



Efeito tóxico dos praguicidas maneb e paraquat sobre a atividade da enzima antioxidante catalase em ratos

Arbo, M.D.¹; Ludwig, M.¹; Ludwig, L.S. ; Alano, A.S.¹;
Zardo, V. ¹ e Steffen, V.M. ^{1*}

¹Laboratório de Toxicologia, Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

Recebido 31/03/06 / Aceito 25/07/06

RESUMO

Os radicais livres estão envolvidos em um grande número de enfermidades do ser humano. O cérebro tem níveis baixos de enzimas antioxidantes e um conteúdo lipídico elevado, tornando-se muito susceptível ao ataque de espécies reativas de oxigênio. Neste trabalho avaliou-se a lipoperoxidação em hipocampo e a atividade da enzima catalase em estriado e hipocampo de ratos tratados com o fungicida maneb (30 mg/kg) e o herbicida paraquat (10 mg/kg). Não houve alteração na lipoperoxidação nem na atividade enzimática no hipocampo dos animais tratados com ambos os praguicidas, porém foi observada uma inibição da catalase no estriado dos ratos tratados com maneb e com paraquat. Com estes resultados pode-se sugerir, de forma preliminar, uma ação tóxica maior sobre centros dopaminérgicos. Estudos sobre a toxicidade destes compostos são essenciais na compreensão do papel destes praguicidas e dos radicais livres na etiologia das doenças. *Palavras-chave:* catalase; paraquat; maneb; estriado; hipocampo; radicais livres.

INTRODUÇÃO

Os radicais livres estão envolvidos em um grande número de enfermidades do ser humano. Evidências têm se acumulado mostrando que o dano gerado pelos radicais livres é importante nas doenças neurodegenerativas, crônico-inflamatórias, vasculares e no câncer (Halliwell, 1994). O cérebro tem níveis relativamente baixos de enzimas antioxidantes e um conteúdo lipídico alto com grande quantidade de ácidos graxos insaturados e catecolaminas, que são substratos susceptíveis ao ataque das espécies reativas de oxigênio (EROs). Várias doenças neurológicas nas quais há envolvimento de radicais livres em sua fisiopatologia estão descritas: doença de Parkinson (DP), doença de Alzheimer (DA), isquemia, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, doenças inflamatórias, epilepsia, etc. (Przedborski et al., 1996; Bem-Menachem et al., 2000).

EROs, assim como os radicais superóxido e hidroxila

e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são produzidas também sob condições fisiológicas normais. O H_2O_2 não é por si só um radical livre, mas em altas concentrações pode reagir com o superóxido ou ferro produzindo o radical hidroxila altamente reativo. A conversão do H_2O_2 para H_2O pode ser feita pela catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GSH-Px) (Michiels et al., 1994; Simonié et al., 2000). O radical hidroxila formado tem uma grande probabilidade de reagir com moléculas não-radicalares transformando-as em radicais livres secundários. Esta reação é encontrada durante a lipoperoxidação (LPO) produzindo hidroperóxidos (McCord, 1989; Walz et al., 2000).

O maneb (etileno bis-ditiocarbamato de manganês) é um fungicida orgânico muito usado na nossa agricultura para o controle de pragas, sendo utilizado em hortifrutigranjeiros, fumo, grãos e também em plantas ornamentais. A exposição crônica de humanos ao maneb é epidemiologicamente relacionada com o desenvolvimento de Parkinsonismo e muitos desses casos também são seguidos de altos índices de exposição ocupacional a este fungicida (Ferraz et al., 1988; Meco et al., 1994). Muitos mecanismos foram propostos para explicar a neurotoxicidade dos ditiocarbamatos, entre eles o maneb, os quais incluem catálise e oxidação de catecóis como a dopamina (Fitsanakis et al., 2002), inibição do complexo III da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons (Zhang et al., 2003) e a alteração no ciclo redox celular devido a sua capacidade de quelar metais, como o ferro (Orrenius et al., 1996). Outro mecanismo pelo qual o maneb e outros ditiocarbamatos podem atuar é através do aumento da susceptibilidade ao dano oxidativo, devido a alterações no sistema antioxidante celular (Cereser et al., 2001).

O paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridílio) é um herbicida não-seletivo, extremamente tóxico para humanos (Houze et al., 1990) e animais de laboratório (Ogata & Manabe, 1990; Satoh et al., 1992) que tem causado muitas mortes acidentais ou por suicídio. Sabe-se que o herbicida no organismo sofre um processo redox cíclico onde o paraquat é metabolizado pela NADPH-citocromo P-450 redutase em um intermediário reduzido, radicalar, que produz EROs durante a oxidação com o oxigênio molecular (Bus et al., 1976).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito

*Autor para correspondência: Vera M. Steffen - Departamento de Análises Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Av. Ipiranga - 2752/sala 604 - Santana - CEP: 90610-000 - Porto Alegre - RS - Brasil - Telefone: (51) 3316-5297 / Fax (51) 3316-5437 - E-mail: vsteffen@terra.com.br

dos praguicidas mane b e paraquat sobre a atividade da enzima antioxidante CAT em hipocampo e estriado, estruturas cerebrais relacionadas respectivamente com DA e DP. Para tanto, avaliou-se a LPO em hipocampo, através da medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), e a atividade da CAT em hipocampo e estriado de ratos tratados com o fungicida mane b e o herbicida paraquat.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com três a cinco meses de idade (250-350 g) fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos em caixas plásticas de 47x34x18 cm, sob ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura constante (23 ± 1 °C). Durante todas as etapas, os animais tiveram livre acesso a água e alimento. A manipulação animal foi realizada seguindo os princípios éticos relatados por Goldim (1995) e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Tratamento

Os animais (n=15) foram divididos em três grupos: controle (n=5), tratado mane b (n=5) e tratado paraquat (n=5) que receberam, respectivamente, solução salina 0,9% (volume médio de 0,3 mL), 30 mg/kg de mane b e 10 mg/kg de paraquat, por via intraperitoneal. O tratamento teve duração de quatro semanas e as doses foram administradas duas vezes por semana com intervalos constantes. Os praguicidas avaliados foram previamente dissolvidos em solução salina. As doses testadas foram estabelecidas segundo a literatura (Takahashi et al., 1989; Thiruchelvan et al., 2000; McCormack et al., 2002; Nielsen et al., 2006).

Medidas Bioquímicas

Após 24 horas do último tratamento os animais

foram sacrificados através de decapitação com guilhotina, a calota craniana foi aberta e o cérebro foi retirado. As estruturas de interesse, hipocampo e estriado, foram localizadas e dissecadas, sobre gelo, não ultrapassando o tempo de três minutos. Em seguida, as estruturas isoladas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70 °C até utilização.

As estruturas cerebrais isoladas de cada um dos animais dos grupos controle, tratado mane b e tratado paraquat foram individualmente pesadas e homogeneizadas na proporção 1:10 (peso/volume) em tampão fosfato de potássio 10mM (pH 7,6), utilizando homogeneizador de vidro Potter-Elvehjem. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 30.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante de cada amostra foi removido e mantido em gelo durante a realização dos ensaios bioquímicos.

A LPO foi medida através dos níveis de TBA-RS em hipocampo de acordo com o método espectrofotométrico de Esterbauer & Cheeseman (1990).

A atividade da CAT foi determinada espectrofotometricamente, em hipocampo e estriado, por meio da decomposição do H₂O₂ de acordo com o método descrito por Aebi (1984).

A quantificação de proteínas foi realizada de acordo com o método de Lowry et al. (1951), utilizando albumina bovina como padrão.

