

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**Jamile da Silva Bernardi**

**DIAZINON ALTERA A ATIVIDADE DAS COLINESTERASES  
PERIFÉRICAS SEM ALTERAR O COMPORTAMENTO DE  
CAMUNDONGOS**

**Santa Maria, RS**

**2018**

**Jamile da Silva Bernardi**

**DIAZINON ALTERA A ATIVIDADE DAS COLINESTERASES  
PERIFÉRICAS SEM ALTERAR O COMPORTAMENTO DE  
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Ester Pereira**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2018**

Jamile da Silva Bernardi

**DIAZINON ALTERA A ATIVIDADE DAS COLINESTERASES  
PERIFÉRICAS SEM ALTERAR O COMPORTAMENTO EM  
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**.

Aprovado em 15 de outubro de 2018

---

Maria Ester Pereira (UFSM)  
(Presidente/Orientador)

---

Mauro Schneider Oliveira (UFSM)

---

Rafael Porto Ineu (UTFPR)

---

Daniel Mendes Pereira Ardisson de Araújo (Suplente) (UFSM)

Santa Maria, RS  
2018

## DEDICATÓRIA

*Ao meu pai, Iglênio, e minha mãe, Ilzamar.*

*Sem vocês nada disso seria possível!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus e ao meu anjinho da guarda aos quais recorri, principalmente nas horas de maior necessidade.

Aos meus pais *Iglênio e Ilzamar*, por todo o apoio (psicológico e financeiro, hehe). Vocês são a minha base, meus exemplos e em quem eu penso antes de todos os meus atos. Sei que tiveram que abdicar de muita coisa para que eu pudesse estar escrevendo isso aqui hoje. Espero compensar um pouquinho de todo esse esforço com alegria (o retorno financeiro ainda não..). Amo vocês!

A Prof<sup>a</sup> Maria Ester, por me aceitar no lab como IC e por me orientar durante o mestrado. Aprendi muita coisa durante esse tempo. A senhora foi uma pessoa muito importante na minha vida. Sei que deixei a desejar e lhe decepcionei muitas vezes, mas peço desculpas por isso!

Ao pessoal do Lab... o pessoal das antigas (Taíse, Mari, Lidi e Vítor) que me acolheram e me ajudaram muito. Ao Michael, que me ensinou muita coisa do que sei dentro do lab hoje. Ao Tiago pela amizade de todos esses anos, pelas caronas, e principalmente pelos papos cabeça tomando um cafezinho novo. A Nilce, que me trouxe tanta alegria, conhecimento, carinho e amizade em tão pouco tempo de convivência; aprendi tanto contigo! Mas ainda vou vender jequiti pra gente ir ganhar dinheiro no Silvio Santos. As minhas filhinhas científicas Sara e Mari, pela amizade diária, pelas boas risadas, pelas indicações de série e horóscopos, por terem me ensinado tanto, quando eu deveria tentar ensinar alguma coisa pra vocês. Vocês foram dois serezzinhos maravilhosos que entraram em minha vida!

A toda minha família, vô,vô, tios, tias, meus primos amados, que sempre se preocuparam comigo e me encham de amor e carinho a cada ida pra casa.

Ao meu irmão, Jacson que, apesar das brigas (que nem temos mais tantas agora) e de querer me passar a perna na divisão do resto do churrasco no domingo, sempre está disposto a me ajudar. E agora, a próxima é tua, que venha a formatura!

Ao Régis, que esteve ao meu lado esse tempo todo (e que tempo hein!), tendo que me dividir com o lab nos finais de semana. Obrigada pelo apoio, paciência (sempre que possível, hahaha) e por estar sempre torcendo por mim. E estendo o agradecimento a toda tua família também, seu Silva, D. Denise, Bruna, Benhur, Ricardo... E a Raque que me acompanhou nessa caminhada desde o dia do vestibular.

Aos meus amigos *made in Jóia*, em especial a turma do *Costelão* (Armando, Pri, Ra, Gabi, Bruno, Paola, Benhur, Carol, Cri A, Aline, Cris D, Jé, Chai, Elton, Ricardo, Mar...) pela parceria, amizade, festas, boas risadas e o companheirismo de todas as horas.

A Leli, Cíntia e Bruninha, minhas amigas de infância e que agora, mesmo separadas pela distância continuam sempre presentes e torcendo por mim!

Ao Robson, por todas as palavras amigas, os bons conselhos, o apoio, as viagens. Acho que tu não tem ideia o tamanho da consideração que tenho por ti. Meu irmão mais velho!

A Nanda, por segurar essa barra junto comigo, principalmente nos momentos mais difíceis era pra ti que eu corria e sempre tinha um colinho, um abraço bem apertado me esperando e um "calma Milinha, vai dar tudo certo! Calma..."

As minhas BBF (Bruna W., Bruna X, Cibele, Evelyne, Juci e Roberta), que foram o melhor presente que a faculdade poderia ter me dado. Gurias, muito obrigada pela amizade, carinho e cuidado de vocês! E uma estrelinha a mais pra Bruna e pra Eve por me aguentarem de maneira mais intensa o mestrado todo. Não sei o que seria de mim sem vocês!

Aos labs que me acolheram como se eu fosse parte deles. Ao lab da prof<sup>a</sup> Sara (Sara, Eve, Maria, Nati, Susana, Indi, Camila) pelas jantinhas, cafés, caronas, RUs, pelos mates pra esfriar a cabeça... Vocês foram ótimas vizinhas! Ao lab da prof<sup>a</sup> Cristina, por toodas as festas (que não foram poucas!) e pelo carinho. Ao prof. Denis, por sempre estar disponível todas as vezes que pedi ajuda, e pelo bom dia/ boa tarde sempre animado. Ao lab da prof<sup>a</sup> Cíntia (Ju, Lu e Gui) pelos trabalhos em parceria e pelas boas risadas (e que a N<sup>a</sup> S<sup>a</sup> Wistar continue protegendo nossos experimentos, heheh).

A banca, professores Mauro e Rafael, pela disponibilidade e colaboração com o trabalho.

A UFSM, por me acolher durante todo esse tempo, por me proporcionar o bem mais precioso que posso ter, que é o conhecimento. A todos os professores e servidores daqui que de alguma maneira colaboraram para estar aqui hoje.

Ao PPGBTox pela oportunidade de fazer o mestrado. E a todos os professores e servidores que foram fundamentais na minha formação.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro, que possibilitou que eu fizesse o mestrado.

*“Sempre vejo fotos de alpinistas no alto da montanha.  
Eles estão sorrindo, em êxtase, triunfantes.  
Mas ninguém tira fotos durante o trajeto,  
Pois quem quer se lembrar do resto?  
Nós forçamos nossos limites porque somos obrigados,  
Não porque gostamos.  
A escalada é implacável,  
A dor e a agonia de passar para o próximo nível...  
Disso ninguém tira fotos,  
Disso, ninguém quer lembrar.  
Só queremos lembrar da vista lá de cima.  
O momento estonteante no limite do mundo.  
É isso que nos faz seguir escalando,  
E vale por toda dor.  
(Meredith Grey, Grey’s Anatomy)*

## RESUMO

### DIAZINON ALTERA A ATIVIDADE DAS COLINESTERASES PERIFÉRICAS SEM ALTERAR O COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS

AUTOR: Jamile da Silva Bernardi  
ORIENTADORA: Maria Ester Pereira

Os compostos organofosforados (OF) pertencem a uma classe de compostos químicos que contém um átomo de fósforo pentavalente em sua estrutura, o qual está ligado por uma dupla ligação a um átomo de oxigênio ou a um átomo de enxofre. São comumente usados como gás de guerra e também como pesticidas na agricultura e na veterinária. O diazinon (DZ) é um OF da classe dos fosforotioatos, e como os demais OF, é caracterizado pela capacidade de inibir as colinesterases (ChEs), causando danos principalmente ao sistema nervoso central (SNC). As ChEs, tanto a acetilcolinesterase (AChE) quanto a butirilcolinesterase (BChE), são enzimas que desempenham papel chave na neurotransmissão colinérgica e em outras funções fisiológicas, como contração muscular e detoxificação. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos de uma exposição a curto e longo prazo a duas diferentes doses de DZ, no desempenho comportamental e na atividade das ChEs de SNC e tecidos periféricos, bem como, estudar os parâmetros cinéticos da inibição da AChE pelo DZ, *in vitro*. Para isso foram usados camundongos machos *Swiss* adultos. Os animais foram expostos subcutaneamente ao DZ nas doses de 0, 10 ou 100 mg/kg, durante 10 ou 30 dias. Nos quatro últimos dias de tratamento, os animais foram submetidos às tarefas comportamentais campo aberto (CA) e labirinto aquático de Morris (LAM). No 11º ou no 31º dia, os animais foram eutanasiados e córtex cerebral, hipocampo, baço, coração, estômago, fígado, intestino delgado, músculo esquelético, pâncreas, pulmão e rim foram coletados para mensuração da atividade das ChEs. Para os ensaios *in vitro*, a coleta de amostras procedeu-se similarmente. A exposição ao DZ por 10 ou 30 dias não causou danos locomotores nem alterou a memória, analisados no teste do CA e do LAM, respectivamente. O DZ não alterou a atividade das ChEs de córtex e hipocampo. Nos tecidos periféricos, a exposição por 10 dias diminuiu a atividade da AChE de estômago, e da BChE de estômago, rim, pulmão e plasma. A exposição por 30 dias diminuiu a atividade da AChE do intestino, coração, fígado e pâncreas; e diminuiu a atividade da BChE de intestino, rim, fígado, pulmão e pâncreas. Os resultados *in vitro* mostram que a AChE de origem cerebral é insensível ao DZ; enquanto que as enzimas de origem periférica são mais sensíveis ao composto. Também verificou-se que o DZ inibe de forma não competitiva a AChE do coração e do pâncreas e apresenta um comportamento do tipo misto para a AChE de estômago e de fígado na maior concentração testada. Considerando os resultados em conjunto, pode-se sugerir que a ausência de alterações comportamentais pode estar relacionada a ausência de efeito do composto sobre a AChE cerebral, verificada tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

Palavras-chave: Organofosforados. Déficit cognitivo. Cinética enzimática. Acetilcolinesterase. Butirilcolinesterase.

## ABSTRACT

### DIAZINON ALTERS THE ACTIVITY OF PERIPHERAL CHOLINESTERASES WITHOUT ALTERING THE BEHAVIOR OF MICE

AUTHOR: Jamile da Silva Bernardi

ADVISOR: Maria Ester Pereira

Organophosphorus compounds (OP) belong to a class of chemical compounds which contain a pentavalent phosphorus atom in its structure, which is bound by a double bond to an oxygen atom or to a sulfur atom. They are commonly used as war gas and also as pesticides in agriculture and veterinary medicine. Diazinon (DZ) is an OP of the phosphorothioate class, and like all OP, is characterized by the ability to inhibit cholinesterases (ChEs), causing damage mainly to the central nervous system (CNS). ChEs, both acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE), are enzymes that play key roles in cholinergic neurotransmission and other physiological functions, such as muscle contraction and detoxification. The objective of this study was to investigate the effects of short and long term exposure to two different doses of DZ on the behavioral performance and activity of ChEs of CNS and peripheral tissues, as well as to study the kinetic parameters of AChE inhibition by DZ, *in vitro*. Male Swiss adult mice were used for this purpose. The animals were exposed subcutaneously to DZ at doses of 0, 10 or 100 mg/kg for 10 or 30 days. During the last four days of treatment, the animals were submitted to behavioral tasks of open field (OF) and Morris water maze (MWM). On the 11<sup>th</sup> or 31<sup>st</sup> day, the animals were euthanized and the cerebral cortex, hippocampus, spleen, heart, stomach, liver, small intestine, skeletal muscle, pancreas, lung and kidney were collected to measure ChEs activity. For the *in vitro* assays, the sampling was performed similarly. Exposure to DZ for 10 or 30 days did not cause locomotor damage or altered memory, analyzed in the OF and MWM task, respectively. DZ does not alter the activity of cortex and hippocampus ChEs. In peripheral tissues, exposure for 10 days decreased the activity of the stomach bag, and of the BBB in the stomach, rim, lung and plasma. Exposure for 30 days decreased AChE activity of intestine, heart, liver and pancreas; and decreased BBB, intestinal, kidney, liver, lung and pancreas activity. The *in vitro* results show that an AChE of cerebral origin is insensitive to DZ; while the enzymes of peripheral origin are more sensitive to the compound. It is also possible that DZ is not competitively shaped to perform a heart and pancreas examination and has a mixed-type behavior for stomach and skin disease at the highest concentration tested. The results together may suggest that the absence of behavioral changes may be related to a lack of effects on a cerebral AChE, verified both *in vivo* and *in vitro*.

Keywords: Organophosphates. Cognitive deficit. Enzymatic kinetics. Acetylcholinesterase. Butyrylcholinesterase.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Introdução

Figura 1-	Estrutura geral dos compostos organofosforados.....	13
Figura 2-	Estrutura química do ácido fosfórico, ácido fosfônico e ácido fosfínico.....	14
Figura 3-	Estrutura química do diazinon e estrutura química geral da classe dos OF fosforotioatos.....	16
Figura 4-	Ação do citocromo P-450 no metabolismo do DZ.....	18
Figura 5-	Mecanismo de síntese, liberação e degradação da ACh.....	20
Figura 6-	Mecanismo de ação da AChE.....	26

### Manuscrito

Figure 1-	Effects on spatial memory and learning capacity on Morris Water Maze, at 7 to 10 days of DZ exposition (Fig 1A) and at 27 to 30 days of DZ exposition (Fig 1B).....	41
-----------	---	----

## LISTA DE TABELAS

### Introdução

Tabela 1- Polimorfismo molecular da AChE e BChE.....	23
--	----

### Manuscrito

Table 1- Spontaneous locomotor and exploratory activity in the open field task of mice after 7 days of DZ exposure.....	40
Table 2- Spontaneous locomotor and exploratory activity in the open field task of mice after 27 days of DZ exposure.....	40
Table 3- AChE and BChE activities from tissues of mice exposed for 10 days to 10 or 100 mg/kg of DZ.....	42
Table 4- AChE and BChE activities from tissues of mice exposed for 30 days to 10 or 100 mg/kg of DZ.....	43
Table 5- IC <sub>50</sub> for inhibition of AChE activity from tissues of mice.....	44
Table 6- Kinetic parameters (apparent $K_m$ and $V_{max}$ ) of AChE of heart, pancreas, stomach, and liver in the presence of DZ.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcetilCoA	Acetil coenzima A
ACh	Acetilcolina (do inglês <i>Acetylcholine</i> )
AChE	Acetilcolinesterase (do inglês <i>acetylcholinesterase</i> )
ATCh	<i>Acetylthiocholine</i>
BCh	Butirilcolina
BChE	Butirilcolinesterase (do inglês <i>butyrylcholinesterase</i> )
BTCh	<i>Butyrylthiocholine</i>
CA/OF	Campo aberto (do inglês <i>open field</i> )
ChAT	Colina acetiltransferase
ChEs	Colinesterases (do inglês <i>cholinesterases</i> )
DMSO	<i>Dimethylsuloóxide</i>
DTNB	<i>Ditiobisnitrobenzoate</i>
DZ	Diazinon
EC	Classificação enzimática
IC <sub>50</sub>	Concentração que diminui 50% da atividade da enzima (do inglês <i>inhibitory concentration</i> )
iChEs	Anticolinesterásicos/inibidores das colinesterases
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Menten
KPB	<i>Phosphate potassium cold buffer</i>
LAM/MWM	Labirinto aquático de Morris (do inglês <i>labirinto aquático de Morris</i> )
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MWM	Morris water maze
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
OF	Organofosforados
OP	Organofosforados (do inglês <i>organophosphorus</i> )
PAS	Sítio aniônico periférico
PCh	Propionilcolina
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
SEM	Erro padrão da média (do inglês <i>Standard error of the mean</i> )
SNC/CNS	Sistema nervoso central (do inglês <i>central nervous system</i> )
SNP	Sistema nervoso periférico
V <sub>max</sub>	Velocidade máxima
WHO	Organização mundial de saúde (do inglês <i>World Health Organization</i> )

