

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
CÂMPUS DE DRACENA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS

MECANISMOS DE TOXICIDADE DO INSETICIDA
IMIDACLOPRIDO NO FÍGADO DE RATO

Paulo Francisco Veiga Bizerra

Zootecnista

Dracena
2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
CÂMPUS DE DRACENA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS

MECANISMOS DE TOXICIDADE DO INSETICIDA
IMIDACLOPRIDO NO FÍGADO DE RATO

Paulo Francisco Veiga Bizerra

Orientador: Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto

Co-orientador: Dr. Marcos Antônio Maioli

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – Unesp - Câmpus de Dracena, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

Dracena
2018

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

B625m

Bizerra, Paulo Francisco Veiga.

Mecanismos de toxicidade do inseticida Imidacloprido no fígado de rato / Paulo Francisco Veiga Bizerra. -- Dracena: [s.n.], 2018.
82 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2018.

Orientador: Fábio Erminio Mingatto

Co-orientador: Marcos Antônio Maioli

Inclui bibliografia.

1. Bioenergética. 2. Biotransformação. 3. Metabolismo. 4. Inseticida. 5. Metabolismo. 6. Toxicidade. I. Título.



Bibliotecário Fábio Sampaio Rosas
CRB 8/6665



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Dracena



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: MECANISMOS DE TOXICIDADE DO INSETICIDA IMIDACLOPRIDO NO FÍGADO DE RATO

AUTOR: PAULO FRANCISCO VEIGA BIZERRA

ORIENTADOR: FÁBIO ERMINIO MINGATTO

COORIENTADOR: MARCOS ANTONIO MAIOLI

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 / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena

Prof. Dr. PAULO RENATO MATOS LOPES

Curso de Engenharia Agrônoma / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológica de Dracena

Profa. Dra. KARINA SAYURI UTSUNOMIYA

Departamento de Bioquímica / Universidade Estadual de Maringá - UEM

Dracena, 16 de fevereiro de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Paulo Francisco Veiga Bizerra – nascido em 22 de abril de 1990, na cidade de Garça/SP - Brasil, filho de Maria Aparecida Veiga. Em julho de 2015, concluiu a graduação em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - FCAT. Em março de 2016, iniciou no Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Animal, em nível de mestrado, área de concentração Produção Animal na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Programa Inter unidades do Câmpus de Dracena, realizando estudos na área de “Bioquímica Metabólica e Toxicológica”, sob a orientação do Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto.

“Transforme as pedras que você tropeça
nas pedras de sua escada.”

Sócrates

Dedico:

Mulheres da minha vida, minha AVÓ, MÃE e IRMÃ

Meu IRMÃO

Por serem minha motivação e exemplos de vida a serem seguidos

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me guiar e dar forças nos momentos mais difíceis nessa caminhada.

À minha Família, em especial a minha Mãe Maria Aparecida, minha avó Maria e aos meus irmãos Mariane e João, pelos conselhos, apoio, motivação, acompanhamento, amizade e principalmente por acreditar e depositar confiança em mim. A eles sou eternamente grato.

Ao Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto pela orientação, apoio, paciência, dedicação, compreensão, pela confiança depositada e por ser a peça fundamental para meu desenvolvimento acadêmico e exemplo a ser seguido. Obrigado por contribuir para meu crescimento e amadurecimento profissional e, especialmente pela atenção, carinho e amizade. A você professor, minha admiração e gratidão.

Aos meus amigos (as) do Laboratório de Bioquímica Metabólica e Toxicológica (LaBMet), Anilda, Marcos Maioli, Hyllana e Camila por toda ajuda e companheirismo durante nossos dias de trabalho e pelos conselhos e apoio nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Rodrigo, Prof.^a Dr.^a Karina e toda equipe do Laboratório de Oxidações Biológicas da Universidade Estadual de Maringá pela ajuda nas análises de fígado em perfusão, parceria, companheirismo, paciência e amizade. Grato.

Aos meus amigos e a República Eter na Ment, pela amizade, aprendizado, companheirismo, confiança, convivência e por proporcionar várias histórias em minha vida.

Aos técnicos de Laboratório da FCAT - Unesp Andréia, Edison, Heloisa e João, pelo auxílio nas análises, companhia e boas conversas.

Obrigado!



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Dracena



Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **"Mecanismos de Toxicidade dos Inseticidas Lufenurona e Imidacloprido em Mitocôndrias e Hepatócitos Isolados de Rato e Células HEPG2 (Mechanisms of Toxicity of Insecticides Lufenuron and Imidacloprid on Isolated Mitochondria and Hepatocytes from Rat and HEPG2 Cells)"**, registrada com o nº **30/2015.R2 – CEUA**, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Fábio Erminio Mingatto** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica** – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP - Câmpus de Dracena, em reunião de **25/04/2016**.

Dracena, 25 de abril de 2016.

Prof. Dr. Danilo Domingues Millen
Presidente da Comissão de Ética em Uso de Animais

MECANISMOS DE TOXICIDADE DO INSETICIDA IMIDACLOPRIDO NO FÍGADO DE RATO

RESUMO - O imidacloprido (IMD) é um inseticida neonicotinóide largamente utilizado em diversas culturas agrícolas e em animais para o controle de pragas. O IMD é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e por contato, sendo rápida e uniformemente distribuído nos órgãos e tecidos. Dados da literatura mostram que as concentrações mais elevadas foram observadas nos órgãos de eliminação: fígado e rins. O fígado é o principal órgão envolvido na biotransformação de substâncias exógenas (xenobióticos), convertendo compostos hidrofóbicos em hidrossolúveis, mais facilmente eliminados pelo organismo. Vários estudos vêm sendo conduzidos sobre os efeitos tóxicos do IMD em animais, causando danos ao fígado. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar os mecanismos envolvidos na toxicidade do IMD sobre a bioenergética de mitocôndrias e hepatócitos isolados de rato e ações do IMD sobre o metabolismo de carboidratos e proteínas em fígado de rato em perfusão. Em mitocôndrias isoladas, o IMD promoveu uma diminuição dose-dependente no estado 3 da respiração e na produção de ATP, sem afetar o potencial de membrana mitocondrial. Experimentos subsequentes medindo o consumo de oxigênio mostraram que o IMD não afeta a cadeia respiratória e que seu efeito é semelhante ao da oligomicina (inibidora da F_0F_1 -ATP sintase) e/ou ao do atractilosídeo (inibidor do translocador de nucleotídeos de adenina, ANT). IMD inibiu a atividade da F_0F_1 -ATP sintase em mitocôndrias rompidas e inibiu parcialmente a despolarização do potencial de membrana induzida pelo ADP. Esses resultados indicam que o IMD afeta a bioenergética mitocondrial por meio da inibição da F_0F_1 -ATP sintase. Em Experimentos com hepatócitos isolados de rato os resultados da respiração foram semelhantes aos encontrados nas mitocôndrias isoladas, porém o IMD afetou a produção intracelular de ATP e induziu a morte celular somente nos hepatócitos isolados de ratos previamente tratados com dexametasona, um ativador do citocromo P450. No fígado de rato em perfusão o IMD também inibiu a produção de glicose por meio da gliconeogênese. Esses resultados sugerem que a toxicidade do IMD pode estar associada a alterações no metabolismo energético celular sendo a enzima F_0F_1 -ATP sintase o principal alvo da ação tóxica deste inseticida, e que os metabólitos formados na biotransformação do IMD podem ser mais tóxicos do que o próprio IMD.

Palavras-chave: bioenergética, biotransformação, inseticida, metabolismo, toxicidade.

MECHANISMS OF TOXICITY OF THE INSECTICIDE IMIDACLOPRID IN THE RAT LIVER

ABSTRACT - Imidacloprid (IMD) is a neonicotinoid insecticide widely used in various crops and animals for pest control. IMD is rapidly absorbed by the gastrointestinal tract, being rapidly and evenly distributed in the organs and tissues. The highest concentrations were observed in the elimination organs: liver and kidneys. The liver is the main organ involved in the biotransformation of exogenous substances (xenobiotics), with the capacity to convert hydrophobic compounds into water soluble metabolites, which are more easily eliminated by the organism. Studies have been conducted on the toxic effects of IMD on animals, causing damage to the liver. In this sense, the objective of this study was to evaluate the mechanisms involved in the toxicity of IMD on the bioenergetics of mitochondria and isolated hepatocytes of rats and its actions on the metabolism of carbohydrates and proteins in liver of rats in perfusion. In isolated mitochondria, IMD promoted a dose-dependent decrease in the state 3 of mitochondrial respiration and ATP levels, without affecting mitochondrial membrane potential. Subsequent experiments measuring oxygen consumption have shown that IMD does not affect the electron transport chain and that its effect is similar to that of oligomycin (F_0F_1 -ATP synthase inhibitor) and/or atracytoside (ANT adenine nucleotide translocator inhibitor). In the perfusion rat liver IMD inhibited the activity of F_0F_1 -ATP synthase in freeze/thaw-disrupted mitochondria and partially inhibited the depolarization of the membrane potential induced by ADP. These results indicate that IMD affects in mitochondrial bioenergetics by inhibiting F_0F_1 -ATP synthase. In experiments with isolated hepatocytes respiration results were similar to those found in isolated mitochondria, but IMD affected the intracellular production of ATP and induced cell death only in hepatocytes isolated from rats previously treated with dexamethasone, a cytochrome P450 activator. IMD also inhibited the production of glucose by gluconeogenesis. These results suggest that IMD toxicity may be associated with changes in cellular energy metabolism with the enzyme F_0F_1 -ATP synthase being the main target of the toxic action of this insecticide, and that the metabolites formed in the biotransformation of the IMD may be more toxic than the IMD itself.

Keywords – bioenergetics, biotransformation, insecticide, metabolism, toxicity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Inseticidas	12
2.1.1 Imidacloprido	13
2.2 Fígado e Hepatotoxicidade	16
2.3 Biotransformação do IMD	18
2.4 Bioenergética mitocondrial	20
3 OBJETIVO.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Avaliação ética	24
4.2 Reagentes.....	24
4.3 Animais	24
4.4 Mitocôndrias.....	25
4.4.1 Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato intactas e rompidas	25
4.4.2 Respiração mitocondrial	27
4.4.3 Potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$).....	27
4.4.4 Síntese de ATP	28
4.4.5 Atividade da F_0F_1 -ATP sintase.....	28
4.4.6 Despolarização do $\Delta\psi$ induzida pelo ADP	29
4.5 Hepatócitos Primários	30
4.5.1 Isolamento dos Hepatócitos de Rato	30
4.5.2 Ensaio com Células Permeabilizadas	34
4.5.3 Ensaio com Células Incubadas	35
4.6 Perfusão de fígado de rato.....	38
4.6.1 Animais	38
4.6.2 Líquido de perfusão	39
4.6.3 Método de perfusão do fígado	39
4.6.3 Dosagens bioquímicas.....	42
4.7 Análise Estatística.....	45
5 RESULTADOS	46

5.1	Mitocôndrias.....	46
5.1.1	Efeito do IMD na respiração mitocondrial	46
5.1.2	Efeito do IMD no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$)	48
5.1.3	Efeito do IMD nos níveis de ATP mitocondriais	50
5.1.4	Efeito do IMD na despolarização induzida por ADP no $\Delta\psi$	50
5.1.5	Efeito do IMD na atividade da F_0F_1 -ATP sintase	51
5.2	Hepatócitos	53
5.2.1	Efeitos do IMD sobre a respiração mitocondrial dos hepatócitos permeabilizados.....	53
5.2.2	Efeitos do IMD sobre o potencial de membrana mitocondrial dos hepatócitos	55
5.2.3	Efeito do IMD sobre a concentração intracelular de ATP dos hepatócitos	56
5.2.4	Efeitos do IMD sobre a viabilidade celular	59
5.3	Fígado de ratos em perfusão	62
5.3.1	Efeito do IMD sobre a gliconeogênese, ciclo da uréia e consumo de oxigênio no fígado de ratos em jejum	62
6	DISCUSSÃO.....	68
7	CONCLUSÃO	74
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1 INTRODUÇÃO

Pesticidas são utilizados extensivamente na agropecuária sendo poluentes cada vez mais presentes no ambiente, os quais muitas vezes são persistentes e podem ser bioacumulados através das cadeias biológicas, tais como solo-planta-alimento ou água-organismos aquáticos-alimentos (PRESTON, 2002). Entre os pesticidas estão os inseticidas, acaricidas, fungicidas e rodenticidas, nomes comuns que indicam a principal função do pesticida (BAPTISTA, 1999).

O imidacloprido (IMD) é um inseticida neonicotinóide sistêmico que mata os insetos via ingestão ou contato, interferindo no sistema nervoso por meio do bloqueio dos receptores pós-sinápticos da acetilcolina (nAChRs) (TOMIZAWA et al., 2005). É amplamente utilizado para controle de vários insetos no tratamento de sementes, do solo e de plantações, e até mesmo no controle de pulgas em animais domésticos, moscas em animais de fazenda e piolhos em ovelhas (HUTCHINSON et al., 2001; POSPISCHIL, 2002; FOSSEN, 2006; BAYER, 2018). É um dos inseticidas mais utilizados no mundo e estudo publicado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Indicadores de Desenvolvimento Sustentável - Brasil 2015 - IBGE) mostrou que o IMD está entre os três ingredientes ativos de pesticidas mais comercializados no Brasil.

Por ser um inseticida altamente seletivo para nAChRs em insetos, o IMD não deveria apresentar um agente tóxico em mamíferos. No entanto, casos de intoxicação ocorreram em seres humanos devido a exposições ocupacionais ou uso indevido dos produtos que contêm como princípio ativo o imidacloprid (MOHAMED et al., 2009; KUMAR et al., 2013; HAN et al., 2018). Vários estudos vêm sendo conduzidos sobre os efeitos do IMD em animais, sendo eles ratos (MOHANY et al., 2011, TOOR et al., 2013; KAPOOR et al., 2014) camundongos (ARFAT et al., 2014), frangos de postura (KAMMON et al., 2010), peixes (DESAI; PARIKH, 2013; QADIR et al., 2014) e bovídeos (KAUR et al., 2006), demonstrando que o composto tem alta capacidade de danificar o fígado, envolvendo lesões do tipo hepatocelular, ou seja, aquelas caracterizadas por altos níveis séricos de alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase, porém, o mecanismo de ação tóxica neste órgão ainda não foi totalmente descrito.

O fígado desempenha uma função central no metabolismo, pois recebe grandes quantidades de nutrientes e xenobióticos que são absorvidos por meio do trato digestivo e veia porta. Entre as principais funções hepáticas estão a captação de aminoácidos, lipídios, carboidratos e vitaminas, com subsequente armazenamento, conversão metabólica e liberação no sangue e bile. O fígado é também o principal órgão envolvido na biotransformação de substâncias exógenas (xenobióticos), com capacidade de converter compostos hidrofóbicos em hidrossolúveis, mais facilmente eliminados pelo organismo (GUILLOUZO, 1998). Esse processo de biotransformação (desintoxicação) é realizado principalmente pelo sistema enzimático denominado citocromo P450 (DANIELSON, 2002; IOANNIDES, 2002).

Evidências experimentais indicam que a mitocôndria representa um alvo preferencial e crítico para a ação de drogas, toxinas ou seus metabólitos reativos formados pelo citocromo P450. Os efeitos tóxicos sobre as mitocôndrias podem ocorrer por mecanismos diretos e indiretos, levando a disfunções mitocondriais, tais como alterações no transporte de elétrons e 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, morte celular ou uma disfunção metabólica (NADANACIVA et al., 2007; MINGATTO et al., 2007; DYKENS et al., 2008; SANTOS et al., 2009; GARCIA et al., 2010; ZANOLI et al., 2012; LI et al., 2012; TAVARES et al., 2015).

Sendo assim, torna-se importante a avaliação dos efeitos do IMD sobre os parâmetros relacionados à bioenergética de mitocôndrias e hepatócitos primários isolados de fígado de rato, e o efeito do IMD sobre a morte celular e o metabolismo hepático, no sentido de avaliar os mecanismos envolvidos na hepatotoxicidade do inseticida. Assim, espera-se fornecer informações relevantes para o auxílio no tratamento em caso de intoxicação em animais e humanos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Inseticidas

Os Pesticidas são substâncias químicas que apresentam ação fisiológica sobre organismos vivos e normalmente são utilizados para impedir a ação ou destruir, direta ou indiretamente, ervas daninhas, roedores, fungos, ácaros e insetos. Estes produtos são apresentados em formulações sólidas ou líquidas naturais, semissintéticas ou sintéticas utilizadas como inseticidas, acaricidas, fungicidas e rodenticidas, nomes comuns que indicam a principal função do pesticida (BAPTISTA, 1999).

A rigidez e evolução da legislação e do sistema de registro garantem que os produtos colocados à disposição do usuário são seguros, quando bem utilizados. Porém, os pesticidas podem ser tóxicos devido ao uso inadequado e sua toxicidade depende das propriedades dos ingredientes ativos e inertes do produto (TAVELLA et al., 2011). Outro fator a ser considerado é que os pesticidas são poluentes cada vez mais presentes no ambiente, os quais muitas vezes são persistentes e podem ser bioacumulados através das cadeias biológicas, tais como solo-planta-alimento ou água-organismos aquáticos-alimentos (PRESTON, 2002), além de produtos resultantes do seu metabolismo ou degradação originam resíduos que podem contaminar e acumular no ambiente, sendo frequente encontrar resíduos de pesticidas em águas superficiais ou lençóis freáticos, no solo e em produtos agrícolas.

Os inseticidas são uma classe de pesticidas com o objetivo de prevenir, destruir e controlar insetos. O modo de ação da maioria dos inseticidas é ao nível do sistema nervoso, bloqueando os processos fisiológicos e bioquímicos dos insetos, mediante a bloqueio de receptores. Os inseticidas podem ser classificados em grupos químicos sendo eles os Organofosforados, Carbamatos, Organoclorados, Piretróides e Neonicotinóides (DURO et al., 2013; TOMIZAWA, CASIDA, 2000).

Na última década os neonicotinóides tiveram grande expansão comercial, tornando-os de maior classe de inseticidas usada na prevenção, controle e tratamento de parasitas (insetos) no âmbito veterinário e ambiental. Os

neonicotinóides tiveram origem na molécula de nicotina, um alcalóide de ocorrência natural proveniente das folhas da planta do tabaco (*Nicotiana tabacum*), atingindo níveis entre 2 a 7 %, e é um constituinte ativo do fumo do tabaco. Na sua forma concentrada é também usada como inseticida, já que é um agente tóxico nervoso potente (DURO et al, 2013).

Os princípios ativos desta classe atuam como agonistas de receptores nicotínicos dos insetos e têm como principal representante o IMD (TOMIZAWA, CASIDA, 2000), o qual foi o primeiro neonicotinóide introduzido no Japão e na Europa no ano de 1990 e comercializado nos EUA em 1992 (OBANA, et al. 2003).

2.1.1 Imidacloprido

O IMD (1-[(6-cloro-3-piridinil)metil]-N-nitro-2-imidazolidinimina) (Fig. 1) é um inseticida neonicotinóide sistêmico que mata os insetos via ingestão ou contato, interferindo no sistema nervoso por meio do bloqueio dos receptores pós-sinápticos da acetilcolina (TOMIZAWA et al., 2005). É amplamente utilizado para controle de vários insetos no tratamento de sementes, do solo e de plantações e até mesmo no controle de pulgas em animais domésticos e moscas em animais de fazenda (HUTCHINSON et al., 2001; FOSSEN, 2006).

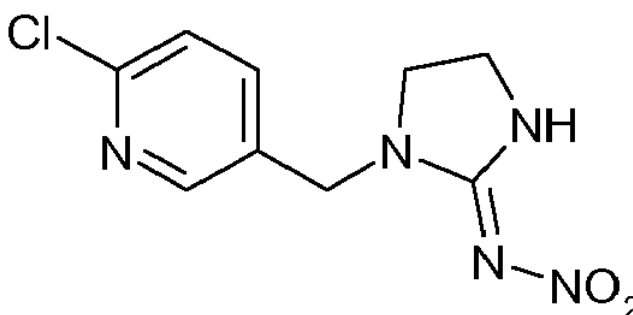


Figura 1. Estrutura molecular do IMD. Fonte: domínio público.

É um dos inseticidas mais utilizados no mundo e estudo recente publicado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Indicadores de Desenvolvimento Sustentável - Brasil 2015 - IBGE) mostrou que o IMD está entre os três ingredientes

ativos de agroquímicos mais comercializados no Brasil. Em 2013, a União Européia, através do Regulamento n.485, restringiu o uso e as aplicações de neonicotinóides, incluindo o imidacloprido, havendo necessidade de mais pesquisas sobre sua toxicidade (EU, 2013).

Como um pesticida sistêmico, o IMD move-se facilmente ou se transloca no xilema a partir do solo para as folhas, frutas, pólen e néctar das plantas (FOSSEN, 2006), podendo estes servirem de alimento para animais, facilitando uma possível intoxicação ou danos em sua produção ou até mesmo em sua saúde.

O IMD é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal, sendo rápida e uniformemente distribuído nos órgãos e tecidos. As concentrações mais elevadas foram observadas nos órgãos de eliminação: fígado e rins (NORTOX, 2015). Entretanto, também há relatos na literatura em que o IMD apresentou efeito neurotóxico (ABOU-DONIA et al., 2008; BAL et al., 2010; LONARE et al., 2014), genotóxico (DEMSIA et al., 2007; KATARIA et al., 2016; STIVAKTAKIS et al., 2016) e efeitos sobre o sistema reprodutor (BAL et al, 2012a; BAL et al., 2012b).

Vários estudos vêm sendo conduzidos sobre os efeitos do IMD em animais, principalmente em ratos e camundongos, demonstrando que o composto tem alta capacidade de danificar o fígado, porém, o mecanismo de ação tóxica neste órgão ainda não foi descrito.

