios (volume final de 0,5 mL) e adicionar diferentes concentrações (5, 10, 15 e 25 µM) de abamectina. A reação foi iniciada com a adição de ATP 5 mM e incubação durante 20 minutos em banho a 37°C. Na sequência, ácido tricloroacético gelado foi adicionado em concentração final de 5%, finalizando a reação. Em seguida, o material foi centrifugado a 12.000 g, durante dez minutos e o fosfato inorgânico (Pi) liberado foi dosado segundo o método proposto por Fiske e Subbarow (1925), em comprimento de onda de 700 nm, empregando espectrofotômetro modelo DU-800 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Os resultados foram expressos em nmol de Pi/min.mg de proteína. A sensibilidade da oligomicina (4 µg/mL) foi testada em todas as suspensões mitocondriais.

3.12 Determinação da Inibição da Despolarização do Potencial de Membrana ($\Delta\Psi$) Induzida por ADP

A inibição da despolarização do $\Delta\Psi$ induzida por ADP foi realizada conforme O'Brien, Oliveira e Wallace (2008), com modificações. Mitocôndrias isoladas (1 mg de proteína) foram pré-incubadas por um minuto com abamectina nas concentrações de 5 a 25 µM ou carboxiatractilosídeo (cATR) 5 µM a 30°C em meio de reação (volume final de 2 mL) contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, EGTA 0,5 mM, HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4, e o indicador rodamina 123 0,4 µM e, em

seguida, energizadas com succinato 5 mM durante 1,5 minutos antes da adição de 400 nmol de ADP. A amplitude da despolarização induzida pelo ADP foi medida na presença e ausência dos compostos testados em espectrofluorímetro modelo RFPC 5301 (Shimadzu, Tokyo, Japão).

3.13 Análise Estatística

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

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos da Abamectina Sobre a Velocidade de Consumo de Oxigênio no Estado 3 em Mitocôndrias Isoladas de Fígado de Rato

Os efeitos das adições de diferentes concentrações de abamectina (5, 10, 15 e 25 μM) foram observados em três experimentos independentes, com diferentes preparações mitocondriais ($n=3$), sobre a velocidade de consumo de oxigênio no estado 3 em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. No primeiro experimento, o substrato oxidável foi o glutamato 5 mM juntamente com malato 5 mM (Figura 18). No segundo, o substrato oxidável foi o succinato 5 mM e o complexo I foi inibido pela rotenona 2,5 μM (Figura 19). No terceiro, o substrato oxidável foi o TMPD 200 μM + ascorbato 3 mM (dados não apresentados). A abamectina inibiu a velocidade do estado 3, de maneira dose-dependente, nos três experimentos descritos acima.

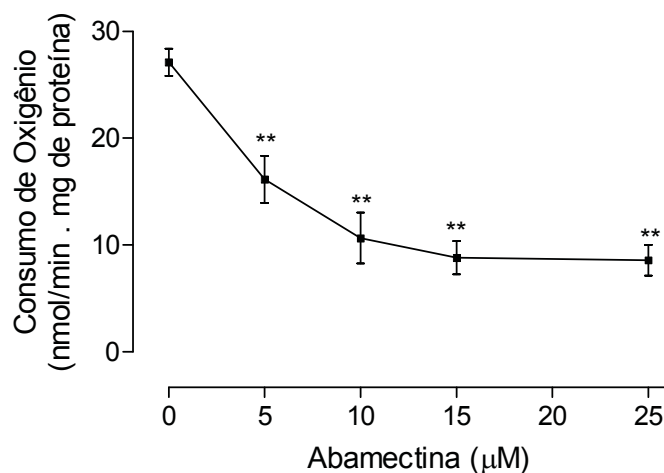


FIGURA 18 – Efeitos da abamectina no estado 3 da respiração em mitocôndrias (1 mg/mL) isoladas de fígado de rato, energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM. Valores representam a média $\pm$ EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. **Significativamente diferente do controle ($P < 0,01$).

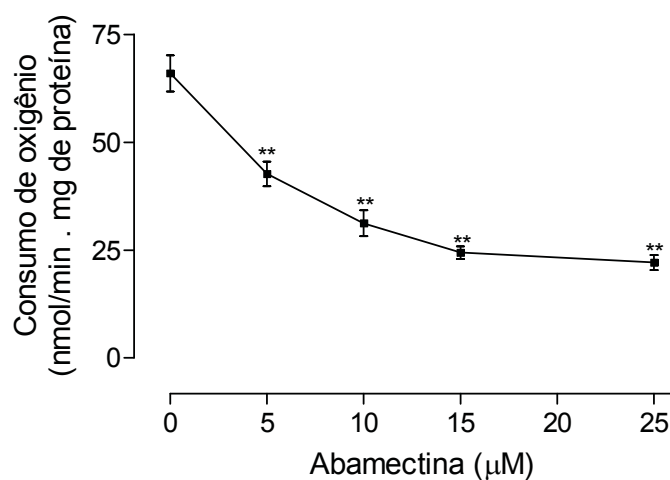


FIGURA 19 - Efeitos da abamectina no estado 3 da respiração em mitocôndrias (1 mg/mL) isoladas de fígado de rato, energizadas com succinato 5 mM (acrescido de rotenona 2,5 μM). Valores representam a média ± EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. **Significativamente diferente do controle ($P < 0,01$).

Uma vez que a abamectina inibiu o consumo de oxigênio no estado 3 da respiração mitocondrial, um ensaio foi realizado para avaliar sua atuação como agente desacoplador, empregando succinato 5 mM como substrato. A adição da abamectina 25 μM ocorreu após o consumo total do ADP e observou-se que a mesma não estimulou a respiração do estado 4 (Figura 20).