## SUMÁRIO

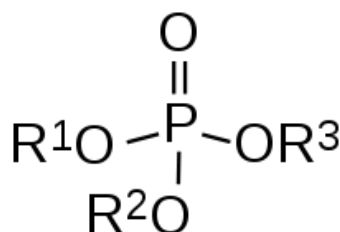
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1.1	ORGANOFOSFORADOS.....	13
1.2	DIAZINON.....	16
1.3	COLINESTERASES.....	18
1.3.1	<b>Acetilcolinesterase.....</b>	<b>19</b>
1.3.2	<b>Butirilcolinesterase.....</b>	<b>21</b>
1.3.3	<b>Formas moleculares.....</b>	<b>22</b>
1.3.4	<b>Estrutura.....</b>	<b>24</b>
1.3.5	<b>Mecanismo de ação.....</b>	<b>25</b>
1.3.6	<b>Inibidores das colinesterases.....</b>	<b>26</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
<b>3</b>	<b>DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>55</b>
4.1	<i>In vivo</i> .....	55
4.2	<i>In vitro</i> .....	55
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>60</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ORGANOFOSFORADOS

Os compostos organofosforados (OF) são uma grande classe de compostos químicos que contém um átomo de fósforo pentavalente em sua estrutura, o qual está ligado por uma dupla ligação a um átomo de oxigênio ou a um átomo de enxofre (figura 1). Esses compostos são derivados dos ácidos fosfórico, fosfônico ou fosfínico (figura 2) (TERRY, 2012<sup>a</sup>). Sete tipos de pesticidas OF foram produzidos e registrados pra uso nos Estados Unidos. Eles são representados pelos fosfatos [O,O-P=O(O)], fosforotioatos [O,O-P=S(O)], fosforotiolatos [O,O-P=O(S)], fosforoditionatos [O,O-P=S(S)], fosforamidatos [O,O-P=O(NHR)], fosforamidotioatos [O,O-P=S(NHR)] e fosfonatos [O,R-P=O(O)] (NIGG e KNAAK, 2000).

Figura 1- Estrutura geral dos compostos organofosforados.

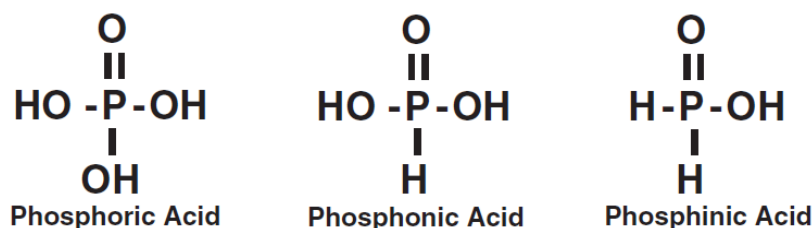


Fonte: <http://npic.orst.edu/mcapro/opbiomarkers.html> (acessado em 08/09/18).

Os organofosforados contêm um átomo de fósforo (P) central com uma ligação dupla ao oxigênio (O) ou ao enxofre (S), os grupos R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup> possuem estrutura etílica ou metila e R<sup>3</sup> um grupo de saída específico de cada OF.

Os primeiros OF foram sintetizados no século XIX pelos químicos franceses Jean Louis Lassaigne e Philippe de Clermout. No entanto foi no início do século XX que os OF começaram a ser usados como inseticida e gás de guerra, principalmente por influência do químico alemão Gerhard Schrader (TERRY, 2012<sup>a</sup>).

Figura 2- Estrutura química do ácido fosfórico, ácido fosfônico e ácido fosfínico.



Fonte: Terry (2012)<sup>a</sup>.

Os OF usados como gases de guerra mais conhecidos são o sarim, o tabum e o somam. Os agentes nervosos, como também são chamados, foram usados amplamente na guerra Irã-Iraque, de 1984 a 1988. O mais conhecido foi o ataque em Halabaja que, em 16 de março de 1988 matou cerca de 5 mil pessoas em apenas um dia. Desde então, só na Síria são relatados milhares de ataques até os dias de hoje (<https://veja.abril.com.br/blog/reveja/o-massacre-de-halabja-uma-pompeia-destruida-pela-mao-humana/> acessado 11/09/2018).

Na agricultura, os compostos OF começaram a ser utilizados para substituírem os compostos organoclorados, pois se acumulam menos no organismo e conseqüentemente são menos tóxicos. Os compostos OF representam mais de 36% do total do mercado mundial de pesticidas químicos. São a classe de pesticidas mais utilizada para o controle de pragas agrícolas devido à sua elevada eficácia para o controle de insetos, garantindo um aumento da produção agrícola. Esse vasto uso está associado a alta eficácia como inseticida e o baixo custo do produto, além do fácil manuseio (BARBOZA, 2018).

Hoje em dia, existem dez compostos organofosforados registrados no ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA), são eles: acefato, cadusafós, clorpirifós, diazinon, dimetoato, dissulfatom, etiona, etoprofós, fenaminofós e fenitrotiona (disponível em:

[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons); acessado em 11/09/18).

O uso de agrotóxicos vem crescendo, devido ao aumento da atividade agrícola, principalmente em países em desenvolvimento. Embora a exposição ambiental exclusivamente ao OF tenha declinado em algumas partes do mundo devido às restrições impostas (CLUNE, 2012), as exposições ocupacionais a OF ainda são predominantes. O uso de pesticidas baseados em OF (especificamente) é considerado um problema de saúde mundial, já que eles ainda são os mais comumente usados e os mais frequentemente associados à toxicidade para humanos (ROHLMAN, 2011).

O principal efeito tóxico dos compostos OF é a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE). Assim, os efeitos de uma exposição aguda aos OF (aproximadamente 24 h) que inibem a atividade da enzima AChE em 80 a 90% precipitam a crise colinérgica por meio da superestimulação do sistema nervoso, levando à insuficiência respiratória, paralisia muscular, diminuição da pressão arterial, descarga parassimpática e até a morte. Esse tipo de exposição está relacionada principalmente aos casos de tentativas de suicídio e nas zonas da guerra química (VOORHEES, 2017).

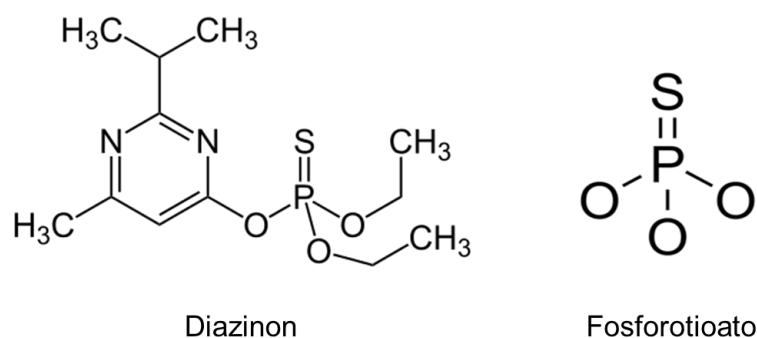
Já uma exposição crônica ou prolongada a níveis baixos ou moderados de exposição estão relacionados às situações ocupacionais, que incluem ingestão de alimentos contaminados, trabalhadores que aplicam, fabricam ou transportam esses agroquímicos, além de pessoas que vivem em áreas próximas às de aplicação de OF ou indústrias. As exposições crônicas variam de acordo com a duração, via, dose e a idade do indivíduo exposto. Infelizmente, os estudos sobre os efeitos de acordo com o tipo de exposição no ser humano são controversos. A exposição crônica não costuma desencadear sintomas associados com uma estimulação por via colinérgica, e sim, parece estar associada a condições neuropsiquiátricas debilitantes. Associações mais frequentes são: déficits no funcionamento executivo, aumento da prevalência de doenças neurodegenerativas como doença de Parkinson, doença de Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica; condições psiquiátricas como depressão, ansiedade e suicídio, e déficit cognitivo. Por outro lado, alguns estudos relataram que

não há fortes associações entre exposições ocupacionais e desempenho neurocomportamental ou neurodegeneração (VOORHEES, 2017). Além disso, um estudo correlacionando a concentração de metabólitos de alguns pesticidas na urina com testes neurocomportamentais mostrou que nem sempre essa correlação é positiva, ou seja, o aumento da excreção dos metabólitos não foi proporcional a diminuição da capacidade cognitiva (KRIEG, 2013).

## 1.2 DIAZINON

O diazinon (DZ; figura 3), também conhecido como diazinona e O,O-dietil O-2-isopropil-6-metilpirimidina-4-il fosforotioato pela IUPAC é um organofosforado da classe dos fosforotioatos (figura 3). Essa classe, da qual o paration também faz parte, é caracterizada pelo produto do metabolismo (os *oxons*) terem maior afinidade pelas ChEs e serem mais tóxicos que o produto primário.

Figura 3- Estrutura química do diazinon e estrutura química geral da classe dos OF fosforotioatos



Fonte: [www.google.com/imagens](http://www.google.com/imagens) (acessado em setembro de 2018).



O DZ é classificado como um agrotóxico da classe inseticida e acaricida. É amplamente usado na veterinária, aplicação foliar de citros e maçãs e em jardins (MAPA; <http://agrofit.agricultura.gov.br>, acessado em setembro de 2018).

O DZ, como os demais compostos OF, devido à sua alta lipossolubilidade, é absorvido pelo organismo humano através de todas as vias possíveis, incluindo o trato gastro-intestinal, a via respiratória, a via dérmica e as membranas mucosas. As exposições ocupacionais costumam ocorrer pelas vias dérmica e pulmonar, e a ingestão oral é a mais comum nos casos de tentativas de suicídio (VOORHEES, 2017).

Após a absorção, os compostos OF são distribuídos no organismo, concentrando-se especialmente no tecido adiposo, no fígado, rins, glândulas salivares, tireóide, pâncreas, paredes do estômago e intestino; e em menor proporção, no sistema nervoso central (SNC) e músculos (OGA, 2014). Os OF ficam depositados no organismo até serem metabolizados.

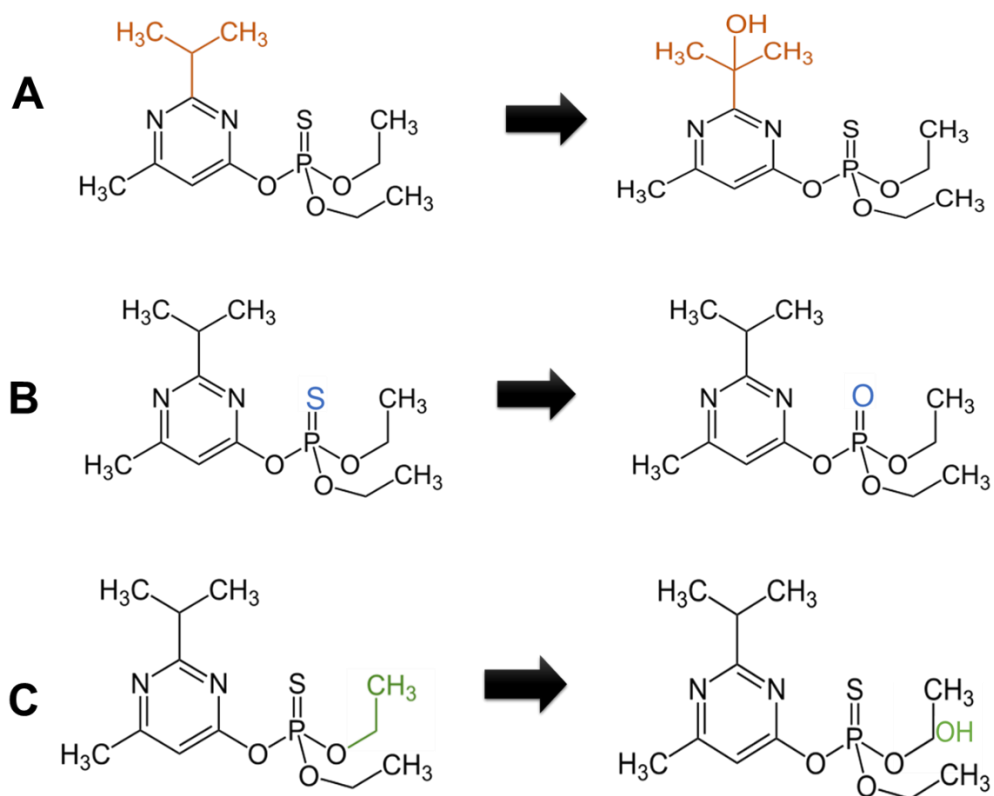
O DZ, como os demais OF pertencentes à classe dos fosfotioatos, pode ser metabolizado por duas classes gerais de reações: I) reações envolvendo oxidases de função mista e o citocromo P-450; e II) por reações envolvendo hidrolases (A e B esterases). Por ação do citocromo P-450, o DZ pode sofrer oxidação do grupo lateral (Figura 4A); dissulfuração por ação da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), formando os *oxons* (Figura 4B); ou ainda clivagem da ligação P-O-arilo, por um mecanismo oxidativo (Figura 4C). A dissulfuração constitui uma das primeiras vias de biotransformação do DZ. A transformação da ligação P=S em P=O, com formação da chamada forma *oxon*, resulta, no caso dos fosforotioatos, em um aumento da toxicidade do composto. Entretanto, paralelo a isso, esta reação de biotransformação resulta na produção de compostos menos lipofílicos, logo, menos susceptíveis a se acumularem no tecido adiposo do organismo e a penetrar nas membranas celulares (LARINI, 1999).

Existem dois tipos de esterases, as do tipo A e as do tipo B (TAYLOR, 2012). As esterases do tipo A são aquelas capazes de hidrolisar os compostos OF, incluindo arilesterases, paraxonases e DFPases. Sabe-se que são encontradas principalmente no fígado, mas não há estudos a respeito do mecanismo de ação ou dos aminoácidos

do sítio ativo. As esterases do tipo B, são aquelas que são inibidas pelos compostos organofosforados. Tanto a acetilcolinesterase como a butirilcolinesterase são esterases do tipo B (NIGG e KNAAK, 2000).

A excreção dos OF ocorre principalmente pela urina e em pequenas proporções pelas fezes, quase sempre nas primeiras 48 horas após a absorção (LARINI, 1999).

Figura 4- Ação do citocromo P-450 no metabolismo do DZ



Fonte: Baseado em Nigg e Knaak (2000).

