UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIENCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Neuropatia retardada induzida por organofosforados: estudo *in vitro* dos mecanismos de neurotoxicidade do organofosforado triclorfom, e estratégias de neuroproteção

Lais Silva Fernandes

Ribeirão Preto 2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIENCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Neuropatia retardada induzida por organofosforados: estudo *in vitro* dos mecanismos de neurotoxicidade do organofosforado triclorfom e estratégias de neuroproteção

> Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Toxicologia para a obtenção do título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Lais Silva Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Antonio Cardoso dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Luz Emerick

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Toxicologia em 10/03/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Fernandes, Lais Silva

Neuropatia retardada induzida por organofosforados: estudo *in vitro* dos mecanismos de neurotoxicidade do organofosforado triclorfom e estratégias de neuroproteção. Ribeirão Preto, 2017.

148 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmecêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Toxicologia

Orientador: Santos, Antonio Cardoso

1. Neuropatia retardada induzida por organoforforados (NRIOP).

- 2. Triclorfom. 3. Neuroproteção. 4. Mipafox. 5. Paraoxon. 6. Amilorida.
- 7. Nimodipino. 8. MDL. 9. Liraglutida

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lais Silva Fernandes

Neuropatia retardada induzida por organofosforados: estudo *in vitro* dos mecanismos de neurotoxicidade do organofosforado triclorfom e estratégias de neuroproteção.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para a obtenção do título de Doutora em Ciências

Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Cardoso dos Santos

Aprovado em:

Prof. Dr.:		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr.:		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr.:		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr.:		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr.:		
Instituição:	Assinatura:	

Banca Examinadora

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais e ao meu namorado, que são meu alicerce e minha força.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, saúde e força nos momentos difíceis para continuar e trilhar esse caminho atrás de meus objetivos.

Aos meus pais, Marilda e Wilson, por todo amor, carinho, apoio, paciência, dedicação. Palavras não descrevem todo amor e gratidão que tenho por estas duas pessoas maravilhosas que me deram o maior presente de todos, a vida!

A meu namorado Eduardo, por todo amor, carinho, dedicação, paciência e toda ajuda esse tempo todo, sua presença e apoio foram fundamentais para a conclusão desta etapa de minha vida!

Ao meu orientador professor Antonio, e coorientador professor Guilherme, pela oportunidade, pela dedicação, paciência, humildade, e por todos os conhecimentos compartilhados que me ajudaram muito e foram essenciais para o meu crescimento.

A professora Regina Helena, que me deu a primeira oportunidade de estágio na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, e foi extremamente atenciosa, prestativa e carinhosa.

As minhas queridas Sônia e Gilda, que me acolheram na faculdade desde o início e foram verdadeiras mães, carinhosas, preocupadas, atenciosas, me ensinaram muita coisa.

À Neife, a responsável pelo nosso laboratório, por toda paciência, todos os conhecimentos transmitidos a mim e toda a ajuda dada, foi de extrema importância.

As minhas queridas companheiras de laboratório Rebeca, Rafaela, Flávia, Liliam e Carol por toda ajuda, todo o apoio nos momentos difíceis, todas as risadas, as conversas, as "gordices", todos os bons momentos que passamos. Também aos colegas de laboratório que já terminaram e seguiram seus caminhos mas que também me ajudaram muito e foram fundamentais para o meu aprendizado no laboratório: Nadia, Danilo, Roberto, Guilherme e Flávio. Um enorme agradecimento à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – pelo financiamento a este trabalho por meio da bolsa de Mestrado processo 2012/16319-3 e do Auxílio à pesquisa processo 2013/26906-6. Este apoio foi fundamental para o desenvolvimento do presente trabalho.

Um grande agradecimento também às agências financiadoras CAPES e CNPq (processo 140105/2015-8) pelas bolsas concedidas. Este apoio foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

À todos os funcionários da FCFRP-USP por todo apoio e assistência, em especial à Rose, por toda paciência e apoio.

Enfim, a todos que não foram citados mas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização e conclusão deste trabalho.

"No meio da confusão, encontre a simplicidade. A partir da discórdia, encontre a harmonia. No meio da dificuldade reside a oportunidade".

Albert Einstein

RESUMO

FERNANDES, L.S. Neuropatia retardada induzida por organofosforados: estudo *in vitro* dos mecanismos de neurotoxicidade do organofosforado triclorfom e estratégias de neuroproteção. 2017. 148f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Os praguicidas organofosforados (OPs) são amplamente utilizados na indústria química e na agricultura em todo o mundo. Muitos deles são potenciais causadores da "Neuropatia Retardada Induzida por Organofosforados" (NRIOP), caracterizada pela degeneração distal de axônios do sistema nervoso central e periférico (degeneração do tipo Walleriana). O praguicida triclorfom (dimetil 2,2,2-tricloro-1hidroxietil fosfonato) tem sido utilizado em larga escala na produção agrícola e também no controle de vetores transmissores de várias doenças. Há relatos de efeitos neuropáticos em seres humanos expostos ao triclorfom, mas apesar disso, o seu potencial neuropático e seus mecanismos de neurotoxicidade ainda não foram elucidados. Assim, no presente estudo foram avaliados os mecanismos de toxicidade do praguicida OP triclorfom utilizando linhagem SH-SY5Y de neuroblastoma humano como modelo, e também foram avaliados possíveis agentes neuroprotetores em células tratadas com o bem estabelecido indutor da neuropatia mipafox. Foram utilizados como possíveis neuroprotetores: a amilorida e nimodipino (bloqueadores de canais de cálcio tipo T e L respectivamente), MDL 28170 (inibidor (III) de calpaína) e liraglutida (um agonista do "glucagon like peptide" -GLP-1). Foram usados o mipafox, como modelo de indução da NRIOP e o paraoxon, como modelo não indutor da NRIOP. Os ensaios de inibição e reativação da esterase susceptível à neuropatia (ESNp) e de citotoxicidade mostraram que somente o mipafox e o triclorfom apresentaram inibição e envelhecimento da ESNp superiores a 70% em concentrações com baixa toxicidade, condição compatível com a indução da NRIOP. A ativação das calpaínas foi observada apenas no tratamento com mipafox, efeito este inibido pela nimodipina, amilorida e pelo MDL 28170. Triclorfom e o mipafox causaram elevação significativa nos níveis de cálcio intracelular e da caspase-3, além de inibir significativamente o crescimento de neuritos. Os três OPs avaliados foram capazes de diminuir a captação da glicose, que foi aumentada nos grupos tratados com mipafox associado com neuroprotetores. As quatro substâncias utilizadas como possíveis neuroprotetoras reduziram significativamente o dano causado pelo mipafox sobre os neuritos. O modelo usado no estudo mostrou-se apropriado para a caracterização dos OP neuropáticos, pois permitiu a diferenciação dos efeitos do mipafox (neuropático) e do paraoxon (não-neuropático). Os dados obtidos indicam que o triclorfom tem potencial indutor de NRIOP, e a amilorida, nimodipino liraglutida e MDL apresentaram potencial neuroprotetor.

Palavras-chave: Neuropatia Retardada Induzida por Organofosforados (NRIOP), Esterase Susceptível à Neuropatia (ESNp), Triclorfom, mipafox, paraoxon, amilorida, MDL 28170, nimodipino, liraglutida.

ABSTRACT

FERNANDES, L.S. Organophosphate induced delayed neuropathy: in vitro study of the neurotoxicity mechanisms induced by the organophosphate trichlorfon and strategies of neuroprotection. 2017. 148f. Thesis (Doutoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Organophosphorus (OP) pesticides are widely used in the chemical industry and agriculture around the world. "Organophosphate Induced Delayed Neuropathy" (OPIDN) is characterized by distal degeneration of axons of the central and peripheral nervous system (Wallerian-type degeneration). The OP trichlorfom (dimethyl 2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl phosphonate) has been used in large scale in agricultural production and also for the control of vectors that are transmitter of diseases. There are reports of neuropathic effects in humans exposed to trichlorfon, but despite this, its neuropathic potential and mechanisms of neurotoxicity have not vet been elucidated. Thus, in the present study we evaluated the mechanisms of toxicity of trichlorfom and possible neuroprotective agents in SH-SY5Y human neuroblastoma cells treated with the well-established neuropathy inducer mipafox. The following neuroprotective agents were used: amyloride and nimodipine (T and Ltype calcium channel blockers, respectively), MDL 28170 (calpain inhibitor (III) and liraglutide (a "glucagon-like peptide" - GLP-1 agonist). Mipafox was used as neuropathic OP and paraoxon was used as a non-neuropathic OP. Inhibition and reactivation assays of neurpathy target esterase (NTE) and cytotoxicity showed that only mipafox and trichlorfon showed inhibition and aging of 70% of the NTE in concentrations that presented low toxicity, consistent with development of OPIDN. Activation of calpain was observed only in the treatment with mipafox, an effect inhibited by nimodipine, amyloride and MDL 28170. Triclorfom and mipafox caused significant increase in the levels of intracellular calcium, caspase-3 and significantly inhibiting neurite growth. All three OPs assessed in this work caused a decrease in glucose uptake, which was increased in groups treated whith mipafox plus neuroprotectors. Substances used as possible neuroprotective agents significantly reduced the inhibitory effect of mipafox on neurite outgrowth. The model used in the study proved to be appropriate for characterizing neuropathic OPs, because it allowed a differentiation of the effects of mipafox (neuropathic) and paraoxon (nonneuropathic). The data obtained indicate that trichlorfonm has potential in cause OPIDN. Amiloride, nimodipine, MDL and liraglutide have presented potential neuroprotective effects.

Keywords: Organophosphate Induced Delayed Neuropathy (OPIDN), Neuropathy Target Esterase (NTE), trichlorfon, mipafox, paraoxon, amiloride, MDL 28170, nimodipine, liraglutide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química geral dos organofosforados (JOHNSON, 2000)4
Figura 2 – Possíveis mecanismos de reação entre os praguicidas e a ESNp11
Figura 3 – Degeneração Walleriana. Digestão da porção terminal do axônio pelas calpaínas devido a entrada excessiva de cálcio12
Figura 4 — Figura retirada do artigo publicado por (DA SILVA e DOTTI, 2002). A) imagens de contraste de fase mostrando as fases iniciais de neuritogênese em culturas de neurônios do hipocampo de embriões de rato14
Figura 5 — Estrutura química do organofosforado triclorfom17
Figura 7 – Estrutura química dos compostos organofosforados mipafox (neuropático) e paraoxon (não neuropático), utilizados neste estudo
Figura 8 – Esquema mostrando o procedimento de determinação da atividade da ESNp
Figura 9 – Esquema mostrando o procedimento de reativação da ESNp
Figura 10 – Esquema mostrando o procedimento de determinação da atividade das calpaínas40
Figura 11 – Esquema demonstrando a montagem do sistema para a transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose46
Figura 12– Esquema da detecção das proteínas no western blot
Figura 13 – Representação Gráfica da Equação da reta da curva de calibração de proteína feita com tampão tris-EDTA pH 8,051
Figura 14 – Representação Gráfica da equação da reta da curva de calibração de proteína feita com tampão PCD52
Figura 15 – Curva analítica de proteína feita com tampão fosfato pH 8,052
Figura 16 – Curva analítica de dosagem de proteínas feita para as análises por western blot
Figura 18 – Porcentagem (%) de atividade da ESNp em células SH-SY5Y em função da concentração de mipafox. Cada ponto corresponde à média de três amostras analisadas em triplicata e estão representados como média ± erro padrão da média.

Figura 19 – Porcentagem (%) de atividade da ESNp nas células SH-SY5Y em função da concentração de paraoxon. Cada ponto corresponde à média de três amostras analisadas em triplicata e estão representados como média ± erro padrão da média......55 Figura 20 – Porcentagem (%) da atividade da enzima ESNp em células SH-SY5Y versus concentração de triclorfom......56 Figura 21 – Porcentagem (%) de inibição e envelhecimento da ESNp em células SH-SY5Y versus concentração de mipafox......58 Figura 22 – Porcentagem (%) de inibição e envelhecimento da ESNp em células SH-SY5Y versus concentração de paraoxon. Cada ponto corresponde à média de três amostras analisadas em triplicata. Valores estão representados como média ± erro Figura 23 – Porcentagem (%) de inibição e envelhecimento da ESNp em células SH-SY5Y versus concentração de Triclorfom. Cada ponto corresponde à média de três amostras analisadas em triplicata. Valores estão representados como média ± erro Figura 24 – Porcentagem (%) de atividade da AChE em células SH-SY5Y em função da concentração de mipafox. Cada ponto corresponde à média de três amostras analisadas em triplicata. Os valores de IC50 são mostrados na Tabela 7. Valores estão representados como média ± erro padrão da média60 Figura 25 – Porcentagem (%) de atividade da AChE em células SH-SY5Y em função da concentração de paraoxon......60 Figura 26 – Porcentagem (%) da atividade da enzima AchE em células SH-SY5Y versus concentração de triclorfom.....61 Figura 27 – Citotoxicidade causada mipafox $(2x10^{-5} \text{ M})$, paraoxon $(3x10^{-4} \text{ M})$, triclorfom (1x10⁻³ M) nas células SH-SY5Y após 24 horas de incubação a 37°C.63 Figura 28 – Efeitos da amilorida na viabilidade celular de células SH-SY5Y de neuroblastoma humano após 24 h de incubação a 37 °C......63 Figura 29 – Efeitos da nimodipino na viabilidade celular de células SH-SY5Y de neuroblastoma humano após 24 h de incubação a 37 ºC.....64 Figura 30 – Efeitos da liraglutida na viabilidade celular de células SH-SY5Y de neuroblastoma humano após 24 h de incubação a 37 ºC.....64 Figura 31 – Efeitos do MDL na viabilidade celular de células SH-SY5Y de neuroblastoma humano após 24 h de incubação a 37 °C.....65 Figura 32 – Efeitos do mipafox (2 x 10^{-5} M), paraoxon (3 x 10^{-4} M) e triclorfon (10^{-3} M) na liberação de LDH em células SH-SY5Y de neuroblastoma humano diferenciadas após 24, 48 e 72 horas de incubação.66

Figura 33 –Efeitos do mipafox (2 x 10 ⁻⁵ M), paraoxon (3 x 10 ⁻⁴ M) e triclorfon (10 ⁻³ M) na liberação de LDH em células SH-SY5Y de neuroblastoma humano indiferenciadas após 24, 48 e 72 horas de incubação
Figura 34 – Efeito da ativação das calpaínas na presença de etanol (veículo, controle), mipafox (2x10 ⁻⁵ M), paraoxon (3x10 ⁻⁴ M), triclorfom (1x10 ⁻³ M), amilorida e nimodipino (15 ng/mL), MDL (), mipafox + amilorida, mipafox + MDL e mipafox+nimodipino em cultura de células SH-SY5Y após 24 horas de incubação à 37°C, 5% de CO2.
Figura 35 – Curva de calibração de cálcio (1 a 20 mg/L) obtida por espectrometria de massa indutivamente acoplada a Plasma (ICP-MS, "Inductively coupled plasma mass spectrometry")
Figura 36 – Efeitos do mipafox, paraoxon e triclorfom na concentração de cálcio de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, após 24 horas de incubação68
Figura 37 – Atividade da caspase-3 utilizando paraoxon, mipafox e triclorfom em células SH-SY5Y de neuroblastoma humano depois de 24 horas de incubação a 37°C
Figura 38 – Alterações na morfologia nuclear após 24 e 48 horas de incubação com os OPs. Representação gráfica da média dos cinco campos analisados por grupo 70
Figura 39 – Alterações na morfologia nuclear após 24 horas de incubação com os OPs
Figura 40 – Alterações na morfologia nuclear após 24 horas de incubação com o OP mipafox e as substâncias amilorida, nimodipino e MDL, avaliadas como possíveis protetoras
Figura 41 – Alterações na morfologia nuclear após 48 horas de incubação com os OPs
Figura 42 – Alterações na morfologia nuclear após 48 horas de incubação com o OP mipafox e as substâncias amilorida, nimodipino e MDL, avaliadas como possíveis protetoras
Figura 43 – Porcentagem de células apoptóticas e necróticas após 24 (A) e 48 (B) horas de incubação com mipafox, paraoxon e triclorfom. Representação gráfica da média dos cinco campos analisados por grupo76
Figura 44 – Avaliação de células apoptóticas e necróticas por microscopia de fluorescência após 24 horas de incubação com:
Figura 45 – Avaliação de células apoptóticas e necróticas por microscopia de fluorescência após 48 horas de incubação com: A) Controle negativo (etanol); B) Mipafox; C) Paraoxon; D) Triclorfom
Figura 46 – Porcentagem de células apoptóticas e necróticas após 24 (A) e 48 (B) horas de incubação com mipafox mais os possíveis neuroprotetores amilorida,

nimodipino, MDL e liraglutida. Representação gráfica da média dos cinco campos analisados por grupo79
Figura 47 – Avaliação de células apoptóticas e necróticas por microscopia de fluorescência após 24 horas de incubação com: A) Mipafox + Nimodipino; B) Mipafox + Amilorida; C) Mipafox + Liraglutida; D) Mipafox + MDL80
Figura 48 – Avaliação de células apoptóticas e necróticas por microscopia de fluorescência após 48 horas de incubação com: A) Mipafox + Nimodipino; B) Mipafox + Amilorida; C) Mipafox + Liraglutida; D) Mipafox + MDL81
Figura 49 – Efeito sobre o crescimento de neuritos83
Figura 50 – Imagens obtidas em microscópio óptico invertido com contraste de fase. As células foram induzidas à diferenciação com ácido retinóico 10µM por 5 dias84
Figura 51 – Imagens obtidas em microscópio óptico invertido com contraste de fase. As células foram induzidas à diferenciação com ácido retinóico 10µM por 5 dias85 Figura 52 – Efeito sobre o crescimento de neuritos. As células foram induzidas à diferenciação com ácido retinóico 10µM por 5 dias
Figura 53 – Imagens obtidas em microscópio óptico invertido com contraste de fase. As células foram induzidas à diferenciação com ácido retinóico 10µM por 5 dias e posteriormente incubados com: A) ácido retinóico (AR); B) mipafox; C) paraoxon; D) triclorfom durante 48 horas
Figura 54 – Imagens obtidas em microscópio óptico invertido com contraste de fase. As células foram induzidas à diferenciação com ácido retinóico 10µM por 5 dias88
Figura 55 – Efeito sobre o crescimento de neuritos. As células foram induzidas à diferenciação com ácido retinóico 10µM por 5 dias.)
Figura 56 – Imagens obtidas em microscópio óptico invertido com contraste de fase. As células foram induzidas à diferenciação com ácido retinóico 10µM por 5 dias90
Figura 57 – Imagens obtidas em microscópio óptico invertido com contraste de fase. As células foram induzidas à diferenciação com ácido retinóico 10µM por 5 dias91
Figura 58 – Análise imunocitoquímica do neurofilamento de 200 kD (NF200) em células SH-SY-5Y diferenciados95
Figura 59 – Análise imunocitoquímica do neurofilamento de 200 kD (NF200) em células SH-SY-5Y diferenciados96
Figura 60 – Análise da intensidade de fluorescência emitida pelas células expostas aos OPs e possíveis neuroprotetores tratadas com o anticorpo anti-NF20097
Figura 61 – Análise de F-actina por Western blot em células SH-SY-5Y diferenciadas expostas ao mipafox (2 x 10 ⁻⁵ M), paraoxon (3 x 10 ⁻⁴ M) e triclorfom (10 ⁻³ M)

Figura 68 – Análise de Sinaptofisina por Western blot em células SH-SY-5Y diferenciadas expostas ao mipafox (2 x 10⁻⁵ M) mais os possíveis neuroprotetores nimodipino, amilorida, MDL e liraglutida......103

Figura 69 – Análise de GAP-43 por Western blot em células SH-SY-5Y diferenciadas expostas ao mipafox (2 x 10⁻⁵ M), paraoxon (3 x 10⁻⁴ M) e triclorfom (10⁻³ M). 104

Figura 74 – Avaliação da captação celular de glicose utilizando mipafox e os possíveis protetores amilorida, nimodipino, liraglutida e MDL em células SH-SY5Y de neuroblastoma humano após 72 horas de incubação......108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação da OMS para os compostos inibidores das colinesterases OPs e carbamatos de acordo com a dose letal capaz de matar 50% da população exposta (DL ₅₀)
Tabela 2 – Classificação da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária para os compostos inibidores das colinesterases OPs e carbamatos de acordo com a dose letal capaz de matar 50% da população exposta (DL ₅₀)6
Tabela 3 – Protocolo para preparação da curva padrão de proteína
Tabela 4 – Protocolo para preparação da curva padrão de proteína com reagente Bio Rad para análises por western blott
Tabela 5 – Valores de IC50 dos três OP avaliados em relação à atividade da ESNp de células SH-SY5Y56
Tabela 6 – Taxas de inibição e envelhecimento da ESNp de células SH-SY5Y após 24 horas de exposição aos OP avaliados57
Tabela 7 – Valores de IC50 e r2 dos três OP avaliados em relação à atividade da AChE de células SH-SY5Y e relação entre os valores de IC50 da ESNp e da AChE61
Tabela 8 – Valores das médias do comprimento dos neuritos e das médias das porcentagens de células com neuritos de células expostas aos OPs. Cada valor corresponde à média de três experimentos realizados em triplicata. Os valores estão representados como média ± erro padrão da média
Tabela 9 – Valores das médias do comprimento dos neuritos e das médias das porcentagens de células com neuritos de células expostas ao OP mipafox mais os possíveis neuroprotetores. Cada valor corresponde à média de três experimentos realizados em triplicata. Os valores estão representados como média ± erro padrão da média

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 4-AAP 4-aminoantipirina
- Ac anticorpo
- AChE acetilcolinesterase
- ACh acetilcolina
- α fator de separação
- ANOVA análise de variância
- ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCh acetiltiocolina
- BSA soro albumina bovina
- DA doença de Alzheimer
- DL50 dose letal capaz de matar 50% da população exposta
- DTNB ácido 5,5-ditio-bis(2-nitrobenzóico)
- DTT ditiotreitol
- DMSO dimetilsulfóxido
- EDTA etileno diamino tetra acetato de sódio
- ESNp esterase susceptível à neuropatia
- FAO Organização para Agricultura e Alimentação das Nações Unidas
- GLP-1 "Glucagon-like peptide" 1
- GAP-43 "Growth-associated protein
- HO Hoechst 33342
- IF intensidade de fluorescência
- IgG imunoglobulina G
- IgM imunoglobulina M
- IPCS-WHO International Programme on Chemical Safety World Health Organization
- IP iodeto de propídio

- K3Fe(CN)6 ferricianeto de potássio
- kDa quilodaltons
- MAPs "Microtubules-associated proteins"
- MDL 28170 carbenzoxi-valil-phenilalanial
- NF-200 neurofilamento 200kDa
- NRIOP neuropatia retardada induzida por organofosforados
- NTE neuropathy target esterase
- OECD Organisation for Economic Co-operation and Development
- OMS Organização Mundial de Saúde
- OP organofosforado
- OPIDN Organophosphate Induced Delayed Neuropathy
- PCD protease cálcio-dependente
- pH potencial hidrogeniônico
- PIB produto interno bruto
- PSP saligenin fenil fosfato
- SDS dodecil sulfato de sódio
- SINITOX Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
- TOCP tri-orto-cresil fosfato
- TRIS tris hidróxido amino metano
- UI unidades internacionais.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Praguicidas no cenário econômico e da saúde pública	1
1.2 Praguicidas organofosforados	3
1.3 A intoxicação por praguicidas organofosforados	6
1.4 Neuropatia retardada induzida por organofosforados: o papel da ESNp	9
1.5 Degeneração do tipo Walleriana	11
1.6 O papel dos organofosforados na diferenciação neuronal: neuritogêne proteínas de citoesqueleto e proteínas relacionadas à neuroplasticidade	ese, 13
1.7 O organofosforado triclorfom	16
1.8 Neuroproteção	18
1.8.1 Bloqueadores de canais de cálcio	18
1.8.2 Análogo do GLP-1 (glucagon-like peptide 1) Liraglutida	22
1.8.3 Inibidor de calpaínas MDL28170	23
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVOS	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Reagentes	27
4.2. Preparo de Soluções	27
4.2.1 Tampão salina fosfato (PBS) pH 7,2 a 25°C	28
4.2.2 Tampão Tris 50 mM – EDTA 0,2 mM HCl pH 8,0 a 25°C	28
4.2.3 Tampão citrato-Tris 50mM pH 6,0 a 25°C	28
4.2.4 Fenilvalerato Dispersante	28
4.2.5 4-aminoantipirina (4-AAP) 0,02% e Dodecilsulfato de sódio (SDS) 5%	28
4.2.6 Ferricianeto de Potássio K3Fe(CN)6 0,40%	29

4.2.7 Solução de Azul Brilhante para determinação de proteínas	29
4.2.8 Reagente Bio Rad para determinação de proteínas	29
4.2.9 Solução padrão de soro albumina bovina (BSA) (500µg/mL)	29
4.2.10 Solução padrão de soro albumina bovina (BSA) (1000µg/mL)	29
4.2.11 Solução salina 0,9%	29
4.2.12 Tampão fosfato (0,1 M de fosfato de sódio, pH 8,0 e pH 7,0)	29
4.2.13 Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB 10,3 mM)	30
4.2.14 Acetiltiocolina (ATCh 10,7 mM)	30
4.2.15 Solução de KCI em tampão Tris-EDTA, pH 8,5	30
4.2.16 Tampão PCD (protease cálcio-dependente) (20 mM tris; 5 mM EDTA; 1 mM 2-mercaptoetanol)	0 30
4.2.17 Tampão caseína (0,5 mg/mL de caseína; 20 mM DTT; 50 mM tris; 4 m CaCl2)	M 31
4.2.18 Gradientes de NaCI em tampão PCD	31
4.2.19 Preparo de meio de cultura F12 HAM	31
4.2.20 Preparo de TBS e TTBS 1x	31
4.2.21 Tampão de Eletroforese (Tris-Glicina/SDS)	32
4.2.22 Tampão de Transferência (Tris-Glicina)	32
4.2.23 Tampão de lise (CelLytic [™] M, C2978) com inibidores de proteases fosfatases	e 32
4.2.23 Tampão de lise (CelLytic [™] M, C2978) com inibidores de proteases fosfatases 4.2.24 Preparo dos anticorpos primários anti-GAP43, anti-sinapsina I e ant sinaptofisina	e 32 ti- 32
4.2.23 Tampão de lise (CelLytic [™] M, C2978) com inibidores de proteases fosfatases 4.2.24 Preparo dos anticorpos primários anti-GAP43, anti-sinapsina I e ant sinaptofisina 4.2.25 Preparo do anticorpo primário anti-β-actina	e 32 ti- 32 32
 4.2.23 Tampão de lise (CelLytic [™] M, C2978) com inibidores de proteases fosfatases	e 32 ti- 32 32 32
 4.2.23 Tampão de lise (CelLytic [™] M, C2978) com inibidores de proteases fosfatases 4.2.24 Preparo dos anticorpos primários anti-GAP43, anti-sinapsina I e ant sinaptofisina	e 32 ti- 32 32 32 ti- 33
 4.2.23 Tampão de lise (CelLytic [™] M, C2978) com inibidores de proteases fosfatases 4.2.24 Preparo dos anticorpos primários anti-GAP43, anti-sinapsina I e ant sinaptofisina	e 32 ti- 32 32 32 ti- 33 33
 4.2.23 Tampão de lise (CelLytic [™] M, C2978) com inibidores de proteases fosfatases 4.2.24 Preparo dos anticorpos primários anti-GAP43, anti-sinapsina I e ant sinaptofisina	e 32 ti- 32 32 ti- 33 33 34
 4.2.23 Tampão de lise (CelLytic [™] M, C2978) com inibidores de proteases fosfatases	e 32 ti- 32 32 ti- 33 33 34 35
 4.2.23 Tampão de lise (CelLytic TM M, C2978) com inibidores de proteases fosfatases	e 32 ii- 32 32 ii- 33 33 35 35
 4.2.23 Tampão de lise (CelLytic [™] M, C2978) com inibidores de proteases fosfatases	e 32 ii- 32 32 ii- 33 33 35 35 35
 4.2.23 Tampão de lise (CelLytic [™] M, C2978) com inibidores de proteases fosfatases	e 32 ii- 32 32 ii- 33 33 35 35 35 37
 4.2.23 Tampão de lise (CelLytic [™] M, C2978) com inibidores de proteases fosfatases	e 32 ii- 32 32 ii- 33 33 35 35 35 37 37
 4.2.23 Tampão de lise (CelLytic [™] M, C2978) com inibidores de proteases fosfatases	e 32 ii- 32 32 32 ii- 33 33 35 35 35 37 37 38
 4.2.23 Tampão de lise (CelLytic [™] M, C2978) com inibidores de proteases fosfatases. 4.2.24 Preparo dos anticorpos primários anti-GAP43, anti-sinapsina I e ant sinaptofisina	e 32 ii- 32 32 32 ii- 33 33 34 35 35 35 37 37 37 38 40
 4.2.23 Tampão de lise (CelLytic [™] M, C2978) com inibidores de proteases fosfatases. 4.2.24 Preparo dos anticorpos primários anti-GAP43, anti-sinapsina I e antisinaptofisina	e 32 ii- 32 32 32 ii- 33 33 34 35 35 35 37 37 37 37 38 40 41

4.11.2 Ensaio de citotoxicidade pelo método da Lactato Desidrogenase (LDH)	41
4.12 Determinação da atividade da AChE	41
4.13 Determinação de Cálcio Intracelular	42
4.14 Avaliação de Apoptose e/ou Necrose	42
4.14.1 Determinação de Caspase - 3	43
4.14.2 Avaliação da Morfologia Nuclear por Microscopia de Fluorescência (Apoptose)	a 43
4.14.3 Avaliação de necrose e/ou apoptose (Hoechst 33342 e lodeto de Propídeo)) 43
4.15 Ensaio de crescimento de neuritos	44
4.16 Neurofilamento-200 (Imunofluorescência)	44
4.17 Análise de sinaptofisina, sinapsina I e GAP43 por Western Blot	45
4.17.1 Preparo do Lisado celular	45
4.17.2 Eletroforese (SDS page)	46
4.17.3 Transferência	46
4.17.4 Reação imunológica	47
4.18 Análise de Inflamação	47
4.18.1 Interleucina 1 β (IL-1 β)	48
4.18.2 Interleucina-6 (IL-6)	48
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
6 RESULTADOS	51
6.1 Proteínas	51
6.2 Curvas da Inibição da ESNp	54
6.2.1 Valores de IC50 para ESNp	56
6.3 Reativação da ESNp	57
6.4 Atividade da AChE	59
6.4.1 Valores de IC50 para a AChE e razão IC50 ESNp / IC50 AChE	61
6.5 Ensaios de citotoxicidade	62
6.5.1 Citotoxicidade pelo método de redução do MTT	62
6.5.2 Citotoxicidade pelo método da Lactado Desidrogenase (LDH)	65
6.6 Ativação das calpaínas	67
6.7 Determinação de Cálcio Intracelular	68
6.8 Avaliação de necrose e apoptose	69
6.8.1 Determinação de Caspase – 3	69

6.8.2 Avaliação de Células em Apoptose	70
6.8.3 Avaliação de Células em Necrose e Apoptose	75
6.9 Ensaios de Crescimento de Neuritos	82
6.10 Analise de Proteínas de Citoesqueleto	94
6.10.1 Neurofilamento 200-kD (NF-200) por imunofluorescência	94
6.10.2 Análise de F-actina por Western Blott	98
6.10.3 Análise de β-III Tubulina por Western Blott	99
6.11 Análise de Proteínas Relacionadas ao Crescimento e Plasticidade Ne	euronal 101
6.11.1 Análise de Sinapsina I por Western Blott	101
6.11.2 Análise de Sinaptofisina por Western Blott	102
6.11.3 Análise de GAP-43 por Western Blott	104
6.12 Avaliação de inflamação (IL-6 e IL-1β)	105
7 DISCUSSÃO	109
8 CONCLUSÕES	129
REFERÊNCIAS	132

1 INTRODUÇÃO

1.1 Praguicidas no cenário econômico e da saúde pública

O agronegócio é fundamental para a economia do país, pois representa cerca de um terço do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro e tem dado grande contribuição às exportações de produtos agrícolas. O Brasil conta com 388 milhões de hectares de terras agricultáveis férteis e de alta produtividade. Segundo dados do Ministério da Agricultura, as exportações de produtos agrícolas do país passaram de US\$ 27 bilhões em 2004 para US\$ 95 bilhões em 2011. O superávit da balança comercial do agronegócio brasileiro até abril de 2016 atingiu US\$ 7,1 bilhões (AGRICULTURA, 2016).

Seguindo esta tendência da expansão agrícola, o mercado nacional de praguicidas teve que se manter em crescente de produtividade. O faturamento líquido das indústrias químicas que produzem praguicidas passou de 1,1 bilhões de dólares em 1990 para cerca de 4,0 bilhões de dólares em 2005 (SILVA, J.M.; FARIA, H.P.; SILVA, E.N.; PINHEIRO, T.M.M., 2006). Contudo, o aumento da produtividade e consequente aumento do uso de praguicidas estão relacionados com a elevação do número de casos de intoxicações por estes agentes (BONELLI, 2002).

Em 2013, o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX, 2013) da Fundação Oswaldo Cruz, divulgou que os agrotóxicos são causadores de cerca de 7% dos casos de intoxicações registrados no Brasil, sendo responsáveis por 35% dos óbitos registrados por intoxicação humana naquele ano. Em 2013, o SINITOX registrou mais de 42 mil casos de intoxicação humana e mais de 200 óbitos, sendo que os três agentes tóxicos de maior letalidade (razão do número de óbitos pelo número de casos decorrentes de intoxicação) foram: agrotóxicos de uso agrícola, metais e produtos veterinários, nesta ordem. Mas provavelmente o cenário é ainda pior, pois segundo estimativas do Ministério da Saúde estes números refletem apenas parcialmente a realidade do Brasil, sendo que para cada evento de intoxicação por agrotóxico notificado, estima-se que existam outros 50 não relatados (PIRES, 2005a).

Estudos epidemiológicos desenvolvidos com trabalhadores rurais da serra gaúcha demonstraram que a intoxicação por agrotóxicos apresentou forte associação com transtornos psiquiátricos menores, denominados problemas de nervosismo e problemas de tristeza e desânimo (AMORIN, 2003). Assim, trabalhadores que manipulam estes compostos de maneira inadequada por um longo período de tempo apresentam transtornos psiquiátricos que podem contribuir para o elevado índice de tentativas de suicídio.

O uso de praguicidas é um fator de risco muito importante em se tratando tanto de trabalhadores rurais como do meio ambiente. Porém, as utilidades destes produtos excedem as que se conhecem mais comumente. Estes compostos são utilizados na construção e manutenção de estradas, tratamentos de madeiras para construção, armazenamento de grãos e sementes, indústria moveleira e na saúde pública para o combate de vetores transmissores de doenças endêmicas e epidêmicas (SILVA, J. M. F., H.P.; SILVA, E.N.; PINHEIRO, T.M.M., 2006).

