

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

**EFEITO DO TIPO ANTIDEPRESSIVO DO
DISSELENETO DE DIFENILA EM UM MODELO DE
DEPRESSÃO INDUZIDA POR MALATION EM RATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carmine Inês Acker

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

**EFEITO DO TIPO ANTIDEPRESSIVO DO DISSELENETO DE
DIFENILA EM UM MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA
POR MALATION EM RATOS**

por

Carminé Inês Acker

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 grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristina Wayne Nogueira

Santa Maria, RS, Brasil
2010

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado

**EFEITO DO TIPO ANTIDEPRESSIVO DO DISSELENETO DE
DIFENILA EM UM MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR
MALATION EM RATOS**

elaborada por
Carminé Inês Acker

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Cristina Wayne Nogueira, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Vânia Loro, Dr^a. (UFSM)

Tháís Posser, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 01 de abril de 2010

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor, pela dedicação, pelo incentivo e principalmente por me apoiarem em todos os momentos.

À minha irmã, Patrícia, pela amizade, pelo incentivo, pelo exemplo de força e por sempre estar presente, mesmo que distante.

À professora Cristina e ao professor Gilson, pela orientação, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos ex-colegas de laboratório, Ricardo, Cristiane e Cristiano, e aos atuais: Ana Cristina, Michael, Maurício, Bibiana, Simone, Juliana, Ethel, Silvane, Marina, Marlon, César, Cristiani, Pietro, Luiz Vinicius e Carla. Obrigada pela ajuda, pelas conversas e pelas risadas.

Aos colegas do laboratório do professor Gilson.

À todos os meus amigos, pelo apoio e pelos momentos de descontração.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica.

À CAPES, pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO DO TIPO ANTIDEPRESSIVO DO DISSELENETO DE DIFENILA EM UM MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR MALATION EM RATOS

AUTORA: Carmine Inês Acker

ORIENTADORA: Cristina Wayne Nogueira

LOCAL E DATA DA DEFESA: Santa Maria, abril de 2010

Os inseticidas organofosforados (OF), entre eles o malation, são responsáveis por grande parte das intoxicações relatadas anualmente no Brasil. Além dos sintomas da intoxicação colinérgica, a exposição a OF causa distúrbios cognitivos e afetivos, que não necessariamente estão relacionados à inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). Dentre esses prejuízos destaca-se a depressão. O disseleneto de difenila [(PhSe)₂] é um composto orgânico de selênio que possui diversas propriedades farmacológicas, entre elas, a atividade antioxidante. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo investigar um possível efeito do tipo antidepressivo do (PhSe)₂ em um modelo de depressão induzida por malation em ratos. O papel das atividades da Na⁺ K⁺ ATPase, AChE e monoamina oxidase (MAO) bem como do estresse oxidativo no comportamento antidepressivo foram investigados no córtex cerebral de ratos. Os ratos foram expostos ao malation na dose de 50 mg/kg por via intraperitoneal (i.p.) e ao (PhSe)₂ na dose de 50 mg/kg por via oral (p.o.) uma vez ao dia durante três dias. 24 h após a última administração de malation e/ou (PhSe)₂, foram realizados os testes comportamentais e em seguida os animais foram submetidos à eutanásia. Para investigar o comportamento do tipo antidepressivo, os ratos foram submetidos ao teste do nado forçado (TNF) e ao teste do campo aberto (TCA). Os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), bem como as defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas foram determinadas no córtex cerebral dos ratos. Os resultados confirmaram que o malation aumenta o tempo de imobilidade no TNF sem alterar a atividade locomotora no TCA. O tratamento com (PhSe)₂ melhorou a performance dos animais no TNF sem que houvesse alteração no número de cruzamentos no TCA. Houve uma inibição da atividade da Na⁺ K⁺ ATPase nos animais tratados somente com malation e essa inibição foi prevenida pelo (PhSe)₂. A exposição ao malation não alterou os parâmetros de estresse oxidativo bem como as atividades das enzimas AChE e MAO. Com esse trabalho, conclui-se que o (PhSe)₂ exerce efeito do tipo antidepressivo em ratos expostos ao malation. A atividade da Na⁺ K⁺ ATPase está, pelo menos em parte, envolvida no comportamento do tipo antidepressivo do (PhSe)₂.

Palavras-chave: malation; disseleneto de difenila; depressão; selênio.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Graduating Program in Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

ANTIDEPRESSANT-*LIKE* EFFECT OF DIPHENYL DISELENIDE ON MALATHION-INDUCED DEPRESSION MODEL IN RATS

AUTHOR: Carmine Inês Acker

ADVISOR: Cristina Wayne Nogueira

PLACE AND DATA OF THE DEFENSE: Santa Maria, April, 2010

Organophosphorus (OP), among them malathion, are responsible for most of the poisonings reported annually in Brazil. In addition to symptoms of cholinergic poisoning, the exposure to OP causes affective and cognitive disorders, which are not necessarily related to acetylcholinesterase (AChE) enzyme activity inhibition. One of these disorders is depression. Diphenyl diselenide [(PhSe)₂] is an organoselenium compound that presents pharmacological effects, among them the antioxidant effect. Therefore, this study was designed to investigate a potential antidepressant-*like* effect of (PhSe)₂ on a depression model induced by malathion in rats. The role of Na⁺K⁺ ATPase, AChE and monoamine oxidase (MAO) activities and oxidative stress was investigated in cerebral cortices of rats. Rats were exposed once a day for three consecutive days to malathion (50 mg/kg, intraperitoneal) and (PhSe)₂ (50 mg/kg, oral). To investigate the antidepressant-*like* behavior rats were submitted to the forced swimming test (FST) and the open-field test (OFT). Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) levels, enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses were carried out in cerebral cortices of rats. The results confirmed that malathion increased immobility time in the FST without altering the locomotor performance in the OFT. Treatment with (PhSe)₂ ameliorated performance in the FST without altering the crossing numbers in the OFT. The inhibition of Na⁺K⁺ ATPase activity caused by malathion was prevented by treatment with (PhSe)₂. Exposure to malathion did not alter parameters of oxidative stress as well as AChE and MAO activities in cerebral cortex of rats. In conclusion, (PhSe)₂ exerted antidepressant-*like* effect in rats exposed to malathion. Na⁺K⁺ ATPase activity is, at least in part, involved in (PhSe)₂ antidepressant-*like* behavior.

Keywords: malathion; diphenyl diselenide; depression; selenium.

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

TABELA 1 – Classe toxicológica e cor da faixa no rótulo de agrotóxicos.....	03
TABELA 2 – Sintomas agudos de intoxicação por malation.....	08

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

FIGURA 1 – Estrutura geral dos inseticidas organofosforados.....	04
FIGURA 2 – Estrutura química do malation.....	06
FIGURA 3 – Biotransformação do malation.....	07
FIGURA 4 – Estrutura química do (PhSe) ₂	13

Artigo 1

FIGURA 1 – Effect of (PhSe) ₂ on the FST in rats exposed to malathion.....	20
FIGURA 2 – Effect of (PhSe) ₂ on Na ⁺ K ⁺ ATPase in rat cerebral cortex exposed to malathion.....	20

LISTA DE ABREVIATURAS

δ-ALA-D – δ-Aminolevulinato desidratase

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

DL₅₀ – Quantidade de uma determinada substância que é necessária para provocar a morte a pelo menos 50% da população.

EROs – Espécies reativas de oxigênio

ERNs – Espécies reativas de nitrogênio

GPx – Glutathione peroxidase

GST – Glutathione S-transferase

MAO – Monoamina oxidase

MDCA – Malation ácido dicarboxílico

MMCA – Malation ácido monocarboxílico

(PhSe)₂ – Disseleneto de difenila

OF – Organofosforados

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Sistema nervoso periférico

TCA – Teste do campo aberto

TNF – Teste do nado forçado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1. Agrotóxicos.....	03
2.2. Inseticidas Organofosforados.....	04
2.3. Malation.....	06
2.3.1. Toxicidade do malation.....	08
2.4. Depressão.....	09
2.4.1. AChE X Depressão.....	10
2.4.2. Na ⁺ K ⁺ ATPase X Depressão.....	11
2.4.3. MAO X Depressão.....	11
2.4.4. Estresse Oxidativo X Depressão.....	12
2.5. Selênio.....	12
2.5.1. Disseleneto de difenila (PhSe) ₂	13
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivo geral.....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	16
4.1. Artigo 1: Efeito do tipo antidepressivo do disseleneto de difenila em ratos expostos ao malation: Envolvimento da Na⁺ K⁺ ATPase.....	17
5. DISCUSSÃO.....	23
6. CONCLUSÕES.....	27
7. PERSPECTIVAS.....	28
8. REFERÊNCIAS.....	29

1. INTRODUÇÃO

O uso extensivo de agrotóxicos e o intensivo desenvolvimento de novos compostos químicos para esse propósito aumentaram drasticamente a variedade e a quantidade dos mesmos no meio ambiente. Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo, tanto de uso doméstico como de uso agrícola.

As conseqüências do uso intensivo de agrotóxicos refletem-se nos índices de intoxicações induzidas por estas substâncias, seja no campo ou em áreas urbanas. No Brasil, segundo estatísticas do Ministério da Saúde, no ano de 2007 foram registrados mais de 8 mil casos de intoxicação por agrotóxicos de uso rural e doméstico, 31% destes na região Sul.

Dentre os agrotóxicos, o grupo dos organofosforados (OF) representa a classe mais utilizada. Os compostos organofosforados são substâncias inibidoras da acetilcolinesterase (AChE), que impedem a hidrólise da acetilcolina (ACh) e conseqüentemente permitem uma ação mais intensa e prolongada desse neurotransmissor nas sinapses colinérgicas. Atuam de maneira similar a agonistas dos receptores colinérgicos, com os conseqüentes efeitos muscarínicos e nicotínicos sobre o sistema nervoso central (Moretto, 1998).

Entre os agrotóxicos OF destaca-se o inseticida malation, usado amplamente na agricultura e em programas de saúde pública. O malation [0,0-dimetil S-(etil-1,2-dicarboetoxi) fosforoditioato] é utilizado nas áreas rurais e urbanas em uma grande variedade de situações, desde a erradicação de insetos e formigas (Brenner, 1992) até o combate a piolhos (Meinking et al., 2004).

Vários estudos têm demonstrado os prejuízos causados pela intoxicação aguda e crônica por malation, entre eles pode-se destacar ansiedade, confusão, irritabilidade e depressão (Colosio et al., 2003). A toxicidade do malation tem sido atribuída à produção de radicais livres e conseqüentemente ao início de um processo de estresse oxidativo em animais experimentais (Fortunato et al., 2006a; Fortunato et al., 2006b; Possamai et al., 2007).

A depressão é um problema de saúde pública cada vez mais freqüente. Estima-se que cerca de 30% da população mundial sofra de depressão. Essa doença pode ter diversas causas e caracteriza-se por um quadro de tristeza

profunda, incapacidade de interagir socialmente podendo levar a pessoa até mesmo ao suicídio. Com relação aos OF, alguns trabalhos têm relacionado os efeitos tóxicos causados pela exposição ao malation como a causa de suicídio entre trabalhadores rurais (Flessel et al., 1993; Parrón et al., 1996).

Diversos fármacos são utilizados no tratamento da depressão, por exemplo, selegilina, imipramina e fluoxetina. Muitos desses medicamentos apresentam efeitos colaterais ou demoram certo tempo para ter efeito sobre os sintomas da depressão (Nemeroff e Owens, 2002). Nesse contexto, torna-se importante a pesquisa de novos compostos antidepressivos que tenham um efeito mais rápido e que apresentem poucos efeitos colaterais.

Nos últimos anos, os compostos orgânicos de selênio têm se destacado, não apenas como importantes intermediários em síntese orgânica, mas também por apresentarem propriedades farmacológicas em diversos modelos experimentais (Nogueira et al., 2004). Dentre os compostos de selênio que possuem ação farmacológica destaca-se o disseleneto de difenila [(PhSe)₂].