### 1.3 COLINESTERASES

As colinesterases (ChEs) são enzimas que desempenham papel fundamental na neurotransmissão colinérgica e em outras funções fisiológicas. Nos mamíferos, são

divididas em dois principais grupos, de acordo com suas propriedades catalíticas, especificidade de inibidores e distribuição nos tecidos: I) acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7), também conhecida como colinesterase específica ou verdadeira; e II) butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8), também conhecida como pseudocolinesterase. A AChE é encontrada principalmente no SNC, periférico parassimpático (SNP), junção neuromuscular e células sanguíneas como eritrócitos, linfócitos e plaquetas. Enquanto que a BChE é produzida em grandes quantidades no fígado e encontrada no plasma, intestino e, em menores concentrações em outros tecidos. O substrato específico da AChE é a acetilcolina (ACh), já a BChE pode hidrolisar a butirilcolina (BCh), a propionilcolina (PCh) e a ACh dependendo da espécie animal ou da ausência da AChE. Essas duas enzimas são bastante similares quanto ao mecanismo de ação, formas moleculares, natureza do sítio ativo e organização das subunidades (TAYLOR, 2012).

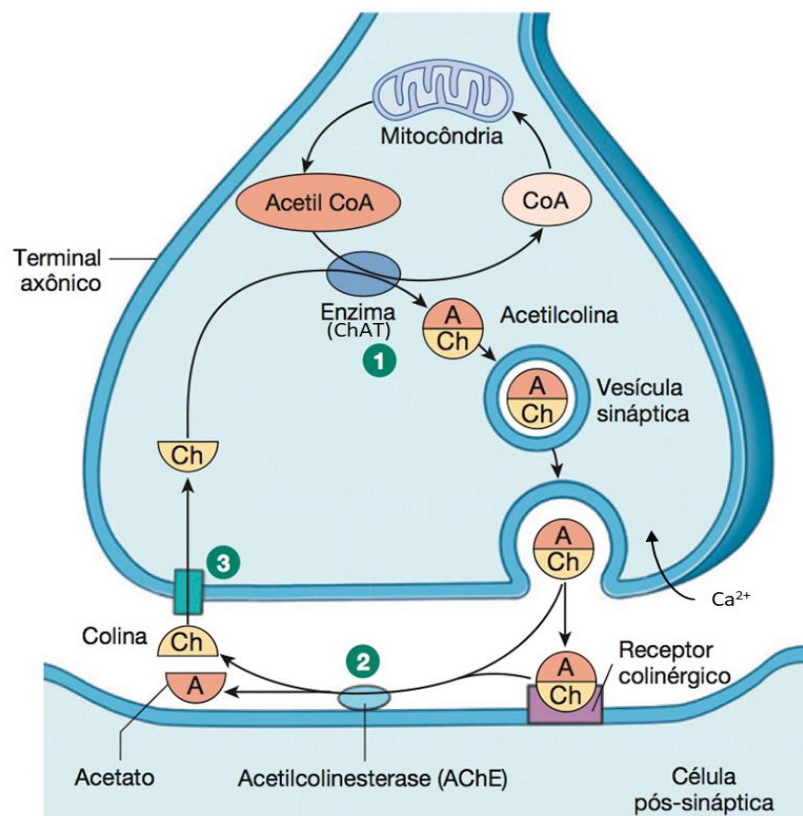
### **1.3.1 Acetilcolinesterase**

A AChE é uma serina hidrolase que desempenha um papel essencial na neurotransmissão colinérgica, catalisando a hidrólise natural do substrato acetilcolina em acetato e colina. Essa é uma função fisiológica bastante importante, uma vez que essa hidrólise é essencial para terminar a ação da acetilcolina nas sinapses colinérgicas e controlar os níveis do neurotransmissor na fenda sináptica. A acetilcolina (ACh) é um dos neurotransmissores mais estudados no SNC e SNP. A ACh é sintetizada (Figura 5) a partir da acetil coenzima A (AcetilCoA), um produto do metabolismo celular, e da colina, um importante produto do metabolismo dos lipídios (TAYLOR, 2012). Além disso, quando a ACh liberada é hidrolisada, mais de 50% da colina é normalmente recapturada pelas terminações nervosas. A colina livre dentro da terminação nervosa é acetilada pela enzima citosólica colina acetiltransferase (ChAT; EC 2.3.1.6), que transfere o grupo acetil da AcetilCoA para a colina. A etapa limitante da velocidade da síntese de ACh parece ser o transporte de colina, cuja atividade é regulada pela velocidade com que a ACh é liberada. A maior parte da ACh

sintetizada é armazenada em vesículas sinápticas e a liberação ocorre por exocitose desencadeada pela entrada de cálcio na terminação nervosa (RANG & DALE, 2011).

As ações da ACh resultam na ativação dos receptores nicotínicos, encontrados na placa motora terminal do músculo esquelético e gânglios autônomos; e dos receptores muscarínicos, encontrados na musculatura lisa, coração e glândulas exócrinas. No SNC dos mamíferos estão presentes os dois tipos de receptores, onde os muscarínicos estão envolvidos no controle motor, na regulação da temperatura, regulação cardiovascular e memória (CAULFIELD e BIRDSALL, 1998).

Figura 5 – Mecanismo de síntese, liberação e degradação da ACh



Fonte: adaptado de <http://neuroquimicaclinica.blogspot.com>. Acessado em setembro de 2018.

A ACh é sintetizada a partir do acetil do AcetilCoA, por ação da ChAT (1). Essa ACh é armazenada em vesículas no neurônio pré-sináptico e é liberada na fenda após influxo de  $Ca^{2+}$ . Na fenda sináptica, a ACh é rapidamente hidrolisada pela AChE em colina e acetato (2). A colina é transportada de volta para o terminal axônico e utilizada para a síntese de mais ACh (3).

Vários estudos sugerem que a AChE tem outras funções biológicas além da sua clássica função em terminar as transmissões nas sinapses colinérgicas. As funções não clássicas da AChE incluem a hidrólise da ACh em contextos não sinápticos, ação como proteína de adesão envolvida no desenvolvimento e manutenção das sinapses, como matriz proteica para ossos, envolvimento no supercrescimento neurítico e aceleração da montagem de peptídeo  $\beta$ -Amilóide em fibras amiloídicas (SILMAN e SUSSMAN, 2008).

### 1.3.2 Butirilcolinesterase

A BChE é mais abundante no plasma e no fígado, seguido da pele e músculos da perna. O RNAm para a BChE está presente no fígado, pulmão, cérebro e coração (LOCKRIDGE, 2015). Os primeiros estudos mostraram que ela degrada succinilcolina no músculo (KALOW, 1962). Depois descobriu-se que alguns indivíduos não têm a BChE e apesar disso, são indivíduos saudáveis (DOENICKE, 1963). Isso levou a pensar que a BChE não tinha função fisiológica importante. Li e col. (2000) demonstraram que camundongos *knockout* para o gene da AChE e com atividade normal da BChE conseguiram sobreviver por mais de um ano. Em um estudo similar, Adler e col. (2004) obtiveram os mesmos resultados, sugerindo assim que a atividade da BChE pode substituir em parte a atividade da AChE, ou seja, na ausência da AChE, a BChE hidrolisa a ACh. Outras pesquisas indicam também que a BChE possa ser um co-regulador da atividade do neurotransmissor ACh. Isso foi possível com a demonstração de que a inibição da BChE leva a um aumento dose-dependente nos níveis de ACh no cérebro (DARVESH, 2003)

Sabe-se também que a BChE plasmática humana apresenta propriedades de promover a desintoxicação de substâncias tóxicas que são ingeridas ou inaladas, hidrolisando-as em metabólitos inativos (LOCKRIDGE, 2011). Variantes da BChE, obtidas por meio de cultura de células, hidrolisam agentes OF em uma velocidade suficiente para ser usada como contramedida desses compostos químicos (LOCKRIDGE, 2015). Além disso, foi demonstrado que a BChE catalisa a hidrólise de

outros ésteres, como cocaína, ácido acetilsalicílico e heroína (GATLEY, 1991; LOCKRIDGE, 1980; MASSON, 1998). Alguns estudos até sugerem o uso da BChE no tratamento de intoxicação por cocaína, já que a BChE hidrolisa a cocaína no plasma, diminuindo os danos ao SNC (BRIMIJOIN, 2013). A atividade da BChE também está relacionada com o metabolismo de gordura. Camundongos *knockout* para a BChE tornaram-se obesos com uma dieta rica em gordura, comparado aos camundongos selvagens. Acredita-se que a deficiência da BChE esteja associada a diminuição do catabolismo de gordura (DE VRIESE, 2004; 2007).

No SNC, o papel do BChE é menos conhecido do que da AChE. Como uma afirmação geral, a BChE está associada à glia, em contraste com a AChE, que é encontrada quase exclusivamente em neurônios. A BChE também está associada aos neurônios, particularmente no hipocampo, na amígdala e no tálamo. Essas áreas estão associadas particularmente à memória e à consolidação e transferência de informações, bem como à emoção (JOHNSON e MOORE, 2012). Bullock e Lane (2007) postularam que os neurônios que expressam a BChE que se projetam no córtex frontal podem controlar a atenção e a memória emocional. Evidências sugerem também, que o sistema colinérgico no hipocampo está envolvido na plasticidade sináptica e, portanto, na formação da memória (COLGIN, 2003).

### **1.3.3 Formas moleculares**

As ChEs são proteínas polimorfos, ocorrendo assim em múltiplas formas moleculares, que diferem quanto a solubilidade, modo de ligação e atividade catalítica. Estas podem existir em duas classes gerais de formas moleculares: oligômeros homoméricos simples de subunidades catalíticas, também chamadas de globulares; e associação heteroméricas de subunidades catalíticas e subunidades estruturais, também chamadas de assimétricas (NIGG e KNAAK, 2000).

As formas globulares contêm uma cabeça onde se localiza o sítio catalítico. São sintetizadas como monômeros catalíticos globulares (G1) os quais se oligomerizam por fazerem ligações bissulfetos formando as isoformas G2 e G4 no

retículo endoplasmático rugoso (tabela 1). As isoformas apresentam características cinéticas similares, mas diferem entre elas quanto a interação iônica e hidrofóbica (TAYLOR, 2012).

A forma assimétrica localiza-se nas terminações sinápticas das fibras motoras e possuem “cabeças” glicosiladas ligadas a grupamentos sulfidrílicos (SH) e “caudas” contendo colágeno. Na cabeça encontra-se o sítio catalítico enquanto a cauda liga a enzima à superfície celular. Essa espécie molecular associa-se com a lâmina basal externa da sinapse. É abundante nas áreas juncionais da musculatura esquelética. Outro tipo de subunidade estrutural, ao qual o tetrâmero de subunidades catalíticas se encontra ligado por pontes dissulfeto, tem sido caracterizado no cérebro. Essa subunidade contém lipídio ligado covalentemente, possibilitando que essa forma da enzima se associe a membrana plasmática. As diferentes conformações das subunidades e as modificações pós-traducionais levam a localização distintas das ChEs na superfície celular (tabela 1), mas parecem não afetar sua atividade catalítica intrínseca (TAYLOR e BROW, 1994).

#### 1.3.4 Estruturas

O centro ativo da AChE é constituído de dois subtipos principais. O primeiro é um sítio aniônico, carregado negativamente, que recebe a cabeça catiônica da ACh (grupo quaternário)  $[-N^+ (CH_3)_3]$ . O segundo, a cerca de 5Å de distância, é um sítio esterásico que aloja o grupamento éster e carbonila da ACh (TAYLOR e RADIC, 1994).

A estrutura tridimensional da AChE demonstra que o centro ativo é quase centrossimétrico a cada unidade e reside na base de um gargalo estreito com uma profundidade de cerca de 20Å. Na base desse gargalo situam-se os resíduos da tríade catalítica: serina 203 (Ser203), histidina 447 (His447) e glutamato 334 (Glu334) (SUSSMAN, 1991; BOURNE, 1999). De acordo com Bourne e colaboradores (1999), os inibidores da enzima podem se ligar ao centro ativo ou a um sítio alostérico localizado no lábio do gargalo, o sítio aniônico periférico (PAS).

Tabela 1- Polimorfismo molecular da AChE e BChE

<b>Hidrofílica, formas solúveis em água secretadas nos fluídos corporais</b>			
<b>AChE</b>			
<b>G<sub>1</sub></b>	<b>G<sub>2</sub></b>	<b>G<sub>4</sub></b>	<b>A<sub>12</sub></b>
	Produto da degradação da G <sub>4</sub>	Secretada pela glândula adrenal; células nervosas periféricas, encontrada no plasma e fluido espinhal	
<b>BChE</b>			
<b>G<sub>1</sub></b>	<b>G<sub>2</sub></b>	<b>G<sub>4</sub></b>	<b>A<sub>12</sub></b>
	Produto da degradação da G <sub>4</sub> (5%)	Plasma humano (95% da atividade)	
<b>Formas imobilizadas, assimétrica</b>			
<b>AChE</b>			
<b>G<sub>1</sub></b>	<b>G<sub>2</sub></b>	<b>G<sub>4</sub></b>	<b>A<sub>12</sub></b>
			Musculatura do vertebrado primitivo <i>Torpedo Californica</i>
<b>BChE</b>			
<b>G<sub>1</sub></b>	<b>G<sub>2</sub></b>	<b>G<sub>4</sub></b>	<b>A<sub>12</sub></b>
			Músculos de aves e mamíferos
<b>Fórmulas globulares anfílicas (ancorada a membrana)</b>			
<b>AChE</b>			
<b>G<sub>1</sub></b>	<b>G<sub>2</sub></b>	<b>G<sub>4</sub></b>	<b>A<sub>12</sub></b>
	Eritrócitos (âncora glicolípídica PI, clivada por protease)	Cérebro de mamíferos (ancorada à ácidos graxos) – 90%	
<b>BChE</b>			
<b>G<sub>1</sub></b>	<b>G<sub>2</sub></b>	<b>G<sub>4</sub></b>	<b>A<sub>12</sub></b>
	Coração do <i>Torpedo marmorate</i> e gânglios cervicais superiores de ratos	Forma solúvel em detergente, reportada no cérebro de mamíferos – 5 a 10%	

Fonte: adaptada de Nigg e Knaak, 2000.

Existem evidências de que AChEs de vertebrados possuem um sítio secundário de ligação do substrato, o PAS, que regula a catálise de modo alostérico. Tem sido sugerido que esse sítio periférico possa estar envolvido na ação de determinados inibidores da enzima ou na inibição por excesso de substrato. Um modelo geral foi



proposto para descrever o comportamento das ChEs de vertebrados. Esse modelo propõe que o substrato pode se combinar com dois sítios distintos, o sítio ativo e o PAS, formando dois diferentes complexos: o complexo binário enzima-substrato e um complexo ternário substrato-enzima-substrato. Ambos levam a hidrólise do substrato, mas com eficiência diferente. A ocupação do sítio periférico afeta a conformação do centro ativo e também a configuração ou a afinidade dos compostos ligados ao centro ativo (TAYLOR, 2012).

Cada subunidade catalítica da BChE humana possui 574 resíduos de aminoácidos. A BChE contém uma tríade catalítica, composta por serina 226, histidina 466 e ácido glutâmico 353. Com base em uma semelhança esperada com a estrutura cristalina da AChE, a tríade catalítica da BChE é provavelmente encontrada no fundo de um desfiladeiro de 20 Å que é revestido por seis resíduos de aminoácidos aromáticos. Além da tríade catalítica, o desfiladeiro do sítio ativo contém o que é denominado "sítio aniônico", que pode se ligar ao nitrogênio catiônico da colina (DARVESH, 2003).