Como na maioria das vezes os praguicidas são utilizados principalmente em países de terceiro mundo, onde as culturas agrícolas dispõem de recursos humanos pouco treinados e pouca ou nenhuma estrutura para a fiscalização ou treinamento adequado, uma grande inquietação vem crescendo cada vez mais por parte dos órgãos responsáveis pela fiscalização e boas práticas de manejo destas substâncias, pois as populações destes lugares são altamente suscetíveis à intoxicações agudas e também exposições crônicas, o que leva a um grande número de mortes e doenças decorrentes da exposição aos praguicidas (LONDON *et al.*, 2005; MONGE *et al.*, 2005).

Um cenário do uso de praguicidas que também vem se destacando nos últimos anos é o seu uso cada vez em maiores quantidades no controle de vetores de doenças, já que crescentes números de casos de doenças transmitidas por mosquitos, principalmente o mosquito *Aedes aegypti*, que transmite o vírus de doenças como a dengue, zika vírus e chickungunia, vêm ocorrendo. Pelo aumento de pessoas afetadas por essas doenças, a tentativa de controle desses vetores utilizando praguicidas também vem aumentando. Em um estudo realizado por CARVALHO (2004) e BEZERRA (2007) utilizando o temefos –organofosforado recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2011) para ser utilizado no controle de larvas do *A. aegypti* – foi demonstrado que dosagens cada vez maiores eram necessárias para o controle do mosquito, mostrando uma resistência das larvas. BENITEZ-TRINIDAD *et al.* (2015) observaram que o temefos pode ter um efeito citostático e apoptótico, e que pode ter potencial efeito genotóxico em células metabolicamente capazes de realizar sua biotransformação. Outro praguicida

organofosforado recomendado pela OMS para o controle do *A. aegypti* é o malation. Muitos estudos demonstram que o malation possui baixa toxicidade para mamíferos; porém, alguns estudos vêm demonstrando que ele aumenta a peroxidação lipídica em cérebro, fígado e eritrócitos de roedores, evento que pode contribuir para o desenvolvimento de diversas doenças (AKHGARI *et al.*, 2003; HAZARIKA *et al.*, 2003). Além disso, o malation pode ser biotransformado em mamíferos para o malaoxon que é extremamente tóxico aos mamíferos (JOHNSON et al., 2000).

Em geral, dentre os praguicidas responsáveis por intoxicações no homem, destacam-se os OPs, com 34%, e os carbamatos, com 26%. Os OPs são os praguicidas mais utilizados nas tentativas de suicídio e levam também ao maior número de mortes, seja por exposição voluntária ou involuntária (PIRES, D. X., CALDAS, E.D., RECENA M.C.P., 2005; PIRES, D. X. C., E. D.; RECENA, M. C. P., 2005). Alguns estudos relacionam a exposição aos praguicidas com sintomas neuropsiquiátricos (REHNER *et al.*, 2000). Existem vários relatos sugerindo que os OPs podem estar associados ao aumento do risco para várias doenças crônicas, incluindo respiratórias, metabólicas (diabetes) e neurológicas (doença de Alzheimer e doença de Parkinson) (CHAKRABORTY *et al.*, 2009).

1.2 Praguicidas organofosforados

O termo praguicida pode ser definido como qualquer substância ou mistura de substâncias com o intuito de prevenir, destruir, repelir ou mitigar pragas. Pragas podem ser insetos, roedores, ervas daninhas, e uma série de outros organismos indesejáveis (Organização para Agricultura e Alimentação das Nações Unidas – FAO). A legislação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA (2002), no inciso IV do decreto 4074 de janeiro de 2002 traz uma definição semelhante: agrotóxicos e afins são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (ANVISA, 2002).

O desenvolvimento dos compostos OP como praguicidas ocorreu somente no final dos anos 1930 e início dos anos 1940, quando o químico alemão Gerhard Schrader descobriu a estrutura química geral dos praguicidas OP. Este químico também sintetizou o primeiro praguicida OP comercializado, chamado Bladan, contendo TEPP (tetraetil pirofosfato) como ingrediente ativo, e um dos mais conhecidos, paration, em 1994 (TERRY, 2012).

Quimicamente, os praguicidas OPs normalmente são ésteres, ésteres de tiol ou anidridos derivados de ácidos fosfóricos. Na figura 1 pode-se observar a estrutura química geral dos compostos OPs. Se os radicais R1 e R2 estiverem diretamente ligados ao átomo de fósforo, os compostos são chamados de fosfinatos. Se ambos radicais R1 e R2 estiverem ligados ao átomo de fósforo via ligação -O- ou -S-, então são chamados de fosfatos, e se um radical se ligar diretamente ao fósforo e o outro por ligação -O- ou -S-, são chamados de fosforatos. Nos OPs chamados fosforoamidatos, o carbono é ligado ao fósforo através de um grupamento amino (JOHNSON, 2000).



O grupamento X irá abandonar o complexo enzima-organofosforado após a ligação enzimática. Pode ser alifático, aromático ou grupos heterocíclicos que serão ligados ao átomo de fósforo por uma ligação -O- ou -S-



Figura 1 – Estrutura química geral dos organofosforados (JOHNSON, 2000).

Para todos os compostos que contêm um átomo de enxofre ligado ao fósforo, um bioativação metabólica é necessária para que manifeste sua atividade biológica, uma vez que apenas os compostos com uma ligação P = O são inibidores eficazes da AChE. Este bioativação consiste em uma dessulfuração oxidativa mediada, principalmente, mas não exclusivamente, no fígado por enzimas do citocromo P450 (CYPs), e que leva à formação de um "oxon" (ZHUANG *et al.*, 2014). No entanto, estes análogos oxidados podem ser rapidamente hidrolisados por hidrolases encontrados nos tecidos dos mamíferos. Os insetos são mais sensíveis a estes compostos, porque muitas vezes não possuem estas enzimas (GLYNN, 2000) Os praguicidas organofosforados são absorvidos através da pele, trato respiratório e gastrointestinal, e muitas vezes a sua absorção é favorecida pelos solventes presentes na formulação. A absorção através da pele é maior em temperaturas mais elevadas, ou quando há lesões na pele. Depois da absorção, estes compostos e os seus metabolitos são rapidamente distribuído a todos os tecidos (VAN DER SCHANS *et al.*, 2003).

O International Programme on Chemical Safety – World Health Organization (IPCS-WHO) classifica os praguicidas organofosforados e carbamatos como inibidores das colinesterases com menores efeitos ao ambiente, porém com maior toxicidade aguda aos organismos. Este programa da Organização Mundial da Saúde (OMS) vinha classificando estes compostos de acordo com a dose letal para 50% da população exposta (DL50) em: la (Extremamente tóxicos); lb (Altamente tóxicos); II (Moderadamente tóxicos); III (Pouco tóxicos) e U (Improváveis de apresentar toxicidade aguda). A partir de 2009 os critérios de classificação foram revisados e a OMS agora usa a categoria de perigo de toxicidade aguda da *"The Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals" – GHS –* (Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos) como ponto de partida para a classificação. Este sistema leva em consideração a toxicidade oral e dérmica, e os valores desta classificação são derivados da estimativa de toxicidade aguda para cada substância levando em consideração também a DL50. A classificação da OMS é mostrada na Tabela 1.

DL₅₀ pa (mg/Kg de p	ira ratos eso corporal)
Oral	Dérmica
< 5	< 50
5-50	50-200
50-2000	200-2000
Acima de 2000	Acima de 2000
5000 c	ou mais
	DL ₅₀ pa (mg/Kg de p Oral < 5 5-50 50-2000 Acima de 2000 5000 c

Tabela 1 – Classificação da OMS para os compostos inibidores das colinesterases OPs e carbamatos de acordo com a dose letal para 50% da população exposta (DL₅₀).

Fonte: Organização Mundial da Saúde (WHO, 2009).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) classifica estes compostos de acordo com a dose letal capaz de matar 50% da população exposta (DL50) em: Classe I (Extremamente Tóxicos – Faixa vermelha); Classe II (Altamente Tóxicos – Faixa Amarela); Classe III (Medianamente Tóxicos – Faixa azul); Classe IV (Pouco Tóxicos – Faixa verde). Alguns OPs dos mais usados em todo o Brasil fazem parte da classe I (metamidofós) e outros fazem parte da classe II (triclorfom) (ANVISA, 2012). Na tabela 2 pode-se observar a classificação da ANVISA.

Tabela 2 – Classificação da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária para os compostos inibidores das colinesterases OPs e carbamatos de acordo com a dose letal capaz de matar 50% da população exposta (DL₅₀).

Classe I	Extremamente Tóxico	Vermelha
Classe II	Altamente Tóxico	Amarela
Classe III	Medianamente Tóxico	Azul

Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA 2012).

1.3 A intoxicação por praguicidas organofosforados

Embora os OPs empregados como inseticidas apresentarem preferencial toxicidade aos insetos, eles também são tóxicos aos humanos e outros animais devido à inibição da acetilcolinesterase (AChE) e subsequente acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas (COLOVIC *et al.*, 2013). Contudo, clinicamente, os sintomas da intoxicação por OPs não provém apenas da inibição da AChE e são divididos em quatro síndromes: síndrome aguda (colinérgica), síndrome intermediária, transtornos neuropsiquiátricos crônicos induzidos por OPs e neuropatia retardada induzida por OPs (NRIOP) (COSTA, 2007).

A síndrome aguda é devido à inibição da enzima AChE no sistema nervoso central e periférico, enzima responsável pela rápida e eficiente hidrólise do

neurotransmissor acetilcolina (ACh). Em condições normais, a célula pré-sináptica sintetiza acetilcolina a partir de colina mais o cofator acetil coenzima A, através da ação da enzima colina acetiltransferase. Uma vez liberada, a ACh é removida rapidamente pela acetilcolinesterase. Entretanto, quando ocorre a inibição da AChE, a eficiência desta enzima se perde e o efeito da acetilcolina se prolonga nas sinapses. Como consequência disto, há um aumento da atividade do sistema nervoso autônomo parassimpático e do sistema nervoso central (COSTA, 2007). Os sinais devido à estimulação do sistema nervoso autônomo parassimpático podem ser provenientes da ação da ACh em receptores muscarínicos ou nicotínicos. A estimulação dos receptores muscarínicos leva ao aumento de secreções, broncoconstrição, miose, cólicas gastrintestinais, diarreia, bradicardia e poliúria. Os efeitos da ativação dos receptores nicotínicos são: fadiga, cãibra, fasciculações e fraqueza muscular generalizada. Os efeitos no sistema nervoso central resultam em: confusão mental, cefaleias, convulsões e coma. É necessário atendimento emergencial na ocorrência destes sintomas, podendo ser administrada a atropina, que é um antagonista competitivo da acetilcolina, e as oximas, que agem como reativadores nucleofílicos da AChE (POPE, KARANTH e LIU, 2005).

Algumas pessoas que sobrevivem a exposição aguda pelos OPs descrevem sintomas neurológicos que duram muito depois de os sintomas agudos terem diminuído. Em 1995 ocorreu um ataque ao metrô de Tokio onde o as pessoas foram expostas ao gás Sarin, composto OP, e cinco anos após o ataque, pessoas que sobreviveram ainda sofriam de visão turva, entravam em fadiga com facilidade, tinham dificuldade de concentração e insônia. Exames de ressonância magnética revelaram alterações estruturais nos cérebros dos indivíduos expostos. Estes sintomas de longa duração podem ser consequência da atividade convulsiva e da anóxia iniciada pela inibição aguda da AChE (MCDONOUGH e SHIH, 1997; KAWADA *et al.*, 2005; YANAGISAWA, MORITA e NAKAJIMA, 2006; YAMASUE *et al.*, 2007; JIANG *et al.*, 2010).

Uma segunda manifestação clínica decorrente da intoxicação por OP é chamada de Síndrome Intermediária. Esta síndrome foi descrita primeiramente por Senanayake e Karalliedde em 1987, e manifesta-se depois da crise colinérgica e antes da NRIOP. Ela é caracterizada por fraqueza dos músculos proximais dos membros, músculos flexores do pescoço, músculos respiratórios e nervos motores cranianos. Também foi observada necrose da fibra muscular após a crise colinérgica

aguda. Embora a incidência da Síndrome Intermediária possa ser alta e seja considerada como uma das principais causas de morbidade e mortalidade associadas aos OP, a fisiopatogia subjacente desta síndrome ainda não é esclarecida. Não há um tratamento específico para esta síndrome e a intervenção é somente de suporte (SENANAYAKE e KARALLIEDDE, 1987; YANG e DENG, 2007; ABDOLLAHI e KARAMI-MOHAJERI, 2012).

Os transtornos neuropsiquiátricos crônicos induzidos por OP podem ser causados pela exposição repetida e a baixas doses de OP, onde não ocorre uma crise colinérgica. O mecanismo desta síndrome é o menos conhecido e sabe-se que independe da inibição de esterases. Os sinais clínicos mais comuns incluem comprometimento da memória, dificuldade de concentração e aprendizagem, ansiedade, depressão e sintomas extrapiramidais tais como: tremor, instabilidade postural e rigidez dos músculos da face não responsivos ao tratamento por levodopa (SALVI RM, 2003). Uma hipótese para explicar a neurotoxicidade a longo prazo em exposições a baixas doses de OPs pode envolver a modificação OP de proteínas no sistema de transporte axonal. Os sistemas de transporte movem as organelas do núcleo das células para os terminais axónicos e de volta para o núcleo. Muitas proteínas estão presentes no axoplasma dos neurônios, sugerindo o envolvimento de um grande número de proteínas neste processo de transporte, que podem ser alteradas após a exposição aos OPs (GUPTA e ABOU-DONIA, 1994; GEARHART *et al.*, 2007; PRENDERGAST *et al.*, 2007; TERRY *et al.*, 2007; RISHAL *et al.*, 2010).

Na década de 30 a NRIOP foi observada pela primeira vez, quando pacientes de tuberculose foram tratados com fosfocreosoto, que é uma mistura indefinida de ésteres derivados do ácido fosfórico e fenóis. Desde então, foi observado mais de 70.000 casos em humanos nos últimos 75 anos. Na década de 30, milhares de casos de paralisia ocorreram nos Estados Unidos devido ao consumo de uma bebida alcoólica conhecida como Ginger Jake contaminada com tri-orto-cresil fosfato (TOCP). Posteriormente, epidemias similares foram reportadas no Marrocos, Holanda, lugoslávia, França, África do Sul e Índia (ZHAO *et al.*, 2004). Esta síndrome é clinicamente silenciosa por 1-2 semanas até o aparecimento de fraqueza muscular, cãibras, dores musculares, sensação de formigamento, perda de sensibilidade, fraqueza distal progressiva e queimação principalmente nos pés e às vezes nas mãos, que pode progredir para debilidade progressiva, inicialmente nas pernas e posteriormente para atrofia distal dos músculos. Os casos mais graves

podem levar à paralisia completa, problemas respiratórios e morte (ABOU-DONIA, 2003).

1.4 Neuropatia retardada induzida por organofosforados: o papel da ESNp

Esta neuropatia caracteriza-se por uma axonopatia distal, central e periférica tipo Walleriana que se desenvolve de 8 a 14 dias após intoxicação por um OP neuropático. Dentre os OPs que causam a NRIOP, incluem fosfatos, fosfonatos e fosforamidatos. Como exemplo de alguns compostos que já foram relatados como causadores da NRIOP tem-se o TOCP, metamidofós, mipafox, diclorvós, leptofós e triclorfom. O mecanismo de ação tóxica para o desenvolvimento da NRIOP foi descrito por (JOHNSON, 1982).

O primeiro evento observado é a desalquilação fosfórica de uma esterase conhecida por esterase susceptível à neuropatia (ESNp). Contudo, a simples inibição da ESNp não é suficiente para causar a NRIOP. É necessária a geração de uma carga negativa na porção terminal do grupamento fosforado ligado à enzima. Isso ocorre como resultado de uma segunda reação, chamada de "envelhecimento". Este complexo negativo OP-esterase é extremamente estável (Figura 2) e resiste à quebra hidrolítica ou reativação promovida por agentes como oximas (GLYNN, 2000). É necessário haver pelo menos 70% de inibição e envelhecimento da ESNp para o desenvolvimento da NRIOP.

Alguns inibidores da ESNp não neuropáticos tais como fosfinatos, carbamatos, tiocarbamatos e sulfonil fluoretos apresentam ambos radicais "R" diretamente ligados ao átomo de fósforo ou carbono (carbamatos e tiocarbamatos). Estes compostos também reagem covalentemente com o centro ativo da esterase, mas não promovem a reação de envelhecimento, consequentemente, esterases inibidas por estes compostos não formam um grupo terminal com carga negativa e são reativados por mecanismos endógenos (GLYNN, 2000; COSTA, 2007). Em estudos realizados por Johnson (1969 e 1993), galinhas pré-tratadas com inibidores da NTE não neuropáticos, posteriormente expostas a OP neuropáticos, foram completamente protegidas da neuropatia gerada por estes OPs. Além disso, houve uma dose limiar e um fator temporal de proteção: pelo menos 30% da ESNp tinha que ser inibida por um inibidor não neuropático, e inibidores da ESNp de ação curta, tais como os carbamatos, conferiram proteção com tempos relativamente curtos até

o nível de inibição ficar abaixo de 30%, mas os inibidores que produziram inibição persistente como o fluoreto de fenilmetilsulfonilo (phenylmethylsulfonyl fluoride – PMSF) levaram a uma proteção duradoura contra os compostos OPs neuropáticos subsequentemente administrados, confirmando que a ESNp é um alvo relevante para a iniciação da NRIOP (JOHNSON, 1969a; JOHNSON e READ, 1993).

A ESNp foi originalmente identificada por Johnson (1969) como alvo dos ésteres OPs, pelos quais, causam a neuropatia retardada em humanos e outros vertebrados (JOHNSON, 1969a). É uma enzima ligada à membrana, com 1327 aminoácidos, pertencente ao grupo das esterases, com peso molecular de 155 kDa, e seu papel fisiológico ainda não está totalmente estabelecido, mas sabe-se que ela está relacionada à homeostase das fosfatidilcolinas. Mais recentemente, a atividade da ESNp vem sendo avaliada com substratos lisofosfolipídicos, mais relevantes em sua função fisiológica. Os lisofosfolipídeos em células saudáveis de mamíferos constituem entre 0,5 e 6% do peso total dos lipídeos. No entanto, em concentrações elevadas, estes lipídeos estão ligados à aterosclerose, a inflamação e hiperlipidemia. Estudos recentes propõem que o papel fisiológico da ESNp possa estar relacionado com a manutenção da fluidez da bicamada lipídica da membrana plasmática e, assim, a atividade normal da ESNp é essencial para a manutenção da membrana neuronal e, consequentemente, a permeabilidade da célula (MUHLIG-VERSEN *et al.*, 2005; GLYNN, 2006; 2007).

Provavelmente, a ESNp apresenta como substratos compostos carboxil ésteres e é inibida pelos ésteres presentes nos OP por um mecanismo de ação geral de uma esterase. O sítio ativo da enzima faz um ataque nucleofílico no acil-carbono do éster. A hidroxila alcoólica é rapidamente liberada e um composto covalente acilenzima é produzido. Este composto é facilmente hidrolisado liberando o ácido carboxílico e a enzima. A ESNp reage de maneira análoga com os OP neuropáticos, porém, neste caso ocorre a clivagem de uma ligação na cadeia P-O-R, P-NH-R ou P-S-R e a perda de R conduz à formação de um resíduo carregado monosubstituído, que permanece ligado à proteína. Este composto negativo é extremamente estável e resiste à ruptura ou a reativação hidrolítica (Figura 2). A taxa de hidrólise do organofosforado-enzima é muito menor do que o acil-enzima, o que torna esta inibição praticamente irreversível. A taxa de envelhecimento da enzima fosforilada depende da natureza do grupo R que é perdido no OP, sendo mais lenta para grupos metil (GLYNN, 2000).



Figura 2 – Possíveis mecanismos de reação entre os praguicidas e a ESNp (JOHNSON, 1975b; RICHARDSON *et al.*, 2013).

1.5 Degeneração do tipo Walleriana

Várias desordens neurodegenerativas provocados por agentes tóxicos demonstram a ocorrência da degeneração do tipo Walleriana, que é uma degeneração axonal. O conceito de degeneração axonal foi inicialmente reportado por Augustus Waller há cerca de cem anos. De acordo com a sequência de eventos que ocorrem na porção distal do axônio, esta degeneração é chamada de axonal tipo Walleriana e se caracteriza pela ativação de proteases cálcio-dependentes (calpaínas) devido à passagem excessiva de cálcio para o meio intracelular. A ativação destas proteases promove a digestão da porção terminal do axônio, o que impede a transmissão do impulso nervoso para a célula pós-sináptica (ANTHONY, 2001). Inicialmente, há um período em que a porção distal do axônio mantém relativa estrutura, transporte e condução normais. A duração deste período latente é proporcional ao tamanho do axônio, sendo os maiores axônios e mais mielinizados os mais afetados. Após este período de manutenção, ocorre então a proteólise que promove digestão do axolema e axoplasma, impedindo a propagação do impulso nervoso (FIGURA 3) (JORTNER *et al.*, 2005).



Figura 3 – Degeneração Walleriana. Digestão da porção terminal do axônio pelas calpaínas devido a entrada excessiva de cálcio.

Embora a inibição e subsequente envelhecimento da ESNp tenham sido propostos como os eventos iniciais da NRIOP, as alterações que ocorrem entre a inibição da ESNp e o aparecimento dos sinais clínicos não estão completamente esclarecidas. O mecanismo proposto é que a inibição da ESNp pelos OPs está associada com um aumento das concentrações de cálcio intracelular e com isso ocorre a ativação das calpaínas (CHOUDHARY e GILL, 2001; EMERICK, PECCININI e DE OLIVEIRA, 2010). Este aumento pode ativar quinases Ca+2/dependentes levando à aberrante fosforilação de proteínas do citoesqueleto, o que é um fato comum em muitos processos neurodegenerativos (SCHLAEPFER e BUNGE, 1973).

As proteases cálcio dependentes intracelulares possuem várias funções na regulação dos diversos sistemas celulares. Dentre elas estão as calpaínas, que apresentam como principais funções a degradação de proteínas do citoesqueleto, modificação de receptores de esteróides e a ativação de proteínas quinases. Já está estabelecido que existem, no mínimo, dois tipos de calpaínas. Um tipo requer concentrações de cálcio na ordem de mM para sua atividade, enquanto que o outro tipo requer concentrações de cálcio na ordem de strutural e funcional, haja visto que também estão envolvidas na patogênese de algumas doenças, como câncer e distrofia muscular do tipo 2A.

Concentrações elevadas de cálcio nas células resulta na ativação das calpaínas, que leva à proteólise descontrolada tanto de proteínas alvo como das não-alvo, levando a danos teciduais irreversíveis. Uma grande quantidade de calpaína ativa que degrada componentes do citoesqueleto como espectrina, subunidades dos microtúbulos, proteínas associadas aos microtúbulos e neurofilamentos, podendo causar danos em canais iônicos, moléculas de adesão celular, outras enzimas e receptores das membranas celulares (CASTILLO e BABSON, 1998; LIU, LIU e WANG, 2008).

1.6 O papel dos organofosforados na diferenciação neuronal: neuritogênese, proteínas de citoesqueleto e proteínas relacionadas à neuroplasticidade

Embora a inibição e subsequente envelhecimento da ESNp tenham sido propostos como os eventos iniciais da NRIOP, e vários mecanismos tenham sido propostos, a sequência de eventos que ocorrem entre a inibição da ESNp por OP neuropáticos e o aparecimento dos sinais clínicos não foi ainda completamente elucidada (JORTNER, 2010).

Além da inibição e envelhecimento da ESNp, outros eventos chave que levam à expressão clínica da NRIOP incluem a disruptura da rede de neurofilamentos do citoesqueleto axonal, que é uma característica comum de várias neuropatias quimicamente induzidas. Vários estudos relatam que os OPs neuropáticos são capazes de causar um aumento na fosforilação de proteínas do citoesqueleto, incluindo neurofilamentos, proteínas associadas à microtúbulos (MAPs), tubulina, e F-actina (ABOU-DONIA, LAPADULA e SUWITA, 1988; ABOU-DONIA, 1993; SACHANA *et al.*, 2003).

A função do sistema nervoso depende de uma complexa arquitetura das redes neuronais. A germinação e alongamento de axônios e dendritos no momento e direção correta forma uma base de conectividade neuronal adequada, e consequentemente um bom funcionamento do cérebro. Apesar de uma ampla variedade de formas neuronais no cérebro em desenvolvimento, o surgimento inicial de um neurito – uma extensão cilíndrica com um cone de crescimento na ponta distal que não possui características claras de um axónio ou um dendrito – pode ser observado para todos os neurônios de maneira similar, ocorrendo a quebra da forma original com a formação de um broto, que se transformará em um neurito, que se desenvolverá em um axônio ou dendrito (FIGURA 4) (DA SILVA e DOTTI, 2002). A neuritogênese é dependente de vários componentes do citoesqueleto. O crescimento de neuritos é uma expressão morfológica de diferenciação neuronal que produz uma polaridade funcional e estrutural que leva ao crescimento de axônios e dendritos (SMITH, 1988; BRADKE e DOTTI, 1997).



Figura 4 — Figura retirada do artigo publicado por (DA SILVA e DOTTI, 2002). A) imagens de contraste de fase mostrando as fases iniciais de neuritogênese em culturas de neurônios do hipocampo de embriões de rato. A esfera neuronal é quebrada e ocorre a formação de brotos com o início da formação dos neuritos (seta azul). Ocorre então a extensão dos neuritos com polarização morfológica para a formação de axônios e dendritos. Neste
exemplo, o axônio parece desenvolver-se a partir do primeiro broto, mas na maioria dos casos não existe uma correlação direta. B) Representação esquemática da formação dos neuritos.

A maioria das células animais possui três tipos de filamentos do citoesqueleto responsáveis por sua organização espacial e propriedades mecânicas. São eles os filamentos intermediários, que proporcionam resistência mecânica; os microtúbulos, que determinam o posicionamento de organelas delimitadas por membranas e direcionam o transporte intracelular; e os filamentos de actina, que determinam a forma da superfície celular e são necessários à locomoção da célula como um todo. Existem centenas de moléculas acessórias que tanto interligam os filamentos entre si quanto os conectam aos outros componentes celulares. Os filamentos intermediários são formados por subunidades que são, por si só, fibrosas e longas, enquanto os filamentos de actina e microtubulos são formados por actina e tubulina respectivamente, que são subunidades compactas e globulares (ALBERTS, 2010).

Os principais elementos do citoesqueleto dos quais a neuritogênese é dependente são os neurofilamentos (NFS), microtúbulos e proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs). Os axônios maduros nas células neuronais contêm uma elevada densidade de proteínas NFS, que são filamentos intermediários do citoesqueleto neuronal e são divididas em três grupos de acordo com seu peso molecular em NF-68, 160 e NF-NF-200 kDa. O neurofilamento de 200 kD (NF-200) é um marcador axonal e de diferenciação neuronal muito útil na imunocitoquímica (ABOU-DONIA, LAPADULA e SUWITA, 1988; ABOU-DONIA, 1993; CHO e TIFFANY-CASTIGLIONI, 2004; BUTTIGLIONE *et al.*, 2007).

Neurônios expressam altos níveis da proteína 43 associada ao crescimento (GAP43) durante o axogênese e sinaptogênes. Esta proteína é um dos principais constituintes dos cones de crescimento dos axônios centrais e periféricos e é expressa durante o crescimento axonal, regeneração, e modula a formação de novas conexões. Alguns estudos sugerem que a GAP43 pode estar envolvida em sinais intra e extracelulares para regular a organização do neuroesqueleto nas terminações nervosas e também pode influenciar o estado de crescimento do terminal pré-sináptico através de uma associação com proteínas do citoesqueleto (SHEA *et al.*, 1991; BENOWITZ e ROUTTENBERG, 1997; CHO e TIFFANY-CASTIGLIONI, 2004). Os neurônios em crescimento, *in vivo* ou *in vitro*, expressam níveis elevados de GAP-43 coincidente com o início do crescimento de neuritos (DANI, ARMSTRONG e BENOWITZ, 1991; DAS, FREUDENRICH e MUNDY, 2004).

Duas proteínas associadas a vesículas sinápticas, sinapsina e sinaptofisina, estão associadas com a sinaptogênese e podem sofrer a interferência dos OPs. A sinaptofisina é um marcador terminal associada à vesícula pré-sináptica, enriquecida em espinhas dendríticas, e está fortemente implicada na plasticidade sináptica, a função cognitiva e sinaptogênese. O aumento da sinaptofisina poderá indicar a formação de vesículas sinápticas, indicando um aumento de vesículas sinápticas já existentes, ou a formação de novos terminais nervosos (BROWNING et al., 1993; ZHANG et al., 2014). As sinapsinas são fosfoproteinas associadas às vesículas sinápticas que regulam exocitose de vesículas sinapticas e podem estar envolvidos na sinaptogênese. Alguns estudos sugerem que a sinapsina I e sinapsina II são proteínas ligadas à ATP que são regulados pela ligação Ca2+/calmodulina e modulam a neurossecreção por interação com a actina do citoesqueleto. A sinapsina I é a mais abundante de todas as fosfoproteínas neuronais e quando desfosforilada está ligada às vesículas sinápticas, ancorando-as ao citoesqueleto do terminal nervoso. A fosforilação da sinapsina I induz a sua liberação da actina, ocorrendo um aumento do número de vesículas disponíveis para fusão com a membrana e exocitose (BROWNING et al., 1993; CECCALDI et al., 1995; CARLSON e EHRICH, 2001; ZHANG et al., 2014). Ambas proteínas, sinapsina e sinaptofisina, aumentam em nível com a formação de sinapses maduras em culturas de células em desenvolvimento.

1.7 O organofosforado triclorfom

Desde 1952, o OP triclorfom (2,2,2-tricloro-1-hidroxietil dimetil fosfonato) (Figura 3) tem sido utilizado em larga escala como inseticida para aumento da produção agrícola e também no controle de vetores transmissores de doenças, devido à sua atividade inibidora da acetilcolinesterase (AChE) dos insetos. É utilizado para a aplicação em partes aéreas de culturas de algodão, amendoim, batata, cacau, café, cana-de-açúcar, cereais, forragens, frutos, girassol, hortaliças, leguminosas, pastagens e soja (ANVISA, 2012).



Figura 5 — Estrutura química do organofosforado triclorfom.

Na medicina veterinária, tem sido utilizado, por via oral ou injetável, contra ecto e endoparasitas. Na medicina humana, sob a denominação de metrifonato, o triclorfom foi utilizado na década de 90 em ensaios clínicos para o tratamento sintomático da doença de Alzheimer, bem como no tratamento da esquistossomose (LIU, CHANG e WU, 2009).

A doença de Alzheimer (DA) é associada a uma série de alterações genéticas, neuropatológicas, e neurofisiológicas, sendo que as anormalidades nos sistemas cerebrais que utilizam acetilcolina são consideradas características da doença. Várias abordagens terapêuticas foram desenvolvidas ao longo dos últimos 20 anos com o objetivo de reparar o funcionamento do sistema colinérgico dos portadores de DA. A inibição da acetilcolinesterase, enzima responsável pela degradação da acetilcolina, vem se mostrando uma estratégia eficaz (SMALL e BULLOCK, 2011). O metrifonato (triclorfom) é um potente inibidor da AChE e os sinais e sintomas clínicos associados à intoxicação aguda são atribuídos ao acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas. Além de efeitos colinérgicos agudos, este composto é capaz de causar uma síndrome neuropática retardada progressiva (quando administrado em galinhas), chamada de neuropatia retardada induzida por OP (NRIOP), bem como sintomas psiguiátricos crônicos que persistem por anos após a exposição (OLAJOS et al., 1979). Dentre os sinais e sintomas, pode-se citar debilidade progressiva, que atinge inicialmente as pernas, evoluindo para atrofia distal dos músculos e, nos casos mais graves, provoca paralisia geral, problemas respiratórios e morte (JOHNSON e GLYNN, 1995).

Em um estudo publicado por (BECKER *et al.*, 1996; 1998) foi notada boa tolerância ao metrifonato no tratamento de pacientes com DA sendo que 91% completaram as 30 semanas de tratamento. Os resultados sugeriram que o anticolinesterásico apresentou efeito benéfico sobre o comportamento de pacientes com DA (INOUYE, 2004). Por outro lado, um estudo experimental realizado em galinhas, associou a administração de altas doses do triclorfom à NRIOP, sempre

precedida por forte crise colinérgica (Johnson, 1975b). Adicionalmente há relatos de casos de neuropatia retardada em pacientes intoxicados com triclorfom (VASILESCU, ALEXIANU e DAN, 1984; MORETTO, NICOLLI e LOTTI, 2005). Embora o triclorfom cause inibição da acetilcolinesterase (AChE) e, consequentemente, acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas (JOHNSON, 2000), outros mecanismos de toxicidade têm sido propostos.

Estudos indicam que o triclorfom pode induzir toxicidade via produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e depleção de sistemas antioxidantes, acarretando um estado conhecido com estresse oxidativo, caracterizado por um desequilíbrio entre a formação excessiva de ERO e uma limitada defesa antioxidante (EHRICH e CORRELL, 1998; DROGE, 2002; KARADEMIR CATALGOL, OZDEN e ALPERTUNGA, 2007). As espécies reativas de oxigênio são geradas principalmente nas mitocôndrias e incluem: radical ânion superóxido (O₂•⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxila (•OH). Este último altamente reativo pode reagir com macromoléculas biológicas susceptíveis e causar peroxidação lipídica, danos ao DNA e oxidação de proteínas (THOMAZ *et al.*, 2009).

1.8 Neuroproteção

1.8.1 Bloqueadores de canais de cálcio

Como um aumento excessivo do cálcio intracelular é um evento chave no desenvolvimento da NRIOP, bloqueadores dos canais de cálcio podem melhorar os sintomas desta neuropatia (EL-FAWAL *et al.*, 1990; WU e LENG, 1997; CHOUDHARY e GILL, 2001; CHOUDHARY *et al.*, 2006; EMERICK, PECCININI e DE OLIVEIRA, 2010; EMERICK, EHRICH, *et al.*, 2012). O cálcio é reconhecido por ser um sinalizador intracelular responsável pelo controle de vários processos. Ele é um segundo mensageiro fundamental envolvido na aprendizagem, memória, fertilização, proliferação, desenvolvimento, diferenciação, contração muscular, transcrição de genes, transmissão de sinais às células nervosas, liberação de neurotransmissores, coagulação do sangue, manutenção das membranas celulares e secreção. No entanto, um desequilíbrio na homeostase do cálcio por uma sobrecarga de cálcio intracelular ou distúrbios em compartimentalização intracelular pode fazer com que ocorra toxicidade para as células (ORRENIUS, NICOTERA e ZHIVOTOVSKY, 2011). A desregulação dos processos que o cálcio participa, bem

como as alterações associadas à atividade dos canais de cálcio têm sido associadas a vários tipos de perturbações neurológicas, incluindo epilepsia, enxaqueca e dor crónica (BERRIDGE, LIPP e BOOTMAN, 2000; SIMMS e ZAMPONI, 2014).

Existem diferentes tipos de estruturas proteicas que permitem o fluxo de íons Ca²⁺ através de membranas, como por exemplo, os canais de cálcio dependentes de voltagem, os canais de cálcio dependentes de ligando e outros transportadores de cálcio como trocadores Na⁺/Ca⁺².