O (PhSe)₂ é um composto organocalcogênio que exibe diversas propriedades farmacológicas incluindo propriedades antiinflamatória e antinociceptiva (Savegnago et al., 2007a), anti-úlceras (Savegnago et al., 2006), anti-hiperglicêmica (Barbosa et al., 2006) entre outras. Além destas, nosso grupo de pesquisa mostrou recentemente que esse composto exerce também efeitos do tipo antidepressivo e do tipo ansiolítico *per se* (Savegnago et al., 2007b; 2008).

Com base nos efeitos benéficos exibidos por esse composto, torna-se importante estudos que investiguem o efeito antidepressivo do (PhSe)₂ nos distúrbios comportamentais causados pelo malation.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Agrotóxicos

O termo “agrotóxicos” é definido pela Lei Federal nº 7.802, regulamentada pelo Decreto nº 98.816, no seu artigo 2, inciso I da seguinte forma:

Os produtos e os componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais. Produtos cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores ou inibidores do crescimento.

Estas substâncias podem ser classificadas quanto à praga que combatem em: inseticidas, herbicidas, fungicidas, raticidas, nematocidas, acaricidas e molusquicidas (Organização Mundial da Saúde, 1996). São classificados ainda segundo seu poder tóxico, variando entre os extremamente tóxicos (Classe I - faixa vermelha) até os pouco tóxicos (Classe IV - faixa verde). Por determinação legal, todos os produtos devem apresentar uma faixa colorida indicativa do grau de toxicidade, conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1 – Classe toxicológica e cor da faixa no rótulo de agrotóxicos.

Classe	Grau de Toxicidade	Faixa	Exemplos
I	Extremamente tóxico	Vermelha	Metamidofós, Endosulfan
II	Altamente tóxico	Amarela	Clorpirifós, Diazinon
III	Medianamente tóxico	Azul	Malation, Acefato
IV	Pouco ou muito pouco tóxico	Verde	Glifosato

Fonte: www.saude.pr.gov.br

Nos anos 70, com a implantação dos planos nacionais de desenvolvimento agrícola e de fertilizante e calcário, o Banco do Brasil concedia financiamentos agrícolas com 15% do crédito atrelado à “aplicação de tecnologia moderna”, dando início a um novo modelo agrícola baseado no uso intensivo de agrotóxicos e na total

estabelecimentos comerciais de produtos agropecuários (Maroni et al., 2000; Petroianu et al., 2006).

O uso generalizado desses compostos tem causado poluição ambiental e risco potencial à saúde, incluindo casos crônicos e agudos de intoxicações, tanto em animais quanto humanos (Abdollahi et al., 2004). Estes compostos são absorvidos pelo organismo humano por via dérmica, respiratória e digestiva. A absorção por via oral assume importância nas intoxicações acidentais, sobretudo em crianças, e nos adultos através do manuseio inadequado dos instrumentos de aplicação, no hábito de fumar ou comer durante o trabalho de aplicação ou preparo do produto, no consumo de alimentos contaminados e nas intoxicações intencionais (homicídios e suicídios) (Larini, 1996).

A ação tóxica dos compostos OF está relacionada à inibição de várias enzimas, porém, as esterases parecem ser as mais importantes clinicamente. A inibição da AChE ocorre através do processo de fosforilação do grupo hidroxila do resíduo de serina da enzima. Com isso, a hidrólise do neurotransmissor ACh será comprometida, levando ao acúmulo deste neurotransmissor nas sinapses do sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). Dessa forma, haverá uma hiperestimulação dos receptores muscarínicos e nicotínicos (receptores colinérgicos) desencadeando uma variedade de sintomas que caracterizarão a “síndrome colinérgica” (Rusyniak e Nañagas, 2004; Eddleston et al., 2008).

Alguns dos efeitos agudos da exposição excessiva a compostos OF são lacrimação, salivação, vômitos, diarreia, dores de cabeça e convulsões. Relatos em trabalhadores expostos a baixas concentrações, porém após uma exposição crônica demonstram: enfraquecimento, déficit de memória, perda de concentração, dificuldade de fala. Também foram observadas alterações psíquicas: aumento de tendências depressivas, ansiedade, irritabilidade e nervosismo. Esses compostos podem ocasionar ainda danos irreversíveis, como paralisias e neoplasias (Ray e Richards, 2001; Salvi et al., 2003).

A intoxicação por OF pode ainda levar à morte, usualmente por insuficiência respiratória resultante de fraqueza muscular e depressão respiratória no SNC, agravados por broncoconstrição e excessiva secreção brônquica (Brenner, 1992; Cocker et al., 2002).

2.3. Malation

Dentre os OF utilizados no Brasil, destaca-se o malation [0,0-dimetil S-(etil-1,2-dicarboetoxi) fosforoditioato] que é utilizado nas áreas rurais e urbanas em uma variedade de situações (erradicações de insetos, formigas e até piolhos) (WHO, 2003; Meinking et al., 2004). Sua estrutura química está representada na figura 2:

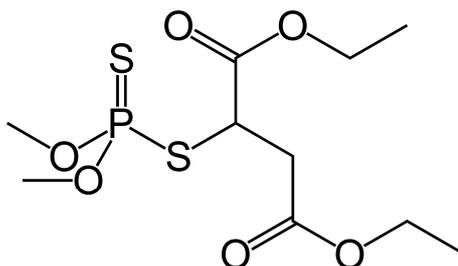


Figura 2 – Estrutura química do malation.

O malation é um inseticida de uso agropecuário e domissanitário da classe III, ou seja, é considerado medianamente tóxico. A dose letal de 50% dos animais (DL_{50}) aguda oral do malation em ratos machos é 1.375 mg/kg, um valor relativamente alto. No entanto o valor da DL_{50} pode não demonstrar alguns efeitos tóxicos que podem ocorrer em níveis abaixo daqueles que causam a morte (The Merck Index, 2001; WHO, 2003).

O malation é absorvido pelo organismo por todas as vias de forma acelerada. Um estudo de Jadhav e colaboradores (1992) demonstrou a distribuição do malation no organismo humano em diversos tecidos e fluidos corporais, como rim, sangue, fígado, baço, coração, cérebro, pulmão e músculos.

O metabolismo do malation em animais ocorre de três formas, oxidativa, hidrolítica, e redução do grupo metil catalisada pela enzima glutathione S-transferase (GST). A figura 3 mostra a biotransformação do malation.

Após absorção, o malation é oxidado no fígado por enzimas do citocromo P-450 em pequenas quantidades para malaoxon, o qual é o principal metabólito responsável pelos efeitos tóxicos observados (Buratti et al., 2005). O metabolismo do malation também se dá através de uma enzima carboxilesterase hepática que catalisa a degradação rápida do malation a derivados como o malation ácido

monocarboxílico (MMCA) e malation ácido dicarboxílico (MDCA). Essas reações competem com a formação do malaixon (catalisada pelo citocromo P-450), que por sua vez também pode ser degradado pela carboxilesterase (Buratti et al., 2005).

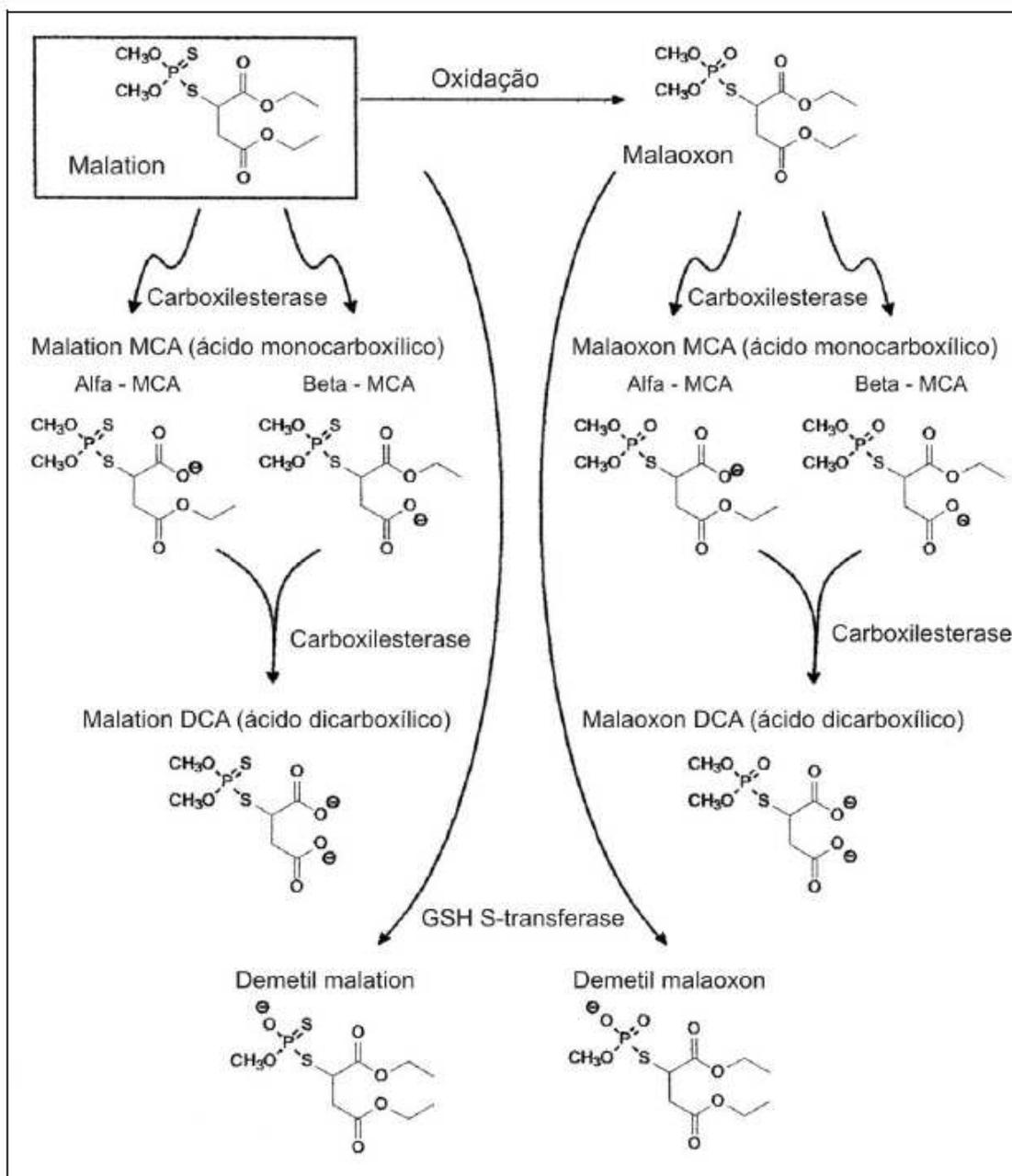


Figura 3 – Biotransformação do malation (Adaptado de WHO, 2003).

No homem, a eliminação do malation é principalmente urinária, e em menor quantidade nas fezes. A excreção máxima ocorre em 2 dias, após isso diminui rapidamente. Em ratos a principal via de excreção também é através da urina (80-

90%) nas primeiras 24 horas após a exposição. Os ratos convertem cerca de 4-6% do malation em malaoxon. O tempo de meia-vida do malation em ratos é 1,4 dias no sangue, na administração por via oral (WHO, 2003).

2.3.1. Toxicidade do Malation

Na exposição aguda o principal mecanismo de toxicidade do malation é a inibição irreversível da enzima AChE, que resulta nos efeitos prolongados da ACh. Os sintomas de intoxicação aguda surgem rapidamente, algumas horas após a exposição excessiva (WHO, 2003). Os principais estão representados na tabela 2.