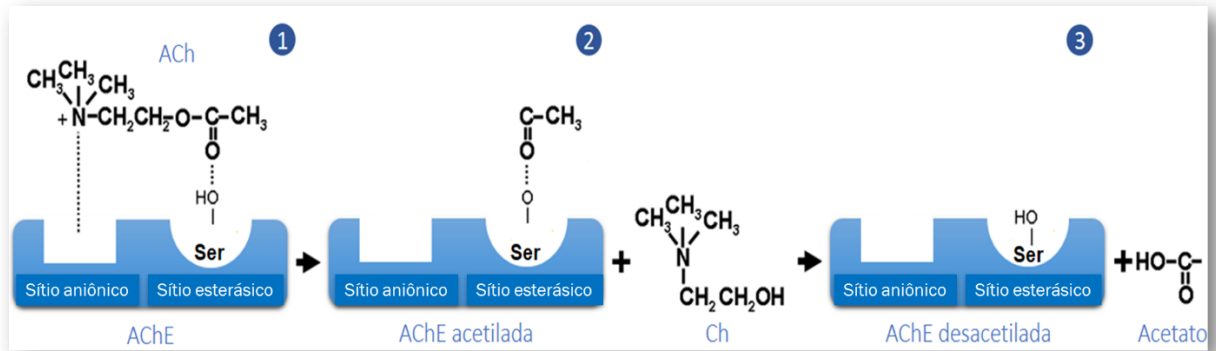
### **1.3.5 Mecanismo de ação**

O mecanismo catalítico das ChEs assemelha-se ao de outras hidrolases, onde o grupamento hidroxila da serina torna-se altamente nucleofílico por um sistema de reposição de carga que envolve o grupamento carboxila do glutamato, o imidazol da histidina e a hidroxila da serina (TAYLOR, 2012).

A primeira etapa da ligação enzima-substrato se dá pelo ataque nucleofílico da hidroxila da serina do local esterásico sobre o grupamento éster-carbonila do substrato, promovendo a quebra da ligação (figura 6). Durante o ataque enzimático sobre o éster, é formado um intermediário tetraédrico entre a enzima e o éster, que entra em colapso e forma um conjugado acetil-enzima, com liberação concomitante da colina. O complexo acetil-enzima é passível de hidrólise e essa resulta na formação do acetado e da enzima ativa (figura 6). Dessa forma, a enzima é totalmente regenerada. A acetil-enzima formada tem vida curta, o que determina a alta eficiência

da enzima. A AChE é uma das enzimas mais eficientes e hidrolisa  $6 \times 10^5$  moléculas de ACh por molécula de enzima por minuto, indicando um tempo de renovação de 150 microssegundos (TAYLOR, 2012).

Figura 6- Mecanismo de ação da AChE



Fonte: COSTA, 2016.

Ataque nucleofílico do sítio ativo ao grupamento Ch e atração eletrostática do sítio aniônico ao grupamento  $N^+$  (1), seguida da acetilação da AChE (2) e rápida desacetilação (hidrólise) da AChE, produzindo acetato e colina (Ch) (3).

### 1.3.6 Inibidores

Inibidores enzimáticos são moléculas que interferem com a catálise, diminuindo ou interrompendo as reações enzimáticas. Essa inibição pode ser reversível ou irreversível. Dentro da inibição reversível temos I) inibidor competitivo, II) inibidor incompetitivo, III) inibidor misto e IV) inibidor não competitivo. Na inibição competitiva, o inibidor compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima; à medida que o inibidor ocupa o sítio ativo, ele impede que o substrato se ligue a enzima. O incompetitivo liga-se em um sítio distinto do sítio ativo. No caso do inibidor misto, há uma ligação a um sítio distinto do sítio ativo, podendo ligar tanto a enzima, quanto ao complexo enzima-substrato. E a inibição não competitiva, é quando o inibidor se liga em outro lugar, que não o sítio ativo da enzima. A inibição do sítio ativo pode se dar tanto pela ligação do inibidor diretamente no sítio ativo, como através de um impedimento alostérico, onde o inibidor se liga na enzima de tal maneira que impede a ligação do substrato ao sítio

ativo. Na inibição irreversível os inibidores ligam-se covalentemente ao grupo funcional, o destroem, ou então formam uma associação não covalente estável com a enzima, inativando-a (NELSON e COX, 2014).

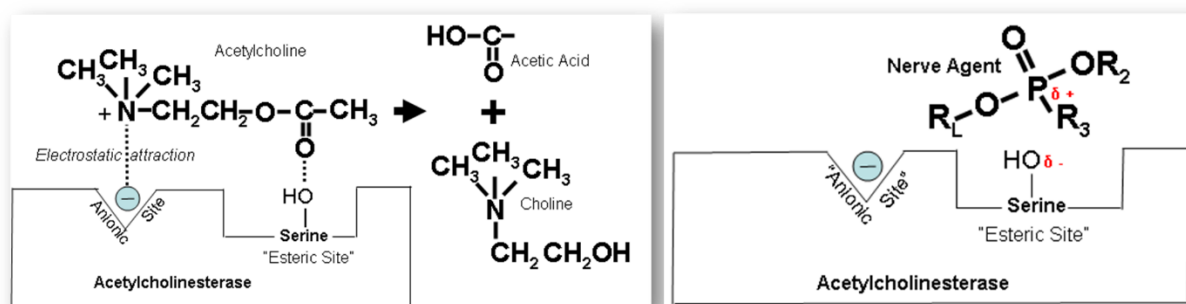
Os anticolinesterásicos ou inibidores das colinesterases (iChEs) são compostos de origem natural ou artificial que possuem a capacidade de inibir a atividade das ChEs e, por consequência, aumentando as concentrações de seus substratos no meio e potencializando os efeitos parassimpáticos. Assim, o efeito farmacológico dos iChEs se deve a ação de ACh atuando por mais tempo em seus receptores (TAYLOR, 2012).

Considera-se que a reação das ChEs com substratos e sua inibição por OF ocorre por um mecanismo análogo. As ChEs hidrolisam rapidamente ésteres de colina, e mais lentamente ésteres de fósforo. Compostos que tem uma ligação éster carbamílica, como a fisostigmina e a neostigmina, que são fármacos usados no tratamento da doença de Alzheimer, são hidrolisadas pela AChE, porém de forma mais lenta do que com a ACh. Por atuarem como substratos alternativos com uma orientação semelhante a ACh, o ataque pelo centro ativo da serina origina a enzima carbamilada. O sequestro da enzima em sua forma carbamilada impede assim, a hidrólise da ACh catalisada pela enzima por períodos prolongados de tempo (TAYLOR, 2012).

Isso não acontece no caso dos inibidores éster de fosfato, o grupo fosforila (do éster de fosfato) permanece ligado a enzima, impedindo que ela reaja com outra molécula. Os OF atuam como hemi-substratos verdadeiros, uma vez que o conjugado resultante com a serina fosforilada é extremamente estável. Os OF do grupo dos fosforotioatos, do qual o DZ faz parte, tem o seguinte mecanismo de ação: o grupo  $P=O$  se liga ao grupo hidroxil da serina do sítio esterásico da enzima de uma maneira análoga ao grupo  $C=O$  do substrato fisiológico ACh. Normalmente, o complexo formado entre a enzima e o substrato é clivado, deixando a enzima acetilada, que é tão rapidamente hidrolisada para regenerar o grupo hidroxil da serina, e assim, a funcionalidade da enzima. No caso dos OF como o DZ, o composto ligado também sofre clivagem para liberar o grupo correspondente tiol ou álcool, deixando a enzima fosforilada. Essa enzima fosforilada, diferentemente do intermediário acetilado da

enzima produzido quando o substrato é a ACh, é hidrolisada muito lentamente, quando isso ocorre. Por consequência, o sítio ativo da enzima é efetivamente bloqueado. Se a enzima fosforilada sofrer uma alteração conhecida como *envelhecimento*, no qual um dos grupos ligados ao átomo de fósforo é perdido, então a inibição pode se tornar permanente (TIMBRELL, 1991).

A toxicidade de um inibidor vai depender basicamente da afinidade da enzima por ele e da taxa de hidrólise do intermediário fosforilado, sendo que isso está na dependência da natureza dos grupos substituintes no átomo de fósforo. Além disso, as taxas do metabolismo que leva ao metabólito ativo também serão determinantes da toxicidade do composto (COLOVIC, 2013).



Apesar dos compostos OF serem rapidamente metabolizados e por essa razão não acumularem no animal, doses crônicas podem causar efeitos tóxicos cumulativos devido a essa lenta reversão da inibição. Por isso, em alguns casos, a ressíntese da enzima pode se tornar o fator limitante no caso de intoxicação (TAYLOR, 2014).

Os efeitos tóxicos da inibição das ChEs por uma exposição crônica aos OF são principalmente neurológicos, como problemas de aprendizagem e memória, atenção, impulsividade, locomoção, depressão e ansiedade. Essas alterações são estudadas em laboratório por meio testes comportamentais envolvendo animais, incluindo o labirinto aquático de Morris (LAM), labirinto radial, labirinto de Barnes, esQUIVA inibitória (EI), reconhecimento do novo objeto (RNO) e testes de condições operantes, para avaliar memória e aprendizado (VOORHEES, 2017).

Estudos mostram que a exposição aguda ao OF clorpirifós (CPF) causa déficit de aprendizado na tarefa do LAM, onde os animais expostos ao OF necessitaram mais tempo para aprender a localização da plataforma de escape, menor tempo no quadrante alvo e menor número de cruzamentos no lugar da plataforma. Nesse estudo, a atividade da AChE no plasma era entre 30 e 60%. Esse mesmo estudo mostrou que os resultados comportamentais não se mantem depois de uma semana da exposição (TERRY, 2003). Paradigmas de uma exposição mais longa ao CPF causam uma maior supressão da ChE plasmática ao longo do tempo, mas défices semelhantes no LAM. Ratos expostos a CPF em dias alternados durante 30 dias exibiram 80% de inibição da CHE no plasma e déficit na tarefa da EI, após um período de 7 dias (TERRY, 2007). E a exposição por 30 dias consecutivos, diminui a atividade das ChEs plasmática em até 80%, resultou em déficit de RNO e MWM após períodos prolongados de 50 e 140 dias, respectivamente (TERRY, 2012).

Estudos com outro OF menos conhecido, o diclorvós (DDVP), mostrou que uma exposição de doze semanas causou redução da atividade das ChEs séricas entre 10 e 55% e 20 a 80% da AChE cerebral, além de danos no aprendizado, analisado na tarefa LAM e EI, e apresentou também déficit na atividade locomotora avaliado pela atividade rotatória (VERMA, 2009). Outro estudo, usando um OF da mesma classe do DZ, o metil paration (MP) durante 10 dias, mostrou que a redução de 30% da atividade da AChE no plasma induziu deficiência na aprendizagem no LAM em ratos (CASTILLO, 2002). Usando também o MP, mas por 21 dias, Sun e colaboradores (2006) verificaram uma redução de 80% na atividade da AChE cerebral, sem apresentar déficit cognitivo na tarefa da EI.

Não foram encontrados resultados na literatura relacionando a exposição de camundongos ao DZ com as tarefas comportamentais, por isso optamos por realizar as tarefas do CA e LAM. O teste do campo aberto (do inglês, *open field*) por exemplo, pode ser usado para analisar atividade locomotora e exploratória dos animais. O labirinto aquático de Morris (do inglês *Morris water maze*) é uma tarefa comportamental usada para avaliar a memória e a aprendizagem.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição à diferentes doses de diazinon e durante diferentes períodos sobre a cognição, e a atividade da AChE e da BChE.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Avaliar em camundongos adultos expostos a duas diferentes doses de diazinon e por 2 períodos diferentes:

- I) a memória e a capacidade de aprendizado, através de testes comportamentais,
- II) a atividade das enzimas AChE e BChE cerebral como parâmetro colinérgico associado a análise comportamental,
- III) atividade da AChE e da BChE em órgãos periféricos, como resposta de detoxificação ou toxicidade colinérgica

2.2.2. Avaliar os parâmetros cinéticos da enzima AChE *in vitro*, nos órgãos onde houve alteração da atividade da enzima *in vivo* e *ex vivo*, por meio da determinação do IC<sub>50</sub> e do  $K_m$  e  $V_{max}$  aparentes.

### **3 DESENVOLVIMENTO**

A dissertação está apresentada em uma introdução geral do tema abordado e o trabalho experimental na forma de um manuscrito, o qual está apresentado no formato de texto com as figuras e tabelas. As referências relativas a introdução encontram-se no final dessa dissertação.

# Diazinon affects the activity of peripheral cholinesterases without altering the behavior of mice

J. S. Bernardi<sup>1</sup>, M. D. Costa<sup>1\*\*</sup>, M. E. Pereira<sup>1,2\*\*</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Biological Sciences - Toxicological Biochemistry

<sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology

\*\* Corresponding author at: Michael Costa and Maria Ester Pereira

Postgraduate Program in Biological Sciences - Toxicological Biochemistry

Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa

Maria, RS, Brazil. CEP: 97105-900, RS, Brazil. Tel: +55-55-3220-8799. E-mail

address: [michaeldcp@outlook.com](mailto:michaeldcp@outlook.com); [pereirame@yahoo.com.br](mailto:pereirame@yahoo.com.br).

**ABSTRACT:** Diazinon (DZ) is an organophosphorus compound commonly used in agriculture and veterinary. The DZ is characterized by inhibit cholinesterases [ChEs; acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE)], causing damage mainly to the central and peripheral nervous system. The objective was to investigate the effects of short and long-term exposure to two doses of DZ on the behavioral performance and activity of ChEs of brain and peripheral tissues, as well as to study the kinetic parameters of AChE inhibition by DZ, *in vitro*. Male *Swiss* adult mice were used were subcutaneously exposed at doses of 0, 10 or 100 mg/kg of DZ for 10 or 30 days. The animals were submitted to open field (OF) and Morris water maze (MWM) tasks. Samples of tissues were collected 24 h after end of treatments to measure ChEs. Exposure to DZ did not alter the locomotor activity, memory, neither cortex and hippocampus ChEs activities. In peripheral tissues, DZ exposure for 10 days decreased the activity of AChE of the stomach, and of BChE of stomach, kidney, lung and plasma. Exposure for 30 days to decreased AChE activity of intestine, heart, liver and pancreas; and decreased BChE activity of intestine, kidney, liver, lung and pancreas. *In vitro* results show that AChE from cerebral tissues is insensitive to DZ; while the enzymes of from peripheral tissues are more sensitive to the compound. DZ inhibited of the uncompetitively way the AChE from heart and pancreas and exhibits mixed-type behavior for AChE of the stomach and liver at the highest concentration tested. The absence of behavioral changes may be related to the absence of inhibition of cortex and hippocampus ChEs.

**KEYWORDS:** organophosphorus; cognitive deficit; pesticide; acetylcholinesterase; butyrylcholinesterase; enzymatic kinetics.



## 1 INTRODUCTION

The organophosphorus compounds (OP) are organic chemical compounds that contain in their structure a phosphorus atom. They are commonly used as pesticides in agriculture and in gardens, as parasiticides in veterinary medicine and as nerve gas in war (VOORHEES, 2017). Among pesticide classes, OP compounds are responsible for most of the poisoning in humans and therefore are considered a problem in developing countries where they are most easily consumed (KAMATH, 2007). According to the World Health Organization, more than one million incidents of poisoning and two million attempts of suicide by OP poisoning are described annually around the world (WHO, 2015).

