

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**CÂMPUS DE DRACENA**

**MECANISMOS DE TOXICIDADE DOS METABÓLITOS DO  
FIPRONIL, DESSULFINIL E SULFONA, EM MITOCÔNDRIAS  
ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO**

**Marco Aurélio Tavares**

Biólogo

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**CÂMPUS DE DRACENA**

**MECANISMOS DE TOXICIDADE DOS METABÓLITOS DO  
FIPRONIL, DESSULFINIL E SULFONA, EM MITOCÔNDRIAS  
ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO**

**Marco Aurélio Tavares**

**Orientador: Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista – Unesp - Câmpus de Dracena, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

2015

FICHA CATALOGRÁFICA  
Desenvolvida pela Seção Técnica de Biblioteca e Documentação  
Campus de Dracena

T231m

Tavares, Marco Aurélio.

Mecanismos de toxicidade dos metabólitos do fipronil, dessulfinil e sulfona, em mitocôndrias isoladas de fígado de rato / Marco Aurélio Tavares. -- Dracena: [s.n.], 2015.

65 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2015.

Orientador: Fábio Erminio Mingatto  
Inclui bibliografia.

1. Dessulfinil. 2. Fígado. 3. Fosforilação oxidativa. 4. Mitocôndrias. 5. Sulfona. 6. Toxicidade I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** Mecanismos de toxicidade dos metabólitos do fipronil, fipronil dessulfínil e fipronil sulfona em mitocôndrias isoladas de fígado de rato

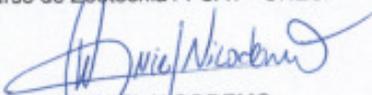
**AUTOR:** MARCO AURÉLIO TAVARES

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO

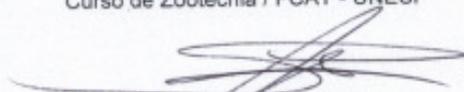
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal, Área: PRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO  
Curso de Zootecnia / FCAT - UNESP



Prof. Dr. DANIEL NICODEMO  
Curso de Zootecnia / FCAT - UNESP



Prof. Dr. SÉRGIO DINIZ GARCIA  
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / FMVA – UNESP

Data da realização: 05 de novembro de 2015.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Marco Aurélio Tavares**, nascido em Junqueirópolis (SP) no dia 28 de abril de 1987, ingressou no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas pela União das Faculdades de Dracena - UNIFADRA - Dracena (SP) em fevereiro de 2010, obtendo o grau de Licenciatura em Ciências Biológicas em dezembro de 2012. Esteve envolvido em atividades de pesquisa desde o início da graduação. Mestrado pelo programa interunidades em Ciência e Tecnologia Animal pela Unesp de Dracena e Ilha Solteira (SP), sob orientação do Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto, professor das disciplinas de Bioquímica Animal e Química Geral do curso de graduação em Zootecnia e Bioquímica do curso de graduação em Engenharia Agrônômica da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - Unesp.

Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês, diz o Senhor, planos de fazê-los prosperar e não de causar dano, planos de dar a vocês esperança e um futuro.

**Jeremias 29.11**

Vamos à presença dele com ações de graças; vamos aclamá-lo com cânticos de louvor. Pois o Senhor é o grande Deus, o grande Rei acima de todos os deuses.

**Salmos 95.2-3**

E disse-me: A minha graça te basta, porque o meu poder se aperfeiçoa na fraqueza. De boa vontade, pois, me gloriarei nas minhas fraquezas, para que em mim habite o poder de Cristo.

Por isso sinto prazer nas fraquezas, nas injúrias, nas necessidades, nas perseguições, nas angústias por amor de Cristo. Porque quando estou fraco então sou forte.

**II Coríntios 12.9-10**

*Dedico:*

*Á minha esposa **Talita de Souza Fabiani Tavares**,  
companheira e incentivadora em todos os momentos, ao  
meu filho **Pedro Marco Fabiani Tavares**, motivo pelo qual  
dedico minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, pela saúde, força e coragem de enfrentar os obstáculos da vida. Penso que na vida, tudo há um propósito, o importante é não perder o “foco”, Jesus Cristo.

Aos Meus Pais José Tavares e Neuza Bindandi Tavares, pelos esforços proporcionados e compreensão nos momentos de minha ausência, à minha esposa e meu filho, sem eles, meu trabalho seria em vão, pois a família é um tesouro na Terra.

Ao Professor Adj. Fábio Erminio Mingatto, pessoa de extrema sabedoria, bondade e conhecimento, exemplo de Pesquisador e Docente, o qual me orientou e me apoiou em todos os momentos. Este que, quando tudo parecia complicado e sem valor, tornava fácil e importante. Este que, quando achava que estava sozinho me estendia à mão. Meu amigo Fábio, Deus te abençoe.

Aos amigos e colegas do LaBMeT, que me auxiliaram nas horas difíceis.

*Muito Obrigado.*

## Sumário

	<b>Páginas</b>
I. INTRODUÇÃO.....	<b>15</b>
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	<b>17</b>
2.1 Generalidades sobre o fígado e hepatotoxicidade.....	<b>17</b>
2.2 Propriedades das Mitocôndrias.....	<b>19</b>
2.2.1 Mitocôndria e função energética.....	<b>20</b>
2.2.1.1 Fosforilação oxidativa.....	<b>22</b>
2.2.1.2 Inibidores e desacopladores.....	<b>23</b>
2.2.2 Mitocôndria e homeostase intracelular de Calcio (Ca <sup>2+</sup> ).....	<b>23</b>
2.3 Fipronil e os seus metabólitos fipronil dessulfinil e fipronil sulfona.....	<b>25</b>
2.4 Justificativa.....	<b>28</b>
III. OBJETIVO.....	<b>29</b>
3.1 Objetivo geral.....	<b>29</b>
3.1.1 Objetivo específico.....	<b>29</b>
3.2 Hipótese.....	<b>29</b>
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	<b>29</b>
4.1 Avaliação Ética.....	<b>29</b>
4.2 Animais.....	<b>29</b>
4.3 Reagentes.....	<b>30</b>
4.4 Isolamento das mitocôndrias de fígado de rato.....	<b>30</b>
4.5 Determinação das proteínas mitocondriais.....	<b>31</b>
4.6 Determinação do consumo de oxigênio mitocondrial.....	<b>32</b>
4.7 Determinação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ).....	<b>32</b>
4.8 Determinação da concentração de ATP mitocondrial.....	<b>32</b>
4.9 Inchamento mitocondrial meio hiposmótico de acetato de potássio...	<b>33</b>

4.10 Efluxo de Cálcio.....	33
4.11 Avaliação da interação do fipronil dessulfenil e do fipronil sulfona com a membrana mitocondrial.....	33
4.12 Produção de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	34
V. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
VI. RESULTADOS.....	34
6.1 Efeitos dos metabólitos fipronil dessulfenil e fipronil sulfona sobre a respiração de mitocôndrias isoladas de fígado de rato.....	34
6.2 Efeitos dos metabólitos fipronil dessulfenil e fipronil sulfona sobre o potencial de membrana mitocondrial.....	39
6.3 Efeitos dos metabólitos fipronil dessulfenil e fipronil sulfona sobre a concentração de ATP mitocondrial.....	43
6.4 Efeitos dos metabólitos fipronil dessulfenil e fipronil sulfona no inchamento mitocondrial em meio hiposmótica de acetato de potássio....	46
6.5. Efeitos dos metabólitos fipronil dessulfenil e fipronil sulfona no efluxo de cálcio mitocondrial.....	46
6.6. Avaliação da interação do fipronil dessulfenil e do sulfona com a membrana mitocondrial.....	49
6.7. Efeitos dos metabólitos fipronil dessulfenil e fipronil sulfona sobre o acúmulo de peróxido de hidrogênio mitocondrial.....	52
VII DISCUSSÃO.....	52
VIII CONCLUSÃO.....	56
IX REFERÊNCIAS.....	56

## Lista de Figuras

		Páginas
<b>FIGURA 1</b>	Morfologia básica das Mitocôndrias.....	20
<b>FIGURA 2</b>	Representação esquemática da cadeia respiratória mitocondrial	21
<b>FIGURA 3</b>	Representação do método polarográfico de avaliação da fosforilação oxidativa através da respiração mitocondrial.....	22
<b>FIGURA 4</b>	Representação do funcionamento dos canais do influxo de $Ca^{2+}$ pelo canal uniporter (UP) e efluxo pelo canal antiporter $Ca^{2+}/Na^{+}$ e pelo poro de transição de permeabilidade (PTP).....	24
<b>FIGURA 5</b>	Estrutura química do fipronil e seus metabólitos.....	28
<b>FIGURA 6</b>	Efeitos dos metabólitos fipronil dessulfenil e fipronil sulfona no estado 3 da respiração em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM.....	36
<b>FIGURA 7</b>	Efeitos do fipronil dessulfenil no estado 3 da respiração em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, energizadas com succinato de potássio 5 mM e acrescentado de rotenona 50 nM	37
<b>FIGURA 8</b>	Efeitos do fipronil dessulfenil 25 $\mu$ M ou fipronil sulfona 5 $\mu$ M no estado 4 da respiração mitocondrial.....	38
<b>FIGURA 9</b>	Efeito de moduladores no desacoplamento da respiração mitocondrial.....	39
<b>FIGURA 10</b>	Efeitos da adição do fipronil dessulfenil no potencial de membrana em mitocôndrias isoladas de fígado de rato.....	41
<b>FIGURA 11</b>	Efeitos da adição do fipronil sulfona no potencial de membrana em mitocôndrias isoladas de fígado de rato.....	42
<b>FIGURA 12</b>	Efeito da adição da Ciclosporina A (CsA) sobre o potencial de membrana mitocondrial.....	43
<b>FIGURA 13</b>	Efeitos do fipronil dessulfenil e fipronil sulfona na concentração de ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com malato mais glutamato.....	44
<b>FIGURA 14</b>	Efeitos do fipronil dessulfenil e fipronil sulfona na concentração de ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com succinato.....	45
<b>FIGURA 15</b>	Efeitos do fipronil dessulfenil e do fipronil sulfona (25 e 5 $\mu$ M, respectivamente) no inchamento mitocondrial em um meio hiposmótico de acetato de potássio.....	46
<b>FIGURA 16</b>	Efeitos da adição do fipronil dessulfenil e fipronil sulfona sobre a liberação de cálcio em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com succinato.....	48
<b>FIGURA 17</b>	Efeito da adição da Ciclosporina A (CsA) sobre a liberação de cálcio de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos energizadas com succinato.....	49
<b>FIGURA 18</b>	Interação do fipronil dessulfenil e do fipronil sulfona com a membrana mitocondrial, avaliada com os métodos de fluorescência da sonda ANS e DPH.....	51
<b>FIGURA 19</b>	Efeito do fipronil dessulfenil e do fipronil sulfona sobre a geração de peróxido de hidrogênio mitocondrial.....	52

**Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA)**

## **Certificado**

Certificamos que o Projeto intitulado "**Mecanismos de toxicidade do fipronil no fígado de ratos**", protocolo nº 34/2012, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). Fábio Erminio Mingatto está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) do Curso de Zootecnia da UNESP de Dracena e foi aprovado pela referida Comissão.

Dracena, 23 de outubro de 2012.

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dra. Sirlei Aparecida Maestá  
Presidente da CEUA - UNESP Dracena

## **MECANISMOS DE TOXICIDADE DOS METABÓLITOS DO FIPRONIL, FIPRONIL DESSULFINIL E FIPRONIL SULFONA EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO**

**RESUMO** - O fipronil é um inseticida amplamente utilizado para controlar pragas nas plantações e em animais. Existem relatos de intoxicação devido à exposição de fipronil em mamíferos e o fígado é um alvo potencial. No presente estudo, foram avaliados os efeitos dos metabólitos do fipronil, fipronil dessulfínil e fipronil sulfona sobre a bioenergética, produção de espécies reativas de oxigênio e efluxo de cálcio em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. O fipronil dessulfínil (5 a 25  $\mu\text{M}$ ) inibiu o estado 3 da respiração em mitocôndrias energizadas com glutamato mais malato, substratos do complexo I da cadeia respiratória, e diminuiu o potencial de membrana mitocondrial, resultando em inibição da síntese de adenosina trifosfato. O metabólito dessulfínil também causou desacoplamento nas mitocôndrias energizadas com succinato e estimulou o efluxo de cálcio. O metabólito sulfona também atuou como inibidor e desacoplador mitocondrial e estimulou o efluxo de cálcio, porém em menores concentrações (0,5 a 5  $\mu\text{M}$ ). Os efeitos dos metabólitos do fipronil na bioenergética mitocondrial e homeostase do cálcio podem estar relacionados com os efeitos tóxicos do inseticida no fígado.

**Palavras-chave:** dessulfínil, fígado, fosforilação oxidativa, mitocôndrias, sulfona, toxicidade

## **MECHANISMS OF TOXICITY OF METABOLITES OF FIPRONIL, FIPRONIL DESULFINYL AND FIPRONIL SULFONE IN ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA**

**ABSTRACT** - Fipronil is an insecticide extensively used to control pests in crops and animals. There are reports of poisoning due to exposure of fipronil in mammals and the liver is a potential target. In this study, we evaluated the effects of metabolites of fipronil, fipronildesulfinyl and fipronilsulfone on the bioenergetics, reactive oxygen species production and calcium efflux from mitochondria isolated from rat liver. Desulfinyl (5 to 25  $\mu\text{M}$ ) inhibited state-3 respiration in mitochondria energized with glutamate plus malate, substrates of complex I of the respiratory chain, and decreased the mitochondrial membrane potential resulting in inhibition of synthesis. Desulfinyl also caused uncoupling in succinate-energized mitochondria and calcium efflux. The metabolite sulfone also acted as mitochondrial inhibitors and uncouplers and caused calcium efflux, but in lower concentrations (0.5 to 5  $\mu\text{M}$ ). These effects of metabolites of fipronil on mitochondrial bioenergetics and calcium homeostasis may be related to toxic effects of the insecticide in the liver.