A intoxicação subaguda ocorre por exposição moderada e tem aparecimento mais lento. Os sintomas são subjetivos e vagos, tais como dor de cabeça, fraqueza, mal-estar, dor de estômago, sonolência, entre outros. Já a intoxicação crônica caracteriza-se por surgimento tardio, ou seja, meses após a exposição (WHO, 2003).

Tabela 2 – Síntomas agudos de intoxicação por malation.

Síndrome Muscarínica	Síndrome Nicotínica	Síndrome SNC
- Distúrbios cardiocirculatórios (diminuição da contratilidade cardíaca, bradicardia e vasodilatação).	- Tremores de língua, lábios, olhos e pálpebras.	- Cefaléia, inquietude.
- Distúrbios gastrointestinais (aumento dos movimentos peristálticos e do tônus intestinal, aumento das secreções digestivas, diarreia, cólicas abdominais, vômitos).	- Espasmos e tremores da musculatura esquelética.	- Tremores, ataxia.
- Distúrbios das glândulas exócrinas (sudorese, lacrimejamento).	- Flacidez e paralisia muscular.	- Confusão mental.
	- Espasmos, fasciculações e fibrilações musculares, principalmente na face e pescoço.	- Convulsões.
		- Coma.

(Adaptado de WHO, 2003)

Além da inibição da AChE, a indução de estresse oxidativo também é considerada um dos principais mecanismos de toxicidade do malation (Akhgari et al., 2003; Abdollahi et al., 2004). Há evidências de que as espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) estão envolvidas no mecanismo de ação de alguns agrotóxicos, tais como o malation (Banerjee et al., 1999). Em animais experimentais expostos ao malation foram observados diversos danos relacionados à produção excessiva de espécies reativas e ao início de um processo de estresse oxidativo (Fortunato et al., 2006a; Fortunato et al., 2006b; Possamai et al., 2007).

Além disso, estudos mostraram que o malation, administrado agudamente, em doses repetidas e cronicamente causa um comportamento do tipo depressivo, avaliado pelo teste do nado forçado (TNF), em ratos (Assini et al., 2005; Ramos et al., 2006; Brocardo et al., 2007).

De fato, a presença de depressão, ansiedade e prejuízos de memória em pessoas expostas a OF vem sendo destacada há bastante tempo. Levin e Rodnitzky (1976), já relatavam estes sintomas mesmo na ausência de inibição significativa da AChE plasmática dos indivíduos estudados. Outro estudo que avaliou 251 casos de suicídio demonstrou uma relação positiva entre os casos estudados e áreas agrícolas, bem como a respectiva população de risco, ou seja, os agricultores expostos a agrotóxicos (Parrón et al., 1996).

No Brasil, um estudo avaliou 37 trabalhadores de plantações de fumo no Rio Grande do Sul, tanto imediatamente quanto 3 meses após o período de aplicação dos OF em suas lavouras. Em nenhum dos momentos avaliados a atividade da AChE plasmática apresentou-se alterada, entretanto foram detectadas alterações psiquiátricas como depressão e ansiedade, em mais da metade dos casos estudados (Salvi et al., 2003).

Além disso, diversos estudos em animais avaliaram o efeito da exposição a OF na função neurotransmissora do cérebro principalmente relacionada aos níveis de serotonina (el-Etri et al., 1992; Raines et al., 2001; Aldridge et al., 2003). Uma diminuição dos níveis de serotonina em doses inferiores àquelas necessárias para inibir a AChE (Aldridge et al., 2003), sugere que o efeito dos OF no humor pode ser mediado por mecanismos anti-colinesterásicos envolvendo a serotonina.

2.4. Depressão

Os seres humanos se entristecem e se alegram com facilidade, em decorrência de acontecimentos da vida. Essa experiência, de flutuações diárias em nosso afeto, é universal e normal. Em algumas pessoas, no entanto, estas flutuações se tornam excessivas em termos de intensidade e/ou duração, passando a interferir de forma significativa em seu cotidiano (DePaulo e Hartz, 2000).

A depressão é um dos transtornos comportamentais mais graves e recorrentes, muitas vezes manifestada com sintomas psicológicos, comportamentais e fisiológicos. Afeta cerca de 30% da população mundial e pode resultar em morte prematura por suicídio e prejuízo da vida social (Kessler et al., 1994). É também considerada um fator de risco para o desenvolvimento de outras doenças, por exemplo, o câncer e as doenças cardiovasculares (Pratt et al., 1996; Reiche et al., 2004).

Diversos fármacos são utilizados no tratamento da depressão. No entanto, em torno de 15% dos pacientes são resistentes a todas as formas de tratamento conhecidas para essa doença (Keller et al., 1992). Além dos efeitos colaterais que podem ser causados pelos antidepressivos, muitos tratamentos demoram semanas para que seja observada uma melhora dos sintomas (Nemeroff e Owens, 2002).

Os antidepressivos clássicos são os compostos inibidores da monoamina oxidase (MAO) (selegilina, moclobemida), compostos tricíclicos (imipramina, maprotilina) e drogas que atuam especificamente sobre o sistema serotoninérgico (fluoxetina, venlafaxina, paroxetina) (Wong e Licinio, 2001). Nas últimas décadas houve um grande avanço na pesquisa por novos compostos antidepressivos principalmente devido aos efeitos colaterais dos medicamentos clássicos. Buscam-se cada vez mais drogas efetivas no tratamento da depressão, que diminuam os sintomas em menos tempo e que apresentem poucos efeitos colaterais.

Os mecanismos moleculares envolvidos na depressão são muito complexos (Sarko, 2000). Embora a maioria das pesquisas sobre depressão se concentre nos neurotransmissores noradrenalina e serotonina, diversos outros fatores podem estar relacionados com essa doença.

2.4.1. AChE X Depressão

A AChE é uma enzima que desempenha um papel regulatório na transmissão colinérgica. Está amplamente distribuída no SNC e é responsável pela hidrólise do neurotransmissor ACh. Algumas evidências sugerem que a disfunção na transmissão colinérgica está envolvida na fisiopatologia da depressão (Fritze, 1993; Garcia-Alloza et al., 2005). A estimulação da transmissão colinérgica com agonistas dos receptores de ACh ou com inibidores da AChE pode causar distúrbios comportamentais (Dilsaver, 1986; Mearns et al., 1994).

2.4.2. Na⁺ K⁺ ATPase X Depressão

Alguns estudos mostram que a atividade da Na⁺ K⁺ ATPase no cérebro está associada à depressão (El-Mallakh e Wyatt, 1995; Gamaro et al., 2003). Na⁺ K⁺ ATPase é a enzima responsável pelo transporte ativo dos íons sódio e potássio, mantendo assim o gradiente iônico necessário para a excitabilidade neuronal. Está presente em altas concentrações nas membranas das células cerebrais, consumindo 40-50% do ATP produzido nesse tecido (Erecinska e Silver, 1994). Dessa forma, alterações na atividade dessa enzima podem causar um distúrbio na função neuronal. Além disso, a serotonina, que está envolvida na fisiopatologia das desordens afetivas (Van Praag et al., 1990), é removida da fenda sináptica pelos transportadores localizados nos neurônios pré-sinápticos por captação dependente de sódio (Lesch et al., 1993; Worrall e Willians, 1994) o que está diretamente relacionado com a atividade da Na⁺ K⁺ ATPase (Lesch et al., 1993).

2.4.3. MAO X Depressão

A MAO é uma enzima mitocondrial responsável pela degradação das monoaminas como dopamina (MAO-B), noradrenalina e serotonina (MAO-A), podendo assim também estar envolvida na depressão. Um aumento na atividade dessa enzima foi observado em distúrbios como depressão, ansiedade e doenças neurodegenerativas. Dessa forma, inibidores da MAO podem ser empregados no tratamento dessas doenças (Nolen et al., 1993; Yamada e Yasuhara, 2004).

2.4.4. Estresse Oxidativo X Depressão

As EROs e as ERNs são um importante fator de dano em muitos processos patológicos e toxicológicos, incluindo os distúrbios psiquiátricos. Vários estudos mostram o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese da depressão. Maes et al. (2000), bem como outros pesquisadores (Tsuboi et al., 2006; Sarandol et al., 2007) mostraram a co-existência de estresse oxidativo aumentado e sintomas de depressão em pacientes. Esse resultado foi evidenciado pela diminuição das defesas antioxidantes e pelo aumento da peroxidação lipídica no plasma destes pacientes. Dessa forma, a utilização de antioxidantes pode representar uma alternativa para o tratamento da depressão.

2.5. Selênio

O selênio foi descoberto em 1817, pelo químico sueco J. J. Berzelius. Esse elemento é um calcogênio do grupo 16 da tabela periódica e pode apresentar-se sob quatro estados de oxidação: selenato (Se^{+6}), selenito (Se^{+4}), selênio elementar (Se^0) e seleneto (Se^{-2}) (Papp et al., 2007).

O selênio é um elemento traço essencial, cuja essencialidade nutricional foi demonstrada em 1957, em ratos (Schwartz e Foltz, 1957). Nos últimos anos, têm sido descrito que baixos níveis de selênio podem levar à predisposição para o desenvolvimento de algumas doenças, tais como o câncer, a esclerose, as doenças cardiovasculares, a cirrose e o diabetes (Navarro-Alarcón e López-Martinez, 2000). Neste contexto, a suplementação de dietas com selênio, tanto para animais quanto para humanos, tem sido aceita pela comunidade científica. Para humanos, a Junta de Alimentação e Nutrição da Academia de Ciências dos Estados Unidos propõe uma ingestão diária de 50-200 μg , a qual é considerada segura e saudável para adultos.

Esse calcogênio apresenta um grande número de funções biológicas, sendo a mais importante a antioxidante. O selênio tem atividade redox e tem importância fundamental porque faz parte do sítio ativo de diversas enzimas. Já é conhecido que o selênio está presente como resíduo de selenocisteína no sítio ativo das enzimas glutathione peroxidase (GPx) (Wingler e Brigelius-Flohé, 1999), tioredoxina redutase

(Holmgren, 1985), 5'-deiodinase (Behne e Kyriakopoulos, 1990) e selenoproteína P (Ursini et al., 1990). Além disso, sabe-se que as moléculas contendo selênio podem ser melhores nucleófilos (e, portanto antioxidantes) do que os antioxidantes clássicos (Arteel e Sies, 2001).

O selênio também é considerado um importante modulador do humor. Diversos estudos demonstraram o papel do selênio nos distúrbios do humor (Hawkes e Hornbostel, 1996; Burk, 2002; Sher, 2008). No entanto, o mecanismo pelo qual o selênio interfere nesses distúrbios ainda não foi esclarecido. Sabe-se que uma dieta pobre em selênio (32-36 µg/dia) está associada a um aumento da incidência de depressão, ansiedade, confusão e hostilidade. Além disso, uma dieta rica em selênio (226 µg/dia) melhora o humor (Rayman, 2000).

2.5.1. Disseleneto de Difenila (PhSe)₂

A partir da década de 30, os organocalcogênios têm sido alvos de interesse para os químicos orgânicos em virtude da descoberta de suas aplicações sintéticas (Comasseto, 1983), suas propriedades biológicas e aplicações farmacológicas (Parnham e Graf, 1991; Nogueira et al., 2004).

Durante as últimas décadas, o interesse pelos compostos orgânicos de selênio tem se intensificado, principalmente devido ao fato de que uma variedade destes compostos possui propriedades farmacológicas (Nogueira et al., 2004). Entre esses compostos, destaca-se o (PhSe)₂ (figura 4), um composto orgânico de selênio lipofílico que apresenta inúmeras propriedades farmacológicas (Nogueira et al., 2004).

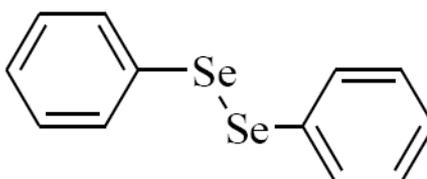


Figura 4 – Estrutura química do (PhSe)₂.