Diazinon (DZ) is an insecticide and parasiticide belonging to the phosphonothioate class of OP (NIGG and KNAAK, 2000). Due to its effectiveness and low cost, DZ becomes one of the most broadly-exploited pesticides in the whole world. In the year 2000, Cox (2000) stated that 75 million applicants in the U.S. annually consume over 5 million pounds of DZ. In Brazil DZ along with metaminophos, phenitrothion, ethion and chlorpyrifos are the most commonly used OP (GRECCO et al., 2009). Accordly to the Pan American Health Organization this class of pesticides is the responsible for the highest number of poisonings and deaths of people in the 1990s (PAHO, 1996). In the present days DZ is still freely marketed for agricultural and veterinary purposes.

DZ, as well as other OP, has as its main toxic effect the inhibition of cholinesterases (ChEs), among them acetylcholinesterase (AChE, EC: 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BChE, EC: 3.1.1.8), resulting in accumulation of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) and, as a consequence, a greater stimulation of the cholinergic synapses in the central nervous system (CNS), parasympathetic nerves and glands (RING et al., 2015). Acute toxic effects such as nausea, vomiting, convulsions, salivation and tremors, are related to the over stimulation of muscarinic and nicotinic receptors by ACh (BARTH and BIAZON, 2010). The chronic effects are: the development of the intermediate syndrome, characterized by muscular paralysis, and the delayed neurotoxicity syndrome (SOCKO et al., 1999).

AChE is found mainly in the CNS, in the neuromuscular junctions and in the hematopoietic system of vertebrates playing a fundamental role in cholinergic

neurotransmission (BOURNE et al., 2006); while BChE is found mainly in the liver, lung and brain and, at even higher levels, in blood plasma (LOCKRIDGE, 2015). In addition, the BChE hydrolyzes ACh mainly in situations of reduction of AChE activity (LOCKRIDGE et al., 2011; LOCKRIDGE, 2015), as well as participation in detoxification processes (VANWAGENEN et al., 1993; LIYASOVA et al., 2013) and lipid metabolism (VRIESIE, 2004; 2007).

The immediate effects of exposure to high levels of OP involving the inhibition of ChEs and causing changes in the CNS (MACKEMZIE et al., 2010). In humans can lead to sequencing and problem solving, deficits in signal detection and information, sustained attention, memory abstraction, flexibility of thinking and processing (SAVAGE et al., 1988; ROSENSTOCK et al., 1991; STEENLAND et al., 1994; DASSANAYAKE et al., 2007). Chronical exposure to low doses of OP can be associated with deficits in short-term memory, learning, attention, and information processing (SINGH and SHARMA, 2000). Animal studies indicate that chronic or repeated exposure to OP at levels not associated with acute toxicity can lead in to spatial learning, recognition memory, cognitive flexibility deficits, findings that support these clinicals and epidemiological observations (TERRY et al., 2003; 2007; 2011; 2012).

Based on the above considerations, the purpose of the present study was to investigate the short and long DZ exposure effect on mice central and peripheral ChEs activities and its potential cognitive impairment induction.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Chemicals

Acetylthiocholine (ATCh), butyrylthiocholine (BTCh), bovine serum albumin, and 5,5'-dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB) were obtained from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Potassium phosphate monobasic was obtained from Proquimios Comércio e Indústria (Rio de Janeiro, RJ, BR), and potassium phosphate dibasic from Neon Comercial Ltda (São Paulo, SP, BR). Coomassie brilliant blue G, dimethyl sulfoxide (DMSO), and Triton X-100 were obtained from Vetec

Quimica Fina Ltd (Duque de Caxias, RJ, BR), and diazinon (DZ) to *in vivo* studies was obtained from Lusa S.A. (Montevideo, UY). All other chemicals were obtained in an analytical grade or from standard commercial suppliers.

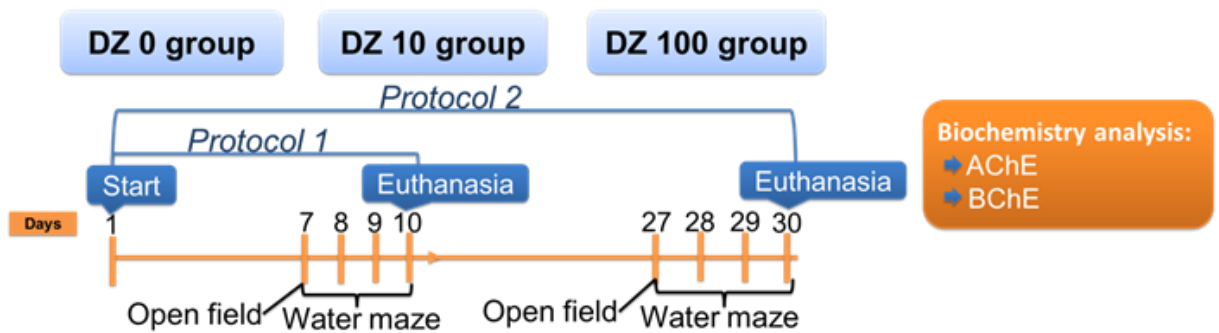
## **2.2 Animals**

Adult male Swiss mice (25-30 g) around two months old were maintained in groups in opaque plastic cages, with free access to water and food under a 12:12 h light/dark cycle at  $23 \pm 2$  °C. Animals were used according to the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources guidance, the Federal University of Santa Maria, Brazil (Process N° 6836140815/2015). All experimental procedures were realized between 10 am and 4 pm. On days of the behavioral tasks the animals were transferred to the test room and allowed to explore and acclimate to the new environment for approximately 1 h before the testing started. All efforts were made to minimize animals' suffering and to reduce the number of animals used in the experiments.

## **2.3 *In vivo* study**

### **2.3.1 Treatment**

The animals were exposed to DZ according to two experimental protocols (figure 1). For both protocols the animals were divided in three groups. The first animals group received vehicle (saline; NaCl 0.9%), being denominated DZ 0 group; the second group received DZ 10 mg/kg, being denominated DZ10 group and the third group received DZ 100 mg/kg and, was denominated DZ100 group. Saline or DZ were administered subcutaneously (2.5 ml/kg) once a day, totalizing 10 days for protocol 1 and 30 days for protocol 2. On days of behavioral experiments, the drugs were administered after the tasks.



**Fig 1** - Experimental protocol.

### 2.3.2 Behavioral experiments

#### 2.3.2.1 Open field

The open field task (OF) was performed according Walsh and Cummins (1976) as described in Costa et al. (2017) to evaluate the exploratory locomotor activity, on 7<sup>th</sup> (protocol 1) and 27<sup>th</sup> (protocol 2) days of DZ exposure. This test was performed in a rectangular arena measuring 45 x 60 x 50 cm, with floor divided in twelve squares (15 x 15 cm). Each animal was placed individually in the center of the arena and the time to perform the first crossing (four-legged criterion), crossings, rearings and fecal boluses were recorded in a 5 min session. The arena was cleaned with 45% ethanol between each animal.

#### 2.3.2.2 Morris water maze

Spatial learning and memory were assessed using the Morris water maze (MWM) task according to the method of Morris (1984) and described in Costa et al (2017). The task was realized on 7<sup>th</sup> to 10<sup>th</sup> (protocol 1) or 27<sup>th</sup> to 30<sup>th</sup> (protocol 2). The maze consisted of a basin (diameter: 100 cm, wall height: 54 cm) made of navy-blue plastic and filled with water ( $26 \pm 1$  °C) at a height of 41 cm. The pool was placed in a room with several extra maze visual cues. For fourth days the animals were submitted to four trials each day [starting in the north (N), then east (E), then south (S) and last west (W)]. The escape platform was hidden 0.5 cm below water level in the middle of

the northwest (NW) quadrant. Once the mice have succeeded in find the platform it remained on this for at least 40 sec after each trial. Whenever mice failed to reach the escape platform within the 1 min cutoff period, they were guided to the platform and were left there for 40 sec. The escape latency to reach the platform was calculated as the mean of total time spent in four trials along the four days.

## **2.4 Ex vivo analysis**

### *2.4.1 Sample preparations*

After the last evaluation on the MWM (days 10 and 30 for protocols 1 and 2, respectively) the animals where anesthetized and euthanized by cardiac puncture for blood collection and tissues dissection. The blood was collected in heparinized tubes and centrifuged at 1000 x g for 10 min for separation of plasma (S1) and erythrocytes (precipitate). The erythrocytes were hemolyzed in phosphate potassium cold buffer (KPB) 0.1 M, pH = 7.1 (1:30 v/v), contain 2% of Triton X-100. The plasma was also diluted in KPB, in a proportion of 1:50 (v/v). The tissues cerebral (cortex and hippocampus), spleen, heart, stomach, liver, small intestine, skeletal muscle, pancreas, lung, and kidney were dissected and homogenized in cold KPB 0.1 M, pH = 7.1 (1:10 w/v), containing 1% of Triton X-100. The samples were centrifuged at 1200 x g for 10 min at 4 °C to obtain supernatant (S1) which was used to cholinesterases (ChEs) activity analysis.

### *2.4.2 Cholinesterases assays (ChEs)*

Acetylcholinesterase (AChE) specific activity was determined by a modification of the spectrophotometric method of Worek et al. (1999) to erythrocytes, and Ellman et al. (1961) as previously described by Costa et al. (2016) to other tissues. The assay medium contained 0.1 M KPB, pH 7.1 and 0.3 mM DTNB. The pre-incubation (2 min) at 30 °C was initiated by adding supernatant S1 and the reaction was initiated by adding 0.45 mM acetylthiocholine (ATCh) as substrate. The reaction velocity was measured by increasing absorbance at 412 nm for 3 min. For butyrylcholinesterase (BChE) specific activity, the same assay medium and S1 pre-incubation were used.

However, here the reaction was initiated by adding 0.45 mM butyrylthiocholine (BTCh) as substrate and the reaction velocity was measured by increasing absorbance at 412 nm for 3 min. The molar extinction coefficient to AChE specific activity measurement was  $0.0136 \mu\text{M}^{-1}$  and to BChE specific activity measurement was  $0.0106 \mu\text{M}^{-1}$ . Total protein concentration was measured by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as the standard. The hemoglobin level to calculate the specific activity of erythrocyte AChE was quantified according to Kampen e Zilstra (1964).

## **2.5 *In vitro* study**

### *2.5.1 Enzymatic material*

For the obtention of the enzymatic material a new set of fourteen wild type animals was used. The animals were euthanized under anesthesia by cervical dislocation and tissues were dissected. The tissues were individually weighed and homogenized 1:6 (w/v) in cold KPB 0.1 M, pH = 7.1. The homogenates were centrifuged at  $1200 \times g$  for 10 min at 4 °C to yield the low-speed supernatant (S1) fraction that was used in the AChE activity determination.

### *2.5.2 AChE enzymatic activity*

AChE activity was determined similarly to *in vivo* study except that 30 min of pre-incubation was chosen to be the time interval of greatest effect of DZ (preliminary study) and the incubation was initiated by adding 0.8 mM of ATCh. DZ was diluted in 0.1 M KPB containing 6 mM of DMSO (0.0468%).

Total protein concentration was measured by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as the standard.

### *2.5.3 IC<sub>50</sub>*

The half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was determined using five DZ final concentrations (1, 2.5, 5, and 10  $\mu\text{M}$ ) for the heart, pancreas, lung, and stomach;

six DZ concentrations (5, 10, 20, 30, 40, and 80  $\mu\text{M}$ ) for liver; and other five concentrations (40, 100, 200, 400, and 800  $\mu\text{M}$ ) for the brain.

The  $IC_{50}$  values were determined using the Dixon method, plotting  $1/V$  versus inhibitor concentration (Dixon and Webb, 1964).

#### 2.5.4 Kinetic parameters

DZ effect on AChE activities of heart, pancreas and stomach tissues were conducted using DZ concentrations of 1, 2, 3 and 4  $\mu\text{M}$ ; for liver tissue DZ concentrations of 5, 10 and 20  $\mu\text{M}$  were used. The concentrations used were based on  $IC_{50}$  results. The kinetic parameters Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) and maximum velocity ( $V_{max}$ ) were estimated by assaying the enzyme activity in presence of ATCh concentrations of 0.05, 0.1, 0.2, and 0.4 mM.  $K_m$  and  $V_{max}$  were calculated plotting  $1/V$  versus  $1/[S]$  (Lineweaver-Burk plot) (Dixon and Webb, 1964) as described in detail in Pereira et al., 2004.

## 2.6 Statistical analysis

Normality of data and homogeneity of the variances were analyzed by Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests, respectively. Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.) and analyzed by two-way ANOVA for MWM task and one-way ANOVA for all the other analyzed parameters, followed by the Tukey's multiple comparison test when appropriated. The significance level was set at  $p \leq 0.05$ .

## 2 Results

### 3.1 *In vivo*

#### 3.1.1 Behavioral tasks

### 3.1.1.1 Open field

Effect of DZ on mice performance in the OF in 10 and 30 days are shown in table 1 and 2, respectively. One-way ANOVA demonstrate no statistical differences in start time, crossing number, rearing number, and fecal boluses for both treatment intervals.

**Table 1-** Spontaneous locomotor and exploratory activity in the open field task of mice after 7 days of DZ exposure.

<b>10 days</b>				
	<b>Latency (sec)</b>	<b>Crossing (num)</b>	<b>Rearing (num)</b>	<b>Fecal boluses(num)</b>
<b>DZ 0</b>	5.87 ± 1.50	128.8 ± 10.41	45.63 ± 4.94	2.87 ± 1.37
<b>DZ 10</b>	5.15 ± 1.39	135.0 ± 8.55	39.63 ± 4.74	3.12 ± 0.70
<b>DZ 100</b>	4.67 ± 0.76	100.3 ± 8.06	38.86 ± 5.70	3.43 ± 0.53

Data are reported as the mean ± S.E.M. for n=7-8 animals per group. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA.

**Table 2-** Spontaneous locomotor and exploratory activity in the open field task of mice after 27 days of DZ exposure.

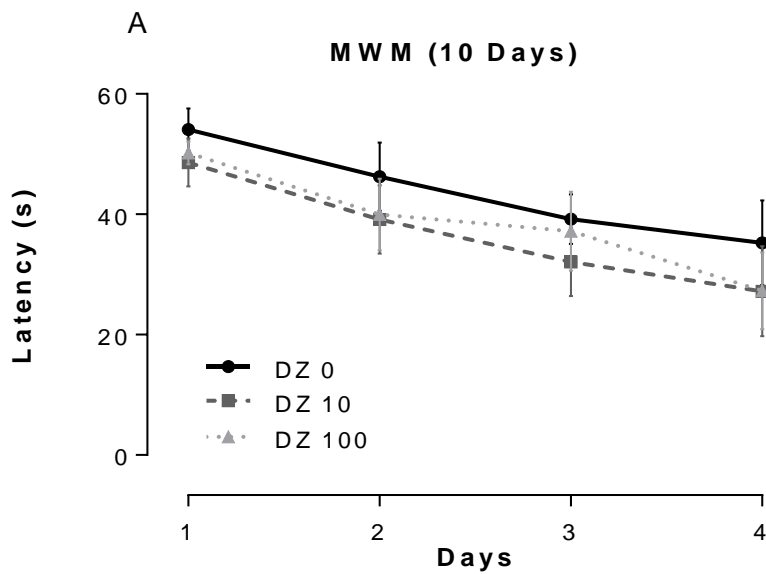
<b>30 days</b>				
	<b>Latency (sec)</b>	<b>Crossing (num)</b>	<b>Rearing (num)</b>	<b>Fecal boluses(num)</b>
<b>DZ 0</b>	5.10 ± 1.22	114.8 ± 13.48	39.50 ± 4.16	1.87 ± 0.58
<b>DZ 10</b>	8.53 ± 0.87	105.4 ± 10.32	42.14 ± 3.76	0.14 ± 0.14
<b>DZ 100</b>	6.25 ± 1.46	102.3 ± 17.09	38.00 ± 6.57	2.50 ± 1.04

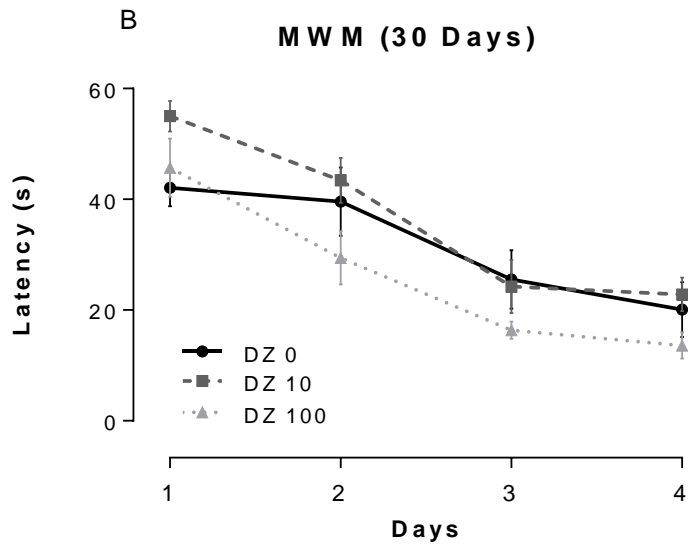
Data are reported as the mean ± S.E.M. for n=4-8 animals per group. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA.