Kammon et al. (2010) utilizaram a concentração de 139 mg/kg de massa corpórea de IMD em frangos de postura, administrado via oral, onde o composto produziu sinais detoxicados 15 minutos pós administração: lentidão, olhos caídos, galinhas sentadas no jarrete, respiração de boca aberta, tremores musculares, galinhas deitadas de um lado e algumas das galinhas também revelaram paralisia e diarreia aquosa. Mortes ocorreram dentro de 5-24 horas após a administração do inseticida. O exame histopatológico revelou hemorragia, degeneração dos hepatócitos, congestão e dilatação leve de sinusóides hepáticos e valores de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FC) significativamente elevados. Os rins mostraram hemorragia sub-capsular e necrose coagulativa do epitélio tubular.

Mohany et al. (2011) forneceram IMD 0,21 mg/kg de massa corpórea por via oral durante quatro semanas e aumentos significantes nos níveis séricos de AST,

ALT, FC e de malondialdeído (MDA), foram observados no grupo tratado. Veia central e sinusóides fortemente congestionados foram observados no tecido hepático; núcleos picnóticos e infiltração de leucócitos também foram encontrados em todo o tecido hepático, indicando hepatotoxicidade.

Duzguner e Erdogan (2012) usaram IMD em ratos na dose de 1 mg/kg de massa corpórea por 30 dias para analisar o estresse oxidativo. A administração do composto resultou no aumento da atividade da catalase, redução da capacidade antioxidante diminuindo a concentração de GSH no cérebro e aumento das concentrações de Ca^{2+} no plasma. No fígado, as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e ALT não foram afetadas pelo IMD, porém houve diminuição da atividade das enzimas AST e lactato desidrogenase (LDH).

Soujanya et al. (2013) testaram o IMD em ratos na concentração de 80 mg/kg de massa corpórea e o efeito protetor da vitamina C sobre a toxicidade da substância. Os resultados mostraram um aumento na atividade das enzimas ALT e AST e as concentrações de GSH foram reduzidas com o IMD. A exposição ao IMD afetou a função hepática em ratos, nas funções antioxidante e histológica e a vitamina C mostrou efeitos protetores significantes.

Toor et al. (2013) forneceram duas doses de IMD: 9 e 45 mg/kg de massa corpórea por via oral durante quatro semanas para ratas e observaram aumento na atividade das enzimas ALT, AST e fosfatase alcalina no plasma das ratas tratadas com a maior dose. Além disso, foram observadas alterações na atividade da ALT e AST no tecido hepático de ratas tratadas com a maior dose. O exame histológico do fígado revelou que o tratamento com a maior dose do IMD resultou em dilatações da veia central e sinusóides entre os hepatócitos.

Arfat et al. (2014) usaram as concentrações de 5, 10 e 15 mg/kg de massa corpórea de IMD, via oral por 15 dias, em camundongos e observaram que a maior dose causou um aumento significativo na atividade sérica das enzimas ALT, AST e FA e na quantidade de bilirrubina total. A análise histológica indicou hepatotoxicidade com vasos sanguíneos hipertrofiados, lesões citoplasmáticas e necrose no fígado, enquanto que a análise do rim indicou nefrotoxicidade com hemólise, degeneração dos túbulos e glomérulos, ambas na maior dose de IMD.

utilizada, a qual está muito abaixo da DL_{50} para camundongos que é de 131 mg/kg de massa corpórea.

Kapor et al. (2014) administraram uma dose única de IMD (20 mg/kg de massa corpórea via oral) em ratas e observaram aumento significativo na atividade sérica das enzimas ALT e AST, além de aumento na quantidade de bilirrubina e uréia no sangue 48 h após a administração do inseticida.

2.2 Fígado e Hepatotoxicidade

O fígado desempenha uma função central no metabolismo, devido à sua interposição entre o trato digestivo e a circulação geral do organismo. 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 (xenobióticos), com capacidade de converter compostos hidrofóbicos em hidrossolúveis, mais facilmente eliminados pelo organismo (GUILLOUZO, 1998).

A célula parenquimal (hepatócito) é a principal unidade funcional do fígado, constituindo 60% da população de células e 80% do volume total do fígado. Os hepatócitos isolados têm sido extensivamente utilizados para estudar o metabolismo e a toxicidade de uma grande variedade de drogas e substâncias químicas (GUILLOUZO, 1998; MINGATTO et al., 2002; MAIOLI et al., 2011), uma vez que mantêm membranas intactas e têm altos níveis de várias enzimas do sistema de metabolismo de xenobióticos e seus co-fatores sendo, portanto, úteis para o estudo da captação, alvos intracelulares e eventos que levam a danos celulares por substâncias químicas e seus metabólitos via biotransformação (MOLDÉUS, 1978).

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 xenobiótico podem provocar toxicidade.

A biotransformação, a qual envolve reações bioquímicas específicas, é definida como uma alteração química dos xenobióticos realizada pelos organismos vivos. O principal objetivo da biotransformação é excretar substâncias, normalmente tóxicas, que foram absorvidas pelos organismos, na forma de metabólitos e/ou produtos solúveis em água e assim mais facilmente excretadas (WILLIAMS et al., 2000). Geralmente, esse processo ocorre para inativar os agentes tóxicos, sendo denominado como sistema de desintoxicação, embora os metabólitos formados, possam ser compostos biologicamente ativos, os quais podem interagir com proteínas séricas, membranas plasmáticas e/ou mitocondriais, ser distribuídos para órgãos, interagir com receptores e organelas celulares (THOMPSON; THOMPSON, 1990; TOLEDO FILHO; VIEIRA, 1990) podendo desencadear maior toxicidade do que o xenobiótico inicial.

O sistema enzimático capaz de metabolizar xenobióticos é o citocromo P450, o qual está presente em todo o organismo, com maior concentração no fígado, o que consequentemente torna esse órgão o centro do metabolismo de xenobióticos. (DANIELSON, 2002; IOANNIDES, 2002). O citocromo P450 faz parte da fração microssômica e é responsável pelas reações de oxidação de inúmeras substâncias, desempenhando papel fundamental na biotransformação (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988; DELUCIA et al., 1988).

A biotransformação dos xenobióticos é decorrente de alterações em sua molécula e são divididas em duas fases. Na Fase I ocorrem as transformações metabólicas catalisadas por enzimas presentes no retículo endoplasmático fazendo com que o xenobiótico sofra reações químicas de oxidação, hidrólise ou redução. Já na Fase II ocorre a conjugação com constituintes naturais do organismo que são catalisadas por enzimas citoplasmáticas, fazendo assim com que o xenobiótico sofra reações químicas como a glucoridinação (principalmente em mamíferos), conjugação com a glutatona ou outros componentes celulares, como aminoácidos.

Para eliminação de uma substância, não é necessário que um composto seja submetido às duas fases, ou seja, apenas a fase I ou fase II podem ser suficientes para aumentar a polaridade do composto e eliminá-lo do organismo (WILLIAMS; JAMES; ROBERTS, 2000).

2.3 Biotransformação do IMD

O IMD é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal, sendo rápida e uniformemente distribuído nos órgãos e tecidos. Foram encontradas concentrações mais elevadas no fígado e rins, ou seja, órgãos de eliminação de substâncias (NORTOX, 2015). Em ratos, a biotransformação ocorre principalmente em duas vias. A primeira através da oxidação da molécula, formando o ácido 6-cloronicotínico, que reage posteriormente com glicina para formar o conjugado ácido hipúrico e, a segunda, pela hidroxilação do anel imidazolidina na posição 4 ou 5, formando assim seus metabólitos (Figura 2).

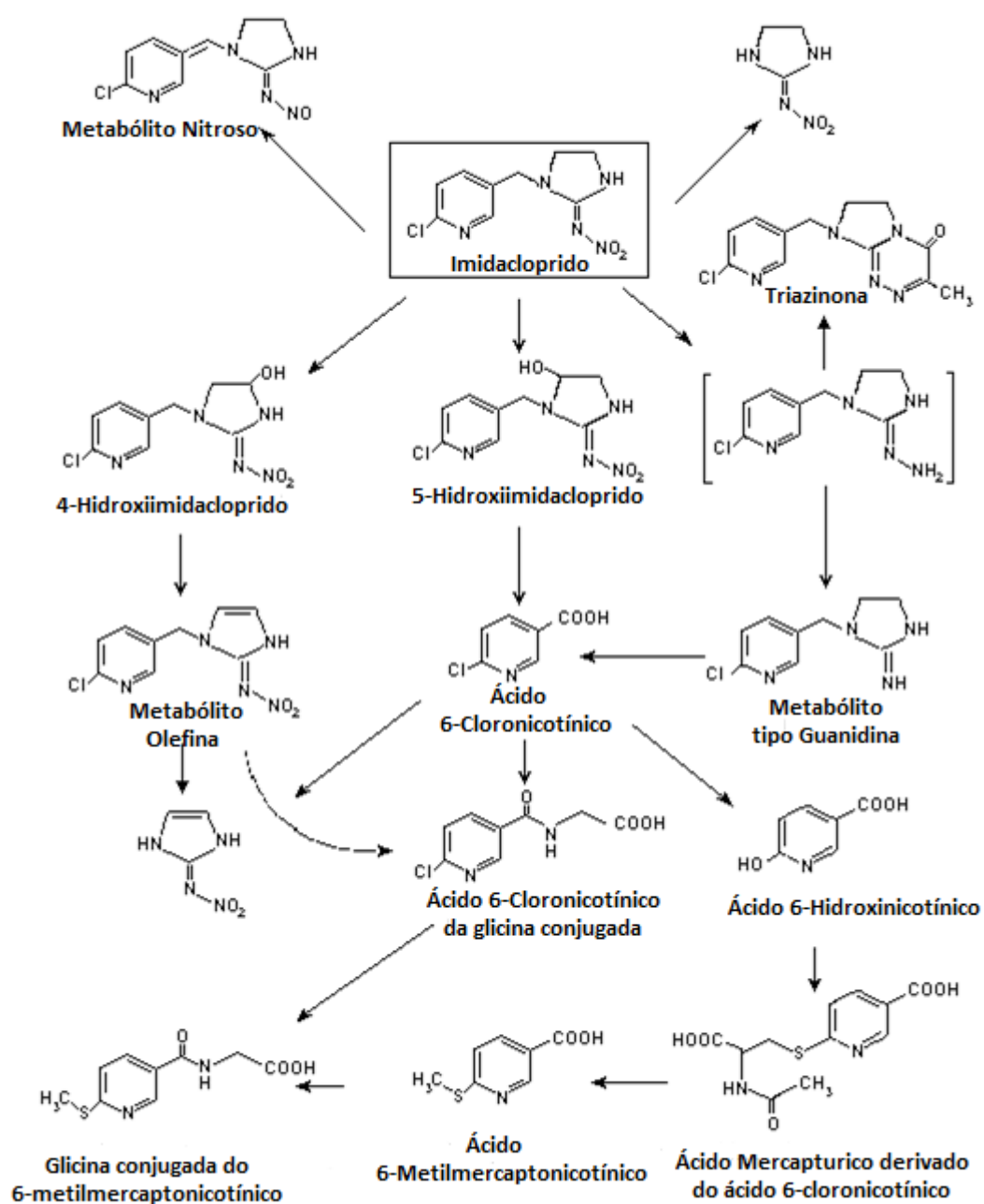


Figura 2. Via metabólica do IMD em ratos. Estruturas do IMD e seus metabólitos. Fonte: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2001pr07.htm>. Acesso em 31 jan. 2018.

2.4 Bioenergética mitocondrial

Mitocôndrias são organelas intracelulares exclusivas das células eucarióticas e são encontradas em todos os tipos de tecidos. São compostas por um sistema duplo de membranas, as membranas externa e interna, as quais definem dois compartimentos: o espaço intermembranar e a matriz mitocondrial (DAUM, 1985; FREY; MANNELA, 2000).

As mitocôndrias presentes no parênquima hepático apresentam 17% do volume celular, possuindo dimensões de 0,45 μm de diâmetro e 4,42 μm de comprimento, e a quantidade encontrada por hepatócito varia na faixa de 800 (SCHEFFLER, 1999) a 1312 mitocôndrias/célula (VAN GURP et al., 2003).

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

A mitocôndria é responsável pela síntese da quase totalidade do ATP necessário à manutenção da estrutura e função celular. Os elétrons doados por substratos oxidáveis à cadeia respiratória na membrana mitocondrial interna, por meio de NADH ou FADH_2 , são transferidos ao O_2 reduzindo-o a H_2O (respiração mitocondrial), e a energia livre resultante é utilizada para a síntese de ATP (fosforilação oxidativa) (Figura 3).

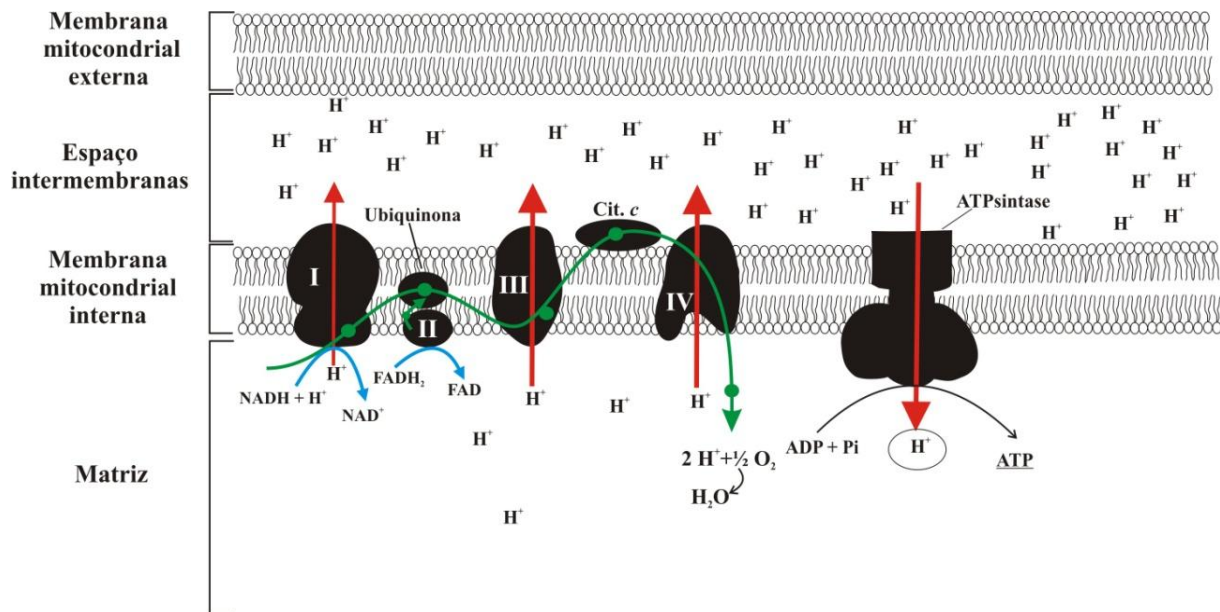


Figura 3. Representação esquemática da cadeia respiratória e fosforilação oxidativa. Fonte: Maioli (2012). Seta verde: caminho percorrido pelos elétrons.

De acordo com a hipótese quimiosmótica de Mitchell em associação com a do acoplamento conformacional de Boyer, o fluxo de elétrons é acompanhado de bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, gerando um gradiente eletroquímico de H^+ . A energia livre liberada no retorno do H^+ à matriz mitocondrial induz alteração conformacional no componente F_1 da F_0F_1 -ATP sintase, liberando o ATP formado a partir de ADP e P_i em seus sítios catalíticos (MITCHELL, 1961; BOYER et al., 1973). Quando a membrana mitocondrial torna-se permeável a H^+ (por exemplo, pela ação de protonóforos) ocorre dissipação do potencial de membrana aumentando a velocidade de respiração; sob essas condições (desacoplamento), a capacidade da mitocôndria de sintetizar ATP é comprometida (MITCHELL, 1961; NICHOLLS, 1982).

Evidências experimentais indicam que a mitocôndria representa um alvo preferencial e crítico para a ação de drogas 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 e 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; MINGATTO et al., 2007;

DYKENS et al., 2008; SANTOS et al., 2009; GARCIA et al., 2010; ZANOLI et al., 2012; LI et al., 2012; TAVARES et al., 2015). Além do seu papel crítico na síntese de ATP, a mitocôndria também é a maior responsável pela formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (VOTYAKOVA; REYNOLDS, 2001; KOWALTOWSKI et al., 2009) e também controla a morte celular (CROMPTON, 1999; KOWALTOWSKI; CASTILHO, 2001; KIM et al., 2003).

3 OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do IMD e seus metabólitos sobre os parâmetros relacionados à bioenergética em mitocôndrias e hepatócitos primários isolados de fígado de rato, além de analisar efeitos sobre o metabolismo hepático, no sentido de auxiliar no conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na toxicidade apresentada pelo inseticida.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Avaliação ética

A Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - Unesp - Câmpus de Dracena certificou que os procedimentos utilizando animais estão de acordo com os preceitos e normas editados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (Certificado nº. 30/2015.R2-CEUA).

4.2 Reagentes

O IMD (Código 37894) foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich Brrasil Ltda (São Paulo, SP, Brasil). Em todos os ensaios foram empregados reagentes de alto grau analítico disponíveis comercialmente e as soluções foram preparadas com água ultra-filtrada em sistema purificador Millipore DirectQ-3[®] (Milli-Q[®]). As substâncias lipofílicas, incluindo o IMD, foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO), sendo que este não excedeu a concentração de 1% do volume total nos ensaios experimentais.

4.3 Animais

Ratos Wistar machos com aproximadamente 200 g de peso vivo, provenientes do Biotério Central da Unesp - Câmpus de Botucatu, ficaram alojados no Biotério de Roedores da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - Unesp - Câmpus de Dracena, em caixas plásticas de polipropileno com dimensões (CxLxA) 41x34x16 cm, com cobertura metálica e serragem de madeira em número máximo de quatro animais por caixa. Os animais ficaram em temperatura controlada de aproximadamente 22°C e receberam alimento e água *ad libitum*, seguindo recomendações do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* - Institute for Laboratory Animal Research. Para o isolamento de hepatócitos foram utilizados animais normais ou animais previamente tratados com dexametasona (50 mg/kg de

peso corporal por 3 dias via intraperitoneal), um estimulador do sistema CYP 450 (SIDHU; OMIECINSKI, 1995).

4.4 Mitocôndrias

4.4.1 Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato intactas e rompidas

As mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferencial padrão (PEDERSEN et al., 1978) (Figura 4). Os ratos foram insensibilizados com éter, eutanaziados por decapitação e o fígado foi imediatamente removido, picotado em 50 mL de meio contendo 250 mM de sacarose, 1 mM de EGTA e 10 mM de HEPES-KOH, pH 7,2 e homogeneizado três vezes durante 15 segundos com intervalos de 1 minuto com um homogeneizador Potter-Elvehjem. O homogeneizado foi centrifugado a $770 \times g$ durante 5 min, e o sobrenadante resultante foi ainda centrifugado a $9.800 \times g$ durante 10 min. O precipitado foi suspenso em 10 mL de meio contendo 250 mM de sacarose, 0,3 mM de EGTA e 10 mM de HEPES-KOH, pH 7,2 e centrifugados a $4.500 \times g$ durante 15 min. O precipitado final mitocondrial foi suspenso em 1 mL de meio contendo 250 mM de sacarose e 10 mM de HEPES-KOH, pH 7,2 e foi utilizado no período máximo de 3 horas. A concentração de proteína mitocondrial foi determinada pelo método de biureto utilizando BSA (albumina de soro bovino) como padrão (CAIN; SKILLETER, 1987).

As mitocôndrias rompidas foram obtidas por tratamento de choque térmico após três ciclos consecutivos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em um banho de água aquecido a 37°C. Os fragmentos de membrana foram mantidos a 4°C e foram utilizados na avaliação da atividade enzimática mitocondrial no período máximo de 3 horas.

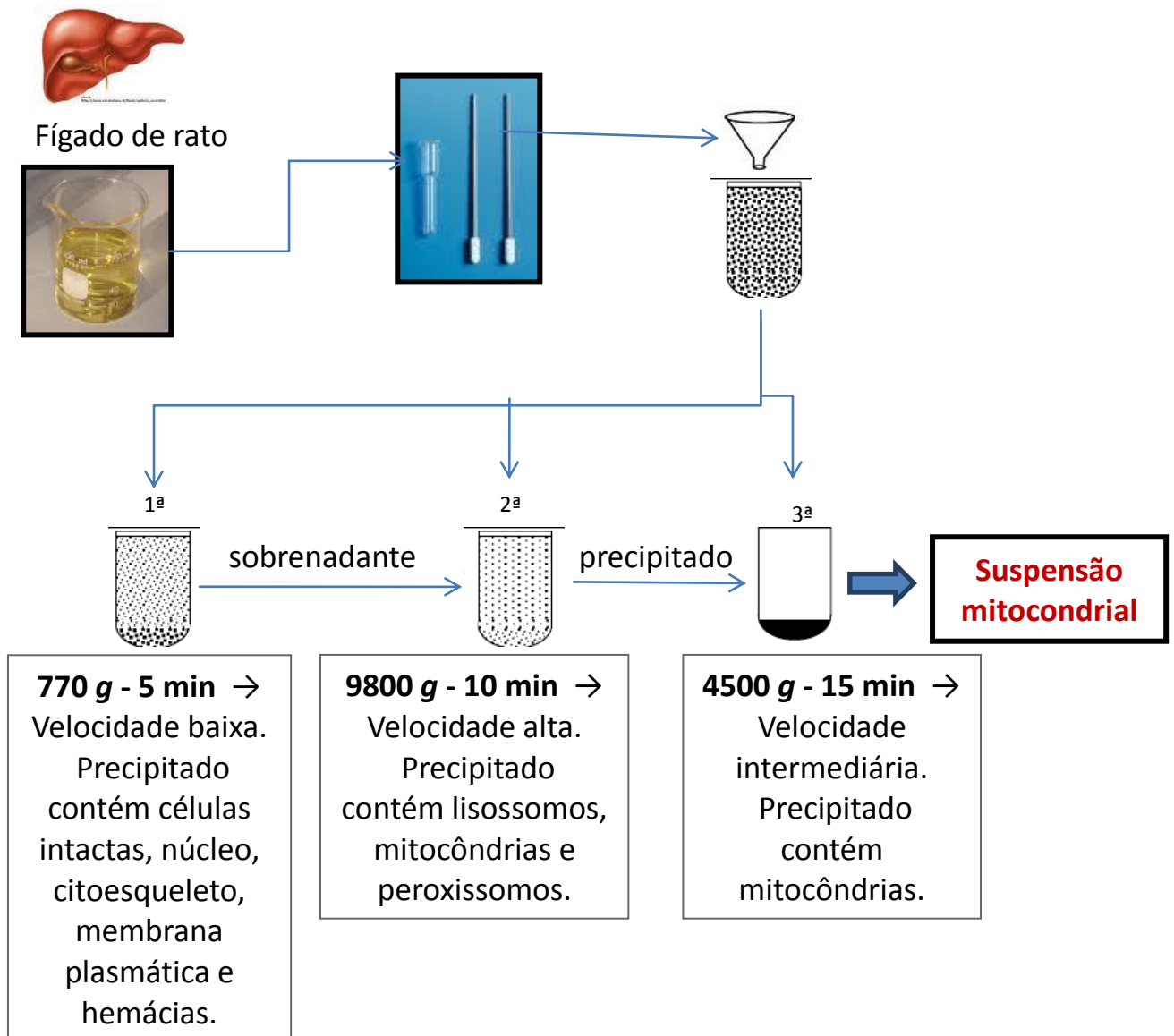


Figura 4. Procedimento realizado para o isolamento das mitocôndrias intactas. Fonte: Pedersen et al. (1978).