Estudos em animais de laboratório demonstraram que o $(\text{PhSe})_2$ apresenta propriedades anti-úlceras (Savegnago et al., 2006), antiinflamatória e antinociceptiva (Savegnago et al., 2007a), anti-hiperglicêmica (Barbosa et al., 2006), neuroprotetora (Ghisleni et al., 2003) e pode retardar o desenvolvimento de câncer (Barbosa et al., 2008). Além disso, esse composto apresenta efeito antioxidante em diversos modelos de estresse oxidativo (Santos et al., 2005; Borges et al., 2008; Luchese et al., 2009; Prigol et al., 2009a). Recentemente foi demonstrado que o $(\text{PhSe})_2$ apresenta propriedades do tipo antidepressiva e do tipo ansiolítica (Savegnago et al., 2007b; Savegnago et al., 2008).

Embora o $(\text{PhSe})_2$ apresente consideráveis propriedades farmacológicas, trabalhos também têm evidenciado a ocorrência de alguns efeitos tóxicos. Inibições nas atividades das enzimas δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) (Nogueira et al., 2003a) e $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase (Borges et al., 2005) foram observadas e o potencial pró-oxidante do $(\text{PhSe})_2$ parece estar envolvido nestes efeitos. Efeitos neurotóxicos do $(\text{PhSe})_2$ também foram relatados (Nogueira et al., 2003b), incluindo a indução de convulsões (Prigol et al., 2008). Entretanto, tais efeitos neurotóxicos foram observados apenas quando o $(\text{PhSe})_2$ foi administrado em altas doses (Prigol et al., 2009b). O $(\text{PhSe})_2$ pode ainda afetar o sistema glutamatérgico em plaquetas humanas (Borges et al., 2004) e de ratos (Nogueira et al., 2001) e dados da literatura também indicam que o $(\text{PhSe})_2$ pode causar toxicidade em fetos de ratas tratadas com este composto (Weis et al., 2007).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa estudou a farmacocinética do $(\text{PhSe})_2$. Prigol et al. (2009b) demonstraram que o pico plasmático de $(\text{PhSe})_2$ após a administração oral (500 mg/kg) foi em 30 min e a concentração plasmática máxima do composto foi de 13,13 e 10,11 $\mu\text{g/ml}$ para ratos e camundongos, respectivamente. Foi demonstrado também que o $(\text{PhSe})_2$ na dose de 500 mg/kg atinge concentrações no plasma, no fígado e no cérebro de 3,67, 5,07 e 1,15 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente após a administração pela via oral em filhotes de ratos. Além disso, foi observada uma correlação negativa entre as concentrações de $(\text{PhSe})_2$ no fígado e no cérebro e a latência para os primeiros episódios convulsivos nesses filhotes (Prigol et al., 2009c).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Considerando que a depressão é um dos distúrbios comportamentais cada vez mais freqüente e que os seres humanos estão expostos a organofosforados, o objetivo do presente trabalho foi investigar um possível efeito do tipo antidepressivo do $(\text{PhSe})_2$ em um modelo de depressão induzida por malation em ratos.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Determinar, através do teste do nado forçado (TNF), um modelo preditivo para o estudo da depressão em animais experimentais, se o tratamento com $(\text{PhSe})_2$ exerce um efeito do tipo antidepressivo em ratos expostos a uma baixa dose de malation.
- ✓ Determinar, através do teste do campo aberto (TCA), um modelo utilizado para a avaliação da locomoção em animais experimentais, se o tratamento com malation e/ou $(\text{PhSe})_2$ altera as atividades locomotora e exploratória dos animais.
- ✓ Investigar a atividade das enzimas $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$, AChE e MAO , bem como parâmetros de estresse oxidativo no córtex cerebral de ratos expostos ao malation e/ou $(\text{PhSe})_2$.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências, encontram-se no próprio artigo, estruturados de acordo com as normas da revista Neuroscience Letters.

4.1. Artigo 1

Efeito do tipo antidepressivo do disseleneto de difenila em ratos expostos ao malation: Envolvimento da Na⁺ K⁺ ATPase

Antidepressant-*like* effect of diphenyl diselenide on rats exposed to malathion:
Involvement of Na⁺K⁺ ATPase activity

Carmine Inês Acker, Cristiane Luchese, Marina Prigol, Cristina Wayne Nogueira

Neuroscience Letters 455 (2009) 168-172



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

Antidepressant-like effect of diphenyl diselenide on rats exposed to malathion: Involvement of Na⁺K⁺ ATPase activity

Carmine I. Acker, Cristiane Luchese, Marina Prigol, Cristina W. Nogueira*

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 October 2008

Received in revised form 14 March 2009

Accepted 21 March 2009

Keywords:

Malathion

Diphenyl diselenide

Selenium

Antidepressant-like

Na⁺K⁺ ATPase activity

Oxidative stress

ABSTRACT

The antidepressant-like effect of repeated administration of diphenyl diselenide (PhSe)₂ in rats exposed to malathion is reported. The role of Na⁺K⁺ ATPase, acetylcholinesterase (AChE) and monoamine oxidase (MAO) activities and oxidative stress in antidepressant behavior were investigated in cerebral cortex of rats. Rats were exposed once a day for 3 consecutive days to malathion (50 mg/kg, intraperitoneal) and (PhSe)₂ (50 mg/kg, oral). To investigate the antidepressant-like behavior rats were submitted to the forced swimming test (FST) and open-field test (OFT). Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) levels, enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses were carried out in cerebral cortex of rats. The results confirmed that malathion increased immobility time in the FST without altering the locomotor performance in the OFT. Treatment with (PhSe)₂ ameliorated performance in the FST without altering the crossing numbers in the OFT. The inhibition of Na⁺K⁺ ATPase activity caused by malathion was prevented by treatment with (PhSe)₂. Exposure to malathion did not alter parameters of oxidative stress as well as AChE and MAO activities in cerebral cortex of rats. In conclusion, (PhSe)₂ exerted antidepressant-like effect in rats exposed to malathion. Na⁺K⁺ ATPase activity is, at least in part, involved in (PhSe)₂ antidepressant-like behavior.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

The extensive use of pesticides for plant and crop protection in agriculture and the intensive development of new chemicals for this purpose have dramatically increased the variety and quantities of agrochemicals present in the environment. Organophosphorus pesticides (OPs) represent the most applied group of insecticides for the last two decades [9,27].

The malathion [S-1,2(bis-ethoxycarbonyl)ethyl O,O-dimethyl phosphorodithioate] is one of the most widely used OP for agriculture corps against several pests and public health programs [2,15]. Malathion is known to induce excitotoxicity through its bioactivated analog, malafoxon [24]. Moreover, studies have demonstrated that exposure to this OP causes oxidative stress [22,4].

In addition, an important sequel observed in acute poisoned patients with OP compounds is impairment in neurobehavioral performance, emotional status [10] and neurotoxicity caused by inhibition of acetylcholinesterase (AChE) activity [8]. Moreover, long-term exposure to low levels of OPs may produce neuropsychiatric symptoms including affective disorder such as anxiety, depression [37,10,38].

Depression is a common disorder and a major cause of disability, and causes death both by suicide and due to raised rates of physical

disorders [32]. The mechanism of depression is quite complex [40]. Although psychobiological research on depression has traditionally concentrated on the neurotransmitters, noradrenaline and 5-HT, the role of acetylcholine in emotional behavior has been studied. Some evidence on this topic suggests that dysfunction of cholinergic transmission is involved in the pathophysiology of depression [19,21].

There is evidence of rapidly increasing interest in the area of effective chemical antidepressants which rates of response and remission and with lower adverse-effect [39]. In this way, diphenyl diselenide (PhSe)₂, an organoselenium compound, could be an attractive target for treatment of depression due to be a non-toxic drug when acutely administered to rats and mice [42,43] at doses that has pharmacological effect [41]. Recently, our group of research reported that this compound exerts antidepressant-like and anxiolytic-like effects [43].

In this study we examine if repeated administration of (PhSe)₂ would exert antidepressant-like effect in rats concomitantly exposed to the low dose of malathion. The role of Na⁺K⁺ ATPase, acetylcholinesterase (AChE) and monoamine oxidase (MAO) activities and oxidative stress was investigated in cerebral cortex of rats.

All animal experiments were carried out in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and use of laboratory animals (NIH publication 8023, revised 1996) and with the approval of the local Animal Use Committee. All chemicals were

* Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 8140; fax: +55 55 3220 8978.
E-mail address: criswn@quimica.ufsm.br (C.W. Nogueira).

obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) and Aldrich Chemical Co. (USA). (PhSe)₂ was prepared in our laboratory according to Paulmier [31] and the chemical purity (99.9%) was determined by GC/HPLC. Malathion 500 CE (50% purity, Indol do Brazil Agroquímica LTDA, Curitiba, PR, Brazil) was obtained from commercial grade. Male adult rats, weighing 200–300 g, were obtained from a local breeding colony. The animals were kept in separate animal rooms, on a 12-h light/dark cycle, in an air conditioned room (22 ± 2 °C). Commercial diet (GUABI, RS, Brazil) and tap water were supplied *ad libitum*.

Rats were divided into four groups of 7–9 animals each. The group I received canola oil (1 ml/kg) + saline (1 ml/kg), group II received (PhSe)₂ (50 mg/kg) + saline (1 ml/kg), group III received canola oil (1 ml/kg) + malathion (50 mg/kg) and group IV received (PhSe)₂ (50 mg/kg) + malathion (50 mg/kg). Rats were treated once a day for 3 consecutive days with malathion and (PhSe)₂. Treatment with (PhSe)₂ was given immediately after malathion injection. (PhSe)₂ was dissolved in canola oil and administered per oral route (p.o.). Malathion was dissolved in saline 0.9% and administered intraperitoneally (i.p.). The dosage regimen was based on Brocardo et al. [6] and did not produce overt signs of toxicity in rats [6]. At the 4th day, rats were submitted to the forced swimming test (FST) and open-field test (OFT). After that, rats were killed by decapitation and the cerebral cortex was immediately excised. The samples of tissues were homogenized in 50 mM Tris–HCl, pH 7.4 (1/3, w/v) and centrifuged at 2400 × g for 15 min at 4 °C. The low-speed supernatants (S₁) were separated and used for biochemical assays excepting for AChE and MAO activities.

The FST was conducted using the method of Porsolt et al. [33], with minor modifications. Behavioral naive rats were individually forced to swim in open plastic cylinders (height 40 cm, diameter 30 cm) containing 25 cm of water, maintained at 25 ± 1 °C. The pretest session was carried out 30 min after the last malathion and/or (PhSe)₂ treatment. In the pretest session, rats were allowed to swim for 15 min and then returned to their home cages. In the test session, 24 h later, rats were again submitted to the FST, with immobility time measured during 5 min. Each rat was judged to be immobile when it remained floating motionless in the water, making only those movements necessary to keep its head above water.

To assess the possible effects of malathion and (PhSe)₂ on the locomotor and exploratory activities, rats were evaluated in the OFT. The OFT was made of polywood and surrounded by walls 30 cm in height. The floor of the open-field, 45 cm in length and 45 cm in width, was divided by masking tape markers into 09 squares (3 rows of 3). Each animal was placed individually at the center of the apparatus and observed for 4 min to record the locomotor (number of segments crossed with the four paws) and exploratory activities (expressed by the number of time rearing on the hind limbs) [46].

The biochemical assays, thiobarbituric acid reactive species (TBARS) levels, non-enzymatic antioxidant defenses (non-protein thiols (NPSH) and ascorbic acid levels), enzymatic antioxidant defenses (catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST) activities), Na⁺K⁺ ATPase, acetylcholinesterase (AChE) and monoamine oxidase (MAO) activities were carried out.