Os canais para Ca²⁺ dependentes de voltagem permitem a entrada deste íon na célula, em resposta à despolarização da membrana, de forma que esses cátions possam exercer suas funções sobre processos fisiológicos tais como a secreção de hormônios e neurotransmissores, regulação da atividade de canais iônicos, controle da secreção de enzimas, expressão gênica, proliferação, morte celular e apoptose (CATTERALL e FEW, 2008). Uma variedade de canais iônicos dependentes de voltagem está envolvida na homeostase do cálcio. Esses canais são membros de uma superfamília de proteínas transmembrana formada por diferentes subunidades, que incluem também canais de K⁺ e Na⁺ dependentes de voltagem (BERRIDGE, LIPP e BOOTMAN, 2000).

Os compostos classificados como bloqueadores dos canais de cálcio atualmente são os medicamentos mais prescritos para o tratamento das doenças cardiovasculares. Estes compostos têm sido utilizados com eficácia no tratamento da hipertensão arterial, da insuficiência coronária, de certas arritmias cardíacas e, ainda, em doentes com disfunção diastólica ventricular esquerda e enxaqueca. Estudos têm demonstrado também seu papel na proteção de danos neuronais como cerebral. excitotoxicidade е danos isquemia causados por desordens neurodegenerativas, como o declínio funcional e cognitivo relacionado à idade (PRINGLE et al., 1996; WILDBURGER et al., 2009). Uma grande variedade de bloqueadores de canais de cálcio tem sido avaliados por sua habilidade em conferir neuroproteção através da melhora no fluxo sanguíneo cerebral ou redução da sobrecarga de cálcio induzida pela liberação massiva de glutamato na isquemia cerebral (KOBAYASHI e MORI, 1998; AURIEL e BORNSTEIN, 2010).

 a) Canais para Cálcio Dependentes de Voltagem tipo – L (corrente elétrica de longa duração). Os canais de cálcio tipo L são ativados por uma forte despolarização; a despolarização tem pouco efeito sobre a sua inativação. Localizam-se no músculo esquelético, músculo cardíaco, cérebro e retina. O seu principal papel no músculo é o acoplamento excitação – contração, permitindo a entrada do Ca²⁺ extracelular para o sarcoplasma. A subida da [Ca²⁺]i subsequente à ativação dos canais tipo L estimula a contração quer diretamente (por fixação do Ca²⁺ à troponina C), quer indiretamente (através da ativação dos receptores rianodínicos, com consequente aumento do Ca²⁺ mioplasmático, graças à sua libertação das reservas intracelulares) (MUKHERJEE e SPINALE, 1998). A estrutura protéica do canal de cálcio tipo L é bem reconhecida. Este canal é composto por várias subunidades, incluindo alfa1, alfa2, beta e delta (a gama existe apenas no músculo esquelético). Todos os bloqueadores de canais de cálcio ligam-se à subunidade alfa1 (LIPSCOMBE, HELTON e XU, 2004).

Nos neurônios, os canais do tipo L estão localizados principalmente nos corpos celulares e dendritos, regiões onde eles são peças vitais no direcionamento da excitabilidade eléctrica para o controle da transcrição de genes cálcio dependentes. Alguns canais do tipo L também estão envolvidos na liberação por exocitose de células endócrinas e neurónios especializados, tais como fotorreceptores. Estes canais requerem geralmente grandes despolarizações para serem ativados,, embora possam ativar-se em potenciais mais negativos em células cromafins, neurônios sensoriais, fotorreceptores e células cardíacas. Além do mais, as correntes tipo L são inativadas rapidamente através de um processo de feedback negativo dependente de Ca²⁺ que ajuda a controlar a sinalização dependente de Ca²⁺ e proteger contra uma sobrecarga tóxica de Ca²⁺ na célula (GEORGE, GLASS e GRIFFIN, 1995; DURANTE *et al.*, 2004; SIMMS e ZAMPONI, 2014).

Os canais de cálcio tipo L são conhecidos por sua sensibilidade a várias classes de moléculas orgânicas amplamente utilizadas no tratamento clínico da hipertensão, angina e vasoespasmos cerebrais. Estas classes incluem as 1,4-dihidropiridinas (nifedipino, anlodipino, felodipino, isradipino, nicardipino, nisoldipino, e nimodipino), fenilalquilaminas (verapamil) e benzotiazepinas (diltiazen), que interagem alostericamente em sítios de ligação distintos na subunidade $\alpha 1$ e bloqueiam a atividade do canal.

O bloqueador de canais de cálcio voltagem-dependente nimodipino, pertencente à classe das dihidropiridinas, é amplamente utilizado no tratamento de

hipertensão e angina pectoris e tem sido caracterizado como um agente neuroprotetor em uma variedade de modelos de isquemia neuronal *in vitro* (GOLDBERG e CHOI, 1993; PISANI *et al.*, 1998) e em modelos animais *in vivo* de acidente vascular encefálico (HORN *et al.*, 2001; BABU e RAMANATHAN, 2011). No caso da NRIOP, o nimodipino já demonstrou ser capaz de proteger a fosforilação de proteínas de citoesqueleto após a administração de OPs neuropáticos como diclorvos e tri-orto-cresil-fosfato (CHOUDHARY e GILL, 2001; CHOUDHARY *et al.*, 2006; EMERICK, PECCININI e DE OLIVEIRA, 2010; EMERICK, EHRICH, *et al.*, 2012).

b) Canais para Cálcio Dependentes de Voltagem tipo – T (corrente elétrica transitória).

Os canais de cálcio do tipo T pertencem ao grupo dos canais ativados por baixa voltagem, e são fortemente bloqueados pelo níquel e mibefradil. Este tipo de canal está presente no cérebro, musculo liso, musculo esquelético e tecido nervoso periférico, e sua abertura é realizada em potenciais muito negativos, que este entre - 70 e -60mV, e sua inativação é voltagem dependente (LACINOVA, 2011). Devido às suas propriedades biofísicas e expressão generalizada, os canais do tipo T controlam funções-chave como picos de baixo limiar, a atividade das células oscilatórias, contração muscular, liberação hormonal e de neurotransmissores, crescimento celular, diferenciação e proliferação (CARBONE, CALORIO e VANDAEL, 2014). Estes canais desempenham um papel em determinadas patologias, incluindo hipertensão, insuficiência cardíaca, perturbações do sono, epilepsia, toxicodependência e dor neuropática. Além disso, eles também podem estar envolvidos na modulação de padrões de disparo dos neurónios, que é importante para o processamento de informações, bem como em processos de crescimento celular (ARNOULT, VILLAZ e FLORMAN, 1998; LACINOVA, 2011).

A manipulação farmacológica dos canais do tipo T tem sido recentemente possível utilizando-se o mibefradil, o protótipo de uma nova classe de bloqueadores tipo T seletivo. Em uma variedade de situações fisiopatológicas experimentais e clínicas, o bloqueio dos canais do tipo T demonstrou ser benéfico. Em ensaios clínicos, o mibefradil demonstrou ser um eficaz anti-hipertensivo, anti-angina e agente anti-isquêmico (OPARIL *et al.*, 1997; HOGLUND *et al.*, 1998; LEVINE *et al.*,

2000), e foi utilizado no tratamento da hipertensão e angina, porém, foi retirado do mercado devido a interações desfavoráveis com outras drogas (MIWA *et al.*, 2011).

A amilorida é um diurético poupador de potássio que foi aprovado para o uso clínico pela primeira vez em 1967, e é utilizada para hipertensão e insuficiência cardíaca congestiva por agir em canais de sódio nos túbulos renais (GARTY e BENOS, 1988). Além disso, ela vem sendo utilizada como ferramenta farmacológica para distinguir os canais do tipo T nativos dos canais ativados por alta voltagem. Estudos já demonstraram que a amilorida bloqueia canais de cálcio do tipo T em células de neuroblastoma de ratos, células de Purkinje caninas e neurônios do gânglio dorsal de galinhas (TANG, PRESSER e MORAD, 1988; HIRANO, FOZZARD e JANUARY, 1989; TYTGAT, VEREECKE e CARMELIET, 1990).

1.8.2 Análogo do GLP-1 (glucagon-like peptide 1) Liraglutida

O GLP-1 é um neuropeptídeo e uma incretina (substâncias produzidas pelo pâncreas e pelos intestinos e que regulam o metabolismo da glicose) produzido nas células-L endócrinas do intestino, sua maior fonte na periferia, por processamento diferencial do proglucagon, gene que é expresso nestas células. Um único gene codifica o proglucagon em espécies de mamíferos, e mRNAs idênticos são produzidos no pâncreas e intestinos. As diferenças nos produtos do proglucagon nestes tecidos são, por conseguinte, devido ao processamento pós-traducional do proglucagon que é tecido-específico (MACLUSKY *et al.*, 2000). O gene do proglucagon é também expresso em certos neurônios do núcleo do trato solitário, no tronco cerebral.

O GLP-1 é um hormônio hipoglicemiante potente, que estimula as células β pancreáticas a liberar insulina em resposta a um aumento da glicose sanguínea, assim como suprime a secreção de glucagon. Esse efeito pode-se dar a partir do aumento de GLUT2 (transportador da glicose) na membrana plasmática das células beta, o que aumenta o influxo de glicose para o interior dessas células ou pelo aumento da atividade da glicoquinase, responsável pela fosforilação da glicose nas células. Esta ação dependente da glicose vem atraindo a atenção para a utilização desta substância no tratamento do diabetes do tipo-2, pois uma liberação desregulada de insulina quando as concentrações de glicose sanguínea estão normais ou injeções de insulina administradas incorretamente podem causar uma

queda perigosa da glicemia, causando uma hipoglicemia, e o GLP-1 não estimula a liberação de insulina no sangue em condições normais da glicemia (HOLST *et al.*, 1987; HOLST e GROMADA, 2004; DRUCKER e NAUCK, 2006). Assim, alguns medicamentos que tem como princípios ativos substâncias análogas ao GLP-1 vêm sendo desenvolvidos e utilizados na clínica para o tratamento do diabetes do tipo 2. Atualmente, três desses análogos estão no mercado e são prescrito para diabéticos tipo 2, a exendina-4 (Byetta®), liraglutida (Victoza®) e lixisenatida (Lyxumia®) (MADSBAD *et al.*, 2008; VILSBOLL, 2009; CHRISTENSEN *et al.*, 2011).

mecanismos Enquanto os exatos pelos quais as desordens neurodegenerativas se desenvolvem não são completamente esclarecidos, existem fatores de risco que podem aumentar a probabilidade de desenvolver estas condições, e o diabetes tipo 2 é uma dessas. Nesta condição, a sinalização da insulina é prejudicada e não há a possibilidade de controlar a glicemia após uma refeição. O diabetes tipo 2 tem sido identificado como fator de risco para doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer e doença de Parkinson, indicando que a deficiência na sinalização da insulina pode ser um fator na iniciação ou aceleração do processo neurodegenerativo (MOROO et al., 1994; RISTOW, 2004; STRACHAN, 2005; HAAN, 2006; AVILES-OLMOS et al., 2013).

Em muitos estudos pré-clínicos foi observado que o análogo do GLP-1 liraglutida pode atravessar a barreira hemato-encefálica e tem efeitos neuroprotetores como proteção da formação da memória em modelo *in vivo* de doença de Alzheimer (DA), proteção da plasticidade sináptica, proteção contra a perda sináptica, redução da formação de placas amiloides na DA, normalização da neurogênese e redução da resposta inflamatória cerebral (MCCLEAN *et al.*, 2010; HUNTER e HOLSCHER, 2012; HAN *et al.*, 2013).

1.8.3 Inibidor de calpaínas MDL28170

A calpaína é uma cisteína protease citosólica sensível ao cálcio que, quando super estimulada, tem sido ligada a uma variedade de desordens degenerativas. Ela está presente na maioria das células de mamíferos e várias isoformas já foram identificadas. Durante períodos fisiológicos normais, as calpaínas possuem baixos níveis de atividade e ajudam na manutenção do citoesqueleto e na regulação de quinases, fatores de transcrição e receptores. Porém, quando excessivamente ativadas elas levam à proteólise de várias proteínas, incluindo receptores, proteínas de ligação a calmodulina, enzimas ligadas à transdução de sinal, fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto. Dos muitos substratos que as calpaínas clivam no cérebro e tecidos periféricos, as proteínas do citoesqueleto, como a α-espectrina, têm sido identificadas como principais alvos destas enzimas. Esta clivagem de proteínas do citoesqueleto leva a uma ruptura do transporte axonal e colapso estrutural, culminando em lesão axonal secundária e, possivelmente, a morte celular. (FOX *et al.*, 1993; BAHR *et al.*, 1995; INOMATA *et al.*, 1996; KAMPFL *et al.*, 1997; WANG e YUEN, 1997).

Como a hipótese do desenvolvimento da NRIOP é de que ocorre uma entrada excessiva de cálcio com consequente ativação das proteases cálcio dependentes (calpaínas) que digerem proteínas do citoesqueleto levando a degeneração das porções terminais dos axônios, a utilização de um inibidor de calpaínas poderia ser útil na atenuação do desenvolvimento desta desordem neurodegenerativa. O aldeído dipeptídeo MDL 28170 (carbenzoxi-valil-phenilalanial, inibidor de calpaina III) é capaz de penetrar rapidamente no cérebro e é eficaz em inibir a proteólise celular mediada pelas calpaínas. Ele é um composto peptídico curto, hidrofóbico, com ausência de resíduos carregados, sendo assim, capaz de penetrar nas membranas por difusão passiva (MEHDI, 1991; KAWAMURA *et al.*, 2005), conseguindo atravessar a barreira hemato-encefálica.

Vários estudos vêm demonstrando que o MDL 28170 possui um papel neuroprotetor em inúmeros modelos de roedores com traumas neuronais, incluindo lesão de medula espinhal, lesão neuronal neonatal hipóxico-isquêmica, isquemia cerebral focal e vem demonstrando causar uma melhora em quadros de injúria axonal em modelos de traumatismo craniano (MARKGRAF *et al.*, 1998; ARATAKI *et al.*, 2005; KAWAMURA *et al.*, 2005; YU e GEDDES, 2007; YU, JOSHI e GEDDES, 2008; THOMPSON *et al.*, 2010).

2 JUSTIFICATIVA

Há relatos de muitos casos de NRIOP após intoxicação com triclorfom, um praguicida OP utilizado em larga escala no Brasil. Embora alguns eventos tenham sido associados ao desenvolvimento da NRIOP, os mecanismos envolvidos ainda não foram completamente elucidados. Assim, o presente estudo propõe um melhor entendimento destes mecanismos e adicionalmente a avaliação de quatro compostos (amilorida, nimodipino, liraglutida e MDL 28170) com potencial de interferir em eventos distintos que possivelmente estariam associados aos efeitos tóxicos irreversíveis dos OPTais informações contribuirão para a melhoria da qualidade de vida de trabalhadores rurais expostos ao triclorfom e a outros praguicidas OP. O estudo propõe ainda um modelo de avaliação de neurotoxicidade/neuroproteção *in vitro*, abolindo o sacrifício excessivo de galinhas (modelo animal para este tipo de avaliação) em estudos mecanísticos com OPs.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo avaliar, in vitro, os mecanismos pelos quais os praguicidas OPs Triclorfom, Mipafox e Paraoxon induzem neurotoxicidade, bem como o estudo de um possível mecanismo de ação neuroprotetora de 4 compostos incubados juntamente com o OP mipafox, reconhecidamente indutor da NRIOP : (i) amilorida, (ii) nimodipino, (iii) MDL 28170, e (iv) liraglutida.

Para alcançar tais objetivos, foram propostas as seguintes estratégias:

 a) Desenvolver um modelo *in vitro* (usando células SH-SY5Y de neuroblastoma humano) para avaliação do mecanismo de ação tóxica de OP neuropáticos, utilizando o mipafox como controle positivo (neuropático) e o paraoxon como controle negativo (não neuropático);

b) Evidenciar se os praguicidas triclorfom, mipafox e paraoxon são capazes de induzir a inibição e o envelhecimento de mais de 70% da ESNp, aplicando um protocolo previamente desenvolvido (JOHNSON, BIRD e MEREDITH, 1988) e modificado (NOSTRANDT e EHRICH, 1992).

c) Verificar a razão IC50 da ESNp/IC50 da AChE para o triclorfom e comparar as razões obtidas com o mipafox (neuropático) e o paraoxon (não-neuropático).

c) Investigar alterações na viabilidade celular (MTT e LDH), nos níveis de cálcio intracelular, na ativação de calpaínas, no crescimento de neuritos, na concentração de proteínas sinápticas, na concentração de proteínas de citoesqueleto, na indução de necrose e apoptose, alterações em marcadores de inflamação (IL-1β e IL-6) e captação de glicose em células SH-SY5Y tratadas com concentrações de triclorfom, mipafox e paraoxon capazes de gerar pelo menos 70% da inibição da ESNp.

 d) Investigar a possível inibição dos efeitos do OP neuropático mipafox na presença de substâncias potencialmente neuroprotetoras (amilorida, nimodipina, MDL 28170 e liraglutida).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Foram utilizados reagentes de grau P.A. obtidos dos seguintes fabricantes: Dodecil sulfato de sódio (SDS), tris hidroximetil amino metano (TRIS), soro albumina bovina (BSA), etil paraoxon, coomassie brilhante blue G-250%, 2-mercaptoetanol, ditiotreitol (DTT), triclorfom, cloreto de cálcio, cloridrato de amilorida, caseína de leite bovino, ácido fosfórico 85%, 2-isonitrosoacetofenona (INAP), fluoreto de benzenosulfonila, 4-aminoantipirina, iodeto de propídio, ácido 5,5-ditio-bis(2nitrobenzóico) (DTNB), MDL 28170, 3 - [4,5 dimetiltiazol-2-il] -2,5-difenil-tetrazólio (MTT) e todos os anticorpos utilizados nas análises por western blott e imunofluorescência, da Sigma-Aldrich® (St Louis, MO, USA). Os reagentes para western blott foram obtidos Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). Ferricianeto de potássio, citrato de sódio, sulfato de sódio anidro, bicarbonato de sódio, dimetilformamida, azida sódica, dimetilsulfóxido (DMSO) e etanol, da Merck (Darmstadt, Alemanha). N,N-di-isopropilfosforamidofluridato (mipafox) e fenilvalerato, da Oriza®. Triton X-100 e etanol 95%, Vetec-Química (Rio de Janeiro, Brasil). Ácido retinoico da Bioflora manipullarium (Ribeirão Preto). Cloreto de sódio, ácido clorídrico, fosfato bibásico de sódio e hidróxido de sódio, da Labsynth. Etilenodiamino-tetra acetato de sódio (EDTA), da Reagen® e acetona, da Qhemis®. Líquido de cintilação Última Gold™ e Solvable da PerkinElmer, Inc.

As soluções de organofosforados foram preparadas em etanol absoluto e diluídas pelo menos 100x para incubação com as células, de modo que a concentração final de etanol no meio de cultura não ultrapassasse 1% (Ehrich et al., 1997). Para o preparo das demais soluções foi utilizada água do Tipo I (ultra-pura) obtida em sistema de purificação Milli-Q Gradiente (Millipore, Bedford, USA).

4.2 Preparo de Soluções

O preparo das soluções utilizadas em todos os experimentos e no cultivo das células está descrito nos tópicos de 4.2.1 a 4.2.27.

4.2.1 Tampão salina fosfato (PBS) pH 7,2 a 25°C

8,77 g de cloreto de sódio 21,3 g de fosfato bibásico de sódio HCI (6 N) qsp.....pH 7,2 a 25°C Água qsp.....1000,0 mL

4.2.2 Tampão Tris 50 mM - EDTA 0,2 mM HCl pH 8,0 a 25°C

6,06 g Tris 0,075 g EDT/A HCI (6 N) qsp.....pH 8,0 a 25°C Água qsp.....1000,0 mL

4.2.3 Tampão citrato-Tris 50mM pH 6,0 a 25°C

1,47 g Citrato de sódio 0,61 g Tris HCI (6 N) qsp.....pH 6,0 a 25°C Água qsp.....100,0 mL

4.2.4 Fenilvalerato Dispersante

A) Fenilvalerato (d=1,04 g/mL; PM=178,22; PE=101°C).

150,0 mg (0,144 mL) de fenilvalerato é diluído com 10,0 mL de dimetilformamida (DMF).

B) Triton X-100:

0,3 mL de triton X-100 é diluído com água até o volume de 1000 mL.

Mistura-se A e B na proporção de 1:30 no momento de uso.

4.2.5 4-aminoantipirina (4-AAP) 0,02% e Dodecilsulfato de sódio (SDS) 5%

0,02 g de 4-AAP 5,0 g de SDS Tampão Tris-EDTA pH 8,0 qsp......100,0 mL

4.2.6 Ferricianeto de Potássio K3Fe(CN)6 0,40%

0,40 g de K₃Fe(CN)₆ dissolvido em 100 mL de água destilada.

4.2.7 Solução de Azul Brilhante para determinação de proteínas

100,0 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 devem ser dissolvidos em 50,0 mL de álcool etílico 95%. Acrescenta-se 100,0 mL de ácido fosfórico 85% e dilui-se para 1000,0 mL com água destilada.

4.2.8 Reagente Bio Rad para determinação de proteínas

Diluir o reagente 5 vezes com água antes do uso

4.2.9 Solução padrão de soro albumina bovina (BSA) (500µg/mL)

5,0 mg de BSA deve ser dissolvido em 10,0 mL de água destilada já contendo 0,05 mg de azida sódica.

4.2.10 Solução padrão de soro albumina bovina (BSA) (1000µg/mL)

10,0 mg de BSA deve ser dissolvido em 10,0 mL de água destilada já contendo 0,05 mg de azida sódica.

4.2.11 Solução salina 0,9%

4,5 g de NaCl dissolvido em 500 mL de água.

4.2.12 Tampão fosfato (0,1 M de fosfato de sódio, pH 8,0 e pH 7,0)

1^a) Preparar 100 mL de uma solução 12,0 g/L de fosfato monobásico de sódio (0,1M) em H2O.

-1,2 g fosfato monobásico de sódio;

H2O qsp100 mL

2^a) Preparar 1000 mL de uma solução 14,2 g/L de fosfato dibásico de sódio em H2O.

Pesa-se 14,2 g de fosfato dibásico de sódio;

H2O qsp1000 mL

Misturar estas soluções na proporção de 55 partes da 1^a com 945 partes da 2^a para obter o tampão de pH 8,0; e na proporção de 39 partes da 1^a com 61 partes da 2^a para obter o tampão de pH 7,0.

pH 8,0: preparar 900 mL.

pH 7,0: preparar 100 mL.

Solução	900 mL Tampão pH 8,0	100 mL Tampão pH 7,0
Fosfato monobásico 12 g/L	49,5 mL	39 mL
Fosfato dibásico 14,2 g/L	850,5 mL	61 mL

4.2.13 Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB 10,3 mM)

- Pesar 0,082 g DTNB
- Tampão fosfato pH 7,0 qsp......20 mL.

4.2.14 Acetiltiocolina (ATCh 10,7 mM)

- Pesar 0,031 g de ATCh
- Tampão fosfato pH 8,0 qsp.....10 mL.
- Preparar no momento da análise.

4.2.15 Solução de KCI em tampão Tris-EDTA, pH 8,5

- Pesar 0,0745g de KCl
- Tampão Tris-EDTA pH 8,0 qsp......40mL
- Dissolver o KCI no tampão e acertar o pH para 8,5.

4.2.16 Tampão PCD (protease cálcio-dependente) (20 mM tris; 5 mM EDTA; 10 mM 2-mercaptoetanol)

4.2.17 Tampão caseína (0,5 mg/mL de caseína; 20 mM DTT; 50 mM tris; 4 mM CaCl2)

0,05 g de caseína 0,309 g de ditiotreitol (DTT) 0,606 de tris 0,044 g de CaCl2 HCl (6 N) qsp pH 7,5 H₂O qsp100 mL.

4.2.18 Gradientes de NaCl em tampão PCD

a) 0,150 M: Pesou-se 0,44 g de NaCl Misturou-se com 50 mL de tampão PCD b) 0,200 M: Pesou-se 0,58 g de NaCl Misturou-se com 50 mL de tampão PCD

4.2.19 Preparo de meio de cultura F12 HAM

5,3g de meio em pó
2,08g de HEPES
0,588g de bicarbonato de sódio
NaOH (1N) qsppH 7,2
H₂O qsp500mL

4.2.20 Preparo de TBS e TTBS 1x

TBS1x: 10 mL de TBS concentrado (10X) H₂O qsp......1000mL TTBS 1X: Foi adicionado 0,1% de Tween 20 em TBS 1x

4.2.21 Tampão de Eletroforese (Tris-Glicina/SDS)

100mL de tampão concentrado H2O qsp.....1L

4.2.22 Tampão de Transferência (Tris-Glicina)

100mL de tampão concentrado 200mL de metanol H2O qsp.....1L

4.2.23 Tampão de lise (CelLytic[™] M, C2978) com inibidores de proteases e fosfatases

Foram utilizados 40 µL de CelLytic para cada 2x10⁵ células. Adicionar na hora do uso coquetel inibidor de proteases (diluição 1:200) e coquetel inibidor de proteases (diluição 1:100).

4.2.24 Preparo dos anticorpos primários anti-GAP43, anti-sinapsina I e antisinaptofisina

Para o anticorpo primário anti-sinapsina I, fez-se uma diluição de 1:1000 em tampão de bloqueio (5% de BSA em TTBS).

Para o anticorpo primário anti-sinaptofisina, fez-se uma diluição de 1µg/mL em tampão de bloqueio (5% de BSA em TTBS).

Para o anticorpo primário anti-GAP43, fez-se uma diluição de 1:1000 em tampão de bloqueio (5% de BSA em TTBS).

4.2.25 Preparo do anticorpo primário anti-β-actina

Para o anticorpo primário anti-β-actina, fez-se uma diluição de 1:10.000 em tampão de bloqueio (5% de leite em TTBS).

4.2.26 Preparo dos anticorpos primários anti-F-actina e anti-β-III tubulina

Para os anticorpos primários anti-F-actina e anti-β-III tubulina, fez-se diluições de 1:100 e 0,4µg/mL em TTBS, respectivamente.

4.2.27 Preparo dos anticorpos secundários anti-mouse e anti-rabbit IgG e antimouse IgM

Para os anticorpos primários anti-mouse e anti-rabbit IgG, foram feitas diluições de 1:5000 em tampão de bloqueio (5% leite em TTBS no caso da β-actina e 5% de BSA em TTBS para os demais).

Para o anticorpo secundário anti-mouse IgM (para F-actina), foi feita uma diluição de 1:500 em TTBS.

4.3 Critérios para escolha dos OP e neuroprotetores

O método reconhecido mundialmente para avaliar a atividade da ESNp utiliza o paraoxon como controle negativo e o mipafox como controle positivo (JOHNSON, 1969b). Neste método, a intensidade da cor alaranjada é medida pela diferença entre os tubos (ou poços quando se utiliza placa) que contém apenas paraoxon e um tubo (ou poço) que contém paraoxon e mipafox. O mipafox inibe a ESNp e é sabidamente indutor de NRIOP (GLYNN, 2000), enquanto o paraoxon inibe outras esterases presentes nas células. Assim, o paraoxon foi utilizado como controle negativo e o mipafox como controle positivo. A escolha do triclorfom para o estudo deve-se basicamente à sua estrutura molecular (Figura 2). Para possibilitar a reação de "envelhecimento", o composto deve apresentar ligação -O- ou -S- entre os radicais (R) e o átomo de fósforo central. Um segundo critério considerado foi a ampla utilização do triclorfom no Brasil (LOPES et al., 2006; THOMAZ et al., 2009). Como estratégia de neuroproteção contra os efeitos neurotóxicos, foram propostos 4 compostos: (i) amilorida, bloqueador de canal de cálcio tipo T e (ii) nimodipino, bloqueador de canal de cálcio tipo L, (iii) MDL 28170 (C22H26N2O4), inibidor (III) de calpaína, uma vez que o acúmulo intracelular de cálcio e a ativação das calpaínas parecem estar envolvidos na NRIOP desencadeada pelos OP; e (iv) liraglutida, um agonista do GLP-1 ("Glucagon-like peptide 1") que apresentou efeito neuroprotetor (EL-FAWAL et al., 1990; EL-FAWAL e MCCAIN, 2008; SATO et al., 2013).



Figura 6 – Estrutura química dos compostos organofosforados mipafox (neuropático) e paraoxon (não neuropático), utilizados neste estudo.

4.4 Cultura celular

Células da linhagem SH-SY5Y, de neuroblastoma humano, foram gentilmente cedidas pelo Professor Dr. Cristoforo Scavone (Departamento de Farmacologia / Instituto de Ciências Biológicas - USP, SP, Brasil). Estas células foram cultivadas em garrafas de cultura de 75cm² contendo 20 mL de meio de cultura F12 HAM (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) suplementado com 15% de soro fetal bovino (FBS; GIBCO®, Life Technologies Corporation, USA) e 1% de uma solução antibiótica contendo 5 mg/mL de penicilina, 5 mg/mL de estreptomicina e 10 mg/mL de neomicina (GIBCO® Life Technologies Corporation, USA) e mantidas a 37°C em atmosfera cotendo 5% de CO2. Estudos prévios demonstraram que estas condições de crescimento maximizam as atividades das esterases neste tipo de células (NOSTRANDT e EHRICH, 1992; EHRICH, 1995a). Previamente à realização dos experimentos, a viabilidade celular foi determinada como tripan blue 0,5% em tampão salina fosfato (PBS), pH 7,2. O critério para uso destas células nos experimentos foi viabilidade superior a 90%. Para colher as células, o meio foi removido e as mesmas foram incubadas com 5,0 mL de tripsina 50% (diluída em PBS) por 5 min. Em seguida, as células foram diluídas com 5 mL meio F12 completo, centrifugadas (1000 rpm, 5 min) e ressuspendidas em meio de cultura de modo a obter-se a concentração de trabalho.

4.5 Diferenciação celular

Para a indução de diferenciação celular, as células foram plaqueadas em placas de 12 poços na concentração de 2x10⁵ cel/poço em meio de cultura F12 HAM suplementado com 15% de soro fetal bovino e 1% de mix de antibióticos. Após 24 horas de incubação, o meio contido nos poços foi trocado pelo meio de diferenciação celular F12 HAM contendo 1,5% de soro fetal bovino, 1% de mix de antibióticos e 10µM de ácido retinóico. As células foram mantidas em meio de diferenciação por 5 dias e o meio foi trocado a cada dois dias. Após o período de diferenciação, as células foram incubadas com os controles e OPs no meio de diferenciação pelos períodos de incubação determinados em cada experimento a ser realizado.

4.6 Escolha das concentrações dos OPs e possíveis neuroprotetores

Foram avaliadas diferentes concentrações de OP para obtenção dos valores de IC50. Estudos prévios demonstraram que 1% de etanol não causou danos significativos às células (EHRICH, 1995; EHRICH, CORRELL e VERONESI, 1997; EMERICK, DEOLIVEIRA, OLIVEIRA, *et al.*, 2012). Após a determinação dos valores de IC50, foram escolhidas as concentrações de trabalho para avaliação dos demais parâmetros. Estas concentrações de trabalho foram aquelas que induziram pelo menos 70% de inibição da ESNp. As células foram expostas aos OPs, etanol (controle) e/ou as substâncias neuroprotetoras pelos períodos de incubação de 24, 48 e 72 horas. Os controles foram feitos com células tratadas com igual volume de etanol absoluto (EMERICK, DEOLIVEIRA, OLIVEIRA, OLIVEIRA, *et al.*, 2012).

A escolha da concentração dos neuroprotetores utilizados nos ensaios foram baseadas nas curvas de viabilidade celular em que 6 concentrações de cada composto foram testadas como possíveis protetoras contra a citotoxicidade induzida pelo MPP⁺, utilizando o ensaio de redução do MTT.

4.7 Dosagem de Proteínas

Foi empregado método previamente descrito (BRADFORD, 1976). Para os ensaios da ESNp, AChE e calpaínas, a curva de calibração foi preparada a partir da diluição de uma solução estoque de albumina sérica bovina (BSA, 500 µg/mL) (Tabela 3) e foram utilizados tampões diferentes, de acordo com o protocolo de preparo das amostras: Tampão tris-EDTA pH 8,0 (ensaio para ESNp), Tampão

fosfato pH 8,0 (ensaio para AchE) e Tampão PCD (ensaio para calpaínas), como demonstrado nas Tabelas 3 e 4. Foi preparada uma solução de Comassie Blue (Brilhant Blue G) para a detecção das proteínas, como descrito no item 4.2.7.

Nas dosagens de proteínas para a avaliação das proteínas relacionadas ao citoesqueleto e à plasticidade neuronal por western blott, também foi empregado o método previamente descrito por (BRADFORD, 1976) (Tabela 4). A curva de calibração foi preparada a partir de diluições de uma solução estoque de albumina sérica bovina (BSA, 1000 µg/mL). Foram feitas diluições nas concentrações de 400, 200, 80 e 40µg/mL de BSA. Foi utilizado o reagente da Bio Rad (Bio Rad Protein Assay Dye reagente Concentrate, número de catálogo 500-0006) diluído 5 vezes para a detecção das proteínas, como descrito no item 4.2.8.

Ponto da curva	Amostras	BSA (500 μg/mL)	Tampão	Sol. Brilhante Blue
Branco			100 µL	250 µL
1		10 µL (5 µg)	90 µL	250 µL
2		20 µL (10 µg)	80 µL	250 µL
3		50 µL (25 µg)	50 µL	250 µL
4		80 µL (40 µg)	20 µL	250 µL
5		100 µL (50 µg)	0	250 µL
Amostras	40 µL		60 µL	250 µL

Tabela 3 – Protocolo para preparação da curva padrão de proteína

Nota: As leituras foram feitas em triplicata no espectrofotômetro UV/VIS a 595 nm após 5 min de reação.

Tabela 4 – Protocolo para preparação da curva padrão de proteína com reagente Bio Rad para análises por western blott.

Ponto da curva	BSA	Amostras	Tampão de lise	Reagente Bio Rad
Branco			10 µL	200 µL
1	10 μL (400 μg/mL)		10 µL	200 µL
2	10 μL (200 μg/mL)		10 µL	200 µL
3	10 µL (80 µg/mL)		10 µL	200 µL
4	10 µL (40 µg/mL)		10 µL	200 µL
Amostras		10 µL		200 µL

Nota: As leituras foram feitas em triplicata no espectrofotômetro UV/VIS a 595 nm após 5 min de reação.

4.8 Determinação da atividade da ESNp

As células foram retiradas da garrafa, contadas e retomadas em meio de cultura de forma a obter 1 x 10⁶ células/mL. Uma alíquota de 200 μ L desta suspensão celular foi incubada com 2 μ L de OP diluídos em etanol (grupo controle foi incubado com 2 μ L de etanol) por 24 horas, 37°C e 5% de CO2. Após este período, o meio foi descartado e as dosagens da ESNp foram realizadas de acordo com método previamente descrito (CORRELL e EHRICH, 1991), como mostrado a seguir:



Mipafox : diluir na hora 1:50 (5880 μL do tampão tris-EDTA + 120 μL de mipafox estoque). Fenilvalerato: diluir na hora 1:30 (8700 μL de triton X-100 + 120 μL de fenilvalerato).

Figura 7 – Esquema mostrando o procedimento de determinação da atividade da ESNp.

4.8.1 Cálculo da atividade da ESNp

Para o cálculo da atividade da ESNp, foi usado coeficiente de extinção molar da reação de fenol com o ferricianeto de potássio de 13.900. Este valor foi utilizado para o cálculo da atividade dessa enzima através da equação abaixo, obtendo assim a atividade média da ESNp em µmol/min/g de proteínas (KAPLAN, 1960).

$$\mu mol / \min/ mL = \frac{A.V_{tr}.10^{6}.1}{\varepsilon.V_{a}.T}$$

Sendo que:

A = absorbância média;

ε = coeficiente de extinção molar (13.900);

VTR = volume total da reação (mL);

Va = volume de amostra (mL);

T = Tempo de reação (minuto);

106 = fator de conversão de mol para µmol;

1 = caminho óptico

Dividindo-se o resultado da equação acima pela concentração de proteínas da amostra em g/mL, obtém-se a atividade da enzima em µmol/min/g de proteínas.

4.9 Reativação da ESNp

Para realizar os testes de reativação da ESNp (% da ESNp inibida - % da ESNp envelhecida), 2 x 10⁷ células/mL foram incubadas com os OP por 24 e 72 horas (37°C, 5% CO2) e em seguida foi utilizado como reativador o composto 2-isonitrosoacetofenona (INAP) por 1 hora nas mesmas condições. Assim, foi possível verificar a porcentagem da atividade enzimática que se manteve inibida (envelhecida) e a porcentagem da enzima que foi reativada (JOHNSON, BIRD e MEREDITH, 1988), como mostrado a seguir:



Figura 8 – Esquema mostrando o procedimento de reativação da ESNp. Nota: O INAP foi utilizado como um reativador da enzima e o KCL foi usado para controle de força iônica (% ESNp reativada = % Atividade com INAP - % da atividade com KCI).

4.10 Atividade das Calpaínas

A purificação das calpaínas e a determinação de sua atividade foram feitas como mostrado no esquema a seguir, descrito por nosso grupo de pesquisa (EMERICK, DEOLIVEIRA, DOS SANTOS, *et al.*, 2012), baseado em metodologia previamente descrita (BALLARD, BARDSLEY e BUTTERY, 1988; BUROKER-KILGORE e WANG, 1993). As células foram mantidas com os OP em meio completo, por 24 horas, 37°C, 5% CO2 na seguinte proporção: 1 mL de suspensão celular (1×10⁶/mL) para 10 µL de OP em etanol. A atividade da enzima foi expressa em unidades de absorbância/minuto/g de proteína (EL-FAWAL *et al.*, 1990).



Figura 9 – Esquema mostrando o procedimento de determinação da atividade das calpaínas.

4.11 Ensaios de Citotoxicidade

A fim de se avaliar se os OPs analisaos induzem citotoxicidade, dois ensaios foram realizados: ensaio de redução do MTT e ensaio de liberação da enzima LDH.

4.11.1 Ensaio de redução do MTT

A citotoxicidade dos OP foi testada utilizando o tradicional ensaio de redução do MTT (3 - [4,5 dimetiltiazol-2-il] -2,5-difenil-tetrazólio). As células foram incubadas em placa de 96 poços com os OPs e controles, em uma densidade de 1x10⁵ células por poço, obtendo um volume final de 200µL. Após 24 horas de incubação, o meio foi retirado, os poços lavados com 200µL de PBS (tampão salina fosfato) e foram adicionados 20µL de solução estoque de MTT (5mg/mL) e 180µL de meio de cultura em cada poço. Depois de 3 horas de incubação à 37°C, o sobrenadante foi retirado e os cristais de formazam formados pelas células viáveis foram solubilizados pela adição de 200µL de DMSO em cada poço. A absorbância foi determinada à 570nm em leitora de microplaca. Todo o ensaio foi feito em triplicata.

4.11.2 Ensaio de citotoxicidade pelo método da Lactato Desidrogenase (LDH)

As células (indiferenciadas e diferenciadas conforme protocolo descrito no item 4.2) foram semeadas em placas de 12 poços a uma densidade de 1 x 10⁶ células/ poço por 24, 48 e 72 horas. Após estes períodos, foram adicionados os OPs e controles. Após os períodos de incubação com os OPs, o sobrenadante foi removido e a atividade da LDH foi avaliada pela utilização do ensaio In Vitro Toxicology Kit®, Lactic Dehydrogenase based (Sigma, MO, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

4.12 Determinação da atividade da AChE

As dosagens da AChE foram feitas como previamente descrito (ELLMAN *et al.*, 1961) com algumas modificações. Foi necessário determinar a quantidade de proteína na cultura de células para que a atividade fosse dada por grama de proteína. As células (2x10⁵ células/poço) foram incubadas com os OP em placas de

96 poços por 24 horas, a 37°C. Após este período, o meio foi descartado, foram adicionados 200µL de tampão fosfato pH 8,0 e seguiu-se agitação por 3 minutos a 37°C em termomixer. Foram adicionados 50µL de DTNB e agitou-se novamente por 3 minutos em termomixer a 37°C. Por fim, foram adicionados 50 µL de Acetiltiocolina, a placa foi agitada por mais 1 minuto e foram efetuadas as leituras nos tempos: 0, 5, 10, 15 e 30 minutos. A avaliação da atividade da AChE foi feita após determinação de proteínas como descrito na Tabela 3.

4.13 Determinação de Cálcio Intracelular

Para determinação da concentração de cálcio intracelular foi utilizado o método previamente descrito por (BATISTA *et al.*, 2009). Um mililitro de suspensão de células (1 x 10^7 células/mL) foi incubado em placa de 12 poços com 10 µL de etanol (controle) ou de solução de OPs durante 24 horas , a 37 ° C e 5 % de CO2. Após este período, o sobrenadante foi removido e as células foram incubadas durante 5 minutos com 1 ml de solução de tripsina por poço (50% diluído em tampão PBS), para se soltarem dos poços. Em seguida, 1 ml de tampão PBS foi adicionado e a suspensão foi centrifugada durante 5 minutos a 2000 rpm. A lavagem com PBS foi repetida mais duas vezes para completa remoção do cálcio extracelular. O precipitado foi pesado e diluído em 1 ml de uma solução contendo 0,01 % (v/v) de triton X-100 e 0,5 % de HNO3 (v / v).

A determinação do cálcio foi realizada por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, ELAN DRCII, PerkinElmer, CT, EUA), operando com argônio de elevado grau de pureza (99,999%; White Martins, Brasil). Padrões analíticos de calibração foram preparados diariamente na faixa de 1-20 mg L -1. Os padrões foram diluídos em uma solução contendo 0,01% (v / v) de triton X - 100 e 0,5 % (v / v) de HNO3.

4.14 Avaliação de Apoptose e/ou Necrose

Para a avaliação de indução de processo apoptótico pelos OPs, foram utilizados os ensaios de determinação da caspase-3 e avaliação da morfologia nuclear em células coradas com fluorocromos DNA específicos.

4.14.1 Determinação de Caspase - 3

Após o período de exposição aos OPs (1 x 10⁷ células/mL), o meio de cultura foi removido e foram adicionados 500µL de PBS gelado; as células então foram removidas dos poços e centrifugadas 2500rpm (600g) por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido, os "pellets" foram lavados com PBS e centrifugados novamente a 2500rpm (600g) por 5 minutos a 4°C. O PBS foi removido e os pellets foram ressuspendidos em tampão de lise. O lisado foi submetido ao procedimento para determinação da caspase-3 conforme descrito pelo fabricante (Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric. Sigma-Aldrich®).

4.14.2 Avaliação da Morfologia Nuclear por Microscopia de Fluorescência (Apoptose)

Para análise da morfologia nuclear, 1x10⁵ células/poço foram incubadas por 24 horas em placa de 12 poços contendo uma lamínula previamente revestida com poli-D-lisina. Após este período, as células foram incubadas com os OPs por 24 ou 48 horas. Então, o meio foi removido, as células foram lavadas 2 vezes com PBS gelado e fixadas com 90% (v/v) de metanol em TBS por 15 minutos. Após remoção do metanol, as células foram coradas por 15 minutos com o fluorocromo DNA-específico Hoechst 33342 (Sigma) (LIU, CHANG e WU, 2009). As lamínulas foram então retiradas da placa, colocadas sobre lâminas, e analisadas em microscópio de fluorescência Olympus BX 51 operando com câmera DP-72 e software "CellSens Standard". Foram contadas 200 células por grupo no total e os resultados foram expressos em porcentagem de células com alterações nucleares (fragmentação e condensação nuclear).

4.14.3 Avaliação de necrose e/ou apoptose (Hoechst 33342 e lodeto de Propídeo)

As células (1x10⁵células/poço) foram incubadas por 24 horas em placa de 12 poços contendo uma lamínula previamente revestida com poli-D-lisina. Após este período, as células foram incubadas com os OPs por 24. Então, o meio foi removido, as células foram lavadas 2 vezes com PBS gelado e fixadas com paraformaldeído

10% por 10 minutos. Após remoção do paraformaldeído, as células foram coradas por 5 minutos com o fluorocromo DNA-específico Hoechst 33342 (20µg/mL) e lodeto de propídeo (10µg/mL) (Sigma). As lamínulas foram então retiradas da placa, colocadas sobre lâminas, e analisadas em microscópio de fluorescência Olympus BX 51 operando com câmera DP-72 e software "CellSens Standard". Foram contadas 200 células por grupo no total, e os resultados foram expressos em porcentagem de células em processo apoptótico e necrótico.

4.15 Ensaio de crescimento de neuritos

As células (2x10⁵ células/poço) foram incubadas em placas de 12 poços por 24 horas, a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO2 e meio de cultura F12 HAM suplementado com 15% de soro fetal bovino, 1% de mistura de antibióticos (volume final de 500µL/poço). Após este período, o meio de cultura foi trocado pelo meio F12 suplementado com 1,5% de soro bovino e 1% de mistura de antibióticos, e foi adicionado ácido retinóico 10µM (volume final de 2mL/poço) e seguiu-se o protocolo de diferenciação descrito no item 4.2. Após o período de diferenciação, foram adicionados os OPs e controles, seguindo-se incubação por até 72h. Ao final destes períodos de incubação, as células foram fotografadas em microscópio ótico invertido com contraste de fase, utilizando objetiva de 20x. Foram obtidas fotos de 8 campos para cada grupo. O número de células diferenciadas foi determinado nas imagens digitalizadas utilizando-se o software Image J.

Foram consideradas diferenciadas as células que possuíam pelo menos um neurito com comprimento igual ou superior ao diâmetro do corpo celular e foi calculada a porcentagem destas células em relação ao total de células contadas e o comprimento dos neuritos em µm (DAS, FREUDENRICH e MUNDY, 2004).

4.16 Neurofilamento-200 (Imunofluorescência)

As células (2 x 10⁵ células / poço) foram cultivadas em lamínulas revestidas com poli-D-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), seguindo o mesmo tratamento descrito no item 4.2. Após 72 horas de incubação com a OPs e controles, o meio foi removido da placa contendo as lamínulas, e as células foram fixadas com 1 mL de de paraformaldeído 4% em PBS 1X durante 10 minutos à temperatura

ambiente, lavou-se duas vezes com 500 μ L de PBS 1X e foram permeabilizadas em 400 μ I de PBS 1X contendo 0,2% de Triton X-100 durante 10 minutos. Uma nova lavagem foi realizada com 500 mL de PBS 1X, e a ligação não específica do anticorpo foi bloqueada por 1% de BSA em PBS 1X, contendo 0,1% de Tween 20 durante 1 hora. Em seguida, as células foram subsequentemente incubadas com anticorpo anti-NF 200 (diluição 1:80 em PBS 1X, contendo 3% de BSA) a 4 ° C durante a noite. Uma nova lavagem foi realizada com 500 μ L de PBS 1X e as células foram então incubadas com anticorpo secundário anti-FITC NF200 durante 1 hora. Uma nova lavagem foi realizada com 500 μ L de PBS 1X e o núcleo as células foram coradas com Hoechst 33342 (20 μ g / ml) durante 3 minutos.

A intensidade de fluorescência foi examinada com um microscópio de fluorescência (Olimpus BX51). As imagens foram obtidas a partir de três campos selecionados aleatoriamente para cada lamínula. Três experimentos independentes foram executados. Após a obtenção das imagens foi calculada a fluorescência total corrigida de dez imagens por grupo utilizando o software Image J. A fluorescência total total corrigida foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

CTCF (Correct Total Cell Fluorescence) = Densidade Integrada- (Área da ref as Cels x Média das leituras de fluorescência dos backgrounds).

4.17. Análise de sinaptofisina, sinapsina I e GAP43 por Western Blot

A análise das proteínas relacionadas à plasticidade e crescimento neuronal sinapsina I, sinaptofisina e GAP43 foi realizada utilizando-se técnias de western blott com digitalização das bandas em sistema de detecção de quimiluminescência.

4.17.1 Preparo do Lisado celular

As células foram diferenciadas seguindo-se o protocolo descrito no item 4.2, e após este período de diferenciação foram expostas aos OPs e controles por 72 horas. Para o preparo do lisado, as células foram lavadas com PBS gelado, transferidas com auxílio de scraper para microtubos de centrífuga e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos à 4°C. O sobrenadante foi então removido e as células foram homogeneizadas com o reagente de lise CelLytic (C2978 Sigma) na proporção de 40µL de CelLytic para cada 2x10⁵ células, por 10 minutos mantidos em

gelo. Após este período, as células foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos a 4ºC. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para novos tubos, precipitados foram desprezados, e as proteínas quantificadas nos lisados celulares como já descrito anteriormente no item 4.5. Os lisados foram guardados em freezer (-80°C) até a realização do ensaio.

4.17.2 Eletroforese (SDS page)

Os lisados foram diluídos de modo a obter-se 10µg de proteína/20µL e foram adicionadas de igual volume de tampão de Laemli (20µL), sendo então aquecidas por 5 minutos a 95°C. As amostras (20µL) foram aplicadas em gel de poliacrilamida (10%, 10 poços) e separadas por eletroforese por 1hora, a 160V em Tampão Tris/glicina/SDS.

4.17.3 Transferência

Após a eletroforese, foram montados os sistemas para a transferência das proteínas do gel para membranas de nitrocelulose, como mostrado na figura 7. Os sistemas de transferência foram mantidos em tampão de transferência (Tris/glicina; metanol e água) por 1 h, a 300mA.



Figura 10 – Esquema demonstrando a montagem do sistema para a transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose. Fonte: https://imunologiahematologia.files.wordpress.com

4.17.4 Reação imunológica

Foi efetuado o bloqueio com 5% de BSA (ou 5% de leite desnatado, dependendo da proteína) em TBST (tampão TBS ou salina tamponada com Tris, contendo 0,1% de Tween 20). As membranas foram então incubadas (1 h, temperatura ambiente ou 4°C, overnight) com os anticorpos primários rabbit antisinapsina I, mouse anti-sinaptofisina e mouse anti-GAP43, todos obtidos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA). As membranas foram lavadas com TTBS e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com horseradish peroxidase (HRP). Após lavagem com TTBS e TBS, a membrana foi tratada com kit ECL (Clarity, BioRad) e foi realizada a digitalização das bandas em sistema de detecção de quimiluminescência. A quantificação das bandas foi feita por densitometria usando o Image J open source software (NIH,USA). As membranas foram tratadas com tampão de stripping e submetidas à imunorreação para quantificação de beta-actina (controle interno de carregamento) e os dados das demais proteínas foram normalizados dividindo-se o resultado pelo resultado da beta-actina.



Membrana contendo as proteínas transferidas

Figura 11– Esquema da detecção das proteínas no western blot. Fonte:ttps://scykness.files.wordpress.com/2013/07/westernblotfinal.

4.18 Análise de Inflamação

A análise de indução de inflamação causada pelos OPs foi avaliada analisando-se a indução da produção celular de interleucina 1β e interleucina 6, ambas indicadoras de presença de processo inflamatório.

4.18.1 Interleucina 1β (IL-1β)

As células (1 x 10⁷ células/mL) foram expostas aos OPs e controles por 24 horas, e após este período, o meio de cultura foi removido e as amostras coletadas. Para a análise da IL-1 β foi utilizado o sobrenadante dos poços. 200 µL de amostra foram adicionados à placa contida no kit (Human IL-1 beta Antibody-coated ELISA Plate e Human IL-6 Antibody-coated ELISA Plate) overnight à 4°C. Após este período, as amostras foram removidas dos poços e seguiu-se o procedimento para determinação de IL-1 β conforme descrito pelo fabricante (Sigma, MO, USA).

4.18.2 Interleucina-6 (IL-6)

Para a análise da IL-6, as células (1 x 10⁷ células/mL) foram expostas aos OPs e controles por 24 horas, e após este período, o meio de cultura foi removido e as amostras coletadas. Para a análise da IL-6 foi utilizado o lisado celular. Para fazer o lisado, as células foram removidas dos poços com auxílio de scraper, transferidas para tubos eppendorfs e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. Os tubos foram transferidos para um isopor com gelo, o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspendidas em tampão de lise contido no kit (Human IL-6 ELISA Kit RAB0306 Sigma) e mantidas no gelo por 10 minutos. Após isto, centrifugou-se a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C e retirou-se o sobrenadante, que foi transferido para novos tubos. 200µL dos lisados foram então adicionados à placa contida no kit (Antibody-coated ELISA Plate) overnight à 4°C. Após este período, as amostras foram removidas dos poços e seguiu-se o procedimento para determinação de IL-6 conforme descrito pelo fabricante (Sigma, MO, USA).

4.19 Captação Celular de Glicose

No presente trabalho também foi avaliada a captação de glicose pelas células expostas aos OPs e aos OPs mais os possíveis protetores. As células (1x10⁵ células/poço) foram plaqueadas por 24 horas a 37°C com 5% de CO₂ em meio F12 HAM. Após este período, o grupo controle positivo teve o meio removido, os poços foram lavados duas vezes com PBS 1X e foi adicionado 1mL de meio DMEM sem glicose contendo uma concentração de 10µM de citocalasina B, um inibidor da

captação da glicose. As células foram então mantidas nestas condições por 1 hora, e após isso o meio F12 dos poços restantes (demais grupos) foi removido e eles foram lavados duas vezes com PBS 1X. Em seguida, foi adicionado o meio DMEM sem glicose em todos os poços (os poços do controle positivo permaneceram com a citocalasina B), adicionado de 50 µM de de uma solução de glicose em água e com 1µCi de deoxi-d-glicose marcada com radionuclídio trício.

Após a incubação com a glicose radiomarcada com trício, o meio foi removido dos poços, que foram lavados 3 vezes com PBS 1X. Foi então adicionado 200µL de solvente para a lise das células e 1mL de líquido de cintilação em cada poço. A placa foi agitada por 10 minutos, o conteúdo dos poços foi passado para tubos eppendorf e foi realizada a leitura em detector de cintilação MicroBeta TriLux Luminiscence Counter da PerkinElmer.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As concentrações inibitórias (IC50) das enzimas foram calculadas utilizando a equação da reta obtida a partir da % da atividade em função do log da concentração do OP, ou seja, % da atividade = a (log da concentração do OP) + b. Os coeficientes de regressão destas retas foram calculados utilizando o método dos quadrados mínimos. Alterações nos parâmetros avaliados nos diferentes grupos foram examinadas para significância estatística usando ANOVA (Analise de Variancia) seguido pelo teste de Tukey para múltiplas comparações. Para a realização destes testes foi utilizado o programa GraphPad Pris 6[®]. Valores de p<0,05 foram considerados significantes.
6 RESULTADOS

6.1 Proteínas

As Figuras de 13-17 mostram as curvas de calibração para a dosagem de proteínas nas amostras. As Figuras 13, 14 e 15 mostram as curvas de calibração feitas com tampão Tris-EDTA pH=8 para para o ensaio da ESNp, tampão PCD para ensaio das calpaínas e tampão fosfato pH=8 para ensaio da AChE, respectivamente. As Figuras 16 e 17 mostram duas curvas de calibração feitas para a dosagem de proteínas para a análise por western blot.



Figura 12 – Representação Gráfica da Equação da reta da curva de calibração de proteína feita com tampão tris-EDTA pH 8,0



Figura 13 – Representação Gráfica da equação da reta da curva de calibração de proteína feita com tampão PCD



Figura 14 – Curva analítica de proteína feita com tampão fosfato pH 8,0

A concentração de proteínas nas amostras foi obtida com base nestas curvas de calibração e utilizada no cálculo da atividade das enzimas ESNp, AChE e calpaínas nas células SH-SY5Y de neuroblastoma humano.



Figura 15 – Curva analítica de dosagem de proteínas feita para as análises por western blot.





As concentrações de proteínas nas amostras que foram analizadas por western blot foram obtidas com base nestas curvas de calibração mostradas nas Figuras 16 e 17.

6.2 Curvas da Inibição da ESNp

A Figura 18 mostra a curva de inibição enzimática induzida pelo mipafox que é sabidamente um OP neuropático. Como mostrado na Tabela 5, o mipafox apresentou IC50 de 1,33 x 10⁻⁶ M, indicando baixa concentração inibitória de 50% da atividade da ESNp.



Figura 17 – Porcentagem (%) de atividade da ESNp em células SH-SY5Y em função da concentração de mipafox. Cada ponto corresponde à média de três amostras analisadas em triplicata e estão representados como média ± erro padrão da média.

A Figura 19 apresenta os resultados de inibição da atividade da ESNp induzida pelo paraoxon nas células SH-SY5Y. O paraoxon é um composto sabidamente não indutor da NRIOP, e, como demonstrado na Tabela 5, mostrou IC50 de 9,31 x 10⁻⁵, indicando que é necessária uma concentração bem maior que a do mipafox (indutor) para causar 50% de inibição da atividade da ESNp.



Figura 18 – Porcentagem (%) de atividade da ESNp nas células SH-SY5Y em função da concentração de paraoxon. Cada ponto corresponde à média de três amostras analisadas em triplicata e estão representados como média ± erro padrão da média.

A Figura 20 ilustra a curva de inibição da atividade da ESNp em função de diferentes concentrações de triclorfom. O triclorfom foi investigado a fim de se analisar seu potencial em ser neuropático, e, como indicado na Tabela 5, ele apresentou uma IC50 de 3,29 x 10⁻⁵, mostrando que uma concentração menor que a do paraoxon (não indutor) é capaz de inibir 50% da atividade da ESNp.



Figura 19 – Porcentagem (%) da atividade da enzima ESNp em células SH-SY5Y versus concentração de triclorfom. Cada ponto corresponde à média de três amostras analisadas em triplicata e estão representados como média ± erro padrão da média. Os valores de IC50 são mostrados na Tabela 6.

6.2.1 Valores de IC50 para ESNp

Tabela 5 – Valores de IC50 dos três OP avaliados em relação à atividade da ESNp de células SH-SY5Y.

Inibidor	IC ₅₀	r ²
Mipafox	1,33 x 10 ⁻⁶	0,94
Paraoxon	9,31 x 10⁻⁵	0,93
Triclorfom	3,29 x 10⁻⁵	0,95

Nota: Os valores de IC50 apresentados são representativos da média de três amostras analisadas em triplicata. O coeficiente de regressão linear (r²) foi obtido a partir da curva do log da % de atividade da enzima versus concentração do OP.

6.3 Reativação da ESNp

Após a construção das curvas de inibição da ESNp pelos três OP, iniciaramse os testes de reativação da ESNp para determinação da proporção da enzima inibida e da proporção da enzima envelhecida (que não é capaz de ser reativada).

Os gráficos de reativação são apresentados nas Figuras 21, 22 e 23 os valores são apresentados na Tabela 6. O mipafox (controle positivo, indutor da NRIOP) e o triclorfom foram capazes de proporcionar inibição e envelhecimento da ESNp acima de 70%, nas concentrações de 2,0 x 10^{-5} M e 1,0 x 10^{-3} M, respectivamente.

Inibidor	Concentração de inibidor (M)	% de inibição	% de envelhecimento
Mipafox	1,0 x 10 ⁻⁶	57,27 ± 14,17	46,15 ± 5,95
	5,0 x 10 ⁻⁶	$80,43 \pm 2,56$	$70,25 \pm 4,95$
	2,0 x 10 ⁻⁵	96,99 ± 1,24	$89,90 \pm 4,80$
Paraoxon	1,0 x 10 ⁻⁴	62,81 ± 3,01	$17,30 \pm 5,00$
	3,0 x 10 ⁻⁴	$78,64 \pm 4,74$	$31,01 \pm 5,40$
	7,0 x 10 ⁻⁴	$90,90 \pm 3,20$	47,15 ± 6,95
Triclorfom	1,0 x 10 ⁻⁵	46,88 ± 3,01	$29,65 \pm 4,85$
	1,0 x 10 ⁻⁴	77,69 ± 2,11	$59,95 \pm 4,15$
	1,0 x 10 ⁻³	93,72 ± 2,22	$74,15 \pm 4,45$

Tabela 6 – Taxas de inibição e envelhecimento da ESNp de células SH-SY5Y após 24 horas de exposição aos OP avaliados.

Nota: cada valor corresponde à média de três amostras analisadas em triplicata. Valores estão representados como média ± erro padrão da média.



Figura 20 – Porcentagem (%) de inibição e envelhecimento da ESNp em células SH-SY5Y versus concentração de mipafox. Cada ponto corresponde à média de três amostras analisadas em triplicata. Valores estão representados como média ± erro padrão da média.



Figura 21 – Porcentagem (%) de inibição e envelhecimento da ESNp em células SH-SY5Y versus concentração de paraoxon. Cada ponto corresponde à média de três amostras analisadas em triplicata. Valores estão representados como média ± erro padrão da média.



Figura 22 – Porcentagem (%) de inibição e envelhecimento da ESNp em células SH-SY5Y versus concentração de Triclorfom. Cada ponto corresponde à média de três amostras analisadas em triplicata. Valores estão representados como média ± erro padrão da média.

6.4 Atividade da AChE

As Figuras 24, 25 e 26 mostram as curvas de inibição enzimática da AChE induzida pelo mipafox, paraoxon e triclorfom, respectivamente. A partir destas curvas, foram determinadas as IC50 dos três OPs para a enzima AChE. Como mostrado na Tabela 7 e Figura 23, a concentração de mipafox que inibiu 50% da atividade da AChE foi de 7,68 x 10⁻⁶. Para o paraoxon, composto não indutor, a IC50 para a AChE foi de 4,99 x 10⁻⁷ (Tabela 7), mostrando que ele induz inibição em 50% da atividade da AChE em uma concentração bem menor do que mipafox (Figura 24). No caso do triclorfom, ele apresentou com IC50 para a AChE de 2,96 x 10⁻⁴, mostrando que é necessária uma concentração maior do que a dos dois controles utilizados para inibir 50% da atividade da AChE (Figura 25).



Figura 23 – Porcentagem (%) de atividade da AChE em células SH-SY5Y em função da concentração de mipafox. Cada ponto corresponde à média de três amostras analisadas em triplicata. Os valores de IC50 são mostrados na Tabela 7. Valores estão representados como média ± erro padrão da média



Figura 24 – Porcentagem (%) de atividade da AChE em células SH-SY5Y em função da concentração de paraoxon. Cada ponto corresponde à média de três amostras analisadas em triplicata. Os valores de IC50 são mostrados na Tabela 7. Valores estão representados como média ± erro padrão da média



Figura 25 – Porcentagem (%) da atividade da enzima AchE em células SH-SY5Y versus concentração de triclorfom. Cada ponto corresponde à média de três amostras analisadas em triplicata. Os valores de IC50 são mostrados na Tabela 7. Valores estão representados como média ± erro padrão da média

6.4.1 Valores de IC50 para a AChE e razão IC50 ESNp / IC50 AChE

As curvas de inibição da AChE foram obtidas a fim de estabelecer a razão IC50 ESNp / IC50 AChE, cujo valor é fundamental para a diferenciação entre OP neuropáticos e não-neuropáticos.

Tabela 7 – Valores de IC50 e r^2 dos três OP avaliados em relação à atividade da AChE de células SH-SY5Y e relação entre os valores de IC50 da ESNp e da AChE. Valores estão representados como média \pm erro padrão da média

Inibidor	IC ₅₀	r ²	IC ₅₀ ESNp / IC ₅₀ AChE
Mipafox	7.68 x 10⁻ ⁶	0,94	0,17
Paraoxon	4.99 x 10 ⁻⁷	0,91	187
Triclorfom	2,96 x 10 ⁻⁴	0,92	0,11

Nota: Os valores de IC50 são representados como a média obtida a partir de três curvas dose-resposta.

6.5. Ensaios de citotoxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade induzida pelos OPs, foram realizados os ensaios de redução do MTT e de liberação da enzima LDH.

6.5.1 Citotoxicidade pelo método de redução do MTT

A citotoxicidade foi avaliada usando o ensaio do MTT para cálculo da porcentagem de células viáveis em relação às células mortas. Mipafox (OP neuropático) e triclorfom, em concentrações que causaram pelo menos 70% da inibição da ESNp, não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle. Já o paraoxon (não-neuropático) apresentou citotoxicidade em concentrações que causaram pelo menos 70% da inibição da ESNp (Figura 27).

O ensaio do MTT também foi realizado para a escolha das concentrações das substâncias possivelmente neuroprotetoras. Foram feitas curvas de viabilidade celular em que 6 concentrações de cada composto foram testadas como possíveis protetoras contra a citotoxicidade induzida pela toxina 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺). uma vez que que a sobrecarga de cálcio tem sido associada ao mecanismo tóxico desta toxina (mecanismo semelhante ao desencadeado pelos OPs neuropáticos). Em concentrações de 1 ng/ml até 50 µg/mL de amilorida, houve um aumento significativo na viabilidade celular quando comparado com o grupo tratado apenas com MPP⁺, mas na concentração de 100 µg/mL ocorreu uma diminuição na viabilidade celular quando comparado ao grupo tratado somente com o MPP+ (Figura 28). As concentrações de nimodipino de 1ng/ml até 1µg/ml causaram um aumento da viabilidade celular, no entanto, a partir de 50µg/mL houve um efeito prejudicial na viabilidade (Figura 29). O inibidor de calpaínas MDL 28170 mostrou aumento da viabilidade nas concentrações de 1µM a 100µM, e a partir de 500µM houve uma redução significativa da viabilidade celular (Figura 30). A liraglutida em todas as concentrações avaliadas apresentou aumento da viabilidade celular em comparação ao grupo tratado somente com MPP⁺ (Figura 31).



Figura 26 – Citotoxicidade causada mipafox ($2x10^{-5}$ M), paraoxon ($3x10^{-4}$ M), triclorfom ($1x10^{-3}$ M) nas células SH-SY5Y após 24 horas de incubação a 37°C. Cada ponto foi analisado em triplicata (n=3) e os resultados são mostrados como média ± erro padrão da média. *Significativo em relação ao controle (p < 0,05).



Concentrações de Amilorida

Figura 27 – Efeitos da amilorida na viabilidade celular de células SH-SY5Y de neuroblastoma humano após 24 h de incubação a 37 °C. As células foram incubadas com MPP⁺ (controle) e MPP⁺ mais diferentes concentrações de amilorida. Cada ponto foi analisado em triplicata (n=3) e os resultados são mostrados como média \pm erro padrão da média. *Significativo em relação ao controle (p < 0,05).



Concentrações de Nimodipino

Figura 28 – Efeitos da nimodipino na viabilidade celular de células SH-SY5Y de neuroblastoma humano após 24 h de incubação a 37 °C. As células foram incubadas com MPP⁺ (controle) e MPP⁺ mais diferentes concentrações de nimodipino. Cada ponto foi analisado em triplicata (n=3) e os resultados são mostrados como média \pm erro padrão da média. *Significativo em relação ao controle (p < 0,05).



Concentrações de Liraglutida

Figura 29 – Efeitos da liraglutida na viabilidade celular de células SH-SY5Y de neuroblastoma humano após 24 h de incubação a 37 °C. As células foram incubadas com MPP⁺ (controle) e MPP⁺ mais diferentes concentrações de liraglutida. Cada ponto foi analisado em triplicata (n=3) e os resultados são mostrados como média \pm erro padrão da média. *Significativo em relação ao controle (p < 0,05).



Concentrações de MDL

Figura 30 – Efeitos do MDL na viabilidade celular de células SH-SY5Y de neuroblastoma humano após 24 h de incubação a 37 °C. As células foram incubadas com MPP⁺ (controle) e MPP⁺ mais diferentes concentrações de liraglutida. Cada ponto foi analisado em triplicata (n=3) e os resultados são mostrados como média \pm erro padrão da média. *Significativo em relação ao controle (p < 0,05).

6.5.2 Citotoxicidade pelo método da Lactado Desidrogenase (LDH)

Foi realizada a análise de citotoxicidade pelo método de liberação da lactato desidrogenase (LDH) em células diferenciadas com ácido retinoico e em células indiferenciadas. A atividade desta enzima no sobrenadante celular indica a proporção de células mortas. Este ensaio foi realizado para assegurar que as concentrações de OPs que causam 70% de inibição de envelhecimento da ESNp são concentrações sub-letais, que não levam à morte celular.

Como pode ser visto nas Figuras 32 e 33, os OPs mipafox (OP neuropático) e triclorfom não causaram liberação significativa (tanto em células diferenciadas como indiferenciadas) de LDH quando comparado com o grupo controle (ácido retinóico). Apenas o paraoxon (OP não neuropático) demosntrou aumento significativo na libertação de LDH, quando comparado com o grupo controle. Os resultados do paraoxon nas células diferenciadas demonstraram um aumento da liberação da enzima já a partir de 24 horas de incubação. Já nas células indiferenciadas, o aumento da liberação ocorreu a partir de 48 horas. Estes resultados demonstram que as célas diferenciadas tornan-se mais sensíveis à exposição a substâncias

toxicas, como indicado por alguns estudos (CHANG *et al.*, 2006; CHEUNG *et al.*, 2009).



Figura 31 – Efeitos do mipafox (2 x 10^{-5} M), paraoxon (3 x 10^{-4} M) e triclorfon (10^{-3} M) na liberação de LDH em células SH-SY5Y de neuroblastoma humano diferenciadas após 24, 48 e 72 horas de incubação. Cada ponto representa a média ± erro padrão da média de três experimentos diferentes realizadas em triplicata. * Significativamente diferente do grupo controle (ácido retinóico) (P <0,05).



Figura 32 –Efeitos do mipafox (2 x 10^{-5} M), paraoxon (3 x 10^{-4} M) e triclorfon (10^{-3} M) na liberação de LDH em células SH-SY5Y de neuroblastoma humano indiferenciadas após 24, 48 e 72 horas de incubação. Cada ponto representa a média ± erro padrão da média de três experimentos diferentes realizadas em triplicata. * Significativamente diferente do grupo controle (ácido retinóico) (P <0,05).