4.4.2 Respiração mitocondrial

A respiração mitocondrial foi avaliada utilizando um medidor de oxigênio dissolvido (Strathkelvin Instruments Limited, Glasgow, Escócia, Reino Unido) equipado com um eletrodo do tipo Clark (Figura 5).

Um miligrama de proteína mitocondrial foi adicionado a 1 mL de meio de respiração contendo sacarose 125 mM, HCl 65 mM e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4, mais EGTA 0,5 mM e K_2HPO_4 10 mM, a 30°C. O consumo de oxigênio foi medido usando 5 mM de glutamato + 5 mM de malato ou 5 mM de succinato (+ 50 nM de rotenona) como substratos respiratórios na ausência (estado 4 da respiração mitocondrial) ou a presença de 400 nmol de ADP (estado 3 da respiração mitocondrial).

As velocidades de respiração de estado 3 e 4 foram determinadas por meio do software Strathkelvin Oxygen 782 System (versão 3.0, 2005) e expressas como $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. As concentrações do IMD utilizadas nos experimentos com mitocôndrias isoladas foram 50, 100, 150 e 200 μM .

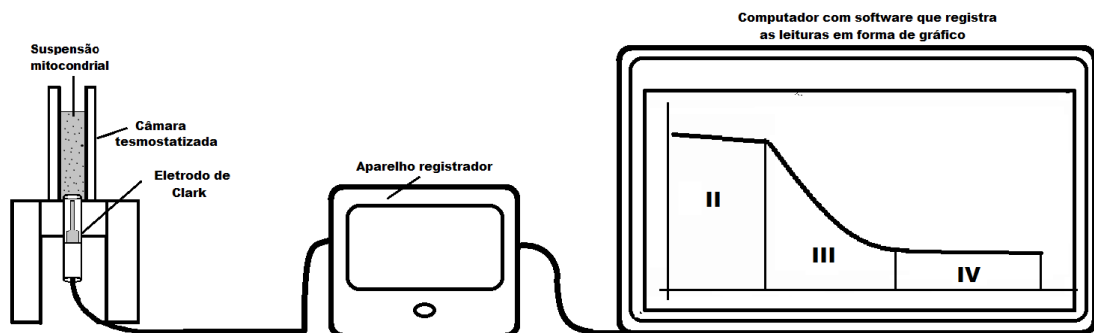


Figura 5. Representação esquemática do oxímetro utilizado para o monitoramento do consumo de oxigênio pelos hepatócitos e do software usado para registrar e calcular as velocidades de consumo de oxigênio. Fonte: Maioli (2012).

4.4.3 Potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) foi determinado por meio de espectrofluorimetria usando um aparelho espectrofluorímetro modelo RF-5301 PC (Shimadzu, Tóquio, Japão), monitorando-se as alterações de fluorescência da

safranina O, usando-se como comprimentos de onda de excitação e emissão 495 e 586 nm, respectivamente (ZANOTTI; AZZONE, 1980).

As mitocôndrias (2 mg de proteína) foram incubadas em um meio contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4 e EGTA 0,5 mM (2 mL de volume final) e foram energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM.

4.4.4 Síntese de ATP

A síntese de ATP foi determinada pelo método de quimioluminescência utilizando o sistema luciferina-luciferase do vagalume por meio de um kit Bioluminescent Assay Kit Sigma (St. Louis, MO, USA) em um aparelho Luminômetro modelo Sirius I (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Alemanha). As mitocôndrias (1 mg de proteína) foram incubadas no meio de respiração (1 mL de volume final) na presença ou na ausência do IMD. A suspensão foi submetida a agitação branda e após 10 minutos de incubação a mesma foi centrifugada a 9.000 x g por 5 min, a 4°C. O precipitado obtido foi tratado com 1 mL de ácido percloracético 1 M a 4°C e novamente centrifugado a 14.000 x g por 10 min a 4°C. Foram separadas alíquotas de 100 µL do sobrenadante de cada amostra e as mesmas foram neutralizadas com KOH 2 M. Em seguida foi adicionado TRIS-HCl 100 mM, pH 7,8 (1 mL de volume final), sendo as amostras centrifugadas a 15.000 x g, por 10 min a 4°C, e os sobrenadantes resultantes foram avaliados, em triplicata, no Luminômetro seguindo as recomendações do fabricante do kit.

4.4.5 Atividade da F_0F_1 -ATP sintase

A atividade da F_0F_1 -ATP sintase foi determinada conforme Bracht et al (2003), em preparações de mitocôndrias intactas desacopladas e mitocôndrias rompidas. As mitocôndrias intactas (0,5 mg de proteína) foram incubadas em meio contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4, mais EGTA 0,2 mM e ATP 5 mM por 20 min a 37°C, na presença de carbonil cianeto-m-clorofenilhidrazona (CCCP) 1 µM, em volume final de 0,5 mL. Quando as mitocôndrias rompidas foram

usadas como fonte da enzima, o meio foi composto por tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 e ATP 5 mM.

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 (50, 100, 150 e 200 μ M) do IMD. A reação foi iniciada com a adição de ATP 5 mM e finalizada com a adição de ácido tricloroacético a 4°C (concentração final de 5%). Em seguida, o material foi centrifugado a 12.000 x g, durante 10 minutos e o fosfato inorgânico (Pi) liberado foi dosado segundo o método proposto por Fiske; Subbarow (1925), em comprimento de onda de 700 nm, utilizando o espectrofotômetro modelo DU-800 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Os resultados foram expressos em nmol de Pi . min⁻¹ . mg de proteína⁻¹. A sensibilidade da oligomicina (4 μ g.mL⁻¹) foi testada em todas as suspensões mitocondriais como controle positivo e o controle negativo foi realizado na ausência do IMD.

4.4.6 Despolarização do $\Delta\psi$ induzida pelo ADP

O efeito do IMD sobre a despolarização do $\Delta\psi$ induzida por ADP foi avaliado conforme descrito por O'Brien et al., 2008, com modificações. As mitocôndrias (2 mg de proteína) foram incubadas em um meio contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4, mais EGTA 0,5 mM, glutamato 5 mM + malato 5 mM e safranina O 10 μ M (2 mL de volume final) a 30°C.

IMD 200 μ M ou carboxilatractilosídeo (cATR) 5 μ M ou Oligomicina 1 μ g/mL, foram adicionados 30 segundos antes da adição de 400 nmol de ADP. A despolarização induzida por ADP descreve a alteração e a recuperação do $\Delta\psi$ após a adição do nucleotídeo. A amplitude de despolarização induzida por ADP foi medida na presença e ausência (controle) das substâncias teste.

4.5 Hepatócitos Primários

4.5.1 Isolamento dos Hepatócitos de Rato

Os hepatócitos foram isolados após a perfusão do fígado com collagenase, conforme descrito previamente por Guguen-Guillouzo (1992), com modificações. Os ratos foram anestesiados por injeção intraperitoneal de tiopental sódico 50 mg.kg^{-1} de peso corporal e a cavidade peritoneal foi aberta por incisão bilateral. O fígado foi canulado e perfundido através da veia porta (Figuras 6 a 8) com uma solução de NaCl 160,8 mM, KCl 3,15 mM, EGTA 0,5 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ 0,7 mM, glicose 5 mM e HEPES-KOH 33 mM, pH 7,65 (meio 1), a 37°C , com um fluxo de 30 mL/min durante 15 minutos. Em seguida, o fígado foi perfundido com uma solução composta pelo meio 1 adicionado de collagenase tipo IV 0,025% (p/v) e CaCl_2 1 mM, com um fluxo de 20 mL/min durante 15 minutos. Ao término da perfusão as células foram separadas (liberadas dos lóbulos) no meio de Krebs-Henseleit, composto por NaCl 119 mM, KCl 4,9 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, CaCl_2 2,6 mM, NaHCO_3 25 mM, MgSO_4 1,2 mM e glicose 5 mM, adicionado de BSA 0,1% (p/v) e HEPES 12,5 mM, pH 7,4. A suspensão foi filtrada em gaze e centrifugada 2 vezes a $50 \times g$ por 3 minutos em centrífuga refrigerada (Eppendorf 5804R, Alemanha). Os hepatócitos foram ressuspendidos no meio de Krebs-Henseleit.

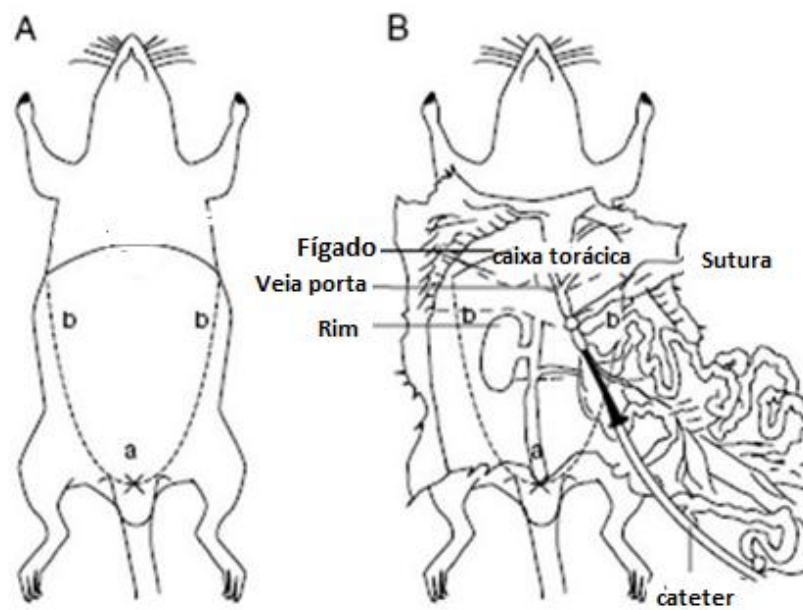


Figura 6. Representação esquemática do processo cirúrgico envolvido no isolamento de hepatócitos. Incisão bilateral no abdômen do animal (A) e inserção da cânula na veia porta hepática (B). Fonte: Maioli (2012).

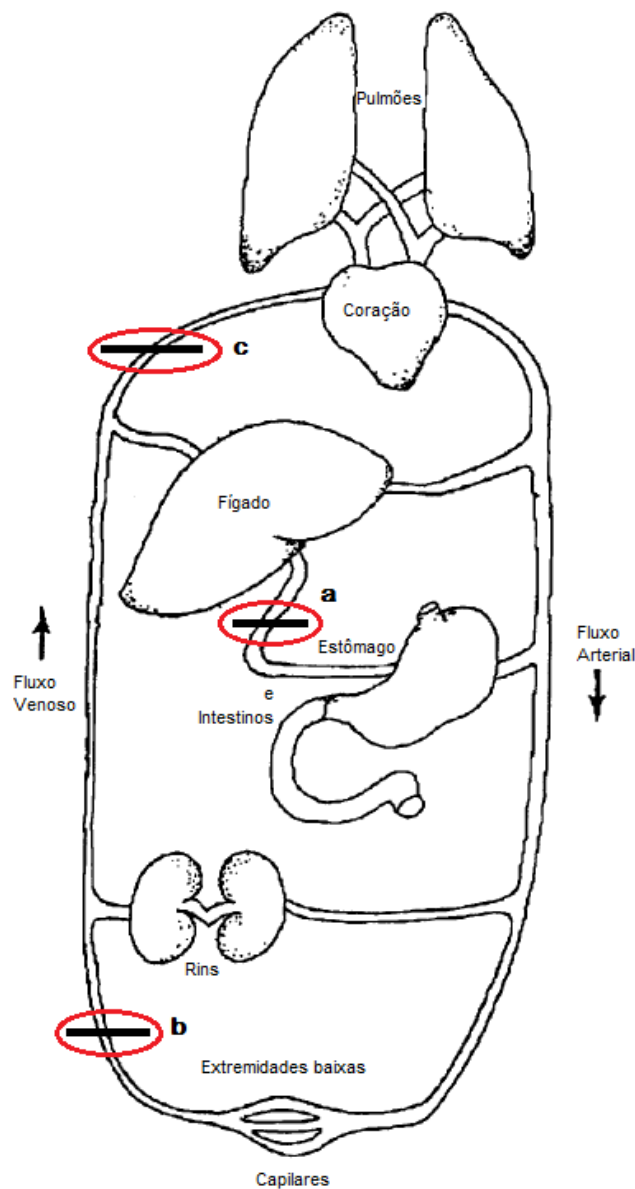


Figura 7. Representação simplificada da distribuição dos principais pontos onde ocorre a inserção de cânulas e/ou interrupção do fluxo sanguíneo ao longo da cirurgia. Veia porta hepática (a), veia cava caudal (b), veia cava cranial (c). Adaptado de Principle of Toxicology: Environmental and Industrial Applications, (2000).

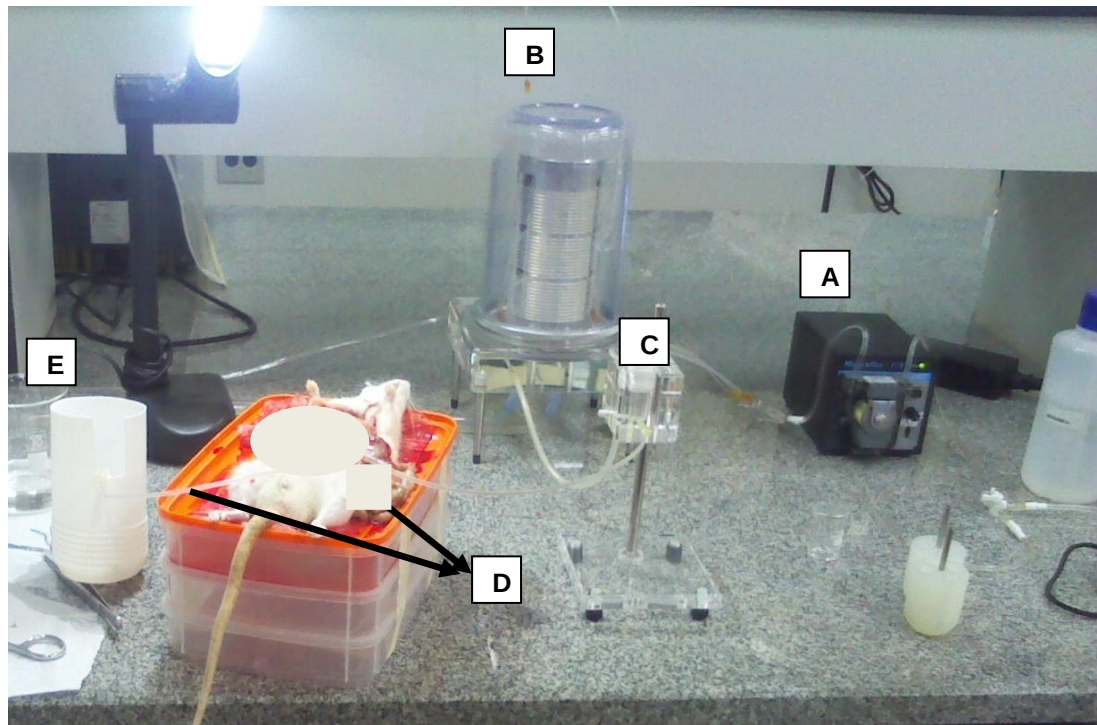


Figura 8. Sistema de perfusão do fígado para isolamento dos hepatócitos. A sequência letras indica o sentido do fluxo e os equipamentos responsáveis pela condução do líquido de perfusão até o fígado. (A) bomba peristáltica, (B) câmara oxigenadora e aquecedora, (C) captador de bolhas, (D) cânulas de entrada e saída do líquido de perfusão e (E) copo coletor do líquido de perfusão para a recirculação após a inserção do meio 1 acrescido de collagenase IV. Fonte: Maioli (2012).

Após a ressuspensão, o número de células foi verificado por contagem em câmara de Neubauer (Figura 9). Para isso a suspensão celular obtida teve de ser diluída inicialmente com meio de Krebs, sendo esta diluição variável em função do número de células presentes, visto que durante a contagem na câmara, não se pode exceder o limite de 200 células em cada quadrante, pois a presença de um número maior de células diminui a confiabilidade da contagem. Em seguida a suspensão sofreu nova diluição, de 10 vezes, com Trypan Blue 0,16% (p/v) (MOLDÉUS, et al., 1978), sendo esta diluição realizada com o intuito de avaliar a viabilidade celular pelo teste de exclusão, pois simultaneamente a contagem do número total de células é obtido também o número de células viáveis, sendo utilizadas apenas preparações com viabilidade celular inicial superior a 85%.

Depois da contagem das células na câmara, para se obter o número de células por mL de suspensão, o valor obtido na contagem foi adicionado na seguinte fórmula:

$$n^{\circ} \text{ de células/mL} = \frac{n^{\circ} \text{ total de células}}{\text{quadrantes}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000$$

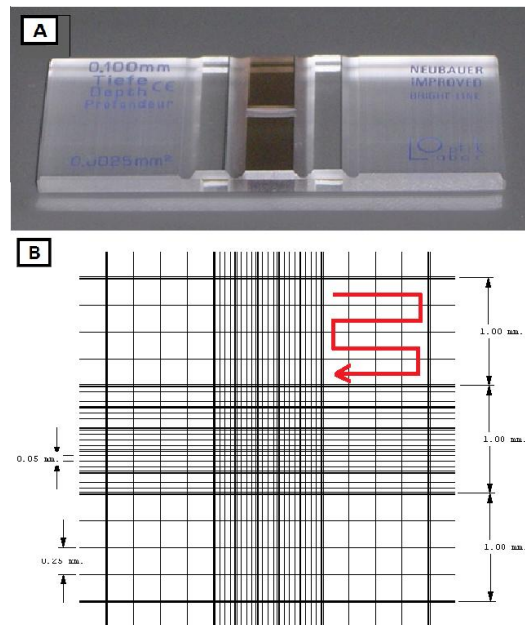


Figura 9. Câmara de Neubauer utilizada para avaliação da viabilidade celular por meio da exclusão do Trypan blue (0,16%) e contagem do número total de células. (A) visão macroscópica da câmara; (B) visão microscópica da organização dos quadrantes utilizados para contagem das células. Fonte: elaborado pelo autor.

4.5.2 Ensaio com Células Permeabilizadas

4.5.2.1 Respiração Mitocondrial

Os hepatócitos (10^6 células/mL) foram incubados em meio contendo sacarose 250 mM, KH_2PO_4 2mM, HEPES 10 mM, EGTA 0,5 mM, BSA 0,5% (m/v), MgCl_2 5 mM, pH 7,2, a 37° C. As células foram permeabilizadas com digitonina 0,002% (m/v), um detergente que facilita a entrada do substrato na célula. Os substratos utilizados foram glutamato 5mM + malato 5 mM ou succinato de potássio 5 mM acrescido de

rotenona 2,5 μM . A respiração de estado 3 foi iniciada pela adição de ADP 2 mM (MOREADITH; FISCKUM, 1984).

A velocidade de respiração de estado 3 foi determinada por meio do software Strathkelvin Oxygen 782 System (versão 3.0, 2005) e expressas como $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^6 \text{ células}^{-1}$. As concentrações do IMD utilizadas nos experimentos de respiração mitocondrial e potencial de membrana mitocondrial em hepatócitos foram de 50, 100, 150 e 200 μM .

4.5.2.2 Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

As células (1×10^6) permeabilizadas com digitonina 0,007% foram incubadas no meio de respiração contendo sacarose 250 mM, KH_2PO_4 2mM, Hepes 10 mM, EGTA 0,5 mM, BSA 0,5 % e MgCl_2 5 mM, pH 7,2, acrescido de safranina O 10 μM (volume final de 2 mL) e a energização das mitocôndrias foi feita pela adição de 5 mM de glutamato + 5 mM de malato ou 5 mM de succinato.

4.5.3 Ensaio com Células Incubadas

4.5.3.1 Condições de Incubação dos Hepatócitos

Os hepatócitos (1×10^6 células/mL) foram incubados na ausência (controle) ou na presença de diferentes concentrações do IMD (0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 3,0 mM) em frascos tipo erlenmeyer de 25 mL, em um volume final de 10 mL, no meio de Krebs-Henseleit adicionado de BSA 0,1% (p/v) e HEPES 12,5 mM, pH 7,4, e mantidos sob agitação constante (30 rpm), a 37° C, em atmosfera com 95% O_2 , 5% CO_2 (MINGATTO et al., 2002) (Figura 10). As coletas de amostras foram realizadas nos tempos: 0 (logo após a adição do inseticida à suspensão celular), 30, 60, 90 e 120 minutos de incubação. Controle foi feito na ausência do IMD com adição de DMSO.