TBARS levels, a measure of lipid peroxidation, were determined as described by Ohkawa et al. [29]. An aliquot of S₁ was incubated with 0.8% thiobarbituric acid (TBA), acetic acid buffer pH 3.4 and 8.1% sodium dodecil sulphate (SDS) at 95 °C for 2 h. The color reaction was measured at 532 nm. TBARS levels were expressed as nmol MDA/mg protein.

NPSH levels were determined by the method of Ellman [13]. An aliquot of S₁ was mixed (1:1) with 10% trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged at 4000 × g for 10 min. After the centrifugation, the protein pellet was discarded and free –SH groups were determined

in the clear supernatant. An aliquot of supernatant was added in 1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4, and 10 mM 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). The color reaction was measured at 412 nm. NPSH levels were expressed as μmol NPSH/g tissue.

Ascorbic acid determination was performed as described by Jacques-Silva et al. [25]. Proteins were precipitated in 10 volumes of a cold 5% TCA solution. An aliquot of the sample at a final volume of 1 ml of the solution was incubated at 37 °C for 3 h then H₂SO₄ 65% (v/v) was added to the medium. The reaction product was determined using a color reagent containing 4.5 mg/ml dinitrophenyl hydrazine and CuSO₄ (0.075 mg/ml) at 520 nm. The content of ascorbic acid was expressed as μmol ascorbic acid/g tissue.

CAT activity was assayed spectrophotometrically by the method of Aebi [1], which involves monitoring the disappearance of H₂O₂ in the homogenate presence at 240 nm. Enzymatic reaction was initiated by adding an aliquot of S₁ and the substrate (H₂O₂) to a concentration of 0.3 mM in a medium containing 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0. The enzymatic activity was expressed in units (U)/mg protein (1 U decomposes 1 μmol of H₂O₂ per minute at pH 7 at 25 °C).

GPx activity was assayed spectrophotometrically by the method of Wendel [47], through the GSH/NADPH/glutathione reductase system, by the dismutation of H₂O₂ at 340 nm. S₁ was added in GSH/NADPH/glutathione reductase system and the enzymatic reaction was initiated by adding H₂O₂. In this assay, the enzyme activity is indirectly measured by means of NADPH decay. H₂O₂ is decomposed, generating GSSG from GSH. GSSG is regenerated back to GSH by glutathione reductase presents in the assay media at the expenses of NADPH. The enzymatic activity was expressed as nmol NADPH/min/mg protein.

GR activity was determined as described by Calberg and Manervik [7]. In this assay, GSSG is reduced by GR at the expense of NADPH consumption, which is followed at 340 nm. GR activity is proportional to NADPH decay. The enzymatic activity was expressed as nmol NADPH/min/mg protein.

GST activity was assayed spectrophotometrically at 340 nm by the method of Habig et al. [23]. The reaction mixture contained an aliquot of S₁, 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.4, 100 mM GSH and 100 mM CDNB, which was used as substrate. The enzymatic activity was expressed as nmol CDNB conjugated/min/mg protein.

For Na⁺K⁺ ATPase activity assay, it was used a reaction mixture containing S₁, 3 mM MgCl₂, 125 mM NaCl, 20 mM KCl and 50 mM Tris–HCl, pH 7.4, in a final volume of 500 μl. The reaction was initiated by the addition of ATP to a final concentration of 3.0 mM. Control samples were carried out under the same conditions with the addition of 0.1 mM ouabain. The samples were incubated at 37 °C for 30 min, the incubation was stopped by adding TCA solution (10%) with 10 mM HgCl₂. Na⁺K⁺ ATPase activity was calculated by the difference between the two assays. Released inorganic phosphate (Pi) was measured by the method of Fiske and Subbarow [16]. Enzyme activity was expressed as nmol Pi/mg protein/min.

For AChE activity assay, the samples of cerebral cortex were homogenized in 0.25 M sucrose buffer (1/10, w/v) and centrifuged at 2400 × g at 4 °C for 15 min. Activity of AChE was carried out according to the method of Ellman et al. [14], using acetylthiocholine as substrate. The activity of AChE was spectrophotometrically measured at 412 nm. The activity of AChE was expressed as nmol/min/mg protein.

A preparation of cortex mitochondria was used for MAO assay as described by Soto-Otero et al. [45]. Cerebral cortices were immediately removed and washed in ice-cold isolation medium (pH 7.4, Na₂PO₄/KH₂PO₄ isotonicized with sucrose). Mitochondria from cortex were then obtained by differential centrifugation. Briefly, after removing blood vessels and pial membranes, cerebral cortices were manually homogenized with four volumes (w/v) of the isolation medium. Then, the homogenate was centrifuged at 900 × g

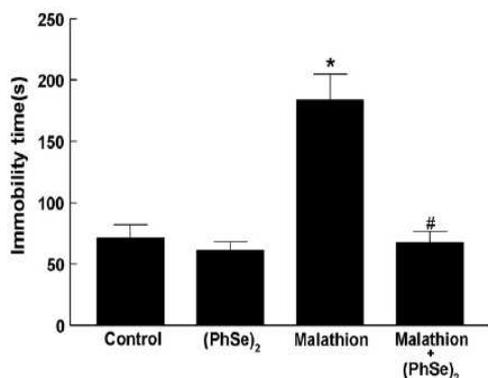


Fig. 1. Effect of (PhSe)₂ on the FST in rats exposed to malathion. Data are reported as means ± S.E.M. of 7–9 animals per group. *Denotes $p < 0.05$ as compared to the control group (two-way ANOVA/Duncan). #Denotes $p < 0.05$ as compared to the malathion group (two-way ANOVA/Duncan).

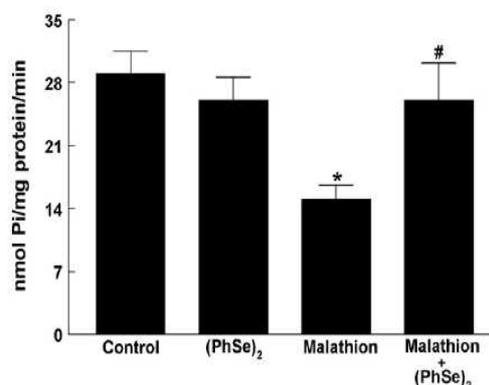


Fig. 2. Effect of (PhSe)₂ on Na⁺K⁺ ATPase in rat cerebral cortex exposed to malathion. Data are reported as means ± S.E.M. of 7–9 animals per group. *Denotes $p < 0.05$ as compared to the control group (two-way ANOVA/Duncan). #Denotes $p < 0.05$ as compared to the malathion group (two-way ANOVA/Duncan).

at 4 °C for 5 min. The supernatant was centrifuged at $12,500 \times g$ for 15 min. The mitochondria pellet was then washed once with isolation medium and re-centrifuged under the same conditions. Finally, the mitochondrial pellet was reconstituted in a buffer solution (Na₂PO₄/KH₂PO₄ isotonicized with KCl, pH 7.4) and stored in aliquots. MAO activity was determined as described by Krajl [26] with some modifications of Matsumoto et al. [28]. Aliquots of samples were incubated at 37 °C for 5 min in a medium containing buffer solution (Na₂PO₄/KH₂PO₄ isotonicized with KCl, pH 7.4) and specific inhibitors, selegiline (a MAO B inhibitor, 250 nM) or clorgiline (a MAO A inhibitor, 250 nM), at a final volume of 600 μl. Then kynuramine dihydrobromide was added to the reaction mixture (final concentration, 90 μM (MAO-A) and 60 μM (MAO-B)) as substrate. Samples were then incubated at 37 °C for 30 min. After incubation, the reaction was terminated by adding 10% of TCA. After cooling and centrifugation at $3000 \times g$ for 15 min, an aliquot of supernatant was added to 1 M NaOH. The fluorescence intensity was detected spectrofluorimetrically with excitation at 315 nm and emission at 380 nm. The concentration of 4-hydroxyquinoline was estimated from a corresponding standard fluorescence curve of 4-hydroxyquinoline. MAO activity was expressed as nmol of 4-hydroxyquinoline formed/mg protein.

The protein concentration was measured by the method of Bradford [5], using bovine serum albumin as the standard.

Data are expressed as means ± S.E.M. Statistical analysis was performed using a two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Duncan's multiple range test when appropriate. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Two-way ANOVA of FST data demonstrated a significant malathion × (PhSe)₂ interaction ($F_{1,28} = 14.166$; $p < 0.001$). Post-hoc comparisons showed that malathion significantly increased immobility time (259%) in the FST. (PhSe)₂ treatment protected against the increase caused by malathion in the FST (Fig. 1). Two-way ANOVA data showed that treatment with malathion did not produce any change in number of crossings and rearing in the OFT (data not shown).

Two-way ANOVA of TBARS levels revealed that malathion did not alter this parameter in rat cerebral cortex (data not shown).

Two-way ANOVA of NPSH and ascorbic acid levels showed that malathion did not alter these parameters in cerebral cortex of rats (data not shown).

Two-way ANOVA of CAT, GPx, GR and GST activities demonstrated that treatment with malathion did not alter the enzymatic activities in cerebral cortex of rats (data not shown).

Two-way ANOVA of Na⁺K⁺ ATPase activity revealed a significant malathion × (PhSe)₂ interaction ($F_{1,29} = 8.862$; $p < 0.01$) in cerebral

cortex of rats. Post-hoc comparisons showed that malathion significantly reduced the enzyme activity (53%) in rat cerebral cortex. (PhSe)₂ treatment protected the inhibition caused by malathion in Na⁺K⁺ ATPase activity in cerebral cortex of rats (Fig. 2).

Two-way ANOVA of AChE activity revealed that malathion did not change the enzyme activity in rat cerebral cortex (data not shown).

Two-way ANOVA of MAO-A and MAO-B activities showed that malathion did not change the enzymes activity in rat cerebral cortex (data not shown).

The current study confirmed that rats treated with a low dose of malathion presented an increase in the immobility time in the FST. Moreover, rats exposed to malathion presented an inhibition in Na⁺K⁺ ATPase activity from cerebral cortex. The most important finding of the present study is that (PhSe)₂ protected against the increase in the immobility time in the FST and the inhibition of Na⁺K⁺ ATPase activity induced by malathion.

Some authors have demonstrated that malathion exposure causes toxic effects in animals and human and is probably the cause of suicides in rural workers exposed to this compound [17,30]. In the present study, we confirmed that repeated exposure to malathion caused an increase in the immobility time in the FST in rats. Accordingly, an enhancement of the immobility time in the FST has been reported after acute [3,6] or chronic [35] exposure to malathion. In addition, the increase of the immobility time caused by malathion could not be attributed to a reduction in the locomotor activity of the animals, since malathion did not alter locomotor performance of rats in the open-field test.

In the current study, we demonstrated that (PhSe)₂ produced significant antidepressant-like action against an increase in the immobility time in the FST induced by malathion, without modifying the locomotor performance and exploratory activities of rats. In accordance, the antidepressant-like effect of (PhSe)₂ after acute administration in rodents has been reported [42].

Some authors have introduced the hypothesis that an inhibition of Na⁺K⁺ ATPase activity in brain is associated with depressive disorders [11,12,20]. In this study, malathion exposure significantly inhibited Na⁺K⁺ ATPase activity in cerebral cortex of rats. Although the exact mechanisms responsible for inhibition of Na⁺K⁺ ATPase activity are not known, it is likely that Na⁺K⁺ ATPase activity is involved in behavioral changes caused by malathion. Our results help to correlate changes in behavior with neurological modifications at the neurochemical level, which is an important further step in animal models of diseases [20]. (PhSe)₂ treatment protected against behavioral alterations and inhibition of Na⁺K⁺ ATPase activity caused by malathion, reinforcing the pharmacological potential

of this compound. Some studies have reported that some psychoactive drugs, such as haloperidol, carbamazepine and lithium increase $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase activity [12,36].

An interesting finding of our study was the lack of malathion effect on MAO-A or MAO-B activity in cerebral cortex of rats. MAO is an enzyme responsible for the metabolism of biologically important active amines, that inactivates neurotransmitter monoamines like dopamine (MAO-B), noradrenaline and serotonin (MAO-A). Thus, we can suggest that MAO activity is not implicated in the increase of the immobility time in the FST caused by malathion in this experimental protocol. In fact, repeated doses of $(\text{PhSe})_2$ did not alter cerebral cortex MAO activity, indicating that MAO activity was not involved in its antidepressant effect.

Even though malathion is known to inhibit AChE activity [8,35], an effect that is involved in the neurotoxicity elicited by this compound, AChE activity was not altered in this experimental protocol. In accordance with these data are those reported by Brocardo et al. [6]. Therefore, we can infer that there is no cholinergic toxicity induced by malathion in this study.

Our data pointed out no change in TBARS levels, non-enzymatic (NPSH and ascorbic acid levels) and enzymatic (CAT, GPx, GR, GST activities) antioxidant defenses in cerebral cortex of rats exposed to malathion. Conversely, other authors have demonstrated that the oxidative stress is an important component to the mechanism of malathion toxicity [2,18,34,44]. It is difficult clearly to explain why the parameters of oxidative stress were not changed by malathion exposure. Probably the schedule of protocol exposure was the accountable for the lack of alteration in these parameters. Besides, concomitant administration of $(\text{PhSe})_2$ and malathion did not alter oxidative stress in cerebral cortex of rats.

In summary, we demonstrate that repeated administration of $(\text{PhSe})_2$ exerted antidepressant-like effect on rats concomitantly exposed to the low dose of malathion. Moreover, we suggest that cerebral cortex $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase activity is, at least in part, involved in $(\text{PhSe})_2$ antidepressant-like behavior.

Acknowledgements

The financial support by CAPES, CNPq and Brazilian Neuroscience Network (IBNet) is gratefully acknowledged.

References

- [1] H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126.
- [2] R.S. Ahmed, V. Seth, S.T. Pasha, B.D. Banerjee, Influence of dietary ginger (*Zingiber officinale* Rosc) on oxidative stress induced by malathion in rats, *Food Chem. Toxicol.* 38 (2000) 443–450.
- [3] F.L. Assini, K.D. Zanette, P.S. Brocardo, P. Pandolfo, A.L.S. Rodrigues, R.N. Takahashi, Behavioral effects and ChE measures after acute and repeated administration of malathion, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20 (2005) 443–449.
- [4] B.D. Banerjee, Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends, *Rev. Environ. Health* 16 (2001) 1–40.
- [5] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein–dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [6] P.S. Brocardo, F. Assini, J.L. Franco, P. Pandolfo, Y.M.R. Muller, R.N. Takahashi, A.L. Dafre, A.L.S. Rodrigues, Zinc attenuates malathion-induced depressant-like behavior and confers neuroprotection in the rat brain, *Toxicol. Sci.* 97 (2007) 140–148.
- [7] I. Carlberg, B. Mannervik, Glutathione reductase, *Methods Enzymol.* 113 (1985) 484–489.
- [8] R.L. Carr, H.W. Chambers, J.A. Guarisco, J.R. Richardson, J. Tang, J.E. Chambers, Effects of repeated oral postnatal exposure to chlorpyrifos on open-field behavior in juvenile rats, *Toxicol. Sci.* 59 (2001) 260–267.
- [9] W.H. Chambers, Organophosphorus compounds: an overview, in: J.E. Chambers, P.E. Levi (Eds.), *Organophosphates, Chemistry, Fate, and Effects*, Academic Press, San Diego, CA, 1992, pp. 3–17.
- [10] C. Colosio, M. Tiramani, M. Maroni, Neurobehavioral effects of pesticides: state of the art, *Neurotoxicology* 24 (2003) 577–591.
- [11] R.S. El-Mallakh, R. Li, Is the $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase the link between phosphoinositide metabolism and bipolar disorder? *J. Neuropsychiatr.* 5 (1993) 361–368.
- [12] R.S. El-Mallakh, R.J. Wyatt, The $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase hypothesis for bipolar illness, *Biol. Psychiatry* 37 (1995) 235–244.
- [13] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem.* 82 (1959) 70–77.
- [14] G.L. Ellman, D.K. Courtney, V. Andres, R.M. Featherstone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* 7 (1961) 88–95.
- [15] H.M. Elsheikha, H.S. Hussein, M.H. Rahbar, Clinico-pathological effects of Schistosoma mansoni infection associated with simultaneous exposure to malathion in Swiss outbred albino mice, *Acta Trop.* 108 (2008) 11–19.
- [16] C.H. Fiske, Y.J. Subbarow, The calorimetric determination of phosphorus, *Biol. Chem.* 66 (1925) 375–381.
- [17] P. Flessel, P.J. Quintana, K. Hooper, Genetic toxicity of malathion: a review, *Environ. Mol. Mutagen.* 22 (1993) 7–17.
- [18] J.J. Fortunato, G. Feier, A.M. Vitali, Malathion-induced oxidative stress in rat brain regions, *Neurochem. Res.* 31 (2006) 671–678.
- [19] J. Fritze, The adrenergic–cholinergic imbalance hypothesis of depression: a review and a perspective, *Rev. Neurosci.* 41 (1993) 63–93.
- [20] G.D. Gamaro, E.L. Streck, C. Matte, M.E. Prediger, A.T.S. Wyse, C. Dalmaz, Reduction of hippocampal $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression, *Neurochem. Res.* 28 (2003) 1339–1344.
- [21] M. Garcia-Alloza, F.J. Gil-Bea, M. Diez-Ariza, C.P. Chen, P.T. Francis, B. Lasheras, M.J. Ramirez, Cholinergic–serotonergic imbalance contributes to cognitive and behavioral symptoms in Alzheimer's disease, *Neuropsychologia* 43 (2005) 442–449.
- [22] F. Gultekin, The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (in vitro), *Arch. Toxicol.* 74 (2000) 533–538.
- [23] W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby, Glutathione S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 7130–7139.
- [24] A. Hazarika, S.N. Sarkar, S. Hajare, M. Katarina, J.K. Malik, Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study, *Toxicology* 185 (2003) 1–8.
- [25] M.C. Jacques-Silva, C.W. Nogueira, L.C. Broch, E.M.M. Flores, J.B.T. Rocha, Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice, *Pharmacol. Toxicol.* 88 (2001) 119–125.
- [26] M. Kralj, A rapid microfluorimetric determination of monoamine oxidase, *Biochem. Pharmacol.* 14 (1965) 1683–1685.
- [27] M. Maroni, C. Colosio, A. Ferioli, A. Fait, Biological monitoring of pesticide exposure: a review, *Toxicology* 7 (2000) 1–118.
- [28] T. Matsumoto, T. Furuta, Y. Nimura, O. Suzuki, 3-(p-Hydroxyphenyl)propionic acid as a new fluorogenic reagent for amine oxidase assays, *Anal. Biochem.* 138 (1984) 133–136.
- [29] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.* 95 (1979) 351–358.
- [30] T. Parron, A.F. Hernandez, E. Villanueva, Increased risk of suicide with exposure to pesticides in an intensive agricultural area. A 12-year retrospective study, *Forensic. Sci. Int.* 79 (1996) 53–63.
- [31] C. Paulmier, Selenoorganic functional groups, in: C. Paulmier (Ed.), *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*, 1st ed., Pergamon Press, Oxford, 1986, pp. 25–51.
- [32] E.S. Paykel, Depression: major problem for public health, *Epidemiol. Psychiatr. Soc.* 15 (2006) 4–10.
- [33] R.D. Porsolt, M. Le Pichon, M. Jalfre, Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments, *Nature* 266 (1977) 730–732.
- [34] F.P. Possamai, J.J. Fortunato, G. Feier, F.R. Agostinho, J. Quevedo, D. Willeml, F. Dal-Pizzol, Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23 (2007) 198–204.
- [35] Z.R. Ramos, J.J. Fortunato, F.R. Agostinho, M.R. Martins, M. Correa, M.R. Schetinger, F. Dal-Pizzol, J. Quevedo, Influence of malathion on acetylcholinesterase activity in rats submitted to a forced swimming test, *Neurotoxicol. Res.* 9 (2006) 285–290.
- [36] P.L. Reddy, S. Khanna, M.N. Subhash, S.M. Channabasavanna, B.S. Rao, Erythrocyte membrane sodium–potassium adenosine triphosphatase activity in affective disorders, *J. Neural. Transm. Gen. Sect.* 89 (1992) 209–218.
- [37] T.J. Reidy, R.M. Bowler, S.S. Rauch, G.I. Pedroza, Pesticide exposure and neuropsychological impairment in migrant farm workers, *Arch. Clin. Neuropsychol.* 7 (1992) 85–95.
- [38] R.M. Salvi, D.R. Lara, E.S. Ghisol, L.V. Portela, R.D. Dias, D.O. Souza, Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate, *Pest. Toxicol. Sci.* 72 (2003) 267–271.
- [39] C.C. Sanchez-Mateo, C.X. Bonkanka, B. Prado, R.M. Rabanal, Antidepressant activity of some *Hypericum reflexum* L. fil. extracts in the forced swimming test in mice, *J. Ethnopharmacol.* 112 (2007) 115–121.
- [40] J. Sarko, Antidepressants, old and new. A review of their adverse effects and toxicity in overdose, *Emerg. Med. Clin. North Am.* 18 (2000) 637–654.
- [41] L. Savegnago, M. Trevisan, D. Alves, J.B.T. Rocha, C.W. Nogueira, G. Zeni, Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide, *Environ. Toxicol. Phar.* 21 (2006) 86–92.
- [42] L. Savegnago, C.R. Jesse, L.G. Pinto, J.B.T. Rocha, C.W. Nogueira, G. Zeni, Monoaminergic agents modulate antidepressant-like effect caused by diphenyl diselenide in rats, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 31 (2007) 1261–1269.
- [43] L. Savegnago, C.R. Jesse, L.G. Pinto, J.B.T. Rocha, D.A. Barancelli, C.W. Nogueira, G. Zeni, Diphenyl diselenide exerts antidepressant-like and anxiolytic-like effects in mice: involvement of 1-arginine-nitric oxide-soluble guanylate cyclase pathway in its antidepressant-like action, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 88 (2008) 418–426.

- [44] S. Sodhi, A. Sharma, A.P.S. Brar, R.S. Brar, Effect of α -tocopherol and selenium on antioxidant status, lipid peroxidation and hepatopathy induced by malathion in chicks, *Pestic. Biochem. Physiol.* 90 (2008) 82–86.
- [45] R. Soto-Otero, E. Mendez-Alvarez, A. Hermida-Ameijeiras, I. Sanchez-Sellero, A. Cruz-Landeira, M.L. Lamas, Inhibition of brain monoamine oxidase activity by the generation of hydroxyl radicals: potential implications in relation to oxidative stress, *Life Sci.* 69 (2001) 879–889.
- [46] R.N. Walsh, R.A. Cummins, The open-field test: a critical review, *Psychol. Bull.* 83 (1976) 482–504.
- [47] A. Wendel, Glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.* 77 (1981) 325–333.

5. DISCUSSÃO

O uso intensivo de agrotóxicos tem causado sérias conseqüências ao meio ambiente e à saúde dos seres humanos, principalmente aos trabalhadores rurais. Entre os diversos efeitos tóxicos causados por essas substâncias merece destaque os distúrbios neurocomportamentais, incluindo a depressão. Cada vez mais freqüente, a depressão é um transtorno comportamental grave que pode levar a pessoa até mesmo ao suicídio. Entre os agrotóxicos relacionados com casos de depressão em humanos estão os inseticidas organofosforados tais como o malation (Salvi et al., 2003).