As análises foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-160 A (Tóquio, Japão). Todos os padrões foram da marca Sigma (MO, EUA) e os demais reagentes de grau analítico.

Análise Estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo Teste *t* de Student para amostras independentes. O nível de significância α foi estabelecido para $p < 0,05$.

RESULTADOS

A Tabela 1 mostra os resultados da quantificação

Tabela 1 - Conteúdo de TBA-RS em homogeneizado de hipocampo de ratos controle (salina), tratados com mane b (30mg/kg) e tratados com paraquat (10mg/kg).

Grupos experimentais	TBA-RS
Controle	5,88 \pm 1,84
Maneb	5,96 \pm 0,84
Paraquat	6,70 \pm 1,90

Os valores são a média \pm desvio padrão, expressos em μ mol/mL, $\zeta = 4$. A análise estatística foi realizada através do teste *t* de Student.

Efeito de Maneb e Paraquat sobre a Catalase

Tabela 2 – Atividade da enzima CAT em homogeneizado de hipocampo e estriado de ratos controle (salina), tratados com maneb (30mg/kg) e tratados com paraquat (10mg/kg).

Grupos experimentais	Hipocampo	Estriado
Controle	1,74 ± 0,42	3,48 ± 0,72
Maneb	1,52 ± 0,25	2,22 ± 0,51 *
Paraquat	1,77 ± 0,15	2,49 ± 0,37 *

Os valores são a média ± desvio padrão expressos em U/mg de proteína, n= 4-5.

* Significância estatística pelo teste *t* de Student (p<0,05).

dos níveis de TBA-RS, onde pode-se observar que nas doses e no período de tratamento avaliado, não houve alteração significativa da LPO no hipocampo dos grupos controle e tratados maneb e paraquat.

A atividade da enzima CAT, apresentada na Tabela 2, foi medida em hipocampo e estriado. No estriado foi observada uma inibição significativa (p< 0,05) de 36,2% na atividade enzimática do grupo que recebeu 30 mg/kg de maneb e 28,5% no grupo que recebeu 10 mg/kg de paraquat.

DISCUSSÃO

Muitos estudos foram publicados a respeito da toxicidade dos praguicidas maneb e paraquat às células dopaminérgicas do sistema nigro-estriatal (Thiruchelvam et al., 2000; McCormack et al., 2002; Nielsen et al., 2006), mas ainda existem poucos sobre a ação destas substâncias no sistema de defesa antioxidante (Barlow et al., 2005). Assim, foram escolhidas para este estudo as regiões cerebrais mais susceptíveis ao estresse oxidativo (hipocampo e estriado) e também as mais atingidas pela DA e DP, respectivamente.

A inibição encontrada na atividade da CAT indica que, se não houver um mecanismo compensatório, como aumento da atividade da GSH-Px, também responsável pela conversão do H₂O₂ em H₂O, o excesso de H₂O₂ pode levar ao aumento do estresse oxidativo e a um dano tecidual. Este dado é importante uma vez que a própria metabolização oxidativa da dopamina, catalisada pela monoamina oxidase, produz H₂O₂ (Ben-Shacar et al., 1995) e, segundo Fitsanakis et al. (2002) o maneb seria um catalisador desta reação.

O paraquat, que também mostrou ação inibitória sobre a CAT, é repetidamente destacado como um fator de risco ambiental pela sua similaridade estrutural com MPP⁺ (íon 1-metil-4-fenilpiridílio), o componente ativo de MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina), um composto sintético que produz DP em humanos expostos (Thiruchelvam et al., 2000). Entretanto, ao contrário dos

estudos realizados por Hung & Lee (1998) com MPTP, que mostrou não alterar significativamente a atividade da CAT no estriado, nossos dados indicam que, apesar da semelhança estrutural, o paraquat altera o sistema antioxidante enzimático nigro-estriatal, diferentemente do MPTP. A inibição da CAT exerceria um papel importante na toxicidade do paraquat, uma vez que a presença deste herbicida facilitaria a redução do íon férrico (Fe⁺³) para o ferroso (Fe⁺²), aumentando significativamente a taxa de formação do radical hidroxila, desde que uma quantidade significativa de H₂O₂ esteja disponível (Van Asbeck et al., 1989).