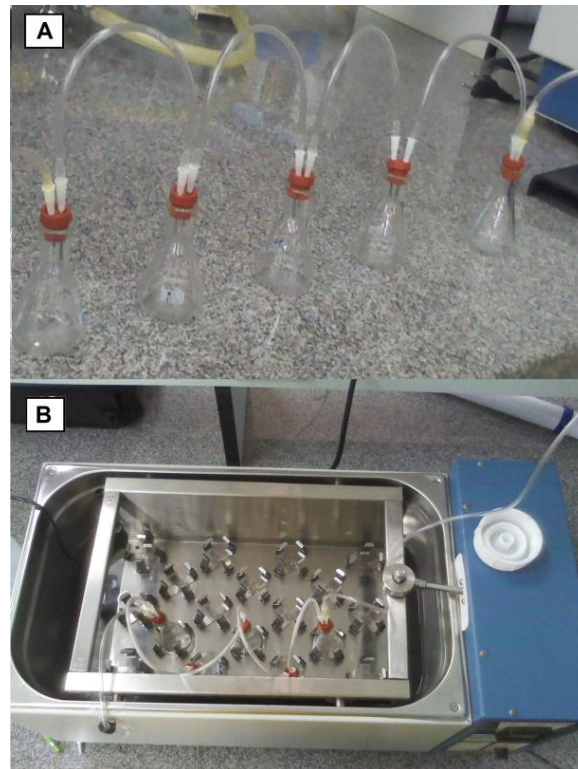


Figura 10. Sistema de oxigenação e agitação dos hepatócitos durante o processo de incubação. (A) A mistura carbogênica é inserida ao sistema, o excedente é transferido de um erlenmeyer para o outro após a saturação do recipiente onde estão contidas as células. (B) Organização dos erlenmeyers no banho-maria tipo Dubnoff utilizado para manter a suspensão celular homogênea e a 37°C. Fonte: elaborado pelo autor.

4.5.3.2 Concentração Celular de ATP

Para a determinação da concentração celular de ATP amostras de 1 mL foram coletadas nos tempos determinados e centrifugadas a 50 g, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi tratado com 1 mL de HClO_4 1 M a 4°C. Após centrifugação da mistura a 2.000 g por 10 minutos, a 4°C, uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi retirada, neutralizada com KOH 2 M e acrescida de Tris-HCl 100 mM, pH 7,8 (q.s.p. 1 mL). A amostra neutralizada foi novamente centrifugada a 15.000 g por 10 minutos, e o conteúdo de ATP foi determinado por bioluminescência a partir de uma alíquota de 100 µL, obtida após a última centrifugação, utilizando-se o sistema luciferina-luciferase por meio do kit “ATP BIOLUMINESCENT ASSAY KIT” (Sigma ChemicalCo. St. Louis, MO, USA) em um

aparelho Luminômetro (modelo Sirius I, BertholdDetection Systems, Pforzheim, Alemanha). Os resultados após as conversões foram expressos em nmol de ATP. 10^6 células⁻¹.

4.5.3.3 Viabilidade Celular Avaliada pela Atividade das Enzimas ALT e AST

Após a incubação, amostras de 1 mL foram coletadas nos tempos determinados e centrifugadas a 50 g, por 5 minutos, a 4° C, e a atividade das enzimas ALT e AST foram determinadas no sobrenadante utilizando-se um “kit” de reagente da marca Bioclin (Belo Horizonte, MG, Brasil). As dosagens foram realizadas em comprimento de onda igual a 340 nm em um espectrofotômetro (BeckmanCoulter modelo DU800) sob agitação e temperatura (37° C) controladas. A quantificação foi realizada por meio da diferença da absorvância medida a cada um minuto (Figura 11), sendo a citotoxicidade expressa em porcentagem da atividade total de ALT e AST, determinada em células tratadas com Triton X-100 0,5% (v/v).

- Cálculo para obtenção da porcentagem em relação ao total:

O primeiro passo é calcular a diferença de absorvância entre os pontos, ou seja, são obtidos 3 valores ($\Delta_1 = A-B$; $\Delta_2 = B-C$; $\Delta_3 = C-D$) sendo que a leitura inicial é desconsiderada. Assim, faz-se uma média, como mostrado na Figura 11. A média dos valores é multiplicada por um fator de conversão (específico para cada enzima) obtendo-se o resultado em U/L. Por fim, faz-se uma relação de porcentagem entre a quantidade de enzima liberada por cada tratamento e a quantidade total, obtida com TRITON X-100.

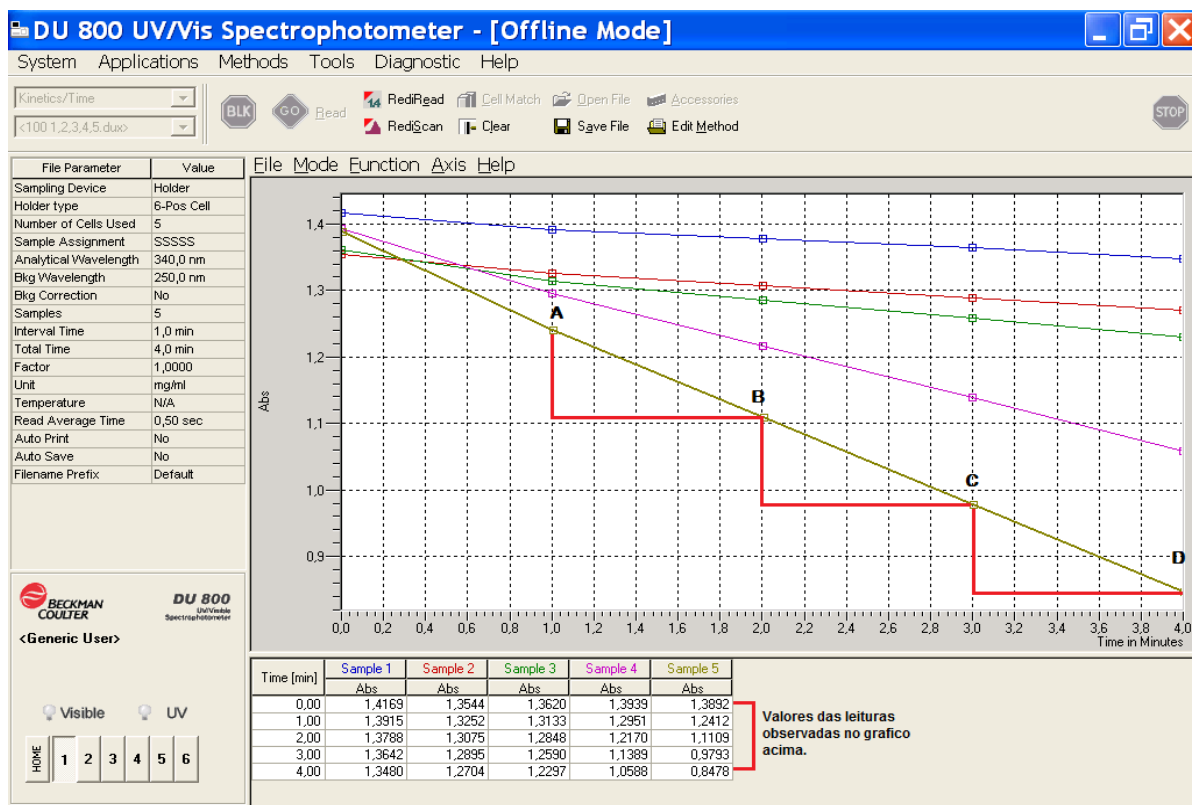


Figura 11. Exemplo de interface do sistema operacional do espectrofotômetro DU800 no modo cinético (Kinetics/Time), onde as leituras são realizadas a cada minuto, dando origem às curvas acima apresentadas. Fonte: elaborado pelo autor.

4.6 Perfusão de fígado de rato

Os experimentos de perfusão de fígado de rato foram realizados no Laboratório de Oxidações Biológicas do Departamento de Bioquímica, da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

4.6.1 Animais

Os animais foram cedidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, e acondicionados em um biotério setorial (Biotério do Departamento de Bioquímica – Credenciado pelo CIUCA-CONCEA para Criação ou Utilização de Animais em Ensino ou Pesquisa Científica) de acordo com as normas vigentes

estabelecidas pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEAE) da Universidade Estadual de Maringá.

Foram utilizados ratos machos albinos da linhagem Wistar, pesando 200 g. Os animais foram alimentados com ração balanceada padrão Nuvilab® e receberam água *ad libitum*. Os ratos foram mantidos em caixas plásticas de polipropileno (4 animais por caixa). O ciclo claro/escuro foi de 12 horas e a temperatura controlada foi de 25°C. Para avaliar as ações do IMD (150 e 250 µM) sobre a gliconeogênese e o metabolismo de proteínas, os ratos foram previamente tratados com fenobarbital (90 mg/kg de peso corporal por 3 dias via intraperitoneal), um estimulador do sistema CYP 450, e permaneceram em jejum por 24 horas antes da cirurgia (NEWMAN; GUZELIAN, 1982).

4.6.2 Líquido de perfusão

O líquido de perfusão padrão utilizado foi o tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (KREBS; HENSELEIT, 1932) com pH 7,4, saturado com a mistura de oxigênio: dióxido de carbono (95:5%). O líquido contém também albumina bovina a 25 mg % (p/v). A composição salina do tampão foi: NaCl 115 mM; NaHCO₃ 25 mM; KCl 5,8 mM; Na₂SO₄ 1,2 mM; MgCl₂ 1,18 mM; NaH₂PO₄ 1,2 mM e CaCl₂ 1,3 mM.

4.6.3 Método de perfusão do fígado

Para o procedimento cirúrgico, os ratos foram anestesiados por injeção intraperitoneal de tiopental (50 mg.kg⁻¹). A técnica cirúrgica a ser utilizada foi a descrita por Scholz e Bücher (1965). O abdômen foi aberto e o tecido conjuntivo que cerca o fígado seccionado. A veia esplênica foi fechada e a veia porta canulada sob fluxo. Com isso ocorrerá o completo dessangramento do fígado. O tórax foi aberto, e para isso, o diafragma e as costelas serão cortados para exposição completa do coração, em seguida ocorreu o fechamento da veia hepática por meio da veia cava superior. Dessa maneira, a veia hepática foi canulada por meio da veia cava superior (porção cranial). O fígado foi retirado do animal, e o fluxo através do órgão

foi ajustado para valores que permitiam oxigenação adequada (entre 4 e 5 mL por minuto, por grama de fígado), o que pode ser avaliado a partir da concentração venosa de oxigênio (nunca inferior a 0,2 mM).

O sistema de perfusão foi composto de uma bomba peristáltica, um oxigenador de membrana e uma câmara para onde o efluente do fígado foi conduzido, sendo que nesta está acoplado um micro eletrodo de platina com polarógrafo, um registrador potenciométrico. Além disso, no sistema existiu um banho-maria com bomba de circulação externa do líquido, um cilindro contendo a mistura carbogênica (O₂:CO₂ / 95:5) e uma bomba de infusão. As partes essenciais deste sistema foram construídas nas oficinas da Universidade Estadual de Maringá. O fluido de perfusão foi bombeado através do sistema de oxigenação com temperatura controlada (37° C) antes de entrar no fígado via a cânula inserida na veia porta. O fluxo de perfusão foi ser mantido constante em cada procedimento experimental, sendo ajustado entre 30 e 35 mL/min, dependendo do peso do fígado. Amostras do líquido perfundido foram coletadas em tempos específicos e analisadas para a determinação de glicose, lactato, piruvato e uréia (Figura 12).

Os experimentos relacionados à gliconeogênese, ciclo da uréia e consumo de oxigênio foram planejados para avaliar as ações do IMD sobre processos biossintéticos dependentes de energia. O fígado de ratos previamente tratados com fenobarbital submetidos ao jejum prévio de 24 h foi perfundido com alanina, um substrato gliconeogênico, e com diferentes concentrações de IMD (150 e 250 µM). A alanina, foi infundida na concentração supra fisiológica de 2,5 mM. A escolha deste aminoácido se deu uma vez que a alanina, juntamente com a glutamina, são os aminoácidos encontrados em maior concentração nos fluídos corporais, em comparação aos demais aminoácidos (HOLECEK, 2011).

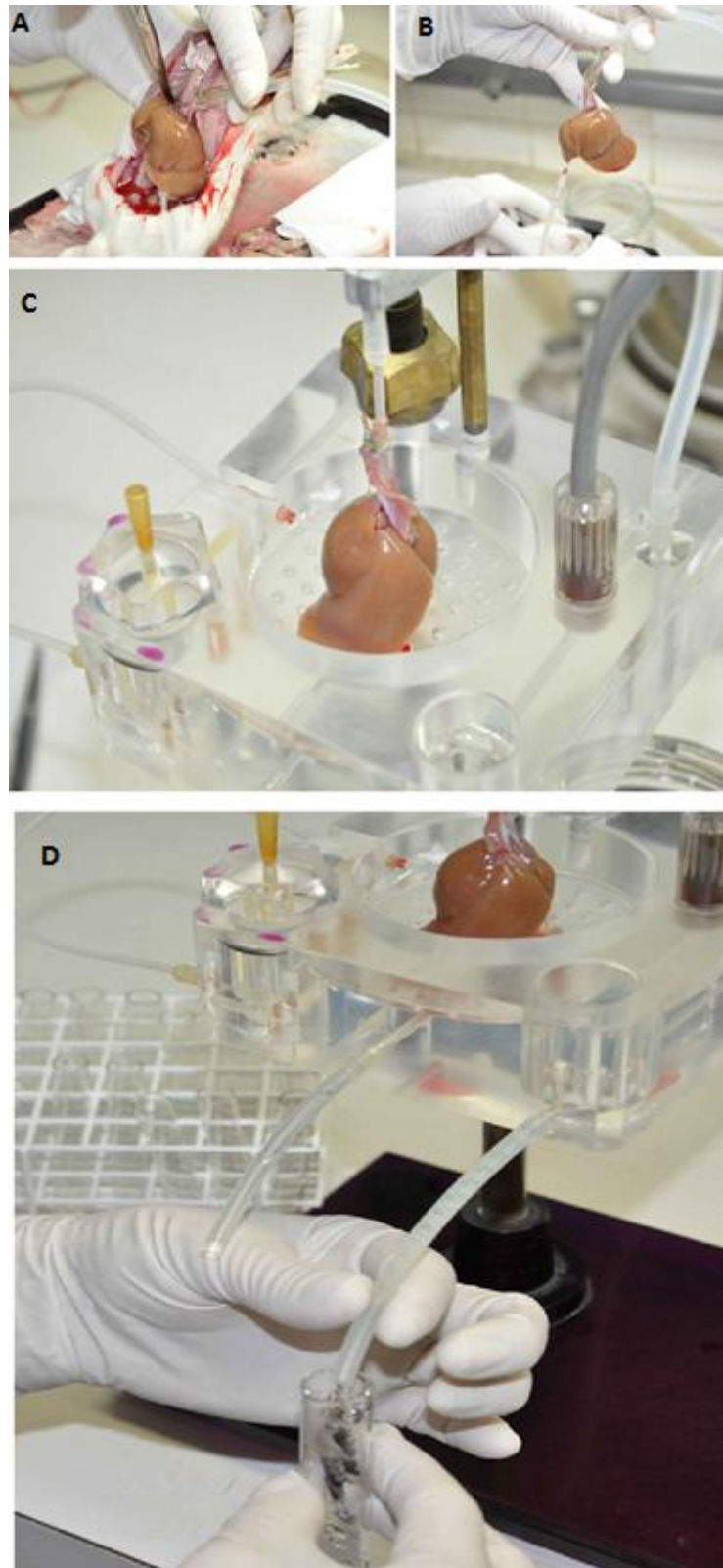


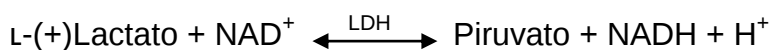
Figura 12. Processo de retirada do fígado pós canulados (A), fígado canulado fora do corpo do animal (B), fígado acoplado ao sistema (C), coleta do líquido perfusado para dosagem dos parâmetros (D). Fonte: Constantin (2009).

4.6.3 Dosagens bioquímicas

4.6.4.1 Dosagem de lactato

As dosagens de lactato foram realizadas de acordo com metodologia descrita por Gutmann; Wahlefeld, (1974). Foram coletadas 500 µL das amostras na saída do perfusado e foram colocados em tubo de ensaio e em seguida serão adicionados 1 mL de mistura reativa composta por tampão glicina 0,1 M-hidrazina 0,4 M, pH 9,0; NAD^+ 2,75 mM e lactato desidrogenase (LDH) 19 U/mL. Após a adição da mistura reativa, as amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37° C em banho-maria durante 1 hora. Ao término desse período as leituras foram realizadas em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 340 nm.

Princípio do método:



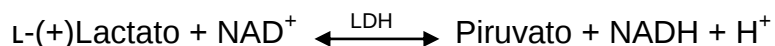
De acordo com a reação apresentada acima catalizada pela enzima lactato desidrogenase (LDH), o lactato é convertido em piruvato com a consequente redução do NAD^+ em NADH, com isso ocorre um aumento na absorbância no espectro de luz com comprimento de onda de 340 nm devido à formação de NADH. Por meio dessa reação pode-se dosar a produção de lactato pela quantidade de NADH produzida, visto que as concentrações de ambos foram utilizadas em proporções iguais para que a reação ocorra. O coeficiente de extinção molar (ϵ) utilizado para conversão dos dados foi de $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4.6.4.2 Dosagem de piruvato

As dosagens de piruvato foram realizadas como descritas por Czok; Lamprecht (1974). Das amostras coletadas na saída do perfusado, 500 µL foram colocados em tubo de ensaio, onde em seguida foram adicionados 1 mL de mistura reativa composta por tampão TRIS 0,1 M pH 7,0; NADH 0,1 mM e LDH 2,75 U/mL. Após a adição da mistura reativa, as amostras foram homogeneizadas e incubadas

a 37° C em banho-maria por 10 minutos. Ao término desse período as leituras foram realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 340 nm.

Princípio do método:

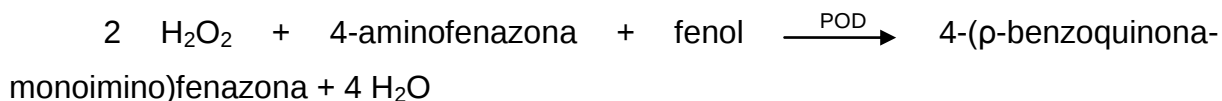
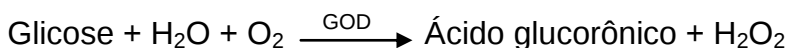


A reação apresentada acima se trata de uma reação reversível, catalisada pela enzima lactato desidrogenase (LDH), onde o piruvato pode ser convertido em lactato utilizando os íons hidrogênio fornecido pelo NADH. Por esse fato, a quantidade de piruvato no perfusado pode ser medida por meio de uma diminuição na absorbância no espectro de luz com comprimento de onda de 340 nm ocasionada pela oxidação do NADH. Isso ocorre porque a oxidação do NADH e a produção de lactato são diretamente proporcionais. O coeficiente de extinção molar (ϵ) utilizado para conversão dos dados foi $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4.6.4.3 Dosagem de glicose

A glicose foi quantificada pelo método enzimático colorimétrico utilizando a glicose oxidase (BERGMEYER; BERNT, 1974). Das amostras a serem coletadas na saída do perfusado ao longo do período de perfusão 1 mL foram colocados em tubos de ensaio, onde foram adicionados 500 μL uma solução de um Kit de reação enzimática (Gold Analise Diagnóstica – 434E-2). Após a adição do reagente do kit, as amostras foram homogeneizadas e colocadas para incubação em banho-maria a 37°C por 20 minutos. Ao término da incubação as leituras foram realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 505 nm.

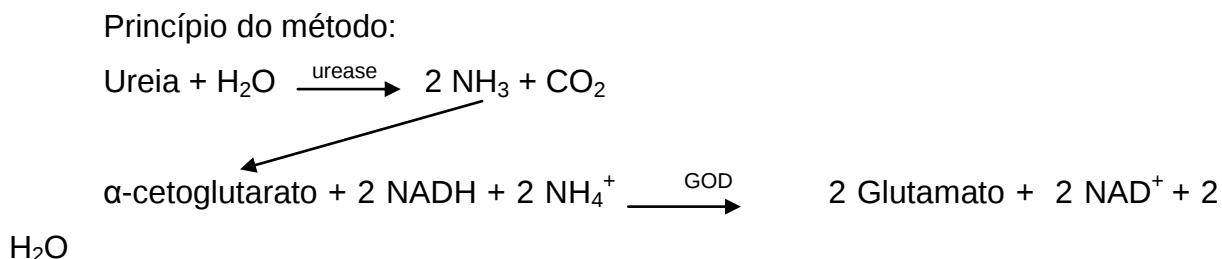
Princípio do método:



A glicose é oxidada enzimaticamente pela glicose oxidase (GOD) a ácido glucorônico e água oxigenada. Essa última, na presença de peroxidase (POD), produz a conjugação do fenol presente na solução com a 4-aminofenazona, dando lugar a um composto colorido que absorve luz a 505 nm. Assim, a intensidade da cor formada é diretamente proporcional à concentração da glicose presente na amostra.

4.6.4.4 Dosagem de uréia

A dosagem de uréia foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Kun e Kearney (1974). Nas amostras foram adicionados 10 µL de solução de urease 1,6 U/mL (obtida de um kit reagente específico para dosagem de uréia). Após a adição da solução de enzima, as amostras foram homogeneizadas e incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos. Ao término desse período foram realizadas as leituras a 340 nm.