Considerando o número crescente de casos de depressão e o fato de que os seres humanos estão cada vez mais expostos a organofosforados, torna-se necessária a busca por novos compostos antidepressivos com ação mais rápida e com menores efeitos colaterais. Um composto orgânico de selênio com importantes propriedades farmacológicas já descritas na literatura é o $(\text{PhSe})_2$. Dentre essas propriedades está a do tipo antidepressiva (Savegnago et al., 2007) e do tipo ansiolítica (Savegnago et al., 2008).

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho consistiu em avaliar o efeito do tipo antidepressivo do $(\text{PhSe})_2$, um composto orgânico de selênio, em um modelo de depressão induzida por malation em ratos. Os resultados confirmaram que o malation aumenta o tempo de imobilidade no TNF sem alterar a atividade locomotora no TCA. O tratamento com $(\text{PhSe})_2$ melhorou a performance dos animais no TNF sem que houvesse alteração no número de cruzamentos no TCA. Houve uma inibição da atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ nos animais tratados somente com malation e essa inibição foi prevenida pelo $(\text{PhSe})_2$. A exposição ao malation não alterou os parâmetros de estresse oxidativo bem como as atividades das enzimas AChE e MAO.

O TNF é um modelo preditivo para o estudo da depressão em animais experimentais proposto por Porsot et al. (1977). Esse modelo baseia-se na observação de que ratos nadando em um espaço confinado, de onde não podem escapar, após um período de alguns minutos adotam uma postura de imobilidade que lhes permite apenas manter a cabeça fora da água (pré-teste), comportamento que se acentua quando o animal é exposto novamente a esta situação dentro de um

período de 24 horas (teste). A este comportamento de imobilidade os autores denominaram “desespero comportamental” que é interpretado como desistência do animal de fugir da situação incontrolável. Para descartar uma possível interferência da atividade locomotora no tempo de imobilidade dos animais foi realizado o TCA, um modelo para a avaliação da atividade locomotora de animais experimentais.

Nesse trabalho foi observado que a administração intraperitoneal de malation na dose de 50 mg/kg, uma vez ao dia durante três dias, aumenta o tempo de imobilidade dos animais no TNF sem alterar a atividade locomotora no TCA, o que indica um comportamento do tipo depressivo. O $(\text{PhSe})_2$ administrado concomitantemente na dose de 50 mg/kg pela via oral demonstrou um efeito do tipo antidepressivo, uma vez que preveniu o aumento do tempo de imobilidade causado pelo malation sem alterar a atividade locomotora dos animais.

A dose de $(\text{PhSe})_2$ utilizada nesse estudo (50 mg/kg) apresenta uma baixa toxicidade, podendo ser considerada segura. Dados da literatura mostram que a DL_{50} oral do $(\text{PhSe})_2$ em ratos machos é de 312 mg/kg (=1mmol/kg). Além disso, a administração oral de $(\text{PhSe})_2$ não altera as atividades das enzimas aspartato e alanina aminotransferase (AST e ALT) bem como os níveis de uréia e creatinina no plasma, o que indica que esse composto não causa toxicidade hepática nem renal (Wilhelm et al., 2009).

$\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase é a enzima responsável por manter e restabelecer, após cada despolarização, o gradiente iônico responsável pela excitabilidade neuronal. Dessa forma, uma alteração da atividade dessa enzima pode trazer sérias conseqüências para a função neuronal. Alguns estudos mostraram que a diminuição da atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase no cérebro está associada a distúrbios afetivos e psiquiátricos como a depressão (El-Mallakh e Li, 1993; El-Mallakh e Wyatt, 1995; Gamaro et al., 2003). El-Mallakh e Wyatt (1995) propuseram que alterações na atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase podem afetar a excitabilidade e atividade neuronais. Mais especificamente, a redução na atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase poderia levar à mania e à depressão por aumentar a excitabilidade da membrana dos neurônios e diminuir a liberação de neurotransmissores.

Nesse trabalho, associado ao comportamento do tipo depressivo observado no TNF, os animais expostos ao malation apresentaram uma diminuição da atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase no córtex cerebral. Apesar de o exato mecanismo pelo qual o malation inibe essa enzima ainda não ser conhecido, os resultados obtidos

indicam que as alterações comportamentais causadas pelo malation estão relacionadas com a atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$. Outro resultado importante desse estudo foi que o tratamento com $(\text{PhSe})_2$ protegeu contra a inibição dessa enzima, indicando que o efeito do tipo antidepressivo observado no TNF está associado à atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$.

As monoaminas serotonina, noradrenalina e dopamina são neurotransmissores que geralmente estão envolvidos na patogênese da depressão e desempenham um importante papel no efeito antidepressivo de diversos medicamentos (Millan, 2004; Papakostas, 2006). A MAO é a enzima que está envolvida no metabolismo dessas monoaminas sendo responsável pela regulação da concentração intracelular desses neurotransmissores no cérebro. Portanto, um funcionamento anormal dessa enzima pode estar envolvido em diversos distúrbios psiquiátricos incluindo a depressão (Deniker, 1984). No entanto, nesse trabalho a atividade da MAO não foi alterada em nenhum dos grupos experimentais, o que indica que essa enzima não está envolvida nas alterações comportamentais observadas no TNF.

A inibição da AChE é considerada o principal mecanismo de toxicidade dos OF. De fato, estudos mostram que a atividade dessa enzima está envolvida nos efeitos neurotóxicos causados pelo malation (Ramos et al., 2006; da Silva et al., 2006). No entanto, nesse trabalho não foi observado toxicidade colinérgica, uma vez que não houve alteração na atividade da AChE.

Há evidências de que os efeitos tóxicos causados pelos OF devem-se também às suas propriedades pró-oxidantes (Verma e Srivastava, 2001; Ranjbar et al., 2002). Foi demonstrado que o estresse oxidativo é um dos mecanismos de toxicidade do malation, uma vez que a exposição a esse composto aumenta a peroxidação lipídica de eritrócitos, fígado e cérebro de roedores (Akhgari et al., 2003; Fortunato et al., 2006). No entanto, no protocolo de exposição utilizado no presente estudo, não foi evidenciado qualquer alteração nos parâmetros de estresse oxidativo avaliados. Dessa forma, descarta-se o envolvimento de um mecanismo antioxidante no efeito do tipo antidepressivo do $(\text{PhSe})_2$ nesse modelo de depressão.

A falta de efeito pró-oxidante do malation observada nesse estudo está de acordo com outros autores. Trevisan et al. (2008) demonstraram que o malation (50 mg/kg) administrado uma vez ao dia durante três dias não altera os parâmetros de estresse oxidativo no córtex e no hipocampo do cérebro de ratos. No entanto, alguns

estudos mostraram a indução de estresse oxidativo pelo malation em cérebro de ratos em doses maiores e em tratamentos mais prolongados (Brocardo et al., 2005; Fortunato et al., 2006b).

Nesse contexto, os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que o $(\text{PhSe})_2$ exerce um efeito do tipo antidepressivo na depressão induzida por malation em ratos. Esse efeito está, pelo menos em parte, envolvido com a atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nessa dissertação, é possível concluir que:

- A administração de $(\text{PhSe})_2$ pela via oral demonstrou um efeito do tipo antidepressivo em ratos concomitantemente expostos ao malation.
- A atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase de córtex cerebral, está relacionada, pelo menos em parte, com o efeito do tipo antidepressivo do $(\text{PhSe})_2$.
- A exposição ao malation não alterou os parâmetros de estresse oxidativo bem como as atividades das enzimas AChE e MAO.

7. PERSPECTIVAS

Considerando os resultados obtidos nesta dissertação, as perspectivas para trabalhos posteriores são:

- Avaliar o envolvimento de outros sistemas de neurotransmissão no efeito do tipo depressivo induzido pelo malation.
- Investigar o mecanismo através do qual o $(\text{PhSe})_2$ exerce o efeito do tipo antidepressivo.

8. REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, M. et al. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. **Comp. Biochem. Physiol. C, Comp. Pharmacol. Toxicol.** 137, 29-34, 2004.

AKHGARI, M. et al. Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. **Hum. Exp. Toxicol.** 22, 205-211, 2003.

ALDRIDGE, J.E. et al. Serotonergic systems targeted by developmental exposure to chlorpyrifos: Effects during different critical periods. **Environ. Health Perspect.** 111, 1736-1743, 2003.

ARTEEL, G.E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 10, 153-158, 2001.

ASSINI, F.L. et al. Behavioral effects and ChE measures after acute and repeated administration of malathion in rats. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 20, 443-449, 2005.

BANERJEE, B.D. et al. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. **Toxicol. Lett.** 107, 33-47, 1999.

BARBOSA, N.B.V. et al. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress. **Chem. Biol. Interact.** 163, 230-238, 2006.

BARBOSA, N.B.V. et al. Diphenyl diselenide supplementation delays the development of *N*-nitroso-*N*-methylurea-induced mammary tumors. **Arch. Toxicol.** 82, 655-663, 2008.

BEHNE, D.; KYRIAKOPOULOS, A. Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 173, 1143-1149, 1990.

BORGES, L.P. et al. Oral administration of diphenyl diselenide protects against cadmium-induced liver damage in rats. **Chem. Biol. Interact.** 171, 15-25, 2008.

BORGES, V.C. et al. Organochalcogens affect the glutamatergic neurotransmission in human platelets. **Neurochem. Res.** 29, 1505-1509, 2004.

BORGES, V.C. et al. Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na⁺ K⁺ ATPase activity in rats. **Toxicology** 215, 191-197, 2005.

BRENNER, L. Malathion. **J. Pestic. Reform** 12, 29-42, 1992.

BROCARDO, P.S. et al. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride. **Toxicology** 207, 283-291, 2005.

BROCARDO, P.S. et al. Zinc attenuates malathion-induced depressant-*like* behavior and confers neuroprotection in the rat brain. **Toxicol. Sci.** 97, 140-148, 2007.

BURATTI, F.M. et al. Malathion bioactivation in the human liver: the contribution of different cytochrome P-450 isoforms. **Drug Metab. Dispos.** 33, 295-302, 2005.

BURK, R.F. Selenium, an antioxidant nutrient. **Nutr. Clin. Care** 5, 75-79, 2002.

COCKER, J. et al. Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides. **Toxicol. Lett.** 134, 97-103, 2002.

COLOSIO, C.; TIRAMANI, M.; MARONI, M. Neurobehavioral effects of pesticides: states of the art. **Neurotoxicology** 24, 577-591, 2003.

COMASSETO, J.V. Vinylic selenides. **J. Organomet. Chem.** 253, 131-181, 1983.

COSTA, L.G. Current issues in organophosphate toxicology. **Clin. Chim. Acta** 366, 1-13, 2006.

DENIKER, P. The search for new antidepressant and related drugs. In: TIPTON, K.F.; DOSTERT, D.; BENEDETTI, M.S., editors. Monoamine oxidase and diseases, prospects for therapy with reversible inhibitors. New York, NY: Academic press, pp. 3-8, 1984.

DILSAVER, S.C. Cholinergic mechanisms in depression. **Brain Res.** 396, 285-316, 1986.

EDDLESTON, M. et al. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. **Lancet** 371, 597-607, 2008.

EL-ETRI, M.M. et al. Brain norepinephrine reductions in soman-intoxicated rats: Association with convulsions and AChE inhibition, time course, and relation to other monoamines. **Exp. Neurol.** 118, 153-163, 1992.

EL-MALLAKH, R.S.; LI, R. Is the Na⁺ K⁺ ATPase the link between phosphoinositide metabolism and bipolar disorder? **J. Neuropsychiatr.** 5, 361-368, 1993.

EL-MALLAKH, R.S.; WYATT, R.J. The Na⁺ K⁺ ATPase hypothesis for bipolar illness. **Biol. Psychiatry** 37, 235-244, 1995.

ERECINSKA, M.; SILVER, I.A. Ions and energy in mammalian brain. **Prog. Neurobiol.** 43, 37-71, 1994.

FLESSEL, P.; QUINTANA, P.J.; HOOPER, K. Genetic toxicity of malathion: a review. **Environ. Mol. Mutagen.** 22, 7-17, 1993.

FORTUNATO, J.J. et al. Lipid peroxidative damage on malathion exposure in rats. **Neurotox. Res.** 9, 23-28, 2006a.

FORTUNATO, J.J. et al. Malathion-induced oxidative stress in rat brain regions. **Neurochem. Res.** 31, 671-678, 2006b.

FRITZE, J. The adrenergic-cholinergic imbalance hypothesis of depression: a review and a perspective. **Rev. Neurosci.** 41, 63-93, 1993.

GAMARO, G.D. et al. Reduction of hippocampal Na⁺ K⁺ ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression. **Neurochem. Res.** 28, 1339-1344, 2003.

GARCIA-ALLOZA, M. et al. Cholinergic-serotonergic imbalance contributes to cognitive and behavioral symptoms in Alzheimer's disease. **Neuropsychologia** 43, 442-449, 2005.

GHISLENI, G. et al. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunoccontent. **Brain. Res.** 986, 196-199, 2003.

HAWKES, W.C.; HORNBOSTEL, L. Effects of dietary selenium on mood in healthy men living in a metabolic research unit. **Biol. Psychiatry** 39, 121-128, 1996.

HOLMGREN, A. Thioredoxin. **Annu. Rev. Biochem.** 54, 237-271, 1985.

JADHAV, R.K. et al. Distribution of malathion in body tissues and fluids. **Forensic Sci. Int.** 52, 223-229, 1992.

KELLER, M.B. et al. Time to recovery, chronicity, and levels of psychopathology in major depression. A 5-year prospective follow-up of 431 subjects. **Arch. Gen. Psychiatry** 49, 809-816, 1992.

KESSLER, R.C. et al. Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. **Arch. Gen. Psychiatry** 51, 8-19, 1994.

LARINI, L. Praguicidas. In: OGA, S. Fundamentos de toxicologia. São Paulo: Atheneu. pp. 515, 1996.

LESCH, K.P. et al. Regional brain expression of serotonin transporter mRNA and its regulation by reuptake inhibiting antidepressants. **Mol. Brain Res.** 17, 31-35, 1993.

LEVIN, H.S.; RODNITZKY, R.L. Behavioral effects of organophosphate in man. **Clin. Toxicol.** 9, 391-403, 1976.

LUCHESE, C.; PINTON, S.; NOGUEIRA, C.W. Brain and lungs of rats are differently affected by cigarette smoke exposure: antioxidant effect of an organoselenium compound. **Pharmacol. Res.** 59, 194-201, 2009.

MAES, M. et al. Lower serum vitamin E concentrations in major depression. Another marker of lowered antioxidant defenses in that illness. **J. Affect. Disord.** 58, 241-246, 2000.

MARONI, M. et al. Biological Monitoring of Pesticide Exposure: a review. **Toxicology** 143, 1-118, 2000.

MEARNS, J.; DUNN, J.; LEES-HALEY, P.R. Psychological effects of organophosphate pesticides: a review and call for psychologists. **J. Clin. Psychol.** 50, 286-294, 1994.

MEINKING, T.L. et al. Efficacy of a reduced application time of ovide lotion (0.5% malathion) compared to nix creme rinse (1% permethrin) for the treatment of head lice. **Pediatr. Dermatol.** 21, 670-674, 2004.

MILLAN, M.J. The role of monoamines in the actions of established and "novel" antidepressant agents: a critical review. **Eur. J. Pharmacol.** 500, 371-384, 2004.

MORETTO, A. Experimental and clinical toxicology of anticholinesterase agents. **Toxicol. Lett.** 103, 509-513, 1998.

NAVARRO-ALARCÓN, M.; LÓPEZ-MARTINEZ, M.C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **Sci. Total Environ.** 249, 347-371, 2000.

NEMEROFF, C.B.; OWENS, M.J. Treatment of mood disorders. **Nat. Neurosci.** 5, 1068-1070, 2002.

NOGUEIRA, C.W. et al. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. **Brain Res.** 906, 157-163, 2001.

NOGUEIRA, C.W. et al. Organochalcogens effects on δ -aminolevulinatase activity from human erythrocytic cells in vitro. **Toxicology** 191, 169-178, 2003a.

NOGUEIRA, C.W. et al. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. **Toxicology** 183, 29-37, 2003b.

NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chem. Rev.** 104, 6255-6286, 2004.

NOLEN, W.A. et al. Reversible monoamine oxidase-A inhibitors in resistant major depression. **Clin. Neuropharmacol.** 16, 69-76, 1993.

PAPAKOSTAS, G.I. Dopaminergic-based pharmacotherapies for depression. **Eur. Neuropsychopharmacol.** 16, 391-402, 2006.

PAPP, L.V. et al. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxid. Redox Signal.** 9, 775-806, 2007.

PARNHAM, M.J.; GRAF, E. Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. **Prog. Drug Res.** 36, 10-47, 1991.

PARRÓN, T.; HERNANDEZ, A.F.; VILLANUEVA, E. Increased risk of suicide with exposure to pesticides in an intensive agricultural area. A 12-year retrospective study. **Forensic Sci. Int.** 79, 53-62, 1996.

PAULO, J.R. de; HORTIZ, L.A. Understanding depression; Jonh Wiley & Sons. 2000.

PETROIANU, G.A. et al. Ranitidine in acute high-dose organophosphate exposure in rats: effect of the time-point of administration and comparison with pyridostigmine. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** 99, 312-316, 2006.

PORSOLT, R.D.; PICHON, M. Le; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature** 266, 730-732, 1977.

POSSAMAI, F.P. et al. Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 23, 198-204, 2007.

PRATT, L. Depression, psychotropic medication, and risk of myocardial infarction. Prospective data from the Baltimore ECA follow-up. **Circulation** 94, 3123-3129, 1996.

PRIGOL, M. et al. Diphenyl diselenide-induced seizures in rat pups: possible interaction with glutamatergic system. **Neurochem. Res.** 33, 996-1004, 2008.

PRIGOL, M.; LUCHESE, C.; NOGUEIRA, C.W. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative stress caused by acute physical exercise in skeletal muscle and lungs of mice. **Cell Biochem. Funct.** 27, 216-222, 2009a.

PRIGOL, M. et al. Convulsant effect of diphenyl diselenide in rats and mice and its relationship to plasma levels. **Toxicol. Lett.** 189, 35-39, 2009b.

PRIGOL, M. et al. Convulsant action of diphenyl diselenide in rat pups: measurement and correlation with plasma, liver and brain levels of compound. **Arch. Toxicol.** 2009c, DOI 10.1007/s00204-009-0507-y.

RAINES, K.W.; SEIDLER, F.J.; SLOTKIN, T.A. Alterations in serotonin transporter expression in brain regions of rats exposed neonatally to chlorpyrifos. **Brain Res. Dev. Brain Res.** 130, 65-72, 2001.

RAMOS, Z.R. et al. Influence of malathion on acetylcholinesterase activity in rats submitted to a forced swimming test. **Neurotoxicol. Res.** 9, 285-290, 2006.

RANJBAR, A.; PASALAR, P.; ABDOLLAHI, M. Induction of oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in organophosphorous pesticide manufacturing workers. **Hum. Exp. Toxicol.** 21, 179-182, 2002.

RAY, D.E.; RICHARDS, P.G. The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates. **Toxicol. Lett.** 120, 343-351, 2001.

RAYMAN, M.P. The importance of selenium to human health. **Lancet** 356, 233-241, 2000.

REICHE, E.M.; NUNES, S.O.; MORIMOTO, H.K. Stress, depression, the immune system, and cancer. **Lancet Oncol.** 5, 617-625, 2004.

RUSYNIAK, D.E.; NAÑAGAS, K.A. Organophosphate poisoning. **Semin. Neurol.** 24, 197-204, 2004.

SALVI, R.M. et al. Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides. **Toxicol. Sci.** 72, 267-271, 2003.

SANTOS, F.W. et al. Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. **Chem. Biol. Interact.** 151, 159-165, 2005.

SARANDOL, A. et al. Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative antioxidative systems. **Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.** 22, 67-73, 2007.

SARKO, J. Antidepressants, old and new. A review of their adverse effects and toxicity in overdose. **Emerg. Med. Clin. North Am.** 18, 637-654, 2000.

SAVEGNAGO, L. et al. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 21, 86-92, 2006.

SAVEGNAGO, L. et al. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: Evidences for the mechanism of action. **Eur. J. Pharmacol.** 555, 129-138, 2007a.

SAVEGNAGO, L. et al. Monoaminergic agents modulate antidepressant-*like* effect caused by diphenyl diselenide in rats. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry** 31, 1261-1269, 2007b.

SAVEGNAGO, L. et al. Diphenyl diselenide exerts antidepressant-*like* and anxiolytic-*like* effects in mice: Involvement of L-arginine-nitric oxide-soluble guanylate cyclase pathway in its antidepressant-*like* action. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 88, 418-426, 2008.

SCHWARTZ, K.; FOLTZ, P.J. Selenium as a integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **J. Am. Chem. Soc.** 79, 200-214, 1957.

SILVA, A.P. da. Lactational exposure to malathion inhibits brain acetylcholinesterase in mice. **Neurotoxicology** 27, 1101-1105, 2006.

THE MERCK INDEX – An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13th. ed. Whitehouse Station, NJ, pp. 1019, 2001.

SHER, L. Depression and suicidal behavior in alcohol abusing adolescents: possible role of selenium deficiency. **Minerva Pediatr.** 60, 201-209, 2008.

TREVISAN, R. et al. Antioxidant and acetylcholinesterase response to repeated malathion exposure in rat cerebral cortex and hippocampus. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** 102, 365-369, 2008.

TSUBOI, H. Possible connections among job stress, depressive symptoms, lipid modulation and antioxidants. **J. Affect. Disord.** 91, 63-70, 2006.

URSINI, F. et al. Dual function of the seleno-protein PHGPx during sperm maturation. **Science** 285, 1393-1396, 1990.

VAN PRAAG, H.M. et al. Monoamines and abnormal behaviour: a multiaminergic perspective. **Br. J. Psychiatry** 157, 723-734, 1990.

VERMA, R.S.; SRIVASTAVA, N. Chlorpyrifos induced alterations in levels of thiobarbituric acid reactive substances and glutathione in rat brain. **Indian J. Exp. Biol.** 39, 174-177, 2001.

WEIS, S.N. et al. Repeated administration of diphenyl diselenide to pregnant rats induces adverse effects on embryonic/fetal development. **Reprod. Toxicol.** 23, 175-81, 2007.

WHO – World Organization of Health. Toxicological profile for malathion. Agency for toxic substances and disease registry, 2003.

WILHELM, E.A. et al. Introduction of trifluoromethyl group into diphenyl diselenide molecule alters its toxicity and protective effect against damage induced by 2-nitropropane in rats. **Exp. Toxicol. Pathol.** 61, 197-203, 2009.

WINGLER, K.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Gastrointestinal glutathione peroxidase. **Biofactors** 10, 245-249, 1999.

WONG, M.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nat. Rev. Neurosci.** 2, 343-351, 2001.

WORRALL, D.M.; WILLIAMS, D.C. Sodium ion-dependent transporters for neurotransmitter: a review of recent developments. **Biochem. J.** 297, 425-436, 1994.

YAMADA, M.; YASUHARA, H. Clinical pharmacology of MAO inhibitors: safety and future. **Neurotoxicology** 25, 215-221, 2004.

ZANIN, M. et al. Agrotóxicos: a realidade do Paraná. Curitiba: Edição da Secretaria do Meio Ambiente do Paraná, pp. 93, 1992.