Diferentemente dos dados obtidos no estriado, nossos resultados demonstraram que não houve aumento significativo da LPO no hipocampo dos animais tratados com ambos os praguicidas. Do mesmo modo, não houve alteração significativa na atividade da CAT na mesma estrutura. Estes dados indicam, de forma preliminar, que haveria uma seletividade maior dos praguicidas maneb e paraquat por centros dopaminérgicos, como é o caso do estriado, rico em receptores de dopamina, ou então, que o tempo de tratamento não foi suficiente para promover dano ao hipocampo. Isso é possível porque algumas estruturas são mais sensíveis a um ambiente oxidativo devido a, entre outras razões, altas concentrações de ferro que podem aumentar as reações oxidativas e a formação de EROs (Bowling & Beal, 1995).

Os resultados obtidos demonstram que tanto o fungicida maneb, quanto o herbicida paraquat, alteram o sistema de proteção antioxidante enzimático inibindo a atividade da CAT no estriado, rico em receptores dopaminérgicos. Assim, a compreensão dos efeitos neurotóxicos destes praguicidas é importante na determinação do papel destes agentes na etiologia das doenças.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a colaboração da Dr. Raquel Bridi. Apoio: Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

ABSTRACT

Toxic effect of pesticides maneb and paraquat on catalase antioxidant enzyme activity in rats

Free radicals are involved in many human diseases, including Alzheimer's disease and Parkinson's disease. The brain is thought to be especially vulnerable to oxidative damage, given its high oxygen consumption, the high levels of polyunsaturated fatty acids and non-regenerative neurons and rather low levels of antioxidant enzymes. In this work, hippocampal lipid peroxidation and catalase enzyme activity in the hippocampus and striatum of rats treated with the fungicide maneb (30 mg/kg) and the herbicide paraquat (10 mg/kg) were estimated by spectrophotometric methods. Neither lipid peroxidation nor the enzymatic activity in the hippocampus were affected in rats treated with either of the pesticides. On the other hand, inhibition of catalase activity was observed in the striatum of rats treated with either maneb or paraquat, indicating a weakening of the enzymatic defense system against free radicals. These findings suggest, preliminarily, a greater toxic action in dopaminergic regions. Understanding the biological effects of these chemicals is important in determining the roles these compounds may play in disease etiologies.

Keywords: catalase; paraquat; maneb; striatum; hippocampus; free radicals.