6.6 Ativação das calpaínas

Para dar suporte aos resultados relativos à inibição e envelhecimento da ESNp foi feita também avaliação da ativação das calpaínas nas células SH-SY5Y. Estes resultados são mostrados na Figura 34 e demonstram que apenas o mipafox foi capaz de aumentar significativamente a atividade das calpaínas em concentrações capazes de causar pelo menos 70% de inibição e envelhecimento da ESNp. Os resultados apresentados na Figura 34 mostram também que tanto o amilorida quanto o nimodipino foram capazes de inibir a ativação de calpaínas induzida pelo mipafox nos grupos tratados com mipafox associado com amilorida e mipafox associado com nimodipino. Quando as células foram tratadas com mipafox associado com inibidor de calpaínas MDL 28170, não houve a diminuição significativa da atividade das calpaínas quando foi comparado com o grupo tratado somente com mipafox



Grupos

Figura 33 – Efeito da ativação das calpaínas na presença de etanol (veículo, controle), mipafox ($2x10^{-5}$ M), paraoxon ($3x10^{-4}$ M), triclorfom ($1x10^{-3}$ M), amilorida e nimodipino (15 ng/mL), MDL (), mipafox + amilorida, mipafox + MDL e mipafox+nimodipino em cultura de células SH-SY5Y após 24 horas de incubação à 37°C, 5% de CO2. Cada ponto foi analisado em triplicata (n=3) e os resultados são mostrados como média ± erro padrão da média. *Significativo em relação ao controle (p < 0,05). A atividade do controle foi considerada 100%.

6.7 Determinação de Cálcio Intracelular

A curva de calibração (r> 0,99) utilizada para cálculo das concentrações de cálcio intracelular é apresentada na Figura 35. Mipafox e triclorfom causaram elevação significativa nos níveis de cálcio intracelular, como demonstrado na na Figura 36.



Concentração de cálcio

Figura 34 – Curva de calibração de cálcio (1 a 20 mg/L) obtida por espectrometria de massa indutivamente acoplada a Plasma (ICP-MS, "Inductively coupled plasma mass spectrometry").



Grupos

Figura 35 – Efeitos do mipafox, paraoxon e triclorfom na concentração de cálcio de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, após 24 horas de incubação. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média de três experimentos independentes feitos em triplicata.

*Significativamente diferente do controle (p <0,05). # Significativamente diferente do mipafox (p <0,05).

6.8 Avaliação de necrose e apoptose

6.8.1 Determinação de Caspase – 3

O ensaio de indução de apoptose avaliando-se a ativação da enzima caspase-3 mostrou que o OP triclorfom causou um aumento significativo na atividade da caspase-3. O mipafox também causou elevações significativas na atividade da caspase-3, enquanto que o paraoxon não elevou significativamente a atividade desta enzima. Amilorida e MDL reduziram o aumento da atividade da caspase-3 causado pelo mipafox (Figura 37).



Figura 36 – Atividade da caspase-3 utilizando paraoxon, mipafox e triclorfom em células SH-SY5Y de neuroblastoma humano depois de 24 horas de incubação a 37°C. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes feitos em triplicata. *Significativamente diferente do controle (p <0,05). # Significativamente diferente do mipafox (p <0,05).

6.8.2 Avaliação de Células em Apoptose

As células SH-SY5Y expostas aos OPs por 24 e 48 horas mostraram alterações nucleares quando coradas com o fluorocromo DNA-específico Hoechst 33342 (HO) e analisadas em microscópio de fluorescência. Os grupos mipafox e triclorfom apresentaram aumento do número de células com alterações morfológicas nucleares como fragmentação e condensação nuclear com 24 e 48 horas de exposição, indicando que estes dois OPs podem aumentar o número de células apoptóticas. O paraoxon causou um aumento significativo da porcentagem de células com alteração somente após 48 horas de exposição, indicando processo apoptótico após este período de incubação (Figura 38, 39 e 41). Os grupos tratados com mipafox associado com as substâncias avaliadas como possíveis protetoras amilorida, nimodipino e MDL tiveram uma redução significativa da porcentagem de células com alterações nucleares quando comparados ao grupo tratado somente com mipafox por 24 e 48 horas (Figura 38, 40 e 42).



Grupos

Figura 37 – Alterações na morfologia nuclear após 24 e 48 horas de incubação com os OPs. Representação gráfica da média dos cinco campos analisados por grupo. Os resultados são mostrados como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. Foi usada a neurotoxina MPP⁺ (1mM) como controle positivo. *Significativamente diferente do controle (etanol) (p <0,05). *Significativamente diferente do mipafox (p <0,05).



Figura 38 – Alterações na morfologia nuclear após 24 horas de incubação com os OPs. A) Controle negativo. B) Células expostas ao mipafox (2x10⁻⁵), mostrando alterações como condensação e fragmentação nuclear. C) Células expostas ao paraoxon (3x10⁻⁴), mostrando poucas células com alterações nucleares. D) Células expostas ao triclorfom (1x10⁻³), onde as células mostram semelhança em relação as células tratadas com o mipafox, apresentando uma maior quantidade de alterações nucleares como condensação e fragmentação. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescências Olympus BX 51 operando com câmera DP-72 e software "CellSens Standard.



Figura 39 – Alterações na morfologia nuclear após 24 horas de incubação com o OP mipafox e as substâncias amilorida, nimodipino e MDL, avaliadas como possíveis protetoras. A) Células expostas somente ao mipafox. B) Células expostas ao mipafox+nimodipino, mostrando menos alterações em relação ao grupo tratado somente com mipafox. C) Células expostas ao mipafox+amilorida, mostrando menos alterações em relação ao grupo tratado somente com mipafox. D) Células expostas ao mipafox+MDL, também mostrando menos alterações em relação ao grupo tratado somente com mipafox. D) Células expostas ao mipafox+MDL, também mostrando menos alterações em relação ao grupo tratado somente com mipafox. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescências Olympus BX 51 operando com câmera DP-72 e software "CellSens Standard.



Figura 40 – Alterações na morfologia nuclear após 48 horas de incubação com os OPs. A) Controle negtivo. B) Células expostas ao OP mipafox, mostrando alterações como condensação e fragmentação nuclear. C) Células expostas ao OP paraoxon, mostrando um aumento na quantidade de células com alterações nucleares. D) Células expostas ao OP triclorfom, onde as células mostram semelhança em relação as células tratadas com o mipafox, apresentando uma maior quantidade de alterações nucleares como condensação e fragmentação. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescências Olympus BX 51 operando com câmera DP-72 e software "CellSens Standard.



Figura 41 – Alterações na morfologia nuclear após 48 horas de incubação com o OP mipafox e as substâncias amilorida, nimodipino e MDL, avaliadas como possíveis protetoras. A) Células expostas somente ao mipafox. B) Células expostas ao mipafox+nimodipino, mostrando menos alterações em relação ao grupo tratado somente com mipafox. C) Células expostas ao mipafox+amilorida, mostrando menos alterações em relação ao grupo tratado somente com mipafox. D) Células expostas ao mipafox+MDL, também mostrando menos alterações em relação ao grupo tratado somente com mipafox. D) Células expostas ao mipafox+MDL, também mostrando menos alterações em relação ao grupo tratado somente com mipafox. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescências Olympus BX 51 operando com câmera DP-72 e software "CellSens Standard.

6.8.3 Avaliação de Células em Necrose e Apoptose

A fim de se avaliar processos de necrose e/ou apoptose que os OPs podem ocasionar, foi realizado um ensaio utilizando o corante Hoechst 33342 (HO) e o iodeto de propídeo (IP). As células SH-SY5Y foram expostas aos OPs por 24 e 48 horas e após este período foram coradas com HO e IP. O HO pode ser utilizado para detectar células apoptóticas pela morfologia nuclear. Este corante é rapidamente absorvido pelas células durante as fases iniciais de apoptose, enquanto a membrana citoplasmática íntegra está impermeável ao IP, que pode ser utilizado para corar o DNA e também para determinar a integridade da membrana celular, já que ele pode penetrar somente membranas celulares comprometidas. Fases tardias de apoptose apresentam corpos apoptóticos e são acompanhadas pelo aumento da permeabilidade da membrana celular, o que permite a entrada de IP nas células. Assim, podemos observar que quando as células estão coradas pelo IP, elas estão em apoptose tardia, apresentando núcleo fragmentado corado em vermelho, ou necrose, onde apresentam o núcleo vermelho intacto. Células em estágios iniciais de apoptose ainda preservam a integridade da membrana e ainda são impermeáveis ao IP, apresentando núcleo condensado e fragmentado corado em azul.

As células foram analisadas em microscópio de fluorescência e pôde-se observar que os grupos mipafox e triclorfom apresentaram aumento significativo do número de células com alterações nucleares, como fragmentação e condensação nuclear, quando coradas com HO, indicando que eles causam um aumento da frequência de células apoptóticas (núcleo azul condensado e fragmentado), como demonstrado na figura 43. Estes dois OPs também causaram um aumento de células em apoptose tardia/necrose (núcleo vermelho intacto) quando comparados ao controle, porém este aumento foi muito menor que o aumento de células apoptóticas, e muito menor do que o aumento de células em apoptose tardia/necrose causado pelo paraoxon. Como pode-se observar nas Figuras 44 e 45, a frequência de células coradas com IP nos grupos tratados com mipafox e triclorfom foi muito menor do que as coradas pelo HO que apresentaram fragmentação e condensação nuclear.

O paraoxon também causou um aumento de células em apoptose, que, após a análise das células coradas com IP, conseguimos concluir se tratar em grande parte de células em apoptose tardia, devido à presença de núcleos condensados e fragmentados corados em vermelho pelo IP. Em relação às células necróticas, que apresentam núcleos intactos vermelhos corados pelo IP, o paraoxon mostrou um aumento significativo da porcentagem de células em necrose a partir de 24 horas de exposição quando comparado ao grupo controle e ao mipafox, que teve uma porcentagem muito menor de células em necrose (Figuras 41-43). Podemos observar nas Figuras 44 e 45 que em 24 e 48 horas de exposição ao paraoxon, há um grande aumento de células coradas pelo IP, o que indica estágios finais de apoptose e/ou necrose.

Os grupos tratados com o mipafox e os possíveis neuroprotetores amilorida, nimodipino, MDL e liraglutida tiveram redução significativa da porcentagem de células apoptóticas quando comparados ao grupo tratado somente com mipafox (Figuras 46-48). Como podemos observar na Figura 46, em relação a apoptose tardia/necrose, apesar dos grupos tratados com amilorida, liraglutida e MDL teram diminuído a porcentagem de células nestes estágios, somente o grupo tratado com mipafox + nimodipino teve uma redução significativa das células nesses estágios quando comparado ao grupo tratado somente com mipafox.



Figura 42 – Porcentagem de células apoptóticas e necróticas após 24 (A) e 48 (B) horas de incubação com mipafox, paraoxon e triclorfom. Representação gráfica da média dos cinco campos analisados por grupo. Os resultados são mostrados como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. *Significativamente diferente do grupo controle (p <0,05). # Significativamente diferente do mipafox (p <0,05). +Indica diferença significativa entre a quantidade de células necróticas e apoptóticas dentro do mesmo grupo (p <0,05).



Figura 43 – Avaliação de células apoptóticas e necróticas por microscopia de fluorescência após 24 horas de incubação com: A) Controle negativo (etanol); B) Mipafox; C) Paraoxon; D) Triclorfom. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescências Olympus BX 51 operando com câmera DP-72 e software "CellSens Standard.



Figura 44 – Avaliação de células apoptóticas e necróticas por microscopia de fluorescência após 48 horas de incubação com: A) Controle negativo (etanol); B) Mipafox; C) Paraoxon; D) Triclorfom. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescências Olympus BX 51 operando com câmera DP-72 e software "CellSens Standard.



Figura 45 – Porcentagem de células apoptóticas e necróticas após 24 (A) e 48 (B) horas de incubação com mipafox mais os possíveis neuroprotetores amilorida, nimodipino, MDL e liraglutida. Representação gráfica da média dos cinco campos analisados por grupo. Os resultados são mostrados como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. *Significativamente diferente do grupo controle (p <0,05). # Significativamente diferente do mipafox (p <0,05). +Indica diferença significativa entre quantitidade de células necróticas e apoptóticas dentro do mesmo grupo (p <0,05).



Figura 46 – Avaliação de células apoptóticas e necróticas por microscopia de fluorescência após 24 horas de incubação com: A) Mipafox + Nimodipino; B) Mipafox + Amilorida; C) Mipafox + Liraglutida; D) Mipafox + MDL. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescências Olympus BX 51 operando com câmera DP-72 e software "CellSens Standard.



Figura 47 – Avaliação de células apoptóticas e necróticas por microscopia de fluorescência após 48 horas de incubação com: A) Mipafox + Nimodipino; B) Mipafox + Amilorida; C) Mipafox + Liraglutida; D) Mipafox + MDL. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescências Olympus BX 51 operando com câmera DP-72 e software "CellSens Standard.

6.9 Ensaios de Crescimento de Neuritos

O crescimento dos neuritos em células tratadas com ácido retinóico por 5 dias foi avaliado após 24 (Figuras 49-51), 48 (Figuras 52-54) e 72 horas (Figuras 55-57) de exposição aos OPs e possíveis neuroprotetores. Os OPs mipafox e triclorfom diminuíram significativamente a porcentagem de células com neuritos e o comprimento dos neuritos a partir de 24 horas de exposição quando comparado ao grupo controle tratado somente com ácido retinóico. O grupo tratado com o paraoxon apresentou células com comprimentos dos neuritos menores do que o grupo controle a partir de 24 horas de exposição e a porcentagem de células com neuritos foi diminuída somente após 48 horas de exposição a este OP.

Quanto às substâncias possivelmente neuroprotetoras, foi observado que nimodipino, amilorida, MDL e liraglutida, que foram utilizados nos tratamentos juntamente com o mipafox, causaram um aumento significativo da porcentagem de células com neuritos e do comprimento dos neuritos a partir de 24 horas de tratamento, quando comparados com o grupo tratado somente com o mipafox.

Nas Tabelas 8 e 9 pode-se observar os valores das médias do comprimento dos neuritos e das médias das porcentagens de células com neuritos das células expostas aos OPs (Tabela 8) e ao OP mipafox associado com os possíveis protetores (Tabela 9).



Figura 48 – Efeito sobre o crescimento de neuritos. As células foram induzidas à diferenciação com ácido retinóico 10µM por 5 dias. A) representação dos dados do comprimento dos neuritos após 24 horas de incubação com ácido retinóico (AR), OPs e/ou neuroprotetores; B) representação dos dados das porcentagens de células com neuritos após 24 horas de incubação com ácido retinóico (AR), OPs e/ou neuroprotetores. Bados das dados das porcentagens de células com neuritos após 24 horas de incubação com ácido retinóico (AR), OPs e/ou neuroprotetores. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes feitos em triplicata (n=9). *Significativamente diferente do grupo ácido retinóico (AR) (p<0,05); #Significativamente diferente do mipafox (p<0,05).



Figura 49 – Imagens obtidas em microscópio óptico invertido com contraste de fase. As células foram induzidas à diferenciação com ácido retinóico 10µM por 5 dias e posteriormente incubados com: A) ácido retinóico (AR); B) mipafox; C) paraoxon; D) triclorfom durante 24 horas.



Figura 50 – Imagens obtidas em microscópio óptico invertido com contraste de fase. As células foram induzidas à diferenciação com ácido retinóico 10µM por 5 dias e posteriormente incubados com: A) mipafox + nimodipino; B) mipafox + amilorida; C) mipafox + liraglutida; D) mipafox + MDL durante 24 horas.



Figura 51 – Efeito sobre o crescimento de neuritos. As células foram induzidas à diferenciação com ácido retinóico 10µM por 5 dias. A) representação dos dados do comprimento dos neuritos após 48 horas de incubação com ácido retinóico (AR), OPs e/ou neuroprotetores; B) representação dos dados das porcentagens de células com neuritos após 24 horas de incubação com ácido retinóico (AR), OPs e/ou neuroprotetores. Dados apresentados como média ± erro padrão da média de três experimentos independentes feitos em triplicata (n=9). *Significativamente diferente do grupo ácido retinóico (AR) (p<0,05); #Significativamente diferente do mipafox (p<0,05).


Figura 52 – Imagens obtidas em microscópio óptico invertido com contraste de fase. As células foram induzidas à diferenciação com ácido retinóico 10µM por 5 dias e posteriormente incubados com: A) ácido retinóico (AR); B) mipafox; C) paraoxon; D) triclorfom durante 48 horas.



Figura 53 – Imagens obtidas em microscópio óptico invertido com contraste de fase. As células foram induzidas à diferenciação com ácido retinóico 10µM por 5 dias e posteriormente incubados com: A) mipafox + nimodipino; B) mipafox + amilorida; C) mipafox + liraglutida; D) mipafox + MDL durante 48 horas.



Α

Grupos

Figura 54 – Efeito sobre o crescimento de neuritos. As células foram induzidas à diferenciação com ácido retinóico 10µM por 5 dias. A) representação dos dados do comprimento dos neuritos após 72 horas de incubação com ácido retinóico (AR), OPs e/ou neuroprotetores; B) representação dos dados das porcentagens de células com neuritos após 24 horas de incubação com ácido retinóico (AR), OPs e/ou neuroprotetores. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes feitos em triplicata (n=9). *Significativamente diferente do grupo ácido retinóico (AR) (p<0,05); #Significativamente diferente do mipafox (p<0,05).



Figura 55 – Imagens obtidas em microscópio óptico invertido com contraste de fase. As células foram induzidas à diferenciação com ácido retinóico 10µM por 5 dias e posteriormente incubados com: A) ácido retinóico (AR); B) mipafox; C) paraoxon; D) triclorfom durante 72 horas.



Figura 56 – Imagens obtidas em microscópio óptico invertido com contraste de fase. As células foram induzidas à diferenciação com ácido retinóico 10µM por 5 dias e posteriormente incubados com: A) mipafox + nimodipino; B) mipafox + amilorida; C) mipafox + liraglutida; D) mipafox + MDL durante 72 horas.

Tabela 8 – Médias do comprimento dos neuritos e médias das porcentagens de células com neuritos de células expostas aos OPs. Cada valor corresponde à média de três experimentos realizados em triplicata. Os valores estão representados como média ± erro padrão da média.

Grupos	Tempos de exposição	Médias comprimento dos neuritos (µm)	% de células com neuritos
	24h	43,58±1,94	5.92+0.97
Controle negativo	48h	45,66±1,64	5.75±0.76
	72h	46,96±1,61	4,91±0,52
	24h	88,00±3,48	33,15±3,76
Ácido rotinaioo	48h	90,56±3,87	32,75±2,93
Acido relinoico	72h	78,70±2,70	30,57±1,08
Mipafox	24	54,66±1,50	11,45±1,90
	48h	50,94±1,41	9,63±0,85
	72h	48,23±1,28	12,65±1,04
	24h	73 05+2 57	25 19+1 90
	48h	70,00±2,01 71 68+2 01	26,36+1,70
Paraoxon	72h	67,53±1,87	23,06±2,20
Triclorfom	24h	54,65±1,74	8,54±1,96
	48h	41,90±3,36	5,97±1,04
	72h	35,52±3,95	3,04±1,35

Tabela 9 – Valores das médias do comprimento dos neuritos e das médias das porcentagens de células com neuritos de células expostas ao OP mipafox mais os possíveis neuroprotetores. Cada valor corresponde à média de três experimentos realizados em triplicata. Os valores estão representados como média ± erro padrão da média

Grupos	Tempos de exposição	Média comprimentos dos neuritos	% de células com neuritos
Ácido Retinóico	24h	88,00±3,48	33,15±3,76
	48h	90,56±3,87	32,75±2,93
	72h	78,70±2,70	30,57±1,08
Mipafox	24h	54,66±1,05	9,13±1,08
	48h	50,56±1,41	9,38±0,85
	72h	48,23±1,28	12,65±1,04
Mipafox+Nimodipino	24	86,79±4,39	27,54±2,99
	48h	89,00±3,51	25,22±1,58
	72h	80,56±2,12	28,98±2,52
Mipafox+Amilorida	24h	82 97+3 90	18,24±1,90
	48h	84 74+3 23	19,88±2,05
	72h	81,10±2,28	28,58±1,60
Mipafox+Liraglutida	24h	73,76±2,60	19,18±1,12
	48h	79,13±3,07	15,37±1,55
	72h	77,46±1,86	22,04±2,31
Mipafox+MDL	24h	71.61+3.28	16,22±2,29
	2411 10h	76,39 2,96	16,28±2,15
	72h	76,04 2,04 20,94±2,23	

6.10. Analise de Proteínas de Citoesqueleto

A avaliação do comprometimento das proteínas de citoesqueleto causado pelos OPs foi feita analisando a intensidade de fluorescência do neurofilamento-200 e análise da concentração das proteínas F-actina e βIII-tubulina por western blott.

6.10.1 Neurofilamento 200-kD (NF-200) por imunofluorescência

Para investigar a possibilidade de disruptura de proteínas relacionadas com elementos do citoesqueleto, o neurofilamento 200-kD (NF-200) foi avaliado por imunofluorescência indireta em células expostas aos OPs e possíveis neuroprotetores por 72 horas, já que os efeitos da progressão da NRIOP são efeitos retardados que são visualizados 8-14 dias após a exposição.

Como mostrado na Figura 58A, as células tratadas apenas com ácido retinóico (AR) mostraram vários processos neuríticos com forte coloração com anticorpo anti-neurofilamento 200 (anti-NF200). As células tratadas com paraoxon (Figura 58C) também mostraram processos neuríticos corados semelhantemente pelo anti-NF200, no entanto, a coloração foi relativamente mais fraca do que as células tratadas apenas com ácido retinóico, como demonstrado na figura 58, onde pode-se observar a intensidade de fluorescência (IF) de cada grupo. Mipafox e triclorfom (Figura 58B e D, respectivamente) mostraram uma forte retração dos processos neuríticos com uma fraca coloração com o anti NF-200.

Quanto as células tratadas com o mipafox associado com os possíveis neuroprotetores, pode-se observar que as células tratadas com mipafox associado com nimodipino e mipafox associado com amilorida tiveram uma intensidade de fluorescência maior do que as células tratadas somente com o mipafox, e apesar dos grupos tratados com MDL e liraglutida terem apresentado IF menores que a dos grupos tratados com amilorida e nimodipino, ainda foi significativamente maior que a IF do grupo tratado somente com mipafox (Figura 60). Os grupos tratados com mipafox e os possíveis neuroprotetores apresentaram vários processos neuríticos, semelhantes aos das células tratadas somente com AR, com uma coloração acentuada com anticorpo anti-NF200 (Figura 59).



Figura 57 – Análise imunocitoquímica do neurofilamento de 200 kD (NF200) em células SH-SY-5Y diferenciados. As células foram expostas a mipafox (2 x 10⁻⁵ M), paraoxon (3 x 10⁻⁴ M) e triclorfom (10⁻³ M) durante 72 horas e coradas utilizando método de imunofluorescência indireta com o anticorpo anti-NF200. (A) As células tratadas apenas com ácido retinóico (grupo controle) mostraram uma forte coloração de vários processos neuríticos. As células tratadas com paraoxon (C) apresentaram menor número de processos e a coloração foi relativamente mais fraca do que o grupo controle. Mipafox (B) e triclorfom (D) apresentaram forte retração dos processos neuríticos e fraca coloração com o anti-NF200.



Figura 58 – Análise imunocitoquímica do neurofilamento de 200 kD (NF200) em células SH-SY-5Y diferenciados. As células foram expostas a mipafox (2 x 10⁻⁵ M) mais as substâncias possivelmente protetoras durante 72 horas e coradas utilizando método de imunofluorescência indireta com o anticorpo anti-NF200. (A) As células tratadas com mipafox mais nimodipino, mostraram uma forte coloração de vários processos neuríticos. As células tratadas com mipafox mais amilorida (B) também apresentaram uma forte coloração e grande número de processos. Os grupos tratados com mipafox + liraglutida (C) e mipafox + MDL (D), apresentaram coloração mais fraca do que amilorida e nimodipino, porem com maior número de processos neuríticos e coloração mais acentuada que o grupo tratado somente com mipafox (figura 39 B).



Grupos

Figura 59 – Análise da intensidade de fluorescência emitida pelas células expostas aos OPs e possíveis neuroprotetores tratadas com o anticorpo anti-NF200. Foi calculada a fluorescência total corrigida e os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes feitos em triplicata (n=9). *Significativamente diferente do grupo ácido retinóico (AR) (p<0,05); #Significativamente diferente do mipafox (p<0,05).

6.10.2 Análise de F-actina por Western Blott

As células foram expostas por 72 horas aos OPs e possíveis neuroprotetores e foi realizado o ensaio de western blott. O ensaio foi realizado com este período de exposição, pois foi observado que a partir de 72 horas ocorreram alterações nas concentrações da F-actina.

Foi realizada a quantificação das bandas obtidas na análise da F-actina e foi observado que no grupo tratado com o ácido retinoico, utilizado para induzir a diferenciação das células SH-SY5Y, a concentração de F-actina foi maior do que nos grupos que foram expostos ao mipafox e triclorfom por 72 horas. O paraoxon não causou uma diminuição significativa da concentração da proteína quando comparado ao grupo tratado somente com ácido retinóico. Isso pode ser observado na Figura 61.

Os grupos tratados com mipafox associado com nimodipino, mipafox associado com liraglutida e mipafox associado com MDL tiveram a concentração da F-actina aumentada quando comparado ao grupo tratado somente com mipafox. As células tratadas com mipafox associado com amilorida não tiveram uma concentração da F-actina significativamente maior do que o grupo tratado somente com mipafox, como pode ser observado na Figura 62.



Figura 60 – Análise de F-actina por Western blot em células SH-SY-5Y diferenciadas expostas ao mipafox (2 x 10⁻⁵ M), paraoxon (3 x 10⁻⁴ M) e triclorfom (10⁻³ M). As bandas foram digitalizadas e alterações na reação com anticorpo foram densitometricamente analisadas. Os dados apresentados representam a média \pm erro padrão da média de valores de área dos picos de três experimentos independentes. * Significativamente diferente do grupo controle (p <0,05). # Significativamente diferente dos grupos controle e mipafox (p <0,05), n = 3.



Figura 61 – Análise de F-actina por Western blot em células SH-SY-5Y diferenciadas expostas ao mipafox (2 x 10^{-5} M) mais os possíveis neuroprotetores nimodipino, amilorida, MDL e liraglutida. As bandas foram digitalizadas e alterações na reação com anticorpo foram densitometricamente analisadas. Os dados apresentados representam a média ± erro padrão da média de valores de área dos picos de três experimentos independentes. * Significativamente diferente do grupo controle (p <0,05). # Significativamente diferente dos grupos controle e mipafox (p <0,05), n = 3.

6.10.3 Análise de β-III Tubulina por Western Blott

As células foram expostas por 72 horas aos OPs e possíveis neuroprotetores e a análise foi realizada pelo ensaio de western blott. Foi realizada a quantificação das bandas obtidas na análise da β -III tubulina e foi observado que no grupo tratado com o ácido retinoico, utilizado para induzir a diferenciação das células SH-SY5Y, a concentração da β -III tubulina foi maior do que nos grupos que foram expostos ao mipafox e triclorfom por 72 horas. Pode-se observar na Figura 63 que o paraoxon (não neuropático), também diminuiu a concentração da β -III tubulina após 72 horas de exposição.

Os grupos tratados com mipafox associado com nimodipino, mipafox associado com liraglutida e mipafox associado com amilorida tiveram a concentração da β -III tubulina aumentada quando comparado ao grupo tratado somente com mipafox. As células tratadas com mipafox associado com MDL não tiveram uma concentração da β -III tubulina significativamente maior do que o grupo tratado somente com mipafox, como pode-se observar na Figura 64.



Figura 62 – Análise de β -III tubulina por Western blot em células SH-SY-5Y diferenciadas expostas ao mipafox (2 x 10⁻⁵ M), paraoxon (3 x 10⁻⁴ M) e triclorfom (10⁻³ M). As bandas foram digitalizadas e alterações na reação com anticorpo foram densitometricamente analisadas. Os dados apresentados representam a média ± erro padrão da média de valores de área dos picos de três experimentos independentes. * Significativamente diferente do grupo controle (p <0,05). # Significativamente diferente dos grupos controle e mipafox (p <0,05), n = 3.



Figura 63 – Análise de β -III tubulina por Western blot em células SH-SY-5Y diferenciadas expostas ao mipafox (2 x 10⁻⁵ M) mais os possíveis neuroprotetores nimodipino, amilorida, MDL e liraglutida. As bandas foram digitalizadas e alterações na reação com anticorpo foram densitometricamente analisadas. Os dados apresentados representam a média ± erro padrão da média de valores de área dos picos de três experimentos independentes. * Significativamente diferente do grupo controle (p <0,05). # Significativamente diferente dos grupos controle e mipafox (p <0,05), n = 3.

6.11 Análise de Proteínas Relacionadas ao Crescimento e Plasticidade Neuronal

A análise das proteínas sinapsina I, sinaptofisina e GAP43 foi realizada utilizando-se técnias de western blott com digitalização das bandas em sistema de detecção de quimiluminescência.

6.11.1 Análise de Sinapsina I por Western Blott

Para a análise da sinapsina I, as células foram expostas aos OPs e possíveis neuroprotetores por 72 horas, quando foi possível observar alterações em sua concentração.

Após a quantificação das bandas obtidas na análise da sinapsina I, foi observado que no grupo tratado com o ácido retinoico, a concentração de sinapsina I foi maior do que nos grupos que foram expostos ao mipafox, paraoxon e triclorfom por 72 horas. Contudo, a diminuição causada pelo paraoxon foi menor do que a causada pelo mipafox e triclorfom. Isso pode ser observado na Figura 65.

Os grupos tratados com mipafox associado com nimodipino, mipafox associado com liraglutida, mipafox associado com MDL e mipafox associado com amilorida tiveram a concentração da sinapsina I aumentada quando comparado ao grupo tratado somente com mipafox, como pode ser observado na Figura 66.



Figura 64 – Análise de Sinapsina I por Western blot em células SH-SY-5Y diferenciadas expostas ao mipafox (2 x 10⁻⁵ M), paraoxon (3 x 10⁻⁴ M) e triclorfom (10⁻³ M). As bandas foram digitalizadas e alterações na reação com anticorpo foram densitometricamente analisadas. Os dados apresentados representam a média ± erro padrão da média de valores de área dos picos de três experimentos independentes. * Significativamente

diferente do grupo controle (p <0,05). # Significativamente diferente dos grupos controle e mipafox (p <0,05), n = 3.



Figura 65 – Análise de Sinapsina I por Western blot em células SH-SY-5Y diferenciadas expostas ao mipafox (2 x 10^{-5} M) mais os possíveis neuroprotetores nimodipino, amilorida, MDL e liraglutida. As bandas foram digitalizadas e alterações na reação com anticorpo foram densitometricamente analisadas. Os dados apresentados representam a média ± erro padrão da média de valores de área dos picos de três experimentos independentes. * Significativamente diferente do grupo controle (p <0,05). # Significativamente diferente dos grupos controle e mipafox (p <0,05), n = 3.

6.11.2 Análise de Sinaptofisina por Western Blott

Na análise da sinaptofisina, as células também foram expostas aos OPs e possíveis neuroprotetores por 72 horas, quando foi possível observar alterações em sua concentração.

Após a quantificação das bandas obtidas na análise da sinaptofisina, foi observado que no grupo tratado com o ácido retinoico, a concentração de sinapsina I foi maior do que nos grupos que foram expostos ao mipafox, paraoxon e triclorfom por 72 horas. Contudo, a diminuição causada pelo paraoxon foi menor do que a causada pelo mipafox e triclorfom. Este evento pode ser observado na Figura 67.

Os grupos tratados com mipafox associado com nimodipino, mipafox associado com liraglutida, mipafox associado com MDL e mipafox associado com amilorida tiveram a concentração da sinaptofisina aumentada quando comparados ao grupo tratado somente com mipafox (Figura 68).



Figura 66 – Análise de Sinaptofisina por Western blot em células SH-SY-5Y diferenciadas expostas ao mipafox (2 x 10^{-5} M), paraoxon (3 x 10^{-4} M) e triclorfom (10^{-3} M). As bandas foram digitalizadas e alterações na reação com anticorpo foram densitometricamente analisadas. Os dados apresentados representam a média ± erro padrão da média de valores de área dos picos de três experimentos independentes. * Significativamente diferente do grupo controle (p <0,05). # Significativamente diferente dos grupos controle e mipafox (p <0,05), n = 3.



Figura 67 – Análise de Sinaptofisina por Western blot em células SH-SY-5Y diferenciadas expostas ao mipafox (2 x 10^{-5} M) mais os possíveis neuroprotetores nimodipino, amilorida, MDL e liraglutida. As bandas foram digitalizadas e alterações na reação com anticorpo foram densitometricamente analisadas. Os dados apresentados representam a média ± erro padrão da média de valores de área dos picos de três experimentos independentes. * Significativamente diferente do grupo controle (p <0,05). # Significativamente diferente dos grupos controle e mipafox (p <0,05), n = 3.

6.11.3 Análise de GAP-43 por Western Blott

As células foram expostas por 72 horas aos OPs e possíveis neuroprotetores e foi realizado o ensaio de western blott, pois foi observado que a partir de 72 horas é que ocorreram alterações na concentração do GAP-43.

Foi realizada a quantificação das bandas obtidas na análise do GAP-43 e foi observado que no grupo tratado com o ácido retinoico, utilizado para induzir a diferenciação das células SH-SY5Y, a concentração do GAP-43 foi maior do que nos grupos que foram expostos ao mipafox e triclorfom por 72 horas. Podemos observar na figura 69 que o paraoxon (não neuropático), também diminuiu a concentração do GAP-43 após 72 horas de exposição.

Os grupos tratados com mipafox associado com nimodipino, mipafox associado com MDL e mipafox associado com amilorida tiveram a concentração do GAP-43 aumentada quando comparado ao grupo tratado somente com mipafox. As células tratadas com mipafox associado com liraglutida não tiveram uma concentração do GAP-43 significativamente maior do que o grupo tratado somente com mipafox (Figura 70).



Figura 68 – Análise de GAP-43 por Western blot em células SH-SY-5Y diferenciadas expostas ao mipafox (2 x 10^{-5} M), paraoxon (3 x 10^{-4} M) e triclorfom (10^{-3} M). As bandas foram digitalizadas e alterações na reação com anticorpo foram densitometricamente analisadas. Os dados apresentados representam a média ± erro padrão da média de valores de área dos picos de três experimentos independentes. * Significativamente diferente do grupo controle (p <0,05). # Significativamente diferente dos grupos controle e mipafox (p <0,05), n = 3.



Figura 69 – Análise de GAP-43 por Western blot em células SH-SY-5Y diferenciadas expostas ao mipafox (2 x 10^{-5} M) mais os possíveis neuroprotetores nimodipino, amilorida, MDL e liraglutida. As bandas foram digitalizadas e alterações na reação com anticorpo foram densitometricamente analisadas. Os dados apresentados representam a média ± erro padrão da média de valores de área dos picos de três experimentos independentes. * Significativamente diferente do grupo controle (p <0,05). # Significativamente diferente dos grupos controle e mipafox (p <0,05), n = 3.

6.12 Avaliação de inflamação (IL-6 e IL-1β)

O ensaio de indução de inflamação que avaliou o aumento da concentração de interleucinas- 6 e 1 β (IL-6 e IL1 β) mostrou que o mipafox causou um aumento significativo na concentração da IL-1 β , mas não de IL-6. Os OPs paraoxon e triclorfom não causaram aumento da concentração destes dois marcadores inflamatórios. Nimodipino, liraglutida e MDL, mas não amilorida, reduziram significativamente o aumento da concentração de IL-1 β causado pelo mipafox (Figuras 71 e 72).