De acordo com as reações apresentadas acima, a dosagem de uréia pode ser realizada por meio de sua decomposição, pois ocorre a formação de duas moléculas de amônia que ao serem produzidas são protonadas tornando-se duas moléculas de amônio. Estas moléculas de amônio por sua vez, são consumidas em uma reação posterior com a consequente formação de glutamato, sendo consumidas duas moléculas de NADH nesse processo. Essa oxidação do NADH em NAD⁺ resulta numa queda na absorção do espectro de luz a 340 nm, sendo esta utilizada para o cálculo da concentração de uréia. O coeficiente de extinção molar (ϵ) a ser utilizado para conversão dos dados foi de 6,22 mM⁻¹.cm⁻¹.

4.6.4.5 Consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio no meio de perfusão foi monitorado continuamente por um eletrodo de platina blindado com Teflon, estando este adequadamente posicionado em uma câmara de acrílico na saída do perfusado do fígado como descrito por Scholz e Bücher (1965), estando também acoplado um polarógrafo para realizar as leituras que foram convertidas em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.

4.7 Análise Estatística

A significância estatística dos dados experimentais foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), sendo a comparação de médias realizada por meio do teste de Dunnet, o qual realiza a comparação entre os tratamentos e o controle, e os resultados com valor de $P < 0,05$ considerados estatisticamente significantes. O programa utilizado foi o Graph pad Prism, versão 4.0 para o Windows, do Graph pad Software (San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Mitocôndrias

5.1.1 Efeito do IMD na respiração mitocondrial

Nas concentrações testadas (50, 100, 150 e 200 μM), o IMD inibiu o estado 3 da respiração das mitocôndrias de forma dose-dependente. Este efeito foi observado quando as mitocôndrias foram energizadas com glutamato mais malato, os substratos do complexo I da cadeia respiratória (Figura 13 A), apresentando resultados significantes nas concentrações de 100 μM ($P < 0,05$), 150 e 200 μM ($P < 0,01$). Quando as mitocôndrias foram energizadas com succinato, um substrato do complexo II da cadeia respiratória (Figura 13 B), foram observados resultados significantes nas concentração de 150 e 200 μM ($P < 0,01$). O IMD não estimulou o estado 4 da respiração em nenhuma das concentrações testadas (dados não mostrados).

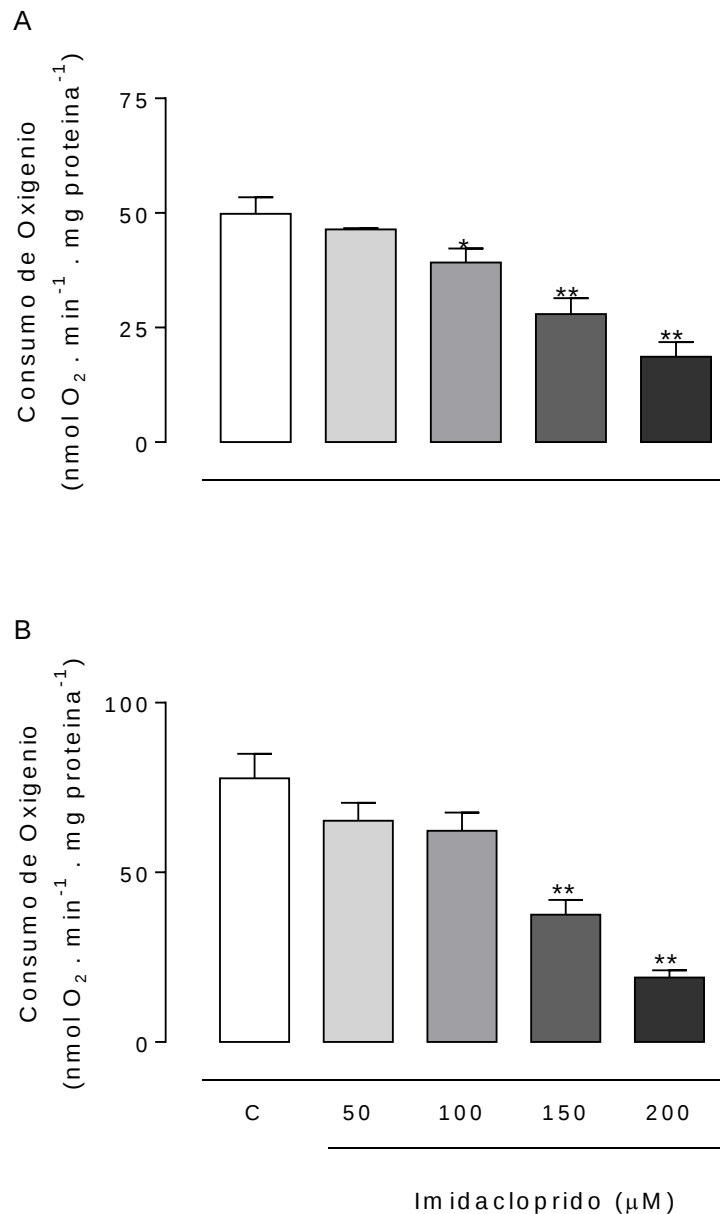


Figura 13. Efeito do IMD (50 - 200 µM) sobre o estado 3 da respiração em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com glutamato 5 mM mais malato 5 mM (A) ou succinato 5 mM (acrescido de rotenona 50 nM) (B). As condições de ensaio estão descritas na seção Material e Métodos. Os valores representam a média ± EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. ***Significamente diferente do controle (*P < 0,05 e **P < 0,01, respectivamente). Fonte: elaborado pelo autor.

Experimentos subsequentes de consumo de oxigênio com mitocôndrias desacopladas pela adição de cianeto de carbonil m-clorofenil-hidrazona (CCCP) foram realizados para testar se o IMD exercia ação inibitória sobre a cadeia

respiratória. O IMD não inibiu a respiração desacoplada por CCCP, indicando que apenas a fosforilação oxidativa foi inibida (Figura 14), visto que a cadeia respiratória está funcionando normalmente e assim, bombeando os prótons para o espaço intermembranar. O mesmo comportamento foi observado com a oligomicina (inibidor específico da F_0F_1 -ATP sintase) e o carboxiatractilosídeo (inibidor específico do ANT). Ao adicionar o cianeto de potássio (KCN) (inibidor da cadeia respiratória), a respiração foi totalmente inibida.

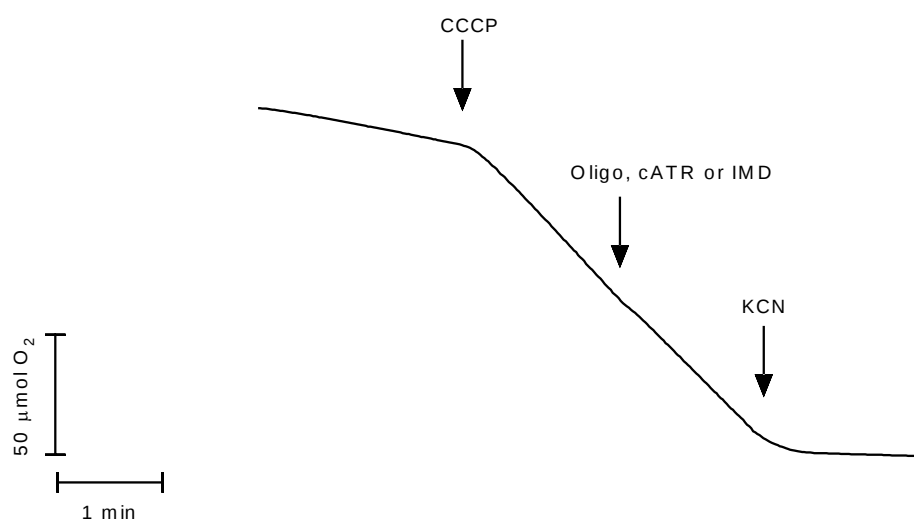


Figura 14. Efeito do IMD ($200 \mu\text{M}$) sobre o consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas de fígado de rato desacopladas com CCCP ($1 \mu\text{M}$). A figura é representativa de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. As setas indicam a adição dos compostos. Oligo: oligomicina $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. cATR: carboxiatractilosídeo $1 \mu\text{M}$. Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.2 Efeito do IMD no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$)

O IMD (50 - $200 \mu\text{M}$) não dissipou o $\Delta\psi$ nas mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com glutamato e malato (Figura 15), nem nas mitocôndrias energizadas com succinato (dados não mostrados).

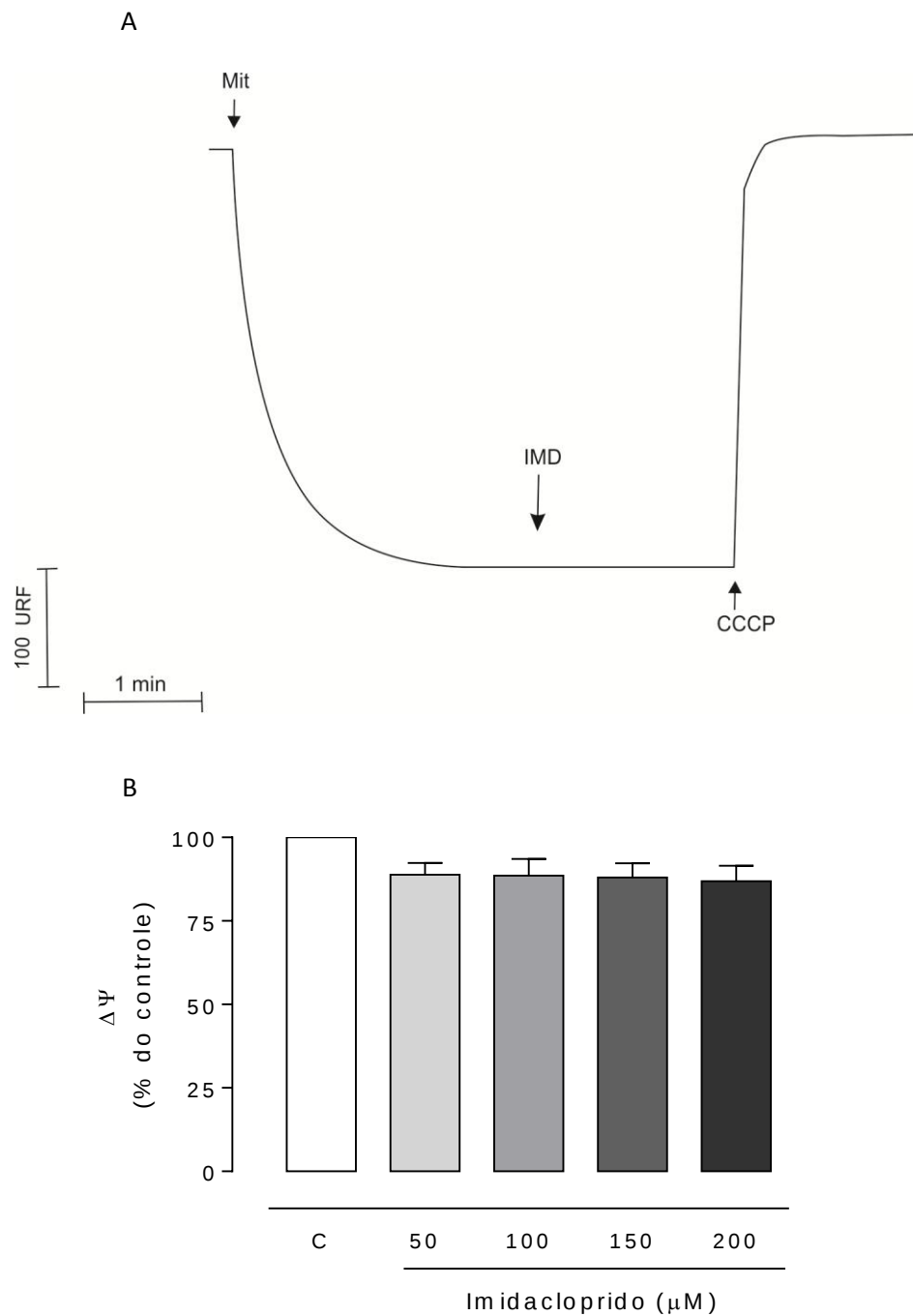


Figura 15. Efeito do IMD (50 - 200 μM) sobre o potencial de membrana ($\Delta\psi$) de mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com glutamato 5 mM mais malato 5 mM. As condições de ensaio estão descritas na seção Material e Métodos. A Figura A é representativa de um experimento, e os valores na Figura B representam a média $\pm$ EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.3 Efeito do IMD nos níveis de ATP mitocondriais

O IMD (50-200 μM) inibiu a produção de ATP de maneira dose-dependente (Figura 16), apresentando resultados significantes nas concentrações de 100 ($P < 0,05$), 150 e 200 μM ($P < 0,01$).

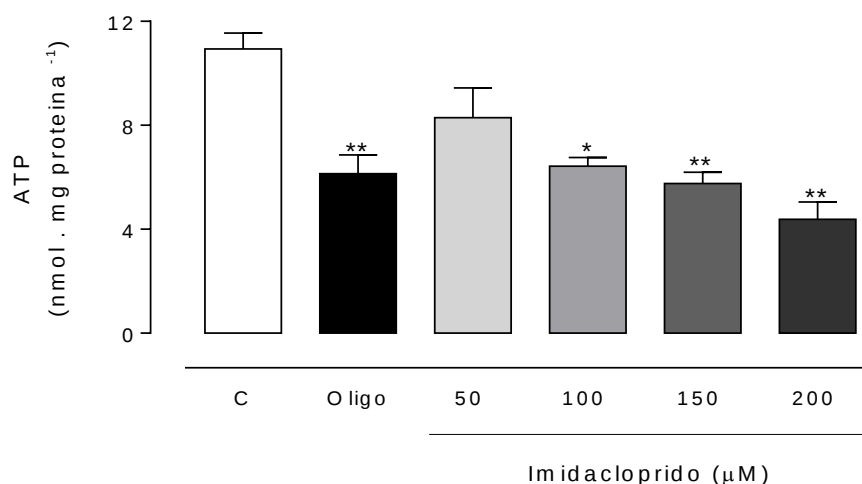


Figura 16. Efeito do IMD (50-200 μM) sobre a síntese de ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos energizadas com glutamato 5 mM mais malato 5 mM. As condições de ensaio estão descritas na seção Material e Métodos. Os valores representam a média $\pm$ EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. C: controle, apenas 0,1% de DMSO. Oligo: oligomicina 1 $\mu\text{g/mL}$. ***Significantemente diferente do controle (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$, respectivamente). Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.4 Efeito do IMD na despolarização induzida por ADP no $\Delta\psi$

O objetivo desse ensaio foi determinar se o IMD inibe a despolarização do $\Delta\psi$ induzida por ADP por inibição do ANT. O carboxiatractilosídeo foi usado como um controle positivo para a inibição direta do ANT. O IMD (200 μM) causou apenas uma inibição parcial da despolarização estimulada pelo ADP, resultado semelhante ao

efeito provocado pela oligomicina (1 $\mu\text{g/mL}$), indicando assim que o IMD não inibe o ANT (Figura 18).

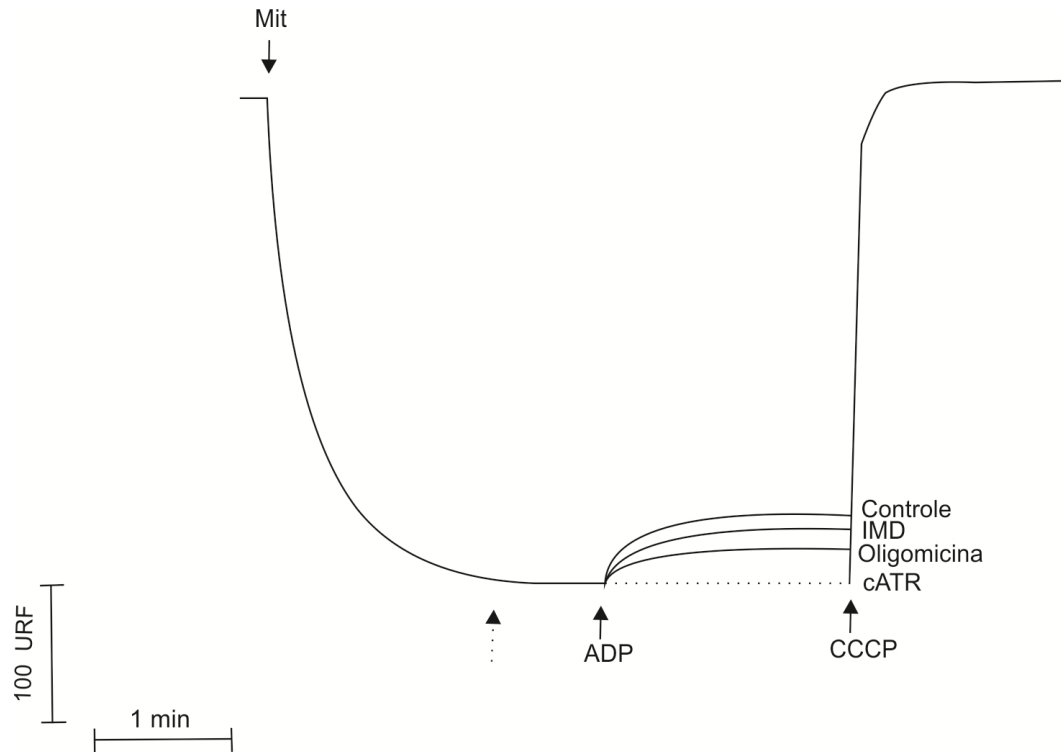


Figura 17. Efeito comparativo do IMD (200 μM), oligomicina (1 $\mu\text{g/mL}$) e carboxiatractilosídeo (cATR) (5 μM) na despolarização do $\Delta\psi$ induzida por ADP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. As condições de ensaio estão descritas na seção Material e Métodos. A figura é representativa de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. Controle, apenas 0,1% de DMSO. Seta pontilhada: adição do cATR, oligomicina ou IMD. Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.5 Efeito do IMD na atividade da F_0F_1 -ATP sintase

A atividade da enzima F_0F_1 -ATP sintase das mitocôndrias intactas desacopladas não foram afetadas pelo IMD (Figura 17 A). Já nas mitocôndrias rompidas, o IMD reduziu a atividade da F_0F_1 -ATP sintase de maneira dose-dependente (Figura 17 B), apresentando resultados significantes nas concentrações de 50, 100 ($P < 0,05$), 150 e 200 μM ($P < 0,01$).

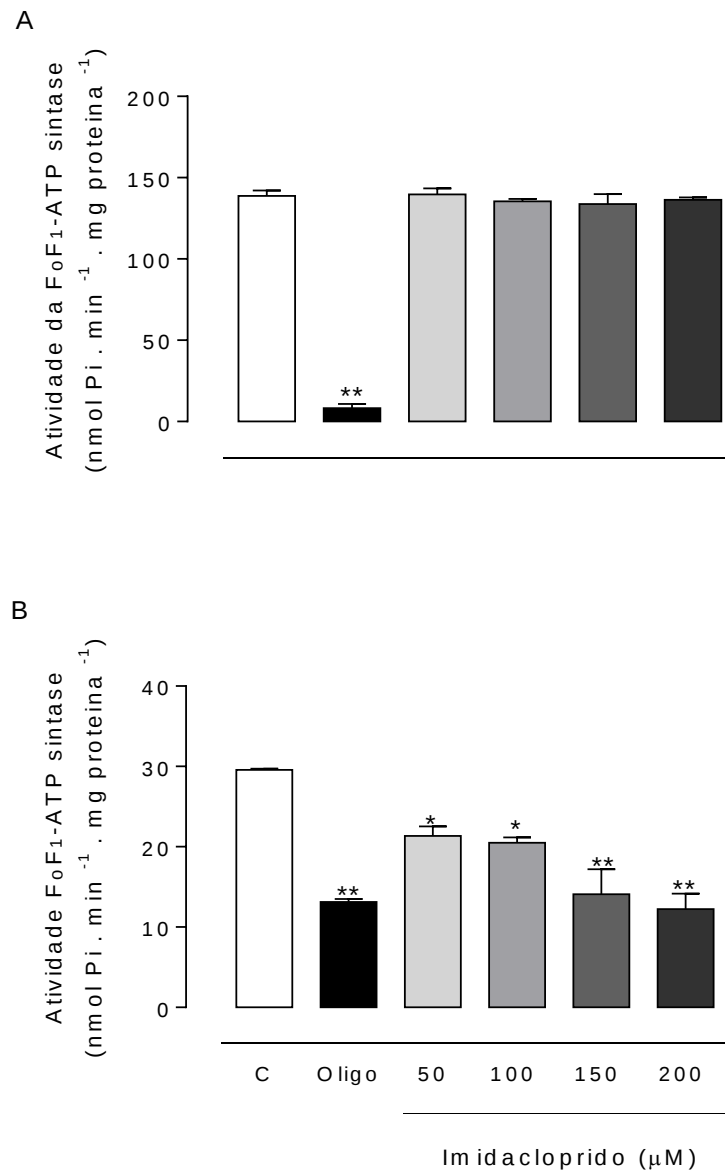


Figura 18. Efeito do IMD (50-200 μM) sobre a atividade da F_0F_1 -ATP sintase em mitocôndrias intactas e desacopladas na presença de CCCP (A) e em mitocôndrias rompidas (B). As condições de ensaio estão descritas na seção Material e Métodos. Os valores representam a média $\pm$ EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. C: controle, apenas 0,1% de DMSO. Oligo: oligomicina 1 $\mu\text{g/mL}$. *,**Significativamente diferente do controle (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$, respectivamente). Fonte: elaborado pelo autor.

5.2 Hepatócitos

5.2.1 Efeitos do IMD sobre a respiração mitocondrial dos hepatócitos permeabilizados

O IMD apresentou ação inibidora sobre a respiração mitocondrial semelhante ao observado em mitocôndrias isoladas. A adição de 150 μM de IMD reduziu significativamente ($P < 0,05$) a velocidade de consumo de oxigênio do estado 3 quando as células foram energizadas com glutamato mais malato, apresentando inibição máxima com a adição de 200 μM do IMD ($P < 0,01$), apresentando um efeito dose-dependente (Figura 19A). Quando as células foram energizadas com succinato (Figura 19B) não houve diferença significativa, porém houve uma tendência de inibição da velocidade do consumo de oxigênio.

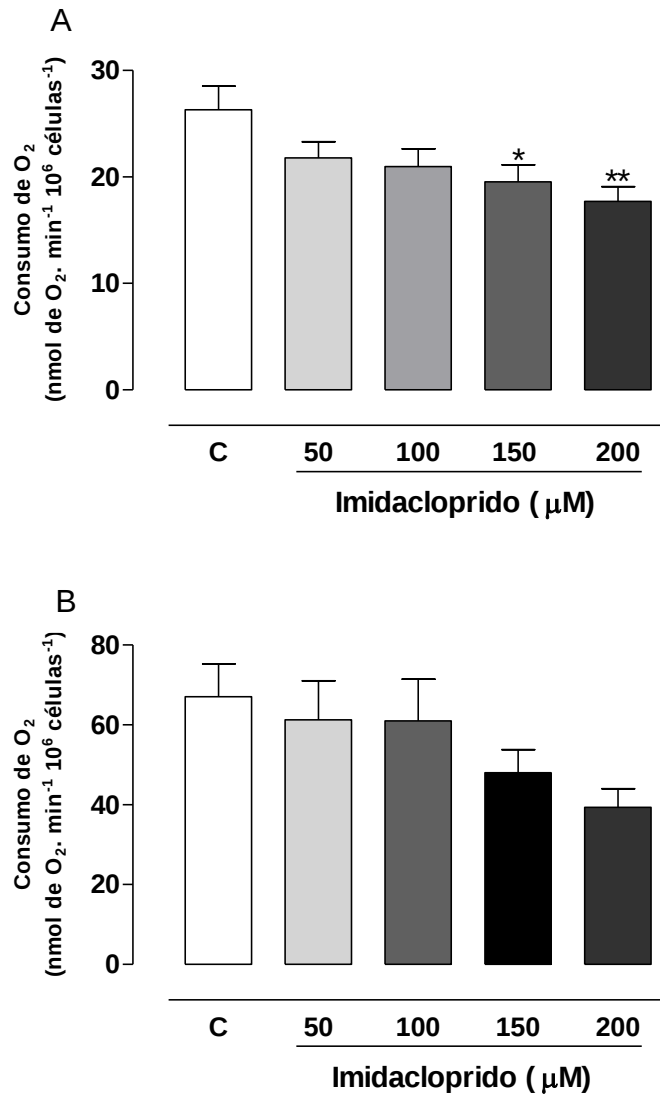


Figura 19. Efeito do IMD sobre o estado 3 da respiração mitocondrial em hepatócitos isolados de ratos (10^6 células. mL⁻¹). As células foram permeabilizadas com digitonina 0,002% e energizadas com glutamato 5 mM mais malato 5 mM (A), ou com succinato 5 mM (B). As condições de ensaio estão descritas na seção Material e Métodos. Os valores representam a média $\pm$ EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. C: controle, apenas 0,1% de DMSO. ***Significantemente diferente do controle (*P < 0,05 e **P < 0,01, respectivamente). Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.2 Efeitos do IMD sobre o potencial de membrana mitocondrial dos hepatócitos

Semelhante aos resultados em mitocôndrias isoladas o IMD não apresentou inibição sobre o potencial de membrana mitocondrial dos hepatócitos energizados nem com glutamato mais malato nem com succinato nas concentrações testadas (Figura 20A).

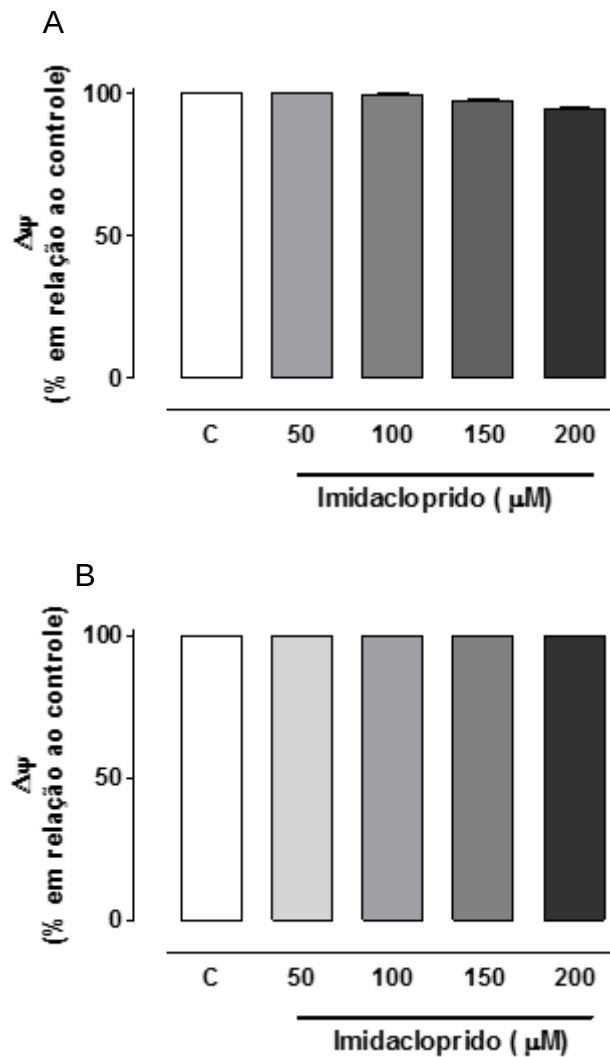


Figura 20. Efeito do IMD sobre o potencial de membrana mitocondrial em hepatócitos isolados de rato (10^6 células.mL⁻¹) energizados com glutamato 5 mM mais malato 5 mM (A) ou succinato 5 mM (B). As células foram permeabilizadas com digitonina 0,002% e o potencial de membrana foi avaliado pela captação da sonda fluorescente safranina O. As condições de ensaio estão descritas na seção Material e Métodos. Os valores representam a média $\pm$ EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. C: controle, apenas 0,1% de DMSO. *Significantemente diferente do controle ($P < 0,05$). Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.3 Efeito do IMD sobre a concentração intracelular de ATP dos hepatócitos

Não foram observadas diferenças significantes nas concentrações intracelulares de ATP em hepatócitos isolados de ratos normais (Figura 21A). Porém, observou-se uma redução significativa da concentração intracelular de ATP nos hepatócitos isolados dos ratos previamente tratados com dexametasona (Figura

21B). Essa redução ocorreu a partir de 90 minutos do período de incubação, sendo significativa nas concentrações de 1,5, 2,0 e 3,0 mM ($P < 0,05$) do inseticida, apresentando o efeito dose e tempo-dependente, e no tempo de 120 minutos, a redução de ATP foi máxima nas mesmas concentrações 2,0 e 3,0 mM ($P < 0,01$) do IMD.

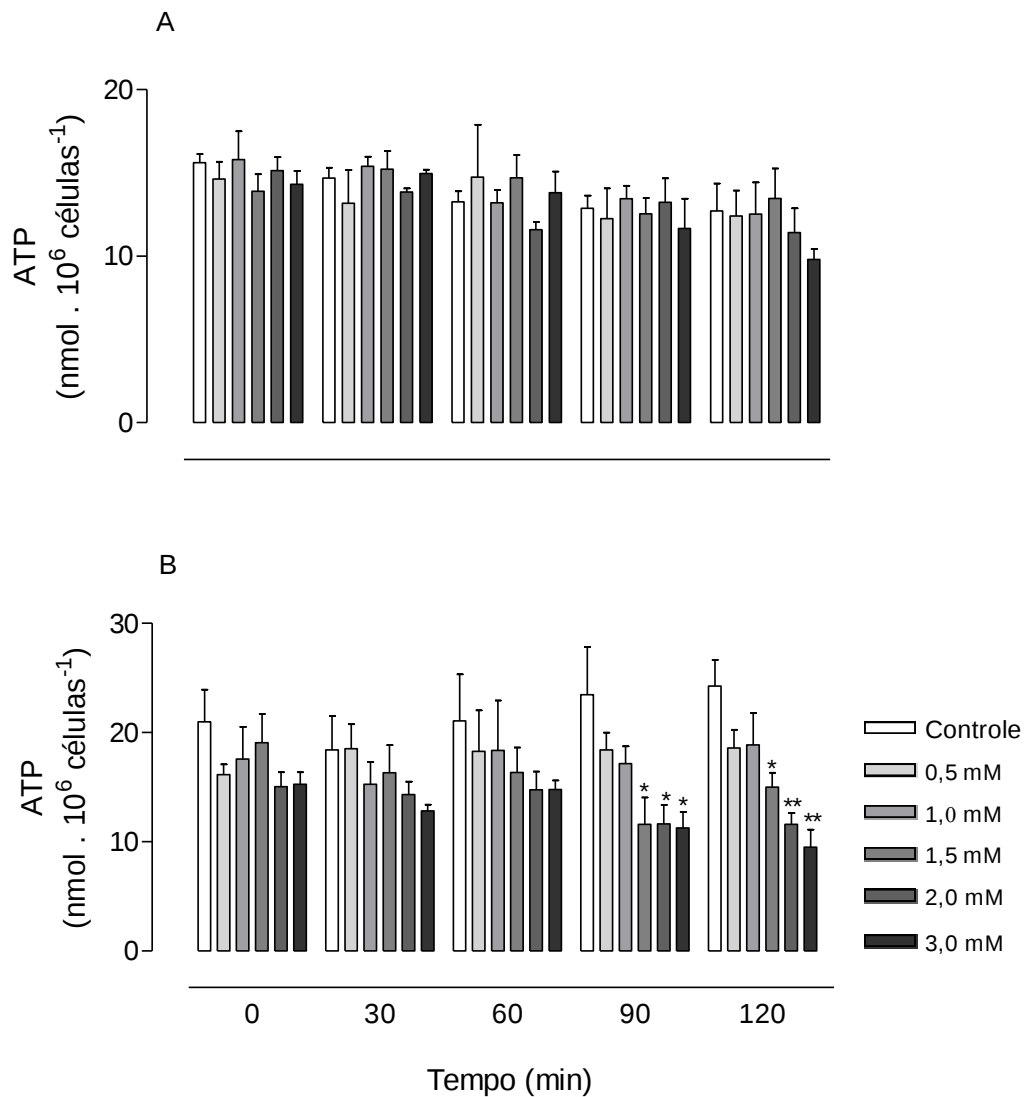


Figura 21. Efeito do IMD sobre a concentração intracelular de ATP em hepatócitos isolados (10^6 células.mL⁻¹) de ratos normais (A) e ratos previamente tratados com dexametasona (B). As condições de ensaio estão descritas na seção Material e Métodos. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 4 experimentos com preparações diferentes. Controle, apenas 0,1% de DMSO. ***Significativamente diferente do controle (*P < 0,05 e **P < 0,01, respectivamente). Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.4 Efeitos do IMD sobre a viabilidade celular

Não foram observadas alterações na atividade das enzimas hepáticas (ALT e AST) no sobrenadante dos hepatócitos isolados de ratos normais (Figura 22A e 22B). Porém, observou-se aumento significativo na atividade de ambas as enzimas no sobrenadante dos hepatócitos isolados de ratos previamente tratados com dexametasona (Figura 23A e 23B). O aumento da atividade da ALT ocorreu a partir dos 30 minutos nas concentrações de 1,5 ($P < 0,05$), 2,0 e 3,0 mM ($P < 0,01$) do IMD e se manteve até o final do experimento, sendo tempo e dose-dependente (Figura 23A). Já para a enzima AST, o aumento foi observado a partir do tempo 30 minutos apenas na concentração de 3,0 mM ($P < 0,05$), enquanto que no tempo 60 minutos apresentou resultados significantes nas concentrações de 2,5 e 3,0 mM ($P < 0,01$), e no tempo 90 minutos nas concentrações de 2,0, 2,5 e 3,0 mM ($P < 0,01$) (Figura 23B).

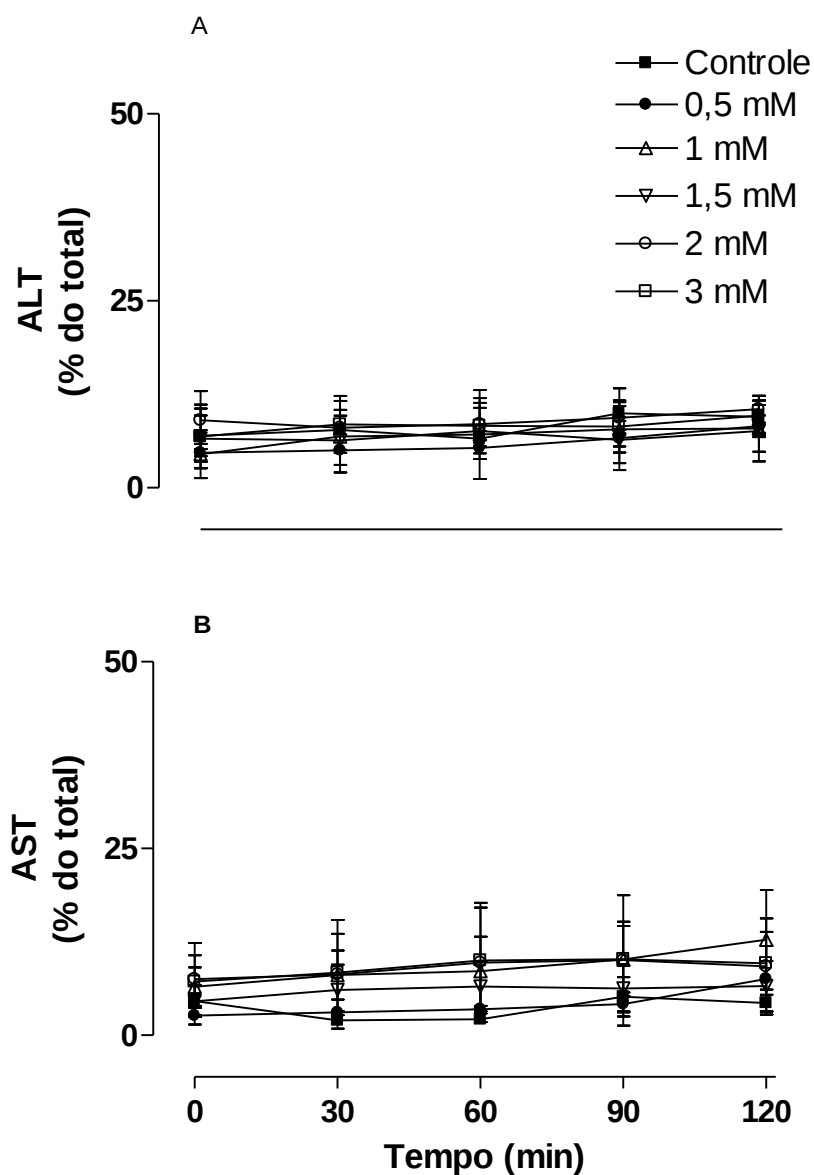


Figura 22. Efeito do IMD sobre a viabilidade celular avaliada pela atividade da enzima alanina transaminase (ALT) (A) e aspartato transaminase (AST) (B) em hepatócitos isolados de ratos normais (10^6 células.mL⁻¹). As condições de ensaio estão descritas na seção Material e Métodos. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 4 experimentos com preparações diferentes. Controle, apenas 0,1% de DMSO. Fonte: elaborado pelo autor.

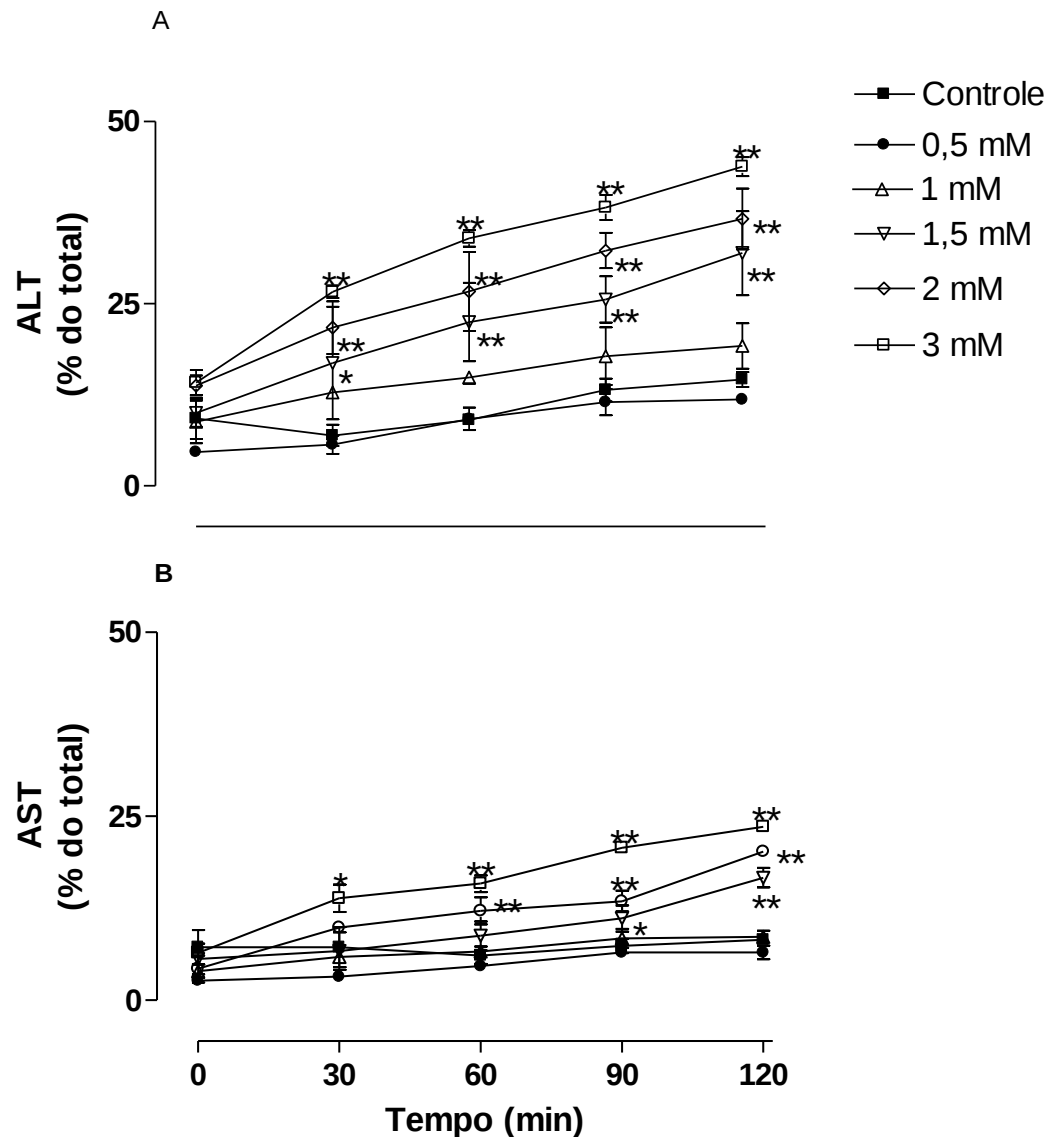


Figura 23. Efeito do IMD sobre a viabilidade celular avaliada pela atividade da enzima alanina transaminase (ALT) (A) e aspartato transaminase (AST) (B) em hepatócitos isolados de ratos previamente tratados com dexametasona (10^6 células.mL⁻¹). As condições de ensaio estão descritas na seção Material e Métodos. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 4 experimentos com preparações diferentes. Controle, apenas 0,1% de DMSO. ***Significativamente diferente do controle (*P < 0,05 e **P < 0,01, respectivamente). Fonte: elaborado pelo autor.

5.3 Fígado de ratos em perfusão

5.3.1 Efeito do IMD sobre a gliconeogênese, ciclo da uréia e consumo de oxigênio no fígado de ratos em jejum

A Figura 24 ilustra os dados referentes aos fluxos metabólicos encontrados em ratos sem a adição do IMD. Nesta série foi infundindo apenas o meio Krebs-Henseleit nos primeiros 10 minutos e, durante esse período, a quantidade de glicose, lactato e piruvato liberada foi muito pequena devido à baixa concentração do glicogênio hepático (Figura 24A). Após o período de pré-perfusão, foi infundida a alanina na concentração de 2,5 mM até o final do período experimental, ou seja, durante 80 minutos. Um aumento considerável na produção de glicose, lactato e piruvato pode ser observado após a adição do aminoácido atingindo a estabilidade aos 10 minutos aproximadamente.

A Figura 24B mostra as alterações no consumo de oxigênio e na produção de ureia. Na ausência de substrato exógeno (10 primeiros minutos), a produção de ureia foi praticamente inexistente. Após o início da infusão do substrato (alanina) a produção de ureia aumentou progressivamente. Já o consumo de oxigênio aumentou após a infusão da alanina, porém atingiu a estabilidade aos 20 minutos.

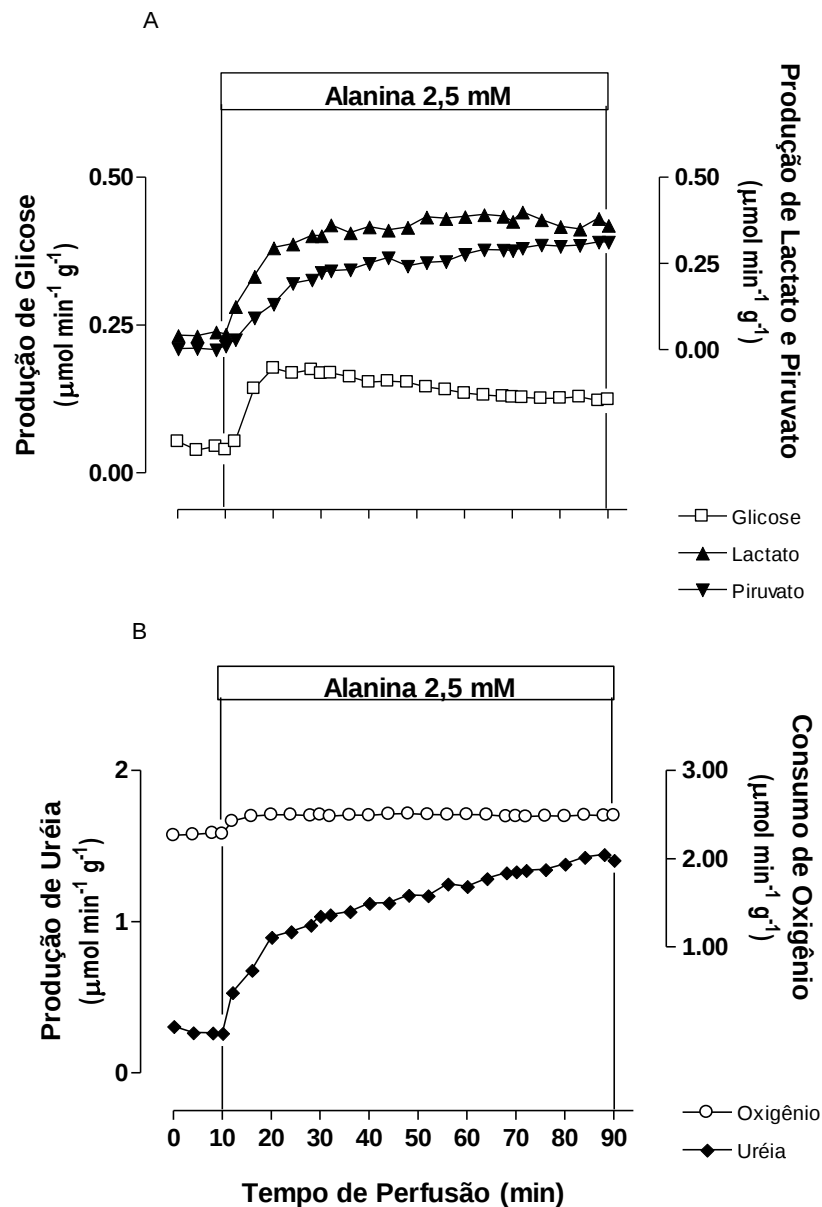


Figura 24. Fluxos metabólicos em fígados de ratos controle tratados com fenobarbital em jejum por 24 h, sem a adição do IMD. O fígado foi perfundido conforme descrito em Material e Métodos. A alanina foi infundida entre 10 e 90 minutos como indicado nas barras horizontais. Amostras do efluente da perfusão foram coletadas para os experimentos metabólicos. Painel A: Produção da glicose, lactato e piruvato. Painel B: Produção da uréia e consumo de oxigênio. Os resultados representam a média dos valores $\pm$ EPM de 4 experimentos. Fonte: elaborado pelo autor.

A Figura 25A mostra as alterações na produção de glicose, lactato e do piruvato no fígado de ratos em jejum submetidos à perfusão com o IMD 150 μ M. Não foram observadas alterações significantes nos fluxos destes metabólitos após a infusão do IMD em relação ao experimento controle. Ainda, foi feita a avaliação do efeito do IMD em relação ao último tempo antes da adição do inseticida (30 minutos), sendo que também não houve diferença significativa nos resultados obtidos neste caso.

A Figura 25B mostra as alterações no consumo de oxigênio e na produção de ureia no fígado de ratos em jejum submetidos à perfusão com o IMD 150 μ M. Também não foram observadas alterações significantes nesses parâmetros avaliados após a adição do IMD.

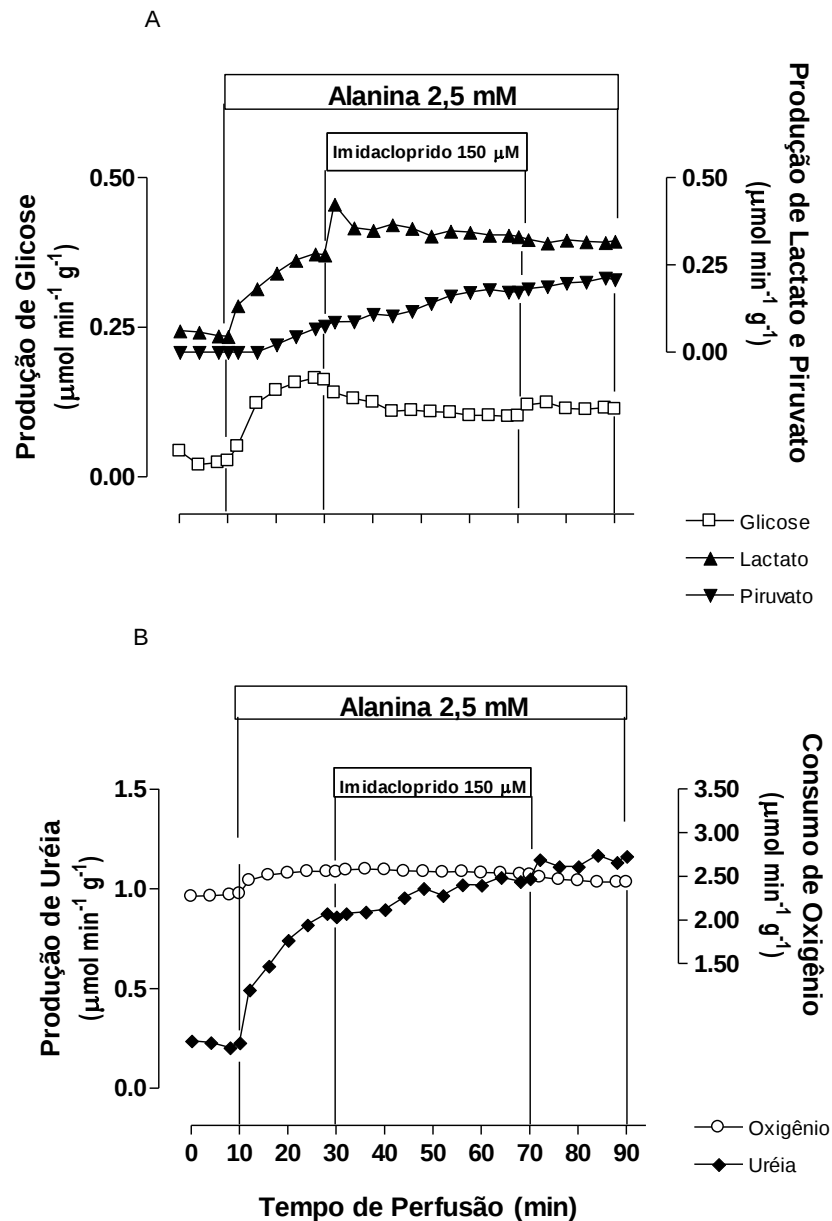


Figura 25. Fluxos metabólicos em fígados de ratos tratados com fenobarbital em jejum por 24 h, na presença de IMD 150 μM . O fígado foi perfundido conforme descrito em Material e Métodos. A alanina foi infundida entre 10 e 90 minutos e o IMD entre 30 e 70 minutos, como indicado nas barras horizontais. Amostras do efluente da perfusão foram coletadas para os experimentos metabólicos. Painel A: Produção da glicose, lactato e piruvato. Painel B: Produção da uréia e consumo de oxigênio. Os resultados representam a média dos valores $\pm$ EPM de 4 experimentos. Fonte: elaborado pelo autor.

A Figura 26A mostra as alterações na produção de glicose, lactato e do piruvato no fígado de ratos em jejum submetidos à perfusão com o IMD 250 μ M. Não foram observadas alterações significantes nos fluxos destes metabólitos após a infusão do IMD em relação ao experimento controle. Porém, quando comparados com o tempo imediatamente anterior à adição do IMD (30 minutos) foram observadas alterações significantes na produção de glicose. A inibição na produção de glicose teve início no tempo 36 minutos e perdurou até o final da infusão do inseticida.

A Figura 26B mostra as alterações no consumo de oxigênio e na produção de ureia no fígado de ratos em jejum submetidos à perfusão com o IMD 250 μ M. Não foram observadas alterações significantes nesses parâmetros avaliados após a adição do IMD.

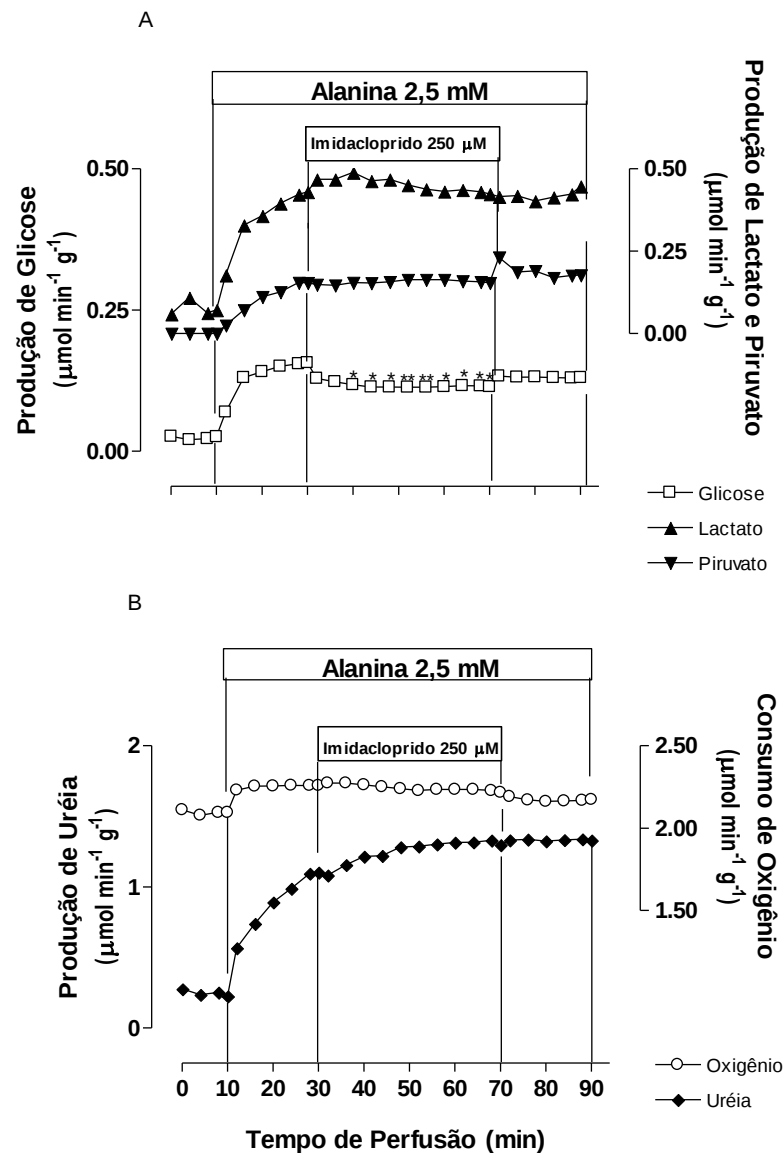


Figura 26. Fluxos metabólicos em fígados de ratos tratados com fenobarbital em jejum por 24 h, na presença de IMD 250 μ M. O fígado foi perfundido conforme descrito em Material e Métodos. A alanina foi infundida entre 10 e 90 minutos e o IMD entre 30 e 70 minutos, como indicado nas barras horizontais. Amostras do efluente da perfusão foram coletadas para os experimentos metabólicos. Painei A: Produção da glicose, lactato e piruvato. Painei B: Produção da uréia e consumo de oxigênio. Os resultados representam a média dos valores $\pm$ EPM de 4 experimentos. Os asteriscos indicam a diferença estatística em comparação ao tempo imediatamente anterior à adição do IMD (30 minutos) com a análise de variância e pós-teste Dunnet (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$). Fonte: elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

As mitocôndrias são responsáveis pela produção de energia utilizada pelas células por meio da fosforilação oxidativa (NICHOLLS; FERGUSON, 2013). A energia liberada pela oxidação de substratos na cadeia respiratória é usada para transportar prótons através da membrana interna, gerando a força próton-motora que impulsiona a síntese de ATP pela F_0F_1 -ATP sintase. Vários compostos capazes de promover mudanças na fosforilação oxidativa foram descritos na literatura científica (WALLACE; STARKOV, 2000; MAIOLI et al., 2012; BRIDGES et al., 2014). Entre estes, estão os inibidores que interferem com a síntese de ATP atuando nos complexos da cadeia respiratória ou na F_0F_1 -ATP sintase (NICHOLLS; FERGUSON, 2013). No presente estudo, foram avaliados os efeitos do IMD sobre a bioenergética de mitocôndrias isoladas do fígado de ratos para auxiliar na descoberta dos mecanismos envolvidos na hepatotoxicidade induzida por este inseticida.

Os resultados obtidos usando mitocôndrias energizadas com glutamato mais malato (carreadores de elétrons para o complexo I) e succinato (carreadores de elétrons para o complexo II) mostraram que o IMD inibe o estado 3 da respiração mitocondrial em uma maneira dose-dependente nas concentrações de 100 a 200 μ M no complexo I e 150 a 200 μ M no complexo II. De acordo com Chance e Williams (1955), a respiração do estado 3 envolve mitocôndrias, ADP e um substrato respiratório, e a taxa de fosforilação de ADP é o fator limitante do processo. A inibição observada nos dois complexos (I e II) pode resultar da ação direta do IMD na cadeia respiratória, ou de um efeito inibitório sobre a F_0F_1 -ATP sintase e/ou no ANT.

Para distinguir se o efeito inibitório do IMD no estado 3 da respiração é devido à inibição da cadeia de transporte de elétrons ou fosforilação oxidativa, um teste de consumo de oxigênio estimulado por um desacoplador, o CCCP, foi realizado. Se a inibição ocorresse na cadeia de transporte de elétrons, o consumo de oxigênio estimulado pelo desacoplador seria inibido. Se o composto testado, em vez disso, atuasse sobre a fosforilação oxidativa, o mesmo não seria capaz de inibir a respiração desacoplada pelo CCCP. O consumo de oxigênio mitocondrial não foi inibido pelo IMD, mas foi inibido pelo KCN (inibidor do complexo IV da cadeia

respiratória), indicando que a inibição do estado 3 da respiração pelo inseticida não ocorre por ação direta na cadeia respiratória. Assim, o IMD pode atuar como um inibidor da F_0F_1 -ATP sintase e/ou sobre o ANT, já que seu efeito é semelhante ao da oligomicina, um inibidor específico da F_0F_1 -ATP sintase e do carboxiatractilosídeo (cATR), um inibidor do ANT.

O IMD não estimulou o estado 4 da respiração mitocondrial e nem dissipou o potencial da membrana mitocondrial, indicando que o inseticida não age como um desacoplador do transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa. Este resultado suporta a hipótese anteriormente proposta de que o IMD se comporta de forma semelhante à oligomicina e/ou o cATR.

A interferência na síntese ou uso de ATP mitocondrial é o mecanismo pelo qual muitos xenobióticos induzem toxicidade aguda ou crônica (MEYER; KULKARNI, 2001). O IMD inibiu significativamente a síntese de ATP de uma maneira dose-dependente, a partir da dose de 100 μ M. Resultados semelhantes mostrando que o IMD afeta a síntese de ATP foram obtidos em outro estudo do nosso grupo usando mitocôndrias isoladas das cabeças e tórax de abelhas africanizadas (NICODEMO et al., 2014).

Foram realizados dois experimentos para determinar o possível efeito do IMD sobre F_0F_1 -ATP sintase e/ou efeito sobre o ANT. No primeiro, o efeito do inseticida na despolarização do potencial de membrana induzida por ADP foi comparado ao da oligomicina (inibidor específico do componente F_0 da F_0F_1 -ATP sintase) e do cATR (inibidor específico do ANT). A adição de cATR antes da adição do ADP inibiu completamente a despolarização do potencial formado, porque neste caso os ANTs foram inibidos; assim, o ADP não foi transportado para a matriz mitocondrial. Quando a oligomicina foi adicionada antes do ADP, ocorreu apenas uma despolarização parcial do potencial de membrana, já que o transporte do ADP pelo ANT estava limitado nesta condição, uma vez que a F_0F_1 -ATP sintase está inibida e assim, o retorno dos H^+ para a matriz mitocondrial ocorre em menor proporção. Portanto o IMD teve um efeito semelhante à oligomicina, indicando que sua ação é apenas sobre a F_0F_1 -ATP sintase.

A F_0F_1 -ATP sintase, complexo V, consiste em duas proteínas funcionais: F_1 , situado na matriz mitocondrial e F_0 , localizado na membrana mitocondrial interna.

Para confirmar a inibição da F_0F_1 -ATP sintase induzida pelo IMD, o efeito sobre a atividade enzimática foi avaliado utilizando mitocôndrias intactas desacopladas e mitocôndrias rompidas com alta concentração de ATP, condição que leva a enzima a operar na direção inversa, hidrolisando ATP (BRACHT et al., 2003). O IMD inibiu significativamente a atividade da F_0F_1 -ATP sintase de forma dose-dependente, apenas em mitocôndrias rompidas. Uma explicação razoável para esta diferença observada é que, nas mitocôndrias desacopladas com o CCCP, a estrutura geral da organela ainda está preservada, enquanto na mitocôndria rompida, a estrutura mitocondrial é destruída e a F_0F_1 -ATP sintase é exposta. Isso sugere que a ruptura da estrutura mitocondrial permite ao IMD interagir com a enzima, provavelmente visando a porção F_1 . Estudos adicionais serão necessários para esclarecer o mecanismo exato pelo qual o IMD interage com o complexo V. Esse efeito, juntamente com a inibição do estado 3 da respiração e os ensaios realizados na despolarização do potencial de membrana induzida por ADP, indica que o inseticida inibe a F_0F_1 -ATP sintase.

Devido à alta especificidade para receptores de insetos, IMD é considerado altamente tóxico para insetos e pouco tóxico para os animais. No entanto, estudos sobre os efeitos do IMD sobre roedores, frangos, peixes e bovídeos indicam que ele induz hepatotoxicidade. Os animais expostos a diferentes doses do inseticida apresentaram sinais e sintomas característicos de dano hepático, como hemorragia, degeneração de hepatócitos, congestão e dilatação venosa central, sinusóides hepáticos (KAMMON et al., 2010; MOHANY et al., 2011; TOOR et al., 2013), núcleos picnóticos e infiltração de leucócitos, bem como vasos sanguíneos hipertrofiados, lesões citoplasmáticas e necrose hepática (ARFAT et al., 2014), com a consequente liberação das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) no meio extracelular (MOHANY et al., 2011; DUZGUNER; ERDOGAN, 2012; DESAI; PARIKH, 2013; SOUJANYA et al., 2013; TOOR et al., 2013; ARFAT et al., 2014; KAPOOR et al., 2014; QADIR et al., 2014).

Nesse sentido, avaliamos também os efeitos do IMD sobre a bioenergética de hepatócitos isolados do fígado de ratos no sentido de avaliar a toxicidade hepática induzida por este inseticida, visto que uma redução da produção de ATP pode diminuir a eficiência dos processos dependentes de energia e as funções celulares

mediadas pelo ATP, o que segundo Eguchi et al. (1997) e Skulachev (2006), pode acarretar na morte celular. Neste sentido, o efeito do IMD sobre a viabilidade dos hepatócitos também foi avaliado por meio da atividade das enzimas ALT e AST no meio de incubação. A enzima AST é uma enzima encontrada em maior quantidade nas mitocôndrias, cerca de 80%, e não é liberada tão rápido como a ALT, que é uma enzima puramente citosólica. A AST está presente em altas concentrações em um grande número de tecidos, como coração, fígado, músculo esquelético, rins e pâncreas. A ALT é primariamente limitada ao citosol dos hepatócitos, e é considerada um indicador altamente sensível de dano hepatocelular e, dentro de certos limites, pode fornecer uma taxa quantitativa do grau de dano sofrido pelo fígado (AL-HABORI et al., 2002).

Os resultados obtidos usando hepatócitos permeabilizados com digitonina e energizados com glutamato mais malato (carreadores de elétrons para o complexo I) e succinato (carreadores de elétrons para o complexo II), mostraram que o IMD inibe o estado 3 da respiração mitocondrial de maneira dose-dependente, resultado semelhante ao obtido com mitocôndrias isoladas.

Na análise de concentração de ATP e viabilidade celular avaliada pela atividade da ALT e AST em hepatócitos normais não houve diferença significativa nos hepatócitos incubados com o IMD comparado com o controle, ou seja, as concentrações utilizadas do inseticida (0,5-3,0 mM) não estavam sendo suficientes para que houvesse depleção na produção de ATP, e consequentemente morte celular. Sendo assim, os experimentos foram repetidos com ratos previamente tratados com dexametasona (estimulador do citocromo P450), ou seja, após a adição do IMD no processo de incubação, este seria metabolizado, avaliando assim o efeito tóxico de possíveis metabólitos.

Nos hepatócitos dos ratos tratados com o dexametasona, observou-se diferença significativa na concentração de ATP nos hepatócitos incubados com 1,5, 2,0 e 3,0 mM do inseticida a partir de 90 minutos de incubação, sendo o efeito tempo e dose-dependente. Também foi observada atividade elevada das enzimas hepáticas (ALT e AST) nesta condição. Esses resultados sugerem que devido à diminuição na concentração de ATP intracelular ocorre a morte celular, lesionando

membranas citoplasmática e membranas mitocondriais, liberando as enzimas para o meio extracelular.