REFERÊNCIAS

- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-6.
- Barlow BK, Lee DW, Cory-Slechta DA, Opanashuk LA. Modulation of antioxidant defense systems by the environmental pesticide maneb in dopaminergic cells. *Neurotoxicology* 2005;26:63-75.
- Ben-Shakar D, Zuk R, Glinka Y. Dopamine neurotoxicity inhibition of mitochondrial respiration. *J Neurochem* 1995;4:718-23.
- Bem-Menachem E, Kyllerman R, Markleind S. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase function in progressive myoclonus epilepsies. *Epilepsy Res* 2000;40:29-33.
- Bowling AC, Beal MF. Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Life Sci* 1995;56 (14):1151-71.
- Bus JS, Cagen SZ, Olgaard M, Gibson JE. A mechanism of paraquat toxicity in mice and rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1976;35:501-13.
- Cereser C, Boget S, Parvaz P, Revol A. Thiram-induced cytotoxicity is accompanied by a rapid and drastic oxidation of reduced glutathione with consecutive lipid peroxidation and cell death. *Toxicology* 2001;163:153-62.
- Esterbauer H, Cheeseman, KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990;186:407-21.
- Ferraz HB, Bertolucci PHF, Pereira JS, Lima JGC, Andrade LAF. Chronic exposure to the fungicide maneb may produce symptoms and signs of CNS manganese intoxication. *Neurology* 1988;38:550-3.
- Fitsanakis VA, Amarnath V, Moore JT, Montine KS, Zhang J, Montine TJ. Catalysis of catechol oxidation by methal-dithiocarbamate complexes in pesticides. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1714-23.
- Goldim JR. *Pesquisa em saúde e direitos dos animais*. Porto Alegre:HCPA;1995.93p.
- Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet* 1994;344:721-4.
- Houze PFJ, Baud R, Mouy C, Bismuth R, Bourdon R, Scherrmann JM. Toxicokinetics of paraquat in humans. *Hum Exp Toxicol* 1990;9:5-12.
- Hung HC, Lee EHY. MPTP produces differential oxidative stress and antioxidative responses in the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways. *Free Radic Biol Med* 1998;24(1):76-84.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
- McCord JM. Superoxide radical: controversies. *Proc Soc Exp Biol Med* 1989;209:112-7.
- McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA, Di Monte DA. Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis* 2002;10:119-27.
- Meco G, Bonifati V, Vanacore N, Fabrizio E. Parkinsonism after chronic exposure to the fungicide maneb (manganese ethylene-bis-dithiocarbamate). *Scand J Work Environ Health* 1994;20:301-5.
- Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1994;17:235-48.
- Nielsen BS, Larsen EH, Ladefoged O, Lam HR. Neurotoxic effect of maneb in rats as studied by neurochemical and immunohistochemical parameters. *Environ Toxicol Pharmacol* 2006;21:268-75.
- Ogata T, Manabe S. Correlation between lipid peroxidation and morphological manifestation of paraquat-induced lung injury in rats. *Arch Toxicol* 1990;64:7-13.
- Orrenius S, Nobel CS, Van den Dobbelen DJ, Burkitt MJ, Slater AF. Dithiocarbamates and the redox regulation of cell death. *Biochem Soc Trans* 1996;24:1032-8.

Efeito de Maneb e Paraquat sobre a Catalase

Przedborski S, Donaldson DBS, Jakowec M, Kish SJ, Guttman M, Rosoklija G, Hays AP. Brain superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1996;39:158-65.

Satoh M, Naganuma A, Imura N. Effect of preinduction of metallothionein on paraquat toxicity in mice. *Arch Toxicol* 1992;66:145-8.

Simonié A, Laginja J, Varljen J, Zupan G, Eraković V. Lithium plus pilocarpine induced status epilepticus – biochemical changes. *Neurosci Res* 2000;36:157-66.

Takahashi RN, Rogerio R, Zanin M. Maneb enhances MPTP neurotoxicity in mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1989;66:167-70.

Thiruchelvam M, Brockel BJ, Richfield EK, Baggs RB, Cory-Slechta DA. Potentiated and preferential effects of combined paraquat and manebe on nigrostriatal dopamine

systems: environmental risk factors for Parkinson's disease? *Brain Res* 2000;873(2):225-34.

Van Asbeck SW, Hillen FC, Boonen HC, De Jung Y, Dormans JA, Vander Wal NA, Marx JJ, Sangster B. Continuous intravenous infusion of desferrioxamine reduces mortality by paraquat in vitamin E-deficient rats. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:769-73.

Walz R, Moreira JCF, Benfato MS, Quevedo J, Schorer N, Vianna MMR, Klamt F, Dal-Pizzol F. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. *Neurosci Lett* 2000;291:179-82.

Zhang J, Fitsanakis VA, Gu G, Jing D, Ao M, Amarnath V, Montine TJ. Manganese ethylene-bis-dithiocarbamate and selective dopaminergic neurodegeneration in rat: a link through mitochondrial dysfunction. *J Neurochem* 2003;84:336-46.