Interleucina - 1b



Figura 70 – Avaliação da concentração de interleucina-1 β utilizando paraoxon, mipafox e triclorfom em células SH-SY5Y de neuroblastoma humano após 24 horas de incubação com os OPs e possíveis neuroprotetores. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média de três experimentos independentes feitos em triplicata. *Significativamente diferente do controle (p <0,05). # Significativamente diferente do mipafox (p <0,05).



Interleucina - 6

Figura 71 – Avaliação da concentração de interleucina-6 utilizando paraoxon, mipafox e triclorfom em células SH-SY5Y de neuroblastoma humano após 24 horas de incubação com os OPs e possíveis neuroprotetores. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes feitos em triplicata. *Significativamente diferente do controle (p <0,05). # Significativamente diferente do mipafox (p <0,05).

6.13 Capatação Celular de Glicose

Foi avaliada a captação celular da glicose através de ensaio utilizando-se glicose radiomarcada com trício em células expostas aos OPs por 72 horas. Foi determinado este período de incubação, pois somente a partir de 72 horas foram detectadas alterações na captação da glicose causada pelos OPs. Ao final das leituras em detector de cintilação, foram obtidos os resultados em CPM (contagem por minuto). Os resultados indicaram que os OPs mipafox paraoxon e triclorfom diminuíram a captação da glicose pelas células quando comparados ao grupo controle negativo (Figura 73). Esta diminuição foi muito menor do que a causada pela citocalasina B, uma substância capaz de bloquear transportadores de glicose, inibindo sua captação pela célula.

As células tratadas com mipafox associado com os possíveis protetores mostraram que os grupos mipafox + amilorida, mipafox + nimodipino, mipafox + liraglutida e mipafox + MDL tiveram aumento significativo da captação da glicose quando comparados ao grupo tratado somente com mipafox (Figura 74).



Figura 72 – Avaliação da captação celular de glicose utilizando paraoxon, mipafox e triclorfom em células SH-SY5Y de neuroblastoma humano após 72 horas de incubação com os OPs. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes feitos em triplicata. *Significativamente diferente do controle (p <0,05). # Significativamente diferente do mipafox (p <0,05).



Grupos

Figura 73 – Avaliação da captação celular de glicose utilizando mipafox e os possíveis protetores amilorida, nimodipino, liraglutida e MDL em células SH-SY5Y de neuroblastoma humano após 72 horas de incubação. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes feitos em triplicata. *Significativamente diferente do controle (p <0,05). # Significativamente diferente do mipafox (p <0,05).

7 DISCUSSÃO

Os praguicidas OPs são responsáveis por vários casos de intoxicações fatais ao redor do mundo todos os anos. Além dos sintomas de intoxicação aguda causados principalmente pela inibição da enzima AChE, alguns compostos OPs são capazes de gerar uma neuropatia tardia conhecida como NRIOP, que ocorre de 8-14 dias após a exposição a um OP neuropático. O mecanismo inicial associado ao desenvolvimento da NRIOP é a fosforilação e subsequente "envelhecimento" da enzima ESNp. Este evento leva a um déficit progressivo do transporte axonal no sistema nervoso. JOHNSON (1969b), originalmente identificou a ESNp como alvo dos OPs neuropáticos e, por isso, é necessária a avaliação da atividade desta enzima em trabalhos que avaliam a capacidade de um OP gerar ou não a NRIOP. Um segundo mecanismo envolvido é uma desregulação da homeostase cálcica, que pode levar à ativação de proteases cálcio-dependentes e de proteínas kinases dependentes de cálcio/calmodulina. Esta ativação contribui para uma fosforilação anormal de proteínas do citoesqueleto e digestão de proteínas nos terminais dos axônios, caracterizando uma degeneração axonal do tipo Walleriana.

Para que ocorra a indução da NRIOP, o OP deve ser capaz de gerar a inibição e envelhecimento de pelo menos 70% da ESNp. Porém, esta inibição de 70% da ESNp deve ser compatível com a sobrevivência dos indivíduos expostos até o aparecimento dos sintomas (8-14 dias). Vários estudos demonstram que os OPs neuropáticos têm uma menor taxa de inibição da AChE, e alguns estudos vêm propondo uma abordagem in vitro para avaliar a capacidade dos OPs em gerar a NRIOP, que consiste na avaliação da capacidade de gerar a reação de envelhecimento da ESNp e na comparação entre a taxa de inibição da ESNp e a AChE. Os taxa de inibicão da autores sugeriram que se а razão IC50ESNp/IC50AChE fosse maior do que 5, então o OP não seria capaz de induzir a NRIOP, pois neste caso a IC50 para ESNp é maior que para a AChE, então, ocorrerá uma forte inibição da AChE na concentração que irá causar pelo menos 70% de inibição e envelhecimento da ESNp. No entanto, se a razão IC50ESNp/IC50AChE fosse menor do que 5, o composto teria potencial neuropático se apresentasse a propriedade de induzir a reação de envelhecimento da ESNp (SOGORB e VILANOVA, 2010).

Vários estudos demonstraram que (GLYNN, 2007; RICHARDSON *et al.*, 2013; HUSAIN, 2014) a ESNp é uma serina esterase integral de membrana, e também está ancorada na face citoplasmática do retículo endoplasmático (RE), onde catalisa a deacilação de fosfatidilcolina para glicerofosfocolina. A fosfatidilcolina representa até 50% do conteúdo fosfolipídico das membranas das células eucarióticas, e, portanto, a ESNp desempenha um papel importante na homeostase das membranas. A inibição da ESNp irá, ao menos temporariamente, causar uma desregulação na homeostase dos fosfolipideos do retículo endoplasmático (RE), que pode causar seu mal funcionamento. Desde que esta organela é um ponto de partida para todo o transporte secretório nas células eucarióticas, o transporte axonal e a interação entre axônios e células da glia serão perturbados.

No presente estudo foi avaliada a taxa de inibição e envelhecimento da ESNp, assim como as IC50 da ESNp e AChE em células SH-SY5Y de neuroblastoma humano, utilizando os OPs mipafox e paraoxon como indutor e não indutor da NRIOP, respectivamente. Foram constatadas diferentes taxas de inibição e envelhecimento da ESNp. Para cada OP foi feita a curva de inibição da ESNp e foi constatado que o mipafox apresentou menor IC50 (maior afinidade pela enzima) quando comparado aos outros OP avaliados. Este resultado mostra que o mipafox apresenta alta afinidade pelo sítio ativo da ESNp. Dentre os demais OP avaliados, o triclorfom foi o que apresentou menor IC50. Na análise da indução do envelhecimento da ESNp, foi avaliado a taxa de enzima que estava inibida (poderia ser reativada) e a taxa que estava envelhecida (inativada). Os resultados mostram que o OP com a maior taxa de envelhecimento foi o mipafox, resultado este esperado uma vez que este composto é conhecido como indutor da NRIOP. O triclorfom, que apresentou IC50 menor do que a do paraoxon, também apresentou taxas de envelhecimento compatíveis com a indução da NRIOP, ou seja, taxa de inibição e envelhecimento superiores a 70% da atividade da ESNp. Assim, as taxas da IC50ESNp/IC50AChE mostraram que os OPs mipafox (OP neuropático) e triclorfom foram baixas (seriam capazes de gerar a NRIOP), enquanto o paraoxon (OP não neuropático) apresentou alta taxa da razão IC50ESNp/IC50AChE.

Estes resultados preliminares para o mipafox e paraoxon corroboram a proposta de vários estudos (JOHNSON, 1969b; 1977; 1982; EHRICH, JORTNER e PADILLA, 1993; JOHNSON e GLYNN, 1995; EHRICH, CORRELL e VERONESI, 1997; EHRICH e CORRELL, 1998; GLYNN, 2006; EMERICK, DEOLIVEIRA, DOS

SANTOS, et al., 2012; EMERICK, EHRICH, et al., 2012) de que para a indução da NRIOP é necessário haver a inibição e envelhecimento de pelo menos 70% da atividade da ESNp e uma baixa taxa da IC50ESNp/IC50AChE, e também dá subsídios para propor que o triclorfom apresentou potencial neuropático *in vitro* e que estudos in vivo devem ser conduzidos para efetivamente comprovar o potencial deste OP em causar a NRIOP. Sendo assim, foram determinadas as concentrações dos OPs que causam no mínimo 70% de inibição e envelhecimento da ESNp para avaliar os possíveis mecanismos envolvidos na geração da NRIOP.

Vários trabalhos associam a progressão da NRIOP como uma degeneração axonal do tipo Walleriana observada em tecidos de galinhas e em culturas de células SH-SY5Y (SONG *et al.*, 1994; CHOUDHARY *et al.*, 2006; EMERICK, DEOLIVEIRA, DOS SANTOS, *et al.*, 2012). Neste tipo de degeneração, ocorre passagem excessiva de cálcio para o meio intracelular, levando à ativação de proteases cálcio dependentes que fazem a digestão da porção terminal dos axônios, inibindo a transmissão de impulsos para as células pós-sinápticas e o transporte axonal. Inicialmente ocorre um período de latência em que o neurônio consegue manter sua integridade. Portanto, a entrada excessiva de cálcio ocorre após este período de latência e manutenção do neurônio, ou seja, é preciso que ocorra mais de 70% de inibição e envelhecimento da ESNp para desencadear o processo degenerativo. Assim, a concentração dos OP teria de proporcionar, ao menos, 70% de inibição da ESNp para que houvesse ativação significativa das calpaínas. Esta ativação das calpaínas foi evidente nas células tratadas com o mipafox, mas não foi significativa no caso do paraoxon e do triclorfom.

Foi avaliada também a concentração de cálcio intracelular nas células SH-SY5Y expostas aos OPs avaliados no estudo. As concentrações de cálcio no citosol variam dinamicamente e é controlada por diversos mecanismos coordenados de controle da homeostase. Em condições de repouso, sua concentração é aproximadamente 100nM, valor quatro vezes menor que as concentrações de cálcio extracelular. Isso se deve a atividade de sistemas ativos de bombeamento de cálcio, os canais e transportadores específicos existentes na membrana plasmática. Porém, a desregulação dos processos de que o cálcio participa, bem como alterações associadas na atividade dos canais para cálcio têm sido associadas a diversos tipos de perturbações neurológicas, incluindo a epilepsia, a enxaqueca e dor crônica (SIMMS e ZAMPONI, 2014). Foi constatado que a concentração de cálcio intracelular aumentou significativamente nas células tratadas com o mipafox (OP neuropático) e triclorfom, mais um resultado indicativo de que o OP triclorfom apresentou mecanismos de toxicidade semelhantes ao OP neuropático. O paraoxon (não neuropático) não proporcionou aumento das concentrações de cálcio intracelular nas condições avaliadas. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com vários estudos sobre a NRIOP que demonstram que a inibição da ESNp causada pelos OPs neuropáticos está associada com um aumento no cálcio intracelular, redução do cálcio no soro e a ativação de proteases cálcio dependentes, também conhecidas como calpaínas (PIAO, YAMAUCHI e MA, 2003; MUZARDO, MACHADO e DE OLIVEIRA, 2008; EMERICK, PECCININI e DE OLIVEIRA, 2010).

Para confirmar a proposta de que para haver indução da NRIOP é preciso que a concentração de OP necessária para causar 70% de inibição e envelhecimento da ESNp não leve a uma morte celular acentuada, foram realizados ensaios pelo método da redução do MTT (sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração purpúrea e insolúvel em água) pelas desidrogenases mitocondriais de células viáveis e o ensaio da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) pelas células com comprometimento na membrana celular. Foi observado que os OPs mipafox e triclorfom não prejudicaram a redução do MTT pelas desidrogenases mitocondriais e nem causaram um aumento da liberação da LDH para o meio extracelular. Diferentemente, o paraoxon causou diminuição da redução do MTT e liberação de LDH para o meio extracelular, ou seja, as concentrações de paraoxon que causaram 70% da inibição da ESNp foram capazes de induzir morte celular significativa. Estes resultados dão suporte à hipótese de que compostos com a razão IC50NTE/IC50AChE muito maior do que cinco e/ou baixa taxa de envelhecimento não seriam capazes de gerar NRIOP. A inibição e o envelhecimento da ESNp causadas pelo mipafox e pelo triclorfom sempre ocorreram em concentrações que não causaram citotoxicidade acentuada. Vários estudos vêm demonstrando que a inibição da esterase deve ser em concentrações menores que aquelas necessárias para causar citotoxicidade (EHRICH, CORRELL e VERONESI, 1997; HARRIS et al., 2009).

Para uma investigação mais aprofundada das vias de indução de citotoxicidade e morte celular, foi realizado o ensaio de ativação da caspase-3 e análise de morfologia nuclear por microscopia de fluorescência utilizando os fluorocromos Hoeschst 33342 (HO) e lodeto de Propídeo (IP). A caspase-3 é considerada a caspase executora mais importante. Ela ativa especificamente uma endonuclease chamada CAD (DNAse ativada por caspase), que em células em proliferação é complexada com um inibidor, o ICAD (Inibidor de DNAse ativada por caspase). Em células apoptoticas, a caspase-3 ativada cliva o ICAD e libera CAD, que então degrada o DNA cromossomal e causa condensação da cromatina. A caspase-3 estimula também a reorganização do citoesqueleto e a desintegração da célula em corpos apoptóticos (SAKAHIRA, ENARI e NAGATA, 1998; ELMORE, 2007), importante na degradação celular e subsequente sendo então remodelamento em partículas apoptóticas (CARLSON, JORTNER e EHRICH, 2000). A apoptose é facilmente determinada pela visualização de fragmentação do DNA e condensação de cromatina utilizando corantes fluorescentes específicos para corar o DNA, como o Hoechst 33342. Este corante é permeável nas membranas celulares e é absorvido pelas células em estágios iniciais de apoptose, enquanto a membrana ainda está íntegra e não permite a passagem do iodeto de propídeo, que só irá atravessar a membrana celular em estágios de apoptose tardia e necrose (DIVE et al., 1992; MARTIN, GREEN e COTTER, 1994; MAJNO e JORIS, 1995; COBB et al., 1996; DUKE, OJCIUS e YOUNG, 1996).

Foi observado que as células tratadas com mipafox e triclorfom apresentaram um aumento da atividade da caspase-3, e as células que apresentaram alteração da morfologia nuclear tiveram alterações características de estágios iniciais de apoptose, com condensação de cromatina e fragmentação nuclear, com poucas células coradas pelo IP, indicativo de morte celular por apoptose. Estes resultados sugerem que, embora o mipafox e triclorfom induzam a morte celular por apoptose, isto ocorre apenas em certa medida, pois não foi detectável pelo ensaio do MTT e LDH (células apoptóticas podem não liberar quantidades significativas de LDH) e, assim, estes resultados estão de acordo com a hipótese de que o triclorfom (assim como o mipafox) pode ser um OP neuropático, isto é, que inibe 70% de ESNp em concentrações que provocam baixa citotoxicidade.

Um estudo realizado por LIU et al. (2009), demonstrou que o triclorfom foi capaz de causar morte celular por apoptose e inibição da AChE de forma dosedependente, indicando uma relação positiva entre a taxa de apoptose e a taxa de inibição da AChE, sugerindo que a toxicidade colinérgica causada por esse OP está relacionada à indução de apoptose causada por ele. Apesar de observarmos que não houve uma citotoxicidade significativamente diferente do grupo controle nos grupos tratados com mipafox e triclorfom nas concentrações utilizadas neste estudo (concentrações que causaram pelo menos 70% de inibição e envelhecimento na ESNp), estes dois OPs causaram cerca de 60 e 64% de inibição da AChE, respectivamente, podendo, assim, haver uma relação entre a toxicidade colinérgica e indução de apoptose.

Os resultados obtidos para o paraoxon trazem evidências de que ele causa morte celular através de necrose, pois não causou ativação de caspase-3 e nos ensaios com coloração utilizando HO/IP, a maioria das células apresentaram-se em estágios de apoptose tardia e necrose. Além disso, causou uma acentuada diminuição da redução do MTT e alta liberação de LHD para o meio extracelular, e a LDH é uma enzima liberada para o meio extracelular quando as membranas celulares estão comprometidas. Assim, foi possível encontrar evidencias de necrose, pois a liberação de LDH e coloração do núcleo pelo IP indicam comprometimento da membrana celular, e este comprometimento é observado em células em processo necrótico.

Outros efeitos importantes causados pelos OPs e que podem levar a expressão e desenvolvimento da NRIOP são a perda de componentes do citoesqueleto neuronal e uma diminuição do crescimento de neuritos, desde que a neuritogênese é dependente de vários componentes do citoesqueleto (EHRICH e CORRELL, 1998; CHEUNG *et al.*, 2009; DWANE, DURACK e KIELY, 2013).

Um dos métodos mais bem caracterizados para a indução de diferenciação em células SH-SY5Y é baseado no uso de ácido retinóico (AR) (10µM) no meio de cultura com baixa concentração ou livre de soro por no mínimo de 3-5 dias (ADEM et al., 1987; KOVALEVICH e LANGFORD, 2013). Assim, as células adquirem mais propriedades neuronais, incluindo o crescimento de neuritos e alterações morfológicas. De acordo com (MELINO et al., 1997; CONSTANTINESCU et al., 2007), na diferenciação utilizando AR, há um aumento da síntese de enzimas neuroespecíficas (como a acetilcolinesterase), neurotransmissores (catecolaminas como а dopamina, DA), alterações nos marcadores do citoesqueleto (neurofilamentos) e modificações eletrofisiológicas como visto em neurônios normais. No presente trabalho as células foram incubadas por 5 dias com AR, onde pararam a proliferação e diferenciaram-se, estendendo longos neuritos. Após este

período foram expostas aos OPs nas concentrações de 70% de inibição e envelhecimento da ESNp.

Na análise morfológica foi observado que o triclorfom causou uma diminuição significativa da porcentagem de células com neuritos e do comprimento dos neuritos a partir de 24 horas de exposição. O mipafox também reduziu significativamente a porcentagem de células com neuritos e comprimentos dos neuritos a partir de 24 horas de exposição, reforçando a hipótese de que os OP neuropáticos são capazes de inibir o crescimento de neuritos em células de linhagens neuronais. O paraoxon (não neuropático) reduziu o comprimento dos neuritos a partir de 24 horas e só foi capaz de reduzir a porcentagem de células com neuritos a partir de 48 horas de exposição, porém, esta diminuição foi menor do que a causada pelos OPs mipafox e triclorfom.

Em concordância com outros estudos (EHRICH, CORRELL e VERONESI, 1997; CHO e TIFFANY-CASTIGLIONI, 2004) paraoxon mostrou forte ação inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE). Estudos têm demonstrado que a AChE é expressa no cérebro em desenvolvimento antes do maior período de sinaptogênese, sugerindo que pode estar envolvida em outras funções não relacionadas com a neurotransmissão. Um papel morfogênico proposto para a AChE é que esta enzima poderia funcionar como uma molécula de adesão envolvida na extensão dos neuritos e no crescimento axonal (YANG *et al.*, 2008; FLASKOS, 2012). Funções não catalíticas potenciais da AChE foram implicadas pela descoberta de que certos inibidores da AChE diminuem o crescimento de neuritos em linhagens de células de galinhas (LANKFORD, DEMELLO e KLEIN, 1988; LAYER, 1991; STERNFELD *et al.*, 1998; BIGBEE *et al.*, 2000; GIORDANO *et al.*, 2007; PARAOANU e LAYER, 2008). Assim, estes resultados para o paraoxon podem sugerir que esta redução no crescimento de neuritos pode estar relacionada com a sua perturbação da atividade morfogênica que a AChE exibe durante o neurodesenvolvimento.

Estas alterações morfológicas na extensão dos neuritos podem ter sido devido à inibição do crescimento dos neuritos, à indução de degeneração, ou ambos, uma vez que houve uma redução significativa na porcentagem de células que possuíam neuritos e também uma diminuição do comprimento dos neuritos ainda existentes. Alguns estudos (WEI *et al.*, 2003; CHO e TIFFANY-CASTIGLIONI, 2004) mostram que o mipafox reduz significativamente o comprimento de neuritos em células SH-SY5Y diferenciadas. O crescimento de neuritos após a exposição aos

compostos OPs pode ser afetado por vários mecanismos diferentes. Vários autores sugerem que existe uma correlação entre a diminuição do crescimento de neuritos e a perturbação de proteínas que compõem o citoesqueleto ou inibição da atividade enzima ESNp, desde que esta esterase vem demonstrando possuir uma importante ação para a manutenção dos neurônios (SCHMUCK e AHR, 1997; LI e CASIDA, 1998; SACHANA *et al.*, 2001). Uma relação entre a inibição da ESNp e perturbações do citoesqueleto em células SH-SY5Y diferenciadas ainda não está bem estabelecida, porém, vários estudos têm demonstrado que alguns inibidores da ESNp são capazes de levar a uma diminuição no crescimento de neuritos (ABOU-DONIA, LAPADULA e SUWITA, 1988; HENSCHLER *et al.*, 1992; ABOU-DONIA, 1993; LI e CASIDA, 1998; HARGREAVES *et al.*, 2006).

Para avaliar os mecanismos pelos quais os OPs avaliados neste estudo afetam o crescimento de neuritos e processos relacionados à plasticidade neuronal, foi avaliada a concentração de algumas proteínas de citoesqueleto e proteínas relacionadas à plasticidade e sinaptogênese neuronal. Nesta análise, foram avaliadas as proteínas NF-200, F-actina, β-III tubulina, GAP-43, Sinapsina I e Sinaptofisina nas células SH-SY5Y diferenciadas expostas por 72 horas aos OPs em concentrações capazes de induzir pelo menos 70% de inibição da ESNp. Alterações na concentração destas proteínas foram significativamente relevantes a partir de 72 horas de exposição. Isso pode ser explicado pelo fato de o início da expressão e progressão das características da NRIOP se dá após certo período de exposição (neuropatia retardada), não se tratando de um processo agudo.

Após a análise morfométrica para avaliação do crescimento de neuritos foi feito um lisado celular e avaliou-se a concentração destas proteínas. Na análise das proteínas de citoesqueleto, o NF-200 foi avaliado por imunofluorescência indireta e observou-se que os as células tratadas com os OPs mipafox e triclorfom mostraram coloração fraca com anti-NF200, com poucos processos corados quando comparado ao controle (AR), que apresentou o NF-200 difundido ao longo do corpo celular e também ao longo de neuritos. As células tratadas com o paraoxon apresentaram intensidade de fluorescência reduzida quando comparado ao controle, porém, também apresentaram NF-200 difundido pelo corpo celular e também ao longo do triclorfom e mipafox.

O envolvimento da disruptura de elementos do citoesqueleto no desenvolvimento da NRIOP, particularmente neurofilamentos, microtúbulos e outros

elementos, foi avaliado por BISCHOFF (1967) que demonstrou que o primeiro sinal patológico foi uma agregação e acúmulo de neurofilamentos e neurotúbulos com condensação parcial desses elementos e uma proliferação incipiente do retículo endoplasmático liso. O crescimento inicial de axônios está associado com a reunião de subunidades de neurofilamentos, que são os mais numerosos elementos do citoesqueleto, e a expressão de NF-200 é um marcador de lesão axonal (CHO e TIFFANY-CASTIGLIONI, 2004). Assim, esta alteração pode sugerir que há uma alteração nas vias de sinalização envolvendo esta proteína após exposição aos OPs triclorfom e mipafox, que são inibidores da ESNp.

Na avaliação da concentração de F-actina (actina filamentosa) e β -III tubulina, também elementos do citoesqueleto, foi observado que em 24 horas de exposição já houve uma diminuição em suas concentrações nas células expostas aos OPs mipafox e triclorfom, porém, estas alterações foram realmente significativas a partir de 72 horas de exposição, onde mipafox e triclorfom causaram uma grande diminuição das concentrações destas proteínas quando comparada ao grupo controle. Após 24 horas de exposição, o paraoxon não causou alterações das concentrações destas proteínas de exposição, as células tratadas com paraoxon não tiveram uma diminuição significativa da concentração de F-actina quando comparado ao controle, ao contrário da β -III tubulina, que teve sua concentração diminuída quando comparada ao grupo controle.

Componentes do citoesqueleto, principalmente a f-actina, são responsáveis pela manutenção extensão dos neuritos. Segundo CARLSON e EHRICH (2001), alterações no comprimento e qualidade dos neuritos precede morte celular in vitro induzida por OPs, e implicam proteínas como a f-actina neste processo. Os microfilamentos de f-actina também modulam a neurosecreção por interação com as sinapsinas I e II, que quando fosforiladas por quinases ativadas por cálcio/calmodulina são liberadas da ligação à f-actina e aumentam o número de vesículas disponíveis para fusão com a membrana e exocitose (CECCALDI et al., 1995; NIELANDER et al., 1997). Assim, como existiu uma entrada excessiva de cálcio nas células tratadas com mipafox e triclorfom, uma fosforilação aberrante da sinapsina pode ter ocorrido, ocorrendo alterações em sua ligação à f-actina, que também foi alterada, levando a um mal funcionamento da neurosecreção, o que pode desencadear em perdas celulares importantes.

Além disso, muitos estudos vêm mostrando que as alterações causadas na actina do citoesqueleto por compostos OPs podem afetar a fragmentação do DNA e perda de substratos de adesão, ou fragmentação nuclear e ativação de caspases, sugerindo que alterações na f-actina pode contribuir para a iniciação *in vitro* de citotoxicidade (CARLSON e EHRICH, 1999; CARLSON, JORTNER e EHRICH, 2000; CARLSON e EHRICH, 2001). Estes dados estão de acordo com os achados neste estudo, já que os OPs que alteraram f-actina (mipafox e triclorfom) causaram também um aumento de células apoptóticas e ativação de caspase-3, indicando início de citotoxidade, ainda não detectada pelos métodos do MTT e LDH.

No caso da β -III tubulina, estudos *in vitro* vêm demonstrando que exposição a componentes OPs causam uma perturbação na sua polimerização em microtubulos (que são dímeros de tubulina), interferindo no bom funcionamento neuronal, já que os microtubulos proporcionam capacidade estrutural aos neurônios, e as proteínas associadas aos microtubulos ligam-se à tubulina e servem para uma vasta gama de funções, incluindo estabilização, desestabilização, reticulação e facilitação de interações entre os microtúbulos e outras proteínas nas células. Alterações na polimerização da tubulina vem demonstrando causar disfunção neuronal, apoptose, danos ao crescimento de neuritos e danos teciduais (TERRY *et al.*, 2007; JIANG *et al.*, 2010). Assim, a diminuição no crescimento de neuritos causado pelos OPs avaliados pode também ser devido às alterações da β -III tubulina.

A concentração de duas proteínas associadas às membranas pré-sinápticas, sinapsina I e sinaptofisina, foram avaliadas para verificar o efeito dos OPs na sinaptogênese. Estas proteínas são localizadas na membrana pré-sináptica e regulam a fusão das vesículas e liberação de neurotransmissores (DAS, FREUDENRICH e MUNDY, 2004). Mipafox e triclorfom causaram uma redução significativa da concentração de sinapsina I e sinaptofisina em concentrações que causaram pelo menos 70% de inibição da ESNp. Em um estudo realizado por CHIN *et al.* (1995), utilizando ratos deficientes em sinapsina I, foi demonstrado que o crescimento de neuritos predendríticos foi severamente retardado nos neurônios do hipocampo dos ratos mutantes. Além disso, a formação de sinapses foi retardada de forma significativa nestes neurônios mutantes, indicando que a sinapsina I desempenha um papel na regulação da axonogenese e sinaptogênese. Assim, triclorfom e mipafox podem estar causando uma perturbação destas proteínas sinápticas e, consequentemente, causar alterações na sinaptogênese. Além disso, a

diminuição do crescimento de neuritos causada por estes OPs pode estar relacionada com a diminuição da concentração de sinapsina e sinaptofisina.

Na análise do GAP-43, foi constatado que esta proteína teve sua concentração diminuída após exposição ao mipafox e triclorfom em concentrações que causaram pelo menos 70% de inibição da ESNp. GAP43, uma proteína associada com o crescimento de axônios, é o principal componente dos cones de crescimento e também de neuritos em crescimento, e é expresso em níveis elevados durante o alongamento axonal (BENOWITZ e ROUTTENBERG, 1997; SACHANA *et al.*, 2003). Assim, é reconhecido que ele desempenha um papel importante na manutenção e crescimento dos axônios, e esta diminuição do crescimento de neuritos causado por estes OPs pode ser devido a esta alteração da expressão desta proteína.

No caso do paraoxon, ele também causou uma diminuição da concentração de GAP-43, sinapsina I e sinaptofisina, porém, esta diminuição foi menor do que a causada pelo mipafox e triclorfom. Como foi observado na análise da enzima AChE, o paraoxon na concentração utilizada neste trabalho causa uma forte inibição desta enzima, e estudos vem demonstrando que ela possui um papel morfogênico, que poderia funcionar como uma molécula de adesão envolvida na extensão dos neuritos e no crescimento axonal (YANG *et al.*, 2008; FLASKOS, 2012), indicando que o paraoxon pode estar causando alterações nas concentrações destas proteínas atuando por outras vias.

Há evidências experimentais significativas de que a intoxicação aguda pelos OPs provoca uma resposta inflamatória robusta e evidências emergentes sugerem que a exposição crônica a baixas doses de OPs também leva a liberação de mediadores inflamatórios. As citocinas pro-inflamatórias podem tanto proteger como causar danos ao sistema nervoso central, e têm sido implicadas em várias doenças neurodegenerativas (BENVENISTE, 1998; BANKS e LEIN, 2012). As citocinas possuem um conjunto diversificado de funções, incluindo a capacidade de ativar macrófagos, promover o recrutamento de leucócitos, estimular a célula B e a diferenciação de células T e aumentam a permeabilidade vascular (BENVENISTE, 1998).

O mipafox foi capaz de induzir a expressão da IL-1β, indicando seu potencial para gerar respostas inflamatórias. Nenhum dos OPs testados foram capazes de aumentar as concentrações de IL-6. A expressão de IL-6 é aumentada em várias

doenças do SNC crônicas ou agudas, como por exemplo, lesão cerebral, isquemia, infecção, e esclerose múltipla, bem como doenças de Alzheimer e Parkinson. Porém, alguns estudos vêm demonstrando que a IL-6 protege os neurônios contra excitotoxicidade *in vitro*, e previne o cérebro de ataques isquêmicos ou de excitotoxicidade *in vivo* (GRUOL e NELSON, 2005; WANG *et al.*, 2009). Assim, a compreensão da dicotomia patogênese / neuroproteção de IL-6 pode proporcionar uma base para melhores estratégias terapêuticas e novos estudos precisam ser realizados para a avaliação do potencial dos compostos OPs em induzir processo inflamatório.

Outro efeito da exposição aos OPs que vários estudos recentes vêm demonstrando é a indução de resistência à insulina, indicando que exposições subcrônicas aos OPs leva ao desenvolvimento de diabetes. Estes estudos mostram que os pesticidas prejudicam a captação de glicose pelas células estimulada pela insulina, levando à hiperglicemia. Fígado, músculo e cérebro são órgãos envolvidos na glicogênese, glicogenólise, gliconeogênese e glicólise e, por outro lado, o pâncreas mantém o controle hormonal da homeostase da glicose pela secreção de glucagon e insulina. Os OPs podem influenciar as vias envolvidas na homeostase da glicose nesses órgãos. A maioria dos estudos colcluem que OPs induzem vias metabólicas no cérebro, músculos esqueléticos e fígado a favor do aumento da produção de glicose. Além disso, a resistência à insulina, a perturbação na secreção de insulina e ilhotas de Langerhans pancreáticas danificadas são consequências da exposição a OPs (ARSENAULT, GIBSON e MADER, 1975; DEOTARE e CHAKRABARTI, 1981; HUSAIN e ANSARI, 1988; ABDOLLAHI *et al.*, 2004; POURNOURMOHAMMADI *et al.*, 2005; ROMERO-NAVARRO *et al.*, 2006).

Assim, nossos resultados estão de acordo com estes estudos, pois os grupos tratados com mipafox, paraoxon e triclorom diminuíram a captação da glicose quando comparados ao grupo controle negativo. Esta captação foi maior quando comparada à captação do grupo controle positivo, que foi tratado com um inibidor dos transportadores de glicose, a citocalasina B. Podemos observar que tanto o OP neuropático (mipafox), quanto o OP não neuropático (paraoxon) prejudicaram significativamente a captação da glicose, assim como o triclorfom. Assim, podemos predizer que a captação da glicose não é uma característica somente dos OPs neuropáticos, a ver que vários estudos que correlacionam perturbações nas vias metabólicas causadas por praguicidas, como perturbações na captação da glicose,

não se reportam apenas a OPs neuropáticos, já que essas substâncias são capazer de agir em diversos órgãos além do sistema nervoso, sendo que fígado, músculos e pâncreas também estão envolvidos nas vias metabólicas da glicose. Um estudo realizado por LASRAM *et al.* (2009) mostrou que a hiperglicemia induzida pelo OP malationa foi associada à inibição da AChE no pâncreas, e houve uma tendência de reversibilidade que coincidiu com a reativação espontânea de AChE inibida.

Com a finalidade de avaliar possíveis estratégias de neuroproteção, alguns compostos que podem interferir em algum ponto dos mecanismos de neurotoxicidade dos OPs neuropáticos foram avaliados. Como o mipafox já é bem estabelecido indutor da NRIOP, os possíveis neuroprotetores foram adicionados às células juntamente com este OP (nas concentrações que causam pelo menos 70% de inibição e envelhecimento da ESNp), a fim de se comparar as células expostas somente ao mipafox com as células expostas ao mipafox associado com os possíveis neuroprotetores. Foram utilizados dois bloqueadores de canais de cálcio - amilorida (bloqueador do tipo T) e nimodipino (bloqueador tipo L) -, o inibidor de calpaínas MDL 28170 e um agonista do GLP-1 (liraglutida) foram utilizados como estratégias de neuroproteção.

A fim de se escolher a concentração dos possíveis neuroprotetores a serem utilizadas, foi realizado o ensaio de MTT para avaliar a sua ação protetora contra a citotoxicidade induzida pelo MPP⁺, uma neurotoxina dopaminérgica associada ao Parkinsonismo *in vivo*, uma vez que a concentração mipafox utilizado utilizada neste trabalho foi uma concentração que não causou uma diminuição da viabilidade celular, como mostrado pelo ensaio de viabilidade celular da redução do MTT e liberação da LDH. O MPP⁺ foi utilizado como modelo de neurotoxina porque também é capaz de alterar a homeostase do cálcio e ativar proteases cálcio dependentes, mecanismos semelhantes aos OPs neuropáticos (CHEN, KOUTSILIERI e RAUSCH, 1995; OBATA, 2003). Adicionalmente, alguns trabalhos sugerem que bloqueadores de canais de cálcio, incluindo nimodipino e amilorida, podem atuar como neuroprotetores contra a neurotoxicidade induzida por MPP⁺ *in vivo* e *in vitro* (KUPSCH *et al.*, 1995; ARIAS *et al.*, 2008; ZHANG RUN-PING, 2014). Assim, foi escolhido o MPP⁺ ao invés do mipafox porque uma concentração citotóxica de mipafox desencadearia um mecanismo diferente de neurotoxicidade.

Quanto aos bloqueadores de canais de cálcio, a amilorida mostrou que nas concentrações de 1 ng/ml até 50 µg/mL, houve um aumento significativo na

viabilidade celular quando comparado com o grupo tratado apenas com MPP⁺, mas na concentração de 100 µg/mL ocorreu uma diminuição na viabilidade celular. As concentrações de nimodipino de 1ng/ml até 1µg/ml causaram um aumento da viabilidade celular, no entanto, a partir de 50µg/mL houve um efeito prejudicial na viabilidade. Estes resultados indicam que os bloqueadores de canais de cálcio podem proteger as células contra a citotoxicidade causada pelo MPP⁺, mas esta proteção é dose dependente, indicando que um bloqueio forte dos canais de cálcio pode prejudicar a manutenção dos processos celulares que dependem da sinalização do cálcio, uma vez que a homeostase cálcica é vital para a sobrevivência dos neurônios e muito importante para vários processos, incluindo a liberação de neurotransmissores, coagulação sanguínea, manutenção das membranas celulares e secreção (KUPSCH *et al.*, 1995; BERRIDGE, LIPP e BOOTMAN, 2000; MURGIA *et al.*, 2009; KOPECKY, LIANG e BAO, 2014; SIMMS e ZAMPONI, 2014; ZHANG RUN-PING, 2014).

Os bloqueadores dos canais de cálcio vêm sendo avaliados quanto ao seu papel neuroprotetor através da redução do influxo excessivo de cálcio, da melhoria do fluxo sanguíneo cerebral e/ou outras cascatas de sinalização. O tratamento com mipafox associado com amilorida foi capaz de diminuir o influxo excessivo de cálcio para o interior das células. Amilorida é um diurético poupador de potássio, que bloqueia seletivamente os canais de cálcio ativados por baixa voltagem (tipo T), e tem sido utilizado como uma ferramenta farmacológica para identificar os canais de cálcio do tipo T (TYTGAT, VEREECKE e CARMELIET, 1990). De acordo com LOPEZ-CHARCAS, RIVERA e GOMORA (2012) foi o primeiro bloqueador orgânico que bloqueia seletivamente os canais de cálcio do tipo T nativos. Canais de cálcio do tipo T estão presentes predominantemente nos neurónios e são conhecidos por desempenhar papéis no desenvolvimento, manutenção e reparação deste tecido, mas também têm sido implicadas no desenvolvimento de doenças quando não devidamente regulados (KOPECKY, LIANG e BAO, 2014). No tratamento com mipafox associado com nimodipino, um bloqueador de canais de cálcio ativado por alta voltagem (tipo L), houve também diminuição da sobrecarga de cálcio, e devido à capacidade deste composto em atravessar a barreira hemato-encefálica de forma mais eficaz, ele poderia ser a droga de escolha como um possível tratamento para a NRIOP. Bloqueadores de cálcio tipo L tem demonstrado capacidade de melhorar os sinais e sintomas da NRIOP. Alguns autores demonstraram o efeito protetor do
verapamil em galinhas tratadas com fenilsaligenin fosfato (PSP) ou tri-orto-fosfato (TOCP). CHOUDHARY e GILL (2001) demonstraram que ratos tratados com diclorvós tiveram uma diminuição nos níveis de cálcio intracelular quando foi administrado nimodipino. Quanto à ativação das calpaínas, proteases cálcio dependentes, os tratamentos com mipafox associado com nimodipino e mipafox associado com amilorida diminuíram a atividade desta enzima quando comparado ao grupo tratado somente com mipafox, indicando que causando uma diminuição da entrada de cálcio nas células há também uma diminuição da atividade das calpaínas.

Sabe-se que a perturbação da homeostase do cálcio pode levar a morte celular. Um desequilíbrio de cálcio nas células pode desencadear cascatas de sinalização que conduzem à ativação de caspase-3, considerada como sendo uma das mais importantes das caspases executoras (SAKAHIRA, ENARI e NAGATA, 1998; ELMORE, 2007). Mipafox causou um aumento significativo da atividade da caspase-3, enquanto os tratamentos com mipafox associado com amilorida e mipafox associado com nimodipino foram capazes de diminuir a atividade da caspase-3. Na avaliação da morfologia nuclear para avaliação de necrose e apoptose utilizando o fluorocromo DNA-específico Hoechst 33342 (HO) e lodeto de propídeo (IP), o mipafox levou ao aparecimento de células com características de apoptose, mas com poucas células coradas pelo IP. Amilorida e nimodipino causaram uma diminuição das células coradas com HO que apresentavam alterações nucleares características de apoptose e também diminuíram o número de células coradas com IP. Isso indica que a indução de morte celular causada pelo mipafox, ainda que baixa por não ter sido detectada pelos métodos de avaliação de viabilidade celular, foi diminuída pelos dois bloqueadores de canais de cálcio testados.

Os resultados do efeito protetor dos bloqueadores dos canais de cálcio sobre o crescimento de neuritos mostraram que as células tratadas com mipafox associado com amilorida e mipafox associado com nimodipino tiveram uma maior porcentagem de células com neuritos e do comprimento dos neuritos a partir de 24 horas de tratamento quando comparado ao grupo tratado somente com mipafox. Na análise das proteínas GAP-43, sinapsina I e sinaptofisina observou-se que houve um aumento da concentração destas proteínas nos grupos tratados com mipafox associado com amilorida e mipafox associado com nimodipino quando comparado com o grupo tratado somente com mipafox. Em relação às proteínas de citoesqueleto, as células tratadas com mipafox associado com amilorida e mipafox associado com nimodipino causaram aumento da intensidade de fluorescência na análise do NF-200 e aumentou a concentração de f-actina quando comparado ao grupo tratado somente com mipafox. No caso da β -III tubulina, somente o grupo tratado com mipafox associado com nimodipino teve um aumento significativo quando comparado ao mipafox, indicando que o bloqueador do tipo T não foi capaz de impedir os efeitos prejudiciais do mipafox sobre a β -III tubulina.

Somente o bloqueador de canais de cálcio (tipo L) nimodipino foi capaz de reduzir a concentração de IL1-β induzida pelo mipafox. As células tratadas com mipafox associado com nimodipino tiveram uma diminuição da concentração desta citocina inflamatória quando comparado ao grupo tratado somente com mipafox. As células tratadas com mipafox associado com amilorida não tiveram uma redução da concentração de IL-1ß quando comparado às células tratadas somente com mipafox. Estudos demonstram que os OPs têm a capacidade de gerar neuroinflamação, e a concentração de IL-16 é um indicativo de processo inflamatório. Dos vários alvos moleculares e mecanismos alternativos propostos para mediar a neurotoxicidade dos OPs (CASIDA e QUISTAD, 2005; PANCETTI et al., 2007; SOLTANINEJAD e ABDOLLAHI, 2009; LOCKRIDGE e SCHOPFER, 2010; BANKS e LEIN, 2012), a inflamação é de interesse por causa de evidências que sugerem que agentes anti-inflamatórios são neuroprotetores após intoxicações agudas intoxicação com OP (AMITAI et al., 2006) e por causa da disponibilidade de biomarcadores periféricos quantitativos de inflamação validados experimentalmente que se correlacionam bem com déficits neurocomportamentais observados em consequência de doenças neurodegenerativas. O mipafox não foi capaz de alterar a concentração de IL-6, assim como os tratamentos com mipafox associado com amilorida e mipafox associado com nimodipino. A concentração de IL-6 é aumentada em várias doenças do SNC crônicas ou agudas, como por exemplo, lesão cerebral, isquemia, infecção, e esclerose múltipla, bem como doenças de Alzheimer e Parkinson. Porém, alguns estudos vêm demonstrando que a IL-6 protege os neurônios contra excitotoxicidade *in vitro*, e previne o cérebro de ataques isquêmicos ou de excitotoxicidade in vivo (GRUOL e NELSON, 2005; WANG et al., 2009). Assim, a compreensão da dicotomia patogênese / neuroproteção de IL-6 pode proporcionar uma base para melhores estratégias terapêuticas e novos estudos

precisam ser realizados para a avaliação do potencial dos compostos OPs em induzir processo inflamatório.

Quanto a captação celular de glicose, os dois bloqueadores de canais de cálcio foram capazes de causar um aumento desta captação. As células tratadas com mipafox associado com amilorida e mipafox associado com nimodipino tiveram uma captação maior quando comparadas às células tratadas somente com mipafox. A homeostase do cálcio é muito importante para diversos processos celulares, e vários estudos sugerem que em modelos animais e em pacientes diabéticos, a concentração intracelular anormal de cálcio é um defeito comum tanto no diabetes insulino-dependente (tipo 1) quanto no insulino-independente (tipo 2). A glicose provoca um aumento rápido de cálcio intracelular, principalmente estimulando seu influxo. Sob condições fisiológicas, a glicose também pode promover a mobilização do cálcio das reservas intracelulares em virtude da estimulação da hidrólise de fosfolípidos na membrana e da formação trifosfato de inositol (IP3), um potente estímulo para a mobilização de cálcio do retículo endoplasmático (DRAZNIN, 1988). Em estudo realizado por LU et al. (2014), foi demonstrado que canais de cálcio do tipo T podem ser novos alvos terapêuticos para hiperglicemia, e que bloqueadores destes canais podem reduzir a glicose basal, reduzindo a produção de glicose no fígado e diminuindo a liberação basal de insulina ou síntese por células ß pancreáticas. Um aumento na captação de glicose pelos tecidos periféricos sensíveis à insulina e uma melhorar na razão glicose/insulina foi observada em pacientes com diabetes do tipo 2 com hipertensão ou obesidade e em pacientes com hipertensão e diminuição na tolerância à glicose tratados com nifedipino em baixas doses a longo prazo (BRIEDE et al., 2004).

Na escolha da concentração a ser utilizada do inibidor de calpaínas MDL 28170, também foi realizado o ensaio de MTT para avaliar a sua função protetora contra a citotoxicidade induzida pelo MPP⁺. Foi observado que em concentrações de 1 a 100µM houve aumento da viabilidade celular. Concentrações acima de 500µM causaram diminuição da viabilidade celular, indicando que uma forte inibição da atividade desta enzima foi prejudicial para a sobrevivência das células. No ensaio para verificar o cálcio intracelular, foi observado que as concentrações intracelulares de cálcio ainda foram maiores que no controle negativo, porém, em relação às células tratadas somente com o mipafox, houve uma diminuição significativa. Ele foi capaz de reduzir o aumento da atividade da caspase-3 e a porcentagem de células

apoptóticas induzidas pelo mipafox. Nos ensaios de crescimento de neuritos, também foi capaz de proteger contra a inibição do crescimento de neuritos causada pelo mipafox.

Na análise das proteínas GAP-43, sinapsina I, sinaptofisina, f-actina e NF-200 em células tratadas com mipafox associado com MDL, observou-se que houve um aumento da concentração destas proteínas quando comparado ao grupo exposto somente ao mipafox, indicando que as calpainas podem estar implicadas nas alterações na sinaptogênese, manutenção dos axônios, neuritogênese, manutenção do citoesqueleto e neurosecreção. A concentração de β-III tubulina não foi significativamente aumentada quando comparado ao grupo tratado somente com mipafox. Em relação à indução de neuroinflamação, este inibidor de calpaínas foi capaz de reduzir a concentração da citocina pró-inflamatória IL-1β causada pelo mipafox.

Quanto à captação celular de glicose, este composto foi capaz de aumentar esta captação em células tratadas com mipafox associado com MDL quando comparadas às células tratadas somente com mipafox. Resultados experimentais indicam que a calpaína-10 e outras calpaínas estão envolvidas nas vias metabólicas associadas a diabetes do tipo 2, e que inibidores de calpaínas são capazes de afetar fortemente o metabolismo da glicose, ação da insulina e resistência à insulina (PANDURANGAN *et al.*, 2014).

A ativação de calpaínas está envolvida em inúmeras desordens neurológicas crônicas e agudas, incluindo isquemia cerebral, doença de Parkinson, doença de Alzheimer e neuropatias periféricas. Apesar do seu reconhecimento nestes transtornos, o mecanismo exato que desencadeia a ativação destas enzimas e os seus objetivos específicos ainda não são completamente esclarecidos. Pode ser que a ativação das calpaínas seja um efeito que vai desencadear as lesões celulares, incluindo a interrupção do transporte axonal que leva à degradação do citoesqueleto, a fragmentação do DNA, a apoptose e, finalmente, morte celular. Assim, os inibidores de calpaínas podem ser uma boa abordagem para a neuroproteção em muitos distúrbios neurológicos (CANER *et al.*, 1993; LI *et al.*, 1996; LI, HOGAN e BANIK, 1996; HUANG e WANG, 2001; ATALAY *et al.*, 2007; AMINI *et al.*, 2013; BAUDRY, CHOU e BI, 2013; DAS *et al.*, 2013).

Outra substância utilizada como possível neuroprotetora foi a liraglutida, um agonista do GLP-1 ("Glucagon-like peptide 1"), capaz de atravessar a barreira

hemato-encefálica e cujo efeito neuroprotetor tem sido demonstrado em estudos recentes. SHARMA, JALEWA e HOLSCHER (2014) encontraram efeitos protetores na formação da memória, plasticidade sináptica, sobrevivência sináptica, redução da síntese amilóide e redução da carga de placa no cérebro de modelo animal de doença de Alzheimer. A liraglutida pode se ligar ao GLP-1R, que é acoplado a segundos mensageiros que fazem parte de uma cascata de sinalização relacionada fatores de crescimento e diminuição de apoptose, assim como pode melhorar a liberação de outros fatores de crescimento no cérebro, como BDNF e NGF (SHARMA, JALEWA e HOLSCHER, 2014).

No ensaio realizado para a escolha da concentração a ser utilizada, todas as concentrações testadas levaram a um aumento da viabilidade celular, indicando potencial neuroprotetor desta substância. Este possível neuroprotetor foi capaz de reduzir significativamente a porcentagem de células apoptóticas quando comparado ao grupo tratado somente com mipafox, foi capaz de diminuir a concentração da citocina pro-inflamatória IL-1β e nos ensaios de crescimento de neuritos, causou um aumento da porcentagem de células com neuritos e o comprimento dos neuritos quando comparado ao grupo tratado somente com mipafox.

Na análise das proteínas NF-200, f-actina, β-III tubulina, sinapsina I e sinaptofisina, observou-se que a liraglutida foi capaz de aumentar a concentração de todas estas proteínas, quando comparado ao grupo tratado somente com mipafox. No caso do GAP-43, no grupo tratado com mipafox associado com liraglutida não houve aumento significativo em sua concentração quando comparado ao grupo tratado somente com mipafox. Apesar deste resultado com o GAP-43, os resultados para o restante das proteínas vêm mostrando que esta substância tem um potencial efeito neuroprotetor. Uma variedade de estudos pré-clínicos indicam que a liraglutida possui uma gama de efeitos neuroprotetores, como por exemplo a proteção da formação da memória em modelo de doença de Alzheimer (AD) em ratos, a proteção da plasticidade sináptica no hipocampo, prevenção da perda de sinapses e redução dos níveis de placas amilóides e os níveis de amilóides oligoméricas solúveis, (MCCLEAN et al., 2011; HUNTER e HOLSCHER, 2012; HAN et al., 2013) a normalização da neurogênese e proliferação de células progenitoras no hipocampo (HAMILTON et al., 2011; PARTHSARATHY e HOLSCHER, 2013)) e uma redução resposta inflamatória crônica no cérebro (MCCLEAN et al., 2011; da PARTHSARATHY e HOLSCHER, 2013).

Os resultados do ensaio da captação celular da glicose demostraram que as células tratadas com mipafox associado com liraglutida tiveram uma captação maior do que a das células tratadas somente com o mipafox. Vários agonistas do GLP-1 podem atravessar a barreira hemato encefálica e vêm demonstrando efeitos neuroprotetores em modelos animais de doença de Parkinson e Alzheimer. A administração de liraglutida em vários modelos animais e em humanos estimula a liberação de insulina dependente de glicose e diminui a secreção de glucagon (MANNUCCI, 2010). O GLP-1 e o seu receptor têm sido localizados no sistema nervoso central de humanos, e a administração periférica de GLP-1 em humanos normais reduz significativamente o metabolismo da glicose no hipotálamo e no tronco cerebral (ALVAREZ *et al.*, 2005). Embora dados em humanos sejam limitados, a avaliação quantitativa da expressão do receptor do GLP1 (GLP1R) no hipotálamo humano revelou uma redução significativa da expressão destes receptores em secções hipotalâmicas de 8 pacientes com diabetes do tipo 2, em comparação com controles não diabéticos (TEN KULVE *et al.*, 2016).

8 CONCLUSÕES

O modelo *in vitro* utilizando células da linhagem SH-SY5Y de neuroblastoma humano mostrou-se apropriado para triagem dos OPs como neuropáticos ou nãoneuropáticos, pois, como esperado, o mipafox (indutor de NRIOP) apresentou razão IC50ESNp/IC50AChE menor que 5 e maior taxa de envelhecimento entre todos os OP avaliados, enquanto que o paraoxon (não-indutor da NRIOP) apresentou razão IC50ESNp/IC50AChE maior que 5 e reduzida taxa de envelhecimento da ESNp.

Este estudo demonstrou que a utilização de células SH-SY5Y diferenciadas é adeguada para a avaliação dos mecanismos de neurotoxicidade de OPs e pode ser usado como um modelo para estudar os efeitos destes compostos sobre a neuritogênese e sinaptogênese. Triclorfom causou efeitos neurotóxicos semelhantes aos do mipafox (OP neuropático) quanto a percentagem de células com neuritos, o comprimento dos neuritos, concentração de GAP43, NF200, sinapsina I, sinaptofisina, β-III tubulina, NF-200, f-actina, citotoxicidade, ativação de caspase-3 e indução de apoptose em concentrações que induziram pelo menos 70% de inibição da ESNp e deverá ser considerado para estudos em modelos animais. Estes resultados sugerem que o desenvolvimento da NRIOP pode estar relacionado a efeitos deletérios sobre a neuritogênese, sinaptogênese, manutenção axonal, manutenção do citoesqueleto e neurosecreção. O paraoxon (OP não neuropático) não provocou efeitos significativos sobre a concentração de NF200 e f-actina, mas levou a uma diminuição, menor do que a diminuição causada por mipafox e triclorfom, do comprimento dos neuritos, da porcentagem de células com neuritos, da concentração de GAP43, sinapsina I, β-III tubulina e sinaptofisina. Além do mais, ele causou alta citotoxicidade em concentrações que causaram pelo menos 70% de inibição da ESNp, indicando que OPs não neuropáticos também são capazes de interferir na sinaptogênese neuritogênese por outras vias.

As quatro substâncias com potencial neuroprotetor tiveram efeito positivo, pois protegeram contra: ativação das calpaínas (nimodipino e amilorida), aumento de cálcio intracelular (MDL, amilorida e nimodipino), apoptose e inibição do crescimento de neuritos (as quatro substâncias) e indução de processo inflamatório (nimodipino e MDL) provocados pelo mipafox.

Estes resultados sugerem que somente a inibição da AChE não é suficiente para explicar os diversos efeitos tóxicos causados pelos OPs, e que estes compostos podem agir em vários alvos causando efeitos deletérios.

REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, M. et al. Hyperglycemia associated with increased hepatic glycogen phosphorylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in rats following subchronic exposure to malathion. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol,** v. 137, n. 4, p. 343-7, Apr 2004.

ABDOLLAHI, M.; KARAMI-MOHAJERI, S. A comprehensive review on experimental and clinical findings in intermediate syndrome caused by organophosphate poisoning. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 258, n. 3, p. 309-14, Feb 1 2012.

ABOU-DONIA, M. B. The cytoskeleton as a target for organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity (OPIDN). **Chem Biol Interact,** v. 87, n. 1-3, p. 383-93, Jun 1993.

ABOU-DONIA, M. B. Organophosphorus ester-induced chronic neurotoxicity. **Arch Environ Health,** v. 58, n. 8, p. 484-97, Aug 2003.

ABOU-DONIA, M. B.; LAPADULA, D. M.; SUWITA, E. Cytoskeletal proteins as targets for organophosphorus compound and aliphatic hexacarbon-induced neurotoxicity. **Toxicology**, v. 49, n. 2-3, p. 469-77, May 1988.

ADEM, A. et al. Muscarinic receptors in human SH-SY5Y neuroblastoma cell line: regulation by phorbol ester and retinoic acid-induced differentiation. **Brain Res**, v. 430, n. 2, p. 235-42, Jun 1987.

AGRICULTURA, M. D. Balança Comercial do Agronegócio. Ministério da Agricultura 2016.

AKHGARI, M. et al. Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. **Hum Exp Toxicol**, v. 22, n. 4, p. 205-11, Apr 2003.

ALBERTS, B. Biologia Molecular da Célula. 5. 2010. ISBN 978-0-8153-4105-5.

ALVAREZ, E. et al. The expression of GLP-1 receptor mRNA and protein allows the effect of GLP-1 on glucose metabolism in the human hypothalamus and brainstem. **J Neurochem**, v. 92, n. 4, p. 798-806, Feb 2005.

AMINI, M. et al. Conditional disruption of calpain in the CNS alters dendrite morphology, impairs LTP, and promotes neuronal survival following injury. **J Neurosci**, v. 33, n. 13, p. 5773-84, Mar 27 2013.

AMITAI, G. et al. Bifunctional compounds eliciting anti-inflammatory and anti-cholinesterase activity as potential treatment of nerve and blister chemical agents poisoning. **J Appl Toxicol**, v. 26, n. 1, p. 81-7, Jan-Feb 2006.

AMORIN, M. M. E. A. A Homeopatia na prevenção das doenças de origem ambiental por agrotóxicos: um estudo de caso com engenheiros agrônomos e técnicos agrícolas. FIOCRUZ. Rio de Janeiro 2003.

ANTHONY, D. C., MONTINE, T.J., VALENTINE, W.M., GRAHAM, D.G. . Toxic responses of the nervous system. . In: KLAASSEN, C. D. (Ed.). **Casarett and Doull Toxicology: The Basic Science of Poisons**. New York.: McGraw-Hill, 978-0-07-134721-1, 2001. p.535–559.

ANVISA. DECRETO № 4.074, DE 4 DE JANEIRO DE 2002. Brasília 2002.

ANVISA. Agrotóxicos e Toxicologia/Assuntos de Interesse/Monografias de Agrotóxico. AGROTOXICOS. Brasília 2012.

ARATAKI, S. et al. Calpain inhibitors prevent neuronal cell death and ameliorate motor disturbances after compression-induced spinal cord injury in rats. **J Neurotrauma**, v. 22, n. 3, p. 398-406, Mar 2005.

ARIAS, R. L. et al. Amiloride is neuroprotective in an MPTP model of Parkinson's disease. **Neurobiol Dis**, v. 31, n. 3, p. 334-41, Sep 2008.

ARNOULT, C.; VILLAZ, M.; FLORMAN, H. M. Pharmacological properties of the T-type Ca2+ current of mouse spermatogenic cells. **Mol Pharmacol**, v. 53, n. 6, p. 1104-11, Jun 1998.

ARSENAULT, A. L.; GIBSON, M. A.; MADER, M. E. Hypoglycemia in malathion-treated chick embryos. **Can J Zool**, v. 53, n. 8, p. 1055-7, Aug 1975.

ATALAY, B. et al. Attenuation of microtubule associated protein-2 degradation after mild head injury by mexiletine and calpain-2 inhibitor. **Br J Neurosurg**, v. 21, n. 3, p. 281-7, Jun 2007.

AURIEL, E.; BORNSTEIN, N. M. Neuroprotection in acute ischemic stroke--current status. J Cell Mol Med, v. 14, n. 9, p. 2200-2, Sep 2010.

AVILES-OLMOS, I. et al. Parkinson's disease, insulin resistance and novel agents of neuroprotection. **Brain**, v. 136, n. Pt 2, p. 374-84, Feb 2013.

BABU, C. S.; RAMANATHAN, M. Post-ischemic administration of nimodipine following focal cerebral ischemic-reperfusion injury in rats alleviated excitotoxicity, neurobehavioural alterations and partially the bioenergetics. **Int J Dev Neurosci**, v. 29, n. 1, p. 93-105, Feb 2011.

BAHR, B. A. et al. Induction of calpain-mediated spectrin fragments by pathogenic treatments in long-term hippocampal slices. **J Pharmacol Exp Ther,** v. 273, n. 2, p. 902-8, May 1995.

BALLARD, R.; BARDSLEY, R. G.; BUTTERY, P. J. Changes in the activity of skeletal muscle calciumactivated neutral proteinase (EC 3.4.22.17) and its specific inhibitor in chickens grown at different rates in response to graded levels of dietary protein. **Br J Nutr,** v. 59, n. 1, p. 141-7, Jan 1988.

BANKS, C. N.; LEIN, P. J. A review of experimental evidence linking neurotoxic organophosphorus compounds and inflammation. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 3, p. 575-84, Jun 2012.

BATISTA, B. L. et al. Exploiting dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) for sequential determination of trace elements in blood using a dilute-and-shoot procedure. **Anal Chim Acta**, v. 639, n. 1-2, p. 13-8, Apr 20 2009.

BAUDRY, M.; CHOU, M. M.; BI, X. Targeting calpain in synaptic plasticity. **Expert Opin Ther Targets,** v. 17, n. 5, p. 579-92, May 2013.

BECKER, R. E. et al. Double-blind, placebo-controlled study of metrifonate, an acetylcholinesterase inhibitor, for Alzheimer disease. **Alzheimer Dis Assoc Disord**, v. 10, n. 3, p. 124-31, Fall 1996.

BECKER, R. E. et al. Effects of metrifonate on cognitive decline in Alzheimer disease: a double-blind, placebo-controlled, 6-month study. **Alzheimer Dis Assoc Disord**, v. 12, n. 1, p. 54-7, Mar 1998.

BENITEZ-TRINIDAD, A. B. et al. Cytostatic and genotoxic effect of temephos in human lymphocytes and HepG2 cells. **Toxicol In Vitro,** v. 29, n. 4, p. 779-86, Jun 2015.

BENOWITZ, L. I.; ROUTTENBERG, A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. **Trends Neurosci,** v. 20, n. 2, p. 84-91, Feb 1997.

BENVENISTE, E. N. Cytokine actions in the central nervous system. **Cytokine Growth Factor Rev,** v. 9, n. 3-4, p. 259-75, Sep-Dec 1998.

BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 1, n. 1, p. 11-21, Oct 2000.

BEZERRA, E. B. E. A. Resistência de Populações de Aedes aegypti (L.) (Diptera: Culicidae) ao Organofosforado Temefós na Paraíba. **Neotropical Entomology** v. 36, n. 2, p. 303-309, 2007.

BIGBEE, J. W. et al. Evidence for the direct role of acetylcholinesterase in neurite outgrowth in primary dorsal root ganglion neurons. **Brain Res**, v. 861, n. 2, p. 354-62, Apr 10 2000.

BISCHOFF, A. The ultrastructure of tri-ortho-cresyl phosphate-poisoning. I. Studies on myelin and axonal alterations in the sciatic nerve. **Acta Neuropathol**, v. 9, n. 2, p. 159-74, Oct 20 1967.

BONELLI, R. Labor Productivity in Brazil during the 1990s IPEA, Rio de Janeiro, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

BRADKE, F.; DOTTI, C. G. Neuronal polarity: vectorial cytoplasmic flow precedes axon formation. **Neuron**, v. 19, n. 6, p. 1175-86, Dec 1997.

BRIEDE, J. et al. Effect of new and known 1,4-dihydropyridine derivatives on blood glucose levels in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Cell Biochem Funct**, v. 22, n. 4, p. 219-24, Jul-Aug 2004.

BROWNING, M. D. et al. Significant reductions in synapsin but not synaptophysin specific activity in the brains of some schizophrenics. **Biol Psychiatry**, v. 34, n. 8, p. 529-35, Oct 15 1993.

BUROKER-KILGORE, M.; WANG, K. K. A Coomassie brilliant blue G-250-based colorimetric assay for measuring activity of calpain and other proteases. **Anal Biochem,** v. 208, n. 2, p. 387-92, Feb 1 1993.

BUTTIGLIONE, M. et al. Behaviour of SH-SY5Y neuroblastoma cell line grown in different media and on different chemically modified substrates. **Biomaterials,** v. 28, n. 19, p. 2932-45, Jul 2007.

CANER, H. et al. Attenuation of AMPA-induced neurotoxicity by a calpain inhibitor. **Brain Res**, v. 607, n. 1-2, p. 354-6, Apr 2 1993.

CARBONE, E.; CALORIO, C.; VANDAEL, D. H. T-type channel-mediated neurotransmitter release. **Pflugers Arch**, v. 466, n. 4, p. 677-87, Apr 2014.

CARLSON, K.; EHRICH, M. Organophosphorus compound-induced modification of SH-SY5Y human neuroblastoma mitochondrial transmembrane potential. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 160, n. 1, p. 33-42, Oct 1 1999.

CARLSON, K.; EHRICH, M. Organophosphorus compounds alter intracellular F-actin content in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. **Neurotoxicology**, v. 22, n. 6, p. 819-27, Dec 2001.

CARLSON, K.; JORTNER, B. S.; EHRICH, M. Organophosphorus compound-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 168, n. 2, p. 102-13, Oct 15 2000.

CARVALHO, M. S. L. E. A. Susceptibility of Aedes aegypti larvae to the insecticide temephos in the Federal District, Brazil. **Rev Saúde Pública** v. 38, n. 5, p. 1-6, 2004.

CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Serine hydrolase targets of organophosphorus toxicants. **Chem Biol Interact**, v. 157-158, p. 277-83, Dec 15 2005.

CASTILLO, M. R.; BABSON, J. R. Ca(2+)-dependent mechanisms of cell injury in cultured cortical neurons. **Neuroscience**, v. 86, n. 4, p. 1133-44, Oct 1998.

CATTERALL, W. A.; FEW, A. P. Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. **Neuron**, v. 59, n. 6, p. 882-901, Sep 25 2008.

CECCALDI, P. E. et al. Dephosphorylated synapsin I anchors synaptic vesicles to actin cytoskeleton: an analysis by videomicroscopy. **J Cell Biol**, v. 128, n. 5, p. 905-12, Mar 1995.

CHAKRABORTY, S. et al. Chronic exposures to cholinesterase-inhibiting pesticides adversely affect respiratory health of agricultural workers in India. **J Occup Health**, v. 51, n. 6, p. 488-97, 2009.

CHANG, P. A. et al. Effect of carbamate esters on neurite outgrowth in differentiating human SK-N-SH neuroblastoma cells. **Chem Biol Interact**, v. 159, n. 1, p. 65-72, Jan 05 2006.

CHEN, T. S.; KOUTSILIERI, E.; RAUSCH, W. D. MPP+ selectively affects calcium homeostasis in mesencephalic cell cultures from embryonal C57/Bl6 mice. J Neural Transm Gen Sect, v. 100, n. 2, p. 153-63, 1995.

CHEUNG, Y. T. et al. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. **Neurotoxicology**, v. 30, n. 1, p. 127-35, Jan 2009.

CHIN, L. S. et al. Impairment of axonal development and of synaptogenesis in hippocampal neurons of synapsin I-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 92, n. 20, p. 9230-4, Sep 26 1995.

CHO, T.; TIFFANY-CASTIGLIONI, E. Neurofilament 200 as an indicator of differences between mipafox and paraoxon sensitivity in Sy5Y neuroblastoma cells. **J Toxicol Environ Health A,** v. 67, n. 13, p. 987-1000, Jul 9 2004.

CHOUDHARY, S.; GILL, K. D. Protective effect of nimodipine on dichlorvos-induced delayed neurotoxicity in rat brain(1). **Biochem Pharmacol**, v. 62, n. 9, p. 1265-72, Nov 1 2001.

CHOUDHARY, S. et al. The L-type calcium channel blocker nimodipine mitigates cytoskeletal proteins phosphorylation in dichlorvos-induced delayed neurotoxicity in rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 98, n. 5, p. 447-55, May 2006.

CHRISTENSEN, M. et al. Lixisenatide for type 2 diabetes mellitus. **Expert Opin Investig Drugs,** v. 20, n. 4, p. 549-57, Apr 2011.

COBB, J. P. et al. Mechanisms of cell injury and death. Br J Anaesth, v. 77, n. 1, p. 3-10, Jul 1996.

COLOVIC, M. B. et al. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. **Curr Neuropharmacol**, v. 11, n. 3, p. 315-35, May 2013.

CONSTANTINESCU, R. et al. Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y. J Neural Transm Suppl, n. 72, p. 17-28, 2007.

CORRELL, L.; EHRICH, M. A microassay method for neurotoxic esterase determinations. **Fundam Appl Toxicol**, v. 16, n. 1, p. 110-6, Jan 1991.

COSTA, L. G. Toxic effects of pesticides In: (ED), K. C. (Ed.). Casarett & Doulls toxicology: the basic science of poisons, 2007. p.883-930. ISBN 978-0-07-134721-1.

DA SILVA, J. S.; DOTTI, C. G. Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. **Nat Rev Neurosci,** v. 3, n. 9, p. 694-704, Sep 2002.

DANI, J. W.; ARMSTRONG, D. M.; BENOWITZ, L. I. Mapping the development of the rat brain by GAP-43 immunocytochemistry. **Neuroscience**, v. 40, n. 1, p. 277-87, 1991.

DAS, A. et al. Calpain inhibitor attenuated optic nerve damage in acute optic neuritis in rats. J **Neurochem,** v. 124, n. 1, p. 133-46, Jan 2013.

DAS, K. P.; FREUDENRICH, T. M.; MUNDY, W. R. Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures. **Neurotoxicol Teratol**, v. 26, n. 3, p. 397-406, May-Jun 2004.

DEOTARE, S. T.; CHAKRABARTI, C. H. Effect of acephate (orthene) on tissue levels of thiamine, pyruvic acid, lactic acid, glycogen and blood sugar. **Indian J Physiol Pharmacol,** v. 25, n. 3, p. 259-64, Jul-Sep 1981.

DIVE, C. et al. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. **Biochim Biophys Acta**, v. 1133, n. 3, p. 275-85, Feb 3 1992.

DRAZNIN, B. Intracellular calcium, insulin secretion, and action. **Am J Med,** v. 85, n. 5A, p. 44-58, Nov 28 1988.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev,** v. 82, n. 1, p. 47-95, Jan 2002.

DRUCKER, D. J.; NAUCK, M. A. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. **Lancet**, v. 368, n. 9548, p. 1696-705, Nov 11 2006.

DUKE, R. C.; OJCIUS, D. M.; YOUNG, J. D. Cell suicide in health and disease. **Sci Am**, v. 275, n. 6, p. 80-7, Dec 1996.

DURANTE, P. et al. Low-threshold L-type calcium channels in rat dopamine neurons. **J Neurophysiol**, v. 91, n. 3, p. 1450-4, Mar 2004.

DWANE, S.; DURACK, E.; KIELY, P. A. Optimising parameters for the differentiation of SH-SY5Y cells to study cell adhesion and cell migration. **BMC Res Notes**, v. 6, p. 366, 2013.

EHRICH, M.; CORRELL, L. Inhibition of carboxylesterases in SH-SY5Y human and NB41A3 mouse neuroblastoma cells by organophosphorus esters. **J Toxicol Environ Health A,** v. 53, n. 5, p. 385-99, Mar 13 1998.

EHRICH, M.; CORRELL, L.; VERONESI, B. Acetylcholinesterase and neuropathy target esterase inhibitions in neuroblastoma cells to distinguish organophosphorus compounds causing acute and delayed neurotoxicity. **Fundam Appl Toxicol**, v. 38, n. 1, p. 55-63, Jul 1997.

EHRICH, M., CORRELL, L., CARLSON, K., WILCKE, J., AND VERONESI, B. Examinations of culture conditions on esterase activities in human and mouse neuroblastoma cells. **In Vitro Toxicol.**, v. 8, p. 199-207, 1995.

EHRICH, M.; JORTNER, B. S.; PADILLA, S. Relationship of neuropathy target esterase inhibition to neuropathology and ataxia in hens given organophosphorus esters. **Chem Biol Interact**, v. 87, n. 1-3, p. 431-7, Jun 1993.

EL-FAWAL, H. A. et al. Protease activity in brain, nerve, and muscle of hens given neuropathyinducing organophosphates and a calcium channel blocker. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 103, n. 1, p. 133-42, Mar 15 1990.

EL-FAWAL, H. A.; MCCAIN, W. C. Antibodies to neural proteins in organophosphorus-induced delayed neuropathy (OPIDN) and its amelioration. **Neurotoxicol Teratol**, v. 30, n. 3, p. 161-6, May-Jun 2008.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol**, v. 7, p. 88-95, Jul 1961.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 4, p. 495-516, Jun 2007.

EMERICK, G. L. et al. Mechanisms for consideration for intervention in the development of organophosphorus-induced delayed neuropathy. **Chem Biol Interact,** v. 199, n. 3, p. 177-84, Sep 30 2012.

EMERICK, G. L. et al. Comparative in vitro study of the inhibition of human and hen esterases by methamidophos enantiomers. **Toxicology**, v. 292, n. 2-3, p. 145-50, Feb 26 2012.

EMERICK, G. L. et al. Biochemical, histopathological and clinical evaluation of delayed effects caused by methamidophos isoforms and TOCP in hens: ameliorative effects using control of calcium homeostasis. **Toxicology**, v. 302, n. 1, p. 88-95, Dec 8 2012.

EMERICK, G. L.; PECCININI, R. G.; DE OLIVEIRA, G. H. Organophosphorus-induced delayed neuropathy: a simple and efficient therapeutic strategy. **Toxicol Lett**, v. 192, n. 2, p. 238-44, Feb 1 2010.

FLASKOS, J. The developmental neurotoxicity of organophosphorus insecticides: a direct role for the oxon metabolites. **Toxicol Lett**, v. 209, n. 1, p. 86-93, Feb 25 2012.

FOX, J. E. et al. Evidence that activation of platelet calpain is induced as a consequence of binding of adhesive ligand to the integrin, glycoprotein IIb-IIIa. **J Cell Biol**, v. 120, n. 6, p. 1501-7, Mar 1993.

GARTY, H.; BENOS, D. J. Characteristics and regulatory mechanisms of the amiloride-blockable Na+ channel. **Physiol Rev**, v. 68, n. 2, p. 309-73, Apr 1988.

GEARHART, D. A. et al. Chlorpyrifos, chlorpyrifos-oxon, and diisopropylfluorophosphate inhibit kinesin-dependent microtubule motility. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 218, n. 1, p. 20-9, Jan 1 2007.

GEORGE, E. B.; GLASS, J. D.; GRIFFIN, J. W. Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. **J Neurosci**, v. 15, n. 10, p. 6445-52, Oct 1995.

GIORDANO, C. et al. Acetylcholinesterase modulates neurite outgrowth on fibronectin. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 356, n. 2, p. 398-404, May 4 2007.

GLYNN, P. Neural development and neurodegeneration: two faces of neuropathy target esterase. **Prog Neurobiol**, v. 61, n. 1, p. 61-74, May 2000.

GLYNN, P. A mechanism for organophosphate-induced delayed neuropathy. **Toxicol Lett**, v. 162, n. 1, p. 94-7, Mar 15 2006.

GLYNN, P. Axonal degeneration and neuropathy target esterase. Arh Hig Rada Toksikol, v. 58, n. 3, p. 355-8, Sep 2007.

GOLDBERG, M. P.; CHOI, D. W. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. **J Neurosci**, v. 13, n. 8, p. 3510-24, Aug 1993.

GRUOL, D. L.; NELSON, T. E. Purkinje neuron physiology is altered by the inflammatory factor interleukin-6. **Cerebellum,** v. 4, n. 3, p. 198-205, 2005.

GUPTA, R. P.; ABOU-DONIA, M. B. In vivo and in vitro effects of diisopropyl phosphorofluoridate (DFP) on the rate of hen brain tubulin polymerization. **Neurochem Res**, v. 19, n. 4, p. 435-44, Apr 1994.

HAAN, M. N. Therapy Insight: type 2 diabetes mellitus and the risk of late-onset Alzheimer's disease. **Nat Clin Pract Neurol**, v. 2, n. 3, p. 159-66, Mar 2006.

HAMILTON, A. et al. Novel GLP-1 mimetics developed to treat type 2 diabetes promote progenitor cell proliferation in the brain. J Neurosci Res, v. 89, n. 4, p. 481-9, Apr 2011.

HAN, W. N. et al. Liraglutide protects against amyloid-beta protein-induced impairment of spatial learning and memory in rats. **Neurobiol Aging**, v. 34, n. 2, p. 576-88, Feb 2013.

HARGREAVES, A. J. et al. Inhibition of neurite outgrowth in differentiating mouse N2a neuroblastoma cells by phenyl saligenin phosphate: effects on MAP kinase (ERK 1/2) activation, neurofilament heavy chain phosphorylation and neuropathy target esterase activity. **Biochem Pharmacol**, v. 71, n. 8, p. 1240-7, Apr 14 2006.

HARRIS, W. et al. Effects of phenyl saligenin phosphate on cell viability and transglutaminase activity in N2a neuroblastoma and HepG2 hepatoma cell lines. **Toxicol In Vitro**, v. 23, n. 8, p. 1559-63, Dec 2009.

HAZARIKA, A. et al. Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study. **Toxicology**, v. 185, n. 1-2, p. 1-8, Mar 14 2003.

HENSCHLER, D. et al. The inhibitory effect of neuropathic organophosphate esters on neurite outgrowth in cell cultures: A basis for screening for delayed neurotoxicity. **Toxicol In Vitro**, v. 6, n. 4, p. 327-35, Jul 1992.

HIRANO, Y.; FOZZARD, H. A.; JANUARY, C. T. Characteristics of L- and T-type Ca2+ currents in canine cardiac Purkinje cells. **Am J Physiol**, v. 256, n. 5 Pt 2, p. H1478-92, May 1989.

HOGLUND, C. et al. A comparison of the effects of mibefradil and atenolol on regression of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. **Cardiology**, v. 89, n. 4, p. 263-70, May 1998.

HOLST, J. J.; GROMADA, J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 287, n. 2, p. E199-206, Aug 2004.

HOLST, J. J. et al. Truncated glucagon-like peptide I, an insulin-releasing hormone from the distal gut. **FEBS Lett**, v. 211, n. 2, p. 169-74, Jan 26 1987.

HORN, J. et al. Nimodipine in animal model experiments of focal cerebral ischemia: a systematic review. **Stroke**, v. 32, n. 10, p. 2433-8, Oct 2001.

HUANG, Y.; WANG, K. K. The calpain family and human disease. **Trends Mol Med,** v. 7, n. 8, p. 355-62, Aug 2001.

HUNTER, K.; HOLSCHER, C. Drugs developed to treat diabetes, liraglutide and lixisenatide, cross the blood brain barrier and enhance neurogenesis. **BMC Neurosci**, v. 13, p. 33, Mar 23 2012.

HUSAIN, K. Delayed Neurotoxicity of Organophosphorus Compounds. Journal of Environmental Immunology and Toxicology, v. 1, n. 1, p. 14-21, 2014.

HUSAIN, K.; ANSARI, R. A. Influence of cholinergic and adrenergic blocking drugs on hyperglycemia and brain glycogenolysis in diazinon-treated animals. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 66, n. 9, p. 1144-7, Sep 1988.

INOMATA, M. et al. Involvement of calpain in integrin-mediated signal transduction. **Arch Biochem Biophys**, v. 328, n. 1, p. 129-34, Apr 1 1996.

INOMATA, M., HAYASHI, M., NAKAMURA, M., IMAHORI, K., KAWASHIMA, S. . Purification and characterization of a calcium-activated neutral protease from rabbit skeletal muscle which requires calcium ions of μ M order concentration. **Journal of Biochemistry**, v. 93, p. 291-294, 1983.

INOUYE, K. E. O., G. H. . Avaliação crítica do tratamento farmacológico atual para doença de Alzheimer. **Infarma**, v. 15, p. 80-84, 2004.

JIANG, W. et al. Mice treated with chlorpyrifos or chlorpyrifos oxon have organophosphorylated tubulin in the brain and disrupted microtubule structures, suggesting a role for tubulin in neurotoxicity associated with exposure to organophosphorus agents. **Toxicol Sci**, v. 115, n. 1, p. 183-93, May 2010.

JOHNSON, M. K. The delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. Identification of the phosphorylation site as an esterase. **Biochem J,** v. 114, n. 4, p. 711-7, Oct 1969a.

JOHNSON, M. K. A phosphorylation site in brain and the delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. **Biochem J,** v. 111, n. 4, p. 487-95, Feb 1969b.

JOHNSON, M. K. Structure-activity relationships for substrates and inhibitors of hen brain neurotoxic esterase. **Biochem Pharmacol**, v. 24, n. 7, p. 797-805, Apr 1 1975.

JOHNSON, M. K. Improved assay of neurotoxic esterase for screening organophosphates for delayed neurotoxicity potential. **Arch Toxicol**, v. 37, n. 2, p. 113-5, Jun 18 1977.

JOHNSON, M. K. Initiation of organophosphate-induced delayed neuropathy. **Neurobehav Toxicol Teratol**, v. 4, n. 6, p. 759-65, Nov-Dec 1982.

JOHNSON, M. K.; BIRD, I.; MEREDITH, C. Phenyl di-n-pentylphosphinate: a convenient reactivatible inhibitor for studies on neuropathy target esterase (NTE) and protection against organophosphate-induced delayed polyneuropathy. **Toxicol Lett**, v. 40, n. 2, p. 133-40, Feb 1988.

JOHNSON, M. K.; GLYNN, P. Neuropathy target esterase (NTE) and organophosphorus-induced delayed polyneuropathy (OPIDP): recent advances. **Toxicol Lett**, v. 82-83, p. 459-63, Dec 1995.

JOHNSON, M. K.; READ, D. J. Prophylaxis against and promotion of organophosphate-induced delayed neuropathy by phenyl di-n-pentylphosphinate. **Chem Biol Interact**, v. 87, n. 1-3, p. 449-55, Jun 1993.

JOHNSON, M. K. J., D., MEREDITH, T.J., EYER, P., HEATH, A.J., LIGTENSTEIN, D.A., MARRS, T.C., SZINICZ, L., VALE, J.A., HAINES, J.A. Evaluation of antidotes for poisoning by organophosphorus pesticides. **Emergency Medicine**, v. 12, p. 22-37, 2000.

JORTNER, B. S. et al. Neuropathological studies of rats following multiple exposure to tri-ortho-tolyl phosphate, chlorpyrifos and stress. **Toxicol Pathol**, v. 33, n. 3, p. 378-85, 2005.

JORTNER, E. E. Organophosphorus-induced delayed neuropathy. In: R, K. E. (Ed.). Handbook of **Pesticide Toxicology**. San Diego: Academic Press, 2010.

KAMPFL, A. et al. Mechanisms of calpain proteolysis following traumatic brain injury: implications for pathology and therapy: a review and update. **J Neurotrauma**, v. 14, n. 3, p. 121-34, Mar 1997.

KAPLAN, A. Frontiers of medicine. I. Clinical chemistry. Northwest Med, v. 59, p. 516-8, Apr 1960.

KARADEMIR CATALGOL, B.; OZDEN, S.; ALPERTUNGA, B. Effects of trichlorfon on malondialdehyde and antioxidant system in human erythrocytes. **Toxicol In Vitro**, v. 21, n. 8, p. 1538-44, Dec 2007.

KAWADA, T. et al. Insomnia as a sequela of sarin toxicity several years after exposure in Tokyo subway trains. **Percept Mot Skills**, v. 100, n. 3 Pt 2, p. 1121-6, Jun 2005.

KAWAMURA, M. et al. Calpain inhibitor MDL 28170 protects hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats by inhibition of both apoptosis and necrosis. **Brain Res**, v. 1037, n. 1-2, p. 59-69, Mar 10 2005.

KOBAYASHI, T.; MORI, Y. Ca2+ channel antagonists and neuroprotection from cerebral ischemia. **Eur J Pharmacol**, v. 363, n. 1, p. 1-15, Dec 11 1998.

KOPECKY, B. J.; LIANG, R.; BAO, J. T-type calcium channel blockers as neuroprotective agents. **Pflugers Arch**, v. 466, n. 4, p. 757-65, Apr 2014.

KOVALEVICH, J.; LANGFORD, D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. **Methods Mol Biol**, v. 1078, p. 9-21, 2013.

KUPSCH, A. et al. Pretreatment with nimodipine prevents MPTP-induced neurotoxicity at the nigral, but not at the striatal level in mice. **Neuroreport**, v. 6, n. 4, p. 621-5, Mar 7 1995.

LACINOVA, L. T-type calcium channel blockers - new and notable. **Gen Physiol Biophys,** v. 30, n. 4, p. 403-9, Dec 2011.

LANKFORD, K. L.; DEMELLO, F. G.; KLEIN, W. L. D1-type dopamine receptors inhibit growth cone motility in cultured retina neurons: evidence that neurotransmitters act as morphogenic growth regulators in the developing central nervous system. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 85, n. 8, p. 2839-43, Apr 1988.

LASRAM, M. M. et al. Metabolic disorders of acute exposure to malathion in adult Wistar rats. J Hazard Mater, v. 163, n. 2-3, p. 1052-5, Apr 30 2009.

LAYER, P. G. Cholinesterases during development of the avian nervous system. **Cell Mol Neurobiol**, v. 11, n. 1, p. 7-33, Feb 1991.

LEVINE, T. B. et al. Effect of mibefradil, a T-type calcium channel blocker, on morbidity and mortality in moderate to severe congestive heart failure: the MACH-1 study. Mortality Assessment in Congestive Heart Failure Trial. **Circulation**, v. 101, n. 7, p. 758-64, Feb 22 2000.

LI, J. et al. Regional differences in gene expression for calcium activated neutral proteases (calpains) and their endogenous inhibitor calpastatin in mouse brain and spinal cord. **J Neurobiol**, v. 30, n. 2, p. 177-91, Jun 1996.

LI, W.; CASIDA, J. E. Organophosphorus neuropathy target esterase inhibitors selectively block outgrowth of neurite-like and cell processes in cultured cells. **Toxicol Lett,** v. 98, n. 3, p. 139-46, Sep 15 1998.

LI, Z.; HOGAN, E. L.; BANIK, N. L. Role of calpain in spinal cord injury: increased calpain immunoreactivity in rat spinal cord after impact trauma. **Neurochem Res**, v. 21, n. 4, p. 441-8, Apr 1996.

LIPSCOMBE, D.; HELTON, T. D.; XU, W. L-type calcium channels: the low down. J Neurophysiol, v. 92, n. 5, p. 2633-41, Nov 2004.

LIU, C. Y.; CHANG, P. A.; WU, Y. J. Trichlorfon induces apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells via the endoplasmic reticulum? **Chem Biol Interact**, v. 181, n. 1, p. 37-44, Sep 14 2009.

LIU, J.; LIU, M. C.; WANG, K. K. Calpain in the CNS: from synaptic function to neurotoxicity. **Sci Signal**, v. 1, n. 14, p. re1, Apr 08 2008.

LOCKRIDGE, O.; SCHOPFER, L. M. Review of tyrosine and lysine as new motifs for organophosphate binding to proteins that have no active site serine. **Chem Biol Interact**, v. 187, n. 1-3, p. 344-8, Sep 6 2010.

LONDON, L. et al. Suicide and exposure to organophosphate insecticides: cause or effect? **Am J Ind Med**, v. 47, n. 4, p. 308-21, Apr 2005.

LOPES, R. B. et al. Bioconcentration of trichlorfon insecticide in pacu (Piaractus mesopotamicus). **Chemosphere**, v. 64, n. 1, p. 56-62, Jun 2006.

LOPEZ-CHARCAS, O.; RIVERA, M.; GOMORA, J. C. Block of human CaV3 channels by the diuretic amiloride. **Mol Pharmacol,** v. 82, n. 4, p. 658-67, Oct 2012.

LU, Y. et al. Mibefradil reduces blood glucose concentration in db/db mice. **Clinics (Sao Paulo),** v. 69, n. 1, p. 61-7, Jan 2014.

MACLUSKY, N. J. et al. Neuroendocrine function and response to stress in mice with complete disruption of glucagon-like peptide-1 receptor signaling. **Endocrinology**, v. 141, n. 2, p. 752-62, Feb 2000.

MADSBAD, S. et al. Glucagon-like peptide receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in the treatment of diabetes: a review of clinical trials. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care,** v. 11, n. 4, p. 491-9, Jul 2008.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **Am J Pathol**, v. 146, n. 1, p. 3-15, Jan 1995.

MANNUCCI, E. L., C. Incretins and the specific mechanism of action of liraglutide, the first applicable human glucagon-like peptide 1 analog in the treatment of type 2 diabetes. **Journal of Receptor, Ligand and Channel Research**, v. 3, p. 105-112, 2010.

MARKGRAF, C. G. et al. Six-hour window of opportunity for calpain inhibition in focal cerebral ischemia in rats. **Stroke,** v. 29, n. 1, p. 152-8, Jan 1998.

MARTIN, S. J.; GREEN, D. R.; COTTER, T. G. Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. **Trends Biochem Sci**, v. 19, n. 1, p. 26-30, Jan 1994.

MCCLEAN, P. L. et al. Glucagon-like peptide-1 analogues enhance synaptic plasticity in the brain: a link between diabetes and Alzheimer's disease. **Eur J Pharmacol,** v. 630, n. 1-3, p. 158-62, Mar 25 2010.

MCCLEAN, P. L. et al. The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. **J Neurosci**, v. 31, n. 17, p. 6587-94, Apr 27 2011.

MCDONOUGH, J. H., JR.; SHIH, T. M. Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 21, n. 5, p. 559-79, Sep 1997.

MEHDI, S. Cell-penetrating inhibitors of calpain. Trends Biochem Sci, v. 16, n. 4, p. 150-3, Apr 1991.

MELINO, G. et al. Retinoids and the control of growth/death decisions in human neuroblastoma cell lines. **J Neurooncol**, v. 31, n. 1-2, p. 65-83, Jan 1997.

MIWA, H. et al. Effects of T-type calcium channel blockers on a parkinsonian tremor model in rats. **Pharmacol Biochem Behav,** v. 97, n. 4, p. 656-9, Feb 2011.

MONGE, P. et al. Assessment of pesticide exposure in the agricultural population of Costa Rica. **Ann Occup Hyg,** v. 49, n. 5, p. 375-84, Jul 2005.

MORETTO, A.; NICOLLI, A.; LOTTI, M. Peripheral nerve esterases and the promotion of organophosphate-induced neuropathy in hens. **Chem Biol Interact**, v. 157-158, p. 285-91, Dec 15 2005.

MOROO, I. et al. Loss of insulin receptor immunoreactivity from the substantia nigra pars compacta neurons in Parkinson's disease. **Acta Neuropathol**, v. 87, n. 4, p. 343-8, 1994.

MUHLIG-VERSEN, M. et al. Loss of Swiss cheese/neuropathy target esterase activity causes disruption of phosphatidylcholine homeostasis and neuronal and glial death in adult Drosophila. J **Neurosci**, v. 25, n. 11, p. 2865-73, Mar 16 2005.

MUKHERJEE, R.; SPINALE, F. G. L-type calcium channel abundance and function with cardiac hypertrophy and failure: a review. **J Mol Cell Cardiol**, v. 30, n. 10, p. 1899-916, Oct 1998.

MURGIA, M. et al. Controlling metabolism and cell death: at the heart of mitochondrial calcium signalling. **J Mol Cell Cardiol**, v. 46, n. 6, p. 781-8, Jun 2009.

MUZARDO, G. A.; MACHADO, R. G.; DE OLIVEIRA, G. H. Effects of calcium gluconate and PMSF in the treatment of acute intoxication of chicken by TOCP. **Hum Exp Toxicol**, v. 27, n. 3, p. 247-52, Mar 2008.

NIELANDER, H. B. et al. Phosphorylation-dependent effects of synapsin IIa on actin polymerization and network formation. **Eur J Neurosci,** v. 9, n. 12, p. 2712-22, Dec 1997.

NOSTRANDT, A. C.; EHRICH, M. Development of a model cell culture system in which to study early effects of neuropathy-inducing organophosphorus esters. **Toxicol Lett**, v. 60, n. 1, p. 107-14, Jan 1992.

OBATA, T. Calcium overload enhances hydroxyl radical generation by 1-methyl-4 phenylpyridinium ion (MPP+) in rat striatum. **Brain Res**, v. 965, n. 1-2, p. 287-9, Mar 07 2003.

OLAJOS, E. J. et al. The dose-response relationship of trichlorfon neurotoxicity in hens. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 3, n. 3, p. 245-55, Sep 1979.

OPARIL, S. et al. Dose-response characteristics of mibefradil, a novel calcium antagonist, in the treatment of essential hypertension. **Am J Hypertens,** v. 10, n. 7 Pt 1, p. 735-42, Jul 1997.

ORRENIUS, S.; NICOTERA, P.; ZHIVOTOVSKY, B. Cell death mechanisms and their implications in toxicology. **Toxicol Sci**, v. 119, n. 1, p. 3-19, Jan 2011.

PANCETTI, F. et al. Noncholinesterase effects induced by organophosphate pesticides and their relationship to cognitive processes: implication for the action of acylpeptide hydrolase. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev**, v. 10, n. 8, p. 623-30, Dec 2007.

PANDURANGAN, M. et al. The calpain system and diabetes. **Pathophysiology**, v. 21, n. 2, p. 161-7, Jun 2014.

PARAOANU, L. E.; LAYER, P. G. Acetylcholinesterase in cell adhesion, neurite growth and network formation. **FEBS J**, v. 275, n. 4, p. 618-24, Feb 2008.

PARTHSARATHY, V.; HOLSCHER, C. The type 2 diabetes drug liraglutide reduces chronic inflammation induced by irradiation in the mouse brain. **Eur J Pharmacol**, v. 700, n. 1-3, p. 42-50, Jan 30 2013.

PIAO, F.; YAMAUCHI, T.; MA, N. The effect of Calcicol as calcium tonic on delayed neurotoxicity induced by organophosphorus compounds. **Toxicol Lett**, v. 143, n. 1, p. 65-71, Jun 5 2003.

PIRES, D. X., CALDAS, E.D., RECENA M.C.P. Intoxicações provocadas por agrotóxicos de uso agrícola na microrregião de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, no período de 1992 a 2002. **Cad. Saude Publica,** v. 21, n. 3, p. 11, 2005.

PIRES, D. X. C., E. D.; RECENA, M. C. P. Uso de agrotóxicos e suicídios no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. . **Cad. Saúde Pública,,** v. 21, n. 2, p. 598-604, 2005.

PIRES, E. D. R., M. C. P. Uso de agrotóxicos e suicídios no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. Cad Saúde Pública, v. 21(2), p. 598-604, 2005a.

PISANI, A. et al. L-type Ca2+ channel blockers attenuate electrical changes and Ca2+ rise induced by oxygen/glucose deprivation in cortical neurons. **Stroke**, v. 29, n. 1, p. 196-201; discussion 202, Jan 1998.

POPE, C.; KARANTH, S.; LIU, J. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action. **Environ Toxicol Pharmacol,** v. 19, n. 3, p. 433-46, May 2005.

POURNOURMOHAMMADI, S. et al. Effects of malathion subchronic exposure on rat skeletal muscle glucose metabolism. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 19, n. 1, p. 191-6, Jan 2005.

PRENDERGAST, M. A. et al. Microtubule-associated targets in chlorpyrifos oxon hippocampal neurotoxicity. **Neuroscience**, v. 146, n. 1, p. 330-9, Apr 25 2007.

PRINGLE, A. K. et al. Selective N-type calcium channel antagonist omega conotoxin MVIIA is neuroprotective against hypoxic neurodegeneration in organotypic hippocampal-slice cultures. **Stroke,** v. 27, n. 11, p. 2124-30, Nov 1996.

REHNER, T. A. et al. Depression among victims of south Mississippi's methyl parathion disaster. **Health Soc Work,** v. 25, n. 1, p. 33-40, Feb 2000.

RICHARDSON, R. J. et al. Neuropathy target esterase (NTE): overview and future. **Chem Biol Interact**, v. 203, n. 1, p. 238-44, Mar 25 2013.

RISHAL, I. et al. Axoplasm isolation from peripheral nerve. **Dev Neurobiol**, v. 70, n. 2, p. 126-33, Feb 2010.

RISTOW, M. Neurodegenerative disorders associated with diabetes mellitus. J Mol Med (Berl), v. 82, n. 8, p. 510-29, Aug 2004.

ROMERO-NAVARRO, G. et al. Effect of dichlorvos on hepatic and pancreatic glucokinase activity and gene expression, and on insulin mRNA levels. Life Sci, v. 78, n. 9, p. 1015-20, Jan 25 2006.

SACHANA, M. et al. The toxicity of chlorpyrifos towards differentiating mouse N2a neuroblastoma cells. **Toxicol In Vitro,** v. 15, n. 4-5, p. 369-72, Aug-Oct 2001.

SACHANA, M. et al. Inhibition of neurite outgrowth in N2a cells by leptophos and carbaryl: effects on neurofilament heavy chain, GAP-43 and HSP-70. **Toxicol In Vitro**, v. 17, n. 1, p. 115-20, Feb 2003.

SAKAHIRA, H.; ENARI, M.; NAGATA, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 96-9, Jan 1 1998.

SALVI RM, L. D., GHISOLFI ES, PORTELA LV, DIAS RD, SOUZA DO Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides. . **Toxicol Sci** v. 72(2), n. 267-71 2003.

SATO, K. et al. Neuroprotective effects of liraglutide for stroke model of rats. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 11, p. 21513-24, 2013.

SCHLAEPFER, W. W.; BUNGE, R. P. Effects of calcium ion concentration on the degeneration of amputated axons in tissue culture. **J Cell Biol**, v. 59, n. 2 Pt 1, p. 456-70, Nov 1973.

SCHMUCK, G.; AHR, H. J. Improved in vitro method for screening organophosphate-induced delayed polyneuropathy. **Toxicol In Vitro**, v. 11, n. 3, p. 263-70, Jun 1997.

SENANAYAKE, N.; KARALLIEDDE, L. Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides. An intermediate syndrome. **N Engl J Med,** v. 316, n. 13, p. 761-3, Mar 26 1987.

SHARMA, M. K.; JALEWA, J.; HOLSCHER, C. Neuroprotective and anti-apoptotic effects of liraglutide on SH-SY5Y cells exposed to methylglyoxal stress. **J Neurochem**, v. 128, n. 3, p. 459-71, Feb 2014.

SHEA, T. B. et al. Phospholipid-mediated delivery of anti-GAP-43 antibodies into neuroblastoma cells prevents neuritogenesis. **J Neurosci**, v. 11, n. 6, p. 1685-90, Jun 1991.

SILVA, J. M. F., H.P.; SILVA, E.N.; PINHEIRO, T.M.M. **Protocolo de Atenção à Saúde dos Trabalhadores Expostos a agrotóxicos**. SAÚDE, M. D. Brasília 2006.

SILVA, J. M. F., H.P.; SILVA, E.N.; PINHEIRO, T.M.M. Protocolo de Atenção à Saúde dos Trabalhadores Expostos a agrotóxicos. . Brasília. Ministério da saúde., 2006.

SIMMS, B. A.; ZAMPONI, G. W. Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. **Neuron**, v. 82, n. 1, p. 24-45, Apr 2 2014.

SINITOX. Estatística Anual de casos de Intoxicação e Envenenamento. TECNOLÓGICA, C. D. I. C. E. Saúde, M. d. : Fundação Oswaldo Cruz 2013.

SMALL, G.; BULLOCK, R. Defining optimal treatment with cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement,** v. 7, n. 2, p. 177-84, Mar 2011.

SMITH, S. J. Neuronal cytomechanics: the actin-based motility of growth cones. **Science**, v. 242, n. 4879, p. 708-15, Nov 4 1988.

SOGORB, M. A.; VILANOVA, E. Serum albumins and detoxication of anti-cholinesterase agents. **Chem Biol Interact**, v. 187, n. 1-3, p. 325-9, Sep 6 2010.

SOLTANINEJAD, K.; ABDOLLAHI, M. Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: a systematic review. **Med Sci Monit**, v. 15, n. 3, p. RA75-90, Mar 2009.

SONG, D. K. et al. Calpain inhibitors block Ca(2+)-induced suppression of neurite outgrowth in isolated hippocampal pyramidal neurons. **J Neurosci Res**, v. 39, n. 4, p. 474-81, Nov 1 1994.

STERNFELD, M. et al. Acetylcholinesterase enhances neurite growth and synapse development through alternative contributions of its hydrolytic capacity, core protein, and variable C termini. J **Neurosci**, v. 18, n. 4, p. 1240-9, Feb 15 1998.

STRACHAN, M. W. Insulin and cognitive function in humans: experimental data and therapeutic considerations. **Biochem Soc Trans**, v. 33, n. Pt 5, p. 1037-40, Nov 2005.

TANG, C. M.; PRESSER, F.; MORAD, M. Amiloride selectively blocks the low threshold (T) calcium channel. **Science**, v. 240, n. 4849, p. 213-5, Apr 8 1988.

TEN KULVE, J. S. et al. Decreased Hypothalamic Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Expression in Type 2 Diabetes Patients. J Clin Endocrinol Metab, v. 101, n. 5, p. 2122-9, May 2016.

TERRY, A. V., JR. Functional consequences of repeated organophosphate exposure: potential noncholinergic mechanisms. **Pharmacol Ther,** v. 134, n. 3, p. 355-65, Jun 2012.

TERRY, A. V., JR. et al. Chronic, intermittent exposure to chlorpyrifos in rats: protracted effects on axonal transport, neurotrophin receptors, cholinergic markers, and information processing. J **Pharmacol Exp Ther**, v. 322, n. 3, p. 1117-28, Sep 2007.

THOMAZ, J. M. et al. Cardio-respiratory function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate insecticide trichlorfon (NEGUVON). **Ecotoxicol Environ Saf,** v. 72, n. 5, p. 1413-24, Jul 2009.

THOMPSON, S. N. et al. A pharmacological analysis of the neuroprotective efficacy of the brain- and cell-permeable calpain inhibitor MDL-28170 in the mouse controlled cortical impact traumatic brain injury model. **J Neurotrauma**, v. 27, n. 12, p. 2233-43, Dec 2010.

TYTGAT, J.; VEREECKE, J.; CARMELIET, E. Mechanism of cardiac T-type Ca channel blockade by amiloride. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 254, n. 2, p. 546-51, Aug 1990.

VAN DER SCHANS, M. J. et al. Toxicokinetics of the nerve agent (+/-)-VX in anesthetized and atropinized hairless guinea pigs and marmosets after intravenous and percutaneous administration. **Toxicol Appl Pharmacol,** v. 191, n. 1, p. 48-62, Aug 15 2003.

VASILESCU, C.; ALEXIANU, M.; DAN, A. Delayed neuropathy after organophosphorus insecticide (Dipterex) poisoning: a clinical, electrophysiological and nerve biopsy study. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 47, n. 5, p. 543-8, May 1984.

VILSBOLL, T. Liraglutide: a new treatment for type 2 diabetes. **Drugs Today (Barc)**, v. 45, n. 2, p. 101-13, Feb 2009.

WANG, K. K.; YUEN, P. W. Development and therapeutic potential of calpain inhibitors. **Adv Pharmacol**, v. 37, p. 117-52, 1997.

WANG, X. Q. et al. Neuroprotection of interleukin-6 against NMDA attack and its signal transduction by JAK and MAPK. **Neurosci Lett**, v. 450, n. 2, p. 122-6, Jan 30 2009.

WEI, S. et al. Group IIA secretory phospholipase A2 stimulates exocytosis and neurotransmitter release in pheochromocytoma-12 cells and cultured rat hippocampal neurons. **Neuroscience**, v. 121, n. 4, p. 891-8, 2003.

WHO, W. H. O. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009. SAFETY, I. P. O. C. 2009.

WHO, W. H. O. WHO SPECIFICATIONS AND EVALUATIONS FOR PUBLIC HEALTH PESTICIDES TEMEPHOS 0,0,0'0'-tetramethyl 0,0'-thiodi-p-phenylene bis(phosphorothioate) 2011.

WILDBURGER, N. C. et al. Neuroprotective effects of blockers for T-type calcium channels. **Mol Neurodegener**, v. 4, p. 44, Oct 28 2009.

WU, Y. J.; LENG, X. F. Comparison of effects of verapamil and quercetin on delayed polyneuropathy induced by Tri-o-cresyl phosphate in hens. **Bull Environ Contam Toxicol,** v. 58, n. 4, p. 611-8, Apr 1997.

YAMASUE, H. et al. Human brain structural change related to acute single exposure to sarin. **Ann Neurol**, v. 61, n. 1, p. 37-46, Jan 2007.

YANAGISAWA, N.; MORITA, H.; NAKAJIMA, T. Sarin experiences in Japan: acute toxicity and long-term effects. J Neurol Sci, v. 249, n. 1, p. 76-85, Nov 1 2006.

YANG, C. C.; DENG, J. F. Intermediate syndrome following organophosphate insecticide poisoning. J Chin Med Assoc, v. 70, n. 11, p. 467-72, Nov 2007.

YANG, D. et al. Chlorpyrifos and chlorpyrifos-oxon inhibit axonal growth by interfering with the morphogenic activity of acetylcholinesterase. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 228, n. 1, p. 32-41, Apr 1 2008.

YU, C. G.; GEDDES, J. W. Sustained calpain inhibition improves locomotor function and tissue sparing following contusive spinal cord injury. **Neurochem Res**, v. 32, n. 12, p. 2046-53, Dec 2007.

YU, C. G.; JOSHI, A.; GEDDES, J. W. Intraspinal MDL28170 microinjection improves functional and pathological outcome following spinal cord injury. **J Neurotrauma**, v. 25, n. 7, p. 833-40, Jul 2008.

ZHANG RUN-PING, L. J.-P. Amiloride protects PC12 cells from MPP+ induced injury via autophagylysosome pathway.

Journal of Jiangsu University, v. 24, n. 04, p. 359-352, 2014.

ZHANG, W. et al. Effects of neural stem cells on synaptic proteins and memory in a mouse model of Alzheimer's disease. J Neurosci Res, v. 92, n. 2, p. 185-94, Feb 2014.

ZHAO, X. L. et al. Tri-ortho-cresyl phosphate (TOCP) decreases the levels of cytoskeletal proteins in hen sciatic nerve. **Toxicol Lett**, v. 152, n. 2, p. 139-47, Sep 10 2004.

ZHUANG, X. M. et al. Contribution of carboxylesterase and cytochrome P450 to the bioactivation and detoxification of isocarbophos and its enantiomers in human liver microsomes. **Toxicol Sci**, v. 140, n. 1, p. 40-8, Jul 2014.