### 3.1.1.2 Morris Water Maze task

Mice performances in MWM task along the four days of test is shown in Fig 2A and 2B for the animals exposed to DZ for 10 days and 30 days, respectively. The two-way ANOVA (three treatments x fourth days of task) shows that all groups for 10 days of exposure [ $F_{(3,60)}=11.68$ ,  $p<0.001$ ] and for 30 day of exposure [ $F_{(3,54)}=35.83$ ,  $p<0.001$ ] presented decrease in time to find the platform over the days. Statistic test showed no interaction effect (treatments x days).





**Fig 2-** Effects on spatial memory and learning capacity on Morris Water Maze, at 7 to 10 days of DZ exposition (Fig 1A) and at 27 to 30 days of DZ exposition (Fig 1B). Data are reported as the mean  $\pm$  S.E.M. for n=7-8 animals per group. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Tukey's test.

### 3.1.2 ChEs activity

AChE and BChE activity of mice exposed for 10 days (protocol 1) to DZ 10 or 100 mg/kg are showed in table 3. The one-way ANOVA revealed that the DZ exposure for 10 days decrease the AChE activity from stomach of mice exposed to DZ 100 mg/kg [ $F_{(2,18)}=4.666$ ,  $p=0.02$ ]. The BChE activity was lower in the plasma [ $F_{(2,18)}=23.73$ ,  $p=0.0004$ ] and stomach [ $F_{(2,17)}=7.086$ ,  $p=0.006$ ] of the animals exposed to both DZ doses, in the kidney [ $F_{(2,17)}=4,459$ ,  $p= 0.02$ ] after DZ 100 mg/kg, and lung [ $F_{(2,18)}=5.383$ ,  $p=0.02$ ] after DZ 10 mg/kg.

**Table 3-** AChE and BChE activities from tissues of mice exposed for 10 days to 10 or 100 mg/kg of DZ

	10 Days					
	AChE activity			BChE activity		
	μmol ATCh hydrolyzed/h/mg prot			μmol BTCh hydrolyzed/h/mg prot		
	DZ 0	DZ 10	DZ 100	DZ 0	DZ 10	DZ 100
<b>Cerebral Cortex</b>	2.26 ± 0.19	2.22 ± 0.19	2.02 ± 0.14	2.39 ± 0.25	1.88 ± 0.25	2.54 ± 0.28
<b>Erythrocyte<sup>a</sup></b>	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01	-	-	-
<b>Gut</b>	1.75 ± 0.22	1.57 ± 0.23	1.75 ± 0.35	1.58 ± 0.14	1.36 ± 0.21	1.38 ± 0.25
<b>Hippocampus</b>	1.28 ± 0.10	1.27 ± 0.14	1.22 ± 0.13	2.03 ± 0.19	1.89 ± 0.19	2.09 ± 0.20
<b>Heart</b>	0.56 ± 0.06	0.54 ± 0.06	0.48 ± 0.05	0.42 ± 0.07	0.38 ± 0.06	0.26 ± 0.04
<b>Kidney</b>	1.74 ± 0.26	1.87 ± 0.41	1.32 ± 0.38	0.97 ± 0.12	0.89 ± 0.18	0.42 ± 0.08*
<b>Liver</b>	0.37 ± 0.04	0.37 ± 0.08	0.34 ± 0.05	0.33 ± 0.03	0.33 ± 0.05	0.29 ± 0.05
<b>Lung</b>	0.98 ± 0.20	0.34 ± 0.83	0.58 ± 0.22	0.49 ± 0.09	0.17 ± 0.03*	0.25 ± 0.08
<b>Muscle</b>	0.34 ± 0.07	0.43 ± 0.10	0.45 ± 0.11	0.19 ± 0.04	0.23 ± 0.08	0.17 ± 0.05
<b>Pancreas</b>	0.51 ± 0.15	0.38 ± 0.10	0.27 ± 0.05	0.34 ± 0.11	0.31 ± 0.09	0.21 ± 0.05
<b>Plasma</b>	-	-	-	0.18 ± 0.03	0.07 ± 0.01*	0.06 ± 0.01*
<b>Spleen</b>	1.02 ± 0.16	0.83 ± 0.10	0.51 ± 0.09	0.22 ± 0.04	0.18 ± 0.03	0.13 ± 0.03
<b>Stomach</b>	2.25 ± 0.31	1.51 ± 0.25	1.18 ± 0.08*	1.34 ± 0.16	0.80 ± 0.06*	0.83 ± 0.06*

Data are reported as the mean ± S.E.M. for n=4-8 animals per group. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA. \* Significantly different from the sham group at least p<0.05 (Tukey's test). <sup>a</sup> AChE expressed as μmol ATCh hydrolyzed/h/mg hemoglobin.

AChE and BChE activity of mice exposed for 30 days (protocol 2) to DZ 10 or 100 mg/kg are showed in table 4. The one-way ANOVA revealed that the DZ exposure for 30 days decrease the AChE activity from heart [ $F_{(2,19)}=12.82$ ,  $p=0.0003$ ], gut [ $F_{(2,17)}=5.747$ ,  $p=0.01$ ], pancreas [ $F_{(2,19)}=5.318$ ,  $p=0.02$ ] in the mice exposed to higher DZ dose, and liver [ $F_{(2,19)}=33.15$ ,  $p<0.0001$ ] in the mice exposed to 10 and 100 mg/kg of DZ. Also decreased the BChE activity from gut [ $F_{(2,17)}=15.30$ ,  $p=0.0002$ ] and pancreas [ $F_{(2,19)}=7.939$ ,  $p=0.003$ ] after DZ 100 mg/kg exposure, and liver [ $F_{(2,19)}=51.51$ ,  $p<0.0001$ ], kidney [ $F_{(2,19)}=31.54$ ,  $p<0.0001$ ], and lung [ $F_{(2,19)}=59.98$ ,  $p<0.0001$ ] of the animals exposed to both DZ doses. Spleen BChE activity was increased by exposure of DZ 100 mg/kg [ $F_{(2,19)}=7.074$ ,  $P=0.005$ ].

**Table 4-** AChE and BChE specific activities from tissues of mice exposed for 30 days to 10 or 100 mg/kg of DZ

**30 days**

	<b>AChE activity</b>			<b>BChE activity</b>		
	$\mu\text{mol ATCh hydrolyzed/h/mg prot}$			$\mu\text{mol BTCh hydrolyzed/h/mg prot}$		
	<b>DZ 0</b>	<b>DZ 10</b>	<b>DZ 100</b>	<b>DZ 0</b>	<b>DZ 10</b>	<b>DZ 100</b>
<b>Cerebral Cortex</b>	0.54 ± 0.06	0.77 ± 0.15	0.74 ± 0.10	1.39 ± 0.21	1.58 ± 0.93	0.74 ± 0.17
<b>Erythrocyte<sup>a</sup></b>	0.005 ± 0.01	0.003 ± 0.01	0.005 ± 0.01	-	-	-
<b>Gut</b>	1.03 ± 0.15	1.07 ± 0.06	0.47 ± 0.10*	1.26 ± 0.05	1.16 ± 0.12	0.45 ± 0.10*
<b>Hippocampus</b>	2.35 ± 0.26	2.46 ± 0.25	1.33 ± 0.35	2.12 ± 0.27	2.46 ± 0.16	1.98 ± 0.49
<b>Heart</b>	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.04 ± 0.01*	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.01
<b>Kidney</b>	0.53 ± 0.04	0.59 ± 0.04	0.43 ± 0.11	0.46 ± 0.02	0.33 ± 0.01*	0.19 ± 0.04*
<b>Liver</b>	0.34 ± 0.01	0.24 ± 0.01*	0.18 ± 0.03*	0.33 ± 0.01	0.22 ± 0.01*	0.13 ± 0.02*
<b>Lung</b>	1.01 ± 0.66	1.06 ± 0.06	0.81 ± 0.10	0.94 ± 0.05	0.42 ± 0.03*	0.32 ± 0.02*
<b>Muscle</b>	0.23 ± 0.03	0.27 ± 0.04	0.23 ± 0.09	0.46 ± 0.02	0.52 ± 0.07	0.50 ± 0.06
<b>Pancreas</b>	0.86 ± 0.13	0.65 ± 0.04	0.35 ± 0.06*	0.84 ± 0.08	0.66 ± 0.06	0.35 ± 0.05*
<b>Plasma</b>	-	-	-	9.33 ± 1.24	10.54 ± 1.41	11.07 ± 1.03
<b>Spleen</b>	0.23 ± 0.03	0.35 ± 0.05	0.33 ± 0.10	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.25 ± 0.02*
<b>Stomach</b>	1.35 ± 0.12	1.43 ± 0.08	1.47 ± 0.06	1.12 ± 0.15	0.96 ± 0.08	0.95 ± 0.23

Data are reported as the mean ± S.E.M. for n=3-9 animals per group. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA. \* significantly different from the sham group at least p<0.05 (Tukey's test). <sup>a</sup> AChE expressed as  $\mu\text{mol ATCh hydrolyzed/h/mg hemoglobin}$ .

### 3.2 *In vitro*

#### 3.2.1 $IC_{50}$

The  $IC_{50}$  value was determined by plotting a 1/% of velocity *versus* DZ concentration ( $\mu\text{M}$ ) graph and using the straight equation to determine the concentration of DZ required reducing 50% of AChE activity (Tab 5).

**Table 5-**  $IC_{50}$  for inhibition of AChE activity from tissues of mice.

	<b><math>IC_{50}</math> (<math>\mu\text{M DZ}</math>)</b>
<b>Brain</b>	234.4 ± 11.5
<b>Heart</b>	3.35 ± 0.42

<b>Liver</b>	11.7 ± 1.72
<b>Lung</b>	15.5 ± 1.80
<b>Pancreas</b>	2.97 ± 0.33
<b>Stomach</b>	2.91 ± 0,25

Data are expressed as mean ± S.E.M. for 3-4 independent assays conducted in duplicate.

### 3.2.2 Determination of AChE $K_m$ and $V_{max}$

The kinetics parameters were calculate using Lineweaver-Burk plot (1/velocity versus 1/[substrate]) and are showed in table 6. The  $K_m$  was determined when line intersect 1/S-axis and  $V_{max}$  when line intersect 1/V-axis. Thus, the one-way ANOVA analysis the  $K_m$  of heart and pancreas were not altered and  $V_{max}$  decreased with the increase of DZ concentrations for heart [ $F_{(5,12)} = 15.15$ ,  $p < 0.0001$ ] and pancreas [ $F_{(5,12)} = 21.95$ ,  $p < 0.0001$ ].  $K_m$  and  $V_{max}$  values to liver and stomach were not altered in any DZ concentrations.

**Table 6-** Kinetic parameters (apparent  $K_m$  and  $V_{max}$ ) of AChE of heart, pancreas, stomach, and liver in the presence of DZ

	DZ ( $\mu\text{M}$ )	$K_m$ mmol ATCh	$V_{max}$ $\mu\text{mol/h/mg prot}$
<b>Heart</b>	0	0.24 $\pm$ 0.06	1.24 $\pm$ 0.20
	1	0.16 $\pm$ 0.01	0.66 $\pm$ 0.07*
	2	0.21 $\pm$ 0.03	0.57 $\pm$ 0.07*
	3	0.19 $\pm$ 0.03	0.39 $\pm$ 0.04*
	4	0.19 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.02*
<b>Pancreas</b>	0	0.18 $\pm$ 0.01	3.21 $\pm$ 0.43
	1	0.13 $\pm$ 0.03	1.62 $\pm$ 0.09*
	2	0.16 $\pm$ 0.07	1.34 $\pm$ 0.21*
	3	0.14 $\pm$ 0.02	1.16 $\pm$ 0.21*
	4	0.11 $\pm$ 0.03	0.57 $\pm$ 0.01*
<b>Stomach</b>	0	0.2361 $\pm$ 0.10	1.90 $\pm$ 0.16
	1	0.2006 $\pm$ 0.03	1.65 $\pm$ 0.15
	2	0.1409 $\pm$ 0.02	1.15 $\pm$ 0.25
	3	0.2247 $\pm$ 0.06	1.16 $\pm$ 0.25
	4	0.3970 $\pm$ 0.14	1.22 $\pm$ 0.24
<b>Liver</b>	0	0.3148 $\pm$ 0.05	3.70 $\pm$ 0.94
	5	0.3766 $\pm$ 0.11	3.27 $\pm$ 1.09
	10	0.5153 $\pm$ 0.22	2.57 $\pm$ 0.67
	20	0.7128 $\pm$ 0.34	1.50 $\pm$ 0.64

Apparent  $K_m$  and  $V_{max}$  of heart, pancreas, stomach, and liver were determined by the Lineweaver-Burk method ( $1/V$  versus  $1/[S]$ ). The results are represented as mean  $\pm$  S.E.M. for 3-4 independent biological assays, and performed in duplicate. The apparent  $K_m$  is expressed as mmol of ATCh and  $V_{max}$  as  $\mu\text{mol}$  of substrate hydrolyzed per hour per mg of protein. \* Significantly different from the 0  $\mu\text{M}$  of DZ at least  $p < 0.05$  from one-way ANOVA and Tukey's test.

## 4 DISCUSSION

In the present study, the short and long DZ exposure effect on mice central and peripheral ChEs activities and its potential cognitive impairment induction were evaluated. The results indicate that mice spatial learning and memory abilities were non-affected by the OP administration. This was not surprising, once that the OP did not alter the ChEs activities in both the cerebral cortex and hippocampus. By the other hand, a decrease in AChE activity was observed in stomach in 10 days and in gut, heart, liver and pancreas in 30 days of treatment. The BChE activity was also decreased in plasma and stomach in 10 days, guts, kidney and pancreas in 30 days and, liver and lung for both 10 and 30 days of treatment. *In vitro* results show that AChE of cerebral origin is insensitive to DZ; while the enzymes of peripheral tissues (liver, stomach, lung, heart, and pancreas) are more sensitive to the compound. DZ inhibited of the uncompetitively way the AChE from the heart and pancreas and exhibits mixed-type behavior for AChE of the stomach and liver at the highest concentration tested.