**Keywords:** desulfinyl, liver, oxidative phosphorylation, mitochondria, sulfone, toxicity

## I INTRODUÇÃO

O fipronil é um inseticida amplamente utilizado para controlar uma variedade de pragas tais como baratas, mosquitos, gafanhotos, além de pulgas, carrapatos e piolhos em cães, gatos e bovinos (CHANTON et al., 2001;. AAJOURD; RAVANEL; TISSUT, 2003). Ele pertence à uma nova geração de inseticidas que foram desenvolvidos para reduzir os danos ao ambiente e aos mamíferos. Além disso, estes novos inseticidas servem como agentes de controle alternativos que são necessários porque alguns insetos desenvolveram resistência a compostos tais como organofosforados, carbamatos e piretróides. Assim, estes novos inseticidas demonstram grande eficácia em doses mais baixas em comparação com os agentes anteriormente citados (BOBE; COSTE; COOPER, 1997).

A ação tóxica do fipronil é devida à sua habilidade de agir como um bloqueador não competitivo dos canais de  $\text{Cl}^-$  ligados aos receptores do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), levando os insetos à morte por hiperexcitação neuronal e paralisia (ZHAO, 2004). Existem três principais vias de intoxicação com fipronil: oral, dermal e por inalação (JENNINGS et al. 2002; FUNG et al., 2003). No efeito inicial, o fipronil não aparenta ser um agente tóxico severo aos mamíferos, todavia, qualquer espécie poderá ser afetada se a dose utilizada for maior que a recomendada pelos fabricantes. De acordo com relatos apresentados na literatura científica, existem casos de intoxicação devido à exposição acidental ou utilização equivocada do composto (CHODOROWSKI; ANAND, 2004). Um caso de intoxicação aguda após ingestão de uma elevada dose de fipronil acarretou óbito humano (MOHAMED et al., 2004).

Além do sistema nervoso central (SNC), outros órgãos podem ser afetados pelo tratamento com fipronil, incluindo o fígado. Um estudo realizado por Silva (2008) avaliou os efeitos da exposição prolongada de ratos ao inseticida; foram observados hepatócitos edemaciados e aumento do peso do fígado em animais tratados com uma dose oral de  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ , o que corresponde a um décimo do valor da  $\text{DL}_{50}$  estabelecida para ratos (TINGLE et al., 2003).

Uma vez no sangue, o fipronil e os seus metabólitos são amplamente distribuídos, em particular nos tecidos adiposos, além de ter um elevado nível de

recirculação entero-hepática (HAINZL; CASIDA, 1996; MOHAMED et al, 2004). A formação do metabólito fipronil sulfona, que é derivado de uma reação de oxidação do grupo tioéter, corresponde à principal via de metabolismo hepático do composto, assim como a transformação no metabólito fipronil dessulfínil (CABONI; SAMMELSON; CASIDA, 2003; TANG et al, 2004). De acordo com Leghaitet al. (2009), esta oxidação é catalisada por enzimas do citocromo P450. Tanto o fipronil como seus metabólitos fipronil dessulfínil e fipronil sulfona podem induzir a morte celular em células HepG2 e em hepatócitos humanos (DAS et al., 2006).

O fígado desempenha diversas funções relacionadas com o metabolismo animal que recebe ambos os xenobióticos, bem como os nutrientes, os quais são absorvidos através do trato digestivo e da veia porta (GUILLOUZO, 1998). O processo de metabolismo dos xenobióticos realizado pelo citocromo P450 no fígado é denominado biotransformação (OGA, 2008). Sua principal função é aumentar a polaridade das substâncias para que essas sejam excretadas mais facilmente. Todavia, esse processo tem sido apontado como responsável pelos efeitos tóxicos de inúmeros compostos químicos, visto que os metabólitos produzidos podem exercer atividades adversas ao organismo animal (MINGATTO et al, 2007; MAIOLI et al., 2011) por alterar, a nível celular e molecular, algum componente celular fundamental (mitocôndria, por exemplo) modulando assim sua função (MEYER; KULKARNI, 2001).

A mitocôndria é responsável pela síntese de quase todo o ATP necessário à manutenção da estrutura e função celular. Na respiração mitocondrial os elétrons doados por substratos oxidáveis à cadeia respiratória na membrana mitocondrial interna, por meio de NADH ou FADH<sub>2</sub>, são transferidos ao O<sub>2</sub> reduzindo-o a H<sub>2</sub>O e a energia livre resultante é utilizada, através da fosforilação oxidativa, para sintetizar a molécula de ATP. De acordo com a hipótese quimiosmótica de Mitchell em associação com a hipótese do acoplamento conformacional de Boyer, o fluxo de elétrons é realizado através do bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, gerando um gradiente eletroquímico de H<sup>+</sup>. A energia livre liberada no retorno do H<sup>+</sup> à matriz mitocondrial induz alteração conformacional no componente F<sub>1</sub> da F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP sintase, liberando o ATP formado a partir de ADP e Pi em seus sítios catalíticos (MITCHELL, 1961; BOYER et al., 1973).

Evidências experimentais indicam que a mitocôndria representa um alvo preferencial e crítico para a ação de fármacos e toxinas. Os efeitos tóxicos sobre as mitocôndrias podem ocorrer por mecanismos diretos e indiretos, levando a disfunções mitocondriais, tais como alterações no transporte de elétrons na fosforilação oxidativa, na permeabilidade da membrana mitocondrial interna, no transporte de cálcio, no estado oxidativo, além de uma série de outros eventos que levam à depleção de ATP (NADANACIVA et al., 2007; DYKENS et al., 2008; SANTOS et al., 2009; GARCIA et al., 2010; CASTANHA-ZANOLI, 2012; LI et al., 2012).

Diante do exposto acima, uma maior investigação experimental sobre a atividade tóxica dos metabólitos fipronil dessulfínico e fipronil sulfona no fígado deve ser realizada uma vez que este é um órgão de suma importância ao organismo. Desta maneira, neste estudo foram avaliados os efeitos dos metabólitos do fipronil sobre a bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato, com o objetivo de auxiliar na prevenção e tratamento de animais intoxicados pela substância.

## **II REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Generalidades sobre o fígado e hepatotoxicidade**

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

Substâncias capazes de produzir danos aos hepatócitos são denominadas hepatotóxicas. Os hepatotóxicos intrínsecos afetam todos os indivíduos em

uma forma dose-dependente e, portanto, previsivelmente, podendo interferir com o metabolismo celular (hepatotóxicos ativos) ou tornarem-se tóxicos após biotransformação (hepatotóxicos latentes). A hepatotoxicidade idiossincrática, por outro lado, é dose-independente, podendo ser uma consequência do metabolismo anormal do xenobiótico em indivíduos susceptíveis (idiossincrasia metabólica) ou ser provocada por lesão hepática mediada pelo sistema imune (hepatite alérgica); nesses casos, mesmo pequenas concentrações de um fármaco podem provocar toxicidade. A atividade do fígado no metabolismo de substâncias exógenas é mediada principalmente pelo citocromo P450 (CYP). As enzimas do CYP são uma superfamília de monooxigenases, muitas das quais são responsáveis por metabolizar xenobióticos. Apesar de existirem 18 famílias destas enzimas em humanos, as famílias 1-4 parecem possuir o maior envolvimento no metabolismo de químicos exógenos. Dentro dessas famílias, existem importantes subfamílias e isoformas que contribuem substancialmente ao metabolismo de xenobióticos. Algumas das isoformas de CYP hepáticas mais importantes incluem 3A4, 2C19, 1A1, 2B6 e 3A5 (CABONI et al., 2003; TANG et al., 2004, DAS et al., 2006).

Embora as reações de biotransformação estejam associadas ao processo de desintoxicação, em alguns casos o metabolismo do xenobiótico é prejudicial às células devido à produção de metabólitos altamente reativos, mais tóxicos do que o composto de origem, entre eles, eletrófilos, radicais e espécies reativas de oxigênio (ERO); estes, por sua vez, podem reagir diretamente com macromoléculas celulares ou iniciar reações em cadeia.

Os diversos aspectos da lesão química ao fígado incluem a natureza dos agentes hepatotóxicos, a característica da lesão, o mecanismo para os efeitos hepatotóxicos, as circunstâncias de exposição e a importância médica e social. Algumas hepatotoxinas encontradas na natureza são produtos de plantas, metabolismo de fungos e bactérias ou são minerais. Muitos agentes hepatotóxicos são produtos da indústria química ou farmacêutica (TOLMAN e SIRRINE, 1998; ZIMMERMAN, 1998). Outros ainda são subprodutos ou resíduos de materiais industriais que, por poluir o ambiente, podem ter acesso a humanos e animais. A lesão hepatotóxica pode ter várias formas. Alguns agentes químicos levam à necrose, esteatose, cirrose ou carcinoma (SCHOENTAL, 1963; TOLMAN e

SIRRINE, 1998; ZIMMERMAN, 1998). Outros levam apenas a interferências na secreção biliar e icterícia, com pequena ou nenhuma lesão evidente ao parênquima hepático (ROUILLER, 1964; ZIMMERMAN, 1998). Alguns produzem curiosas lesões degenerativas ou vasculares.

## 2.2 Propriedades das mitocôndrias

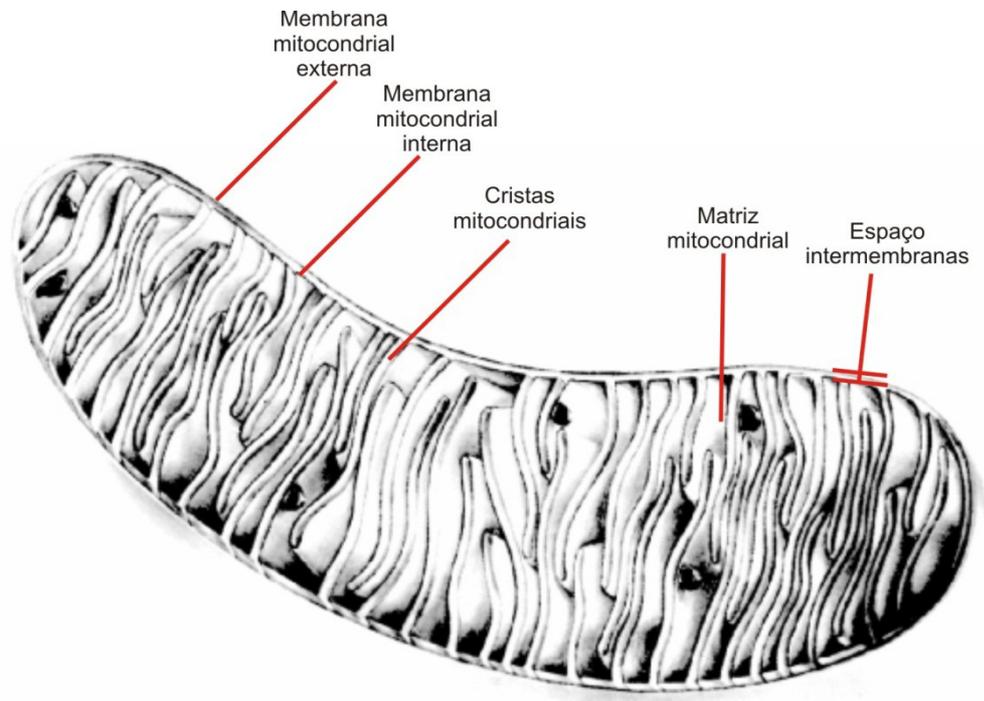
As mitocôndrias são organelas intracelulares com dimensões e formas diversas, dependendo dos tecidos e estados metabólicos nos quais se localizam (DAUM, 1985). Podem apresentar de 0,2 a 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro, de 2 a 8  $\mu\text{m}$  de comprimento e são responsáveis pela respiração celular (PIMENTEL,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

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

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

Já a membrana mitocondrial interna é formada por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e cardiolipina (DAUM, 1985). É impermeável à maioria das moléculas pequenas e íons, sendo necessária a presença de transportadores específicos para que outras espécies químicas possam atravessá-la (NELSON; COX, 2011). É permeável ao oxigênio molecular, dióxido de carbono, óxido nítrico e água. Apresenta muitas invaginações ou cristas mitocondriais, recentemente reconstruídas tridimensionalmente, caracterizando grande complexidade. (figura 1) (FREY; MANNELLA, 2000). Nestas cristas, localizam-se os componentes da cadeia respiratória e a ATP sintase (NELSON; COX, 2011). A matriz mitocondrial, além do

DNA, contém enzimas pertencentes ao ciclo de Krebs,  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e vias de oxidação dos aminoácidos (NELSON; COX, 2011).



**Figura 1** - Morfologia básica das mitocôndrias (Fonte: SCHEFFLER, 1999).

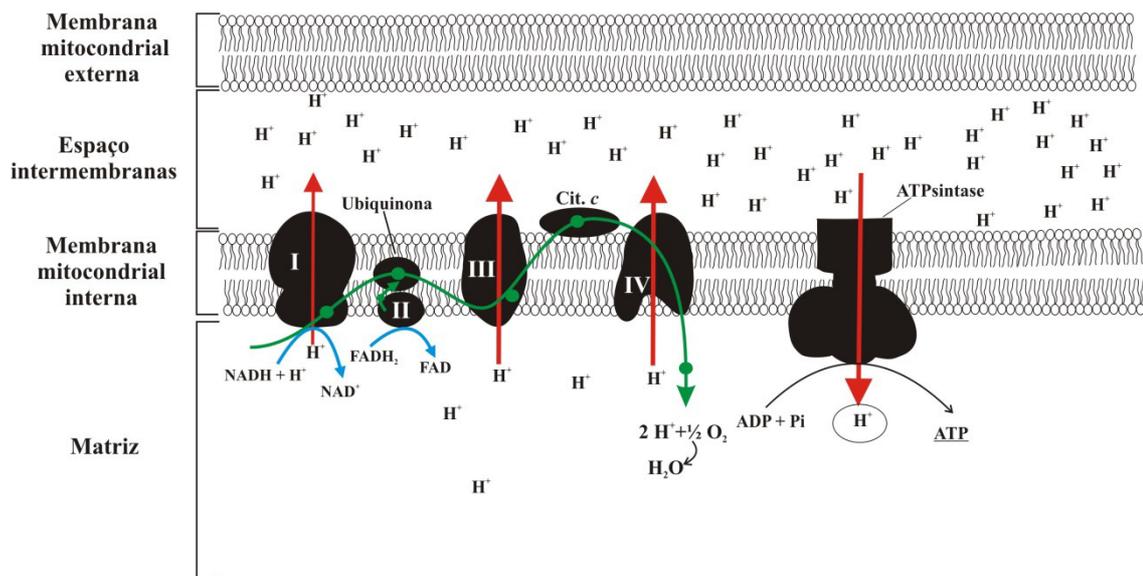
### 2.2.1 Mitocôndria e função energética

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

Os elétrons doados por substratos oxidáveis à cadeia respiratória na membrana mitocondrial interna, por meio de NADH ou FADH<sub>2</sub>, são transferidos ao O<sub>2</sub> reduzindo-o a H<sub>2</sub>O (respiração mitocondrial). A transferência dos elétrons das coenzimas NADH e FADH<sub>2</sub>, ocorre através dos equivalentes redutores NADH desidrogenase (Complexo I) e succinato desidrogenase (complexo II),

respectivamente. Os complexos I e II recebem e transferem os elétrons para a ubiquinona por meio de uma série de centros Fe-S, que por sua vez os transfere para a ubiquinona-citocromo c oxidorreductase (Complexo III), e este para a citocromo oxidase (Complexo IV) por meio do citocromo c, uma proteína que se localiza na face externa da membrana mitocondrial interna.

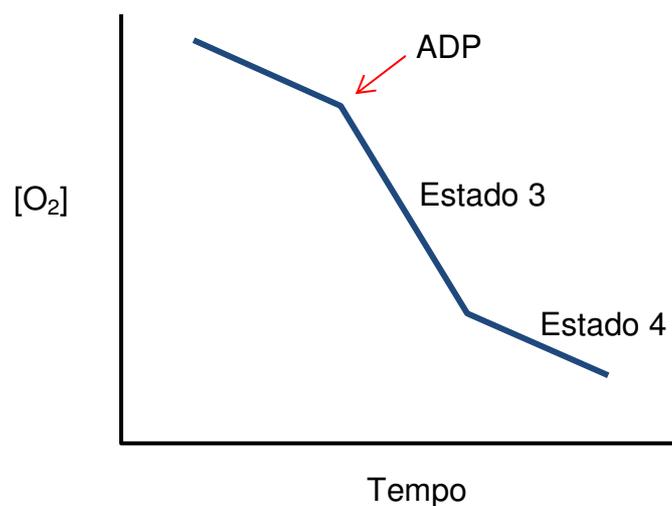
O fluxo de elétrons segue ao longo da cadeia respiratória resultando no bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial interna gerando um gradiente eletroquímico de  $H^+$ . A energia livre liberada no retorno do  $H^+$  à matriz mitocondrial induz alteração conformacional no componente  $F_1$  da  $F_0F_1$ -ATP sintase, liberando o ATP formado a partir de ADP e  $P_i$  em seus sítios catalíticos (Figura 2)(MITCHELL,1961; BOYER et al., 1973).



**Figura 2** - Representação esquemática da cadeia respiratória mitocondrial acoplada à síntese de ATP (MAIOLI, 2012).

Em 1955, Chance e Williams descreveram a cinética de óxido/redução dos componentes da cadeia respiratória mitocondrial e definiram os conceitos operacionais do estado metabólico mitocondrial e controle respiratório. Em estudos desenvolvidos no ano seguinte, os pesquisadores desenvolveram o método polarográfico para medir a fosforilação oxidativa, estabelecendo cinco condições ou

estados, capazes de controlar a velocidade da respiração mitocondrial. O estado 1 é caracterizado pela ausência de ADP e substrato respiratório; o estado 2 é aquele no qual o substrato respiratório é o fator limitante da respiração; o estado 3 contém todos os componentes em concentrações adequadas, sendo a velocidade de fosforilação do ADP o fator limitante; o estado 4 (basal), no qual a respiração é limitada pela disponibilidade de ADP e o estado 5, caracterizado pela ausência de oxigênio (MORELAND, 2001)(Figura 3).



**Figura 3** - Representação do método polarográfico de avaliação da fosforilação oxidativa por meio da respiração mitocondrial.

### 2.2.1.1 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. 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  $P_i$  (MITCHELL, 1961; BOYER et al., 1973).

### 2.2.1.2 Inibidores e desacopladores

Como mencionado anteriormente, a produção de ATP via fosforilação oxidativa é dependente do acoplamento existente entre a cadeia de transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa, e inúmeras substâncias denominadas, de maneira geral como inibidores e desacopladores diminuem ou impedem a fosforilação do ADP realizada pela ATP sintase.

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

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

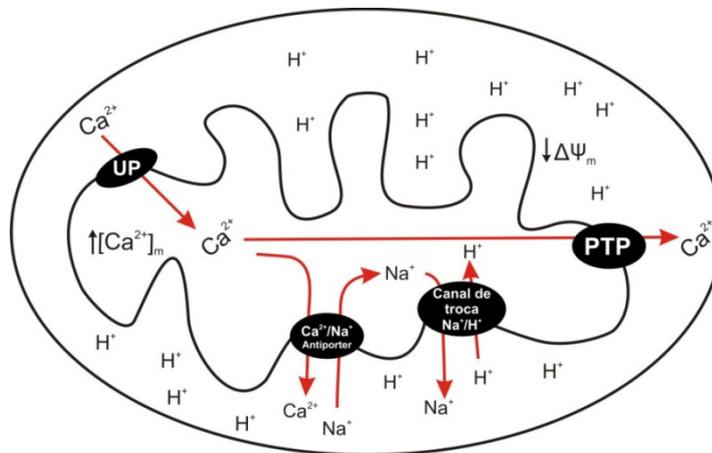
### 2.2.2 Mitocôndria e homeostase intracelular de $Ca^{2+}$

O íon cálcio é conhecido por ser importante na regulação de muitas reações enzimáticas, e o aumento da sua concentração no citossol da ordem de  $1 \times 10^{-7}$  M

para uma concentração  $\geq 1 \times 10^{-6}$  M pode promover drásticas modificações em todo o padrão metabólico da célula eucariótica (SKULACHEV, 1999).

A mitocôndria além de estar envolvida no processo de produção de energia atua, juntamente com o retículo endoplasmático, ativamente sobre a homeostase intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , pois dependendo da concentração do íon no citossol e da necessidade da célula, a mitocôndria pode tanto captá-lo quanto liberá-lo. São três os mecanismos utilizados pela organela para o transporte do cálcio: canal uniporter, o antiporter  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  e o antiporter  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  (Figura 4) (SKULACHEV, 1999).

Os canais uniporter e antiporter são responsáveis pelo influxo e efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  da mitocôndria, respectivamente. O influxo do cálcio através da membrana mitocondrial interna pelo canal uniporter é impulsionado pelo potencial de membrana mitocondrial, ou seja, a captação do íon cálcio por esse canal consome o potencial de membrana formado (BROOKES et al., 2004; GUNTER, 1994). O efluxo, por sua vez, é mediado pelos canais antiporter  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  que operam por meio de trocas eletroneutras (GUNTER et al., 1994). Além dos dois canais antiporter, o poro associado à transição de permeabilidade mitocondrial (PTP) compõe outra via de efluxo de cálcio (Figura 4).



**Figura 4** - Representação do funcionamento dos canais do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo canal uniporter (UP) e efluxo pelo canal antiporter  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  e pelo poro de transição de permeabilidade (PTP).  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  = concentração mitocondrial de cálcio (Adaptado de BOOKES et al., 2004).

### 2.3 Fipronil e seus metabólitos dessulfinil e sulfona

O fipronil (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil]-4-[(trifluorometil)sulfinil]-1H-pirazol-3-carbonitril) foi lançado em 1993 como o primeiro inseticida fenilpirazol, sendo este um composto sintético produzido pela companhia Rhône-Poulenc Agro em 1987 (TINGLE et al., 2003).

Esse inseticida tem sido extensivamente utilizado para o controle de uma variedade de pestes, como baratas, mosquitos, gafanhotos, pulgas, carrapatos, piolhos de cães, gatos e bovinos (CHANTON et al. 2001; AAJOUND et al. 2003). Faz parte da nova geração de inseticidas desenvolvidos recentemente com o intuito de reduzir danos ao meio ambiente e mamífero, além de servirem como alternativa à resistência de alguns insetos a outros compostos inseticidas como organofosfatos, piretróides e carbamatos, desempenhando assim, grande efetividade em doses inferiores aos agentes anteriormente citados (BOBE et al. 1997).

A ação tóxica do fipronil é devido à sua habilidade de agir como um bloqueador não competitivo dos canais de Cl<sup>-</sup> ligados aos receptores do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), levando os insetos à morte por hiperexcitação neuronal e paralisia (ZHAO, 2004). Uma maior afinidade para receptores GABA de insetos do que de mamíferos resulta em menor toxicidade a estes em relação a outros inseticidas. Sua seletividade deve-se à elevada capacidade do fipronil de bloquear a isoforma dos canais de Cl<sup>-</sup> do receptor GABA de insetos (HAINZL; CASIDA, 1996) Apesar disso, o fipronil pode ligar-se aos receptores GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>C</sub> de mamíferos (IKEDA et al., 2001; RATRA et al., 2002). O fipronil é metabolizado em fipronil dessulfinil e fipronil sulfona (Figura 5) por oxidação do grupo tioéter e fotodegradação, respectivamente, e que são mais persistentes e menos seletivos aos receptores GABA, além de serem mais tóxicos a insetos, mamíferos, organismos aquáticos e pássaros em relação ao composto original (DAS et al., 2006). Em relação aos metabólitos fipronil sulfona e fipronil dessulfinil apresentam respectivamente, afinidades 6 e 15 vezes maiores aos receptores GABA do cérebro humano (HAINZL et al., 1998).

Além do sistema nervoso central (SNC), outros órgãos podem ser afetados pelo tratamento com fipronil, Silva (2008) avaliando os efeitos da exposição

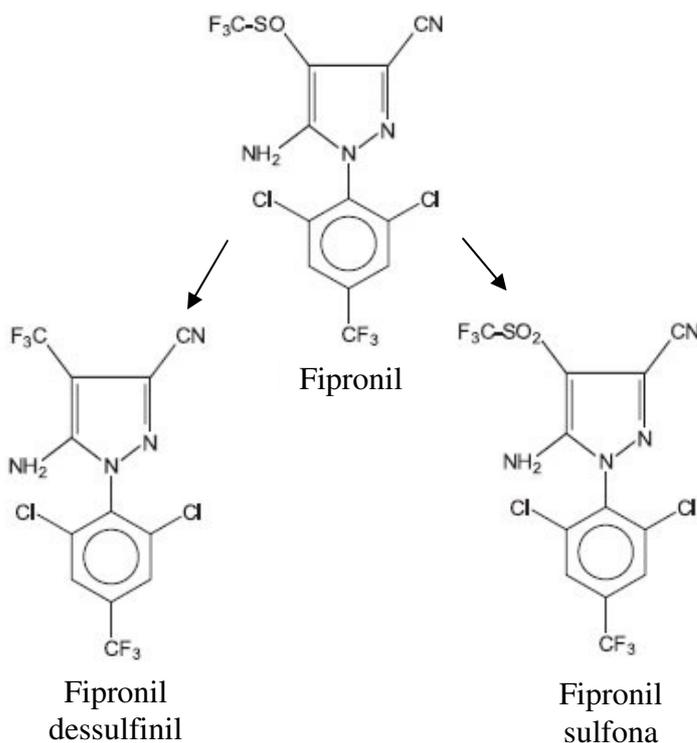
prolongada de ratos ao composto, foi dentre eles o fígado, pois além desse ter efeito de intoxicação, ainda produz metabólitos mais agressivos. Em estudo recente realizado foi observado tumefação das células hepáticas e aumento do peso do fígado em animais tratados com 10 mg/kg administrada via gavagem. A dose utilizada corresponde a um décimo da DL<sub>50</sub> em ratos estabelecida por Hainzl e Casida (1996), de 100 mg/kg.

Existem 3 principais vias de intoxicação com fipronil: oral, dermal e por inalação (JENNINGS et al. 2002; FUNG et al., 2003). Em primeira instância, o fipronil não representa um tóxico severo aos organismos acima citados, todavia, qualquer espécie poderá ser afetada se a dose utilizada for maior que a recomendada pelos fabricantes. De acordo com relatos apresentados na literatura, existem casos de intoxicação devido à exposição acidental ou utilização equivocada do composto (CHODOROWSKI; ANAND, 2004). Um caso de intoxicação aguda após ingestão de uma elevada dose de fipronil acarretou em morte humana (MOHAMED et al., 2004).

Não se pode afirmar se os sintomas causados por intoxicação, tais como sudorese, náuseas, vômitos e agitação resultam de toxicidade neurológica, mas relatos de convulsões em coelhos sugerem que o SNC seja o maior alvo do fipronil e seus metabólitos dessulfinil e o sulfona (WEBSTER, 1999). Durante alimentação crônica de ratos com fipronil, sintomas como apreensão, inclusive causando fatalidades, foram observados. Outros efeitos relatados foram diminuição do ganho de peso, reduzido consumo de alimento e eficiência na conversão do alimento, diminuídas medidas hematológicas, mudanças nos hormônios tireoidianos, aumento no peso do fígado e progressiva nefropatia senil. Já os efeitos de contato local com o fipronil foram brandos, constando apenas de irritação transitória dos olhos e pele (EPA, 1996). Também existem evidências de que o fipronil e seus metabólitos podem ser bioacumulados, particularmente em peixes, ou ainda causar câncer de tireóide em ratos (TINGLE et al., 2003).

Existem poucos estudos relacionados ao metabolismo do fipronil em mamíferos. Uma vez na corrente sanguínea, o fipronil e seus metabólitos são amplamente distribuídos, particularmente em tecidos gordurosos, além de apresentarem um alto nível de recirculação entero hepática (HAINZL; CASIDA, 1996; MOHAMED et al., 2004). Foi constatado que a formação do metabólito fipronil

sulfona derivado de uma reação de oxidação corresponda à principal via do metabolismo hepático deste composto (CABONI et al., 2003; TANG et al., 2004). De acordo com Leghait et al. (2009), essa reação de oxidação é catalisada pelas enzimas do CYP. O tratamento de animais com fipronil provoca a elevação na atividade do CYP no fígado, sendo a isoforma 3A4 considerada a principal enzima hepática responsável pela formação dos metabólitos de acordo com (Figura 5) (CABONI et al., 2003; TANG et al., 2004; DAS et al., 2006). Tanto o fipronil quanto seus metabólitos fipronil dessulfonil e fipronil sulfona podem induzir a morte celular em culturas de hepatócitos humanos. Das et al. (2006) sugeriram que a formação do metabólito seja uma forma de ativação da toxicidade do composto, o que potencializaria seus efeitos. De acordo com Mohamed (2004), obteve em seus resultados caso de morte pelo composto fipronil. Os casos na literatura de intoxicação por acidente ou uso incorreto do composto fipronil (CHODOROWSKI; ANAND, 2004; LEE et al., 2010). Vidal (2011) ressalta a citotoxicidade do fipronil que leva a célula a apoptose.



**Figura 5** - Estrutura química do fipronil e seus metabólitos dessulfenil e sulfona. Adaptado de Kurzet al. (2013).

## 2.4 Justificativa

Os estudos dos mecanismos de toxicidade do fipronil em sua grande maioria referem-se ao SNC. Além disso, não existem relatos disponíveis na literatura acerca dos mecanismos de ação dos metabólitos do fipronil, fipronil dessulfenil e fipronil sulfona sobre o metabolismo energético celular e estresse oxidativo. Dessa forma, o conhecimento bioquímico da ação desses metabólitos no fígado a nível mitocondrial é de extrema importância para o desenvolvimento de um método de intervenção caso os mamíferos apresentem um quadro de intoxicação pela substância.

### **III OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo geral**

Estudar os efeitos dos metabólitos do fipronil, dessulfenil e sulfona, em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos.

##### **3.1.1 Objetivo específico**

Avaliar os efeitos do fipronil dessulfenil e do fipronil sulfona, com relação a parâmetros associados à bioenergética, estresse oxidativo e homeostase de cálcio com o intuito de elucidar os mecanismos de toxicidade da substância.

#### **3.2 Hipótese**

A toxicidade do fipronil está relacionada com o efeito dos seus metabólitos, fipronil dessulfenil e fipronil sulfona sobre a bioenergética, homeostase de cálcio e estresse oxidativo em mitocôndrias.

### **IV MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 Avaliação Ética**

A Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) do Câmpus da UNESP de Dracena certificou que os procedimentos utilizando animais estão de acordo com os “Princípios Éticos na Experimentação Animal” (Protocolo nº. 34/2012).

#### **4.2 Animais**

Ratos Wistar machos (200 g), provenientes do Biotério Central da UNESP (Campus de Botucatu), ficaram alojados no Biotério do Câmpus 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*. Os animais não receberam tratamento prévio até o momento da decapitação uma vez que os experimentos com o fipronil dessulfenil e o fipronil sulfona foram realizados *in vitro*, empregando mitocôndrias isoladas de fígado.

### 4.3 Reagentes

Em todos os ensaios, os reagentes de maior alto grau analítico disponível comercialmente foram empregados e as soluções foram preparadas com água ultra-filtrada em sistema purificador Millipore DirectQ-3<sup>®</sup> (Milli-Q<sup>®</sup>).

O fipronil dessulfenil foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo, Brasil) e o fipronil sulfona foi importado do Laboratório Dr. Ehrenstorfer-Schäfers (Augsburg, Alemanha). Ambos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO).

### 4.4 Isolamento das mitocôndrias de fígado de rato

O método da centrifugação diferencial (PEDERSEN et al., 1978) foi aplicado no isolamento das mitocôndrias provenientes de ratos Wistar machos, com 180-200 g. Os animais foram eutanasiados por decaptação em guilhotina e a exposição do fígado ocorreu mediante incisão bilateral na cavidade abdominal, com remoção imediata, sendo picotado em pequenos fragmentos e imersos rapidamente em 50 mL de meio contendo sacarose 250 mM, ácido etilenoglicol bis(β-aminoetiléter) 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 foi 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 um período máximo de 3 horas após o isolamento.

#### **4.5 Determinação das proteínas mitocondriais**

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

#### **4.6 Determinação do consumo de oxigênio mitocondrial**

O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias 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 Williams (1955). As mitocôndrias (1 mg de proteína/mL) foram incubadas sob agitação (volume final de 1 mL), em uma câmara fechada e termostalizada 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<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM (pH 7,4) e energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM ou succinato de potássio 5 mM (acrescido de rotenona 50 nM). Diferentes concentrações (5, 10, 15 e 25 µM) do fipronil dessulfínil e (0,5, 1, 2,5 e 5 µM) do fipronil sulfona foram adicionadas e as velocidades de consumo de oxigênio foram determinadas por meio do software Strathkelvin Oxygen 782 System (versão 3.0, 2005) e expressas como nmol O<sub>2</sub> consumido/min/mg de proteínas. A respiração do estado 3 teve início após a adição de 400 nmols de ADP.

#### **4.7 Determinação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ )**

O potencial de membrana mitocondrial 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 (1 mg de proteína/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  $\mu$ M. Os substratos usados foram glutamato 5 mM + malato 5 mM ou succinato 5 mM (acrescido de rotenona 2,5  $\mu$ M). Os resultados foram expressos como porcentagem em relação à fluorescência da amostra controle, ou seja, sem adição do fipronil dessulfínil ou do fipronil sulfona.

#### **4.8 Determinação da concentração de ATP mitocondrial**

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

#### **4.9 Inchamento mitocondrial em meio hiposmótico de acetato de potássio**

As mitocôndrias (0,45 mg de proteína) foram incubadas a 30°C em um meio contendo acetato de potássio 54 mM, HEPES-KOH 5 mM, pH 7,1, EGTA 0,1 mM, EDTA 0,2 mM, azida sódica 0,1 mM, albumina do soro bovino 0,1% (p/v), atractilósídeo 15  $\mu$ M, antimicina A 1  $\mu$ M e propanolol 0,3 mM, seguido por valinomicina 1  $\mu$ M e as substâncias testadas, em volume final de 1,5 mL. O inchamento foi monitorado pela diminuição da absorvância em 540 nm em um espectrofotômetro modelo DU-800 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) (MINGATTO et al., 2000).

#### **4.10 Efluxo de cálcio**

O efluxo de cálcio nas mitocôndrias intactas (2 mg de proteína) foi monitorado pelas variações na absorvância do corante arsenazo III, entre 685 e 675 nm, em um meio contendo 125 mM, KCl 65 mM, HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4, acrescido de  $\text{CaCl}_2$  10  $\mu$ M (volume final 2 mL) (Scarpa, 1979). O efluxo do íon foi calculado em porcentagem em relação ao efeito do desacoplador CCCP.

#### **4.11 Avaliação da interação do fipronil dessulfínil e do fipronil sulfona com a membrana mitocondrial**

As mitocôndrias foram incubadas a 37°C em meio contendo sacarose 125 mM, KCl; 65 mM, HEPES-KOH 10 mM, pH 7,2, com ANS (1-anilinoftaleno-8-sulfonato) 75  $\mu$ M (2 mg de proteína) ou DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno) 0,5  $\mu$ M (0,5 mg de proteína), mais CCCP 1  $\mu$ M antes que as substâncias testadas fossem adicionadas (2 mL de volume final). A fluorescência foi medida em espectrofluorímetro modelo RFPC 5301 (Shimadzu, Tokyo, Japão) em comprimentos de onda de 380 e 485 nm para excitação e emissão, respectivamente, para ANS (Slavík, 1982) e 377 e 431 nm, respectivamente, para DPH (Lee et al., 1999).

#### **4.12 Produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelas mitocôndrias de fígado foi avaliada por meio da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Votyakova e Reynolds, 2001). As mitocôndrias (0,5 mg/mL) energizadas com glutamato 5 mM mais malato 5 mM ou succinato 5 mM (acrescido de rotenona 50 nM) foram incubadas com Amplex Red 25 µM e a enzima peroxidase de raiz forte 0,025 U/mL, e a fluorescência foi medida em espectrofluorímetro modelo RFPC 5301 (Shimadzu, Tokyo, Japão) em comprimentos de onda de 563 e 587 nm para excitação e emissão, respectivamente.

### **V ANÁLISE ESTATÍSTICA**

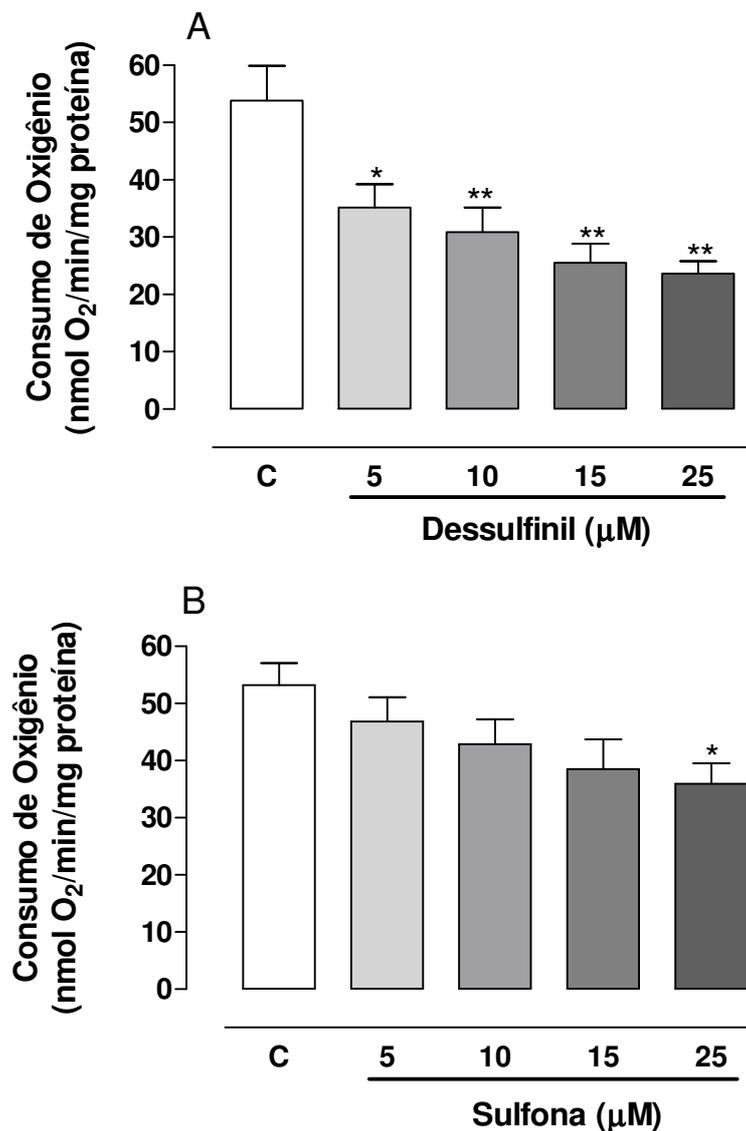
A significância estatística dos dados experimentais foi determinada pelo teste de análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Dunnett, comparando o grupo tratado e o controle, sendo considerados estatisticamente significantes resultados com valores de  $P < 0,05$ . As análises foram realizadas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

### **VI RESULTADOS**

#### **6.1 Efeitos do fipronil dessulfínil e do fipronil sulfona sobre a respiração de mitocôndrias isoladas de fígado de rato**

Os efeitos da adição do fipronil dessulfínil e do fipronil sulfona nas doses de 5 a 25 µM sobre a velocidade de consumo de oxigênio no estado 3 da respiração mitocondrial foram avaliados em dois protocolos experimentais: no primeiro experimento, os substratos oxidáveis foram o glutamato 5 mM mais o malato 5 mM, os quais são substratos do complexo da cadeia respiratória; no segundo, foi usado o succinato 5 mM, um substrato do complexo II da cadeia respiratória, acrescentado

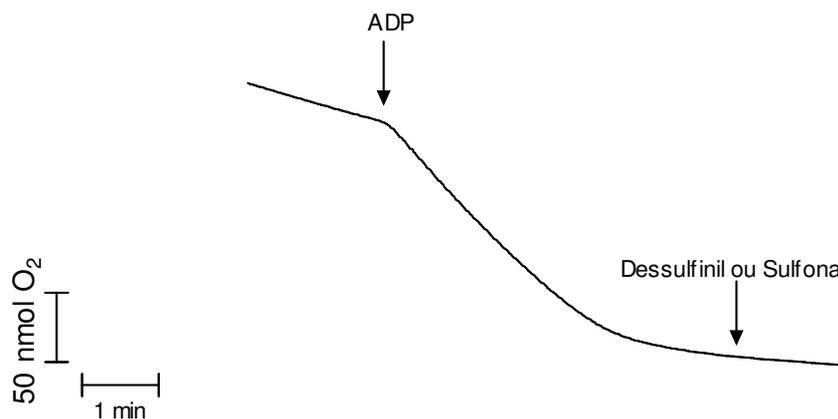
de um inibidor do complexo I, rotenona 50 nM. Ambos os metabólitos inibiram a atividade respiratória no complexo I de maneira dose-dependente (Figuras 6A e 6B), sendo que o fipronil dessulfínil apresentou efeito significativo a partir de 5  $\mu\text{M}$ , enquanto o efeito do fipronil sulfona foi significativo somente na maior concentração testada (25  $\mu\text{M}$ ); nenhum dos dois metabólitos inibiu a respiração de estado 3 em mitocôndrias energizadas com o succinato (resultados não apresentados).



**Figura 6** - Efeitos do fipronil dessulfenil (A) e do fipronil sulfona (B) no consumo de oxigênio do estado 3 da respiração em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de cinco experimentos com diferentes preparações mitocondriais. \*\*\*Significativamente diferente do controle (\* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$ ). C = controle, sem adição dos metabólitos.

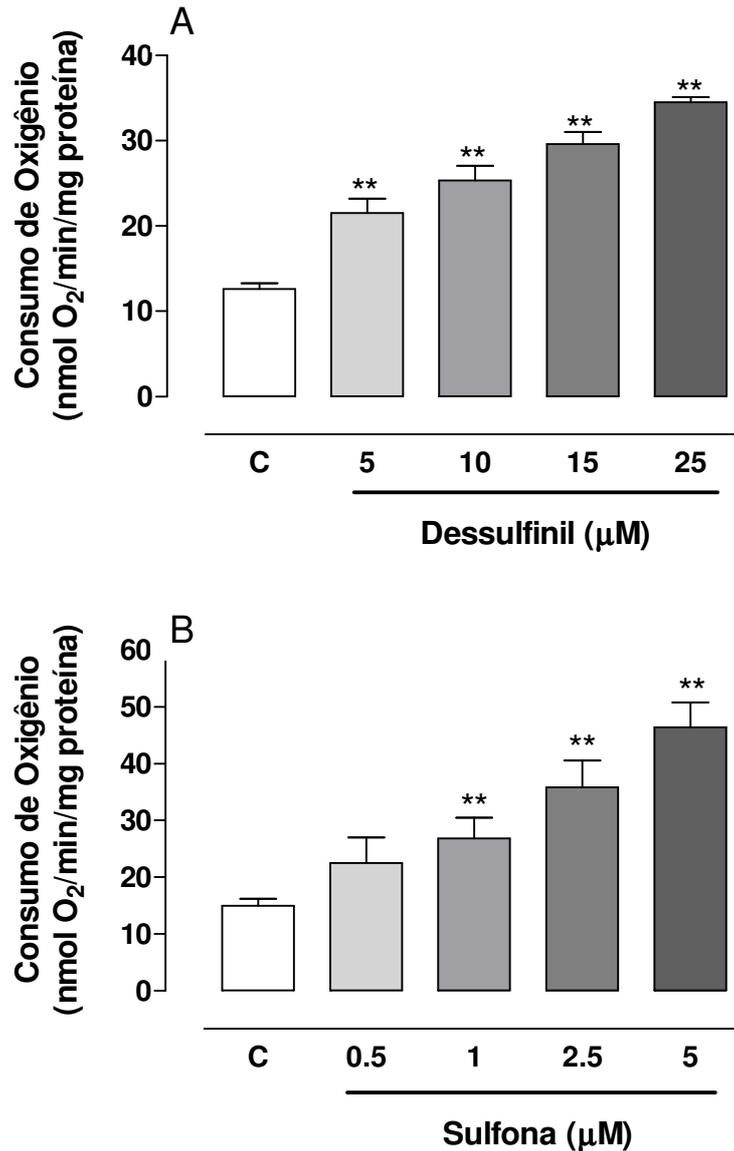
Após observar que o fipronil dessulfenil e o fipronil sulfona inibiram o complexo I da cadeia respiratória, um ensaio foi realizado para avaliar seus efeitos sobre a

velocidade de consumo de oxigênio no estado 4 da respiração mitocondrial nos dois protocolos experimentais citados acima. Os metabólitos não apresentaram efeito sobre o consumo de oxigênio em mitocôndrias energizadas com glutamato + malato conforme observado na Figura 7.



**Figura 7** - Efeitos do fipronil dessulfetil (25  $\mu$ M) ou fipronil sulfona (5  $\mu$ M) no estado 4 da respiração mitocondrial, avaliados após o consumo total de ADP, em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM. A figura é representativa de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

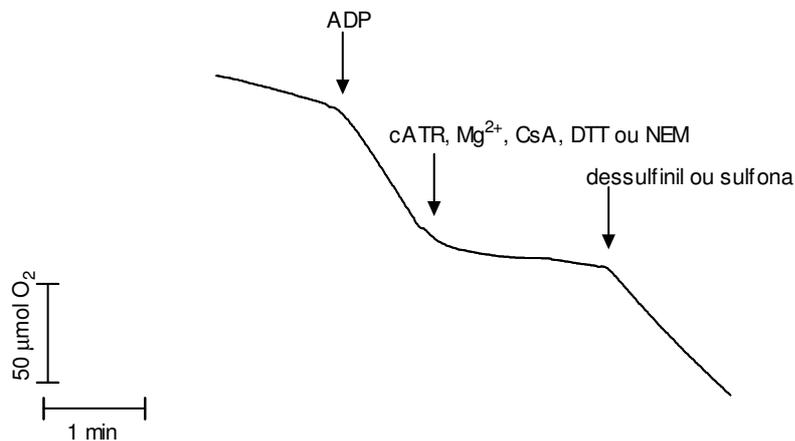
Ambos os metabólitos estimularam a respiração de maneira dose-dependente nas mitocôndrias energizadas com succinato (Figuras 8A e 8B). O fipronil dessulfetil apresentou efeito significativo na faixa de concentração compreendida entre 5 a 25  $\mu$ M, enquanto que o fipronil sulfona mostrou-se mais potente com relação a esse efeito o qual foi significativo em uma faixa de concentração que variou entre 0,5 a 5  $\mu$ M.



**Figura 8** - Efeitos do fipronil dessulfenil (A) e do fipronil sulfona (B) no consumo de oxigênio do estado 4 da respiração em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, energizadas com succinato 5 mM (+ rotenona 50 nM). Os valores representam a média  $\pm$  EPM de cinco experimentos com diferentes preparações mitocondriais. \*\*Significativamente diferente do controle (\*\* $P < 0,01$ ). C = controle, sem adição dos metabólitos.

A estimulação da respiração de estado 4 promovida pelos metabólitos dessulfenil e sulfona não foi inibida pelos moduladores carboxiatractilosídeo 5  $\mu\text{M}$

(cATR), magnésio 1 mM ( $Mg^{2+}$ ), ciclosporina A 1  $\mu$ M (CsA), ditioneitol 1 mM (DTT) ou N-etilmaleimida 25  $\mu$ M (NEM), conforme observado na Figura 9.

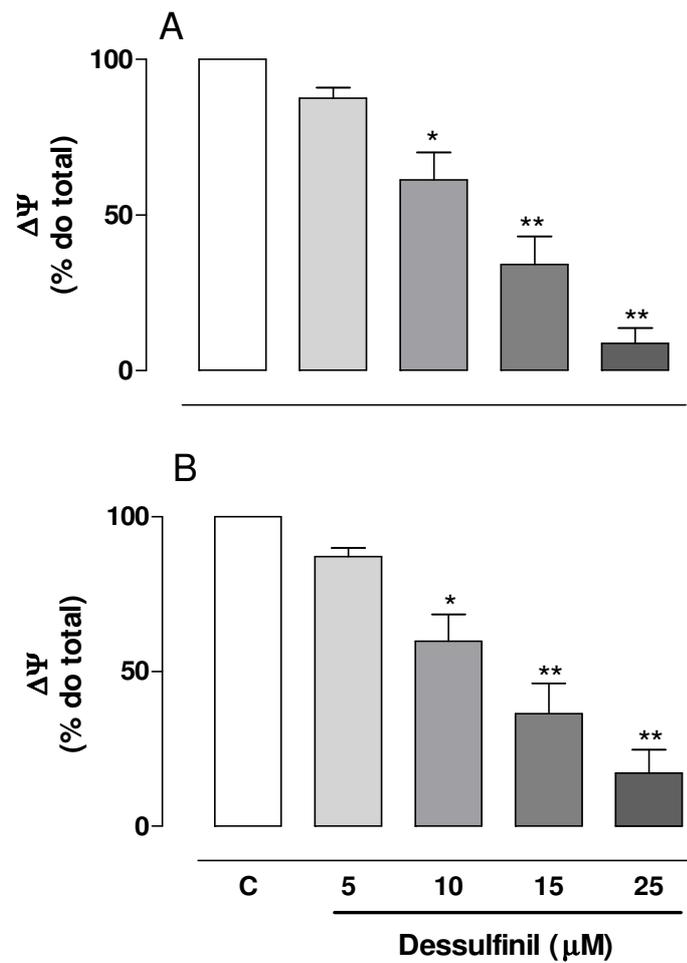


**Figura 9** - Efeitos dos moduladores no desacoplamento da respiração promovido pelos metabólitos dessulfínil e sulfona em mitocôndrias (1 mg de proteína/mL) isoladas de fígado de rato, energizadas com succinato 5 mM (+ rotenona 50 nM). A figura é representativa de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. As setas indicam a adição das substâncias. ADP: adenosina difosfato 400 nmols; cATR: carboxiatractilosídeo 5  $\mu$ M;  $Mg^{2+}$ : magnésio 1 mM; CsA: ciclosporina A 1  $\mu$ M; DTT: ditioneitol 1 mM; NEM: N-etilmaleimida 25  $\mu$ M.

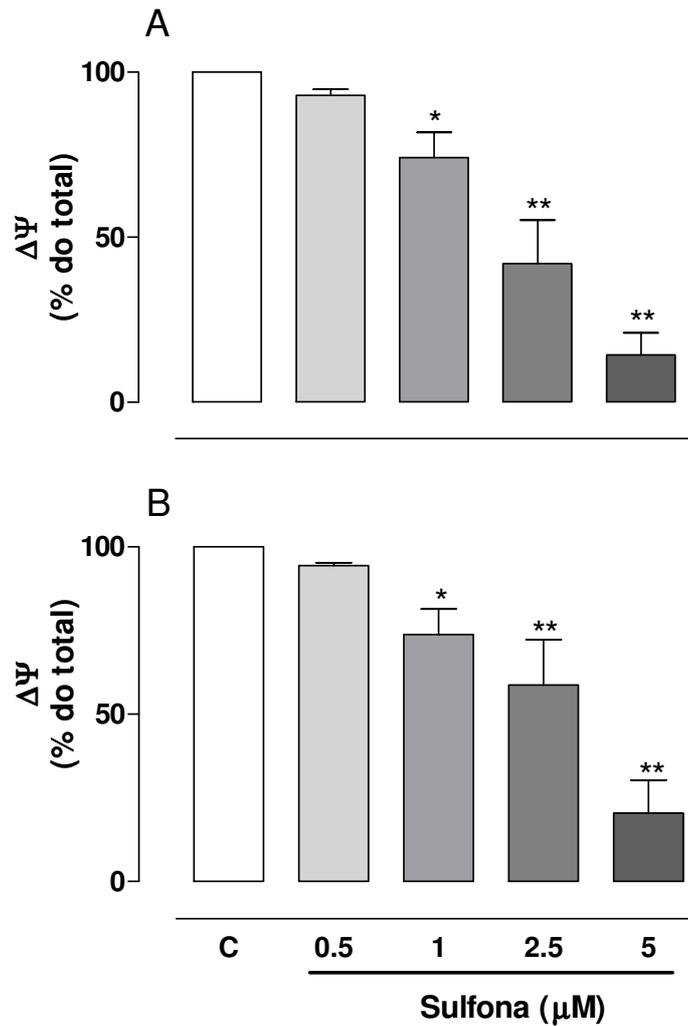
## 6.2 Efeitos dos metabólitos fipronil dessulfínil e do fipronil sulfona sobre o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi$ )

Os efeitos dos metabólitos sobre o potencial de membrana mitocondrial foi avaliado por espectrofluorimetria, utilizando-se a captação da safranina O como indicador do potencial e glutamato mais malato ou succinato, como substratos oxidáveis. Com a adição dos substratos às mitocôndrias ocorreu a formação do potencial de membrana e após 120 segundos, diferentes concentrações do fipronil

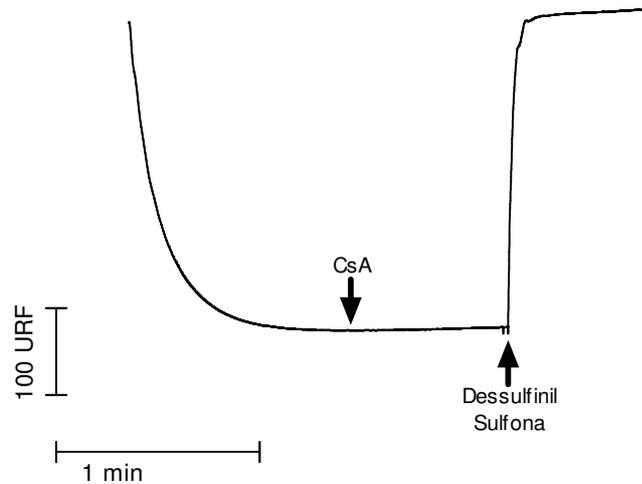
dessulfínil (5 a 25  $\mu\text{M}$ ) (Figuras 10A e 10B) ou do fipronil sulfona (0,5 a 5  $\mu\text{M}$ ) (Figura 11A e 11B) foram adicionados em experimentos independentes. Ambos os compostos diminuíram o potencial de membrana de maneira dose-dependente, tanto em mitocôndrias energizadas com substratos do complexo I quanto do complexo II da cadeia respiratória. O inibidor do poro de transição de permeabilidade mitocondrial ciclosporina A (1  $\mu\text{M}$ ) não preveniu a dissipação do  $\Delta\psi$  induzido pelos compostos (Figura 12).



**Figura 10** - Efeitos da adição do fipronil dessulfenil no potencial de membrana em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM **(A)** ou succinato 5 mM (+ 2,5 μM de rotenona) **(B)**. Os valores representam a média ± EPM de cinco experimentos com diferentes preparações mitocondriais. \*,\*\*Significativamente diferente do controle (\*P < 0,05 e \*\*P < 0,01). C = controle, sem adição dos metabólitos.



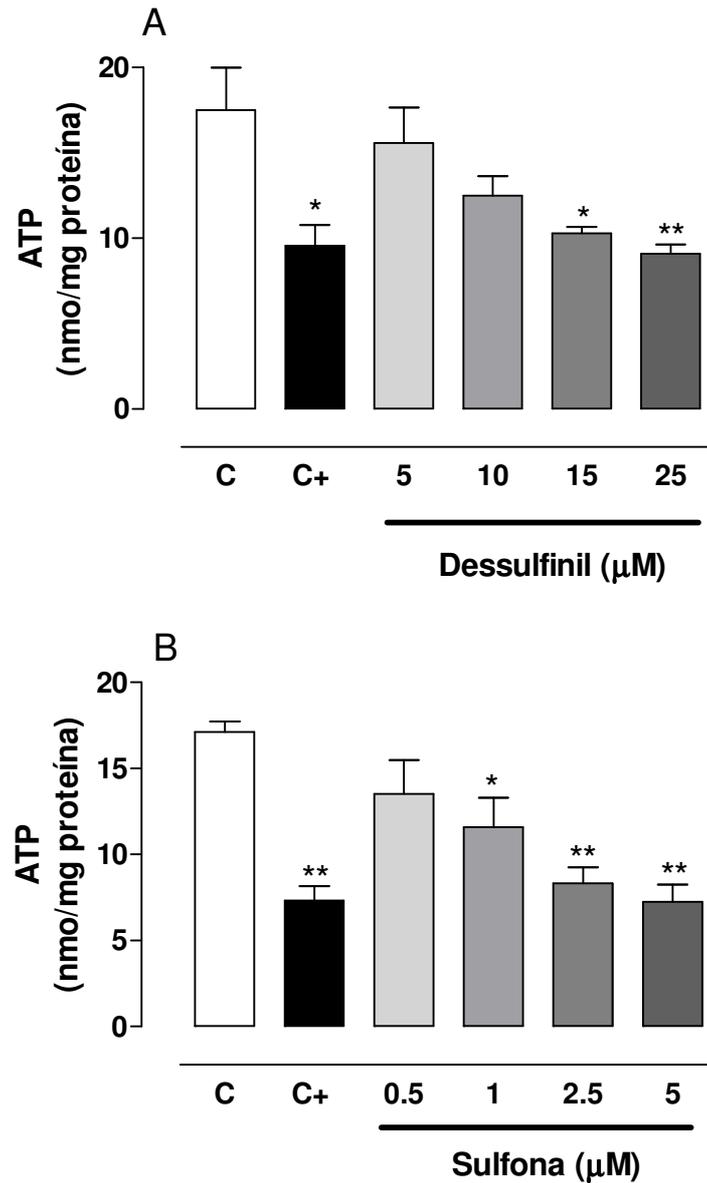
**Figura 11** - Efeitos da adição do fipronil sulfona no potencial de membrana em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM (A) ou succinato 5 mM (+ 2,5  $\mu\text{M}$  de rotenona) (B). Os valores representam a média  $\pm$  EPM de cinco experimentos com diferentes preparações mitocondriais. \*\*Significativamente diferente do controle (\* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$ ). C = controle, sem adição dos metabólitos.



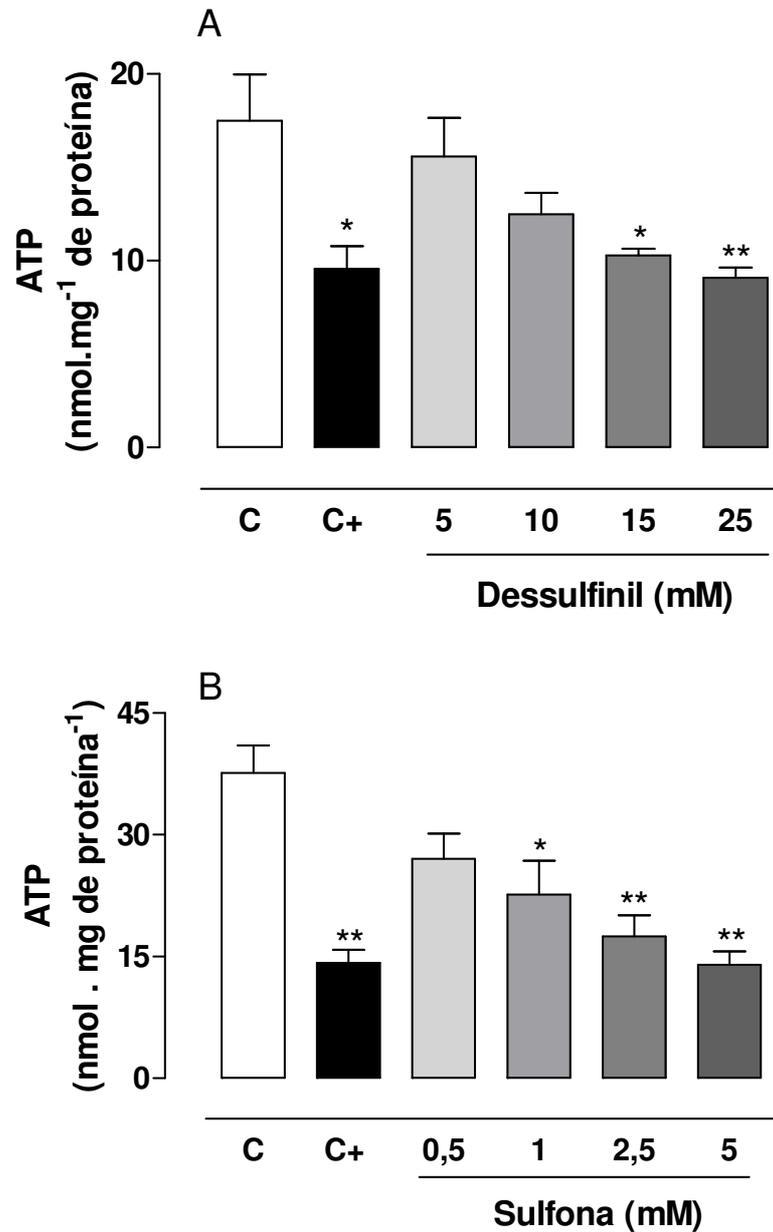
**Figura 12** - Efeitos dos moduladores no desacoplamento do potencial de membrana promovido pelos metabólitos dessulfínil e sulfona em mitocôndrias (1 mg de proteína/mL) isoladas de fígado de rato, energizadas com succinato 5 mM (+ rotenona 50 nM). A figura é representativa de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. As setas indicam a adição das substâncias. Ciclosporina A (CsA) e dessulfínil ou sulfona.

### 6.3 Efeitos dos metabólitos fipronil dessulfínil e do fipronil sulfona sobre a concentração de ATP mitocondrial

Os efeitos dos metabólitos do fipronil, fipronil sulfona e fipronil dessulfínil na síntese de ATP pelas mitocôndrias isoladas foram avaliados nas mesmas condições da respiração mitocondrial 15 minutos após a incubação das mitocôndrias as substâncias na presença de glutamato mais malato (Figuras 13A e 13B). Em consonância com os resultados da respiração mitocondrial, ambos os metabólitos causaram uma diminuição dose-dependente significativa na concentração de ATP mitocondrial. Os mesmos resultados foram obtidos em mitocôndrias incubadas com os metabólitos na presença de succinato (Figuras 14A e 14B)



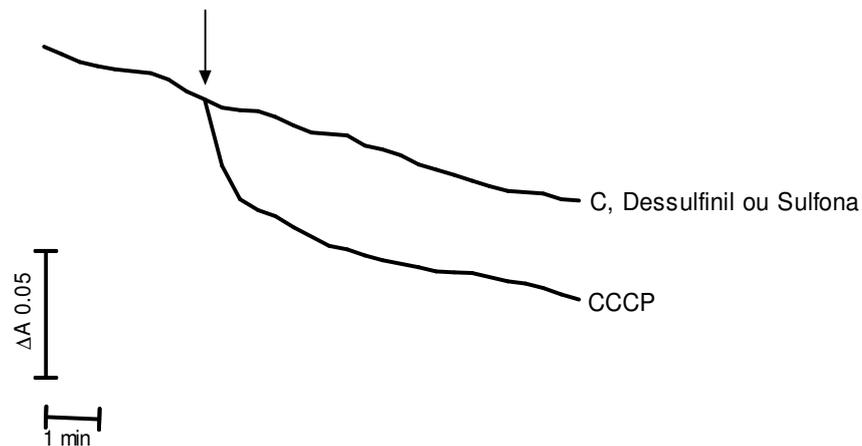
**Figura 13** - Efeitos do fipronil dessulfenil (A) e do fipronil sulfona (B) na concentração de ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, energizadas com glutamato 5mM + malato 5 mM. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. \*\*\*Significativamente diferente do controle (\* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$ ). C = controle, sem adição dos metabólitos ou rotenona; C+ = controle positivo, obtido pela adição de rotenona 2,5  $\mu\text{M}$ .



**Figura 14** - Efeitos do fipronil dessulfenil (A) e do fipronil sulfona (B) na concentração de ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, energizadas com succinato 5mM (+ 2,5  $\mu$ M de rotenona). Os valores representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. \*\*\*Significativamente diferente do controle (\* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$ ). C = controle, sem adição dos metabólitos ou rotenona; C+ = controle positivo, obtido pela adição de rotenona 2,5  $\mu$ M.

#### 6.4 Efeitos dos metabólitos fipronil dessulfenil e do fipronil sulfona no inchamento mitocondrial em meio hiposmótico de acetato de potássio

Para avaliar as propriedades protonofóricas dos metabólitos, foram investigados os seus efeitos no inchamento de mitocôndrias incubadas em meio hiposmótico de acetato de potássio. O fipronil dessulfenil e o fipronil sulfona em suas concentrações máximas testadas de 25  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente, não induziram o inchamento das mitocôndrias, o que indica que eles não atuam como os desacopladores clássicos da cadeia respiratória e da fosforilação oxidativa (Figura 15).

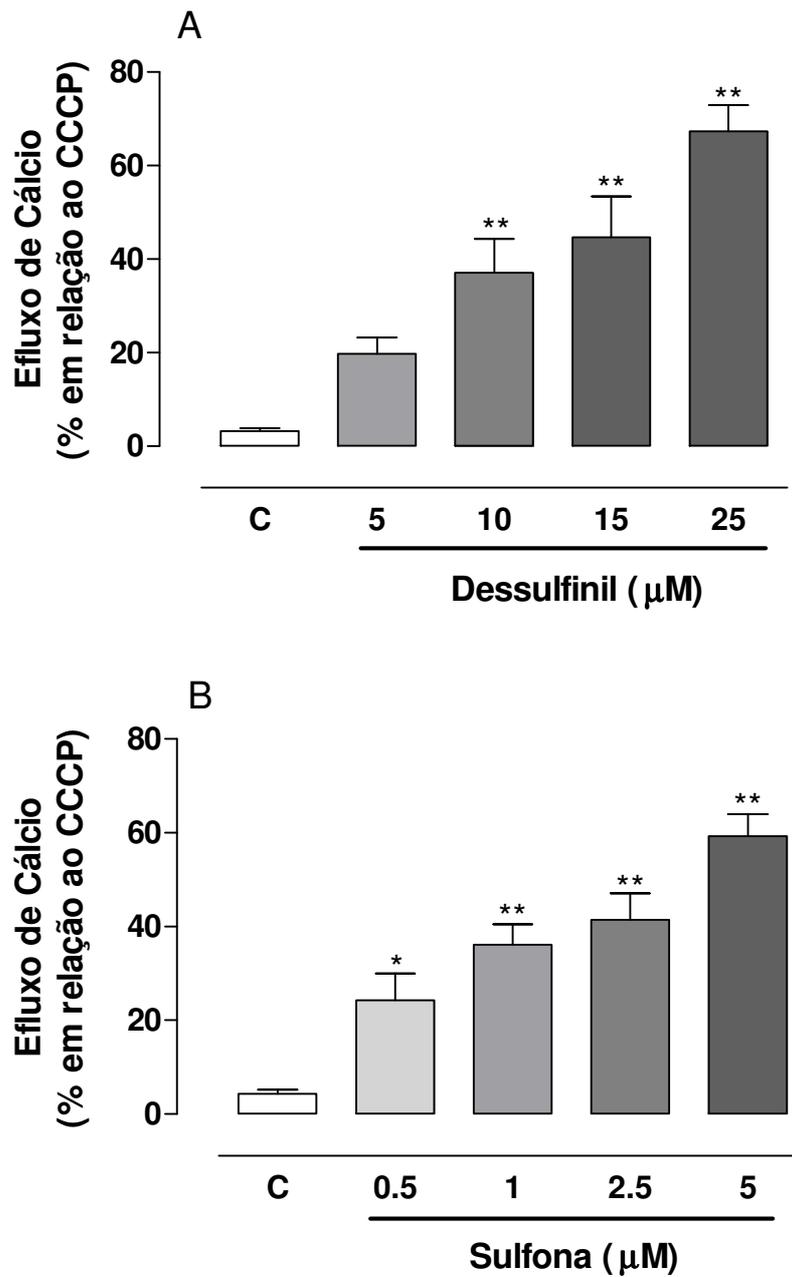


**Figura 15** - Efeitos do fipronil dessulfenil (25  $\mu\text{M}$ ) e do fipronil sulfona (5  $\mu\text{M}$ ) no inchamento mitocondrial em meio hiposmótico de acetato de potássio. A figura é representativa de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. A seta indica a adição dos compostos. C = controle, sem adição dos metabólitos ou CCCP; CCCP = controle positivo, obtido pela adição do desacoplador protoforético CCCP 1  $\mu\text{M}$ .

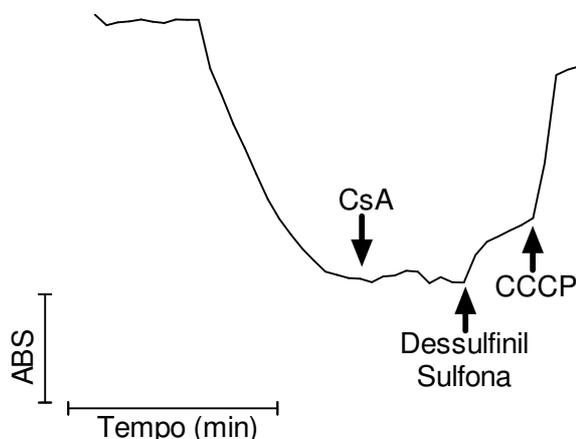
#### 6.5 Efeitos dos metabólitos fipronil dessulfenil e do fipronil sulfona no efluxo de cálcio mitocondrial

A capacidade das mitocôndrias do fígado para acumular  $\text{Ca}^{2+}$  na presença do fipronil dessulfenil ou do fipronil sulfona foi avaliada utilizando o indicador arsenazo

III. As mitocôndrias expostas ao  $\text{Ca}^{2+}$  e energizadas com glutamato mais malato ou succinato foram capazes de captar e reter quase todo o  $\text{Ca}^{2+}$  presente no meio. A adição dos metabólitos às mitocôndrias energizadas diminuiu a sua capacidade de reter o  $\text{Ca}^{2+}$  de uma forma dose-dependente, sendo o metabólito fipronil sulfona o mais potente (Figura 16). O inibidor do poro de transição de permeabilidade mitocondrial ciclosporina A ( $1 \mu\text{M}$ ) não impediu a liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  induzida pelos metabólitos (Figura 17).



**Figura 16** - Efeito do fipronil dessulfenil (A) e do fipronil sulfona (B) sobre a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10 \mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$  adicionado) em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com succinato  $5 \text{ mM}$  (+ rotenona  $2,5 \mu\text{M}$ ). Os valores representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. \*\*\*Significativamente diferente do controle (\* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$ ). C = controle, sem adição dos metabólitos.

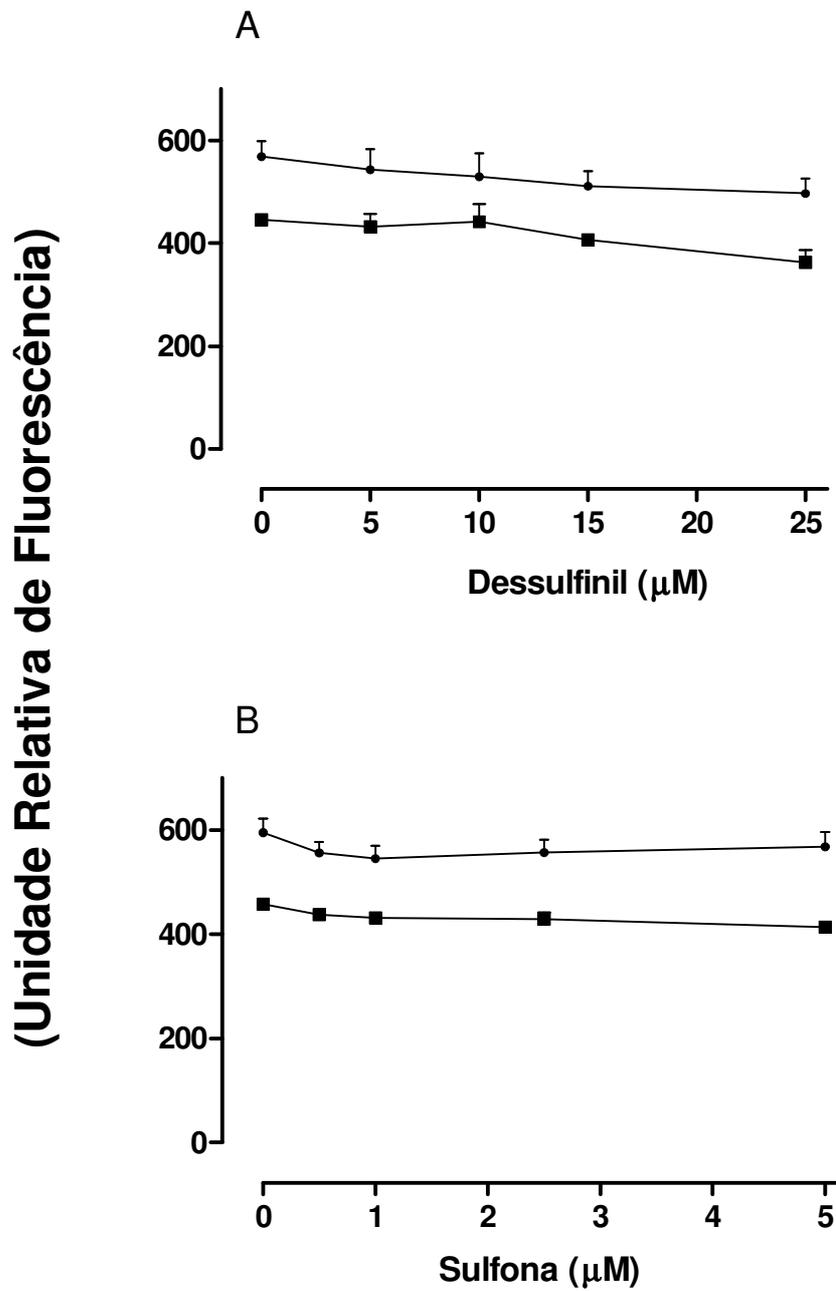


**Figura 17** - Efeitos dos moduladores no efluxo de cálcio promovido pelos metabólitos dessulfinil e sulfona em mitocôndrias (1 mg de proteína/mL) isoladas de fígado de rato, energizadas com succinato 5 mM (+ rotenona 50 nM). A figura é representativa de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. As setas indicam a adição das substâncias. Ciclosporina A (CsA) e dessulfinil ou sulfona.

### 6.6 Avaliação da interação do fipronil dessulfinil e do fipronil sulfona com a membrana mitocondrial

A interação dos metabólitos do fipronil, fipronil dessulfinil e fipronil sulfona com a membrana mitocondrial foi testada com duas sondas diferentes (ANS e DPH), de forma a avaliar as interações com ambas as porções hidrofílica e hidrofóbica da membrana. O ANS geralmente se liga aos grupos polares dos fosfolípidios e às proteínas na superfície da membrana, sendo o seu grupo sulfonato aniônico o principal determinante da ligação. A quantidade de moléculas de ANS ligadas à membrana é altamente influenciada pelo potencial de carga de superfície, sendo inversamente proporcional ao seu potencial negativo (Slavík, 1982). O DPH é incorporado na região hidrofóbica da membrana, sendo orientado paralelamente ao eixo da cadeia acil dos lípidios (Lee et al., 1999). Nenhum dos metabólitos afetou as respostas de fluorescência do ANS e DPH incubados com mitocôndrias isoladas de

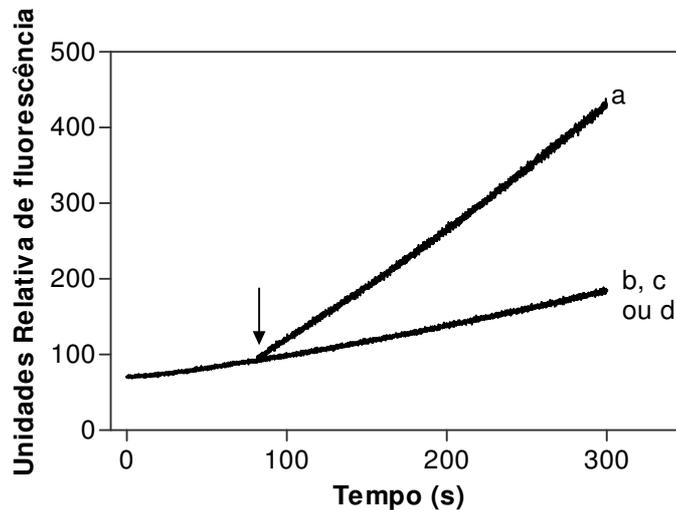
fígado de rato, indicando que eles não interagem com a membrana mitocondrial (Figura 18).



**Figura 18** - Interação do fipronil dessulfinil (A) e do fipronil sulfona (B) com a membrana mitocondrial, avaliada com as sondas fluorescentes ANS (•) e DPH(■). Os valores representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

## 6.7 Efeitos dos metabólitos fipronil dessulfínil e do fipronil sulfona sobre o acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial

Os efeitos do fipronil dessulfínil e do fipronil sulfona sobre a geração de ERO mitocondrial foram avaliados por meio da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De acordo com os resultados apresentados na Figura 19, a exposição das mitocôndrias energizadas com succinato aos metabólitos, não apresentaram alterações na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Um controle positivo foi efetuado utilizando *t*-butil hidroperóxido. Nenhuma alteração na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi observada em mitocôndrias energizadas com glutamato mais malato (resultados não apresentados).



**Figura 19** - Efeitos do fipronil dessulfínil (c, 25  $\mu$ M) e do fipronil sulfona (d, 5  $\mu$ M) sobre a geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. A figura é representativa de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. A seta indica a adição dos compostos. a = controle positivo, *t*-butilhidroperóxido 0,1 mM; b = controle, sem a adição dos metabólitos ou do *t*-butilhidroperóxido.

## VII DISCUSSÃO

As mitocôndrias são importantes organelas celulares por serem responsáveis pela maior parte da energia gerada e utilizada pelas células (NICHOLLS;

FERGUSON, 2002). Estas desempenham papel fundamental na sobrevivência celular por representarem o principal sítio do metabolismo oxidativo dos eucariotos e também por participarem de vias apoptóticas e necróticas (NICHOLLS; FERGUSON, 2002; LIU et al., 1996; DESAGUER; MARTINOU, 2000).

Estudos anteriores demonstraram que o fipronil e seus metabólitos, dessulfínil e sulfona apresentam toxicidade em diferentes modelos de células e que este efeito pode estar relacionado a uma diminuição na produção de ATP (DAS et al., 2006; VIDAU et al., 2009). Nesse sentido, experimentos realizados com fígado de rato em perfusão mostraram que o fipronil (10-50  $\mu\text{M}$ ) interfere no metabolismo energético causando hepatotoxicidade (MEDEIROS et al., 2015).

De acordo com Chance e Williams (1955), o estado 3 da respiração mitocondrial contém mitocôndria, substrato respiratório e ADP, sendo que a velocidade de fosforilação do ADP é o fator limitante da velocidade de consumo de oxigênio. No presente estudo, o efeito dos metabólitos do fipronil no estado 3 da respiração mitocondrial, utilizando mitocôndrias energizadas com glutamato mais malato, doadores de elétrons para o complexo I e succinato, doador de elétrons para o complexo II, demonstrou que ambos os metabólitos são inibidores do complexo I de maneira dose-dependente, porém o fipronil dessulfínil é um agente mais potente, uma vez que apresentou efeitos em concentrações a partir de 5  $\mu\text{M}$  enquanto que o fipronil sulfona exerceu efeito significativo apenas na concentração de 25  $\mu\text{M}$ .

Substâncias desacopladoras são capazes de atuar sobre o acoplamento da síntese de ATP com o transporte de elétrons (MARZZOCO; TORRES, 2007). Quando a membrana mitocondrial torna-se permeável a íons  $\text{H}^+$ , ocorre dissipação do potencial de membrana, aumentando a taxa respiratória. Sob esta condição (desacoplamento) a organela já não é capaz de sustentar a síntese de ATP (MITCHELL, 1961; NICHOLLS, 1982).

Ao acrescentar ambos os metabólitos, após o consumo total do ADP (estado 4 da respiração), em mitocôndrias energizadas com os substratos do complexo I da cadeia respiratória glutamato mais malato observou-se que estes não estimularam a respiração descartando a hipótese de sua atuação como agente desacoplador nessas condições. No entanto, as duas substâncias testadas estimularam o consumo de oxigênio nas mitocôndrias energizadas com succinato, indicando uma

ação desacopladora, porém de um modo diferente daquele pelo qual agem os desacopladores protonoforéticos tais como o 2,4-dinitrofenol ou o CCCP devido à sua incapacidade de promover o inchamento mitocondrial em meio hiposmótico de acetato de potássio. Além disso, carboxiatractilosídeo (um inibidor do translocador de nucleotídeos de adenina, ANT),  $Mg^{2+}$  (um estabilizante da membrana), ciclosporina A (um inibidor do poro de transição de permeabilidade mitocondrial), ditiotreitól (um agente redutor de grupos tióis) e N-etilmaleimida (um agente alquilante de grupos tióis) não protegeram contra o desacoplamento induzido pelos metabólitos. Além disso, a ausência de produção de ERO mitocondrial conforme avaliada pelo acúmulo de  $H_2O_2$  corroborou ausência de efeitos oxidativos no desacoplamento causado pelos metabólitos do fipronil. Estes resultados reforçam a hipótese de que as substâncias podem atuar como um desacoplador incomum, provavelmente por meio de uma interação com a membrana mitocondrial, tornando assim a membrana permeável a prótons, tal como sugerido por Vidal et al., 2011.

Os metabólitos do fipronil, assim como outros inseticidas que exercem ações inibidoras em canais de íons, são compostos lipofílicos que podem ligar-se aos domínios hidrofóbicos das proteínas de membrana (HU et al., 2008). Para testar a hipótese de que o efeito desacoplador desses metabólitos é mediado por uma interação com a membrana mitocondrial, foram realizados ensaios utilizando mitocôndrias marcadas com as sondas fluorescentes ANS e DPH. O DPH é incorporado na membrana mitocondrial e alojado perpendicularmente entre as extremidades dos lípidos não polares que compõem a membrana; substâncias químicas capazes de interagir com o interior da bicamada lipídica podem induzir a liberação de DPH, causando uma redução na sua fluorescência (ANDRICH; VANDERKOOI, 1976; LEE et al., 1999). Após a adição dos metabólitos do fipronil nas mitocôndrias incubadas com a sonda DPH, não foi observada alteração significativa na intensidade de fluorescência, o que indica que as substâncias não interagem com as extremidades hidrofóbicas dos lípidos de membrana. Este resultado está de acordo com o descrito por Hu et al., 2008, que não observaram alterações significantes na polarização de fluorescência do DPH quando membranas mitocondriais de *Plutella xylostella* foram incubadas com o fipronil. Usando o ANS, que se liga às extremidades polares dos fosfolipídios e proteínas na superfície da

membrana (SLAVIK, 1982), não foram observados aumentos na fluorescência, o que sugere que os compostos não têm capacidade para interagir com a superfície da membrana mitocondrial.

Uma vez observado que o fipronil dessulfenil e o fipronil sulfona não induzem o inchamento em meio hiposmótico de acetato de potássio e não interagem com a membrana mitocondrial é razoável propor que possam atuar sobre proteínas específicas de membrana e utilizar algumas dessas para induzir o desacoplamento. Estudos realizados para descrever a ligação do inseticida fipronil com o receptor GABA e o canal de  $\text{Cl}^-$  mostraram que a substância interage com resíduos de aminoácidos dessas proteínas por meio de interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (CHEN et al., 2006; CI et al., 2007; CHENG et al., 2009). Nesse sentido, serão necessários estudos complementares para testar se os metabólitos do fipronil induzem desacoplamento por meio de interações com as proteínas da membrana mitocondrial.

Ambos os metabólitos diminuíram o potencial de membrana e inibiram significativamente a síntese de ATP nas mitocôndrias de um modo dose-dependente, confirmando, assim, os dados obtidos nos testes de respiração, o que indica a capacidade das substâncias de interferir no processo de fosforilação oxidativa. Sendo o ATP um importante componente metabólico, a interferência na sua síntese ou utilização pode caracterizar uma toxicidade aguda ou crônica (MEYER; KULKARNI, 2001).

O cálcio regula vários processos fisiológicos atuando como um mensageiro intracelular. No entanto, a interrupção da sua homeostase, devido a um aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  livre no citoplasma, pode induzir a morte celular por apoptose (ORRENIUS et al., 2003; PINTON et al., 2008). No presente estudo, observou-se que a exposição das mitocôndrias energizadas com succinato aos metabólitos fipronil dessulfenil e fipronil sulfona resultou na liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial. A ausência de inibição da liberação de cálcio pela ciclosporina A, porém, descarta o envolvimento do poro de transição de permeabilidade mitocondrial neste fenômeno.

## VIII CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que os metabólitos do fipronil, fipronil dessulfinil e fipronil sulfona afetam a bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato, energizadas com glutamato mais malato e succinato, atuando como inibidores do complexo I da cadeia respiratória e desacopladores, diminuindo o potencial de membrana mitocondrial e conseqüentemente inibindo a síntese de ATP. Além disso, os metabólitos promoveram o efluxo de cálcio mitocondrial, efeito este que, em conjunto com a redução da síntese de ATP, pode provocar a indução da morte celular por apoptose, conforme observado para o fipronil sulfona em estudos usando células HepG2 e hepatócitos humanos (DAS et al., 2006).

## IX REFERÊNCIAS

AAJOUD, A.; RAVANEL, P.; TISSUT, M. Fipronil metabolism and dissipation in a simplified aquatic ecosystem. **J. Agr. Food Chem.**, v.51, p.1347-1352, 2003.

ANDRICH, M.P.; VANDERKOOI, J.M. Temperature dependence of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene fluorescence in phospholipid artificial membranes. **Biochemistry**, v.15, p.1257-1261, 1976.

BOBE, A.; COSTE, C.M.; COOPER, J.F. Factors influencing the adsorption of fipronil on soils. **J. Agr. Food Chem.**, v.45, p.4861-4865, 1997.

BOYER, P.D.; CROSS, R.L.; MOMSEN, W. A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.70, p.2837-2839, 1973.

BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, C.L. Estudo do metabolismo energético em mitocôndrias isoladas de tecido animal In: BRACHT, A.;

ISHII-IWAMOTO, E.L. (Eds.) **Métodos de Laboratório em Bioquímica**. Barueri: Manole, 2003. cap 9, p.227-247.

BROOKES, P.S. et al. Calcium, ATP and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. **Am. J. Physiol.**, v.287, p.817-833, 2004.

CABONI, P.; SAMMELSON, R.E.; CASIDA, J.E. Phenylpyrazole insecticide photochemistry, metabolism, and GABA ergic action: ethiprole compared with fipronil. **J. Agr. Food Chem.**, v.51, p.7055-7061, 2003.

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

CASTANHA ZANOLI, J.C. et al. Abamectin affects the bioenergetics of liver mitochondria: A potential mechanism of hepatotoxicity. **Toxicol. in Vitro**, v.26, p.51-56, 2012.

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

CHANTON, P.F. et al. Toxicity and bioaccumulation of fipronil in the nontargetarthropodan fauna associated with subalpine mosquito breeding. **Ecotoxicol. Env. Saf.**, v.52, p.8-12, 2001.

CHEN, L.; DURKIN, K.A.; CASIDA, J.E. Structural model for gamma-aminobutyricacid receptor noncompetitive antagonist binding: widely diverse structures fitthe same site. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.103, p.5185-5190, 2006.

CHENG, J. et al. Homology modeling of human and housefly GABA receptor channels and Surfex-docking of fipronil. **J. Mol. Model.**, v.15, p.1145-1153, 2009

CHODOROWSKI, Z; ANAND, J.S. Accidental dermal and inhalation exposure with fipronil – a case report. **J. Toxicol.**, v.42, n.2, p.189-190, 2004.

CI, S.; REN, T.; SU, Z. Modeling the interaction of fipronil-related non-competitive antagonists with the GABA<sub>3</sub>-receptor. **J. Mol. Model.** v.13, p.457-464, 2007

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

DAS, P.C. et al. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. **Chem-Biol. Interac.**, v.164, p.200-214, 2006.

DESAGUER, S.; MARTINOU, J.C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends Cell Biol.**, v.10, p.369-377, 2000.

DYKENS et al. In vitro assessment of mitochondrial dysfunction and cyto-toxicity of nefazodone, trazodone and buspirone. **Toxicol. Sci.**, v.103, p.335-345, 2008.

FUNG, H.T. et al. A case of accidental ingestion of ant bait containing fipronil. **J Toxicol Clin Toxicol**, v.41, n.3, p.245-248, 2003.

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

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

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

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

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

HAINZL, D.; CASIDA J.E. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.93, p.12746-12767, 1996.

HAINZL, D.; COLE L. M.; CASIDA J. E. Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. **Chem. Res. Toxicol.**, v.11, p.1529-1535, 1998.

HU, J. et al. Effects of insecticides on the fluidity of mitochondrial membranes of the diamond back moth, *Plutella xylostella*, resistant and susceptible to avermectin. **J. Insect. Sci.**, v.8, p.1-9, 2008.

HUGNET, C.; CADORE, J.L.; BORDOISEAU, G. Use of fipronil spray (0.25%) for the treatment of *Damalinia equi* (*Wereckella equi*) infestation. **Pract. Vet. Équine**, v.31, p.65-68, 1999.

IKEDA, T. et al. Fipronil modulation of gamma-aminobutyric acid(A) receptors in rat dorsal root ganglion neurons. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.296, p.914-921, 2001.

JENNINGS, K.A et al. Human exposure to fipronil from dogs treated with frontline. **Vet. Hum. Toxicol.**, v.44, n.5, p.301-303, 2002.

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

KURZ, M.H.S. et al. Development of a fast method for the determination of the insecticide fipronil and its metabolites in environmental waters by SPE and GC-ECD. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.24, n. 4, p.631-638, 2013.

LEE, J.; YU; B.P.; HERLIHY, J.T. Modulation of cardiac mitochondrial membrane fluidity by age and calorie intake. **Free Radic. Biol. Med.**, v.26, p.260-265, 1999

LEE, S.J. et al. Acute illnesses associated with exposure to fipronil: surveillance data from 11 states in the United States, 2001–2007. **Clin. Toxicol.**, v.48, p.737-744, 2010

LEGHAIT, J. et al. Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. **Toxicology**, v.255, p.38-44, 2009.

LI, Y. et al. Mitochondrial dysfunction induced by sertraline, an antidepressant agent. **Toxicol. Sci.**, v.127, p.582-591, 2012

LIU, X. et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for ATP and cytochrome c. **Cell**, v.86, p.147-157, 1996.

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

MAIOLI, M. A. **Papel da mitocôndria na citotoxicidade induzida pela abamectina em hepatócitos isolados de rato. 2012.** 80f (Mestrado) - UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. Cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa. **Bioquímica básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. cap. 11, p. 132-155.

MEDEIROS, H.C.D. et al. Effect of fipronil on energy metabolism in the perfused rat liver. **Toxicol. Lett.**, Maringá, p.35-42, 2015

MEYER, S.A; KULKARNI, A.P. Hepatotoxicity. In: HODGSON, E.; SMART, R.C. (eds.) **Introduction to biochemical toxicology**. 3 ed. New York: John Wiley & Sons, p.487-507, 2001.

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

MINGATTO, F.E. et al. Dehydromonocrotaline inhibits mitochondrial complex I. A potential mechanism accounting for hepatotoxicity of monocrotaline. **Toxicol.**, v.50, n.5, p.724-730, 2007.

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

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

MOHAMED, F. et al. Acute human self-poisoning with the *N*-phenylpyrazole insecticide fipronil – a GABA<sub>A</sub>-gated chloride channel blocker. **J. Toxicol.**, v.42, n.7, p.955-963, 2004.

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

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.

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

NADANACIVA, S. et al. Mitochondrial impairment by PPAR agonists and statins identified via immuno captured OXPHOS complex activities and respiration. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.223, p.277-287. 2007

NELSON, D.L.; COX, M.M. Fosforilação oxidativa e fotofosforilação. In: **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. p.707-772.

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

NICHOLLS, D.G; FERGUSON, S.J. **Bioenergetics 3**. San Diego: Academic Press, 2002.

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

ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v.4, p.552-65. 2003.

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

PENALIGGON, J. Getting to grips with fleas on pet dogs and cats. **Pestic. Outl.**, v.8, p.19-23, 1997.

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

PINTON, P. et al. Calcium and apoptosis: **ER-mitochondria** Ca<sup>2+</sup> transfer in the control of apoptosis. **Oncogene**, v.27, p.6407-6418, 2008

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

RATRA, G.S. et al. Unique insecticide specificity of human homomeric rho 1 GABA(C) receptor. **Toxicol. Lett.**, v.129, p.47-53, 2002.

ROUILLER, C.H. Experimental toxic injury of the liver. In: ROUILLER, C.H. (Ed.). **The liver**. v.2. New York: Academic Press, 1964. p.335-476.

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

SCARPA, A. Measurements of cation transport with metallo chromic indicators. In: Fleischer, S., Packer, L. (Eds.), **Methods in Enzymology**, v.56. New York: Academic Press, 1979. p.301–352.

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

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

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

SLAVÍK, J. Anilidonaphthalenesulfonate as a probe of membrane composition and function. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 694, p.1-25, 1982.

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

TINGLE, C.C. et al. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. **Review Environmental Contaminants and Toxicology**, v.176, p.1-66, 2003.

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

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

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

VOTYAKOVA, T.V., REYNOLDS, I.J.  $\Delta\psi_m$ -dependent and independent production of reactive oxygen species by brain mitochondria. **J. Neurochem.**, v.79, p.266-277. 2001.

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

ZHAO, X. et al. Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.310, n.1, p.192-201, 2004.

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