Estudos recentes mostram que a exposição ao IMD representa risco potencial para animais de fazenda e seres humanos. Um estudo de Shridhar, 2010 revelou um episódio de toxicidade clínica com 8 búfalos mortos depois de beber água de uma lagoa contaminada com IMD. Os dados sobre a exposição humana ao IMD estão relacionados a exposições ocupacionais (CALUMPANG; MEDINA, 1996; AGARWAL; SRINIVAS, 2007; KUMAR et al., 2013) e relatos de casos de auto-envenenamento (WU et al., 2001; PROENÇA et al., 2005; HUANG et al., 2006; DAVID et al., 2007; MOHAMED et al., 2009; LIN et al., 2013). Geralmente, ocorrem efeitos clínicos leves, como taquicardia, hipertensão, náuseas, vômitos, dor de cabeça e diarreia, mas sequelas mais graves, incluindo insuficiência respiratória, convulsões (WU et al., 2001; AGARWAL; SRINIVAS, 2007; MOHAMED et al., 2009) e até casos de morte foram relatados (PROENÇA et al., 2005; HUANG et al., 2006; SHADNIA; MOGHADDAM, 2008; IYYADURAI et al., 2010).

Com base na importância do fígado para o metabolismo animal e no fato de que o IMD exerce ação sobre a bioenergética em mitocôndrias e hepatócitos isolados, passou-se a investigar os efeitos do IMD no fígado de rato perfundido isoladamente, avaliando o metabolismo de carboidratos e proteínas em condições de jejum, utilizando as concentrações de 150 e 200 μM do inseticida em ratos em normais e tratados com fenobarbital (estimulador do citocromo P450). Neste sistema, os estados metabólicos estacionários derivados de diferentes vias podem ser determinados precisamente em condições próximas da situação fisiológica (SCHOLZ; BÜCHER, 1965).

A gliconeogênese é uma via anabólica do metabolismo hepático, na qual ocorre a síntese de glicose a partir de compostos como aminoácidos, lactato e glicerol, e ácido propiônico no caso de animais ruminantes, por meio de diversas reações químicas com o consumo de ATP (MARZZOCO; TORRES, 2014). Dos parâmetros analisados, o IMD não apresentou resultado significativo comparado com as curvas do experimento controle, porém ao analisar a concentração de glicose comparando-a com o tempo 30 (último tempo em que apenas a alanina era perfundida) e os demais tempos (quando o IMD estava sendo perfundido) na

concentração de 250 μM , o IMD diminuiu significativamente os níveis de glicose a partir dos 40 minutos de perfusão. Esses resultados indicam que o IMD afeta a gliconeogênese, podendo esse efeito ser decorrente da sua interferência sobre a bioenergética observada nas mitocôndrias e hepatócitos isolados, visto que essa via metabólica é dependente de energia. Ainda, existe a possibilidade de que a toxicidade do IMD possa estar associada com uma possível inibição de enzimas específicas da gliconeogênese. Além disso, alguns dos sinais gerais de toxicidade que foram observados na intoxicação por IMD em animais e seres humanos poderiam ser em parte a consequência de uma diminuição da produção de energia nos tecidos, já que os efeitos reportados neste trabalho certamente não estão restritos às mitocôndrias hepáticas.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que o IMD pode causar alterações no metabolismo energético celular sendo a enzima F_0F_1 -ATP sintase o principal alvo da ação tóxica deste inseticida, e que os metabólitos formados na biotransformação do IMD podem ser mais tóxicos do que o próprio IMD. Uma vez que a inibição do metabolismo energético pode afetar vários processos importantes para a manutenção celular, é razoável que as mudanças na produção de energia mitocondrial do fígado descritas no presente trabalho possam contribuir para a hepatotoxicidade apresentada pelo inseticida.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-DONIA, M. B.; GOLDSTEIN, L. B.; BULLMAN, S.; TU, T.; KHAN, W. A.; DECHKOVSKAIA, A. M.; AND ABDEL-RAHMAN, A. A. Imidacloprid induces neurobehavioral deficits and increases expression of glial fibrillary acidic protein in the motor cortex and hippocampus in offspring rats following in utero exposure. **Journal Toxicology Environmental Health, part A**, v. 71, p. 119-130, 2008.

AGARWAL, R.; SRINIVAS, R. Severe neuropsychiatric manifestations and rhabdomyolysis in a patient with imidacloprid poisoning. **American Journal OF Emergency Medicine**, v. 25, p. 844-845, 2007.

ARFAT, Y.; MAHMOOD, N.; TAHIR, M. U.; RASHID, M.; ANJUM, S.; ZHAO, F.; LI, D.; SUN, Y.; HU, L.; ZHIHAO, C.; YIN, C.; SHANG, P.; QIAN, A-R. Effect of imidacloprid on hepatotoxicity and nephrotoxicity in male albino mice. **Toxicology Reports**, v. 1, p. 554-561, 2014.

BAL, R.; ERDOGAN, S.; THEOPHILIDIS, G.; BAYDAS, G.; NAZIROGLU, M. Assessing the effects of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the cholinergic synapses of the stellate cells of the mouse cochlear nucleus using whole-cell patch-clamp recording. **Neurotoxicology**, v. 31, p. 113-120, 2010.

BAL, R.; NAZIROGLU, M.; TURK, G.; YILMAZ, O.; KULOGLU, T.; ETEM, E.; BAYDAS, G. Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. **Cell Biochemistry Function**, v. 30, p. 492–499, 2012.

BAL, R.; TURK, G.; TUZCU, M.; YILMAZ, O.; KULOGLU, T.; GUNDOGDU, R.; GUR, S.; AGCA, A.; ULAS, M.; CAMBAY, Z.; TUZCU, Z.; GENCOGLU, H.; GUVENC, M.; OZSAHIN, A. D.; KOCAMAN, N.; ASLAN, A.; ETEM, E. Assessment of imidacloprid toxicity on reproductive organ system of adult male rats. **Journal Environmental Science and Health, part B: Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes**, v. 47, p. 434-444, 2012.

BAYER. **Avenge**. 2018. Disponível em: <<https://bayer.com.au/en/bayerrsquos-products/product-details.php?l1=Bayer+HealthCare&aktion=details&id=676&l1=&l2=Animal%20Health>>. Acesso em: 03 jan. 2018.

BAPTISTA, G. C. Desenvolvimento do uso de pesticidas! inseticidas. Manual de resíduos de pesticidas em alimentos. [S.l.]: **GARP-Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas**, 1999. p. 6-11.

BERGMEYER, H. U. Determination of urea with glutamate dehydrogenase as indicator enzyme. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), **Methods of Enzymatic Analysis**. New York: Academic Press, 1974. p. 1794-1801,

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. .p. 227–247.

BRIDGES, H. R.; JONES, A. J. Y.; POLLAK, M. N.; HIRST, J. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. **Biochemical Journal** v. 462, p. 475-487, 2014.

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.

CASTANHA ZANOLI, J. C.; MAIOLI, M. A.; MEDEIROS, H. C. D.; MINGATTO, F. E. Abamectin affects the bioenergetics of liver mitochondria: A potential mechanism of hepatotoxicity. **Toxicology in Vitro**, v. 26, p. 51-56, 2012.

CALUMPANG, S. M.; MEDINA, M. J. Applicator exposure to imidacloprid while spraying mangoes. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 57, p. 697-704, 1996.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Advances in Enzymology**, v. 17, p. 65-134, 1955.

CONSTANTIN, R. P. The actions of fisetin on glucose metabolism in the rat liver. **Cell Biochemistry and Function**, v. 28, n. 2, p. 149-158, 2010.

CZOK, R.; LAMPRECHT, W. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate 2-phosphate. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.). **Methods of enzymatic analysis**. New York: Academic Press, 1974. p. 1446-1451,

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

DAUM, G. Lipids of mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 822, p. 1-42, 1985.

DAVID, D.; GEORGE, I. A.; PETER, J. V. Toxicology of the newer neonicotinoid insecticides: imidacloprid poisoning in a human. **Clinical Toxicology**, v. 45, p. 485-486, 2007.

DELUCIA, R.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; VALLE, L. B. S.; OGA, S. Farmacocinética: Eliminação Metabólica de Fármacos. In: DELUCIA, R.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; VALLE, L. B. S.; OGA, S. **Farmacologia integrada: princípios básicos**. Rio de Janeiro: Atehenueu, p. 102-112. (A). v.1. 1988.

DEMSIA, G.; VLASTOS, D.; GOUMENOU, M.; MATTHOPOULOS, D. P. Assessment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone-marrow. **Mutation Research**, v. 634, p. 32-39, 2007.

DESAI, B.; PARIKH, P. Biochemical alterations on exposure of imidacloprid and curzate on fresh water fish *Oreochromis mossambicus* and *Labeo rohita*. **Indian Journal of Forensic Medicine and Toxicology**, v. 7, p. 87-91, 2013.

DURO, P. N.; TEIXEIRA, J. G.; PINTO, A. P. **Desenvolvimento de métodos eletroquímicos para quantificação de neonicotinóides em amostras de água contaminadas**. 2003. f.15-20. Dissertação (Mestrado em Análises Químicas Ambientais) - Universidade de Évora, 2003.

DUZGUNER, V.; ERDOGAN, S. Chronic exposure to imidacloprid induces inflammation and oxidative stress in the liver & central nervous system of rats. **Pesticides Biochemistry and Physiology**, v. 104, p. 58-64, 2012.

DYKENS, J. A.; JAMIESON, J. D.; MARROQUIN, L. D.; NADANACIVA, S.; XU, J. J.; DUNN, M. C.; SMITH, A. R.; WILL, Y. *In vitro* assessment of mitochondrial dysfunction and cytotoxicity of nefazodone, trazodone and buspirone. **Toxicological Sciences**, v. 103, p. 335-345, 2008.

EU - EUROPEAN UNION. Commission implementing regulation (EU) No 485/2013 of 24 May 2013 “amending Implementing Regulation (EU) No 540/2011, as regards the conditions of approval of the active substances clothianidin, thiamethoxam and imidacloprid, and prohibiting the use and sale of seeds treated with plant protection products containing those active substances”. **Official Journal of the European Union**, 25.5.2013. L 139/12-26, 2013.

FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 66, p. 375-400, 1925.

FOSEN, M. **Environmental fate of imidacloprid**. 2006. Disponível em: <<http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/Imidclprdfate2.pdf>>. Acesso em: 26 fev. 2018.

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

GARCIA, A. F.; MEDEIROS, H. C. D.; MAIOLI, M. A.; LIMA, M. C.; ROCHA, B. A.; COSTA, F. B.; CURTI, C.; GROppo, M.; MINGATTO, F. E. Comparative effects of lantadene A and its reduced metabolite on mitochondrial bioenergetics. **Toxicon**, v. 55, p. 1331-1337, 2010.

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

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

GUTMANN, I.; WAHLEFELD, A. W. L(+) lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD⁺. In: Bergmeyer, H. U. (Ed.). **Methods of enzymatic analysis**. New York: Academic Press, 1974. p. 1464-1466.

HAN, W.; TIAN, Y.; SHEN, X. Human exposure to neonicotinoid insecticides and the evaluation of their potential toxicity: an overview. **Chemosphere**, v. 192, p. 59-65, 2018.

HUANG, N. C.; LIN, S. L.; CHOU, C. H.; HUNG, Y. M.; CHUNG, H. M.; HUANG, S. T. Fatal ventricular fibrillation in a patient with acute imidacloprid poisoning. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 24, p. 883-885, 2006.

HUTCHINSON, M. J.; JACOBS, D.E.; MENCKE, N. Establishment of the cat flea (*Ctenocephalides felis*) on the ferret (*Mustela putorius furo*) and its control with imidacloprid. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 15, p. 212-214, 2001.

IOANNIDES, C. **Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics**. Chichester: John Wiley & Sons, 2002.

IYYADURAI, R.; GEORGE, I. A.; AND PETER, J. V. Imidacloprid poisoning—newer insecticide and fatal toxicity. **Journal of Medical Toxicology**, v. 6, p. 77-78, 2010.

KAMMON, A. M.; BRAR, R. S.; BANGA, H. S.; SODHI, S. Patho-biochemical studies on hepatotoxicity and nephrotoxicity on exposure to chlorpyrifos and imidacloprid in layer chickens. **Veterinarski Arhiv**, v. 80, p. 663-672, 2010.

KAPOOR, U.; SRIVASTAVA, M. K.; TRIVEDI, P.; GARG, V.; SRIVASTAVA, L. P. Disposition and acute toxicity of imidacloprid in female rats after single exposure. **Food and Chemical Toxicology**, v. 68, p. 190-195, 2014.

KATARIA, S. K.; CHHILLAR, A. K.; KUMAR, A.; TOMAR, M.; MALIK, V. Cytogenetic and hematological alterations induced by acute oral exposure of imidacloprid in female mice. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 59-65, 2016.

KAUR, B.; SANDHU, H.; KAUR, R. Toxic effects of subacute oral exposure of imidacloprid on biochemical parameters in crossbred cow calves. **Toxicology International**, p. 13-43, 2006.

KIM, J. S.; HE, L.; LEMASTERS, J. J. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 304, n. 3, p. 463-470, 2003.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p. 8-13.

KOWALTOWSKI, A. J.; SOUZA-PINTO, N. C.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, p. 333-343, 2009.

KREBS, H. A; HENSELEIT, H. Untersuchungen uber die Harnstoffbildung in Tierkorper. **Zeitschrift Fur Physiologische Chemie**, v. 210, p. 33, 1932.

KUMAR, A.; VERMA, A.; KUMAR, A. Accidental human poisoning with a neonicotinoid insecticide, imidacloprid: A rare case report from rural India with a brief review of literature. **Egyptian Journal Forensic Sciences**, v. 3, p. 123-126, 2013.

KUN, F.; KEARNEY, E. B. Ammonia. In: Bergmeyer, H. U. (Ed.). **Methods of enzymatic analysis**, New York: Academic Press, 1974. p. 1802-1806.

LI, Y.; COUCH, L.; HIGUCHI, M.; FANG, J. L.; GUO, L. Mitochondrial dysfunction induced by sertraline, an antidepressant agent. **Toxicological Sciences**, v. 127, p. 582-591, 2012.

LIN, P. C.; LIN, H. J.; LIAO, Y. Y.; GUO, H. R.; CHEN, K. T. Acute poisoning with neonicotinoid insecticides: a case report and literature review. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 112, p. 282-286, 2013.

LONARE, M.; KUMAR, M.; RAUT, S.; BADGUJAR, P.; DOLTADE, S.; TELANG, A. Evaluation of imidacloprid-induced neurotoxicity in male rats: a protective effect of curcumin. **Neurochemistry International**, v. 78, p. 122-129, 2014.

MAIOLI, M. A.; LEMOS, D. E.; GUELFI, M.; MEDEIROS, H. C. D.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MINGATTO, F. E. Mechanism for the uncoupling of oxidative phosphorylation by juliprosopine on rat brain mitochondria. **Toxicon**, v. 60, p. 1355-1362, 2012.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. p. 169-173.

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

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

MINGATTO, F. E.; RODRIGUES, T.; PIGOSO, A. A.; UYEMURA, S. A.; CURTI, C.; SANTOS, A. C. The critical role of mitochondrial energetic impairment in the toxicity of nimesulide to hepatocytes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, n. 2, p. 601-607, 2002.

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

MOHAMED, F.; GAWARAMMANA, I.; ROBERTSON, T. A.; ROBERTS, M. S.; PALANGASINGHE, C.; ZAWAHIR, S.; JAYAMANNE, S.; KANDASAMY, J.; EDDLESTON, M.; BUCKLEY, N. A.; DAWSON, A. H.; ROBERTS, D. M. Acute human self-poisoning with imidacloprid compound: a neonicotinoid insecticide. **PLoS One**, v. 4, n. 4, p. e5127, 2009.

MOHANY, M.; BADR, G.; REFAAT, I.; EL-FEKI, M. Immunological and histological effects of exposure to imidacloprid insecticide in male albino rats. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, p. 2106–2114, 2011.

NADANACIVA, S.; DYKENS, J. A.; BERNAL, A.; CAPALDI, R. A.; WILL, Y. Mitochondrial impairment by PPAR agonists and statins identified via immunocaptured OXPHOS complex activities and respiration. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 223, p. 277–287, 2007.

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

NICODEMO, D.; MAIOLI, M. A.; MEDEIROS, H. C.; GUELF, M.; BALIEIRA, K. V.; DE JONG, D.; MINGATTO, F. E. Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.33 p. 2070-2075, 2014.

NORTOX. **Imidacloprid**. 2015. Disponível em:
<http://www.nortox.com.br/files/produtos/bula/061323000000_13032015.pdf>.
Acesso em: 02 fev. 2015.

NEWMAN, S.; GUZELIAN, P. S. Stimulation of de novo synthesis of cytochrome P-450 by phenobarbital in primary nonproliferating cultures of adult rat hepatocytes. **Cell Biology**, v.79, p. 2922-2926, 1982.

OBANA, H.; OKIHASHI, M.; AKUTSO, K.; KITAGAWA, Y.; HORI, S.; Determination of Neonicotinoid Pesticide Residues in Vegetables and Fruits with Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography Mass Spectrometry, **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 51, p. 2501, 2003.

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

PEDERSEN, P. L.; GREENAWALT, J. W.; REYNAFARJE, B.; HULLIHEN, J.; DECKER, G. L.; SOPER, J. W.; BUSTAMANTE, E. Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues. **Methods in Cell Biology**, v. 20, p. 411–481, 1978.

POSPISCHIL, R. Imidacloprid fly bait: a fast acting formulation against flies in livestock. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON URBAN PESTS, 4., 2002, Charleston. Proceedings.. Charleston: Pocahontas Press. 2002. p. 457-458.

PRESTON, B. L. Indirect effects in aquatic ecotoxicology: Implications for ecological risk assessment. **Journal of Environmental Management**, v. 29, p. 311–323, 2002.

PROENÇA, P.; TEIXEIRA, H.; CASTANHEIRA, F.; PINHEIRO, J.; MONSANTO, P. V.; MARQUES, E. P.; VIEIRA, D.N. Two fatal intoxication cases with imidacloprid: LC/MS analysis. **Forensic Science International**, v.153, p. 75–80, 2005.

QADIR, S., LATIF, A., ALI, M., AND IQBAL, F. Effects of imidacloprid on the hematological and serum biochemical profile of *Labeo rohita*. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 46, n.4, p. 1085–1090, 2014.

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

SCHOLZ, R.; BÜCHER, T. Hemoglobin-free perfusion of rat liver. In: CHANGCE, B., ESTABROOK, W.; WILLIAMSON, J. R. (Ed.). **Control of energy metabolism**. New York: Academic Press, 1965. p. 393-414.

SHADNIA, S.; MOGHADDAM, H. H. Fatal intoxication with imidacloprid insecticide. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 26 p. 631–634, 2008.

SHRIDHAR, N. B. Toxicity of imidacloprid in buffaloes. **Indian Journal of Animal Research**, v. 44, n. 3, p. 224–225, 2010.

SIDHU J. S.; OMIECINSKI C. J. Modulation of xenobiotic-inducible cytochrome P450 gene expression by dexamethasone in primary rat hepatocytes. **Pharmacogenetics**, v.5, p. 24-36, 1995.

SOUJANYA, S.; LAKSHMAN, M.; KUMAR, A. A.; REDDY, A. G. Evaluation of the protective role of vitamin C in imidacloprid-induced hepatotoxicity in male Albino rats. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v. 4, p. 63–67, 2013.

STIVAKTAKIS, P. D.; KAVVALAKIS, M. P.; TZATZARAKIS, M. N.; ALEGAKIS, A. K.; PANAGIOTAKIS, M. N.; FRAGKIADAKI, P.; VAKONAKI, E.; OZCAGLI, E.; HAYES, W. A.; RAKITSKII, V. N.; TSATSAKIS, A. M. Long-term exposure of rabbits to imidacloprid as quantified in blood induces genotoxic effect. **Chemosphere** v. 149, p. 108–113, 2016.

TAVARES, M. A.; PALMA, I. D. F.; MEDEIROS, H. C. D.; GUELF, M.; SANTANA, A. T.; MINGATTO, F. E. Comparative effects of fipronil and its metabolites sulfone and desulfinyl on the isolated rat liver mitochondria. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.40, p. 206–214, 2015.

TAVELLA, L. B.; SILVA, I. N.; FONTES, L. O.; DIAS, J. R. M.; SILVA, M. I. L. O uso de agrotóxicos na agricultura e suas consequências toxicológicas e ambientais. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.7, n.2, p.6-12, 2011.

THOMPSON, J.S.; THOMPSON, M. W. Genética bioquímica humana: farmacogenética. In: THOMPSON, J.S.; THOMPSON, M.W. **Genética médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. p.124-133.

TOLEDO-FILHO, A.; VIEIRA, B. Farmacogenética. In: TOLEDO-FILHO, A.; VIEIRA, B. **Farmacologia aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. p. 318-325.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, E; Thiacloprid, imidacloprid and their imine derivatives up-regulate the $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor in M10 cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 169, p.114, 2000.

TOMIZAWA, M.; LEE, D. L.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 247–268, 2005.

TOOR, H. K.; SANGHA, G. K.; KHERA, K. S. Imidacloprid induced histological and biochemical alterations in liver of female albino rats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 105, p. 1–4, 2013.

VAN GURP, M. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 304, n. 3, p. 487-497, 2003.

WALLACE, K. B.; STARKOV, A. A. Mitochondrial targets of drug toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 40, p. 353–388, 2000.

WILLIAMS, P. L.; JAMES, R. C.; ROBERTS, S. M. **Principles of toxicology: environmental and industrial applications**. 2. ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 2000. p. 57.

WU, I. W.; LIN, J. L.; CHENG, E. T. Acute poisoning with the neonicotinoid insecticide imidacloprid in N-methyl pyrrolidone. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v.39, p. 617–621, 2001.

ZANOTTI, A.; AZZONE, G. F. Safranine as membrane potential probe in rat liver mitochondria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.201, p. 255–265, 1980.