Exposure to some OP agents can cause locomotor damage. In our study, however, the open field test showed us that DZ did not change this parameter. Nevertheless, this result was satisfactory as a guarantee that there was no influence of the locomotion in the test used to evaluate memory and learning.

It is well reported in the literature that OPs compounds cause various neurological disorders in humans (JOKANOVÍC, 2010), among them, deficiency in learning ability over time (SLOTKIN, 2004). However, the animals exposed to DZ 10 and 100 mg/kg presented the same learning ability as the DZ0 control group in the MWM task. This can be explained by the fact that in most cases of cognitive impairment it happens when the exposure occurs during development (BOUCHARD, 2011), or with adults who have suffered acute exposure to a high concentration of OP and after that, have continued to be exposed chronically (JOKANOVIC, 2010). In addition, toxicity symptoms usually appear when there is approximately 50% reduction in AChE activity (BARTH, 2010).

ACh is the main neurotransmitter of the cholinergic system, responsible for vital functions such as learning, memory, movement control and modulation of cerebral

blood flow. ChEs are responsible for regulating the levels of ACh in the body (RANG & DALE, 2011, p.168). When these enzymes come into contact with the OPs, they lose their catalytic activity, because the OPs bind covalently in ChEs (BARTH, 2010). As a consequence of this inhibition, OP affect cognitive ability (MISRA, 1994). Here, the activity of ChEs was not altered in the brain (cerebral cortex and hippocampus). Corroborating this result, no effect on the cognitive ability of the animals was observed in the MWM test. However, we do not rule out the possibility that exposure to DZ may contribute to the development of cognitive disorders, since we only performed the MWM test.

Inhibition of peripheral and cerebral AChE may occur only when the absorbed dose of OP is sufficiently large to overcome the capacity of detoxification (through hydrolysis) or deactivation (through irreversible inhibition of ChEs) of the intestine, blood and liver (MARBLE, 2007). Blood circulates intimately through all organs, allowing blood BChE and then blood AChE to be readily available for binding to OP. Only when most ChEs in blood are already inhibited, ChEs in peripheral tissues and brain tissue would play the role of detoxification. In the blood tissue of the animals treated here with DZ a significant decrease in BChE was observed at 10 days, and in the two ChEs at 30 days, although not significant. This result was to be expected, since blood ChEs are more susceptible than cerebral ChEs or peripheral tissues, especially BChE which has a higher affinity for OP than AChE (AUREBEK, 2009). A fact that occurs due to BChE occurs in a ratio of ten times in relation to AChE (MASSON, 2010) since it participates in the detoxification of the organism (LOCKRIDGE, 2015) and must be eliminated along with the pathogen. Along with this, in the richly vascularized organs, such as the heart, liver, kidneys and lungs, a decrease in ChEs activity was also observed, although not always significant, mainly at the 30 days of exposure to DZ.

It is in the pancreas where much of the synthesis of ChEs occurs and is soon distributed to the body via blood, thus becoming one of the tissues targeted by the toxicity of the OPs (HARPUTLUOGLU, 2003; RIZOS, 2004). Here, DZ decreases the activity of both ChEs in this tissue, although this was significant only after 30 days. These results corroborate the study by Costa et al. (2012) where DZ caused the inhibition of AChE and BChE activity in this tissue.



One of the functions of the spleen is to remove and destroy red blood cells. After a certain period of time, by induction of OP the cells begin to enter apoptosis, and this induces the synthesis of new enzymes and stimulates their activity (DUYSEN, 2011). In addition, the spleen is an organ where hematogenesis occurs, which would make it more resistant to the action of toxic compounds. This may explain the decrease in ChEs activity, although not significant, after exposure for 10 days and the increase in ChEs activity after a longer exposure period.

In the *in vitro* study was investigated the sensitivity of AChE activity of DZ-sensitive mice organs *in vivo* and to determine the kinetic parameters of this enzyme. We selected the tissues that DZ altered AChE activity *in vivo*, both with the 10 days and the 30 days of DZ exposition. Besides these, we also opted to analyze AChE activity in brain tissue since neurotoxicity by OP is well documented in the literature (VOORHEES, 2017). However, in this study, *in vivo* exposure to DZ did not cause damage to memory and learning analyzed in behavioral tests, nor alter AChE activity in cortex and hippocampus.

The method used was Ellman's using ATCh as alternative substrate and DTNB as color reagent resulting in production of 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB) that has yellow color due to the shift of electrons to the sulfur atom. At first, we analyzed the time required for preincubation with the enzyme material (tissue), DTNB and DZ. This was so that it did not hear an underestimation of the DZ effect or false positive results of the DZ reaction with DTNB. The best pre-incubation time was 30 min, which was used in the other analyzes.

The second step was to find the  $IC_{50}$ , that is, the concentration required to decrease 50% of AChE activity, of all tissues. The total brain  $IC_{50}$  of mice was 234.4  $\mu$ M DZ. High  $IC_{50}$  means low affinity of the enzyme for the compound, which corroborates our *in vivo* results, where there was no change in AChE activity and, consequently, no cognitive damage after exposure to DZ. As the  $IC_{50}$  is very high, we did not perform the studies to determine the kinetic parameters  $K_m$  and  $V_{max}$  of cerebral AChE.

The lung  $IC_{50}$  was 15.5  $\mu$ M DZ. But the concentration curve of DZ versus percent inhibition was not linear. Thus, we chose not to calculate the kinetic parameters  $K_m$  and  $V_{max}$ , because the result would not be reliable.

The liver IC<sub>50</sub> was 11.7 µM DZ. The heart, pancreas, and stomach, the IC<sub>50</sub> were around 3 µM DZ. For these four tissues the IC<sub>50</sub> values were within an acceptable range, as well as the linearity of the inhibition percentage in relation to the concentration increase, allowing the kinetic studies to be performed.

For the kinetic analyzes, smaller, larger and IC<sub>50</sub> concentrations were used. For all ATCh concentrations here used the enzyme activity was linear, thus demonstrating that this decrease was not due to lack of substrate. Moreover, substrate inhibition is a kinetic property of AChE (FROEDE, 1986). However, the highest substrate final concentration (ATCh 0.4 mM) tested was based on previously studies of our laboratory (PEREIRA, 2004), which demonstrate to be a non-inhibitory substrate concentration. Kinetic characterization of the inhibition demonstrated that DZ of heart and pancreas AChE were the noncompetitive inhibition type. This is due to the decrease of the V<sub>max</sub> apparent values and absence of change in the K<sub>m</sub> apparent values. The kinetic parameters of K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> were not changed for AChE of the stomach and liver.

In conclusion, the animals treated with DZ showed no cognitive and behavioral damage, as they did not alter the activity of ChEs in the CNS. This is probably related to the enzymes in the brain not being so sensitive to inhibition by DZ, compared to the peripheral organs.

### **Conflict of interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### **Acknowledgements**

The present work was carried out with the support of CAPES/PROEX (23038.005848/2018-31). MEP (311082/2014-9) and JSB (0737/2018) are recipient of CNPq fellowships.

## References

- AURBEK, N., THIERMANN, H., EYER, F., EYER, P., and WOREK, F. Suitability of human butyrylcholinesterase as therapeutic marker and pseudo catalytic scavenger in organophosphate poisoning: a kinetic analysis. **Toxicology**, v. 259, n. 3, p. 133-139, 2009.
- BARTH, V. G. and BIAZON, A. C. Complicações decorrentes da intoxicação por organofosforados. **SaBios: Revista Saúde e Biologia**, v. 5, n. 2, p. 27-33, 2010.
- BOUCHARD, M. F.; CHEVRIER, J.; HARLEY, K. G.; KOGUT, K.; VEDAR, M.; CALDERON, N.; TRUJILLO, C.; JOHNSON, C.; BRADMAN, A.; BARR, D. B., and ESKENAZI, B. Prenatal exposure to organophosphate pesticides and IQ in 7-year-old children. **Research- Children's Health**, v. 119, n. 8, p. 1189-1195, 2011.
- BOURNE, Y., RADIĆ, Z., SULZENBACHER, G., KIM, E., TAYLOR, P., and MARCHOT, P. Substrate and Product Trafficking through the Active Center Gorge of Acetylcholinesterase Analyzed by Crystallography and Equilibrium Binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 39, p. 29256-29267, 2006.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein–dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- COSTA, M. D., GAI, B. M., ACKER, C. I., SOUZA, A. C. G., BRANDÃO, R., and NOGUEIRA, C. W. Ebselen reduces hyperglycemia temporarily-induced by diazinon: A compound with insulin-mimetic properties. **Chemico-Biology Interactions**, v. 197, p. 80-86, 2012.
- COSTA, M., BERNARDI, J., FIUZA, T., COSTA, L., BRANDÃO, R., and PEREIRA, M.E. N-acetylcysteine protects memory decline induced by streptozotocin in mice. **Chemico-Biological Interactions**, v.253 p. 10-17, 2016.
- COSTA, M., BERNARDI, J., COSTA, L., FIUZA, T., BRANDÃO, R., RIBEIRO, M. F., AMARAL, J. D., RODRIGUES, C. M. P., and PEREIRA, M.E. N-acetylcysteine treatment attenuates the cognitive impairment and synaptic plasticity loss induced by streptozotocin. **Chemico-Biological Interactions**, v. 272, p. 37-46, 2017.
- COX, C. Diazinon: toxicology. **Journal of Pesticide Reform**, v. 20, n. 2, p. 15-21, 2000.
- DASSANAYAKE T., WEERASINGHE V., DANGAHADENIYA U., KULARATNE K., DAWSON A., and KARALLIEDDE L. Cognitive processing of visual stimuli in patients with organophosphate insecticide poisoning. **Neurology**, v. 68, n. 20, p. 27–30, 2007.

- DUYSEN, E. G. and LOCKRIDGE, O. Induction of plasma acetylcholinesterase activity in mice challenged with organophosphorus poisons. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 255, p. 214-220, 2011.
- ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES, V., and FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.
- FROEDE, H. C., WILSON, I. B., and KAUFMAN, H. Acetylcholinesterase: theory of noncompetitive inhibition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 247, p. 420-423, 1986.
- GRECCO, F.B., SCHILD, A.L., SOARES, M.P., RAFFI, M.B., SALLIS, S.V., and DAMÉ, M.C. Intoxicação por organofosforados em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 3, p.211-214, 2009.
- HARPUTLUOGLU, M. M. M., KANTARCEKEN, B., KARINCAOGLU, M., ALADAG, M., YILDIZ, R., ATEŞ, M., BULENT YILDIRIM, B., and HILMIOGLU, F. Acute pancreatitis: an obscure complication of organophosphate intoxication. **Human & Experimental Toxicology**, v. 22, p. 341–343, 2003.
- JOKANOVIĆ, M. and KOSANOVIĆ, M. Neurotoxic effects in patients poisoned with organophosphorus pesticides. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 29, p. 195-201, 2010.
- KAMATH, V. and RAJINI, P. S. Altered glucose homeostasis and oxidative impairment in pancreas of rats subjected to dimethoate intoxication. **Toxicology**, v. 231, n. 2, p. 137-146, 2007.
- KAMPEN, E. J. and ZILSTRA, W. G. Standardization of hemoglobinometry II. The hemoglobincyanide method. **Clinica Chimica Acta**, v. 6, p. 538-544, 1964.
- LIYASOVA, M. S., SCHOPFER, L. M., KODANI, S., LANTZ, S. R., CASIDA, J. E., and LOCKRIDGE, O. Newly observed spontaneous activation of ethephon as a butyrylcholinesterase inhibitor. **Chemical Research in Toxicology**, v. 26, n. 3, p. 422–431, 2013.
- LOCKRIDGE, O. Butyrylcholinesterase: overview, structure, and function. **Anticholinesterase Pesticides: Metabolism, Neurotoxicity, and Epidemiology**, John Wiley & Sons, Inc, Singapore, 2011. Cap. 3, p. 25–41.
- LOCKRIDGE, O. and DUYSEN, E. G. Induction of plasma acetylcholinesterase activity in mice challenged with organophosphorus poisons. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 255, n. 2, p. 214-220, 2011.
- LOCKRIDGE, O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 148, p. 34-46, 2015.

MACKENZIE ROSS, S. J., BREWIN, C. R., CURRAN, H. V., FURLONG, C. E., ABRAHAM-SMITH, K. M., and HARRISON, V. Neuropsychological and psychiatric functioning in sheep farmers exposed to low levels of organophosphate pesticides. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 32, n. 4, p. 452–459, 2010.

MARABLE, B. R., MAURISSEN, J. P. J., MATTSSON, J. L., and BILLINGTON, R. Differential sensitivity of blood, peripheral, and central cholinesterases in beagle dogs following dietary exposure to chlorpyrifos. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 47, p. 240-248, 2007.

MASSON, P. and LOCKRIDGE, O. Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: catalytic complexities and hysteretic behavior. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 494, n.2, p. 107-120, 2010.

MISRA, U. K., PRASAD, M. and PANDEY, C. M. A study of cognitive functions and event related potentials following organophosphate exposure. **Electromyography and Clinical Neurophysiology**, v. 34, n. 4, p. 197-203, 1994.

MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial-learning in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 11, p. 47-60, 1984.

NELSON, D. L. and COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga... et al. 6 ed. Porto Alegre. Artmed. 2014.

NIGG, H. N. and KNAAK, J. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Blood Cholinesterases as Human Biomarkers of Organophosphorus Pesticide Exposure. 1ª ed. New York: **Springer**, v. 163, p. 29-112, 2000.

OGA, S. Praguicidas – Inseticidas inibidores da colinesterase: **Fundamentos de Toxicologia**. 4ª ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2014. p. 324-329.

PEREIRA, M. E., ADAMS, A. I. A. and SILVA, N. S. 2,5-Hexanedione inhibits rat brain acetylcholinesterase activity in vitro. **Toxicology Letters**, v. 146, p. 269-274, 2004.

RANG, P. H. and DALE, M. M. **Rang & Dale: Farmacologia**. Tradução de Pharmacology, 7<sup>th</sup> ed por Tatiana Ferreira Robaiana et al. Rio de Janeiro. **Elsevier**, 2011. p. 109 and p.168.

RING, A., STROM, B. O., TURNER, S. R., TIMPERLEY, C. M., BIRD, M., GREEN, A. C., CHAD, J. E., WOREK, F., and TATTERSALL, J. E. H. Bispyridinium Compounds Inhibit Both Muscle and Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors in Human Cell Lines. **PLOS one**, v. 10, n. 8. 2015.

RIZOS, E., LIBEROPOULOS, E., KOSTA, P., EFREMIDIS, S., and ELISAF, M. Carbofuran-induced acute pancreatitis. **Journal of the Pancreas**, v. 5, n. 1, p. 44-47, 2004.

ROSENSTOCK L., KEIFER M., DANIELL W.E., MCCONNELL R., and CLAYPOOLE K. Chronic central nervous system effects of acute organophosphate pesticide intoxication. **The Lancet**, v. 338, n. 8761, p. 3-7, 1991.

SAVAGE E.P., KEEFE T.J., MOUNCE L.M., HEATON R.K., LEWIS J.A., and BURCAR P.J. Chronic neurological sequelae of acute organophosphate pesticide poisoning. **Arch Environ Health**. v. 43, n. 1, p. 3-45, 1988.