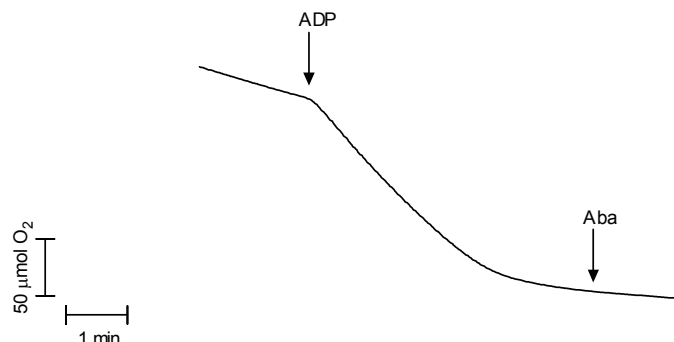


FIGURA 20 – Efeito da abamectina (Aba) 25 μM na respiração de estado 4, evidenciada após o consumo total de ADP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1 mg/mL).

Com o objetivo de verificar se a abamectina atuou diretamente sobre os complexos da cadeia transportadora de elétrons, foram realizados dois experimentos. O primeiro consistiu em empregar o substrato succinato 5 mM, iniciando a respiração com 400 nmols de ADP. Após alguns minutos do início da respiração de estado 3, oligomicina (inibidor da F_0F_1 -ATPase, na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$) ou atractilosídeo 1 μM ou abamectina 25 μM foram inseridos no meio, inibindo a respiração mitocondrial. Em seguida, CCCP 1 μM foi adicionado, estimulando a velocidade de consumo de oxigênio (Figura 21).

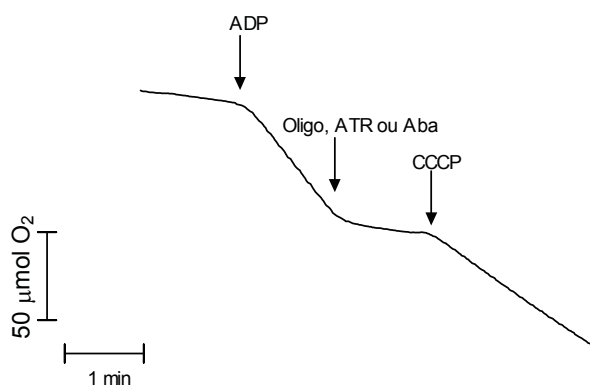


FIGURA 21 – Efeito do CCCP ($1 \mu\text{M}$) sobre o consumo de oxigênio de mitocôndrias (1 mg/mL) isoladas de fígado de rato energizadas com succinato 5 mM , inibido pela oligomicina (Oligo) $1 \mu\text{g/mL}$, atractilosídeo (ATR) $1 \mu\text{M}$ ou abamectina (Aba) $25 \mu\text{M}$.

No segundo experimento, CCCP foi utilizado como agente desacoplador e o cianeto de potássio (KCN), como inibidor do complexo IV. Neste experimento (Figura 22), o substrato oxidável foi o succinato 5 mM e o CCCP $1 \mu\text{M}$ foi adicionado desacoplando a fosforilação oxidativa. Após alguns minutos, abamectina $25 \mu\text{M}$ ou oligomicina $1 \mu\text{g/mL}$ ou atractilosídeo $1 \mu\text{M}$ (inibidor do translocador de ADP/ATP) foram adicionadas e não inibiram o consumo de oxigênio. Em seguida, KCN $1 \mu\text{M}$ foi adicionado e o mesmo inibiu o consumo de oxigênio, caracterizando sua atuação como inibidor do complexo IV da cadeia respiratória.

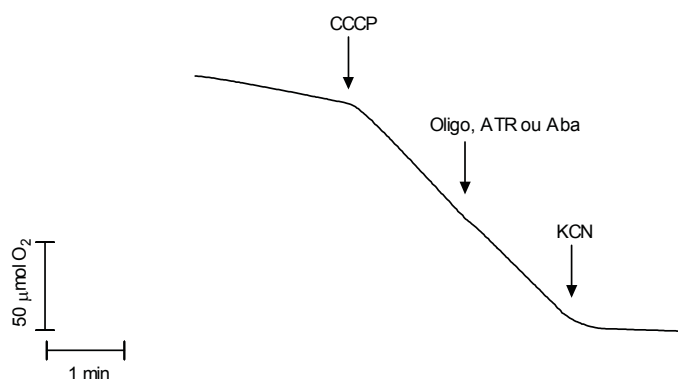


FIGURA 22 – Efeitos da oligomicina (Oligo) $1 \mu\text{g/mL}$, atractilosídeo (ATR) $1 \mu\text{M}$ ou abamectina (Aba) $25 \mu\text{M}$ e KCN $1 \mu\text{M}$ no consumo de oxigênio de mitocôndrias (1 mg/mL) isoladas de fígado de rato, energizadas com succinato 5 mM e desacopladas por CCCP $1 \mu\text{M}$.

4.2 Efeitos da Abamectina Sobre a Atividade das Enzimas NADH Desidrogenase e Succinato Desidrogenase

Os efeitos da abamectina na atividade das enzimas NADH desidrogenase e succinato desidrogenase foram avaliados em mitocôndrias rompidas. Abamectina, nas concentrações de 5 a $25 \mu\text{M}$, não promoveu alterações significativas na atividade da NADH (Figura 23) nem da succinato desidrogenase (Figura 24).

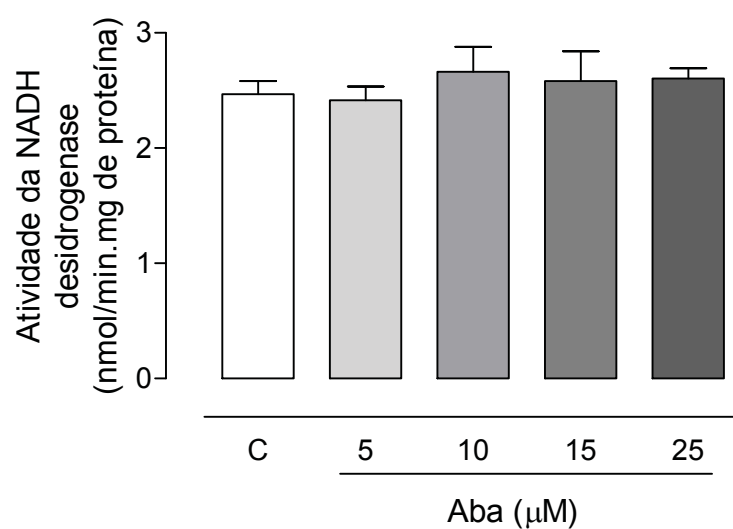


FIGURA 23 – Efeitos da abamectina (Aba) na atividade da enzima NADH desidrogenase em mitocôndrias rompidas (0,2 mg/mL) isoladas de fígado de rato. Valores representam a média $\pm$ EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. (C = controle)

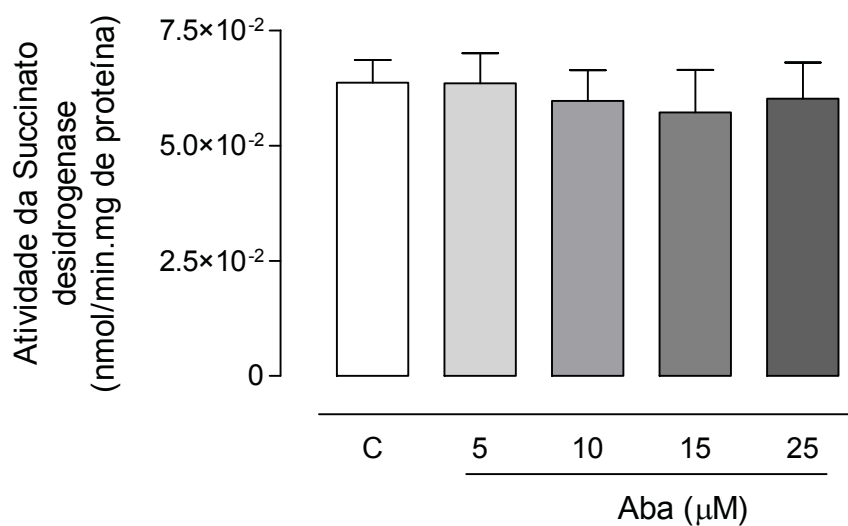


FIGURA 24 - Efeitos da abamectina (Aba) na atividade da enzima succinato desidrogenase em mitocôndrias rompidas (0,2 mg/mL) isoladas de fígado de rato. Valores representam a média $\pm$ EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. (C = controle)

4.3 Efeitos da Abamectina Sobre o Potencial Elétrico de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi$)

O potencial de membrana em mitocôndrias intactas de fígado de rato foi avaliado por espectrofluorimetria, utilizando-se a captação da safranina O (4 μM) como indicador do potencial e glutamato 5 mM + malato 5 mM como substratos oxidáveis. Com a adição das mitocôndrias ocorreu a formação do potencial de membrana e após 120 segundos, abamectina 25 μM , atractilosídeo (ATR) 1 μM e oligomicina 1 $\mu\text{g/mL}$ foram adicionados em experimentos independentes e nenhum deles exerceu influência sobre o potencial de membrana (Figura 25). CCCP 1 μM ou rotenona 2,5 μM foram adicionados e dissiparam o potencial elétrico de membrana mitocondrial.

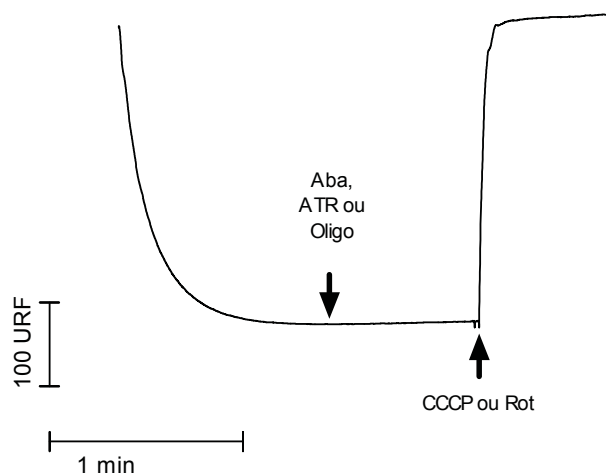


FIGURA 25 – Efeitos da adição de abamectina (Aba) 25 μM , oligomicina (Oligo) 1 $\mu\text{g/mL}$ ou atractilosídeo (ATR) 1 μM no potencial de membrana ($\Delta\Psi$) em mitocôndrias (1 mg/mL) isoladas de fígado de rato, energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM. (CCCP 1 μM ; rotenona (Rot) 2,5 μM).

4.4 Efeitos da Abamectina Sobre a Síntese de ATP

Os efeitos da abamectina na síntese de ATP foram avaliados pelo método de quimioluminescência (sistema luciferina-luciferase de vaga-lume), por meio do kit “Bioluminescent Assay Kit” da marca Sigma-Aldrich. Abamectina, em concentrações de 5, 10, 15 e 25 μM inibiu significativamente a síntese de ATP a partir da concentração 10 μM e alcançou o seu efeito máximo na concentração de 15 μM (Figura 26).

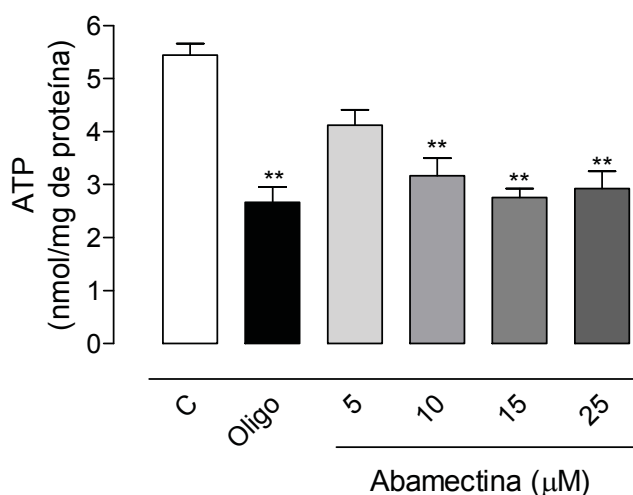


FIGURA 26 – Efeitos da abamectina e oligomicina (Oligo) 1 $\mu\text{g/mL}$ na síntese mitocondrial de ATP. Valores representam a média $\pm$ EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. **Significativamente diferente do controle ($P < 0,01$). (C = controle)

4.5 Efeitos da Abamectina Sobre a Atividade da F_0F_1 -ATPase

Os efeitos da abamectina na atividade da enzima F_0F_1 -ATPase foram avaliados em duas condições experimentais distintas, empregando mitocôndrias intactas desacopladas com CCCP (1 μM) e mitocôndrias rompidas. Nos experimentos com mitocôndrias intactas desacopladas, abamectina causou diminuição da atividade da F_0F_1 -ATPase de maneira dose-dependente (Figura 27). Nas mitocôndrias rompidas o efeito foi de extensão menor e semelhante em todas as concentrações testadas (Figura 28).

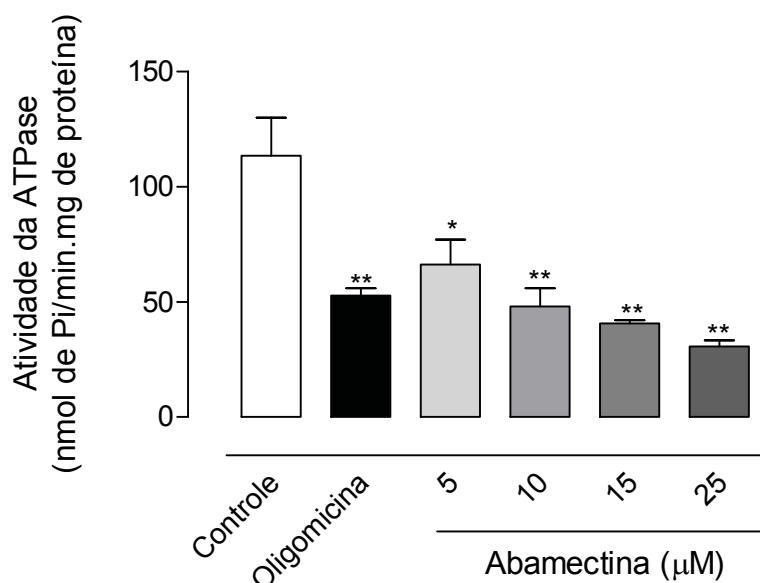


FIGURA 27 – Efeitos da abamectina e oligomicina 4 $\mu\text{g/mL}$ na atividade da enzima F_0F_1 -ATPase em mitocôndrias intactas (1 mg/mL) isoladas de fígado de rato e desacopladas com CCCP 1 μM . Valores representam a média $\pm$ EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. *Significativamente diferente do controle ($P < 0,05$) e **Significativamente diferente do controle ($P < 0,01$).

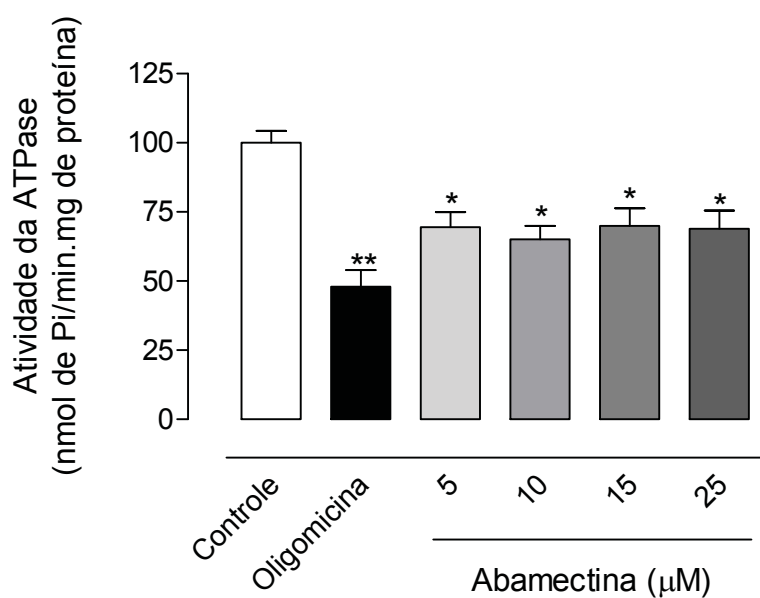


FIGURA 28 – Efeitos da abamectina e oligomicina 4 $\mu\text{g/mL}$ na atividade da enzima F_0F_1 -ATPase em mitocôndrias rompidas (0,25 mg/mL) isoladas de fígado de rato. Valores representam a média $\pm$ EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. *Significativamente diferente do controle ($P < 0,05$) e **Significativamente diferente do controle ($P < 0,01$).

4.6 Efeitos da Abamectina Sobre a Despolarização do Potencial de Membrana ($\Delta\Psi$) Induzida por ADP

O objetivo deste ensaio foi determinar se a abamectina é capaz de inibir a despolarização do potencial de membrana induzida pelo ADP como forma de avaliar o efeito do composto sobre o translocador de ADP/ATP. Carboxiatractilosídeo foi utilizado como controle positivo para a inibição do translocador. A abamectina (5 a 25 μM) inibiu significativamente a despolarização do potencial de membrana induzida por ADP de maneira dose-dependente (Figura 29).

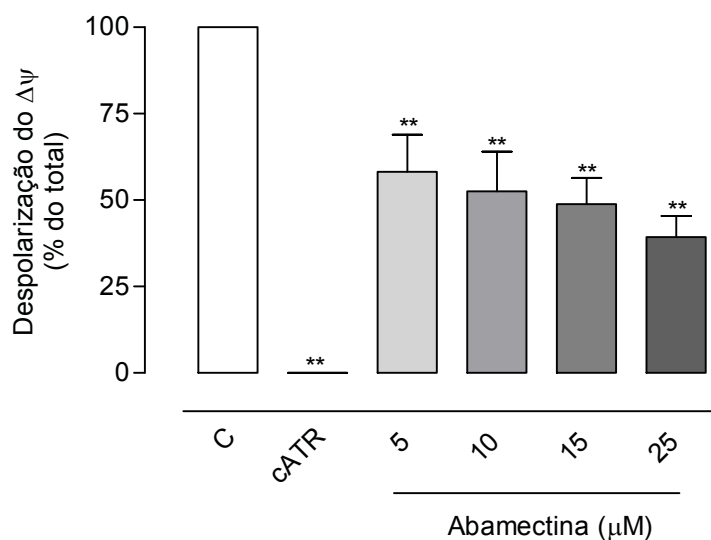


FIGURA 29 – Efeitos da abamectina sobre a despolarização do potencial de membrana ($\Delta\Psi$) induzida pelo ADP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Valores representam a média $\pm$ EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. **Significativamente diferente do controle ($P < 0,01$). (C = Controle; cATR = carboxiatractilosídeo)

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, os resultados obtidos na respiração mitocondrial, empregando mitocôndrias energizadas com glutamato + malato, doadores de elétrons para o complexo I (Figura 18); com succinato, doador de elétrons para o complexo II (Figura 19) e com TMPD/ascorbato (dados não apresentados), doador artificial de elétrons para o complexo IV da cadeia transportadora de elétrons, mostraram que a abamectina inibiu a respiração do estado 3, nas concentrações de 5 a 25 μM , de maneira dose-dependente. Conforme Chance e Williams (1955), o fator limitante da respiração no estado 3 é a velocidade de fosforilação do ADP. Estas inibições observadas poderiam decorrer da atuação da abamectina diretamente na cadeia respiratória; por inibição da F_0F_1 -ATPase, do translocador de ADP/ATP, ou de ambos.

Substâncias desacopladoras são capazes de atuar sobre o acoplamento da síntese de ATP com o transporte de elétrons (MARZZOCO; TORRES, 2007). Quando a membrana mitocondrial interna torna-se permeável a H^+ , ocorre dissipação do potencial de membrana aumentando a velocidade de respiração do estado 4; nestas condições (desacoplamento), a capacidade da mitocôndria de sintetizar ATP é comprometida (MITCHELL, 1961; NICHOLLS, 1982). Ao acrescentar a abamectina 25 μM , após o consumo total do ADP (Figura 20), observou-se que esta não estimulou a respiração do estado 4 (basal), na qual a respiração é limitada pela disponibilidade de ADP (MORELAND, 2001), descartando a hipótese de sua atuação como agente desacoplador.

Pela adição de um desacoplador, é possível distinguir a inibição do sistema da fosforilação oxidativa da inibição da cadeia transportadora de elétrons. Se a inibição ocorre na fosforilação oxidativa, o consumo de oxigênio é restaurado e se ocorre na cadeia transportadora de elétrons, o desacoplador é inócuo sendo que, nos dois casos, a formação de ATP permanece inibida (MARZZOCO; TORRES, 2007). Nesse sentido, foi realizado o teste empregando CCCP como desacoplador e succinato como substrato, após inibição induzida por abamectina, oligomicina ou atractilósídeo (Figura 21), e o mesmo foi capaz de restaurar o consumo de oxigênio, indicando que a inibição da respiração do estado 3 pela abamectina não foi pela sua atuação diretamente sobre a cadeia respiratória e sim, provavelmente por interação com a F_0F_1 -ATPase e/ou com o translocador de ADP/ATP, uma vez que seu

comportamento foi semelhante ao da oligomicina, um inibidor específico da F_0F_1 -ATPase, e ao do atractilósídeo (inibidor do translocador de ADP/ATP).

Outro experimento foi realizado para verificar se a abamectina exercia um efeito direto sobre os complexos da cadeia respiratória empregando CCCP como agente desacoplador e KCN como inibidor do complexo IV da cadeia respiratória (Figura 22). Neste experimento, o CCCP foi adicionado após energização da mitocôndria com succinato e desacoplou a fosforilação oxidativa. Ao adicionar abamectina, atractilósídeo ou oligomicina, estes não inibiram o consumo de oxigênio e ao adicionar KCN, este inibiu o consumo de oxigênio demonstrando que abamectina não exerce ação direta sobre os complexos da cadeia respiratória. Portanto, a abamectina novamente comportou-se de forma semelhante ao atractilósídeo e à oligomicina.

O complexo I (NADH desidrogenase) é o mais vulnerável de todos os complexos da cadeia transportadora de elétrons (BOELSTERLI, 2007). O complexo II, que é menor e mais simples que o complexo I, contém a enzima succinato desidrogenase, única enzima do ciclo de Krebs ligada à membrana mitocondrial interna (NELSON; COX, 2002). A abamectina não interagiu com as enzimas NADH desidrogenase (Figura 23) e succinato desidrogenase (Figura 24), em experimentos realizados para avaliar as atividades das mesmas, comprovando que o fármaco não atua diretamente sobre a cadeia transportadora de elétrons, especificamente nos complexos I e II.

Em concordância com os resultados anteriores, abamectina não dissipou o potencial de membrana (Figura 25), efeito este desencadeado por inibidores dos complexos da cadeia respiratória como a rotenona e por substâncias desacopladoras como o CCCP, ou seja, aquelas capazes de atuar sobre o acoplamento da síntese de ATP com o transporte de elétrons (MARZZOCO; TORRES, 2007). Esses resultados reforçam a hipótese proposta anteriormente de que a abamectina exerceria o seu mecanismo tóxico por sua atuação diretamente sobre a enzima F_0F_1 -ATPase e/ou sobre o translocador de ADP/ATP.

A abamectina inibiu significativamente a síntese de ATP na concentração de 10 μM e atingiu seu efeito máximo na concentração de 15 μM (Figura 26) confirmando dados obtidos por Maioli et al. (2010) em estudo no qual a abamectina inibiu a síntese de ATP em hepatócitos isolados de rato, indicando uma capacidade deste fármaco em diminuir o potencial de fosforilação oxidativa. Uma vez que ATP é

um componente metabólico essencial, interferências em sua síntese ou utilização caracterizam mecanismos pelo quais os xenobióticos podem expressar toxicidade aguda ou crônica (MEYER; KULKARNI, 2001).

O ANT é um componente importante do sistema mitocondrial de síntese de ATP devido à sua atividade de translocase de nucleotídeos de adenina e pode ser um alvo potencial para a toxicidade induzida por compostos químicos (OLIVEIRA; WALLACE, 2006). Experimentos foram realizados para caracterizar a atividade da abamectina sobre a atividade da F_0F_1 -ATPase ou do ANT. Ao avaliar a atividade da enzima ATPase, observou-se inibição da atividade enzimática, tanto em mitocôndrias intactas desacopladas com CCCP (Figura 27) como em mitocôndrias rompidas (Figura 28). Porém, a inibição exercida pela abamectina (5 a 25 μ M) foi mais significativa em mitocôndrias desacopladas do que em mitocôndrias rompidas. Esses resultados juntamente com a inibição da despolarização do potencial de membrana induzida pelo ADP demonstrada pela abamectina (Figura 29) indicam que a abamectina atua inibindo mais especificamente o translocador de ADP/ATP do que a F_0F_1 -ATPase.

6 CONCLUSÃO

A abamectina afetou a bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato inibindo a cadeia respiratória, sem afetar a atividade das enzimas NADH desidrogenase, succinato desidrogenase e o potencial de membrana; reduzindo o potencial mitocondrial de fosforilação oxidativa e diminuindo os níveis de ATP como consequência de sua atuação evidente por inibição mais específica do translocador de ADP/ATP do que da F_0F_1 -ATPase. Esse efeito pode estar relacionado com a intoxicação hepática de animais tratados com a abamectina observada em estudos anteriores.

REFERÊNCIAS

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

ALBERT, J. et al. A GABA-activated chloride conductance not blocked by picrotoxin on spiny lobster neuromuscular preparations. **Br. J. Pharmacol.**, v. 87, n. 4, p. 771-779, 1986.

ALVINERIE, M. et al. Toutain microdose d'ivermectine chez la vache laitière: concentrations plasmatiques et résidus dans le lait. **Rev. Med. Vet.**, v. 145, p. 761-764, 1994.

AMACHER, D.E. Drug-associated mitochondrial toxicity and its detection. **Curr. Med. Chem.**, v. 12, n. 16, p. 1829-1839, 2005.

ANDRADE, S.F.; SANTARÉM, V.A. Endoparasitídeos e ectoparasitídeos. In: Andrade S.F. (Ed.) **Manual terapêutica veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2002. p. 469-470.

ANDREW, N.W.; HALLEY, B.A. Stability of ivermectin in rumen fluids. **J. Vet. Pharmacol. Therap.**, v. 19, n. 4, p. 295-299, 1996.

BASSISSI, M.F.; ALVINERIE, M.; LESPINE, A. Macrocyclic lactones distribution in the plasma lipoproteins of several animal species including humans. **Comp. Biochem. Physiol. Part C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v. 138, n. 4, p. 437-444, 2004.

BIANCHIN, I. et al. Epidemiologia dos nematódeos gastrintestinais em bovinos de corte nos cerrados e controle estratégico no Brasil. **Circular Técnica – Centro Nacional de Pesquisa de gado de corte**, n. 24, 1996.

BOELSTERLI, U.A. **Mechanistic toxicology**: the molecular basis of how chemicals disrupt biological targets. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 357-389.

BOYER, P.D. et al. A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 70, n. 10, p. 2837-2839, 1973.

BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.L; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, C.L. Estudo do metabolismo energético em mitocôndrias isoladas de tecido animal In: BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.L. (Ed.) **Métodos de laboratório em bioquímica**. Barueri: Manole, 2003. Cap 9, p. 227-247.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 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: 17 out. 2010.

BURG, R.W. et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 15, n. 3, p. 361-367, 1979.

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

CAMPBELL, W.C.; BENZ, G.W. Ivermectin: a review of efficacy and safety. **J. Vet. Pharmacol. Therap.**, v. 7, p. 1-16, 1984.

CAMPBELL, W.C. et al. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. **Science**, v. 221, n. 4613, p. 823-828, 1983.

CAPARROZ-ASSEF, S. M. E. et al. A. The uncoupling effect of the nonsteroidal anti-inflammatory drug nimesulide in liver mitochondria from adjuvant-induced arthritic rats. **Cell Biochem. Funct.**, v. 19, n. 2, p. 117-124. 2001.

CERKVENIK-FLAJS, V. et al. Kinetics of abamectin disposition in blood plasma and Milk of lactating dairy sheep and suckling lambs. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n. 23, p. 9733-9738, 2007.

CHABALA, J.C. et al. Ivermectin, a new broad-spectrum antiparasitic agent. **J. Med. Chem.**, v. 23, n. 10, p.1134-1136, 1980.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. **Nature**, v. 175, n. 4469, p. 1120-1121, 1955.

CHUNG, K. et al. Agricultural avermectins: na uncommon but potentially fatal cause of pesticide poisoning. **Ann. Emerg. Med.**, v. 34, n. 1, p. 51-57, 1999.

COURTNEY, C.H.; ROBERSON, E.L. Chemotherapy of parasitic disease. Antinematodal drugs, p.916-922. In: ADAMS, H.R. (Ed.) **Veterinary pharmacology and therapeutics**. 7th ed. Ames: Iowa State University Press, 1995.

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

EGERTON, J.R. et al. 22, 23: dihydroavermectin B1, a new broad-spectrum antiparasitic agent. **Br. Vet. J.**, v. 136, n. 1, p. 88-97, 1980.

ESPOTI, M.D. Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1364, n. 2, p. 222-235, 1998.

FISHER, M.H.; MROZIK, H. Chemistry. In: CAMPBELL, W.C. (Ed.) **Ivermectin and abamectin**. New York: Springer – Verlag, 1989. p. 1-23.

FISHER, M.H.; MROZIK, H. The Chemistry and pharmacology of avermectins. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 32, p. 537-553, 1992.

FISKE, C.H.; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J. Biol. Chem.**, v. 66, p. 375-400, 1925.

FREITAS, E.M.S. **Ação tóxica da veratrina em mitocôndrias e no retículo sarcoplasmático**. 2006. 173f. Tese (Doutorado em Biologia) – Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, Campinas, 2006.

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

GARCIA, A.F. et al. Comparative effects of lantadene A and its reduced metabolite on mitochondrial bioenergetics. **Toxicon**, v. 55, n. 7, p. 1331–1337, 2010.

GÓMEZ-LECHÓN, M.J. et al. The use of cultured hepatocytes to investigate the metabolism of drugs and mechanisms of drug hepatotoxicity. **Altern. Lab. Anim.**, v. 29, n. 3, p. 225-231, 2001.

GROVE, D.I. The effects of 22,23-dihydroavermectin B₁ on *Strongyloides ratti* and *S. stercoralis* infection in mice. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 77, n. 4, p. 405-410, 1983.

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

HALLEY, B.A. et al. Ivermectin and abamectin metabolism: differences and similarities. In: HUTSON, D.H. et al. (Ed). **Xenobiotics and food-producing animals: metabolism and residues**. Washington, DC: American Chemical Society, 1992. p. 203-216. (Symposium Series, n. 503).

HENNESSY, D.R.; ALVINERIE, M.R. Pharmacokinetics of the macrocyclic lactones: conventional wisdom and new paradigms. In: VERCRUYSSSE, J.; REW, R. S. (Ed.) **Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy**. Wallingford: CABI, 2002. p. 97-119.

HSU, D.Z. et al. Abamectin effects on aspartate aminotransferase and nitric oxide in rats. **Toxicology**, v. 165, n. 2-3, p. 189–193, 2001.

JUNGE, W.; LILL, H.; ENGELBRECHT, S. ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics. **Trends Biochem. Sci.**, v. 22, n. 11, p. 420-423, 1997.

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

KLAASSEN, C.D.; EARTON, D.L. Principles of toxicology. In: AMDUR, M.O. et al. **Toxicology**, 4. ed. New York: McGraw-Hill, 1991. p. 12-49.

KOLAR, L. et al. Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. **Environ. Pollution**, v. 151, n. 1, p.182-189, 2008.

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

LIFSCHITZ, A. et al. Moxidectin in cattle: correlation between plasma and target tissues disposition. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, v. 22, n. 4, p. 266-273, 1999.

LIFSCHITZ, A. et al. Pharmacokinetic evaluation of four ivermectin generic formulations in calves. **Vet. Parasitol.**, v. 119, n. 2-3, p. 247-257, 2004.

LO, P. et al. Pharmacokinetics studies of ivermectin: effect of formulation. **Vet. Res. Commun.**, v. 9, n. 4, p. 251-268, 1985.

LUCIANI, S. Effects of tannic acid and 2-thnoyltrifluoroacetone on succinate oxidation and penetration across the mitochondrial membrane. **FEBS Lett.**, v. 12, n. 4, p. 213-216, 1971.:

LÜMMEN, P. Complex I inhibitors as insecticides and acaricides. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1364, n. 2, p. 287-296, 1998.

MAIOLI, M.A. et al. Efeitos da abamectina em hepatócitos isolados. In: **CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP**, 22., 2010, Ilha Solteira. **Anais...** Ilha Solteira: UNESP, 2010. v. 1, p. 1546-1549.

MARTIN, R.; PENNINGTON, A.J. Effect of dihydroavermectin B_{1a} on Cl single channel currents in *Ascaris* muscle. **Pestic. Sci.**, v.24, p. 90-91, 1988.

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.

MAYNARD, M.S.; WISLOCKI, P.G.; KU, C.C. The fate of avermectin B_{1a} in lactating goats. **J. Agric. Food Chem.**, v. 37, n. 6, p. 1491-1497, 1989.

McKELLAR, Q.A.; BENCHAOU, H. Avermectins and milbemycins. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, v.19, n. 5, p. 331-351, 1996.

MELLIN, T.N.; BUSCH, R.D.; WANG, C.C. Postsynaptic inhibition of invertebrate neuromuscular transmission by avermectin B_{1a}. **Neuropharmacology**, v. 22, n. 1, p. 89-96, 1983.

MEYER, S.A.; KULKARNI, A.P. Hepatotoxicity. In: HODGSON, E.; SMART, R.C. (Ed.) **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. **Toxicon**, v. 50, n. 5, p. 724–730, 2007.

MINGATTO, F.E. et al. Effects of nimesulide and its reduced metabolite on mitochondria. **Br. J. Pharmacol.**, v. 131, n. 6, p. 1154-1160, 2000.

MINGATTO, F.E. et al. *In vitro* interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on oxidative phosphorylation of rat kidney mitochondria: respiration and ATP synthesis. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 334, n. 2, p. 303-308, 1996.

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

MOORE, L.F. Dermatologic disease. External parasites. In: CORVIW, R.M. (Ed.) **Current veterinary therapy, food animal practice**. 4th. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999. p.731.

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**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. Cap. 19, p. 515-537.

NICHOLLS, D.G. **Bioenergetics**: an introduction to the chemiosmotic theory. London: Academic Press, 1982. p. 25-96.

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. **Br. J. Pharmacol.**, v. 132, n. 3, p. 722-728, 2001.

O'BRIEN, T.M.; OLIVEIRA, P.J.; WALLACE, K.B. Inhibition of the adenine nucleotide translocator by *N*-acetyl perfluorooctane sulfonamides in vitro. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 227, p. 184-195, 2008.

OLIVEIRA, P.J.; WALLACE, K.B. Depletion of adenine nucleotide translocator protein in heart mitochondria from doxorubicin-treated rats. Relevance for mitochondrial dysfunction. **Toxicology**, v. 220, p. 160-168, 2006.

OMURA, S. **The ivermectin story**. 2007. Disponível em <[http://www.satoshi-omura.info/ ivermectin/index.html](http://www.satoshi-omura.info/ivermectin/index.html)> Acesso em: 28 nov. 2010.

OSTLIND, D.A.; CIFELLI, S.; LANG, R. Insecticidal activity of the anti-parasitic avermectins. **Vet. Rec.**, v. 105, n. 8, p. 168, 1979.

PALMA, C. et al. Determinación de residuos de abamectina-triclabendazol en tejidos bovinos. **Arch. Med. Vet.**, v. 38, n. 3, p. 265-271, 2006.

PEDERSEN, P.L. et al. Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues. **Methods Cell. Biol.**, v. 20, p. 411-481, 1978.

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

PITERNA, T. et al. New ventures in the chemistry of avermectins. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 17, n. 12, p. 4085-4095, 2009.

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.

SCOTT, R.H.; DUCE, I.J. Pharmacology of GABA receptors on skeletal muscle fibres of the locust (*Schistocerca gregaria*). **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 86, n. 2, p. 305-311, 1987.

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

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

SHOOP, W.L.; MROZIK, H.; FISHER, M.H. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. **Vet. Parasitol.**, v.59, n. 2, p. 139–156, 1995.

SILVERS, G.; FUENTEALBA, C. Comparacion de la efectividad antihelmintica de seis productos comerciales que contienen lactonas macrociclicas frente a nematodos gastrointestinales del bovino. **Arch. Med. Vet.**, v.35, n.1, p. 81-88, 2003.

SINDAN (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos Para Saúde Animal). **Compêndio de produtos veterinários**. 2007. Disponível em: <<http://www.cpvvs.com.br/cpvvs/index.html>> Acesso em: 28 nov. 2010.

SOPER, J.W.; PEDERSEN, P.L. Adenosine triphosphatase of rat liver mitochondria: detergent solubilization of an oligomycin-and dicyclohexylcarbodiimide-sensitive form of the enzyme. **Biochemistry**, v. 15, n. 12, p. 2682-2690, 1976.

SUNG, Y-F. et al. Avermectin intoxication with coma, myoclonus, and polyneuropathy. **Clin. Toxicol.**, v. 47, n. 7, p. 686-688, 2009.

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

TAKIGUCHI, Y. et al. Milbemycins, a new family of macrolide antibiotics: fermentation, isolation and physico-chemical properties. **J. Antibiot.**, v. 33, n. 10, p. 1120-1127, 1980.

TAYLOR, H.R.; GREENE, A.S.J. The status of ivermectin in treatment of onchocerciasis. **Am. J. Trop. Hyg.**, v. 41, n. 4, p. 460-466, 1989.

TAYLOR, M.A. Review: recent developments in ectoparasites. **Veterinary Journal**, v. 161, n. 3, p. 253-268, 2001.

TRACY, J.M.; WEBSTER, L.T.J.R. Drugs used in the chemotherapy of helminthiasis, p.1131-1133. In: HARMAN, J.G. et al. (Ed.). **The pharmacological basis of therapeutics**. 10th. ed. New York: Internacional Edition, 2001.

TURNER, M.J.; SCHAEFFER, J.M. Mode of action of ivermectin. In: CAMPBELL, W.C. (Ed.) **Ivermectin and abamectin**. New York: Springer Verlag, 1989. p. 73-88.

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

WU, Z. et al. Multi-residue analysis of avermectins in swine liver by immunoaffinity extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. **J. Chromatog. B**, v. 755, n. 1-2, p. 361–366, 2001.

ZENG, Z. et al. Role of cytochrome P450 isoforms in the metabolism of abamectin and ivermectin in rats. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, n. 10, p. 3374-3378, 1996.

ANEXO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus Experimental de Dracena



Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Certificado

Certificamos que o Projeto intitulado "Mecanismos de Toxicidade da Abamectina e da Ivermectina no Fígado de Ratos", protocolo nº 03/2010, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto, utilizando 50 ratos, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Zootecnia da UNESP de Dracena e foi aprovado pela referida Comissão, em sessão de 05/04/2010.

(We certify that the Project "Mechanisms of Toxicity of Abamectin and Ivermectin on Rat Liver", protocol number 03/2010, under the responsibility of Dr Fábio Erminio Mingatto, utilizing 50 animals, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethics in Animal Research Committee of the Faculty of Zootecny of Unesp Dracena and was approved in 05/04/2010 meeting).

Dracena, 5 de Abril de 2010.

Profa. Dra. Flávia Thomaz Verechia Pereira
Vice-Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) Unesp Dracena

Profa. Dra. Valquíria Cação da Cruz
Membro da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) Unesp Dracena

Profa. Dr. Sirlei Maestá
Membro da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) Unesp Dracena

Elaine Talita Santos
Membro da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) Unesp Dracena