SINGH S., and SHARMA N. Neurological syndromes following organophosphate poisoning. **Neurology India**, v.48, p. 308-313, 2000.

SLOTKIN, T. A. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 198, n. 2, p. 132–151, 2004.

SOCKO, R., SLAWOMIR, G. and ROMAN G. Long-term behavioral effects of a repeated exposure to chlorphenvinphos in rats. **International Journal Occupational Medicine Environmental Health**, v. 12, n. 2, p. 105-117, 1999.

STEENLAND K., JENKINS B., AMES R.G., O'MALLEY M., CHRISLIP D., and RUSSO J. Chronic neurological sequelae to organophosphate pesticide poisoning. **American Journal of Public Health**. v. 84, n. 73, p. 1-6, 1994.

TERRY AV JR, STONE J.D., BUCCAFUSCO J. J., SICKLES D. W., and PRENDERGAST M. A. Repeated, subthreshold exposures to chlorpyrifos in rats: hippocampal damage, impaired axonal transport and deficits in spatial learning. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 305, p. 375-384. 2003.

TERRY AV JR, GEARHART D.A., BECK W.D., TRUAN J.N., MIDDLEMORE M.L., and WILLIAMSON L.N. Chronic, Intermittent Exposure to Chlorpyrifos in Rats: Protracted Effects on Axonal Transport, Neurotrophin Receptors, Cholinergic Markers, and Information Processing. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 322, p. 1117–1128, 2007.

TERRY AV JR, BUCCAFUSCO J.J., GEARHART D.A., BECK W.D., MIDDLEMORE-RISHER M.L., and TRUAN J.N. Repeated, intermittent exposures to diisopropylfluorophosphate in rats: protracted effects on cholinergic markers, nerve growth factor-related proteins, and cognitive function. **Neuroscience**. v. 10, n. 176, p. 237-53, 2011.

TERRY AV JR, BECK W.D., WARNER S., VANDENHUERK L., and CALLAHAN P.M. Chronic impairments in spatial learning and memory in rats previously exposed to chlorpyrifos or diisopropylfluorophosphate. **Neurotoxicology Teratology**. v. 34, n.1 p. 1-8, 2012.

WALSH, R. N. and COMMINS, R. A. The open-field test: a critical review. **Psychological Bulletin**. v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.

WOREK, F. U.; MAST, D.; KIDERLEN, C.; and DIEPOLD, P. Eyer, Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. **Clinica Chimica Acta**. v. 288, p. 73-90, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Manual of health surveillance of populations exposed to agrochemicals, Brasilia p. 69, 1996.

VANWAGENEN, B. C., LARSEN, R., CARDELLINA, J. H., RANDAZZO, and D., LIDERT, Z. C., and SWITHENBANK, C. Ulosantoin, a potent insecticide from the sponge *Ulosa ruetzleri*. **The Journal of Organic Chemistry**. v. 58, p. 335–337, 1993.

VOORHEES, J. R., ROHLMAN, D., LEIN, P. J. and PIEPER, A. A. Neurotoxicity in preclinical models of occupational exposure to organophosphorus compounds. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, n. 590, p. 1-24, 2017.

VRIESE, C. de, GREGOIRE, F., LEMA-KISOKA, R., WAELBROECK, M., ROBBERECHT, P., and DELPORTE, C. Ghrelin Degradation by Serum and Tissue Homogenates: Identification of the Cleavage Sites. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 4997-5005, 2004.

VRIESE, C. de, HACQUEBARD, M., GREGOIRE, F., CARPENTIER, Y., and DELPORTE, C. Ghrelin Interacts with Human Plasma Lipoproteins. **Endocrinology**, v. 148, n. 5, p. 2355-2362, 2007.

## 4 CONCLUSÕES

Considerando os resultados em conjunto pode-se sugerir que a ausência de efeitos comportamentais do DZ pode estar relacionadas a ausência de efeito do composto sobre a AChE cerebral, verificada tanto *in vivo* quanto *in vitro*, uma vez que:

### 4.1 *in vivo*

- I) Os animais expostos ao DZ não apresentaram danos locomotores e cognitivos, avaliados nos testes comportamentais do campo aberto (*open field*) e labirinto aquático de Morris (*Morris water maze*);
- II) O DZ também não alterou a atividade da AChE e da BChE de cérebro (córtex cerebral e hipocampo);
- III) O DZ diminuiu a atividade da AChE e da BChE em alguns tecidos periféricos;

### 4.2 *in vitro*

- I) O  $IC_{50}$  da AChE cerebral foi muito maior que dos tecidos periféricos estudados, mostrando que a AChE de origem cerebral é menos sensível ao DZ, enquanto as enzimas dos tecidos periféricos são mais sensíveis ao composto.
- II) O DZ inibe de forma não competitiva a AChE do coração e do pâncreas e apresenta um comportamento do tipo misto para a AChE de estômago e fígado na maior concentração testada.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, M. Reduced acetylcholine receptor density, Morphological remodeling, and Butyrylcholinesterase activity can Sustain muscle function in Acetylcholinesterase knockout mice. **Muscle Nerve**, v. 30, p. 317–327, 2004.
- ALDRIDGE W.N. Survey of major points of interest about reactions of cholinesterase. **Croatica Chemica Acta**, v.47, p. 225-233, 1976.
- BARBOZA, H. T. G. et al. Compostos organofosforados e seu papel na agricultura. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n.1, p. 172-193, 2018.
- BOURNE, Y. et al. Crystal structure of mouse acetylcholinesterase: a peripheral site-occluding loop in a tetrameric assembly. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 5, p. 2963-29-70, 1999.
- BULLOCK, R.; LANE, R. Executive dyscontrol in dementia, with emphasis on subcortical pathology and the role of butyrylcholinesterase. **Current Alzheimer Research**, v.4, p. 277–293, 2007.
- BRIMIJOIN, S. et al. Anti-cocaine antibody and butyrylcholinesterase-derived cocaine hydrolase exert cooperative effects on cocaine pharmacokinetics and cocaine-induced locomotor activity in mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 203, p. 212-216, 2013.
- CASTILLO, C. G. et al. Behavioral effects of exposure to endosulfan and methyl parathion in adult rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 24, p. 797-804, 2002.
- CAULFIELD, M. P.; BIRDSALL, N. J. M. International Union of Pharmacology: XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 50, p. 279-290, 1998.
- CLUNE, A.L.; RYAN, P. B.; BARR, D. B. Have regulatory efforts to reduce organophosphorus insecticide exposures been effective? **Environment Health Perspective**, v.120, p. 521-525, 2012.
- COLGIN, L. L.; KUBOTA, D.; LYNCH, G. Cholinergic plasticity in the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 2872–2877, 2003.

- COLOVIC, M. B. et al. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, p. 315-335, 2013.
- COSTA, M. Efeito da n-acetilcisteína no déficit cognitivo induzido pela estreptozotocina em camundongos. 2016. Tese (Doutorado em ciências biológicas: bioquímica toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2016.
- DARVESH, S.; HOPKINS, D. A.; GEULA, C. Neurobiology of Butyrylcholinesterase. **Nature reviews-Neuroscience**, v.4, p. 131-138, 2003.
- DE VRIESE, C. et al. Ghrelin Degradation by Serum and Tissue Homogenates: Identification of the Cleavage Sites. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 4997-5005, 2004.
- DE VRIESE, C. et al. Ghrelin Interacts with Human Plasma Lipoproteins. **Endocrinology**, v. 148, n. 5, p. 2355-2362, 2007.
- DOENICKE, A. et al. Serum cholinesterase anenzymia. Report of a case confirmed by enzyme-histochemical examination of liver-biopsy specimen. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 7, p. 59–68, 1963.
- GATLEY, S. J. Activities of the enantiomers of cocaine and some related compounds as substrates and inhibitors of plasma butyrylcholinesterase. **Biochemistry Pharmacology**, v. 41, p. 1249-1254, 1991.
- JOHNSON, G.; MOORE, S. W. Why has butyrylcholinesterase been retained? Structural and functional diversification in a duplicated gene. **Neurochemistry Internacional**, v. 61, p. 783-797, 2012.
- KALOW, W. **Pharmacogenetics**. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, 1962.
- KRIEG, W. F. Jr. The relationship between pesticide metabolites and neurobehavioral test performance in the third National Health and Nutrition Examination Survey. **Archives of environmental health**, v. 68, p. 39-46, 2013.
- LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**. 1ª edição brasileira, Ed. Manole, SP, p. 47-75, 1999.
- Li, B. et al. Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase *knockout* mouse. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, p. 1320–1331, 2000.

- LI, B. et al. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor function in acetylcholinesterase knockout mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.74, p. 977-986, 2003.
- LOCKRIDGE, O. et al. Hydrolysis of diacetylmorphine (heroin) by human serum cholinesterase. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 215, p. 1-8, 1980.
- LOCKRIDGE, O.; DUYSEN, E. G.; MASSON, P. Butyrylcholinesterase: overview, structure, and functions: **Anticholinesterase Pesticides – Metabolism, neurotoxicology, and epidemiology**. Eds Tetsuo Satoh and Ramesh Gupta, Wiley, Hoboken, New Jersey. 2011.
- LOCKRIDGE, O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 148, p. 34-46, 2015.
- MASSON, P. et al. Butyrylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of aspirin, a negatively charged ester, and aspirin-related neutral esters. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1387, p. 41-52, 1998.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em <<http://agrofit.agricultura.gov.br>>. Acessado em setembro de 2018.
- NIGG, H. N.; KNAAK, J. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Blood Cholinesterases as Human Biomarkers of Organophosphorus Pesticide Exposure**. 1. ed. New York, **Springer**, v. 163, p. 29-112, 2000.
- OGA, S. et al. Praguicidas – Inseticidas inibidores da colinesterase: **Fundamentos de Toxicologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2014. p 324-329.
- RANG, P. H. & DALE, M. M. et al. Rang & Dale: Farmacologia. Tradução de Pharmacology, 7<sup>th</sup> ed por Tatiana Ferreira Robaiiana et al. **Elsevier**, Rio de Janeiro, 2011.
- REVISTA VEJA. Disponível em <<https://veja.abril.com.br/blog/reveja/o-massacre-de-halabja-uma-pompeia-destruida-pela-mao-humana/>>. Acessado 11/09/2018.
- ROHLMAN, D.S.; ANGER, W. K.; LEIN, P. J. Correlating neurobehavioral performance with biomarkers of organophosphorus pesticide exposure. **Neurotoxicology**, v. 32, p. 268-276, 2011.

SILMAN I.; SUSSMAN J. L. Acetylcholinesterase: how is structure related to function? **Chemistry Biology Interactions**, v. 175, p.3-10, 2008.

SUN, T. T.; PAUL, I. A.; HO, I. K. Motor functions but not learning and memory are impaired upon repeated exposure to sub-lethal doses of methyl parathion. **Journal of Biomedical Science**, v. 13, p. 515-523, 2006.

SUSSMAN et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholinesterase-binding protein. **Science**, v. 253, p. 872-879, 1991.

TAYLOR, P.; BROW, J. H. Acetylcholine: **Basic Neurochemistry**. EDS Siegel, g. j. et al. 5<sup>th</sup> ed., New York, Raven Press, p. 231-260, 1994.

TAYLOR, P.; RADIC, Z. The cholinesterase: from genes to proteins. **Annual Reviews of Pharmacology Toxicology**, v. 34, p. 281-320, 1994.

TAYLOR, P. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman: Agentes anticolinesterásicos**, 12<sup>a</sup> ed. Tradução por Augusto Langeloh et al. AMGH, 2012.

TERRY, AV JR et al. Repeated exposures to subthreshold doses of chlorpyrifos in rats: hippocampal damage, impaired axonal transport, and deficits in spatial learning. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 305, p. 375–384, 2003.

TERRY, AV JR et al. Chronic intermittent exposure to chlorpyrifos in rats: protracted effects on axonal transport, neurotrophin receptors, cholinergic markers, and information processing. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 322, p. 1117–1128, 2007.

TERRY, AV JR et al. Impairments in spatial learning and memory in rats previously exposed to chlorpyrifos or diisopropylfluorophosphate. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 34, n.1, p. 1-8, 2012.

TIMBRELL, J. A. **Principles of Biochemical Toxicology**. Eds. Taylor & Francis. London, p. 327-330, 1991.

VERMA, S. K.; RAHEJA, G.; GILL, K. D. Role of muscarinic signal transduction and CREB phosphorylation in dichlorvos-induced memory deficits in rats: an acetylcholine independent mechanism. **Toxicology**, v. 256, p. 175–182, 2009.

VOORHEES, J. R. et al. Neurotoxicity in preclinical models of occupational exposure to organophosphorus compounds. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, n. 590, p. 1-24, 2017.

# ANEXO A- CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA



Comissão de Ética no Uso de Animais

da Universidade Federal de Santa Maria

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO COGNITIVA E COLINÉRGICA DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM DIAZINON", protocolada sob o CEUA nº 6836140815, sob a responsabilidade de **Maria Ester Pereira** e equipe: *Jamile da Silva Bernardi; Lidiane Machado Costa; Michael Daniel da Costa; Taise Fonseca Pedrosa* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 24/09/2015.

We certify that the proposal "Cognitive and colinergic evaluation of mice treated with Diazinon", utilizing 120 Heterogenics mice (120 males), protocol number CEUA 6836140815, under the responsibility of **Maria Ester Pereira** and team: *Jamile da Silva Bernardi; Lidiane Machado Costa; Michael Daniel da Costa; Taise Fonseca Pedrosa* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 09/24/2015.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2015** a **07/2018**

Área: **Bioquímica E Biologia Molecular**

Origem: **Biotério Central UFSM**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **45 a 45 dias**

N: **120**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **22 a 22 g**

Resumo: Introdução: Os compostos organofosforados (OF) são pesticidas comumente usados na agricultura, na veterinária e como gás de guerra. O diazinon (DZ), é um exemplo clássico desta classe de pesticida. As principais vias de intoxicação são as vias oral, dérmica e respiratória. O principal efeito tóxico do DZ, assim como dos demais OF, é através da inibição das colinesterases (ChEs), entre elas, a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE), resultando no acúmulo de acetilcolina (ACh) e, como consequência, um maior estímulo das sinapses colinérgicas no sistema nervoso central, nervos parassimpáticos e glândulas. Os efeitos imediatos de uma exposição a altos níveis de OF envolvendo a inibição das ChEs e causando mudanças em nível de sistema nervoso central (SNC) tem sido bem documentados. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos da exposição a níveis baixos de OF e uma exposição a longo prazo. Objetivo: Avaliar os efeitos cognitivos e na atividade das ChEs após uma exposição prolongada ao DZ, administrado em doses e vias diferentes. Metodologia: Os camundongos serão tratados com DZ (0, 10 ou 100 mg.kg<sup>-1</sup>), pela via oral ou subcutânea, durante 10 ou 30 dias. Serão realizados os testes comportamentais de esquiziva passiva e labirinto aquático de Morris. Após a eutanásia, será coletado o sangue, baço, cérebro (córtex e hipocampo), coração, diafragma, estômago, fígado, intestino delgado, músculo esquelético, pâncreas, pulmão e rim, para mensuração da atividade da AChE e da BChE.

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no laboratório de bioquímica toxicológica, sala 2239 (prof<sup>ra</sup> Maria Ester Pereira).

Santa Maria, 25 de setembro de 2018

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria